یافته های نوین کشاورزی
سال پنجم- شماره۱- پاییز ۱۳۸۹

اثر سرب و مس بر برخی صفات فیزیولوژیکی گونه گیاهی خلر (*Lathyrus sativus*)

سیده مهتاب بلادی*، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، باشگاه پژوهشگران جوان، کرج، ایران
علی کاشانی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج ، گروه زراعت و اصلاح نباتات، کرج، ایران.
داوود حبیبی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج ، گروه زراعت و اصلاح نباتات، کرج ، ایران.
فرزاد پاک نژاد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج ، گروه زراعت و اصلاح نباتات، کرج ، ایران.
محیا گلشن، فارغ التحصیل کارشناسی ارشد دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج

چکیده

این تحقیق به منظور بررسی اثرات سرب و مس بر گونه گیاهی خلر در خاک های آلوده به این عناصر صورت پذیرفت. بر این اساس به منظور برآورد و شناسایی توانایی گیاه خلر نسبت به عناصر سنگین سرب و مس آزمایشی در پاییز ۱۳۸۷ بر خلر(*Lathyrus sativus*) رقم زنجان انجام شد. این آزمایش به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملا تصادفی انجام شد. که در این راستا از چهار سطح سرب ($Pb(NO_3)_2$) ۰، ۲۰۰، ٤۰۰ و ۸۰۰ میلی گرم بر کیلو گرم خاک و چهار سطح مس ($Cu(SO_4)_2$) ۰،۱۵۰،۳۰۰ و٤۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم خاک استفاده شد. اگرچه نتایج آزمایش حاکی از افت محتوی کلروفیل کل و غشای لیپیدی تحت سمیت عناصر سنگین سرب و مس بود اما فعالیت بیشتر آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز(SOD) با افزایش سطوح سرب و مس در این گونه گیاهی مانع از تولید بیشتر رادیکال های آزاد اکسیژن تولیدی در این گونه گیاهی شد، به طوری که همبستگی منفی بین محتوی کلروفیل**a**، کلروفیل **b** و کلروفیل کل با آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز(SOD) مشاهده شد، همچنین همبستگی بین ظرفیت مالون دی آلدهید (MDA) که وسیله ای برای اندازه گیری فرایند پراکسیداسیون لیپید است با آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز(SOD) مثبت بود بدین معنی که افزایش ظرفیت این بیومارکر که نشان دهنده ی تولید بیشتر اکسیژن برای تخریب غشای لیپیدی است با فعالیت بیشتر آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز(SOD) برای هضم و حذف بیشتر اکسیژن های مخرب همراه بود. همچنین وضعیت آب در بافت برگ ها (RWC) تحت تاثیر این عناصر قرار نگرفت.

واژه های کلیدی: خلر، کلروفیل، مالون دی آلدهید (MDA)، سوپراکسید دیسموتاز (SOD)

* نویسنده مسئول: E-mail: s_mahtab_beladi@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله: ۸۹/٤/۱ تاریخ پذیرش مقاله: ۸۹/۱۰/۲

مقدمه

فلزات سنگین آلاینده های محیطی مهمی هستند که در خاک وجود دارند به طوری که ممکن است در نتیجه فعالیت های بشری مقادیر این فلزات در نواحی طبیعی و کشاورزی به حد سمی برسد. این عناصر در ایجاد تنش اکسیدی در گیاهان مشارکت دارند (۸)، به این ترتیب که با ایجاد گونه های فعال اکسیژن (ROS) که محصول متابولیسم هوازی اند و شامل ترکیباتی مثل سوپراکسیدها، پراکسید، اکسیژن اتمی و رادیکال های هیدروکسیل می باشند طی واکنش های انتقال الکترون در میتوکندری ها، کلروپلاست ها و پراکسی زوم ها تولید می گردند و در صورتی که غلظت آن‌ها تنظیم نشود می توانند سبب آسیب به پروتیین، غشا و DNA شوند (٤). برخی از یون ها با ویژگی های شدید ردوکس مانند مس و شاید حتی یون هایی که فاقد این ویژگی ها هستند مانند روی و کادمیوم به عنوان آغاز کننده های پراکسیداسیون لیپید غشا و تحریک کننده های تولید گونه های فعال اکسیژن شناخته شده اند (۱۹). مشخص شده است که غلظت اضافی مس به دلیل افزایش گونه های فعال اکسیژن (ROS) در بخش های زیر سلولی موجب افزایش تنش اکسیدی می شود (۹). سرب نیز یک عنصر غیر ضروری است که علاوه بر سمیت زیادی که برای انسان دارد اثرات سوئی نیز بر جوانه زنی بذر، رشد گیاه و فرایند فتوسنتز دارد (۱۲). همچنین سرب باعث کاهش طول ریشه، تولید بیومس، جلوگیری از سنتز کلروفیل ۲ و نیز تخریب سلول و آسیب به کروموزوم (۷)، کاهش جذب مواد معدنی و عدم تعادل در آب و تغییر ساختمان و نفوذپذیری غشا های سلولی می شود (۵). یکی از مهم‌ترین دلایل کاهش کلروفیل ها تخریب آن‌ها بوسیله گونه های فعال اکسیژن (ROS) می باشد (١٦). پراکسیداسیون لیپید نیز به دلیل فعالیت لیپوکسی ژنازها افزایش می یابد، مالون دی آلدهید (MDA) فراوان ترین محصول حاصل از تجزیه لیپید آلدهیدی به شمار می آید (٤). در تحقیق علی و همکاران (۲۰۰۳) بر گونه *Salix acmophylla* Bioss اثرات سرب، نیکل و مس بر این گونه گیاهی نشان داد که هر سه فلز مورد مطالعه سبب کاهش ظرفیت کل کلروفیل ۲ بسته به میزان غلظت فلز شدند. اثرات نامطلوب فلزات در این مورد به صورت Pb>Ni>Cu بود، به علاوه کاهش ظرفیت کل کلروفیل با افزایش سطح مالون دی آلدهید(MDA) همراه بود (۱). بنابراین گیاهانی که در مجاورت تنش Heavy metal قرار دارند اغلب با تنش اکسیداتیو روبه‌رو می شوند (۱۹). گیاهان برای محافظت از خود در مقابل آسیب های ناشی از رادیکال های اکسیژنی دارای یک سیستم آنتی اکسیدان هستند(۸). مقاومت گیاهان نسبت به سرب به توانایی آنها در محدود کردن سرب به دیواره های سلولی، سنتز اسمولیت ها و فعال سازی سیستم تدافعی آنتی اکسیدانی مربوط می باشد(۱۷). از آن جایی که مس قادر به کاتالیز کردن و تسریع ایجاد ROS است عناصر و موادی که دارای قابلیت های آنتی اکسیدانی هستند، می توانند از بروز آسیب های اکسیدی ناشی از مس جلوگیری کرده و محافظت به عمل آورند(٦). گفته می شود که آنزیم های آنتی اکسیدان، سیستم های تدافعی مهمی برای گیاهان و جهت

مقابله با تنش اکسیدی ناشی از فلزات به شمار می آیند (۱).سوپراکسید دیسموتازها (SOD)، عبارت اند از آنزیم های فلزی که عدم تناسب رادیکال های آزاد سوپراکسید را به پراکسید هیدروژن و اکسیژن کاتالیز می کند و به نظر می رسد که نقش مهمی را در حفاظت از سلولها در مقابل اثرات زیانبخش غیر مستقیم ناشی از این رادیکال ها بر عهده دارند (۱۳). البته نرخ تولید (ROS) وابسته به گونه، مدت تنش، سن گیاه و مهمتر از همه شدت تنش می باشد (۱٦).

از آن‌جایی که گونه گیاهی خلر(*Lathyrus sativus*) یک گونه از لگوم های یکساله و همه جا زی است که از قابلیت مقاومت در برابر شرایط نامطلوب رشد برخوردار بوده و به عنوان یکی از منابع ژنی قابل توجه محسوب می شود و از آن‌جا که از طریق حفظ تعادل سلولی با کمبود آب مقابله می کند و به طور کلی نسبت به تنش های غیر زنده و حتی زنده مقاومت ایجاد نماید (۳) در این تحقیق فرض کردیم که این گونه گیاهی به دلیل برخورداری از مقاومت قادر به مقابله با تنش فلزات سنگین در سطح سلولی در خاک های آلوده به این گونه عناصر است، بنابراین به بررسی میزان فعالیت مهمترین آنزیم آنتی اکسیدانی و برخی از صفات گیاهی و همبستگی بین این صفات پرداخته شد.

مواد و روش ها

تحقیق حاضر به صورت یک آزمایش گلخانه ای در پاییز ۱۳۸۷ در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی کرج انجام پذیرفت. میزان رطوبت نسبی گلخانه ٦۰ درصد و حداقل و حداکثر درجه حرات به ترتیب برابر با ۱٦ و ۳۲ درجه سانتی گراد بود. در این آزمایش گونه گیاهی خلر (*Lathyrus sativus*) با استفاده از چهار سطح سرب ($Pb(NO_3)_2$) (۰، ۲۰، ٤۰۰ و ۸۰۰ میلی گرم بر کیلو گرم خاک) و چهار سطح مس ($Cu(SO_4)_2$)(۰،۱۵۰،۳۰۰،٤۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم خاک) به صورت آزمایش فاکتوریل و در قالب طرح کاملا تصادفی به منظور بررسی قدرت تحمل فیزیولوژیکی گیاه مورد نظر در خاک های آلوده به سرب و مس مورد آزمایش قرار گرفت. نمونه برداری از خاک مزرعه از عمق ۳۰-۰ سانتی متری خاک صورت گرفت و سپس به منظور تعیین خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک مورد نظر و همچنین وضعیت حاصلخیزی و عوامل محدود کننده، مخصوصاً عناصر سنگین سرب و مس آزمایش خاک انجام شد. بافت خاک مورد آزمایش لومی شنی بوده و میزان شوری خاک برابر(ds/m) ۵/۹۱، pH خاک برابر۷/۷، درصد ازت کل۰/۵٤، میزان مواد آلی۰/۰٦۰٪ میزان سرب ۵/۵ و مس ۰/۸۲ میلی گرم بر کیلوگرم. پس از اطمینان از عدم سمیت خاک به منظور عملیات آماده سازی کلوخه های خاک مورد نظر خرد و سپس از الک ٤ میلی متری عبور داده شد. به منظور بررسی تحمل فیزیولوژیکی، گیاهان مورد مطالعه، غلظت فلزات سنگین آلاینده، چندین برابر بیشتر از حد مجاز آن‌ها در نظر گرفته شد. بسته های حاوی نیترات سرب (۰، ٤۰۰،۲۰۰ و۸۰۰ میلی گرم در کیلوگرم) و

سولفات مس (۰، ۱۵۰، ۳۰۰ و ٤۰۰ میلی گرم در کیلوگرم) به تعداد تکرارها در یک لیتر آب حل شده و خاک با تیمارهایی بیشتر از حد مجاز آلوده شدند سپس به منظور کلاته شدن بیشتر این عناصر با کلوئیدهای خاک و فراهم شدن آلودگی با عناصر، گلدان های تیمار شده به مدت ۳۰ روز در این وضعیت قرار گرفتند و بعد از این مدت به کاشت اقدام شد.

اندازه گیری میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز

جهت محاسبه این فاکتور ۳ عدد برگچه از هر برگ فرعی در هنگام صبح برداشت شد. سعی بر آن بود که برگ ها کاملاً جوان و گسترده باشند. برگ ها داخل پاکت پلاستیکی اتیک گذاری شده قرار گرفت و در ظروف عایق که کف آن از یخ پوشیده شده بود قرار داده شد و به آزمایشگاه منتقل گردید. سپس توسط روش میسرا و همکاران (۱۹۷۲) میزان تغییرات این آنزیم تعیین شد. ابتدا محلول بافر تریس (حاوی فسفات، دی سدیک، pH= ۷/۲) به همراه ۱/۳ میلی مول EDTA و ۰/۱ میلی مول به عنوان سوبسترا استفاده شد، سپس محلول تهیه شده را به آن اضافه کرده، تغییرات جذب نوری حاصله از اکسید اکسیژن اپی نفرین، به عنوان فعالیت آنزیمی ارزیابی شده و از آنزیم استاندارد و خالص جهت استاندارد نمودن نتایج استفاده گردید که واحد آن قادر به اکسیداسیون ۰/۵ میلی مول اپی نفرین در یک دقیقه باشد(١٤).

سنجش مالون دی آلدهید

برای این منظور از روش کروماتوگرافی HPLC براساس روش استیون (۱۹۸۷) استفاده گردید. عصاره ای که برای سنجش 8-oH-2-DG مصرف شده است بر اساس روش تیو بار بتوریک اسید با MDA مورد استفاده قرار گرفت. محصول این واکنش پس از عاری شدن از پروتئین به‌وسیله تری کلرواستیک اسید ۱۲ مول به ستون سیلکاژل اکتادسیل منتقل شد. پس از به تعادل رسیدن ستون، این ستون با فاز متحرک شامل فسفات بافر خاصی متانول شستشو شد و پیک MAD در اسپکتروفتومتر با دتکتورمرئی در طول موج ۵۳۲ نانو متر شناسائی و براساس سطح زیر منحنی پیک اندازه گیری می گردید. جهت استاندارد شدن مالون دی‌آلدهید خالص با نسبت های مختلف در بافر شستشو و منحنی استاندارد رسم گردید (۲۰).

سنجش محتوی کلروفیل

جهت سنجش محتوی کلروفیلa ، b و کلروفیل کل(a+b) توسط روش آرنون (١٩٤٩) و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر ماوراء بنفش استفاده شد (۲).

اندازه گیری محتوی آب نسبی:

محتوی آب نسبی برگ با استفاده از فرمول لیویت (۱۹۸۰) به شرح زیر اندازه گیری شد (۱۱).

$$RWC= WF-WD/ WT-WD\times100$$

WF: وزن تر بافت گیاه

WT: وزن آماس یافته گیاه (اشباع شده از آب)

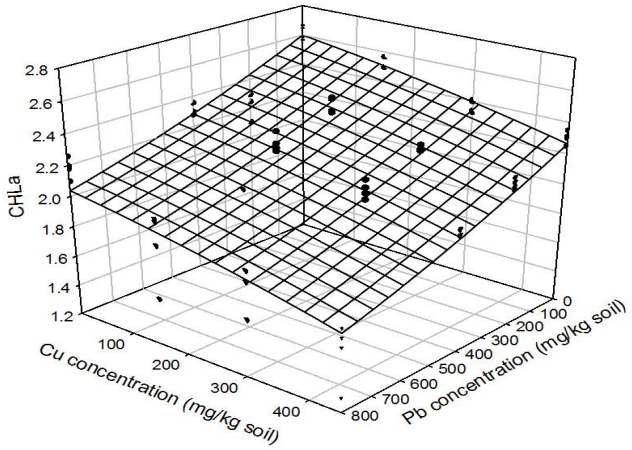
WD: وزن خشک بافت گیاه

روش تجزیه و تحلیل اطلاعات

تجزیه و تحلیل اطلاعات با استفاده از نرم افزار SAS(Version, 9.1) انجام شد. با توجه به کمی بودن هر دو عامل مورد آزمایش (غلظت‌های سرب و مس) برای تجزیه داده‌ها، تجزیه سطح پاسخ (Response) Surface Analysis انجام گرفت.

نتایج و بحث

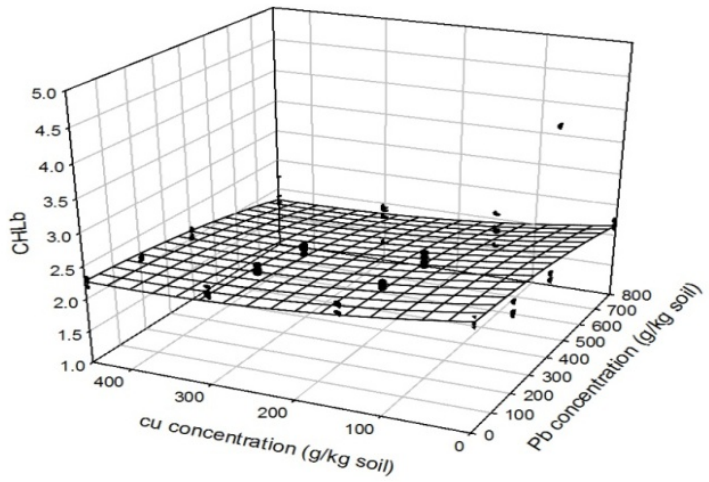
سمیت سرب و مس برای گیاه مورد مطالعه از طریق اندازه گیری غشا لیپید (MDA)، محتوای کلروفیل و محتوی آب نسبی (R.W.C) مورد ارزیابی قرار گرفت، در این راستا افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) که حمایت کننده گیاهان تحت سمیت ناشی از عناصر سنگین است نیز برآورد گردید. شکل ۱ که تغییرات سرب و مس بر میزان کلروفیل a را نشان می دهد، بیانگر این است که افزایش سطوح سرب و مس از میزان کلروفیل a کاسته است، به طوری که تیمار شاهد در مقایسه با تیمار تنش از محتوی کلروفیل a بالاتری برخوردار بود. البته سرب بیش از مس برکاهش ظرفیت کلروفیل a در این گونه گیاهی موثر بود.



شکل۱- روند تغییرات کلروفیل a تحت سطوح متفاوت سرب و مس

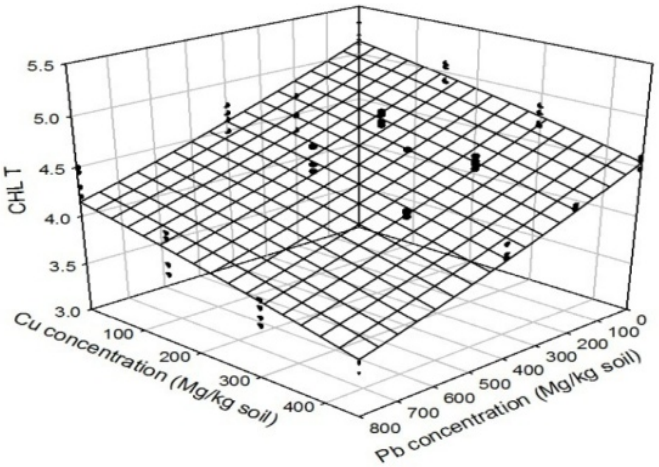
مقادیر متفاوت سرب و مس کلروفیل b را در مقایسه با کلروفیل a بسیار کمتر تحت تاثیر قرار داد و همان گونه که در شکل ۲ مشاهده می شود در تمامی سطوح سرب و مس روند تقریبا ثابتی بر میزان

کلروفیلb مشاهده می شود. هرچند که شیب این تغییرات برای تیمار مس به میزان اندکی در بالاترین غلظت محسوس تر است.



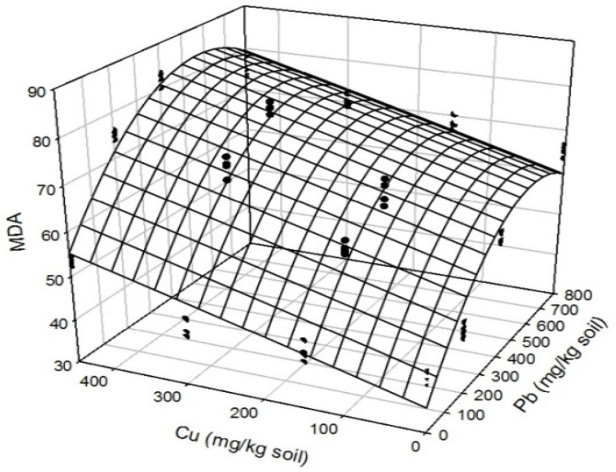
شکل ۲- روند تغییرات کلروفیل b تحت سطوح متفاوت سرب و مس

همچنین هر دو فلز مورد مطالعه سبب کاهش ظرفیت کلروفیل کل بسته به میزان غلظت فلز شدند (شکل ۳). بیشترین کاهش ظرفیت کلروفیل کل نیز در بالاترین سطح از سرب و مس خاک مشاهده شد، هر چند که در مجموع سرب بیش از مس بر کاهش کلروفیل کل موثر بود.



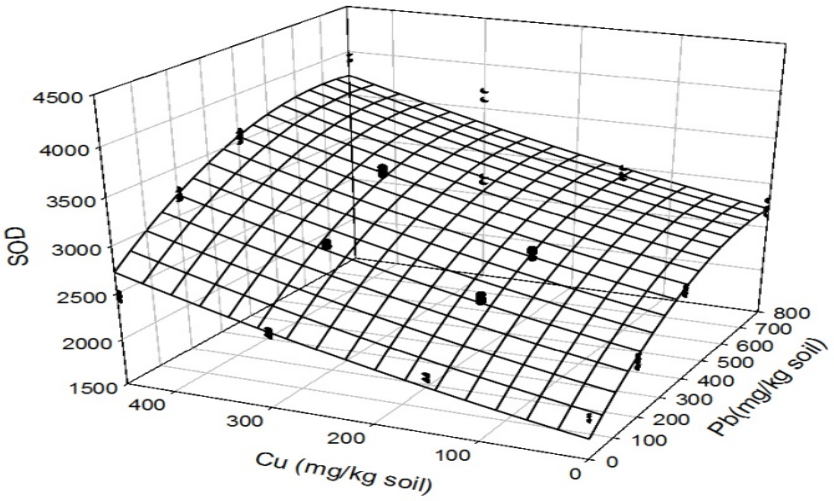
شکل ۳- روند تغییرات کلروفیل کل(a+b) تحت سطوح متفاوت سرب و مس

سرب با جلوگیری از سنتز کلروفیل تاثیر منفی بر فرایند فتوسنتز دارد، بدین ترتیب که با جلوگیری از جذب عناصر ضروری مثل Mg و Fe از سنتز کلروفیل جلوگیری می کند، دستگاه فتوسنتز نیز به دلیل محدودیت لیگاندهای پروتئینی–N–S تخریب می شود و افزایش فعالیت کلروفیلاز نیز سبب افزایش تخریب کلروفیل در شرایط فراوانی سرب می شود (۱۸). بنابراین احتمالا یکی از دلایل کاهش کلروفیل ها افزایش تولید گونه های فعال اکسیژن (ROS) ناشی از سرب و مس بوده است، به علاوه کاهش نسبت کلروفیل a به کلروفیل b می تواند به دلیل حساسیت و تخریب بیشتر کلروفیل a تحت اکسیژن های آزاد تولید شده ناشی از سرب و مس باشد. به نظر می رسد که تنش دو فلز سنگین سرب و مس در گیاه قادر به مهار بیوسنتز کلروفیل و تجزیه زیستی آن در گونه مورد مطالعه بوده است. در بررسی اثر کلرید نیکل و سولفات کادمیوم بر وضعیت کلروفیل گیاهان آبزی گونه هایی نظیر *Ceratophyllum demersum*، *Lemna trisulca*، *Myriophyllum spicatum* حاکی از آن بود که به دلیل جایگزینی این عناصر سنگین با منیزیوم موجود در مرکز حلقه پورفیرینی مقدارکلروفیل کاهش می یابد (۱۰). در تحقیق سودهاکار و همکاران (۱۹۹۲) ظرفیت کلروفیل شش گونه از لگومها که در محیط کشت حاوی سرب رشد کرده بودند کاهش یافت (۲۱). یافته های وین رایت و ول هوس (۱۹۷٦) نیز نشان می دهد که هدر رفت کلروفیل در برگ های گونه های حساس *Agrostis tenuis* بیشتر از گونه های مقاوم این گیاه می باشد (۲۲). پراساد و همکاران (۲۰۰۱) کاهش ظرفیت کلروفیل گیاهان در برابر فلز سنگین مس را به تاثیر مس در تخریب کلروفیل و آسیب ساختمانی و عملکردی آن نسبت دادند (۱۷). آلودگی خاک با دو فلز سنگین سرب و مس ظرفیت مالون دی آلدهید (MDA) که نشانگر پراکسیداسیون لیپید است را نیز به طور معنی داری تحت تاثیر قرار داد (شکل ٤).



شکل ٤- روند تغییرات مالون دی آلدهید(MDA) تحت سطوح متفاوت سرب و مس

البته این تاثیرات در غلظت های ٤٠٠ و ٨٠٠ میلی گرم سرب چشمگیرتر بود. میزان پراکسیداسیون لیپید در مورد گیاهانی که تحت تیمار سرب قرار داشتند چشمگیرتر از تیمارهایی بود که تحت تاثیر مس قرار داشتند. همان گونه که در شکل(٤) مشاهده می شود پراکسیداسیون لیپید تحت سمیت مس از یک معادله خطی پیروی می کند به طوری که با زیاد شدن مقادیر مس ظرفیت مالون دی آلدهید (MDA) نیز افزایش یافته است، که البته بیشترین اثرات سمی مس بر غشاء لیپید در بیشترین سطح از مس استعمال شده در خاک (٤٥٠mg/kg) مشاهده شد. به نظر می رسد که این مشاهده به ماهیت فعالیت کاهشیCu مربوط باشد چرا که این عنصر فرایند تولید رادیکال های بسیار فعال هیدروکسیل را کاتالیز می کند (۹). اگرچه اثرات سمی دو تیمار سرب و مس با یکدیگر اثرات تخریبی زیادی بر غشای لیپید داشت، اما در مجموع سرب بیش از مس بر این فرایند موثر بود که پراکسیداسیون به واسطه واکنش رادیکال های لیپید و اکسیژن روی داده به طوری که رادیکال های پراکسی ایجاد می شوند، رادیکال های پراکسی لیپید نیز سیالیت و نفوذپذیری غشای سلول ها را تغییر می دهند (۷). علی و همکاران (۲۰۰۳) در بررسی اثر سرب، مس و نیکل بر ظرفیت مالون دی آلدهید گونه *Salix acmophylla* مشاهده کردند که میزان پراکسیداسیون لیپید در مورد گیاهانی که تحت تیمار سرب قرار داشتند چشمگیرتر از گیاهانی بود که تحت دو تیمار مس و نیکل بودند.

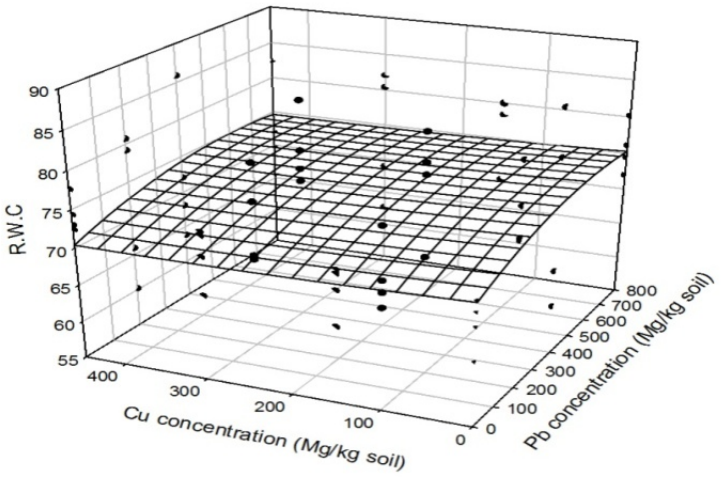


شکل ٥- روند تغییرات آنزیم سوپراکسید دیسموتاز(SOD) تحت سطوح متفاوت سرب و مس

در تحقیق دیگری که به بررسی اثر مس بر گیاه *Withania somnifera* توسط خاتون و همکاران (۲۰۰۸) صورت گرفت، مشاهده شد اثرات غلظت زیاد مس موجب افزایش پراکسیداسیون لیپید با تعیین میزان تولید MDA شد. این نتایج حاکی از آن است که فلزات سنگینی مانند مس و یا سرب موجب بروز تنش اکسیدی شدیدی می شوند. انتظار می رود افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان تنش اکسیدی وارده

بر گیاهان را کاهش دهند. در بررسی واکنش گونه خلر نسبت به دو تیمار سمی سرب و مس مشاهده شد که مس و سرب سبب القاء فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز(SOD) در گونه خلر بسته به میزان غلظت فلز شدند (شکل ۵). حداکثر فعالیت سوپراکسید دیسموتاز (SOD) در مورد سرب و مس در بالاترین سطح از این دو عنصر مشاهده شد. به طوری که در غلظت ۸۰۰ میلی گرم برای تیمار سرب و در غلظت ٤٥٠ میلی گرم برای تیمار مس که بالاترین سطح از این دو عنصر بود این آنزیم افزایش چشمگیری یافت. در مورد تیمار مس روند خطی در افزایش این آنزیم مشاهده شد و در مورد تیمار سرب افزایش این آنزیم از یک معادله درجه دوم پیروی می کند. اثرات دو تیمار سرب و مس با یکدیگر مخصوصا در بالاترین سطح از این دو عنصر بر شدت فعالیت آنزیمی افزود. در اثر شرایط تنش، اکسیژن فعال در گیاه افزایش می یابد در این شرایط گیاه مکانیزم های متفاوتی را برای حذف و از بین بردن این گونه های فعال اکسیژن بکار می گیرد که به نظر می رسد که فعال شدن آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) در پاسخ به اثرات مخرب اکسیژن های تولید شده از سرب و مس در این گونه گیاهی بوده است. و همان گونه که اشاره شد بیشترین فعالیت از این آنزیم نیز در بالاترین غلظت این عناصر در خاک مشاهده شد، که کنترل سطح $O^{\cdot}_2$ توسط این آنزیم (SOD) در شرایط ماندگار مکانیزم حفاظتی مهمی در مقابل تنش اکسیدی در سلول می باشد زیرا $O^{\cdot}_2$ به عنوان پیشگامی برای مشتقات سمی تر یا فعال تر از جمله پراکسی نیتریت یا $Ho^{\cdot}$ عمل می کند (۹). چونگ پرادتیوم و همکاران (۱۹۹۲) نشان دادند که ریشه های سویا از طریق برانگیختن و القاء سوپراکسیددیسموتاز نسبت به افزایش مس واکنش نشان می دهد. به علاوه فعالیت SOD در ریشه های گیاه لوبیای گرگی نیز تحت تیمار سرب افزایش یافت که دلیل آن به تولید رادیکال های آزاد اکسیژن مربوط می باشد (۷). بنابراین گیاهان برای محافظت از خود در مقابل آسیب های ناشی از رادیکال های اکسیژنی اغلب دارای یک سیستم آنتی اکسیدانی هستند که از آسکوربات پراکسیداز (APOX)، گلوتاتیون ردوکتاز (GR)،گلوتاتیون پراکسیداز (GPX)، سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و ترکیبات غیر آنزیمی تشکیل شده اند (۸). به طور کلی نتایج نشان دهنده همبستگی منفی کلروفیل a، کلروفیلb ، کلروفیل کل (CHLT) با آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز بود به طوری که با کم شدن مقدار کلروفیل فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز افزایش یافته که احتمالا این افزایش در پاسخ به تولید رادیکال های آزاد اکسیژن ناشی از سرب و مس بوده است، به علاوه افزایش پراکسیداسیون لیپید نیز با افزایش این آنزیم همراه بود. همچنین کاهش ظرفیت کل کلروفیل (CHLT) با افزایش سطح مالون دی آلدهید (MDA) همراه بود که این مشاهده با تحقیق علی و همکاران (۲۰۰۳) مطابقت دارد. در شرایط تنش فلزات سنگین اثرات سمی پراکسیداسیون لیپید بر ظرفیت کلروفیل و کاهش سنتز کلروفیل در گونه های مختلف گیاهی به دلیل برهمکنش فلزات سمی با گروه SH- آنزیم های ضروری مشاهده شده است که چنین استنباط می شود که کاهش ظرفیت کل کلروفیل احتمالا به دلیل

برهمکنش این فلزات با گروه SH- آنزیم های سنتز کلروفیل و نیز تخریب در نتیجه پراکسیداسیون لیپید بوده است (۱). همچنین نتایج به دست آمده از آنالیز صفت محتوی آب نسبی در گونه گیاهی خلر نشان داد که وضعیت آب در بافت برگها تحت تاثیر تیمار سرب و مس قرار نگرفت زیرا مقدار RWC در هر دو گروه از گیاهان (تیمار شاهد و گیاهان تیمار شده با سرب و مس) تقریبا یکسان بود و از آن‌جایی که آب نسبی در بافت های برگ گیاهانی که تحت تیمار سرب قرار داشتند تا حدی بیش از گیاهان شاهد بود (شکل٦).



شکل ٦- روند تغییرات آب نسبی(RWC) تحت سطوح متفاوت سرب و مس

احتمال می رود که روزنه های برگ در نتیجه تاثیر سرب بسته شده و فعالیت تثبیت کربن اتمسفر دچار لطمه شده باشد (۳)، همچنین این مشاهده با نتایج تحقیق برونت و همکاران(۲۰۰۸) مطابقت دارد. ارتباط مستقیم میان فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز (SOD) با میزان آب نسبی نشان داد که احتمالا افزایش فعالیت این آنزیم به حفظ بیشتر آب نسبی (RWC) در بافت برگ این گونه گیاهی کمک کرده است به طوری که ممکن است این آنزیم با جلوگیری و یا حذف بیشتر اکسیژن های رادیکال آزاد تولید شده ناشی از سرب و مس سبب حفظ محتوی آب نسبی بافت برگ این گونه گیاهی شده باشد. می توان انتظار داشت که در شرایطی که گیاهان می توانند محتوی آب نسبی خود را بیشتر حفظ کنند ، تورژسانس بیشتری را نیز حفظ کرده و در نتیجه اندام های هوایی و ریشه های آن‌ها بهتر رشد می کنند(۱۵). به نظر می رسد که این گونه گیاهان ماده خشک بیشتری را نیز در این شرایط تولید کنند.

جدول۱: ضرایب همبستگی بین صفات اندازه گیری شده

صفات	SOD	MDA	CHL a	CHL b	CHL T	RWC
SOD	۱					
MDA	۰/۵۷۲۲۰**	۱				
CHL a	-۰/۳۶۳۳۳*	-۰/۲۹۱۹^{ns}	۱			
CHL b	-۰/۵۳۰۷**	-۰/۸۶۸۰**	۰/۲۱۲۸۷^{ns}	۱		
CHL T	-۰/۳۸۹۹۱*	-۰/۷۲۷۰**	۰/۲۹۶۱۰^{ns}	۰/۹۰۲۵٤**	۱	
RWC	۰/۵٦۰۷٤**	۰/۸۵۲۷۲**	۰/۲٦۵۹۱^{ns}	-۰/۸٤۸۵**	-۰/۷۰۵۳**	۱

ns، *و**: به ترتیب بیانگر عدم تفاوت معنی دار، تفاوت معنی دار در سطح آماری ۵ درصد و ۱ درصد می باشند

منابع

1- Ali, B. M., Vajpayee, P., Tripathi, R. D., Rai, U. N., Singht, S. N. and Singhgh, S. P. 2003. Phytoremediation of lead, nickel, and copper by salix acmophylla boiss. : Role of Antioxidant Enzymes and Antixidant substances. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 70: 462-469.

2- Arnon, D. I. 1949. Copper enzyme in isolated chloroplast, polyphenol oxidase in betavulgaris. Plant physiology, 24: 1-15.

3- Brunet, J., Repellin, A., Varrault, G., Terrync, N. and Zuily-fodil, Y. 2008. Leadaccumulation in the roots of grass pea (lathyrus sativusl): a novel plant for phytoremediation systems?. C.R Biologies, 331, 859-864.

4- Davey, M. W., Stals, E., Panis, B., Keulemans, J. and Swennen, R. L. 2005. High Throughput determination of mabndialdehyde in plant tissues. Analytical Biochemistry 347: 201-207.

5- Estrella-Gomez, N., Mendoza–Cozatl, D., Moreno–Sanchez, R., Gonzalez–Mendoza, D., Zapata–Perez, O., Martinez–Hernandez, A. and Santamaria, J. M. 2009. The pb-hyperaccumulator aquatic fern salvinia minima baker, responds to pb 2+ by increasing phytochelatins via changes in smpcs expression and in phytochelatin synthase activity. Aquatic Toxicology, 91, 320-328.

6- Gaetke, L. M. and Chow, C. K. 2003. Copper toxicity oxidative stress and antioxidant nutrients. Toxicology, 189: 197-163.

7- Garnczarska, M. and Ratajczak, L. 2000. Metabolic responses of lemna minor to lead ions, II. Induction of antioxidant enzymes in roots. Acta Physiologiae Plantarum, 22: 429-432.

8- Groppa,. M. D., Tomaro, M. L. and Benarides, M. P. 2007. Polyamines and heavy metal stress: the antioxidant behavior of spermine in cadmium – and copper – treated wheat leaves. Biometals, 20: 185-195.

9- Khatun, S., Babar Ali, M., Hahn, E. J. and Paek, K. Y. 2008. Copper toxicity in *Withania somnifera* : Growth and antioxidant enzymes responses of in vitro grown plants. Environmental and Experimental Botany, 64: 279-285.

10- Kupper, H., Kiipper, F. and Spiller, M. 1996. Environmental relevance of heavy metal-substituted chlorophylls using the example of water plants. Journal of Experimental Botany, 47, 259-266.

11- Levitt, J. 1980. Response of Plants to Environmental Stresses, Vol. 2, Water, Radiation, Salt and Other Stresses, Academic Press, New York, 650p.

12- Lin, C., Liu, J., Liu, L., Zhu, T., Sheng, L.and Wang, D. 2009. Soil amendment application frequency contributes to phytoextraction of lead by sunflower at different nutrient levels. Environmental and Experimental Botany, 65, 410-416.

13- Luis, A. D. R., Lyon, D. S., olah, I., Glick, B. and Salin, M. 1983. Immunocytochemical evidence for a peroxisomal localization of manganese superoxide dismutase in leaf protoplasts from a higher plant. Planta , 158: 216-224.

14- Misra, H. p. and Fridovich, I. 1972. The generation of superoxide radical during auto oxidation. J. Biol. Chem. 247, 6960-6966.

15- Morgan, J. M. 1988. The use of coleoptile responses to osmoregulation; growth and yield. Annals of Botany 62, 193-8.

16- Navari-Izzo, F., Quartacci, M. F., Pinzino, O., Vecchia, F. D. and Sgherii, C. L. M. 1998. Thilakoid-bound and stromal antioxidative enzymes in wheat treated with exess copper. Plant physiology. 104: 630-638.

17- Prasad, M. N. V., Malec, P. and Waloszek, A. 2001. Physical responses of Lemma Trisulca L. to cadmium and copper bioaccumulation. Plant Sci. 161, 881-889.

18- Sharma., P. and Dubey, R. S. 2005. Lead Toxicity in plants. Plant physiol., 17, 35-52.
19- Sharma, S. S., Kaul, S., metwally, A., Goyal, K. C., Finkemeier, I. and Dietz, K. J. 2004. Cadmium toxicity to barley (*Hordeum vulgar*) as affected by varying Fe nutritional status. Plant science, 166: 1287-1295.
20- Steven, H. and Sidney, M. H. 1987. Lipid peroxidase in samples as measured by liquid chromatography. Separeathion or malondialdehyde tiobarbituric acid. Elin. Chem. 32: 214-220.
21- Sudhakar, C., Syamalabai, L. and Veeranjaneyulu K. 1992. Lead tolerance of certain legume species grown on lead ore tailings. Agriculture, ecosystems and environment, 41, 253-261.
22- Wainwright, S. G. and Woolhouse, H.W. 1976. Physiological mechanisms of heavy metal tolerance. In: M.J. Chadwick and G. T. Goodman (Editors), The Ecology of Resource Degradation and Renewal. Blackwell Scientific, Oxford, pp. 250-285.