



Effects of different concentrations of lead on some biochemical and physiological parameters of rice (*Oryza sativa* L.)

Javad Salvati¹, Hormoz Fallah Amoli^{2*}, Youssef Niknejad³,
Dawood Berari Tari⁴

¹ Department of Agriculture, Ayatollah Amoly Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran, Email: salavat121@yahoo.com

² Department of Agriculture, Ayatollah Amoy Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran, Email: hormozfalah@gmail.com

³ Department of Agriculture, Ayatollah Amoly Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran, Email: yousofniknejad@gmail.com

⁴ Department of Agriculture, Ayatollah Amoly Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran, Email: dawoodbarari@yahoo.com

Article type:

Research article

Abstract

Lead (Pb) not only negatively alters plant growth and yield but may also have potentially toxic risks to human health. In the present study, the effects of different concentrations of Pb (150 and 300 μ M) on growth and physiological and biochemical attributes of rice under hydroponic conditions were investigated. The results showed that Pb treatments with negative effects on chlorophyll metabolism reduced photosynthetic pigments and, consequently, diminished the growth and biomass of rice plants. Pb stress induced oxidative stress and damage to bio-membranes by increasing the accumulation of hydrogen peroxide and methylglyoxal. The activity of antioxidant enzymes and glyoxalase cycle was upregulated in rice leaves under Pb toxicity. Pb treatments altered the levels of non-enzymatic antioxidant compounds (glutathione (GSH) and ascorbic acid (ASA)) in the leaves of rice plants by reducing the ratios of reduced ASA to oxidized ASA and reduced GSH to oxidized GSH compared to control plants. Therefore, concentrations of 150 and 300 μ M Pb in the soil can induce negative effects on important physiological and metabolic processes of rice which reduce plant growth and biomass.

Article history

Received: 15.11.2022

Revised: 20.02.2022

Accepted: 27.02.2022

Published: 22.12.2023

Keywords

Lead stress

Rice

Proline metabolism

Oxidative stress

Chlorophyll metabolism

Cite this article as: Salvati, J., Fallah Amoli, H., Niknejad, Y., Berari Tari, D. (2023). Effects of different concentrations of lead on some biochemical and physiological parameters of rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Plant Environmental Physiology*, 18(4): 1-18.



©The author(s)

Doi: 10.30495/iper.2022.1945015.1748

Publisher: Islamic Azad University, Gorgan branch

اثرات غلظت‌های مختلف سرب بر برخی از پارامترهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی گیاه برنج (*Oryza sativa* L.)

جواد صلواتی^۱، هرمز فلاح آملی^{۲*}، یوسف نیک‌نژاد^۳، داوود براری تازی^۴

^۱ گروه زراعت، واحد آیت‌اله آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران، رایانامه: salavat121@yahoo.com

^۲ گروه زراعت، واحد آیت‌اله آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران، رایانامه: hormozfalah@gmail.com

^۳ گروه زراعت، واحد آیت‌اله آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران، رایانامه: yousofniknejad@gmail.com

^۴ گروه زراعت، واحد آیت‌اله آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران، رایانامه: _davoodbarari@yahoo.com

نوع مقاله:	چکیده
مقاله پژوهشی این مقاله برگرفته از رساله دکتری می‌باشد.	سرب (Pb) نه تنها رشد و عملکرد گیاه را تغییر می دهد بلکه ممکن است خطرات بالقوه سمی برای سلامتی انسان داشته باشد. در تحقیق حاضر، تاثیر غلظت‌های مختلف سرب (۱۵۰ و ۳۰۰ میکرومولار) بر رشد و فرآیندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه برنج تحت شرایط هیدروپونیک مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان دادند که تیمارهای سرب با تاثیر منفی بر متابولیسم کلروفیل، باعث کاهش رنگیزه‌های فتوسنتزی و در نتیجه، کاهش رشد و بیومس گیاه برنج شد. تنش سرب با افزایش تجمع پراکسید هیدروژن و متیل گلی اکسال، باعث القای تنش اکسیداتیو و آسیب به غشاهای زیستی شد. افزایش غلظت سرب باعث افزایش تجمع سرب در گیاه برنج شد که با افزایش تجمع پرولین و فیتوکلاتین‌ها همراه بود. فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان و چرخه گلی اکسالاز در برگ گیاه برنج تحت سمیت سرب افزایش یافت. تیمارهای سرب باعث تغییر سطح ترکیبات آنتی اکسیدان غیرآنزیمی (گلوتاتیون و آسکوربیک اسید) در برگ گیاه برنج شد بطوری‌که باعث کاهش نسبت‌های آسکوربیک اسید احیاء شده به اکسید شده و گلوتاتیون احیاء شده به اکسید شده نسبت به گیاهان شاهد شد. بنابراین، غلظت‌های ۱۵۰ و ۳۰۰ میکرومولار سرب در خاک می‌تواند تاثیرات منفی بر فرآیندهای فیزیولوژیکی و متابولیک‌های مهم گیاه برنج القا کند که باعث کاهش رشد و بیومس گیاه شود.
تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۸/۲۴ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۱۲/۰۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۲/۰۸ تاریخ چاپ: ۱۴۰۲/۱۰/۰۱	
واژه‌های کلیدی: برنج تنش اکسیداتیو تنش سرب متابولیسم پرولین متابولیسم کلروفیل	

استناد: صلواتی، جواد؛ فلاح آملی، هرمز؛ نیک‌نژاد، یوسف؛ براری تازی، داوود. (۱۴۰۲). اثرات غلظت‌های مختلف سرب بر برخی از پارامترهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی گیاه برنج (*Oryza sativa* L.). فیزیولوژی محیطی گیاهی، ۱۸ (۴)، ۱۸-۱.

Doi: 10.30495/iper.2022.1945015.1748

ناشر: دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرگان

© نویسندگان.



مقدمه

امروزه، آلودگی خاک‌ها با فلزات سنگین مختلف (عناصر غیر ضروری گیاهان) و ورود آنها به اکوسیستم‌های کشاورزی و انتقال از طریق زنجیره غذایی به انسان‌ها به وضعیت هشدار دهنده‌ای در سراسر جهان تبدیل شده است (Anjum et al., 2016; Gerami et al., 2018). در اکوسیستم‌های خشکی، خاک به عنوان منبع اصلی انتقال فلزات سنگین به محصولات کشاورزی عمل می‌کند. این فلزات سنگین از خاک یا از هوای احاطه‌کننده گیاهان وارد سیستم‌های گیاهی می‌شوند و پیامدهای جدی در بهره‌وری محصول و کیفیت دانه‌ها خواهند داشت (Ghorbani et al., 2020). در میان فلزات سنگین مختلف، سرب (Pb) دومین آلاینده مضر بعد از آرسنیک است و اخیراً طبق مقررات جدید REACH اروپا به عنوان "ماده شیمیایی مورد نگرانی" ذکر شده است (Pourrut et al., 2011). سرب به شدت بر متابولیسم طبیعی گیاه، رشد، فرآیندهای فیزیولوژیکی و بهره‌وری گیاه تأثیر می‌گذارد (Ashraf et al., 2015). اغلب منجر به کاهش رشد، تغییر شکل ساختارهای سلولی، برهم‌زدن همئوستازی یون، کاهش بیوسنتز کلروفیل، عدم تعادل هورمونی و ایجاد تولید بیش از حد گونه‌های فعال اکسیژن در گیاهان می‌شود (Kumar et al., 2012). سرب، به عنوان فلزی غیر اکسیداسیون، باعث تولید گونه‌های فعال اکسیژن و در نتیجه، القای تنش اکسیداتیو در سلول‌های گیاهی می‌شود (Singh et al., 2010). این گونه‌های فعال اکسیژن پس از تولید، به آسانی به ساختارهای زیستی و مولکول‌های زیستی آسیب رسانده و منجر به اختلال عملکرد متابولیک می‌شود (Clemens, 2006). گیاهان به‌طور معمول دارای سه مکانیسم برای تحمل سمیت سرب هستند که شامل الف) مکانیسم‌های غیرفعال (گیاه انواع مختلف موانع

فیزیکی را در برابر جذب سرب ایجاد می‌کنند، ب) مکانیسم‌های القایی (سمت‌زدایی فلزات و دفع آن به فضاهای خارج سلولی) و ج) فعال کردن سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی (که شامل آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی است) برای از بین بردن انواع اکسیژن فعال می‌باشد (Pourrut et al., 2011; Ashraf et al., 2015). آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی مانند سوپراکسید دیسموتاز، پراکسیداز، کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز، و آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی مانند گلووتاتیون و آسکوربیک اسید به طور مستقیم یا غیرمستقیم در سمیت‌زدایی انواع اکسیژن فعال در گیاهان نقش مهمی دارند (Mittler, 2002; Ghorbani et al., 2018a). علاوه بر سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی، گیاهان همچنین انواع مختلفی از ترکیبات آلی یا اسمولیت‌ها مانند پرولین و قندهای محلول را برای محافظت از ساختارهای ضروری سلولی و حفظ پتانسیل اسمزی سلولی تجمع می‌کنند (Ali et al., 2018b; Ghorbani et al., 2014).

گیاهان به‌طور طبیعی دارای مکانیسم‌های سلولی پیچیده‌ای برای کاهش سمیت فلزات سنگین از جمله بهبود تغییرات ساختاری سلول، سنتز ترکیبات کلاتور و اسمولیت، ترشح فلزات سنگین به فضای بیرون، غیرمتحرک ساختن فلزات سنگین در دیواره سلولی و توقیف فلزات سمی در واکوئل‌ها می‌باشد (Hall, 2002). کلات کردن فلزات سنگین سمی در سلول‌های گیاهی و جداسازی آنها در واکوئل‌ها یکی از مهمترین‌ترین مکانیسم‌های دفاعی گیاه تحت سمیت فلزات سنگین است (Park et al., 2012). فیتوکلاتین‌ها (PCs) گروهی از پپتیدهای سنتز شده از گلووتاتیون هستند که به فلزات سنگین متصل می‌شوند و باعث انتقال آنها به واکوئل‌ها می‌شوند، که نقش مهمی در سمیت‌زدایی فلزات سنگین و بهبود تحمل گیاه دارند (Rauser, 1995). پرولین و گلووتاتیون

شرایط هیدروپونیک، تیمارهای مختلف سرب اعمال شدند. تیمارهای سرب با استفاده از نیترات سرب ($Pb(NO_3)_2$) آماده شدند. گلدان‌ها در دمای ۲۲/۲۵ درجه سانتی‌گراد برای روز/شب، رطوبت ۶۰-۶۵ درصد و ۱۶ ساعت روشنایی با شدت نور ۳۰۰-۴۰۰ میکرومول بر متر مربع بر ثانیه در گلخانه نگهداری شدند. ۶۰ روز بعد از اعمال تیمارهای سرب، نمونه برداری انجام شد و بعد از ثبت ارتفاع بوته، نمونه‌ها برای اندازه‌گیری صفات‌های بیوشیمیایی در فریزر ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند. برای اندازه‌گیری وزن خشک کل، نمونه‌ها ۷۲ ساعت در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد خشکانده شدند و سپس وزن شدند (Ghorbani et al., 2009).

رنگی‌های فتوسنتزی و فلورسانس کلروفیل: برای اندازه‌گیری رنگی‌های کلروفیل a، b و کاروتنوئیدها، مقدار ۰/۵ گرم برگ تازه وزن گردید و در هاون با پنج میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد به خوبی ساییده و سپس در ۱۰۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. جذب محلول رویی در طول موج‌های ۴۷۰، ۶۴۵ و ۶۶۳ نانومتر اندازه‌گیری شد و محتوای رنگی‌های فتوسنتزی مطابق روش Lichtenthaler (۱۹۸۷) محاسبه گردید. عملکرد فلورسانس کلروفیل (Fv/Fm) با استفاده از دستگاه فلورومتر (PAM 2500, Walz, Germany) و بعد از ۲۰ دقیقه قرار گرفتن برگ در تاریکی با استفاده از گیره‌های مخصوص برگ (B, Walz-۲۰۳۰) اندازه‌گیری شدند. **غلظت سرب:** بافت‌های ریشه و بخش‌های هوایی گیاه برنج بعد از شستشو با آب مقطر، در دمای ۷۵ درجه سانتیگراد به مدت ۷۲ ساعت خشک شدند. بافت‌های خشک شده در محلول $H_2O_2:HNO_3$ (نسبت ۱ به ۴) هضم اسیدی شدند و سپس غلظت عنصر سرب با استفاده از دستگاه ICP-MS (Agilent 7500 cx) اندازه‌گیری شد.

مهمترین ترکیبات آنتی‌اکسیدانی غیر آنزیمی هستند که نقش مهمی در بهبود تحمل گیاهان تحت سمیت فلزات سنگین ایفا می‌کنند (Ghorbani et al., 2021; Ghasemi-Omran e al., 2021).

بنابراین، با توجه به اهمیت گیاه برنج و ضرورت شناخت اثرات سمیت سرب بر صفات‌های فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و عملکرد گیاه، تحقیق حاضر با هدف بررسی تغییرات رشد، برخی صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی و همچنین عملکرد و اجزای عملکرد گیاه برنج تحت غلظت‌های مختلف سرب انجام شد.

مواد و روش‌ها

کشت و تیمار گیاه: تحقیق حاضر در بهار ۱۳۹۹ در گلخانه دانشگاه آزاد اسلامی، واحد آیت‌اله آملی، شهرستان آمل، استان مازندران به صورت طرح کاملاً تصادفی با ۵ تکرار انجام شد. تیمار آزمایش شامل تنش سرب در سه سطح (صفر، ۱۵۰ و ۳۰۰ میکرومولار) بود. با توجه به عدم علائم سمیت سرب در غلظت زیر ۱۰۰ میکرومولار و علائم شدید سمیت در غلظت‌های بالای ۴۰۰ میکرومولار در آزمایش اولیه برای تعیین غلظت‌های سرب، غلظت‌های ۱۵۰ و ۳۰۰ میکرومولار در این تحقیق انتخاب شدند. بذرها رقم طارم هاشمی از موسسه تحقیقات برنج کشور-معاونت آمل تهیه شد. بعد از ضدعفونی بذرها و خیساندن در آب شهری به مدت ۲۴ ساعت، بذرها در سینی‌های حاوی پیت‌موس اتوکلاو شده جوانه‌دار شدند. سپس، گیاهچه‌های ۱۲ روزه یک اندازه به گلدان‌های حاوی محلول هوگلند منتقل شدند. گلدان‌ها توسط پمپ آکواریوم هوا هوادهی می‌شدند. محلول هوگلند در pH 6.0 تنظیم شدند و هر هفته محلول داخل گلدان‌ها تعویض شدند. بعد از یک هفته انتقال گیاهچه‌ها به گلدان‌ها و سازگاری گیاهچه‌ها با

۱۵ میلی‌مولار بود. فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز با قرائت جذب محلول واکنش شامل عصاره آنزیمی، متیونین ۱۳ میلی‌مولار، ریوفلاوین ۱۳ میکرومولار و نیتروبلو تترازولیوم ۶۳ میکرومولار در طول موج ۵۶۰ نانومتر مطابق روش Beauchamp و Fridovich (۱۹۷۱) محاسبه گردید.

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز براساس روش Sairam و همکاران (۲۰۰۲) در محلول واکنش حاوی بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار (pH 7.0)، آسکوربیک اسید ۰/۵ میلی‌مولار، EDTA ۰/۱ میلی‌مولار، آب اکسیژنه ۲۵ میلی‌مولار و عصاره آنزیمی اندازه‌گیری شد. کاهش جذب در محلول واکنش به مدت یک دقیقه در طول موج ۲۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. با استفاده از محلول واکنش شامل بافر پتاسیم-فسفات ۵۰ میلی‌مولار (pH 7.0)، EDTA ۱ میلی‌مولار، گلوکاتایون اکسید شده ۱ میلی‌مولار، NADPH ۰/۲ میلی‌مولار و عصاره آنزیمی در حجم نهایی ۱ میلی‌مولار، فعالیت آنزیم گلوکاتایون ردوکتاز اندازه‌گیری شد. با خواندن میزان کاهش در جذب طول موج ۳۴۰ نانومتر به مدت ۱ دقیقه، فعالیت آنزیم محاسبه شد (Hasanuzzaman et al., 2011).

فعالیت آنزیم گلی اکسالاز I با قرائت میزان افزایش در جذب طول موج ۲۴۰ نانومتر و محلول واکنش شامل بافر پتاسیم فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار (pH 7)، سولفات منیزیم ۱۵ میلی‌مولار، گلوکاتایون ۱/۷ میلی‌مولار، متیل گلی‌اکسال ۳/۵ میلی‌مولار در حجم نهایی ۷۰۰ میکرولیتر مطابق روش Hasanuzzaman و همکاران (۲۰۱۱) محاسبه گردید. با استفاده از روش Principato و همکاران (۱۹۸۷)، فعالیت آنزیم گلی اکسالاز II اندازه‌گیری شد. محلول واکنش شامل بافر Tris-HCl ۱۰۰ میلی‌مولار (pH 7.2)، ۵'،۵-۲-نیتروبنزوئیک اسید ۰/۲ میلی‌مولار و D-S-لاکتوگلوکاتایون ۱ میلی‌مولار در حجم نهایی

محتوای پرولین، مالون دی آلدئید، پراکسید هیدروژن و متیل گلی‌اکسال: برای اندازه‌گیری محتوای پرولین آزاد از عصاره متانولی برگ‌ها استفاده شد. پرولین با قرائت جذب واکنش نین‌هیدرین در طول موج ۵۱۵ نانومتر با استفاده از اسپکتوفتومتر (Carry 300; Varian, Walnut Creek, CA, USA) مطابق روش Bates و همکاران (۱۹۷۳) محاسبه گردید. محتوای مالون دی آلدئید برگ‌ها با استفاده از روش تیوباربتوریک اسید و ضریب خاموشی $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ مطابق روش Heath و Packer (۱۹۶۸) اندازه‌گیری شد.

مقدار پراکسید هیدروژن براساس واکنش H_2O_2 با یدور پتاسیم مطابق روش Alexieva و همکاران (۲۰۰۱) انجام شد. برای اندازه‌گیری متیل گلی‌اکسال، بعد از هموژن کردن برگ‌های تازه با استفاده از پرکلوریک اسید (۵ درصد)، با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. بعد از خنثی‌سازی محلول رویی با استفاده از کربنات سدیم، ترکیبات N-استیل سیستین و مونوسدیم فسفات به محلول اضافه شد و جذب آن در ۲۸۸ نانومتر با استفاده از اسپکتوفتومتر قرائت شد (Wild et al., 2012).

عصاره آنزیمی و سنجش فعالیت آنزیم‌ها: بافت تازه برگ (۰/۵ گرم) در یک میلی‌لیتر از بافر پتاسیم-فسفات ۵۰ میلی‌مولار (pH 7) شامل کلرید پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار، آسکوربات ۱ میلی‌مولار، بتا-مرکاپتواتانول ۵ میلی‌مولار و گلیسرول ۱۰ درصد هموژن شد. از محلول رویی بعد از سانتریفیوژ در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه برای تعیین فعالیت آنزیم‌ها استفاده شد.

فعالیت آنزیم کاتالاز با استفاده از محاسبه کاهش جذب H_2O_2 در ۲۴۰ نانومتر به مدت ۳۰ ثانیه انجام شد. محلول واکنش شامل عصاره آنزیمی، بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار (pH 7.0) و پراکسید هیدروژن

اسید احیا شده براساس منحنی استاندارد مشخص شد. محتوای آسکوربیک اسید اکسید شده با کم کردن آسکوربیک اسید احیا از میزان کل آسکوربیک اسید دست آمد (Dutilleul et al., 2003).

از محلول واکنش شامل محلول رویی، NADPH ۰/۳ میلی مولار، ۵،۵- دی تیویس (۲-نیتروبنزوئیک اسید) ۶ میلی مولار و آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز برای اندازه گیری گلوتاتیون کل استفاده شد. گلوتاتیون اکسید شده نیز بعد از انکوبه کردن محلول واکنش حاوی محلول رویی، تری اتانول آمین ۵۰ درصد و ۲-وینیل پیریدین در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ دقیقه، با قرائت میزان جذب در ۴۱۲ نانومتر محاسبه شد. با کم کردن گلوتاتیون اکسید شده از گلوتاتیون کل، محتوای گلوتاتیون احیا شده مطابق روش Gill و همکاران (۲۰۱۵) بدست آمد.

آنالیز داده‌ها: تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS و مقایسه میانگین توسط آزمون حداقل تفاوت معنی دار (LSD) در سطح پنج درصد انجام شد (Ghorbani et al., 2011). رسم نمودارها با Excel صورت گرفت.

نتایج

رشد و رنگی‌های فتوسنتزی: نتایج آنالیز واریانس نشان داد که اثر تیمار سرب بر ارتفاع و وزن خشک کل در سطح یک درصد معنی دار بود (جدول ۱). نتایج مقایسه میانگین نشان داد کاربرد تیمارهای ۱۵۰ و ۳۰۰ میکرومولار سرب باعث کاهش معنی دار ارتفاع گیاه به ترتیب به میزان ۱۷/۳ و ۳۴/۲ درصد و وزن خشک کل به میزان ۱۰/۷ و ۲۵/۲ درصد نسبت به گیاهان شاهد شد (جدول ۱).

نتایج آنالیز واریانس بیان کردند که تیمار سرب تاثیر معنی داری بر محتوای کلروفیل a، b، کاروتنوئیدها و فلورسانس کلروفیل در سطح یک درصد داشت

یک میلی لیتر می باشد. فعالیت آنزیم دلتا-آمینولولینیک اسید دهیدراتاز مطابق روش Jain و Gadre (۲۰۰۴) و اندازه گیری میزان تفاوت در غلظت پورفوبیلونون در ۱۵ دقیقه در طول موج ۵۵۳ نانومتر محاسبه گردید.

فعالیت آنزیم پرولین دهیدروژناز با قرائت محلول واکنش شامل بافر NaCO₃-HCl ۰/۱۵ میلی مولار (pH 10.3)، L-پرولین ۱۵ میلی مولار، NAD⁺ ۱/۵ میلی مولار و عصاره آنزیمی در طول موج ۳۴۰ نانومتر مطابق روش Charest و Phan (۱۹۹۰) محاسبه گردید. فعالیت آنزیم دلتا ۱-پرولین-۵-کربوکسیلات سنتتاز با قرائت محلول واکنش شامل بافر Tris-HCl ۱۰۰ میلی مولار (pH 7.2)، عصاره آنزیمی، دی کلرید منیزیم ۲۵ میلی مولار، گلو تامات سدیم ۷۵ میلی مولار، ATP ۵ میلی مولار و NADPH ۰/۴ میلی مولار در طول موج ۳۴۰ نانومتر مطابق روش Sumithra و همکاران (۲۰۰۶) محاسبه گردید.

با اندازه گیری افزایش در جذب ۶۶۷ نانومتر حاصل از تشکیل کلروفیلید، فعالیت آنزیم کلروفیلاز مطابق روش Costa و همکاران (۲۰۰۵) بدست آمدند. محتوای آسکوربیک اسید و گلوتاتیون: بعد از هموژن کردن بافت تازه برگ با متافسفریک ۵ درصد حاوی EDTA یک میلی مولار و سانتریفیوژ با سرعت ۱۲۰۰۰ دور برای ۱۰ دقیقه، از محلول رویی برای اندازه گیری محتوای آسکوربیک اسید و گلوتاتیون استفاده شد.

برای اندازه گیری آسکوربیک اسید، محلول رویی ابتدا با استفاده از بافر فسفات پتاسیم ۰/۵ مولار (pH 7.0) خنثی سازی شد. سپس، یک واحد آنزیم آسکوربات پراکسیداز و بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی مولار (pH 7.0) به محلول اضافه شدند و با قرائت جذب محلول در ۲۶۵ نانومتر، آسکوربیک اسید کل و احیا شده تعیین شدند. محتوای آسکوربیک

(جدول ۱). نتایج مقایسه میانگین نشان داد که کاربرد غلظت‌های مختلف سرب باعث کاهش معنی‌دار محتوای کلروفیل a نسبت به گیاهان شاهد شد و بیشترین کاهش تحت غلظت ۳۰۰ میکرومولار سرب مشاهده شد (جدول ۱). تیمار ۱۵۰ میکرومولار سرب تاثیر معنی‌داری بر محتوای کلروفیل b نداشت با اینحال، تیمار ۳۰۰ میکرومولار سرب باعث کاهش

محتوای کلروفیل b به میزان ۵۰/۸ درصد نسبت به گیاه شاهد شد (جدول ۱). نتایج همچنین نشان دادند که کاربرد ۱۵۰ و ۳۰۰ میکرومولار سرب باعث کاهش محتوای کاروتنوئیدها به ترتیب به میزان ۱۸ و ۳۹/۳ درصد و فلورسانس کلروفیل به میزان ۱۲/۵ و ۳۶ درصد نسبت به گیاهان شاهد شد (جدول ۱).

جدول ۱: تجزیه واریانس و مقایسه میانگین صفات مورفولوژی و رنگی‌های فتوسنتزی گیاه برنج تحت تنش سرب (۰، ۱۵۰ و ۳۰۰ میکرومولار)

آنالیز واریانس						
df	ارتفاع	وزن خشک کل	کلروفیل a	کلروفیل b	کاروتنوئیدها	فلورسانس کلروفیل
تیمار	۱۷۹**	۰/۹**	۱/۱**	۰/۷**	۰/۰۹**	۰/۰۴**
خطا	۱/۴	۰/۰۱۲	۰/۰۱۳	۰/۰۱	۰/۰۰۰۲	۰/۰۰۰۲
ضریب تغییرات (%)	۳/۲	۳/۱	۶/۳	۷	۶/۶	۲/۳
مقایسه میانگین						
تیمارها	ارتفاع (سانتی‌متر)	وزن خشک کل (گرم بر بوته)	کلروفیل a (میلی‌گرم بر گرم وزن تر)	کلروفیل b (میلی‌گرم بر گرم وزن تر)	کاروتنوئیدها (میلی‌گرم بر گرم وزن تر)	فلورسانس کلروفیل
شاهد (بدون سرب)	۴۵/۱۸±۱/۰۳ ^a	۴/۲۹±۰/۱۴ ^a	۲/۴۴±۰/۱۲ ^a	۱/۸۳±۰/۱۱ ^a	۰/۲۷۲±۰/۰۱۷ ^a	۰/۶۵۶±۰/۰۱۳ ^a
سرب ۱۵۰ میکرومولار	۳۷/۳۷±۱/۵۸ ^b	۳/۸۳±۰/۰۸ ^b	۱/۷۴±۰/۱۴ ^b	۱/۶۳±۰/۱۰ ^a	۰/۲۲۳±۰/۰۱۱ ^b	۰/۵۷۴±۰/۰۱۴ ^b
سرب ۳۰۰ میکرومولار	۲۹/۷۱±۰/۷۶ ^c	۳/۲۱±۰/۱۱ ^c	۱/۲۵±۰/۰۹ ^c	۰/۹۲±۰/۱۰ ^b	۰/۱۶۵±۰/۰۱۶ ^c	۰/۴۲۰±۰/۰۱۰ ^c

** معنی‌داری در سطح یک درصد.

مقادیر با حروف کوچک یکسان در هر ستون، فاقد اختلاف معنی‌دار آماری در سطح احتمال ۵ درصد براساس آزمون LSD هستند.

هوایی به ترتیب به میزان ۲/۸۱ و ۲/۴۶ میکرومول بر گرم وزن خشک تحت غلظت بالای سرب (۳۰۰ میکرومولار) ثبت شد (جدول ۲). افزایش غلظت سرب باعث افزایش تجمع سرب در کل گیاه شد بطوریکه بیشترین میزان تجمع در گیاهان تیمار شده با ۳۰۰ میکرومولار سرب مشاهده شد (جدول ۲).

تجمع سرب در ریشه، اندام هوایی و کل گیاه:
تجزیه واریانس نشان داد که تیمار سرب تاثیر معنی‌داری در سطح یک درصد بر غلظت سرب در ریشه، اندام هوایی و کل گیاه داشت (جدول ۲). مقایسه میانگین نشان داد که کاربرد غلظت‌های مختلف سرب باعث افزایش تجمع سرب در ریشه و اندام شد که بیشترین میزان تجمع در ریشه و اندام

جدول ۲: تجزیه واریانس و مقایسه میانگین غلظت سرب در گیاه برنج تحت تنش سرب (۰، ۱۵۰ و ۳۰۰ میکرومولار)

آنالیز واریانس			
df	سرب ریشه	سرب اندام هوایی	سرب کل گیاه
تیمار	۶/۱**	۴/۶**	۲۱**
خطا	۰/۰۱۵	۰/۰۲	۰/۰۲
ضریب تغییرات (%)	۸/۱	۸/۹	۵/۱

مقایسه میانگین

تیمارها	سرب ریشه (میکرومول بر گرم وزن خشک)	سرب اندام هوایی (میکرومول بر گرم وزن خشک)	سرب کل گیاه (میکرومول بر گرم وزن خشک)
شاهد (بدون سرب)	--	--	--
سرب ۱۵۰ میکرومولار	۱/۷۶ ± ۰/۱۲ ^b	۱/۴۴ ± ۰/۱۳ ^b	۳/۲۰ ± ۰/۲۵ ^b
سرب ۳۰۰ میکرومولار	۲/۸۱ ± ۰/۱۸ ^a	۲/۴۶ ± ۰/۱۶ ^a	۵/۲۷ ± ۰/۰۵ ^a

- مقادیر با حروف کوچک یکسان در هر ستون، فاقد اختلاف معنی‌دار آماری در سطح احتمال ۵ درصد براساس آزمون LSD هستند.

جدول ۳: تجزیه واریانس و مقایسه میانگین محتوای فیتوکلاتین‌ها، پرولین، مالون دی آلدئید، پراکسید هیدروژن و متیل گلی اکسال در گیاه برنج تحت تنش سرب (۰، ۱۵۰ و ۳۰۰ میکرومولار)

آنالیز واریانس						
df	فیتوکلاتین ریشه	فیتوکلاتین برگ	پروکلین	مالون دی آلدئید	پراکسید هیدروژن	متیل گلی اکسال
تیمار	۰/۰۴**	۰/۰۵**	۷۳**	۳۸**	۲۳۰۸**	۱۳۱**
خطا	۰/۰۰۰۷	۰/۰۰۰۸	۰/۲	۰/۰۶	۳/۲	۰/۳
ضریب تغییرات (%)	۵/۱	۸/۶	۵/۸	۳/۸	۲/۲	۳/۵

مقایسه میانگین

تیمارها	فیتوکلاتین ریشه (میکرومول بر گرم وزن تر)	فیتوکلاتین برگ (میکرومول بر گرم وزن تر)	پروکلین (میلی-مول بر گرم وزن تر)	مالون دی آلدئید (نانومول بر گرم وزن تر)	پراکسید هیدروژن (میکرومول بر گرم وزن تر)	متیل گلی اکسال (میکرومول بر گرم وزن تر)
شاهد (بدون سرب)	۰/۳۷۹ ± ۰/۰۲۱ ^b	± ۰/۰۱۸ ^c	۲/۰۹ ± ۰/۱۵ ^c	۳/۰۸ ± ۰/۱۷ ^c	± ۱/۶۸ ^c	۱۰/۲۶ ± ۰/۴۲ ^c
سرب ۱۵۰ میکرومولار	۰/۵۷۳ ± ۰/۰۲۸ ^a	۰/۳۵۵ ± ۰/۰۲۸ ^b	۸/۲۸ ± ۰/۴۰ ^b	۶/۶۸ ± ۰/۱۸ ^b	۸۳/۵۷ ± ۱/۷۷ ^b	۱۶/۵۷ ± ۰/۴۸ ^b
سرب ۳۰۰ میکرومولار	± ۰/۰۲۸ ^a	۰/۴۲۵ ± ۰/۰۳۴ ^a	۱۱/۸۵ ± ۰/۶۲ ^a	۱۰/۲۳ ± ۰/۳۶ ^a	۱۰۹/۴۰ ± ۱/۹۳ ^a	۲۳/۴۸ ± ۰/۷۷ ^a

** معنی‌داری در سطح یک درصد.

مقادیر با حروف کوچک یکسان در هر ستون، فاقد اختلاف معنی‌دار آماری در سطح احتمال ۵ درصد براساس آزمون LSD هستند.

فیتوکلاتین‌ها و پرولین: مطابق نتایج آنالیز واریانس، تیمار سرب تاثیر معنی‌داری بر محتویات فیتوکلاتین‌های ریشه و برگ و همچنین محتوای پرولین برگ در سطح یک درصد داشت (جدول ۳). نتایج نشان دادند که افزایش غلظت سرب باعث افزایش تجمع فیتوکلاتین‌ها در ریشه و برگ گیاه برنج شد که بیشترین تجمع فیتوکلاتین‌ها تحت غلظت ۳۰۰ میکرومولار سرب به ترتیب به میزان ۵۵/۲ و ۱۳۴/۸ درصد افزایش نسبت به گیاهان شاهد مشاهده شد (جدول ۳). افزایش ۴ و ۵/۷ برابری در محتوای پرولین برگ در گیاهان تیمار شده با ۱۵۰ و ۳۰۰ میکرومولار سرب نسبت به گیاهان شاهد مشاهده شد (جدول ۳).

مالون دی آلدئید، پراکسید هیدروژن و متیل گلی اکسال: نتایج مقایسه میانگین نشان دادند که تیمار سرب تاثیر معنی‌داری بر محتویات مالون دی آلدئید، پراکسید هیدروژن و متیل گلی‌اکسال در سطح یک درصد داشته است (جدول ۳). نتایج مقایسه میانگین نشان داد که یک روند افزایشی در سطح مالون دی آلدئید برگ گیاه برنج با افزایش غلظت سرب مشاهده

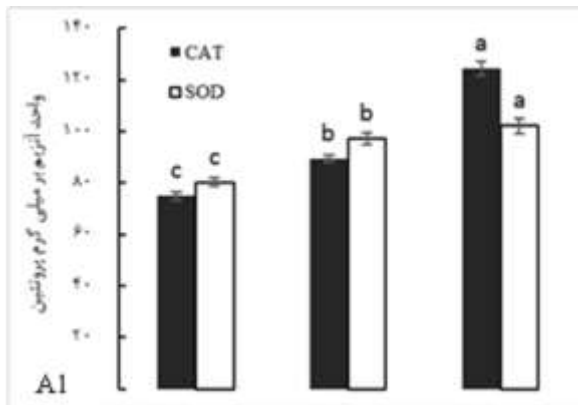
شد که بیشترین میزان مالون دی آلدئید تحت غلظت ۳۰۰ میکرومولار سرب با ۳/۳ برابر افزایش نسبت به گیاه شاهد ثبت شد (جدول ۳). تیمارهای ۱۵۰ و ۳۰۰ میکرومولار سرب باعث افزایش معنی‌دار پراکسید هیدروژن به ترتیب به میزان ۵۴/۹ و ۱۰۲/۷ درصد و متیل گلی‌اکسال به میزان ۶۱/۵ و ۱۲۸/۹ درصد نسبت به گیاهان شاهد شد (جدول ۳).

فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان و سیستم گلی اکسالاز: نتایج آنالیز واریانس نشان داد که اثر تیمار سرب بر فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز، گلوکاتایون ردوکتاز و آسکوربات پراکسیداز در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۴). روند افزایشی در فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز با افزایش غلظت سرب مشاهده شد که به بیشترین میزان تحت غلظت بالای سرب (۳۰۰ میکرومولار) رسید (شکل A۱). تیمارهای ۱۵۰ و ۳۰۰ میکرومولار سرب باعث افزایش فعالیت گلوکاتایون ردوکتاز به ترتیب به میزان ۳۷/۹ و ۴۷/۷ درصد و فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز به میزان ۳۸ و ۱۴/۷ درصد نسبت به گیاهان شاهد شد (شکل B۱).

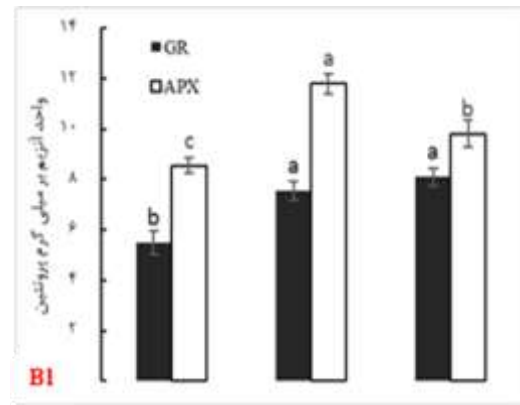
جدول ۴: تجزیه واریانس فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و چرخه گلی‌اکسالاز و آنزیم‌های درگیر در متابولیسم پرولین و کلروفیل در گیاه برنج تحت تنش سرب (۰، ۱۵۰ و ۳۰۰ میکرومولار)

df	کاتالاز	سوپراکسید دیسموتاز	گلوکاتایون ردوکتاز	آسکوربات پراکسیداز	گلی اکسالاز I	گلی اکسالاز II	کلروفیل‌از	آمینولولوبینیک اسید دهیدروژناز	پرولین	پرولین-۵	دلنا-۱
تیمار ۲	۱۹۳۴**	۳۹۶**	۵/۷**	۸**	۰/۰۱**	۰/۰۰۶*	۱۴۷**	۱۷۱۶**	۲/۲**	۲/۵**	۱-دلنا
خطا ۶	۳/۹	۵/۶	۰/۲	۰/۱۸	۰/۰۰۰۶	۰/۰۰۰۷	۰/۳	۴/۶	۰/۰۴	۰/۰۰۳	پرولین-۵
ضرب تغییرات (%)	۲/۲	۲/۶	۵/۷	۴/۲	۶/۵	۹/۴	۳/۶	۲/۸	۴/۱	۳/۲	سنتاز ۱

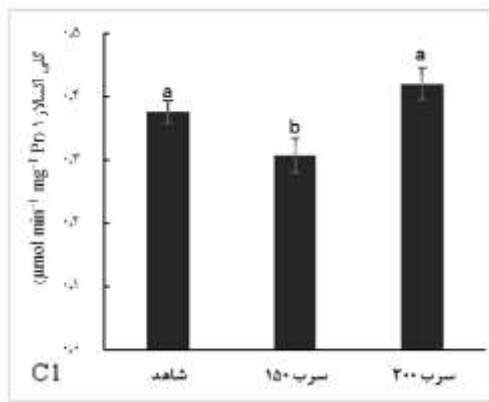
* و ** به ترتیب معنی‌داری در سطح پنج و یک درصد.



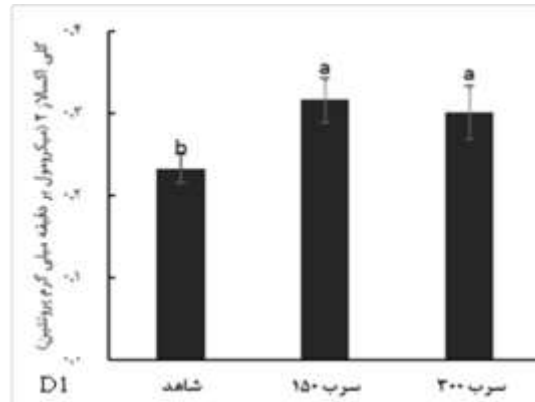
شکل A1: تاثیر غلظت‌های مختلف سرب (۰، ۱۵۰ و ۳۰۰ میکرومولار) بر فعالیت آنزیم‌های کاتالاز (CAT) و سوپراکسید دیسموتاز (SOD)



شکل B1: تاثیر غلظت‌های مختلف سرب (۰، ۱۵۰ و ۳۰۰ میکرومولار) بر ردوکتاز (GR) و آسکوربات پراکسیداز (APX)



شکل C1: تاثیر غلظت‌های مختلف سرب (۰، ۱۵۰ و ۳۰۰ میکرومولار) بر فعالیت آنزیم‌های گلوکاتایون گلی اکسالاز ۱



شکل D1: تاثیر غلظت‌های مختلف سرب (۰، ۱۵۰ و ۳۰۰ میکرومولار) بر گلی اکسالاز ۲ فعالیت آنزیم‌های گلوکاتایون گلی اکسالاز ۱

میکرومولار باعث افزایش در فعالیت آنزیم گلی اکسالاز II به ترتیب به میزان ۳۵/۸ و ۲۹/۳ درصد نسبت به گیاهان شاهد شدند (شکل D1).

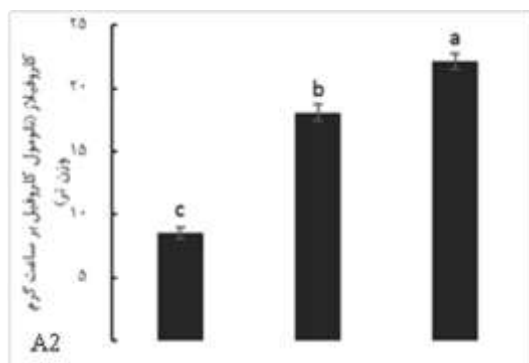
آنزیم‌های درگیر در متابولیسم پرولین و کلروفیل: نتایج آنالیز واریانس نشان دادند که اثر تیمار سرب بر فعالیت آنزیم‌های کلروفیلاز، آمینولولینیک اسید دهیدروژناز، پرولین دهیدروژناز و پرولین-۵-کربوکسیلاز سنتتاز در سطح یک درصد معنی‌دار می‌باشد (جدول ۴). مقایسه میانگین نشان داد که تیمار

تجزیه واریانس نشان داد که تیمار سرب بر فعالیت آنزیم گلی اکسالاز I در سطح یک درصد و آنزیم گلی اکسالاز II در سطح پنج درصد تاثیر معنی‌دار داشته است (جدول ۴). نتایج همچنین نشان دادند که تیمار ۱۵۰ میکرومولار سرب باعث کاهش فعالیت آنزیم گلی اکسالاز I به میزان ۱۸ درصد شد با اینحال، تیمار ۳۰۰ میکرومولار سرب باعث افزایش فعالیت آنزیم گلی اکسالاز I به میزان ۱۱/۸ درصد نسبت به گیاهان شاهد شد (شکل C1). تیمارهای ۱۵۰ و ۳۰۰

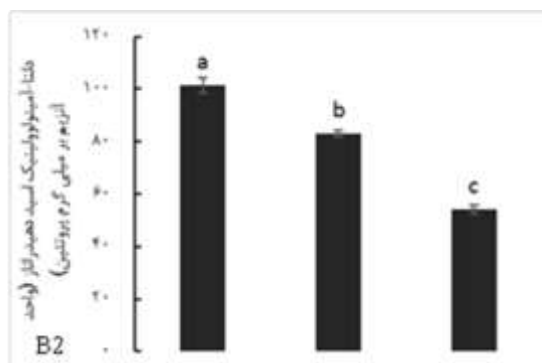
احیا شده به اکسید شده در سطح یک درصد داشت (جدول ۵). نتایج مقایسه میانگین نشان دادند که تیمارهای ۱۵۰ و ۳۰۰ میکرومولار سرب باعث کاهش آسکوربیک اسید احیا شده به ترتیب به میزان ۴۸/۸ و ۵۴/۵ درصد و افزایش محتوای آسکوربیک اسید اکسید شده به ترتیب به میزان ۲/۱ و ۲/۴ درصد نسبت به گیاهان شاهد شدند (شکل A۳). افزایش غلظت سرب باعث افزایش معنی‌دار محتوای گلوکاتایون احیا شده و اکسید شده در برگ گیاه برنج نسبت به گیاهان شاهد شد که بالاترین سطح هر دو ترکیب تحت تیمار ۳۰۰ میکرومولار سرب مشاهده شد (شکل B۳). افزایش غلظت سرب باعث روند کاهشی در نسبت‌های آسکوربیک اسید احیا شده به اکسید شده و گلوکاتایون احیا شده به اکسید شده نسبت به گیاهان شاهد شد که به کمترین میزان خود تحت غلظت‌های بالای سرب (۳۰۰ میکرومولار) رسیدند (شکل C۳ و D).

۱۵۰ و ۳۰۰ میکرومولار سرب باعث افزایش فعالیت آنزیم کلروفیلاز به ترتیب به میزان ۲/۱ و ۲/۶ برابر شد، درحالی‌که فعالیت آنزیم آمینولولینیک اسید دهیدروژناز به ترتیب به میزان ۱۸/۱ و ۴۶/۸ درصد نسبت به گیاهان شاهد کاهش یافت (شکل A۲ و B۲). افزایش غلظت سرب باعث روند کاهشی در فعالیت آنزیم پرولین دهیدروژناز در برگ گیاه برنج شد که به کمترین میزان فعالیت تحت غلظت ۳۰۰ میکرومولار سرب رسید (شکل C۲). تیمارهای ۱۵۰ و ۳۰۰ میکرومولار سرب همچنین باعث افزایش فعالیت آنزیم دلتا-۱-پرولین-۵-کربوکسیلات سنتتاز ۱ به ترتیب به میزان ۳/۷ و ۴/۳ برابر نسبت به گیاهان شاهد شد (شکل D۲).

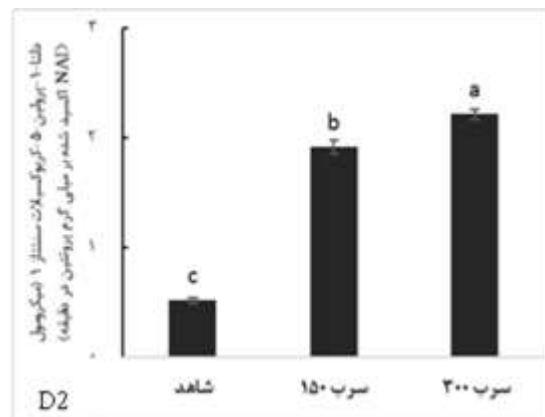
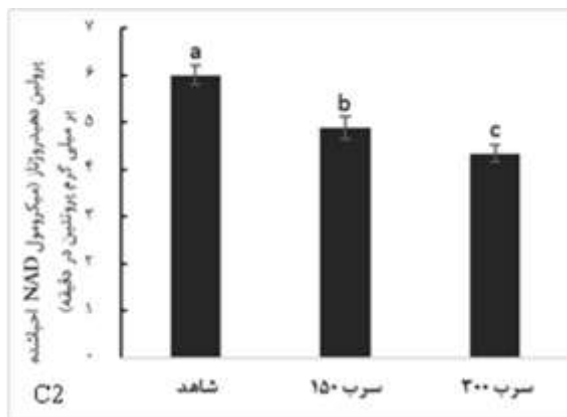
چرخه آسکوربیک اسید-گلوکاتایون: نتایج آنالیز واریانس نشان دادند که تیمار سرب تاثیر معنی‌داری بر محتویات آسکوربیک اسید احیا شده و اکسید شده، گلوکاتایون احیا شده و اکسید شده و نسبت‌های آسکوربیک اسید احیا شده به اکسید شده و گلوکاتایون



شکل A2: تاثیر غلظت‌های مختلف سرب (۰، ۱۵۰ و ۳۰۰ میکرومولار) بر فعالیت آنزیم‌های کلروفیلاز ردوکتاز (GR) و آسکوربات پراکسیداز (APX)



شکل B2: تاثیر غلظت‌های مختلف سرب (۰، ۱۵۰ و ۳۰۰ میکرومولار) بر فعالیت آنزیم‌های دلتا-۱-پروپیل-۵-کربوکسیلات سنتتاز (APX) و آسکوربات پراکسیداز (GR) دهیدراتاز ردوکتاز (GR)



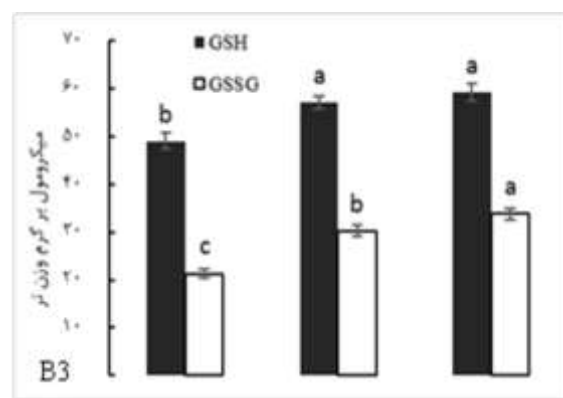
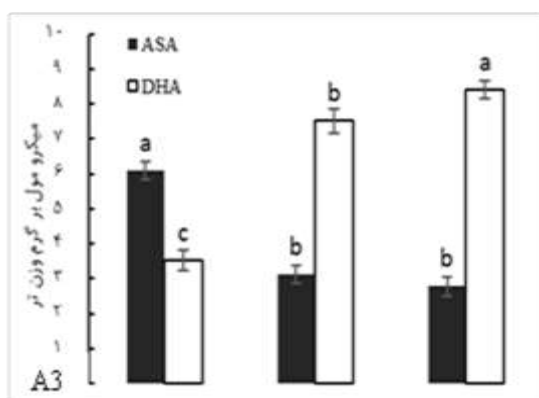
شکل C2: تاثیر غلظت‌های مختلف سرب (۰، ۱۵۰ و ۳۰۰ میکرومولار) بر فعالیت آنزیم‌های پرولین دهیدروژناز ردوکتاز (GR) و آسکوربات پراکسیداز (APX)

شکل D2: تاثیر غلظت‌های مختلف سرب (۰، ۱۵۰ و ۳۰۰ میکرومولار) بر فعالیت آنزیم‌های دلتا-۱-پرولین-۵-کربوکسیلاز سنتتاز ۱ ردوکتاز (GR) و آسکوربات پراکسیداز (APX)

بر رشد دیگر گیاهان مانند گوجه فرنگی (Bali et al., 2018) و کلزا (Shakoor et al., 2014) نیز قبلاً گزارش شده است. Ali و همکاران (۲۰۱۴) نشان دادند که تنش سرب با تاثیر منفی بر رشد ریشه، کاهش جذب عناصر غذایی و اختلال در فرآیندهای متابولیکی، باعث کاهش رشد و بیومس گیاه شد. در گزارش دیگری، Bali و همکاران (۲۰۱۸) بیان داشتند که سمیت سرب با القای تنش اکسیداتیو و کاهش هدایت روزنه‌ای و محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی، تاثیر منفی بر رشد گیاه گوجه فرنگی داشت.

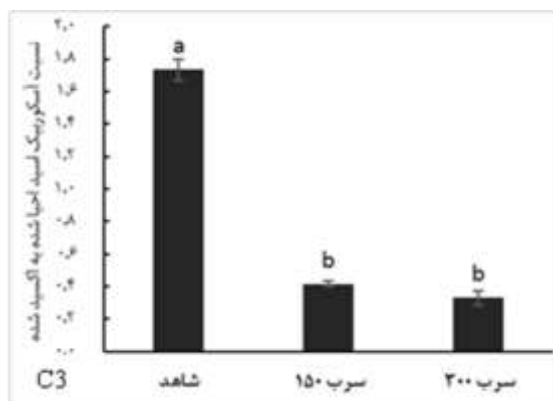
بحث

وجود فلزات سنگین در محیط زیست گیاهان نوعی عامل تنش‌زا می‌باشد که باعث ایجاد تغییرات فیزیولوژیک شده و می‌تواند موجب کاهش توان رشد گیاه و در حالت شدیدتر باعث از بین رفتن گیاه شود. نتایج نشان داد که سرب در غلظت‌های ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی لیتر باعث کاهش ارتفاع و وزن خشک کل برنج شد و بیشترین کاهش تحت غلظت ۳۰۰ میلی مولار سرب گزارش شد که نشان‌دهنده سمیت سرب بر رشد گیاه برنج می‌باشد. نتایج مشابهی از سمیت سرب

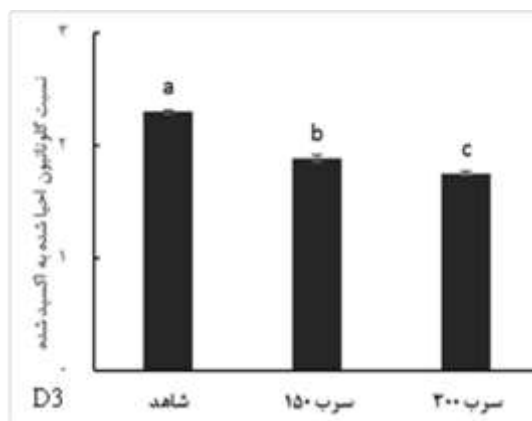


شکل A3: تاثیر غلظت‌های مختلف سرب (۰، ۱۵۰ و ۳۰۰ میکرومولار) بر فعالیت محتوای آسکوربیک اسید احیاشده (ASA) و اکسیدشده (DHA) ردوکتاز (GR) و آسکوربات پراکسیداز (APX)

شکل B3: تاثیر غلظت‌های مختلف سرب (۰، ۱۵۰ و ۳۰۰ میکرومولار) بر محتوای گلوتاتیون احیاشده (GSH) و اکسید شده (GSSG)



شکل C3: تاثیر غلظت‌های مختلف سرب (۰، ۱۵۰ و ۳۰۰ میکرومولار) بر فعالیت محتوای نسبت‌های آسکوربیک اسید احیاشده



شکل D3: تاثیر غلظت‌های مختلف سرب (۰، ۱۵۰ و ۳۰۰ میکرومولار) بر گلو تاتیون احیاشده به اکسید شده

ها می‌شود (Srivastava et al., 2014). بنابراین، نتایج نشان داد که تنش سرب با تغییر متابولیسم کلروفیل و کاهش رنگیزه‌های فتوستتزی، باعث تأثیر منفی بر دستگاه فتوستتزر و در نتیجه، کاهش رشد گیاه شد.

پرولین در شرایط تنش‌زا نقش مهمی در مهار رادیکال‌های سمی، حفظ پتانسیل اسمزی سلولی، بهبود هموستازی ردوکس و عملکرد پروتئین ایفا می‌کند (Ghorbani et al., 2019a). نتایج نشان دادند که تیمار سرب با تعدیل فعالیت آنزیم‌های درگیر در متابولیسم پرولین (پرولین دهیدروژناز و دلتا-۱-پرولین-۵-کربوکسیلات سنتتاز ۱)، باعث افزایش تجمع پرولین در برگ گیاه برنج شد که می‌تواند ناشی تنش آبی القا شده توسط سمیت فلزات سنگین باشد (Ahmad et al., 2020). افزایش تجمع پرولین در گیاهان گندم (Bali et al., 2018) و گوجه فرنگی (Lamhamdi et al., 2011) تحت تنش سرب نیز قبلاً گزارش شده است. Sharma و Dubey (۲۰۰۵) نشان دادند که پرولین به عنوان تثبیت کننده پروتئین و کلاتور فلز، باعث بهبود تحمل گیاه تحت سمیت فلزات سنگین می‌شود. بنابراین، افزایش تجمع پرولین

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که کاربرد سرب باعث کاهش آنزیم درگیر در سنتز کلروفیل (آمینولولینیک اسید دهیدروژناز) و افزایش آنزیم تجزیه کننده کلروفیل (کلروفیلاز) شد که باعث رنگیزه‌های فتوستتزی و فلورسانس کلروفیل مطابقت دارد. این نتایج نشان دهنده اثرات سمی سرب بر دستگاه فتوستتزی می‌باشد که مطابق نتایج گزارش شده توسط Ashraf و همکاران (۲۰۱۷) و Piotrowska و همکاران (۲۰۰۹) می‌باشد. Hegedus و همکاران (۲۰۰۱) بیان داشتند که کاهش در رنگیزه‌های فتوستتزی در گیاهان تحت استرس فلزات سنگین می‌تواند ناشی از القای فعالیت آنزیم کلروفیلاز باشد که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد. تحت تنش سرب، یون سرب جایگزین منیزیم مرکزی در کلروفیل می‌شود، بنابراین مولکول‌های کلروفیل دچار اختلال می‌شوند و باعث ایجاد تغییرات زیرساختی کلروفیل شده و بیوستتزر کلروفیل را مهار می‌کنند (Kupper et al., 1996). مطالعات قبلی همچنین نشان دادند که تخریب کلروفیل یکی از پیامدهای سمیت سرب می‌باشد که باعث کلروز یا تغییر رنگ در برگ-

سطح پراکسید هیدروژن، متیل گلی اکسال و مالون دی آلدئید در گیاهان گلرنگ (Namdjoyan et al., 2020) و کلزا (Shakoor et al., 2014) تحت تنش سرب قبلا گزارش شده است. تجمع انواع اکسیژن‌های فعال تحت شرایط تنش‌زا باعث آسیب به فرآیندهای فیزیولوژیکی سلول‌های گیاهی می‌شود که با تحریک چرخه هابر-ویس، باعث تولید رادیکال‌های هیدروکسیل و القای پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی و در نتیجه، آسیب به عملکرد و نفوذپذیری غشاها می‌شود (Mittler et al., 2012). گیاهان دارای سیستم دفاعی کارآمدی برای مقابله با تنش اکسیداتیو القا شده توسط تنش فلزات سنگین می‌باشند که شامل آنتی اکسیدان‌های آنزیمی و غیر آنزیمی و سیستم گلی اکسالاز می‌باشد. نتایج نشان دادند که کاربرد سرب باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان و گلی اکسالاز شد که نشان دهنده فعال شدن مکانیسم دفاعی گیاه برای مقابله با تنش اکسیداتیو القا شده توسط سمیت سرب می‌باشد. نتایج مشابهی از القای سیستم دفاعی آنتی اکسیدانی و آنزیم‌های گلی اکسالاز تحت سمیت سرب توسط Piotrowska و همکاران (۲۰۰۹) و Bali و همکاران (۲۰۱۸) گزارش شده است. آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در سمیت‌زدایی سوپراکسید آنیون به پراکسید هیدروژن و در نتیجه، پاک‌سازی انواع اکسیژن فعال نقش مهمی دارد، درحالی‌که آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز و کاتالاز آنزیم‌های کلیدی در کاتابولیسم پراکسید هیدروژن به آب هستند (Garg and Manchanda, 2009). بنابراین، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان و گلی اکسالاز می‌تواند نقش مهمی در کاهش سطح پراکسید هیدروژن و متیل گلی اکسال و در نتیجه، بهبود تحمل گیاه تحت سمیت سرب داشته باشد. گلوکاتایون و آسکوربیک اسید دو تا از فراوانترین ترکیبات آنتی اکسیدان غیر آنزیمی در گیاهان می‌باشند که از سلول‌های گیاهی در مقابل

در گیاه برنج تحت تنش سرب نشان دهنده القای مکانیسم دفاعی گیاه برای سازگاری با شرایط تنش‌زا می‌باشد.

فیتوکلاتین‌ها نقش مهمی در سمیت‌زدایی فلزات سنگین با کلات کردن فلزات سمی در گیاهان ایفا می‌کنند (Hall 2002). نتایج نشان دادند که کاربرد تیمارهای سرب باعث افزایش تجمع سرب در ریشه و برگ گیاه برنج شد که با افزایش تجمع فیتوکلاتین‌ها در ریشه و برگ‌ها مطابقت دارد. در واقع، افزایش تجمع فیتوکلاتین‌ها در جهت مقابله با سمیت سرب و افزایش تحمل گیاه تحت تنش سرب می‌باشد. Bali و همکاران (۲۰۱۸) گزارش کردند که افزایش تجمع فیتوکلاتین‌ها در گیاه گوجه فرنگی باعث افزایش تحمل گیاه تحت سمیت سرب می‌شود. گیاهان با تشکیل کمپلکس فیتوکلاتین‌ها-فلزات سمی و انتقال آنها به واکوئل‌ها، باعث کاهش سمیت فلزات سنگین و بهبود تحمل گیاه می‌شوند. در گزارشی، Hasan و همکاران (۲۰۱۵) نشان دادند که افزایش بیان ژن‌های سنتزکننده فیتوکلاتین‌ها و افزایش تجمع این ترکیب‌ها باعث افزایش سریع تحمل گیاه تحت سمیت فلزات سنگین می‌شود. بنابراین، افزایش تجمع سرب در ریشه و برگ گیاه برنج باعث افزایش سطح فیتوکلاتین‌ها در ریشه و برگ گیاه شد که می‌تواند باعث بهبود تحمل گیاه تحت سمیت سرب شود.

افزایش سطح پراکسید هیدروژن، متیل گلی اکسال و مالون دی آلدئید نشان دهنده القای تنش اکسیداتیو و آسیب به غشاهای زیستی می‌باشد (Ghorbani et al., 2019b). نتایج نشان دادند که تیمارهای سرب باعث افزایش سطح پراکسید هیدروژن، متیل گلی اکسال و مالون دی آلدئید در برگ گیاه برنج شد که نشان‌دهنده القا تنش اکسیداتیو می‌باشد که می‌تواند نقش مهمی در کاهش رشد و زیست‌توده گیاه برنج تحت تنش سرب داشته باشد. نتایج مشابهی از افزایش

گلوکاتینون احیاء شده به اکسید شده در گیاه برنج تحت سمیت مس کاهش یافتند که نشان دهنده نقش این ترکیبات آنتی اکسیدان غیرآنزیمی در سمیت‌زدایی فلزات سنگین می‌باشد.

نتیجه‌گیری

نتایج تحقیقات حاضر نشان دادند که تیمار سرب به خصوص در غلظت ۳۰۰ میکرومولار با تاثیر منفی بر مکانیسم‌های فیزیولوژیکی و سنتز کلروفیل، باعث کاهش رشد و بیومس گیاه برنج شد. تنش سرب همچنین با افزایش ترکیبات سمی پراکسید هیدروژن و متیل گلی اکسال، باعث القای تنش اکسیداتیو و آسیب به غشاهای زیستی شد. با اینحال، گیاه برنج برای مقابله با سمیت سرب با تعدیل آنزیم‌های درگیر در متابولیسم پرولین و بهبود فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان و چرخه گلی اکسالاز، باعث افزایش تجمع پرولین و تقویت سیستم دفاعی آنتی اکسیدان گیاه شد. بنابراین، غلظت بیش از ۱۵۰ میکرومولار سرب در خاک می‌تواند تاثیرات منفی بر فرآیندهای فیزیولوژیکی و متابولیک‌های مهم گیاه برنج القا کند که باعث کاهش رشد و بیومس گیاه شود.

رادیکال‌های آزاد ایجاد شده توسط انواع اکسیژن فعال محافظت می‌کنند. نتایج نشان دادند که تیمارهای سرب باعث کاهش آسکوربیک اسید احیا شده و افزایش آسکوربیک اسید اکسیدشده، گلوکاتینون احیاء شده و اکسید شده در برگ گیاهان برنج شد که با کاهش نسبت‌های آسکوربیک اسید احیا شده به اکسید شده و گلوکاتینون احیاء شده به اکسید شده همراه بود که مطابق نتایج Ashraf و همکاران (۲۰۱۷) می‌باشد. گلوکاتینون و آسکوربیک اسید نقش مستقیم خنثی‌سازی سرب دارند و ترکیبات مهم در مسیر هالیول-آسادا محسوب می‌شوند که توسط آنزیم‌های گلوکاتینون ردوکتاز و دهیدروآسکوربات ردوکتاز به فرم‌های احیاء شده و اکسیدشده تبدیل می‌شوند. کاهش نسبت‌های آسکوربیک اسید احیا شده به اکسید شده و گلوکاتینون احیاء شده به اکسید شده نشان دهنده مصرف فرم‌های احیا شده ترکیبات آنتی اکسیدان غیرآنزیمی گلوکاتینون و آسکوربیک اسید در سمیت‌زدایی سرب بوسیله مکانیسم خنثی‌سازی پراکسید هیدروژن می‌باشد (Piechalak et al., 2002). در گزارش دیگری، Mostofa و همکاران (۲۰۱۵) نشان دادند که نسبت‌های آسکوربیک اسید احیا شده به اکسید شده و

References

- Ahmad, P., Alam, P., Balawi, T.H., Altalayan, F.H., Ahanger, M.A. and Ashraf, M. (2020). Sodium nitroprusside (SNP) improves tolerance to arsenic (As) toxicity in *Vicia faba* through the modifications of biochemical attributes, antioxidants, ascorbate-glutathione cycle and glyoxalase cycle. *Chemosphere*. 244: 125480
- Alexieva, V., Sergiev, I., Mapelli, S. and Karanov, E. (2001). The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant, Cell & Environment*. 24: 1337-44.
- Ali, B., Xu, X., Gill, R.A., Yang, S., Ali, S., Tahir, M. and Zhou, W. (2014). Promotive role of 5-aminolevulinic acid on mineral nutrients and antioxidative defense system under lead toxicity in *Brassica napus*. *Industrial Crops and Products*. 52: 617-626.
- Anjum, S.A., Ashraf, U., Khan, I., Tanveer, M., Ali, M., Hussain, I. and Wang L.C. (2016). Chromium and aluminum phytotoxicity in maize: morphophysiological responses and metal uptake. *Clean Soil Air Water*. 44: 1-10.
- Ashraf, U., Kanu, A.S., Deng, Q., Mo, Z., Pan, S., Tian, H. and Tang, X. (2017). Lead (Pb) toxicity; physio-biochemical mechanisms, grain yield, quality, and pb distribution proportions in scented rice. *Frontiers in Plant Science*. 8: 259.

- Ashraf, U., Kanu, A.S., Mo, Z.W., Hussain, S., Anjum, S.A., Khan, I., Abbas, R.N. and Tang, X. (2015). Lead toxicity in rice; effects, mechanisms and mitigation strategies-a mini review. *Environmental Science and Pollution Research*. 22: 18318–18332.
- Bali, S., Kaur, P., Kohli, S.K., Ohri, P., Thukral, A.K., Bhardwaj, R., Wijaya, L., Alyemeni, M.N. and Ahmad, P. (2018). Jasmonic acid induced changes in physio-biochemical attributes and ascorbate-glutathione pathway in *Lycopersicon esculentum* under lead stress at different growth stages. *Science of the Total Environment*. 645: 1344–1360
- Bates, L.S., Waldern, R.P. and Tear, I.D. (1973). Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil*. 39: 205-207.
- Beauchamp, C. and Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*. 44: 276-287.
- Charest, C. and Phan, C.T. (1990). Cold-acclimation of wheat (*Triticum Aestivum*) - properties of enzymes involved in proline metabolism. *Physiologia Plantarum*. 80: 159–168.
- Clemens, S. (2006). Toxic metal accumulation, response to exposure and mechanism of tolerance in plants. *Biochimie*. 88: 1707–1719.
- Costa, M.L., Civello, P.M., Chaves, A.R. and Martínez, G.A. (2005). Effect of ethephon and 6-benzylaminopurine on chlorophyll degrading enzymes and a peroxidase-linked chlorophyll bleaching during post-harvest senescence of broccoli (*Brassica oleracea* L.) at 20 C. *Postharvest Biology and Technology*. 35(2): 191–9.
- Dutilleul, C., Driscoll, S., Cornic, G., De Paepe, R., Foyer, C.H. and Noctor, G. (2003). Functional mitochondrial complex I is required by tobacco leaves for optimal photosynthetic performance in photorespiratory conditions and during transients. *Plant Physiology*. 131: 264–275.
- Garg, N. and Manchanda, G. (2009). ROS generation in plants: boon or bane? *Plant Biosystems*. 143: 8–96.
- Gerami, M., Ghorbani, A. and Karimi, S. (2018). Role of salicylic acid pretreatment in alleviating cadmium-induced toxicity in *Salvia officinalis* L. *Iranian Journal of Plant Biology*. 10(1): 81–95.
- Ghasemi-Omran, V.O., Ghorbani, A. and Sajjadi-Otaghsara, S.A. (2021). Melatonin alleviates NaCl-induced damage by regulating ionic homeostasis, antioxidant system, redox homeostasis, and expression of steviol glycosides-related biosynthetic genes in in vitro cultured *Stevia rebaudiana* Bertoni. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*. 57: 319–331.
- Ghorbani, A., Ghasemi Omran, V.O., Razavi, S.M., Pirdashti, H. and Ranjbar, M. (2019a). *Piriformospora indica* confers salinity tolerance on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) through amelioration of nutrient accumulation, K⁺/Na⁺ homeostasis and water status. *Plant Cell Reports*. 38: 1151–1163.
- Ghorbani, A., Pishkar, L., Roodbari, N., Pehlivan, N. and Wu, C. (2021). Nitric oxide could allay arsenic phytotoxicity in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) by modulating photosynthetic pigments, phytochelatin metabolism, molecular redox status and arsenic sequestration. *Plant Physiology and Biochemistry*. 167: 337–348.
- Ghorbani, A., Razavi, S.M., Ghasemi Omran, V. and Pirdashti, H. (2019b). Effects of endophyte fungi symbiosis on some physiological parameters of tomato plants under 10 day long salinity stress. *Journal of Plant Process and Function*. 7(27): 193–208.
- Ghorbani, A., Razavi, S.M., Ghasemi Omran, V.O. and Pirdashti, H. (2018a). *Piriformospora indica* alleviates salinity by boosting redox poise and antioxidative potential of tomato. *Russian Journal of Plant Physiology*. 65: 898–907.
- Ghorbani, A., Razavi, S.M., Ghasemi Omran, V.O. and Pirdashti, H. (2018b). *Piriformospora indica* inoculation alleviates the adverse effect of NaCl stress on growth, gas exchange and chlorophyll fluorescence in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Plant Biology* 20: 729–736.
- Ghorbani, A., Tafteh, M., Roudbari, N., Pishkar, L., Zhang, W. and Wu, C. (2020). *Piriformospora indica* augments arsenic tolerance in rice (*Oryza sativa*) by immobilizing

- arsenic in roots and improving iron translocation to shoots. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 209: 111793.
- Ghorbani, A., Zarinkamar, F. and Fallah, A. (2009). The effect of cold stress on the morphologic and physiologic characters of tow rice varieties in seedling stage. *Journal of Crop Breeding*. 1: 50–66.
- Ghorbani, A., Zarinkamar, F. and Fallah, A. (2011). Effect of cold stress on the anatomy and morphology of the tolerant and sensitive cultivars of rice during germination. *Journal of Cell & Tissue*. 2(3): 235–244.
- Gill, M. (2014). Heavy metal stress in plants: a review. *International Journal of Advanced Research*. 2(6): 1043-1055.
- Hall, J.L. (2002) Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany*. 53: 1–11
- Hasan, M.K., Ahammed, G.J., Yin, L., Shi, K., Xia, X., Zhou, Y., Yu, J. and Zhou, J. (2015). Melatonin mitigates cadmium phytotoxicity through modulation of phytochelatin biosynthesis, vacuolar sequestration, and antioxidant potential in *Solanum lycopersicum* L. *Frontiers in Plant Science*. 6: 601
- Hasanuzzaman, M., Hossain, M.A. and Fujita, M. (2011). Nitric oxide modulates antioxidant defense and methylglyoxal detoxification system and reduces salinity induced damage in wheat seedling. *Plant Biotechnology Reports*. 5: 353–365.
- Heath, R.L. and Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 125: 189–198.
- Hegedus, A., Erdel, S. and Horvath, G. (2001). Comparative studies of H₂O₂ detoxifying enzymes in green and greening barley seedlings under Cd stress. *Plant Science*. 160: 1085–1093.
- Jain, M. and Gadre, R. (2004). Inhibition of chlorophyll biosynthesis by mercury in excised etiolated maize leaf segments during greening: effect of 2-oxoglutarate. *Indian Journal of Experimental Biology*. 42: 419–423.
- Kumar, A., Prasad, M.N.V. and Sytar, O. (2012). Lead toxicity, defense strategies and associated indicative biomarkers in *Talinum triangulare* grown hydroponically. *Chemosphere*. 89: 1056–1065.
- Kupper, H., Kupper, 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.
- Lamhamdi, M., Bakrim, A., Aarab, A., Lafont, R. and Sayah, F. (2011). Effects of lead phytotoxicity on wheat (*Triticum aestivum* L.) seed germination and seedling growth. *Comptes Rendus Biologies*. 334: 118–126.
- Lichtenthaler, H.K. (1987). Chlorophyll and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembrane. *Methods in Enzymology*. 148: 350-381.
- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidant and stress tolerance. *Trends in Plant Science*. 7: 841–851.
- Mittler, R., Finka, A. and Goloubinoff, P. (2012). How do plants feel the heat? *Trends in Biochemical Sciences*. 37: 118–125.
- Mostofa, M.G., Hossain, M.A., Fujita, M. and Tran, L.S. (2015). Physiological and biochemical mechanisms associated with trehalose-induced copper-stress tolerance in rice. *Scientific Reports*. 5: 11433.
- Namdjoyan, S., Soorki, A.A., Elyasi, N., Kazemi, N. and Simaei, M. (2020). Melatonin alleviates lead-induced oxidative damage in safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seedlings. *Ecotoxicology*. 29(1): 108–118.
- Piechalak, A., Tomaszewska, B., Baralkiewicz, D. and Malecka, A. (2002). Accumulation and detoxification of lead ions in legumes. *Phytochemistry*. 60: 153–162.
- Piotrowska, A., Bajguz, A., Godlewska-Zylikiewicz, B., Czerpak, R. and Kamińska, M. (2009). Jasmonic acid as modulator of lead toxicity in aquatic plant *Wolffia arrhiza* (Lemnaceae). *Environmental and Experimental Botany*. 66: 507–513.

- Pourrut, B., Shahid, M., Dumat, C., Winterton, P. and Pinelli, E. (2011). Lead uptake, toxicity, and detoxification in plants. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. 213: 113–136.
- Principato, G.B., Rosi, G., Talesa, V., Govannini, E. and Uotila, L. (1987). Purification and characterization of two forms of glyoxalase II from rat liver and brain of Wistar rats. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*. 911: 349–355.
- Sairam, R.K., Rao, K.V. and Srivastava, G.C. (2002). Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. *Plant Science*. 163: 1037-1046.
- Shakoor, M.B., Ali, S., Hameed, A., Farid, M., Hussain, S., Yasmeen, T., Najeeb, U., Bharwana, S.A. and Abbasi, G.H. (2014). Citric acid improves lead (pb) phytoextraction in *Brassica napus* L. by mitigating pb-induced morphological and biochemical damages. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 109: 38–47.
- Sharma, P. and Dubey, R.S. (2005). Lead toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*. 17: 35–52.
- Singh, R., Tripathi, R.D., Dwivedi, S., Kumar, A., Trivedi, P.K. and Chakrabarty D. (2010). Lead bioaccumulation potential of an aquatic macrophyte *Najas indica* are related to antioxidant system. *Bioresource Technology*. 101: 3025–3032.
- Srivastava, R.K., Pandey, P., Rajpoot, R., Rani, A. and Dubey, R.S. (2014). Cadmium and lead interactive effects on oxidative stress and antioxidative responses in rice seedlings. *Protoplasma*. 251: 1047–1065.
- Sumithra, K., Jutur, P.P., Carmel, B.D. and Reddy, A.R. (2006). Salinity-induced changes in two cultivars of *Vigna radiata*: responses of antioxidative and proline metabolism. *Plant Growth Regulation*. 50: 11–22.
- Wild, R., Ooi, L., Srikanth, V. and Münch, G. (2012). A quick, convenient and economical method for the reliable determination of methylglyoxal in millimolar concentrations: the N-acetyl-L-cysteine assay. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 403: 2577–2581.