

## Insights into some physiological and biochemical responses of *Populus alba* and *Populus nigra* to lead contamination

Elham Etemadi, Payam Fayyaz \* and Roghayeh Zolfaghari

Department of Forestry, Faculty of Agriculture and Institute of Natural Resources and Environment, Yasouj University, Yasouj, Iran

### Abstract

The effects of lead (PbCl<sub>2</sub>) increment, under hydroponic conditions up to 15, 45 and 90 mg/l in presence of EDTA, on some physiological and biochemical traits of one year old saplings of *P. nigra* and *P. alba*, were investigated. Six weeks after establishing in target concentration, the amount of lead, biomass, water, soluble sugars, proline, electrolyte leakage, malondialdehyde, and pigments were assessed in different organs. The results revealed that with increasing lead concentration in culture medium in the studied period, the amount of lead in saplings increased, but no effect was observed on their biomass. In both species the magnitude of lead accumulation in root was higher than leaf. *P. nigra* had more water and less soluble sugars than *P. alba*. The concentration of soluble sugars increased up to 1.5 times with lead increment in both species, but proline content increased only in *P. nigra* up to 2 times and remained constant in *P. alba*. Elevation of electrolyte leakage in saplings of *P. nigra* in excess lead treatment was accompanied by no change in malondialdehyde content. Concentrations of pigments were not affected by lead, and only the ratio of chlorophyll a to b in *P. nigra* increased in high lead concentration. In general both species accumulated high extent of lead in their organs. But it seems that *P. nigra*, at least with respect of enhancing plasma membrane permeability, increasing proline and the ratio of chlorophyll a to b, was more sensitive to this toxic metal in compare with *P. alba*.

**Keywords:** Heavy metals, Poplar, Phytoremediation, Relative water content, Membrane permeability

\* Corresponding Author: pfayyaz@yu.ac.ir

## بررسی برخی واکنش‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی در دو گونه شالک (*Populus nigra*) و سپیدار (*Populus alba*) به آلودگی سربی

الهام اعتمادی، پیام فیاض \* و رقیه ذوالفقاری

گروه جنگلداری، دانشکده کشاورزی و پژوهشکده منابع طبیعی و محیط‌زیست، دانشگاه یاسوج، یاسوج، ایران

### چکیده

تأثیر افزایش سرب (سرب کلرید) در محیط کشت آبی تا ۱۵، ۴۵ و ۹۰ میلی‌گرم در لیتر با EDTA، بر برخی ویژگی‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی نهال‌های یک‌ساله دو گونه صنوبر شالک و سپیدار بررسی شد. شش هفته پس از قرار گرفتن در غلظت هدف، مقدار سرب، زی توده، مقدار نسبی آب، میزان نشت الکترولیت‌ها، قندهای محلول، پرولین، مالون دی‌آلدئید و رنگدانه‌های فتوسنتزی در اندام‌های مختلف اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که افزایش سرب در محیط کشت در مدت بررسی، میزان سرب را در نهال‌ها افزایش داد؛ اما بر وزن زی توده آن‌ها تأثیر نداشت. در هر دو گونه تجمع سرب در ریشه بیشتر از برگ بود. گونه شالک محتوای آب بیشتر و غلظت قند محلول کمتری نسبت به گونه سپیدار دارد. غلظت قندهای محلول، با افزایش سرب در هر دو گونه تا ۱/۵ برابر افزایش یافت؛ اما غلظت پرولین، تنها در شالک در غلظت زیاد سرب تا دو برابر افزایش نشان داد و در سپیدار ثابت ماند. نهال‌های شالک قرار گرفته در تیمار شدید سرب، افزایش میزان نشت الکترولیت‌ها را نشان دادند؛ اما مقدار مالون دی‌آلدئید آن‌ها تغییر نکرد. مقدار رنگدانه‌ها نیز با تیمار سرب تغییر نکرد و تنها نسبت کلروفیل a/b در گونه شالک در تیمار شدید افزایش یافت. در مجموع، هر دو گونه مقادیر زیادی از سرب را در اندام‌های خود انباشته کردند؛ اما به نظر می‌رسد گونه شالک، دست کم با توجه به افزایش نفوذپذیری غشای سیتوپلاسمی، افزایش پرولین و نسبت کلروفیل a/b حساسیت بیشتری به این فلز سمی در مقایسه با سپیدار داشته باشد.

**واژه‌های کلیدی:** فلزات سنگین، صنوبر، گیاه پالایی، مقدار نسبی آب، نفوذپذیری غشا

### مقدمه

شناخته‌شده‌ای ندارد و جزء عناصر غیرضروری برای

گیاهان به شمار می‌رود (Kim et al., 2002). گیاهانی

که قادرند بیش از ۱۰۰۰ میلی‌گرم سرب در کیلوگرم

سرب، فراوان‌ترین فلز آلوده‌کننده محیط‌زیست

است (Salt et al., 1998) که عملکرد زیستی

\* نگارنده مسؤل: نشانی پست الکترونیک: pfayyaz@yu.ac.ir، شماره تماس: ۰۷۴۳۳۲۲۶۹۴۲

وزن خشک خود انباشته کنند، گیاهان فراانباشتگر (Baker and Brooks, 1989) نامیده می‌شوند. جذب سرب در گیاهان به علت توان اتصال زیاد آن با آنیون‌های موجود در محلول خاک و تشکیل رسوب به شکل نمک‌های نامحلول سولفات، کربنات، هیدروکسید و فسفات، بسیار محدود است (McBride, 1994). تجمع سرب در گیاهان فراانباشتگر و به ویژه در اندام‌های هوایی، به تدریج و پس از اشباع این جایگاه‌ها نمایان می‌شود (Kalinowska and Pawlik, 2010). بنابراین برای افزایش حلالیت و توان جذب آن، استفاده از محیط کشت آبی در حضور مواد کلاته‌کننده نظیر EDTA پیشنهاد می‌شود (Komárek et al., 2007).

ورود سرب بسته به میزان حساسیت گیاه، در غلظت اندک می‌تواند به بروز تغییراتی در فرایندهای فیزیولوژیک گیاه و در غلظت‌های زیاد حتی به مرگ آن منجر شود (Seregin and Ivanov, 2001; Ernst, 1998). آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی، مولکول‌های متنوعی را نظیر سیستین، پرولین، تیول‌ها (Singh and Sinha, 2005)، قندهای محلول (Couée et al., 2006)، کاروتنوئیدها، ترکیبات فنلی و ترکیبات آلی نیتروژن‌دار (Michalak, 2006) شامل می‌شوند و یکی از سازوکارهای دفاعی اولیه در برابر تنش‌های محیطی به شمار می‌روند. با وجود این، درباره نقش آن‌ها در رویارویی با فلزهای سنگین در گونه‌های درختی، اطلاعات بسیار اندکی وجود دارد.

گونه‌های مختلف سرب در مناطق روستایی و چه در فضای سبز شهری، به شکل مجتمع و پراکنده در حاشیه رودها و جاده‌ها حضور دارند (Sabeti, 1976)؛ این امر امکان قرار گرفتن آن‌ها را در معرض فلزات سنگین به ویژه سرب، یکی از آلاینده‌های مهم صنعتی، افزایش می‌دهد. بررسی‌های مختلف نشان می‌دهد که گونه شالک قادر است سرب قابل جذب را در محیط کشت، تا غلظت ۷۰ میلی‌گرم در لیتر تحمل کند (Stobrawa and Lorenc, 2008). همچنین برخی از محققان از شالک (Baslar et al., 2005; Djingova et al., 1995) و سپیدار (Madejona et al., 2004) برای ارزیابی زیستی سرب استفاده کرده‌اند. توان درخور توجه گونه‌های مختلف صنوبر در تجمع فلزهای سنگین در کنار سایر مزایای آن شامل درختی بودن، غیرمثمر بودن، تکثیر آسان و تعرق زیاد، آن را به گونه‌ای ایدئال برای گیاه‌پالایی بدل کرده است (Dix et al., 1997). اگرچه بررسی‌های زیادی درباره توان جذب فلزهای سنگین و تأثیر آن بر رشد گونه‌های مختلف صنوبر انجام شده است، اطلاعات اندکی درباره آثار فیزیولوژیک و بیوشیمیایی فلزهای سنگین در گونه‌های مختلف صنوبر وجود دارد.

شناسایی و مقایسه پاسخ‌های فیزیولوژیک گونه‌های مختلف به آلودگی سربی، ممکن است به انتخاب گونه مناسب و ارتقای ارزیابی و پالایش زیستی منجر شود. از آنجاکه سرب یکی از مهم‌ترین آلاینده‌های زیست‌محیطی است و با ورود به زنجیره غذایی بر موجودات زنده اثر می‌گذارد، شناسایی و مقایسه پاسخ گونه‌های گیاهی به غلظت‌های مختلف این عنصر

وزن خشک خود انباشته کنند، گیاهان فراانباشتگر (Baker and Brooks, 1989) نامیده می‌شوند. جذب سرب در گیاهان به علت توان اتصال زیاد آن با آنیون‌های موجود در محلول خاک و تشکیل رسوب به شکل نمک‌های نامحلول سولفات، کربنات، هیدروکسید و فسفات، بسیار محدود است (McBride, 1994). تجمع سرب در گیاهان فراانباشتگر و به ویژه در اندام‌های هوایی، به تدریج و پس از اشباع این جایگاه‌ها نمایان می‌شود (Kalinowska and Pawlik, 2010). بنابراین برای افزایش حلالیت و توان جذب آن، استفاده از محیط کشت آبی در حضور مواد کلاته‌کننده نظیر EDTA پیشنهاد می‌شود (Komárek et al., 2007).

ورود سرب بسته به میزان حساسیت گیاه، در غلظت اندک می‌تواند به بروز تغییراتی در فرایندهای فیزیولوژیک گیاه و در غلظت‌های زیاد حتی به مرگ آن منجر شود (Seregin and Ivanov, 2001; Ernst, 1998). آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی، مولکول‌های متنوعی را نظیر سیستین، پرولین، تیول‌ها (Singh and Sinha, 2005)، قندهای محلول (Couée et al., 2006)، کاروتنوئیدها، ترکیبات فنلی و ترکیبات آلی نیتروژن‌دار (Michalak, 2006) شامل می‌شوند و یکی از سازوکارهای دفاعی اولیه در برابر تنش‌های محیطی به شمار می‌روند. با وجود این، درباره نقش آن‌ها در رویارویی با فلزهای سنگین در گونه‌های درختی، اطلاعات بسیار اندکی وجود دارد.

جنس صنوبر (*Populus* sp.)، متعلق به خانواده بیدیان (*Salicaceae* Mirb.)، با حدود ۳۵ گونه در دنیا، گستره طبیعی وسیعی در نواحی معتدله شمالی دارد

ایران)، به تدریج افزایش یافت؛ به طوری که در هفت مرحله در یک ماه به غلظت‌های هدف ۱۵، ۴۵ و ۹۰ میلی‌گرم در لیتر رسید. نهال‌ها به مدت ۶ هفته در غلظت هدف رشد کردند و پس از آن برداشت شدند. افزایش تدریجی غلظت سرب به علت بررسی محتاطانه تغییرات فیزیولوژیک نونهال‌های صنوبر و احتراز از اثرهای فیزیولوژیک ناشی از شوک احتمالی بود. همچنین برای جلوگیری از رسوب سرب در محلول غذایی، در ماه دوم قرارگیری، از محلول غذایی رقیق شده (یک هشتم) و در ماه سوم از EDTA (Sigma، آمریکا)، کلاته کننده فلزی، با محلول غذایی کامل استفاده شد (Pajević et al., 2009). ابتدا EDTA با غلظتی برابر با محلول سرب، کلاته شد و سپس به محلول غذایی افزوده شد. با توجه به استفاده نکردن از EDTA در گروه شاهد، این نهال‌ها پس از رقیق کردن محلول غذایی، آسیب شدید دیدند و رویش آن‌ها حتی در ماه سوم و در محلول غذایی کامل نیز متوقف شد و آثار سوختگی در برگ‌ها ناشی از کمبود مواد غذایی در مرحله قبل در آن‌ها توسعه یافت. بنابراین نتایج مربوط به تیمار شاهد تجزیه و تحلیل نشد.

**ویژگی‌های اندازه‌گیری شده:** وزن تر نهال‌ها بلافاصله پس از برداشت به تفکیک ریشه، ساقه و برگ با ترازوی دیجیتالی (مدل GF-400، شرکت AND، ژاپن) با دقت ۰/۰۰۱ گرم اندازه‌گیری و پس از نگهداری در آون ۷۵ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت، وزن خشک آن‌ها نیز تعیین شد. برای اندازه‌گیری سرب پس از خاکستر کردن نمونه‌ها (۰/۴ گرم) در دمای ۵۰۰ درجه سانتیگراد و هضم با کلریدریک اسید (Merck، آلمان) ۲ نرمال تا حجم ۴۰

ضرورت دارد. بنابراین در پژوهش حاضر، پاسخ‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی ناشی از افزایش غلظت سرب در دو گونه شالک و سپیدار (گونه‌های درختی مهم در تولید صنایع سلولزی) بررسی می‌شود.

## مواد و روش‌ها

در تحقیق حاضر، برای بررسی اثر سرب بر ویژگی‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی اندام‌های مختلف دو گونه شالک و سپیدار، آزمایشی به شکل فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی و در ۶ تکرار انجام شد که در آن اثرهای ساده غلظت سرب (۱۵، ۴۵ و ۹۰ میلی‌گرم در لیتر)، گونه (شالک و سپیدار) و اندام (برگ، ساقه و ریشه) با اثرهای متقابل دو گانه و سه گانه آن‌ها بر برخی ویژگی‌های فیزیولوژیک آزمایش شد.

**- تهیه نهال‌ها و شرایط آزمایش:** قلمه‌های دو کلون صنوبر *P. nigra* و *P. alba* از موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور تهیه و در پایان اسفندماه ۱۳۸۹ در گلدان‌های سه کیلوگرمی پلاستیکی سیاه و منفذدار کاشته شدند. سپس نهال‌های حاصل در پایان شهریورماه ۱۳۹۰ از خاک خارج و به محلول غذایی Long Ashton (Hewitt and Smith, 1975) با سیستم هوادهی مناسب با متوسط دمای ۲۲ درجه سانتیگراد و متوسط تشعشعات فعال فتوسنتزی ۱۷۵۰ میکرومول فوتون بر مترمربع بر ثانیه در ساعت ۱۰ صبح منتقل شدند. ده روز پس از قرار گرفتن در این محیط، نهال‌های هر دو گونه به طور یکنواخت به چهار گروه شش تایی شامل یک گروه شاهد و سه گروه تیمار تقسیم شدند. غلظت سرب در محلول غذایی گیاهان تیمار شده با افزودن نمک سرب کلرید (کیمیا مواد،

در برگ‌های فریز شده اندازه‌گیری شد (Scott and Melvin, 1953).

**تحلیل داده‌ها:** قبل از انجام آنالیز واریانس، داده‌های پرت بالقوه با باکس‌پلات و نرمال‌بودن پراکنش داده‌ها با آزمون کلموگروف - اسمیرنوف با ضریب تصحیح لیلیفورس بررسی شدند. با توجه به نرمال‌بودن توزیع داده‌ها هیچ تبدیل داده‌ای انجام نشد. در صورت معنی‌دار بودن اثرهای تیمارها، میانگین‌ها با آزمون مقایسه میانگین چندگانه دانکن گروه‌بندی شدند. کلیه آنالیزهای آماری در سطح اطمینان ۹۵٪ و با نرم افزار SPSS 19 (آمریکا) انجام شد.

### نتایج

بررسی میزان تجمع سرب در ریشه و برگ دو گونه شالک و سپیدار رشدیافته در دو محیط کشت حاوی ۱۵ و ۹۰ میلی‌گرم در لیتر سرب نشان داد که دو گونه از نظر میزان تجمع سرب در بافت‌های خود تفاوت معنی‌داری ندارند (جدول ۱) و در هر دو گونه با افزایش غلظت سرب در محیط کشت بر میزان تجمع سرب در نهال‌ها افزوده می‌شود؛ ولی در محیط کشت غنی از سرب (۹۰ میلی‌گرم در لیتر) تجمع سرب در ریشه بیشتر از برگ بود (شکل ۱- C).

عملکرد رویشی نهال‌ها در مدت بررسی، با غلظت‌های مختلف سرب تغییر نکرد و وزن تر نهال‌های دو گونه شالک و سپیدار نیز تفاوت معنی‌داری نشان نداد و تنها وزن زی توده تر و خشک در اندام‌های مختلف متفاوت بود (جدول ۱)؛ به طوری که ریشه، بیشترین وزن تر (شکل ۲- A) و ساقه، بیشترین وزن خشک (شکل ۲- B) را داشت. همچنین وزن خشک

میلی‌لیتر، میزان سرب در نمونه‌ها با دستگاه جذب اتمی (مدل SpectrAA 220، شرکت Varian، استرالیا) در طول موج ۲۸۳/۳ نانومتر اندازه‌گیری (Okamoto *et al.*, 1971) و مقدار نسبی آب با نمونه‌گیری از این اندام‌ها (۰/۲ گرم) در زمان برداشت تعیین شد (Levitt, 1980). نمونه برگ از برگ‌های جدید کاملاً توسعه یافته، ساقه از قسمت پایینی ساقه و ریشه از ریشه‌های نازک غیرچوبی انتخاب شد. برای بررسی آسیب‌های ناشی از نشت الکترولیت‌های ریشه، ساقه و برگ که شاخصی برای بررسی تغییر نفوذپذیری غشای سیتوپلاسمی است، طبق روش Stuart (1939)، با هدایت سنج الکتریکی (مدل Cond 720، شرکت InoLab، آلمان) اندازه‌گیری شد. غلظت مالون دی‌آلدئید، محصول ثانویه ناشی از اکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع، در برگ و ریشه گیاهان فریز شده در دمای ۴۰- درجه سانتیگراد، براساس روش رنگ‌سنجی محلول واکنش TBA (Thiobarbituric acid) با طیف‌سنج نوری (مدل Lambda EZ 201 UV، شرکت Perkin Elmer، آمریکا) اندازه‌گیری شد (Heath and Packer, 1968). اندازه‌گیری رنگدانه‌های برگ (کلروفیل a, b و کاروتنوئیدها) در برگ‌های فریز شده با روش رنگ‌سنجی عصاره استون انجام شد (Lichtenthaler, 1987). غلظت پرولین از روش رنگ‌سنجی محصول واکنش نین‌هیدرین در تولوئن (هر دو از شرکت AppliChem، آلمان) در برگ و ریشه گیاهان فریز شده اندازه‌گیری شد (Bates *et al.*, 1973). غلظت قندهای محلول کل براساس روش رنگ‌سنجی آنترون - سولفوریک اسید (شرکت Merck، آلمان)

بیشترین مقدار نسبی آب را در مقایسه با اندام‌های مختلف دارد (شکل ۲- E).

نتیجه آنالیز واریانس میزان نشت الکترولیت، در گونه‌ها، اندام‌ها و غلظت‌های مختلف سرب نشان داد که اثر متقابل بین تیمار و نوع گونه و همچنین اندام و نوع گونه مشاهده می‌شود (جدول ۱)؛ به طوری که میزان نشت الکترولیت‌ها در گونه سپیدار با افزایش تیمار سرب تغییر نکرد؛ ولی در شالک در تیمار ۹۰ به شدت افزایش یافت (شکل ۲- F).

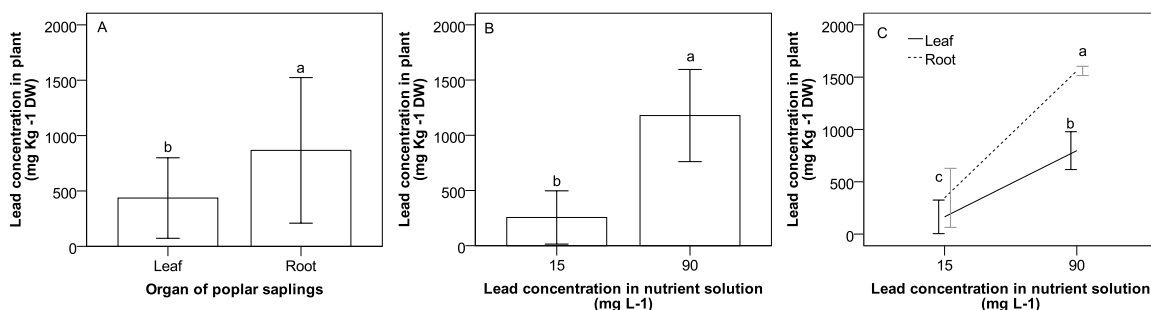
نهای‌های سپیدار از نهای‌های شالک بیشتر بود (شکل ۲- C).

نتایج آنالیز واریانس مقدار نسبی آب اندام‌های مختلف دو گونه در سطوح مختلف سرب نشان داد که گونه و اندام، تاثیر معنی‌داری بر مقدار نسبی آب دارند؛ ولی غلظت‌های مختلف سرب، مقدار نسبی آب را در اندام‌های مختلف تغییر نداد (جدول ۱). نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که گونه شالک مقدار آب بیشتری از گونه سپیدار دارد (شکل ۲- D). همچنین ریشه

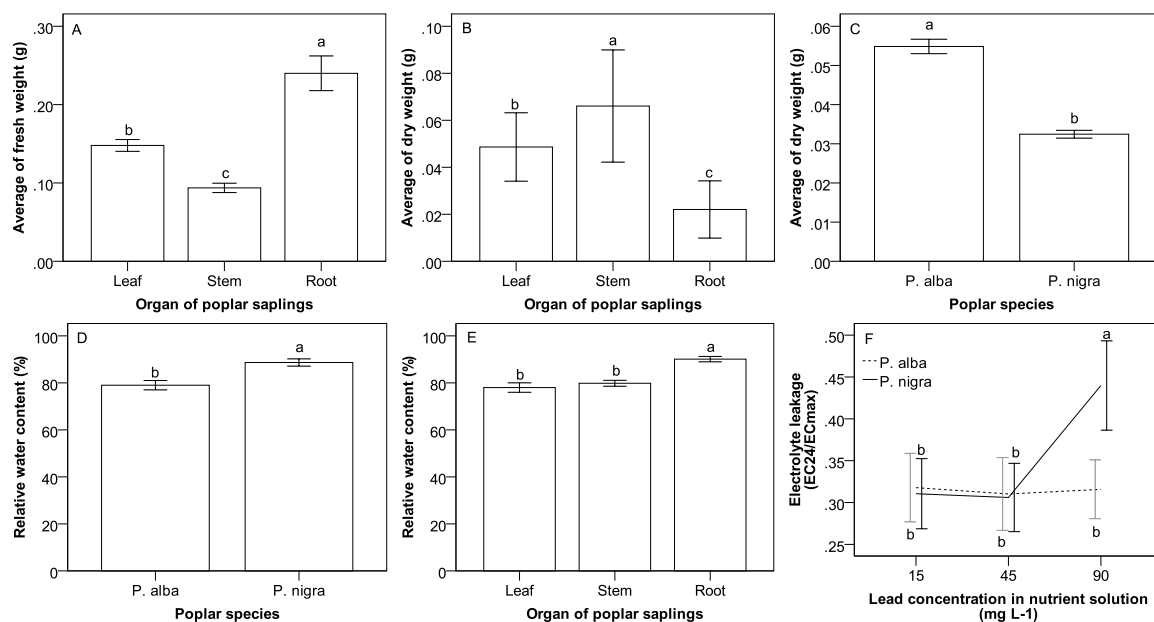
جدول ۱- مقادیر F حاصل از آنالیز واریانس اثرهای ساده و متقابل گونه (شالک و سپیدار)، اندام (ریشه، ساقه و برگ) و تیمار سرب (۱۵، ۴۵ و ۹۰ میلی‌گرم در لیتر) با ضریب تغییرات خطا (%).

منبع تغییرات	تجمع سرب	وزن تر	وزن خشک	مقدار نسبی آب محلول	مقدار قندهای غلظت	میزان نشت الکترولیت‌ها	میزان نشت مالون دی آلدهید	غلظت کلروفیل a	غلظت کلروفیل b	غلظت کلروفیل a/b	کارتنوئیدها	
گونه	۰/۴۸ <sup>n.s</sup>	۰/۱۳ <sup>n.s</sup>	۶/۰۵*	۱۲/۵۰**	۵/۶۱*	۰/۱۷ <sup>n.s</sup>	۴/۲۸*	۰/۴۵ <sup>n.s</sup>	۳/۸۸ <sup>n.s</sup>	۰/۰۵۸ <sup>n.s</sup>	۸/۶۳**	۰/۱۸۳ <sup>n.s</sup>
اندام	۳۸/۳***	۲۵/۰***	۶/۷۴**	۱۰/۰***	۰/۴۴ <sup>n.s</sup>	۹/۰۰**	۱۶۸***	۱۱/۶***	-	-	-	-
تیمار	۱۴۶***	۰/۰۳ <sup>n.s</sup>	۰/۸۱ <sup>n.s</sup>	۰/۷۶ <sup>n.s</sup>	۶/۱۵**	۱۳/۶***	۴/۲۱*	۲/۰۴ <sup>n.s</sup>	۱/۸۹ <sup>n.s</sup>	۱/۶۸ <sup>n.s</sup>	۶/۵۵**	۱/۱۸ <sup>n.s</sup>
اندام × گونه	۰/۸۵ <sup>n.s</sup>	۱/۵۰ <sup>n.s</sup>	۱/۲۵ <sup>n.s</sup>	۰/۸۳ <sup>n.s</sup>	۲/۴۶ <sup>n.s</sup>	۴/۶۹*	۷/۳۲**	۲/۱۷ <sup>n.s</sup>	-	-	-	-
تیمار × گونه	۱/۷۲ <sup>n.s</sup>	۰/۰۳ <sup>n.s</sup>	۱/۲۱ <sup>n.s</sup>	۲/۹۸ <sup>n.s</sup>	۱/۱۶ <sup>n.s</sup>	۳/۳۳*	۵/۶۴**	۱/۹۱ <sup>n.s</sup>	۲/۹۱ <sup>n.s</sup>	۰/۱۸۱ <sup>n.s</sup>	۵/۳۶*	۰/۸ <sup>n.s</sup>
تیمار × اندام	۱۴/۵***	۱/۵۷ <sup>n.s</sup>	۱/۴۱ <sup>n.s</sup>	۰/۹۴ <sup>n.s</sup>	۱/۵۸ <sup>n.s</sup>	۰/۳۸ <sup>n.s</sup>	۰/۴۲ <sup>n.s</sup>	۱/۵ <sup>n.s</sup>	-	-	-	-
تیمار × اندام × گونه	۰/۰۴ <sup>n.s</sup>	۰/۲۷ <sup>n.s</sup>	۱/۰۸ <sup>n.s</sup>	۱/۰۷ <sup>n.s</sup>	۲/۳۴ <sup>n.s</sup>	۰/۰۵ <sup>n.s</sup>	۲/۳۴ <sup>n.s</sup>	۰/۵۰ <sup>n.s</sup>	-	-	-	-
ضریب تغییرات	۳۰/۷	۵۱/۳	۳۷/۲	۳۸/۹	۲۶/۷	۴۰/۲	۵۳/۶	۸۲/۵	۴۰/۱	۴۲/۳	۲۰/۷	۲۳/۴

\*, \*\*, و \*\*\*: به ترتیب نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطوح احتمال ۵، ۱ و ۰/۰۱ و NS: نشان‌دهنده نبود اختلاف معنی‌دار است.



شکل ۱- مقدار سرب در ریشه و برگ دو گونه شالک و سپیدار در محیط کشت حاوی ۱۵ و ۹۰ میلی‌گرم در لیتر سرب. مقادیر میانگین ± انحراف معیار است. حروف مشترک نشان‌دهنده نبود اختلاف معنی‌دار در سطح اطمینان ۰/۰۵ است.



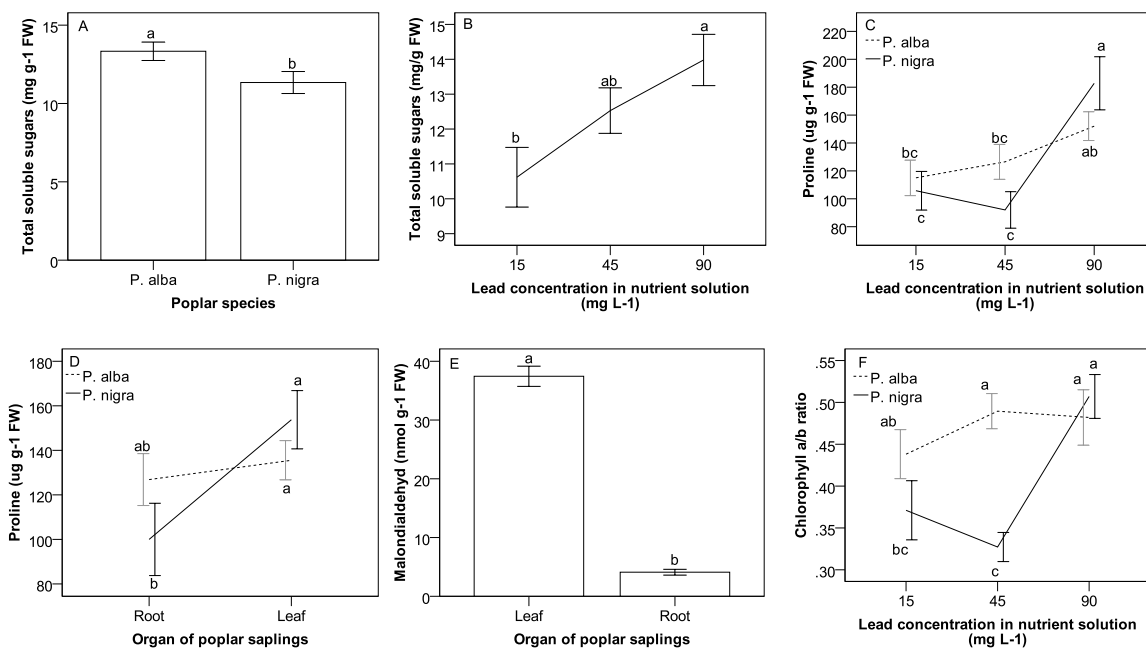
شکل ۲- پاسخ‌های فیزیولوژیک دو گونه شالک و سپیدار در برابر افزایش غلظت سرب در محیط کشت آبی (۱۵، ۴۵ و ۹۰ میلی‌گرم در لیتر). مقادیر میانگین ± تکرار ۶ انحراف معیار است. حروف مشترک نشان‌دهنده نبود اختلاف معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵٪ است.

نتایج آنالیز واریانس تاثیر غلظت‌های مختلف سرب بر میزان مالون دی آلدئید (MDA) ریشه و برگ دو گونه نشان داد که میزان MDA در اندام‌های مختلف متفاوت بود و با تیمارهای مختلف آلودگی سربی تغییر نکرد (جدول ۱)؛ به طوری که میزان آن در برگ بیشتر از ریشه بود (شکل ۳-E).

میزان کلروفیل a، کلروفیل b و کاروتنوئیدها با افزایش غلظت سرب در محیط کشت ثابت ماند و اثر متقابلی بین سطوح مختلف سرب و نوع گونه بر نسبت کلروفیل a/b مشاهده شد (جدول ۱)؛ به طوری که نسبت کلروفیل a/b در گونه *P. nigra* در ۹۰ ppm افزایش یافت؛ ولی تغییر معنی‌داری در گونه *P. alba* مشاهده نشد (شکل ۳-F).

نوع گونه و سطوح سرب، تاثیر معنی‌داری بر غلظت قندهای محلول کل داشت (جدول ۱). میزان قندهای محلول در گونه سپیدار بیشتر از شالک بود (شکل ۳-A). همچنین افزایش غلظت سرب، میزان قندهای محلول را در تیمار شدید در ریشه و برگ هر دو گونه افزایش داد (شکل ۳-B).

افزایش سرب در دو گونه اثر متفاوتی بر تجمع پرولین داشت (جدول ۱)؛ به طوری که در سپیدار میزان پرولین در غلظت‌های مختلف سرب تغییر معنی‌داری نشان نداد؛ اما در شالک میزان پرولین در تیمار شدید سرب افزایش یافت (شکل ۳-C). میزان پرولین در اندام‌های مختلف گونه شالک متفاوت بود؛ به طوری که ریشه کمترین و برگ بیشترین میزان پرولین را داشت؛ اما میزان پرولین در اندام‌های مختلف سپیدار ثابت بود (شکل ۳-D).



شکل ۳- پاسخ‌های بیوشیمیایی دو گونه شالک و سپیدار در برابر افزایش غلظت سرب در محیط کشت آبی (۱۵، ۴۵ و ۹۰ میلی‌گرم در لیتر). مقادیر میانگین ۳ تکرار  $\pm$  انحراف معیار است. حروف مشترک نشان‌دهنده نبود اختلاف معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵٪ است.

این میزان از تجمع سرب اثر معنی‌داری بر وزن تر و خشک و همچنین محتوای آب اندام‌های مختلف دو گونه در مدت آزمایش نداشت. این نتایج هم‌راستا با یافته‌های Stobrawa و Lorenc (۲۰۰۸) و مؤید توان درخور توجه هر دو گونه برای استفاده در بررسی و پالایش زیستی است. تغییر نکردن محتوای آب در تنش‌های مربوط به فلزهای سنگین در برخی از گونه‌های درختی نظیر بلوط نیز گزارش شده است (Disante *et al.*, 2011). ورود فلزهای سنگین به گیاه ممکن است با تأثیر بر هدایت روزنه‌ای، نفوذپذیری غشای سیتوپلاسمی و فعالیت آنزیم‌ها (Poschenrieder and Barceló, 1999)، بر روابط آبی گیاه اثر بگذارد. با توجه به نتایج یادشده استنباط می‌شود که با افزایش غلظت سرب در دامنه بررسی شده، محدودیت آبی برای هیچ‌یک از دو گونه شالک و سپیدار ایجاد نشده است.

## بحث

پژوهش حاضر، تغییرات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی نهال‌های یک‌ساله دو گونه صنوبر شالک و سپیدار را که گونه‌های مناسب برای بررسی و پالایش زیستی در آلودگی سربی هستند مقایسه می‌کند (Baslar *et al.*, 2005; Madejona *et al.*, 2004). افزایش سرب در گیاهان معمولاً به کاهش محتوای آب (Akinci *et al.*, 2010) و نیز کاهش رشد (Saderi *et al.*, 2011) منجر می‌شود. یافتن گیاهانی که با وجود جذب فلزهای سنگین قادرند عملکرد رویشی خود حفظ کنند، یکی از ملزومات بررسی و پالایش زیستی به شمار می‌روند. نهال‌های شالک و سپیدار پس از ۶ هفته قرار گرفتن در محیط کشت حاوی سرب (۹۰ میلی‌گرم در لیتر)، به ترتیب ۱۵۶۰ و ۸۴۷ میلی‌گرم سرب در کیلوگرم وزن خشک ریشه و برگ خود انباشته کردند. با این حال،



تنش فلزهای سنگین در برخی پژوهش‌ها با افزایش میزان کربوهیدرات‌ها (Heydari *et al.*, 2005) و قندهای محلول (Moya *et al.*, 1993) و در برخی دیگر با کاهش آن (Ranjbar *et al.*, 2011) همراه بود. غلظت قندهای محلول کل در ریشه و برگ هر دو گونه شالک و سپیدار، با افزایش غلظت سرب تا ۹۰ میلی گرم در لیتر، افزایش یافت. افزایش قندهای محلول، در بیشتر وضعیت‌های تنش‌زا، سازوکار تحمل در برابر تنش است و تنظیم پتانسیل آب سلول برای مقابله با غلظت زیاد یون‌های جذب‌شده و تجمع یافته در واکوئل را باعث می‌شود (Kameli and Losel, 1993). همچنین افزایش گلوکز در ترکیب با سالیسیلیک اسید در افزایش مقاومت به فلزهای سنگین با تأثیر بر میزان گلو تاسیون نقش دارد (Freeman *et al.*, 2005). از این رو به نظر می‌رسد که افزایش میزان قندهای محلول، یکی از نخستین سازوکارهای مقاومت در برابر آلودگی سربی در هر دو گونه شالک و سپیدار باشد.

سطح اولیه پرولین در نهال‌های یک‌ساله دو گونه شالک و سپیدار، یکسان بود و اثر متقابلی بین گونه و اندام و نیز گونه و سرب مشاهده شد؛ به طوری که با افزایش سرب، میزان پرولین در گونه شالک افزایش یافت؛ اما غلظت پرولین در گونه سپیدار تغییر نکرد. همچنین الگوی توزیع پرولین در شالک، ناهمگن (در برگ بیشتر از ریشه) ولی در سپیدار یکنواخت بود. در مطالعه‌ای Schat (۱۹۹۷) تجمع پرولین آزاد را در اندام‌های مختلف دو اکوتیپ حساس و مقاوم گیاه سیلن بادکنکی (*Silene vulgaris* (Moench) Garcke) از خانواده میخکیان (Caryophyllaceae Juss.) در تیمار تعدادی از فلزهای سنگین (کادمیوم،

روی و مس) بررسی کردند. نتایج بررسی آن‌ها نشان داد که فلزهای سنگین به طور گسترده‌ای تجمع پرولین آزاد را در اندام‌های مختلف اکوتیپ حساس به ویژه در برگ‌های آن موجب شدند. در اکوتیپ مقاوم به فلزهای سنگین میزان پرولین آزاد ۵ تا ۶ برابر بیشتر از اکوتیپ حساس بود و غلظت فلزهای سنگین تأثیری بر تجمع پرولین در اکوتیپ مقاوم نداشت. با توجه به تجمع برابر سرب در دو گونه بررسی شده، به نظر می‌رسد که سرب موجود در گونه شالک به علت محتوای آب بیشتر و نفوذپذیری بیشتر غشای سیتوپلاسمی آن، تحرک، قدرت انحلال و در نتیجه سمیت بیشتری دارد (Hui *et al.*, 2009) که تجمع پرولین را در اندام‌های این گونه موجب شده است. ضمن اینکه توزیع ناهمگن پرولین در اندام‌های گونه شالک (کاهش پرولین در ریشه) شاید در تشدید تنش ناشی از آلودگی سربی و فرستادن سیگنال‌هایی برای افزایش غلظت اسمولیت‌ها دخالت دارد. نتایج این تحقیق مطابقت زیادی با سایر مطالعات انجام شده درباره پاسخ گونه‌های حساس (Zhou *et al.*, 2009) و مقاوم (Schat *et al.*, 1997) به آلودگی سربی دارد. افزایش غلظت سرب در دو گونه شالک و سپیدار،

میزان کلروفیل a، کلروفیل b و کاروتنوئیدها را به طور معنی‌داری تغییر نداد؛ اما نسبت کلروفیل a به b را در گونه شالک افزایش داد که بیشتر ناشی از کاهش کلروفیل b بود. حساسیت رنگدانه‌های مختلف گیاهی در برابر تنش‌های محیطی متفاوت است و معمولاً ابتدا میزان کلروفیل b و سپس کاروتنوئیدها و در نهایت کلروفیل a در اندام برگ کاهش می‌یابد (Bibi and Hussain, 2005)؛ اما این الگوی ثابتی نبوده و بسته به

صنوبر بررسی شده، مقاومت در برابر سازوکارهایی را نشان می‌دهد که به تجزیه کاروتنوئیدها در حضور فلزهای سنگین منجر می‌شود.

یکی از نخستین نشانه‌های تنش اکسیداتیو، افزایش اکسیداسیون اسیدهای چرب غیر اشباع و به دنبال آن افزایش غلظت مالون دی آلدهید (MDA) است (Chaoui et al., 1997). مالون دی آلدهید، پراکسیدی با توان درخور توجه در واکنش با ترکیبات سلولی مختلف است که در نتیجه آن، آنزیم‌ها و غشاها آسیب می‌بینند و برهم خوردن تعادل فیزیولوژیک را موجب می‌شود (Scandalios, 1993). در تحقیقات بسیاری مشاهده شده است که میزان MDA در تنش فلزهای سنگین و افزایش غلظت سرب افزایش می‌یابد (Rossato et al., 2012; Gupta et al., 2009; Liu et al., 2007)؛ اما در بررسی حاضر، میزان MDA با افزایش سرب تا ۹۰ میلی گرم در لیتر و در مدت آزمایش در هیچ یک از گونه‌ها تغییری نکرد که ممکن است به علت وجود سازوکارهای دفاعی موثر در مقابل تنش‌های اکسیداتیو، ایجاد شده باشد.

معمولاً نشت الکترولیت‌ها از غشای سلول، یکی از نشانه‌های آسیب غشایی به شمار می‌رود (Kwon et al., 2002). میزان نشت الکترولیت‌ها با شاخص‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی زیادی نظیر مقاومت روزنه‌ای، پتانسیل اسمزی، شاخص پیچش برگ (Premachandra et al., 1989)، کارایی مصرف آب (Saelim and Zwiazek, 2000; Franca et al., 2000)، سنتر آنزیم‌های آنتی‌اکسیداتیو (Liu and Huang, 2000)، آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی (Banu et al., 2009)، انعکاس طیفی نور (Garty et al.,

ویژگی‌های اونتوژنتیکی گونه و شرایط آزمایش متفاوت است. در تحقیق Ewais (۱۹۹۷) درباره اثر افزایش سرب (۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم در لیتر) در سه گونه *Chenopodium*، *Cyperus difformis* L. و *Digitaria sanguinalis* L. مشخص شد که غلظت اندک سرب بر میزان کلروفیل a و b در هیچ یک از گونه‌ها تاثیر نداشت و غلظت شدید سرب (۲۰۰ میلی گرم در لیتر) میزان هر دو نوع کلروفیل را کاهش داد؛ اما تنها در جنس سلمه (*Chenopodium* L.) کلروفیل b حساس‌تر از کلروفیل a بود. افزایش سرب معمولاً غلظت رنگدانه‌ها را کاهش می‌دهد که این کاهش از مهار آنزیم‌هایی مثل ALA دهیدراز و پروتوکلروفیلید ردوکتاز، جایگزینی سرب با یون‌های منیزیم در حلقه تتراپیرول کلروفیل، کمبود منیزیم و آهن برای سنتز کلروفیل و افزایش فعالیت کلروفیلاز ناشی می‌شود (van Assche and Clijsters, 1990). همچنین در تحقیقات Zhou و همکاران (۲۰۰۹)، مشاهده شد که میزان کلروفیل a، کلروفیل b و کاروتنوئیدها در گونه *Iris pseudacorus* L. غلظت ۵۰۰ میلی گرم در لیتر سرب خاک کاهش پیدا کرد. Fargasova (۲۰۰۱) تاثیر افزایش سرب را بر نهال‌های *Sinapis alba* L. بررسی و مشاهده کرد که کلروفیل a، b و کاروتنوئیدها کاهش پیدا کردند؛ ولی این کاهش در کلروفیل b بیشتر از کلروفیل a بود که با نتایج بررسی حاضر مطابقت دارد.

باتوجه به نقشی که کاروتنوئیدها در حافظت از کلروفیل و اجزای سلول از آسیب‌های ناشی از تنش‌های اکسیداتیو در تنش فلزهای سنگین دارند (Hou et al., 2007)، تغییر نکردن آن‌ها در دو گونه

محیط کشت تخریب غشای سیتوپلاسمی را در همه اندام‌ها موجب شده است.

### نتیجه‌گیری

به‌طور کلی هر دو گونه قادرند مقدار زیادی سرب را تحمل کنند و تغییر در میزان قندهای محلول، یکی از پاسخ‌های ابتدایی به آلودگی سربی بود که در هر دو گونه به یک شدت افزایش یافت. گونه سپیدار مقاوم‌تر از شالک در برابر آلودگی سربی بود. به نظر می‌رسد تفاوت در روابط آبی نقش مهمی در ایجاد تفاوت در مقاومت داشت و به بروز علائم مسمومیت و تشدید سازوکارهای دفاعی در شالک منجر شد؛ به‌طوری‌که ورود سرب در گونه شالک، بدون تغییر در سطح اکسیداسیون لیپیدهای غشایی، نفوذپذیری غشای سیتوپلاسمی و مقدار پرولین را افزایش داد.

### سپاسگزاری

پژوهش حاضر، بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد است که با حمایت مالی دانشگاه یاسوج انجام شده است.

(2001) و لیپیدهای غشایی (Lauriano *et al.*, 2000) در ارتباط است. تنش فلزهای سنگین، اغلب، میزان نشت الکترولیت‌ها را در اندام‌های گیاهان افزایش داده است (Viveros *et al.*, 2010; Gonçalves *et al.*, 2005; Xiong and Wang, 2007). با افزایش غلظت سرب تا ۹۰ میلی‌گرم در لیتر، میزان نشت الکترولیت‌ها در اندام‌های مختلف گونه شالک افزایش یافت؛ اما تغییری در میزان نشت الکترولیت‌های گونه سپیدار مشاهده نشد. به نظر می‌رسد که با توجه به تغییر نکردن میزان مالون دی‌آلدهید، تغییر میزان نشت الکترولیت‌ها در گونه شالک در تیمار شدید، به علت پراکسیداسیون لیپیدهای غشا نیست؛ بلکه سایر عوامل موثر در نفوذپذیری غشای سلول نظیر ترکیب و میزان لیپیدهای غشا در افزایش نفوذپذیری غشای سیتوپلاسمی آن‌ها موثر هستند. با توجه به نتایج به‌دست آمده، به نظر می‌رسد در مجموع، راهکارهای گونه سپیدار در برابر افزایش سرب در محیط کشت به حفاظت اندام‌های این گونه در برابر آسیب غشایی منجر شده است؛ در حالی که در گونه شالک حضور سرب در

### منابع

- Akinci, I. E., Akinci, S. and Yilmaz, K. (2010) Response of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) to lead toxicity: Growth, element uptake, chlorophyll and water content. *African Journal of Agricultural Research* 5(6): 416-423.
- Baker, A. J. M. and Brooks, R. (1989) Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements. A review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery* 1(2): 81-126.
- Banu, M. N. A., Hoque, M. A., Watanabe-Sugimoto, M., Matsuoka, K., Nakamura, Y., Shimoishi, Y. and Murata, Y. (2009) Proline and glycinebetaine induce antioxidant defense gene expression and suppress cell death in cultured tobacco cells under salt stress. *Journal of Plant Physiology* 166(2): 146-156.
- Baslar, S., Dogan, Y., Yenil, N., Karagoz, S. and Bag, H. (2005) Trace element biomonitoring by leaves of *Populus nigra* L. from Western Anatolia, Turkey. *Journal of Environmental Biology* 26(4): 665-668.

- Bates, L. S., Waldren, R. P. and Teare, I. D. (1973) Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil* 39: 205-207.
- Bibi, M. and Hussain, M. (2005) Effect of copper and lead on photosynthesis and plant pigments in black gram [*Vigna mungo* (L.) Hepper]. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 74: 1126-1133.
- Chanda, S., Pramanik, A. and Maiti, G. G. (2011) Taxonomic account of the Indian *Populus* L. (Salicaceae Mirb.) with special emphasis on their distribution and identification. *Indian Forester* 137(7): 872-876.
- Chaoui A., Mazhoudi, S., Ghorbal, M. H. and Ferjani, E. (1997) Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Science* 127: 139-147.
- Couée, I., Sulmon, C., Gouesbet, G. and El-Amrani, A. (2006) Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany* 57(3): 449-459.
- Dix, M. E., Klopfenstein, N. B., Zhang, J. W., Workman, S. W. and Kim, M. S. (1997) Potential use of *Populus* for phytoremediation of environmental pollution in riparian zones. US Department of Agriculture Forest Service General Technical Report 297: 206-211.
- Djingova, R., Wagner, G. and Peshev, D. (1995) Heavy metal distribution in Bulgaria using *Populus nigra* 'Italica' as a biomonitor. *Science of the Total Environment* 172(2): 151-158.
- Disante, K., Fuentes, D. and Cortina, J. (2011) Response to drought of Zn-stressed *Quercus suber* L. seedlings. *Environmental and Experimental Botany* 70(2): 96-103.
- Ernst, W. (1998) Effect of heavy metals in plants at the cellular and organismic level. In: *Ecotoxicology: Ecological fundamentals, chemical exposure and biological effects*. (Eds. Schuurman, G. and Maekert, B.). 587-620. John Wiley and Sons Inc. and Spectrum Akademischer Verlag. New York.
- Ewais, E. A. (1997) Effects of cadmium, nickel and lead on growth, chlorophyll content and proteins of weeds. *Biologia Plantarum* 39(3): 403-410.
- Fargasova, A. (2001) Phytotoxic effects of Ca, Zn, Pb, Cu and Fe on *Sinapis alba* L. seedling and their accumulation in roots and shoots. *Biologia Plantarum* 44(3): 471-473.
- Franca, M. G. C., Thi, A. T. P., Pimentel, C., Rossiello, R. O. P., Zuily-Fodil, Y. and Laffray, D. (2000) Differences in growth and water relations among *Phaseolus vulgaris* cultivars in response to induced drought stress. *Environmental and Experimental Botany* 43(3): 227-237.
- Freeman, J. L., Garcia, D., Kim, D., Hopf, A. and Salt, D. E. (2005) Constitutively elevated salicylic acid signals glutathione-mediated nickel tolerance in *Thlaspi* nickel hyperaccumulators. *Plant Physiology* 137(3):1082-1091.
- Garty, J., Weissman, L., Tamir, O., Beer, S., Cohen, Y., Karnieli, A. and Orlovsky, L. (2001) Comparison of five physiological parameters to assess the vitality of the lichen *Ramalina lacera* exposed to air pollution. *Physiologia Plantarum* 109(4): 410-418.
- Gonçalves, J., Becker, A., Cargnelutti, D., Tabaldi, L., Pereira, L., Battisti, V., Spanevello, R., Morsch, V., Nicoloso, F. and Schetinger, M. (2007) Cadmium toxicity causes oxidative stress and induces response of the antioxidant system in cucumber seedlings. *Journal of Plant Physiology* 19(3): 223-232.

- Gupta, D. K., Nicoloso, F. T., Schetinger, M. R. C., Rossato, L. V., Pereira, L. B., Castro, G. Y., Srivastava, S. and Tripathi, R. D. (2009) Antioxidant defense mechanism in hydroponically grown *Zea mays* seedlings under moderate lead stress. *Journal of Hazardous Materials* 172(1): 479-484.
- Heath, R. L. and Packer, L. (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 125(1): 189-198.
- Hewitt, E. J. and Smith, T. A. (1975) *Plant mineral nutrition*. English University Press, London.
- Heydari, R., Khiami, M. and Farboudnia, T. (2005) Physiological and biochemical effects of Pb on *Zea mays* L. Seedlings. *Iranian Journal of Biology* 18(3): 228-236 (in Persian).
- 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 Physiology and Biochemistry* 45(1): 62-69.
- Hui, N., Selonen, S., Hanzel, J., Tuomela, M., Rainio, A., Kontio, H., Hakala, K., Lankinen, P., Steffen, K., Fingerroos, T., Strömmer, R., Setälä, H., Hatakka, A. and Romantschuk, M. (2009) Influence of lead on organisms within the detritus food web of a contaminated pine forest soil. *Boreal Environment Research* 14(A): 70-85.
- Kalinowska, R., and Pawlik-Skowrońska, B. (2010) Response of two terrestrial green microalgae (Chlorophyta, Trebouxiophyceae) isolated from Cu-rich and unpolluted soils to copper stress. *Environmental Pollution* 158(8): 2778-2785.
- Kameli, A. and Losel, D. M. (1993) Carbohydrates and water stress in wheat plants under water stress. *New Phytologist* 125(3): 609-614.
- Kim, Y. Y., Yang, Y. Y. and Lee, Y. (2002) Pb and Cd uptake in rice roots. *Physiologia Plantarum* 116(3): 368-372.
- Komárek, M., Tlustoš, P., Száková, J., Chrástný, V. and Ettler, V. (2007) The use of maize and poplar in chelant-enhanced phytoextraction of lead from contaminated agricultural soils. *Chemosphere* 67: 640-651.
- Kwon, S. Y., Jeong, Y. J., Lee, H. S., Kim, J. S., Cho, K. Y., Allen, R. D. and Kwak, S. S. (2002) Enhanced tolerances of transgenic tobacco plants expressing both superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in chloroplasts against methyl viologen-mediated oxidative stress. *Plant Cell and Environment* 25(7): 873-882.
- Lauriano, J. A., Lidon, F. C., Carvalho, C. A., Campos, P. S. and Matos, M. D. (2000) Drought effects on membrane lipids and photosynthetic activity in different peanut cultivars. *Photosynthetica* 38(1): 7-12.
- Levitt, J. (1980) *Responses of plants to environmental stresses. Volume II: Water, radiation, salt, and other stresses*. 2<sup>th</sup> edition, Academic Press, New York.
- Lichtenthaler, H. K. (1987) Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology* 148: 350-382.
- Liu, D., Li, T. Q., Yang, X. E., Islam, E., Jin, X. F. and Mahmood, Q. (2007) Effect of Pb on leaf antioxidant enzyme activities and ultrastructure of the two ecotypes of *Sedum alfredii* Hance. *Russian Journal of Plant Physiology* 55(1): 68-76.
- Liu, X. Z. and Huang, B. R. (2000) Heat stress injury in relation to membrane lipid peroxidation in creeping bentgrass. *Crop Science* 40(2): 503-510.

- Madejona, P., Maranona, T., Murilloa, J. and Robinson, B. (2004) White poplar (*Populus alba*) as a biomonitor of trace elements in contaminated riparian forests. *Environmental Pollution* 132(1): 145-155.
- McBride, M. B. (1994) *Environmental chemistry of soils*. Oxford University Press 406 pp.
- Michalak, A. (2006) Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Polish Journal of Environmental Studies* 15(4): 523-530.
- Moya, J. L., Ros, R. and Picazo, I. (1993) Influence of cadmium and nickel on growth, net photosynthesis and carbohydrate distribution in rice plants. *Photosynthesis Research* 36(2): 75-80.
- Okamoto, M., Kanda, M., Matsumoto, I. and Miya, Y. (1971) Fast analysis of trace amounts of lead in cosmetics by atomic absorption spectrophotometry. *Journal of the Society of Cosmetic Chemists* 22: 589-598.
- Pajević, S., Borišev, M., Nikolić, N., Krstić, B., Pilipović, A. and Orlović, S. (2009) Phytoremediation capacity of poplar (*Populus* spp.) and willow (*Salix* spp.) clones in relation to photosynthesis. *Archives of Biological Sciences* 61(2): 239-247.
- Poschenrieder, C. H. and Barceló, J. (1999) Water relations in heavy metal stressed plants. In *Heavy metal stress in plants* (Eds. Cuypers, A., Smeets, K. and Vangronsveld, J.). 207-229 Springer Berlin Heidelberg.
- Premachandra, G. S., Saneoka, H. and Ogata, S. (1989) Nutrio-physiological evaluation of polyethylene glycol test of cell membrane stability in maize. *Crop Science* 29(5): 1287-1292.
- Ranjbar, M., Lari, Y. H., Borumand, J. S. (2011) The effect of Salicylic acid on photosynthetic pigments, contents of sugar and antioxidant enzymes under lead stress in *Brassica napus* L.. *Iranian Journal of Plant Biology* 3(9): 39-52 (in Persian).
- Rossato, L. V., Nicoloso, F. T., Farias, J. G., Cargnelluti, D., Tabaldi, L. A., Antes, F. G., Dressler, V., Morsch, V. and Schetinger, M. R. C. (2012) Effects of lead on the growth, lead accumulation and physiological responses of *Pluchea sagittalis*. *Ecotoxicology* 21(1): 111-123.
- Sabeti, H. (1976) *Forests, trees and shrubs of Iran*. Tehran, Ministry of Agriculture and Natural Resources Ministry of Information and Tourism Press, Tehran. (in Persian).
- Saderi, S. Z., Zarinkamar, F. and Zeinali, H. (2011) The study of lead uptake and accumulation by *Matricaria chamomilla* in various growth stages. *Iranian Journal of Plant Biology* 3(9):53-62 (in Persian).
- Saelim, S. and Zwiazek, J. J. (2000) Preservation of thermal stability of cell membranes and gas exchange in high temperature-acclimated *Xylia xylocarpa* seedlings. *Journal of Plant Physiology* 156(3): 380-385.
- Salt, D. E., Smith, R. and Raskin, I. (1998) Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology. *Phytoremediation* 49(1): 643-668.
- Scandalios, J. G. (1993) Oxygen stress and superoxide dismutase. *Plant Physiology* 101(1): 7-12.
- Schat, H., Sharma, S. S. and Vooijs, R. (1997) Heavy metal-induced accumulation of free proline in a metal-tolerant and a nontolerant ecotype of *Silene vulgaris*. *Physiologia Plantarum* 101(3): 477-482.
- Scott, T. A. and Melvin, E. H. (1953) Determination of dextran with anthrone. *Analytical Chemistry* 25(11): 1656-1661.

- Seregin, I. V. and Ivanov, V. B. (2001) Physiological aspects of cadmium and lead toxic effects on higher plant. *Russian Journal of Plant Physiology* 48(4): 523-544.
- Singh, S. and Sinha, S. (2005) Accumulation of metals and its effects in *Brassica juncea* (L.) Czern. (cv. Rohini) grown on various amendments of tannery waste. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 62(1): 118-127.
- Stobrawa, K. and Lorenc-Plucińska, G. (2008) Thresholds of heavy-metal toxicity in cuttings of European black poplar (*Populus nigra* L.) determined according to antioxidant status of fine roots and morphometrical disorders. *Science of the Total Environment* 390(1): 86-96.
- Stuart, N. W. (1939) Comparative cold hardiness of scion roots from fifty apple varieties. *Proceedings. American Society for Horticultural Science* 37: 330-334.
- Van Assche, F. and Clijsters, H. (1990) Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant Cell and Environment* 13(3): 195-206.
- Viveros, S., Mendoza, G., Alarkon, D. and Cerrato, R. (2010) Copper effects on photosynthetic activity and membrane leakage of *Azolla filiculoides* and *A. caroliniana*. *International Journal of Agriculture and Biology* 12(3): 365-368.
- Xiong, Z. T. and Wang, H. (2005) Copper toxicity and bioaccumulation in Chinese cabbage (*Brassica pekinensis* Rupr.). *Environmental Toxicology* 20(2): 188-194.
- Zhou, Y. Q., Huang, S. Z., Yu, S. L., Gu, J. G., Zhao, J. Z., Han, Y. L. and Fu, J. J. (2009) The physiological response and sub-cellular localization of lead and cadmium in *Iris pseudacorus* L.. *Ecotoxicology* 19(1): 69-76.