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 ($PbCl_2$) 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

Copyright©2016, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

زیست‌شناسی گیاهی ایران، سال هشتم، شماره سی‌ام، زمستان ۱۳۹۵، صفحه ۱-۱۴
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۵/۰۳/۲۲
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۵/۰۶/۰۵
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۵/۰۹/۰۱

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

الهام اعتمادی، پیام فیاض * و رقیه ذوالفقاری
گروه جنگل‌داری، دانشکدهٔ کشاورزی و پژوهشکدهٔ منابع طبیعی و محیط‌زیست، دانشگاه یاسوج، یاسوج، ایران

چکیده
تاثیر افزایش سرب (سرب کلرید) در محیط‌کشت آبی تا ۱۵، ۴۵ و ۹۰ میلی‌گرم در لیتر با EDTA، بر برخی ویژگی‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی نهال‌های یک‌سالهٔ دو گونهٔ صنوبر شالک و سپیدار بررسی شد. شش هفته پس از قرارگرفتن در غلظت هدف، مقدار سرب، زی توده، مقدار نسبی آب، میزان نشت الکترولیت‌ها، قندهای محلول، پرولین، مالون دی آلدهید 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 تودهٔ آن‌ها تأثیر نداشت. در هر دو گونه تجمع سرب در ریشه بیشتر از برگ بود. گونهٔ شالک محتوای آب بیشتر و غلظت قند محلول کمتری نسبت به گونهٔ 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 قرارگرفته در تیمار شدید سرب، افزایش میزان نشت الکترولیت‌ها را نشان دادند؛ اما مقدار مالون دی آلدهید آن‌ها تغییر نکرد. مقدار رنگدانه‌ها نیز با تیمار سرب تغییر نکرد و تنها نسبت کلروفیل a/b در گونهٔ 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 گونهٔ شالک، دست‌کم باتوجه 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، گیاه‌پالایی، مقدار نسبی آب، نفوذپذیری غشا

مقدمه

سرب، فراوان‌ترین فلز آلوده‌کنندهٔ محیط‌زیست است (Salt *et al.*, 1998) که عملکرد زیستی 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

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

Copyright©2016, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

وزن خشک خود انباشته کنند، گیاهان فراانباشتگر (Baker and Brooks, 1989) نامیده می‌شوند. جذب سرب در گیاهان به‌علت توان اتصال زیاد آن با آنیون‌های موجود در محلول خاک و تشکیل رسوب به‌شکل نمک‌های نامحلول سولفات، کربنات، هیدروکسید و فسفات، بسیار محدود است (McBride, 1994). تجمع سرب در گیاهان فراانباشتگر و به‌ویژه در اندام‌های هوایی، به‌تدریج و پس از اشباع این جایگاه‌ها نمایان می‌شود (Kalinowska and Pawlik-Skowrońska, 2010). بنابراین برای افزایش حلالیت و توان جذب آن، استفاده از محیط‌کشت 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 سیستئین، 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، دربارهٔ نقش آن‌ها در رویارویی با فلزهای سنگین در گونه‌های درختی، اطلاعات بسیار اندکی وجود دارد.

جنس صنوبر (*Populus* sp.)، متعلق به خانوادهٔ بیدیان (*Salicasea* Mirb.)، با حدود ۳۵ گونه در دنیا، گسترهٔ طبیعی وسیعی در نواحی معتدلهٔ شمالی دارد (Chanda *et al.*, 2011). گونه‌های شالک و سپیدار در محدودهٔ وسیعی از کشور چه در مناطق روستایی و چه در فضای سبز شهری، به‌شکل مجتمع و پراکنده در حاشیهٔ رودها و جاده‌ها حضور دارند (Sabeti, 1976)؛ این امر امکان قرار گرفتن آن‌ها را در معرض فلزات سنگین به‌ویژه سرب، یکی از آلاینده‌های مهم صنعتی، افزایش می‌دهد. بررسی‌های مختلف نشان می‌دهد که گونهٔ شالک قادر است سرب قابل جذب را در محیط‌کشت، 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 درختی‌بودن، غیرمثمربودن، تکثیر آسان و تعرق زیاد، آن را به گونه‌ای ایدئال برای گیاه‌پالایی بدل کرده است (Dix *et al.*, 1997). اگرچه بررسی‌های زیادی دربارهٔ توان جذب فلزهای سنگین و تأثیر آن بر رشد گونه‌های مختلف صنوبر انجام شده است، اطلاعات اندکی دربارهٔ آثار فیزیولوژیک و بیوشیمیایی فلزهای سنگین در گونه‌های مختلف صنوبر وجود دارد.

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

ضرورت دارد. بنابراین در پژوهش حاضر، پاسخ‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی ناشی از افزایش غلظت سرب در دو گونهٔ 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 گونهٔ شالک و سپیدار، آزمایشی به‌شکل فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی و در ۶ تکرار انجام شد که در آن اثرهای سادهٔ غلظت سرب (۱۵، ۴۵ و ۹۰ میلی‌گرم در لیتر)، گونه (شالک و سپیدار) و اندام (برگ، ساقه و ریشه) با اثرهای متقابل دوگانه و سه‌گانهٔ آن‌ها بر برخی ویژگی‌های فیزیولوژیک آزمایش شد.

– **تهیهٔ نهال‌ها و شرایط آزمایش:** قلمه‌های دو کلون صنوبر *P. nigra* و *P. alba* از موسسهٔ 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 درجهٔ سانتیگراد و متوسط تشعشعات فعال فتوسنتزی ۱۷۵۰ میکرومول فوتون برمترمربع بر ثانیه در ساعت ۱۰ صبح منتقل شدند. ده روز پس از قرارگرفتن در این محیط، نهال‌های هر دو گونه به‌طور یکنواخت به چهار گروه شش‌تایی شامل یک گروه شاهد و سه گروه تیمار تقسیم شدند. غلظت سرب در محلول غذایی گیاهان تیمارشده با افزودن نمک سرب کلرید (کیمیا مواد، ایران)، به‌تدریج افزایش یافت؛ به‌طوری که در هفت مرحله در یک ماه به غلظت‌های هدف ۱۵، ۴۵ و ۹۰ میلی‌گرم در لیتر رسید. نهال‌ها به‌مدت ۶ هفته در غلظت هدف رشد کردند و پس از آن برداشت شدند. افزایش تدریجی غلظت سرب به‌علت بررسی محتاطانهٔ 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 رقیق‌شده (یک هشتم) و در ماه سوم از EDTA (Sigma، آمریکا)، کلاته‌کنندهٔ 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 استفاده‌نکردن از EDTA در گروه شاهد، این نهال‌ها پس از رقیق‌کردن 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 مرحلهٔ قبل در آن‌ها توسعه یافت. بنابراین نتایج مربوط به تیمار شاهد تجزیه و تحلیل نشد.

ویژگی‌های اندازه‌گیری‌شده: 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 درجهٔ سانتیگراد به‌مدت ۴۸ ساعت، وزن خشک آن‌ها نیز تعیین شد. برای اندازه‌گیری سرب پس از خاکسترکردن نمونه‌ها (۰/۴ گرم) در دمای ۵۰۰ درجه سانتیگراد و هضم با کلریدریک اسید (Merck، آلمان) ۲ نرمال تا حجم ۴۰

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). نمونهٔ برگ از برگ‌های جدید کاملا توسعه‌یافته، ساقه از قسمت پایینی ساقه و ریشه از ریشه‌های نازک غیرچوبی انتخاب شد. برای بررسی آسیب غشایی؛ میزان نشت الکترولیت‌های ریشه، ساقه و برگ که شاخصی برای بررسی تغییر نفوذپذیری غشای سیتوپلاسمی است، طبق روش Stuart (۱۹۳۹)، با هدایت‌سنج الکتریکی (مدل Cond 720، شرکت InoLab، آلمان) اندازه‌گیری شد. غلظت مالون دی آلدهید، محصول ثانویهٔ ناشی از اکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع، در برگ و ریشهٔ گیاهان فریزشده در دمای ۴۰- درجهٔ 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 کارتنوئیدها) در برگ‌های فریزشده با روش رنگ‌سنجی عصارهٔ استون انجام شد (Lichtenthaler, 1987). غلظت پرولین از روش رنگ‌سنجی محصول واکنش نین‌هیدرین در تولوئن (هر دو از شرکت AppliChem، آلمان) در برگ و ریشهٔ گیاهان فریزشده اندازه‌گیری شد (Bates *et al.*, 1973). غلظت قندهای محلول کل براساس روش رنگ‌سنجی آنترون - سولفوریک اسید (شرکت Merck، آلمان) 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. باتوجه‌به نرمال‌بودن توزیع داده‌ها هیچ تبدیل داده‌ای انجام نشد. در صورت معنی‌دار بودن اثرهای تیمارها، میانگین‌ها با آزمون مقایسهٔ میانگین چندگانهٔ دانکن گروه‌بندی شدند. کلیهٔ 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 گونهٔ شالک و سپیدار رشدیافته در دو محیط‌کشت 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 محیط‌کشت بر میزان تجمع سرب در نهال‌ها افزوده می‌شود؛ ولی در محیط‌کشت 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 گونهٔ شالک و سپیدار نیز تفاوت معنی‌داری نشان نداد و تنها وزن زی تودهٔ تر و خشک در اندام‌های مختلف متفاوت بود (جدول ۱)؛ به‌طوری‌که ریشه، بیشترین وزن تر (شکل ۲-A) و ساقه، بیشترین وزن خشک (شکل ۲-B) را داشت. همچنین وزن خشک

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

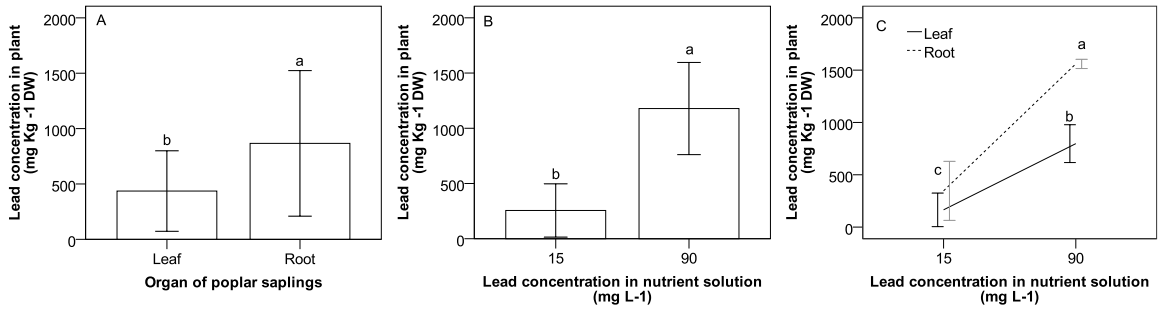
نتایج آنالیز واریانس مقدار نسبی آب اندام‌های مختلف دو گونه در سطوح مختلف سرب نشان داد که گونه و اندام، تاثیر معنی‌داری بر مقدار نسبی آب دارند؛ ولی غلظت‌های مختلف سرب، مقدار نسبی آب را در اندام‌های مختلف تغییر نداد (جدول ۱). نتایج مقایسهٔ میانگین‌ها نشان داد که گونهٔ شالک مقدار آب بیشتری از گونهٔ سپیدار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

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

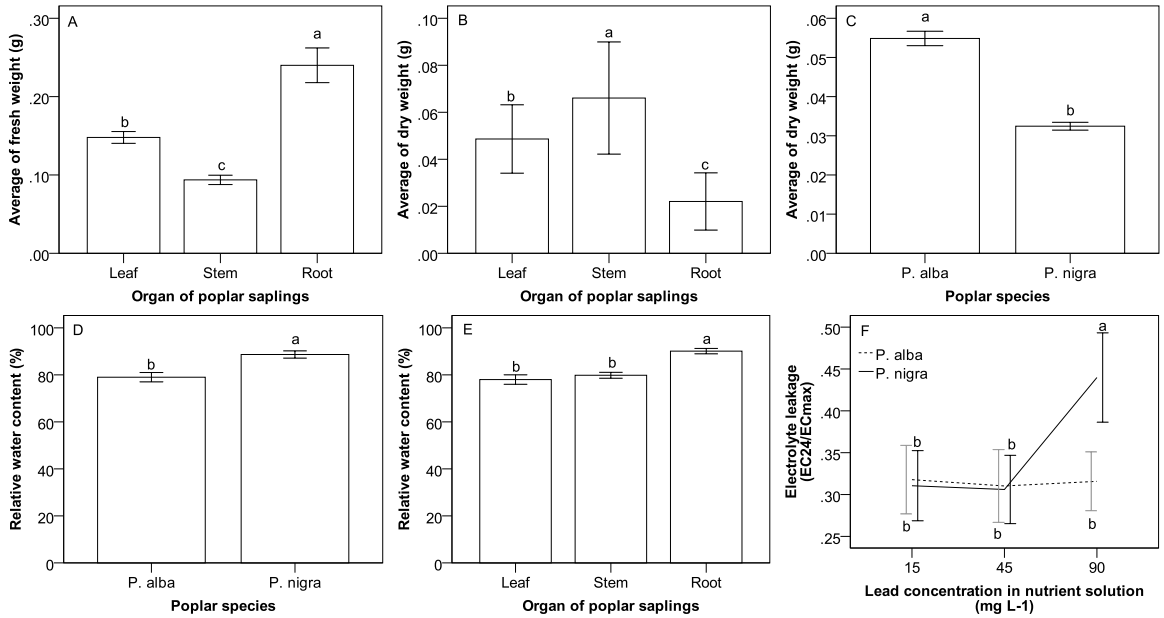
جدول ۱- مقادیر F حاصل از آنالیز واریانس اثرهای ساده و متقابل گونه (شالک و سپیدار)، اندام (ریشه، ساقه و برگ) و تیمار سرب (۱۵، ۴۵ و ۹۰ میلی‌گرم در لیتر) با ضریب تغییرات خطا (٪)

منبع تغییرات	تجمع سرب	وزن تر	وزن خشک	مقدار نسبی آب	قندهای محلول	غلظت پرولین	میزان نشت الکترولیت‌ها	مالون دی آلدهید	غلظت کلروفیل a	غلظت کلروفیل b	کلروفیل a/b	غلظت کارتنوئیدها
گونه	۰/۴۸$^{n.s}$	۰/۱۳$^{n.s}$	۶/۰۵*	۱۲/۵۰**	۵/۶۱*	۰/۱۷$^{n.s}$	۴/۲۸*	۰/۴۵$^{n.s}$	۳/۸۸$^{n.s}$	۰/۰۵۸$^{n.s}$	۸/۶۳**	۰/۱۸۳$^{n.s}$
اندام	۳۸/۳***	۲۵/۰***	۶/۷۴**	۱۰/۰***	۰/۴۴^{ns}	۹/۰۰**	۱۶۸***	۱۱/۶***	–	–	–	–
تیمار	۱۴۶***	۰/۰۳$^{n.s}$	۰/۸۱$^{n.s}$	۰/۷۶$^{n.s}$	۶/۱۵**	۱۳/۶***	۴/۲۱*	۲/۰۴$^{n.s}$	۱/۸۹$^{n.s}$	۱/۶۸$^{n.s}$	۶/۵۵**	۱/۱۸$^{n.s}$
اندام×گونه	۰/۸۵$^{n.s}$	۱/۵۰$^{n.s}$	۱/۲۵$^{n.s}$	۰/۸۳$^{n.s}$	۲/۴۶^{ns}	۴/۶۹*	۷/۳۲**	۲/۱۷$^{n.s}$	–	–	–	–
تیمار×گونه	۱/۷۲$^{n.s}$	۰/۰۳$^{n.s}$	۱/۲۱$^{n.s}$	۲/۹۸$^{n.s}$	۱/۱۶^{ns}	۳/۳۳*	۵/۶۴**	۱/۹۱$^{n.s}$	۲/۹۱$^{n.s}$	۰/۱۸۱$^{n.s}$	۵/۳۶*	۰/۸$^{n.s}$
تیمار×اندام	۱۴/۵***	۱/۵۷$^{n.s}$	۱/۴۱$^{n.s}$	۰/۹۴$^{n.s}$	۱/۵۸$^{n.s}$	۰/۳۸$^{n.s}$	۰/۴۲$^{n.s}$	۱/۵$^{n.s}$	–	–	–	–
تیمار×اندام×گونه	۰/۰۴$^{n.s}$	۰/۲۷$^{n.s}$	۱/۰۸$^{n.s}$	۱/۰۷$^{n.s}$	۲/۳۴$^{n.s}$	۰/۰۵$^{n.s}$	۲/۳۴$^{n.s}$	۰/۵۰$^{n.s}$	–	–	–	–
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 ***: به‌ترتیب نشان‌دهندهٔ اختلاف معنی‌دار در سطوح احتمال ۵، ۱ و ۰/۱٪ و ns: نشان‌دهندهٔ نبود اختلاف معنی‌دار است.



شکل ۱- مقدار سرب در ریشه و برگ دو گونهٔ شالک و سپیدار در محیط‌کشت حاوی ۱۵ و ۹۰ میلی‌گرم در لیتر سرب. مقادیر میانگین ۴ تکرار ± انحراف معیار است. حروف مشترک نشان‌دهندهٔ نبود اختلاف معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵٪ است.



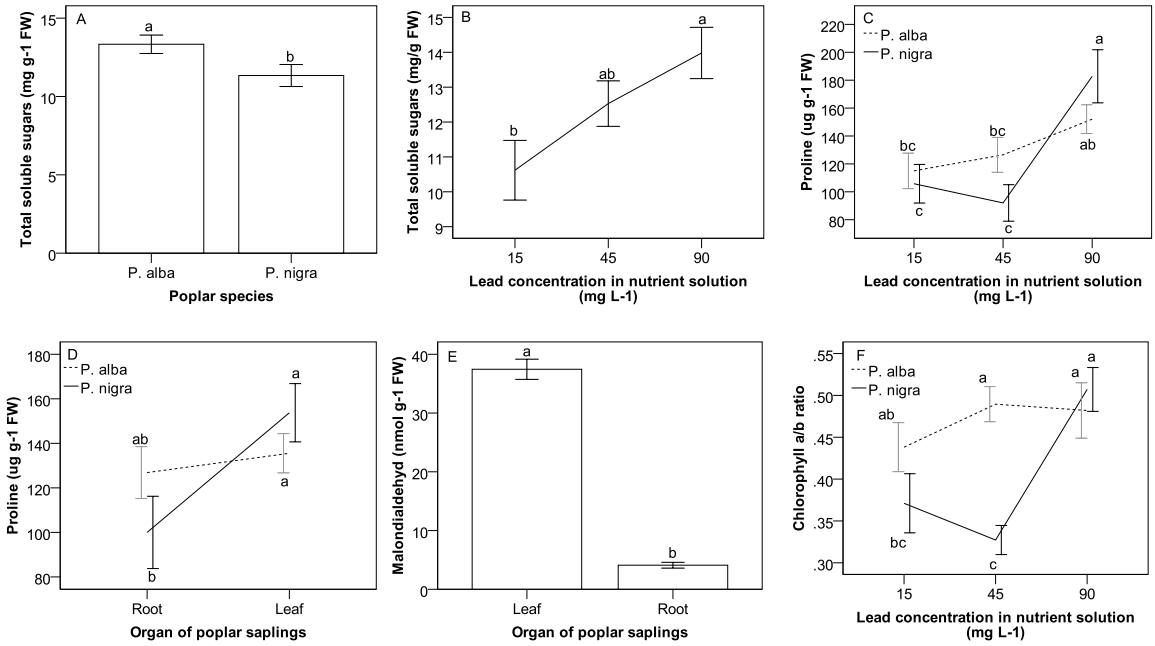
شکل ۲- پاسخ‌های فیزیولوژیک دو گونهٔ شالک و سپیدار در برابر افزایش غلظت سرب در محیط کشت آبی (۱۵، ۴۵ و ۹۰ میلی‌گرم در لیتر). مقادیر میانگین ۶ تکرار ± انحراف معیار است. حروف مشترک نشان‌دهندهٔ نبود اختلاف معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵٪ است.

نوع گونه و سطوح سرب، تاثیر معنی‌داری بر غلظت قندهای محلول کل داشت (جدول ۱). میزان قندهای محلول در گونهٔ 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)؛ به‌طوری‌که 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 گونهٔ شالک متفاوت بود؛ به‌طوری‌که ریشه کمترین و برگ بیشترین میزان پرولین را داشت؛ اما میزان پرولین در اندام‌های مختلف سپیدار ثابت بود (شکل ۳-D).

نتایج آنالیز واریانس تاثیر غلظت‌های مختلف سرب بر میزان مالون دی آلدهید (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)؛ به‌طوری‌که میزان آن در برگ بیشتر از ریشه بود (شکل ۳-E).

میزان کلروفیل a، کلروفیل b و کاروتنویید‌ها 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)؛ به‌طوری‌که نسبت کلروفیل a/b در گونهٔ *P. nigra* در ۹۰ ppm افزایش یافت؛ ولی تغییر معنی‌داری در گونهٔ *P. alba* مشاهده نشد (شکل ۳-F).



شکل ۳- پاسخ‌های بیوشیمیایی دو گونهٔ شالک و سپیدار در برابر افزایش غلظت سرب در محیط‌کشت آبی (۱۵، ۴۵ و ۹۰ میلی‌گرم در لیتر). مقادیر میانگین ۳ تکرار ± انحراف معیار است. حروف مشترک نشان‌دهندهٔ نبود اختلاف معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵٪ است.

بحث

پژوهش حاضر، تغییرات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی نهال‌های یک‌سالهٔ دو گونهٔ 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 معمولا 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 قرارگرفتن در محیط‌کشت حاوی سرب (۹۰ میلی‌گرم در لیتر)، به‌ترتیب ۱۵۶۰ و ۸۴۷ میلی‌گرم سرب در کیلوگرم وزن خشک ریشه و برگ خود انباشته کردند. با این‌حال، 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 دوگونه برای استفاده در بررسی و پالایش زیستی است. تغییرنکردن 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. باتوجه‌به نتایج یادشده استنباط می‌شود که با افزایش غلظت سرب در دامنهٔ بررسی‌شده، محدودیت آبی برای هیچ‌یک از دو گونهٔ شالک و سپیدار ایجاد نشده است.

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 گونهٔ شالک و سپیدار، با افزایش غلظت سرب تا ۹۰ میلی‌گرم 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 تجمع‌یافته 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 گلوتاسیون نقش دارد (Freeman *et al.*, 2005). از این‌رو به نظر می‌رسد که افزایش میزان قندهای محلول، یکی از نخستین سازوکارهای مقاومت در برابر آلودگی سربی در هر دو گونهٔ شالک و سپیدار باشد.

سطح اولیهٔ پرولین در نهال‌های یک‌سالهٔ دوگونهٔ شالک و سپیدار، یکسان بود و اثر متقابلی بین گونه و اندام و نیز گونه و سرب مشاهده شد؛ به‌طوری‌که با افزایش سرب، میزان پرولین در گونهٔ شالک افزایش یافت؛ اما غلظت پرولین در گونهٔ سپیدار تغییر نکرد. همچنین الگوی توزیع پرولین در شالک، ناهمگن (در برگ بیشتر از ریشه) ولی در سپیدار یکنواخت بود. در مطالعه‌ای Schat و همکاران (۱۹۹۷) تجمع پرولین آزاد را در اندام‌های مختلف دو اکوتیپ حساس و مقاوم گیاه سیلن بادکنکی (*Silene vulgaris* (Moench) Garcke) از خانوادهٔ میخکیان (Caryophyllaceae Juss.) در تیمار تعدادی از فلزهای سنگین (کادمیوم، روی و مس) بررسی کردند. نتایج بررسی آن‌ها نشان داد که فلزهای سنگین به‌طورگسترده‌ای تجمع پرولین آزاد را در اندام‌های مختلف اکوتیپ حساس به‌ویژه 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 تاثیری بر تجمع پرولین در اکوتیپ مقاوم نداشت. باتوجه‌به تجمع برابر سرب در دو گونهٔ بررسی‌شده، به نظر می‌رسد که سرب موجود در گونهٔ شالک به‌علت 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 گونهٔ 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 انجام‌شده دربارهٔ پاسخ گونه‌های حساس (Zhou *et al.*, 2009) و مقاوم (Schat *et al.*, 1997) به آلودگی سربی دارد.

افزایش غلظت سرب در دو گونهٔ شالک و سپیدار، میزان کلروفیل a، کلروفیل b و کاروتنوئیدها را به‌طور معنی‌داری تغییر نداد؛ اما نسبت کلروفیل a به b را در گونهٔ شالک افزایش داد که بیشتر ناشی از کاهش کلروفیل b بود. حساسیت رنگدانه‌های مختلف گیاهی در برابر تنش‌های محیطی متفاوت است و معمولا 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

ویژگی‌های اونتوژنتیکی گونه و شرایط آزمایش متفاوت است. در تحقیق Ewais (۱۹۹۷) دربارهٔ اثر افزایش سرب (۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر) در سه‌گونهٔ *Cyperus difformis* L.، *Chenopodium ambrosioides* L. و *Digitaria sanguinalis* L.، مشخص شد که غلظت اندک سرب بر میزان کلروفیل a و b در هیچ‌یک از گونه‌ها تاثیر نداشت و غلظت شدید سرب (۲۰۰ میلی‌گرم 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 معمولا غلظت رنگدانه‌ها را کاهش می‌دهد که این کاهش از مهار آنزیم‌هایی مثل ALA دهیدراز و پروتوکلروفیلید ردوکتاز، جایگزینی سرب با یون‌های منیزیم در حلقهٔ 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 گونهٔ *Iris pseudacorus* L. در غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم 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 کارتنوئیدها کاهش پیدا کردند؛ ولی این کاهش در کلروفیل b بیشتر از کلروفیل a بود که با نتایج بررسی حاضر مطابقت دارد.

باتوجه‌به 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)، تغییرنکردن آن‌ها در دو گونهٔ صنوبر بررسی‌شده، مقاومت در برابر سازوکارهایی را نشان می‌دهد که به تجزیهٔ کاروتنوئیدها در حضور فلزهای سنگین منجر می‌شود.

یکی از نخستین نشانه‌های تنش اکسیداتیو، افزایش اکسیداسیون اسیدهای چرب غیر اشباع و به‌دنبال 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 نتیجهٔ 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 میلی‌گرم در لیتر و در مدت آزمایش در هیچ‌یک از گونه‌ها تغییری نکرد که ممکن است به‌علت وجود سازوکارهای دفاعی موثر در مقابل تنش‌های اکسیداتیو، ایجاد شده باشد.

معمولا 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، پتانسیل‌اسمزی، شاخص پیچش برگ (Premachandra *et al.*, 1989)، کارایی مصرف آب (Saelim and Zwiazek, 2000; Franca *et al.*, 2000)، سنتز آنزیم‌های آنتی‌اکسیداتیو (Liu and Huang, 2000)، آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی (Banu *et al.*, 2009)، انعکاس طیفی نور (Garty *et al.*,

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.*, 2007; Xiong and Wang, 2005). با افزایش غلظت سرب تا ۹۰ میلی‌گرم در لیتر، میزان نشت الکترولیت‌ها در اندام‌های مختلف گونهٔ شالک افزایش یافت؛ اما تغییری در میزان نشت الکترولیت‌های گونهٔ سپیدار مشاهده نشد. به نظر می‌رسد که باتوجه‌به تغییرنکردن میزان مالون دی آلدهید، تغییر میزان نشت الکترولیت‌ها در گونهٔ شالک در تیمار شدید، به‌علت پراکسیداسیون لیپیدهای غشا نیست؛ بلکه سایر عوامل موثر در نفوذپذیری غشای سلول نظیر ترکیب و میزان لیپیدهای غشاء در افزایش نفوذپذیری غشای سیتوپلاسمی آن‌ها موثر هستند. باتوجه‌به نتایج به‌دست آمده، به نظر می‌رسد در مجموع، راهکارهای گونهٔ سپیدار در برابر افزایش سرب در محیط‌کشت به حفاظت اندام‌های این‌گونه در برابر آسیب غشایی منجر شده است؛ درحالی‌که در گونهٔ شالک حضور سرب در محیط‌کشت تخریب غشای سیتوپلاسمی را در همهٔ اندام‌ها موجب شده است.

نتیجه‌گیری

به‌طورکلی 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. گونهٔ 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 گونهٔ شالک، بدون تغییر در سطح اکسیداسیون لیپیدهای غشایی، نفوذپذیری غشای سیتوپلاسمی و مقدار پرولین را افزایش داد.

سپاسگزاری

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

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 Akademisher 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 albs* 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 inducesresponse 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., Chrastný, 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. 2th 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 Plysiology 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.