

## تأثیر فلزات سنگین و ترکیبات مختلف بستر کاشت بر آنزیم‌های پاداکساینده و عملکرد

لوبیا چیتی (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Sadri)

فاطمه امینی و حمیدرضا بلوچی\*

یاسوج، دانشگاه یاسوج، دانشکده کشاورزی، گروه زراعت و اصلاح نباتات

تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۲/۳

تاریخ دریافت: ۹۴/۸/۶

## چکیده

بمنظور بررسی تأثیر فلزات سنگین بر آنزیم‌های پاداکساینده در لوبیا چیتی رقم صدری تحت ترکیبات مختلف بستر کاشت آزمایشی بصورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با سه تکرار در گلخانه دانشگاه یاسوج در سال ۱۳۹۲ اجرا گردید. عامل اول شامل چهار نوع فلزات سنگین (شاهد، نیترات کادمیوم، نیترات سرب، نیترات نیکل و سولفات مس با غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک) و عامل دوم شامل ترکیبات مختلف بستر کاشت در چهار نوع (شاهد (خاک معمولی)، کمپوست، ورمی‌کمپوست و خاکاره) بود. نتایج نشان داد که بیشترین میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز مربوط به بستر کاشت خاکاره بود که نسبت به شاهد بترتیب ۲۱/۳۶ و ۱۱/۹۴ درصد افزایش نشان داد؛ اما با افزودن کمپوست و ورمی‌کمپوست فعالیت این دو آنزیم کاهش یافت. تمام انواع فلزات سنگین فعالیت آنزیم پراکسیداز را افزایش و پروتئین محلول برگ را کاهش دادند و میزان فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز فقط در سطح نیترات سرب کاهش یافت. فلزات سنگین به غیر از نیترات سرب، وزن دانه در بوته را نسبت به سطح شاهد (بدون فلزات سنگین) کاهش داد. بیشترین میزان وزن دانه در بوته در سطح نیترات سرب و کمترین آن در نیترات کادمیوم مشاهده شد. در کل می‌توان گفت که کاربرد کمپوست و ورمی‌کمپوست بعنوان یک کود آلی سرشار از عناصر ماکرو و میکرو است می‌تواند نقش مثبتی را در تعدیل اثرات فلزات سنگین ایفا کند و با کاهش اثرات سمی فلزات سنگین منجر به کاهش فعالیت آنزیم‌های پاداکساینده شود.

واژه‌های کلیدی: لوبیا چیتی (*Phaseolus vulgaris* L.)، فلزات سنگین، بستر کاشت، آنزیم‌های پاداکساینده

\* نویسنده مسئول: تلفن: ۰۹۱۷۱۸۹۲۰۴۰، پست الکترونیکی: balouchi@yu.ac.ir

## مقدمه

و نقل تقسیم کرد (۶). فلزات سنگین باعث ایجاد گونه‌های فعال اکسیژن می‌شوند که این گونه‌ها محصول متابولیسم هوازی بوده و شامل ترکیباتی مثل سوپر اکسید، پراکسید هیدروژن و رادیکال‌های اکسیژن می‌باشند که طی واکنش‌های انتقال الکترون در میتوکندری‌ها، کلروپلاست‌ها و پراکسی‌زوم‌ها تولید می‌شوند و در صورتی که غلظت آن‌ها تنظیم نگردد، سبب آسیب به پروتئین غشا و DNA می‌گردند (۱۶). برخی از یون‌ها مانند مس با ویژگی‌های شدید احیاکنندگی و همچنین یون‌هایی مانند روی و

فلزات از ترکیبات طبیعی در خاک می‌باشند که در این میان فلزات سنگین بصورت قراردادی به عناصری با خصوصیات فلزی (انعطاف پذیر، هادی و پایدار مانند کاتیون‌ها، لیگاندهای اختصاصی) گفته می‌شود که عدد اتمی آنها بیشتر از ۲۰ باشد. فلزات سنگین آلاینده‌ی معمول شامل: نیکل، سرب، جیوه، مس، کروم و کادمیوم هستند. منابع طبیعی و انسانی بسیاری وجود دارند که می‌توانند باعث تجمع غلظت‌های بالایی از فلزات شوند که می‌توان آنها را به منابع طبیعی، کشاورزی، صنعتی، شهری و حمل

فلاونوئیدها و فعالیت آنزیم پراکسیداز در اندام هوایی و ریشه‌های یونجه افزایش یافت (۵).

ورمی‌کمپوست را می‌توان جهت حذف فلزات از خاک‌های آلوده مورد استفاده قرار داد، زیرا ورمی‌کمپوست با فلزات پیوند یافته و جذب را از طریق فراهم کردن عناصر غذایی مانند سدیم، منیزیم، آهن، روی، منگنز و مس افزایش می‌دهد که می‌تواند به عنوان یک کود طبیعی به عملکرد بالای بیومس، سازگاری میکروبی و رشد همه‌جانبه گیاه کمک کند (۲۴). همچنین کمپوست برگ به دلیل دارا بودن قدرت تبادل یونی می‌تواند برای حذف فلزات سنگین از فاضلاب‌ها به کار رود و به دلیل بالا بودن مقدار مواد آلی، قادر است که برای مدت زمان طولانی آلاینده‌ها را در خود نگهداری کند. کمپوست برگ می‌تواند سطوح زیادی از فلزات محلول را حذف کرده و سمیت آن‌ها را کاهش دهد؛ چون انواع برگ‌ها و پوسته‌ها، سطحی را برای جذب فلزات سنگین ایجاد می‌کنند. ولی متأسفانه به سبب این‌که ترکیب کمپوست برگ شناخته شده نیست، مقدار جذب مختلفی برای برگ‌ها و گونه‌های چوبی مختلف موجود در آن می‌تواند وجود داشته باشد. کارایی کمپوست برگ کاملاً بستگی به گونه‌های فصلی موجود در کمپوست در هر زمان و در هر قسمت از آن دارد (۲۴). تلفیق ورمی‌کمپوست با خاک و خاک گلدان می‌تواند منجر به افزایش رشد گیاه شود (۱۰). به طور کلی بستر کاشت بدلیل شکل‌گیری پیچیده بین یون‌های فلزات سنگین با مواد آلی خاک می‌تواند منجر به کاهش سمیت این عناصر برای گیاهان شوند (۳۰). استفاده از راهکارهایی برای مقابله با تنش فلزات سنگین از جمله تأثیر ترکیبات بستر کاشت در کاهش اثرات تنش‌های محیطی و سمیت فلزات سنگین بر رشد گیاهان اهمیت قابل توجهی دارد. از طرف دیگر بررسی تغییرات آنزیم‌های پاداکساینده بعنوان یک سد دفاعی در برابر تنش فلزات سنگین و تأثیر ترکیبات بستر کاشت بر کاهش این سمیت از طریق بررسی فعالیت این آنزیم‌ها بعنوان اهداف این پژوهش طراحی گردید. از دلایل

کادمیوم به عنوان آغاز کننده‌های پراکسیداسیون لیپید غشا و تحریک کننده‌های تولید گونه‌های فعال اکسیژن شناخته شده‌اند. گسترش تنش اکسایشی در گیاهانی که در معرض تنش فلزات سنگین قرار می‌گیرند، بیشتر به عدم توازن ایجاد شده توسط فلز سنگین بین تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و حذف آن‌ها از طریق مکانیزم دفاعی پاداکسایشی نسبت داده می‌شود (۳۲).

نتایج آزمایشات Zhang و همکاران (۳۵) بر گیاهان ماش علوفه‌ای و ماش سبز نشان داد که غلظت ۱۰۰ میکرومولار کادمیوم تولید آنیون پراکسید، پراکسید هیدروژن و همچنین فعالیت نیکوتین‌آمید آدنین دی‌نوکلئوتید فسفات (NADPH) اکسیداز پیوند یافته با غشای پلاسمایی و فعالیت‌های سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و آسکوربات پراکسیداز آپوپلاستی و سیمپلاستی را در برگ‌های هر دو گیاه فوق افزایش داد. فعالیت گایاکول پراکسیداز آپوپلاستی در برگ‌های هر دو گونه به‌طور معنی‌داری القا شد، به‌ویژه در ماش سبز که در معرض غلظت ۱۰۰ میکرومولار کادمیوم بود. با افزایش غلظت کادمیوم، فعالیت آنزیم‌های پاداکساینده مثل آسکوربات پراکسیداز، گایاکول پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز با افزایش غلظت کادمیوم افزایش یافت؛ اما فعالیت کاتالاز (CAT) در گیاه لوبیا کاهش یافت (۱۱). همچنین کاهش فعالیت کاتالاز و افزایش پراکسید هیدروژن در گیاهچه گندم (۷) تحت تنش کادمیوم گزارش شده است. در گیاه ذرت فعالیت آنزیم‌های CAT، آسکوربات پراکسیداز، گلوتاتیون ردوکتاز و گایاکول پراکسیداز هم در اندام هوایی و هم در ریشه‌های گیاهان تیمار شده با سولفات نیکل با افزایش غلظت این فلز افزایش یافتند. میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در ریشه که به طور مستقیم در تماس با فلز سنگین نیکل بود از اندام هوایی بیشتر و میزان فعالیت سایر آنزیم‌ها در اندام هوایی بیشتر از ریشه بود (۴). همچنین تحقیقات نشان داد که با افزایش غلظت سرب در محیط میزان تولید پراکسید هیدروژن بعنوان شاخص‌های تنش اکسایشی و میزان تولید

جدول ۱- غلظت فلزات سنگین در خاک و ترکیبات بستر کاشت مورد آزمایش

| ترکیبات بستر کاشت<br>(میلی‌گرم در کیلوگرم وزن خشک خاک) | کادمیوم | سرب   | نیکل  | مس    |
|--|---------|-------|-------|-------|
| خاک  | ۲/۱۸    | ۲۹/۷۴ | ۷۰/۳۰ | ۱/۹۷  |
| ورمی‌کمپوست  | ۸/۸۳    | ۳۱/۶۸ | ۳۸/۳۷ | ۳/۰۰  |
| کمپوست   | ۶/۹۰    | ۳۴/۵۱ | ۲۲/۶۰ | ۱۰/۰۰ |
| خاکاره   | ۲/۱۰    | ۲/۴۰  | ۱/۲۰  | ۱/۶۰  |

ابتدا خاک و شن را از الک یک سانتی‌متری عبور داده و آن‌ها را بترتیب به نسبت چهار به یک مخلوط کرده و سپس ترکیب‌های آلی خاک با نسبت پنج درصد وزنی (بر مبنای وزن پایه خشک) بطور دستی با خاک هر گلدان مخلوط شد (۹). در مرحله‌ی بعد فلزات سنگین ذکر شده در بالا با غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک توسط افشانه به خاک‌های تقویت شده (با کودها و خاکاره) اضافه شد (۲۴). سپس گلدان‌های کشت با هفت کیلوگرم از خاک فوق پر گردید. بعد از گذشت یک ماه (بدلیل یکنواخت شدن فلز سنگین با خاک) کاشت صورت گرفت. لازم به ذکر است که قبل از کاشت ۰/۳ گرم کود فسفات آمونیوم در لایه‌ی یک سانتی‌متری زیر بذر قرار داده شد (معادل ۱۰۰ کیلوگرم در هکتار) و ۰/۵ گرم کود اوره (معادل ۱۵۰ کیلوگرم در هکتار) همراه با اولین آب آبیاری به هر گلدان داده شد، ۰/۵ گرم دیگر کود اوره (معادل ۱۵۰ کیلوگرم در هکتار) نیز به صورت سرک طی مرحله گلدھی همراه با آب آبیاری اضافه گردید. طی دوره رشد آبیاری گلدان‌ها تا حد ظرفیت زراعی انجام شد و نمونه‌برداری از جوان‌ترین برگ‌های کامل (در مرحله ۵۰٪ گلدھی) انجام گرفت.

**استخراج عصاره آنزیمی و سنجش پروتئین:** جهت اندازه‌گیری کمی پروتئین از روش Bradford (۱۲) استفاده شد. اساس روش برادفورد بر اتصال کوماسی برلیانانت بلو G250 به پروتئین در محیط اسیدی و تعیین جذب ماکزیمم

انتخاب این گیاه می‌توان به پرمصرف بودن آن در سطح جهان و اینکه گیاهان خانواده حبوبات می‌توانند در اراضی فقیر از مواد غذایی رشد نموده و در صورت جذب فلزات سنگین آنها را بیشتر در اندام‌های رویشی ذخیره نموده و کمتر به دانه‌ها انتقال دهند، اشاره نمود.

## مواد و روشها

**کاشت گیاهان و تأثیر تیمارها:** این پژوهش بمنظور بررسی تأثیر فلزات سنگین مختلف و ترکیبات مختلف بستر کاشت بر تغییرات آنزیم‌های پاداکساینده و عملکرد گیاه لوبیا چیتی رقم صدری در سال ۱۳۹۲ در گلخانه و آزمایشگاه‌های دانشکده کشاورزی دانشگاه یاسوج اجرا گردید. این آزمایش بصورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با سه تکرار و دو گیاه در هر گلدان اجرا گردید. فاکتور اول آزمایش شامل انواع فلزات سنگین با پنج نوع (شاهد، نیترات کادمیوم، نیترات سرب، نیترات نیکل و سولفات مس) هر یک با غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و فاکتور دوم شامل ترکیب‌های مختلف بستر کاشت با چهار ترکیب (شاهد (خاک)، کمپوست، ورمی‌کمپوست و خاکاره) بود. علت انتخاب این غلظت بر اساس آزمایش‌های اولیه و تعیین غلظت بحرانی فلزات بر جوانه‌زنی بود (نتایج آورده نشده است). ابتدا بذور لوبیا چیتی رقم صدری از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه گردید. صدری اولین رقم لوبیا چیتی دانه درشت در ایران است که علاوه بر دارا بودن خصوصیات رقم محلی خمین، از نظر عملکرد، رنگ دانه، فرم بوته، بازار پسندی و اجزای عملکرد نسبت به رقم خمین برتر است. لاین G-14088 معروف به رقم صدری در سال ۱۳۶۷ به همراه ۶۰ لاین دیگر از مرکز تحقیقات بین‌المللی گیاهان حاره (CIAT) وارد ایران شد (۳).

غلظت فلزات سنگین در خاک و ترکیبات آلی نیز قبل از اعمال تیمارهای فلزات سنگین در آزمایشگاه آب و خاک فارس اندازه‌گیری شد که در جدول ۱ آورده شده است.

و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود، سپس در طول موج ۲۴۰ نانومتر و توسط اسپکتروفوتومتر قرائت شد و به ازای هر میکروگرم پروتئین در عصاره آنزیمی بیان شد.

**سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز:** فعالیت سوپراکسید دیسموتاز (SOD) طبق روش Gianno-politis و Ries (۲۰)، به این صورت انجام شد که ۰/۲ گرم نمونه‌ی منجمد در ۳ میلی‌لیتر بافر HEPES-KOH ۵۰ میلی‌مولار با pH معادل ۷/۸ حاوی EDTA ۰/۱ میلی‌مولار عصاره‌گیری شد. همگن‌های حاصل در ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد و بخش روئی برای سنجش فعالیت آنزیم SOD مورد استفاده قرار گرفت. مخلوط واکنش شامل، ۲ میلی‌لیتر بافر HEPES-KOH ۵۰ میلی‌مولار با pH= ۷/۸ حاوی EDTA ۰/۱ میلی‌مولار، کربنات سدیم ۵۰ میلی‌مولار با pH=۱۰/۲، L-methionine ۱۲ میلی‌مولار، نیتروبلو تترازولیوم ۷۵ میکرومولار، ریبوفلاوین ۱ میکرومولار و ۲۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی می‌باشد. نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در شدت نور تقریباً ۸۰۰۰ لوکس (در زیر نور خورشید) قرار گرفت و پس از این مدت جذب آن‌ها در طول موج ۵۶۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر قرائت شد. همچنین از یک لوله‌ی آزمایش حاوی مخلوط واکنش بدون عصاره‌ی آنزیمی بعنوان شاهد (بلانک) استفاده شد. یک واحد فعالیت SOD بعنوان مقدار آنزیمی در نظر گرفته می‌شود که منجر به مهار ۵۰ درصد احیای نوری نیتروبلو تترازولیوم می‌گردد. واحد فعالیت بصورت تغییرات جذب به میکروگرم پروتئین در میلی‌گرم بافت تازه برگ بیان می‌شود.

**اندازه‌گیری عملکرد:** در نهایت عملکرد (وزن دانه در بوته) در مرحله رسیدگی فیزیولوژیکی از کل بوته‌های یک گلدان اندازه‌گیری گردید و سپس میانگین‌گیری شد.

**تجزیه و تحلیل آماری:** تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS صورت پذیرفت و مقایسه میانگین با آزمون

از ۴۶۵ تا ۵۹۵ نانومتر می‌باشد. میزان جذب نوری در طول موج ۵۹۵ نانومتر با غلظت پروتئین نسبت مستقیم دارد.

**سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز و پلی‌فنل اکسیداز:** سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز (POX) و پلی‌فنل اکسیداز (PPO) به روش Ghanati و همکاران (۱۸) و به این صورت انجام گرفت که ابتدا به ۱۰۰ میکرولیتر عصاره‌ی آنزیمی، ۲ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۶۰ میلی‌مولار با pH=۶/۱، ۰/۵ میلی‌لیتر گایاکول ۲۸ میلی‌مولار و ۰/۵ میلی‌لیتر  $H_2O_2$  ۵ میلی‌مولار اضافه نموده و جذب محلول در طول موج ۴۷۰ نانومتر قرائت گردید. فعالیت آنزیمی بصورت افزایش جذب توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۴۷۰ نانومتر در دقیقه به ازای هر میکروگرم پروتئین در میلی‌گرم وزن تر برگ می‌باشد.

برای اندازه‌گیری آنزیم پلی‌فنل اکسیداز مخلوط واکنش شامل ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی، ۵۰۰ میکرولیتر آب اکسیژنه ۵ میلی‌مولار و ۵۰۰ میکرولیتر متیل کاتکول ۰/۰۲ میلی‌مولار در ۱۹۰۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم ۶۰ میلی‌مولار با pH=۶/۱ می‌باشد. افزایش فعالیت آنزیم بر اساس شدت رنگ نارنجی متیل کاتکول تولید شده و در طول موج ۴۱۰ نانومتر و توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر خوانده شد. فعالیت آنزیمی به ازای تغییرات جذب به میکروگرم پروتئین در دقیقه در میلی‌گرم بافت تازه برگ بیان شد.

**سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز:** سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) به روش Cakmak و Horst (۱۳) به دین ترتیب که ۰/۱ گرم نمونه‌ی منجمد برگ در ۳ میلی‌لیتر بافر فسفات سدیم ۲۵ میلی‌مولار با pH= ۶/۸ عصاره‌گیری شد. همگن‌های حاصل با سرعت ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند و از بخش شناور رویی برای سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز استفاده گردید. مخلوط واکنش شامل ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات سدیم ۲۵ میلی‌مولار با pH= ۶/۸، ۰/۵ میلی‌لیتر  $H_2O_2$  ۱۰ میلی‌مولار

احتمال پنج درصد اختلاف معنی‌داری داشتند (جدول ۲). نتایج تجزیه واریانس برش‌دهی ترکیبات مختلف بستر کاشت برای انواع فلزات سنگین (جدول ۳) نشان داد که بین ترکیبات بستر مختلف در سطوح شاهد و نیترات نیکل از نظر آماری در سطح احتمال یک درصد برای میزان پروتئین محلول اختلاف معنی‌داری وجود داشت؛ ولی در نیترات کادمیوم، نیترات سرب و سولفات مس اختلاف آماری معنی‌دار بین بسترهای مختلف کاشت مشاهده نشد (جدول ۲ و ۳).

LSD در سطح احتمال پنج درصد انجام شد. برای صفاتی که اثر متقابل آن‌ها معنی‌دار گردید، برش‌دهی نیز انجام شد و مقایسه میانگین‌ها با رویه L.S.Means در سطح احتمال پنج درصد انجام گرفت.

## نتایج و بحث

**محتوای پروتئین محلول برگ:** نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های مربوط به میزان پروتئین محلول برگ نشان داد که ترکیبات مختلف بستر کاشت و فلزات سنگین در سطح احتمال یک درصد و برهم‌کنش آن‌ها در سطح

جدول ۲- نتایج جدول تجزیه واریانس تنش فلزات سنگین و ترکیبات مختلف بستر کاشت برای صفات میزان پروتئین محلول برگ، و فعالیت آنزیم‌های پاداکساینده در گیاه لوبیا چیتی

| منابع تغییرات     | درجه آزادی | پروتئین محلول برگ | POX      | PPO     | CAT      | SOD       | عملکرد   |
|-------------------|------------|-------------------|----------|---------|----------|-----------|----------|
| فلزات سنگین       | ۴          | ۱۸۷/۸ **          | ۲/۳۸ **  | ۰/۱۳ ** | ۶۸/۷۰ ** | ۱۰۲/۳۵ ** | ۱/۹۱ *   |
| بستر کاشت         | ۳          | ۱۰۱/۷ **          | ۰/۲۱ n.s | ۰/۳۹ ** | ۹۴/۸۹ ** | ۹۳/۳۹ **  | ۱۰/۹۴ ** |
| فلزات × بستر کاشت | ۱۲         | ۲۴/۴۱ *           | ۰/۲۹ *   | ۰/۰۵ ** | ۴/۹۴ n.s | ۱۷/۲۶ n.s | ۲/۷۹ **  |
| اشتباه آزمایشی    | ۴۰         | ۱۰/۹۵             | ۰/۱۳     | ۰/۰۱    | ۲/۷۶     | ۹/۰۳      | ۰/۴۷     |
| ضریب تغییرات      | %          | ۱۵/۷۹             | ۲۴/۶۲    | ۲۱/۶۸   | ۱۶/۵۱    | ۲۰/۳۳     | ۱۸/۷۳    |

n.s. و \*\* به ترتیب عدم وجود اختلاف معنی‌دار، معنی‌دار در سطوح پنج و یک درصد را نشان می‌دهند.

جدول ۳- تجزیه واریانس برش‌دهی اثر ترکیبات بستر کاشت در انواع مختلف فلزات سنگین برای صفات میزان پروتئین محلول برگ، فعالیت

### آنزیم‌های POX و PPO

| انواع فلزات سنگین | درجه آزادی | پروتئین محلول برگ | POX      | PPO     | عملکرد دانه |
|-------------------|------------|-------------------|----------|---------|-------------|
| شاهد (بدون فلز)   | ۳          | ۹۷/۵ **           | ۰/۱۵ n.s | ۰/۰۴ *  | ۲/۵۴ **     |
| نیترات کادمیوم    | ۳          | ۹/۱۹ n.s          | ۰/۳۷ *   | ۰/۰۵ *  | ۳/۶۶ **     |
| نیترات سرب        | ۳          | ۹/۲۸ n.s          | ۰/۰۴ n.s | ۰/۰۵ *  | ۴/۵۱ **     |
| نیترات نیکل       | ۳          | ۶۳/۹۸ **          | ۰/۳۳ *   | ۰/۳۴ ** | ۲/۰۸ **     |
| سولفات مس         | ۳          | ۱۹/۷۵ n.s         | ۰/۴۷ *   | ۰/۱۰ ** | ۰/۲۹ n.s    |

n.s. و \*\* به ترتیب عدم وجود اختلاف معنی‌دار، معنی‌دار در سطوح پنج و یک درصد را نشان می‌دهند.

صفت مربوط به کاربرد خاکاره با میانگین ( $\mu\text{gmg}^{-1}\text{FW}$ ) (۱۸) مشاهده شد. کاربرد خاکاره با سطح شاهد فاقد اختلاف آماری معنی‌دار بود. در تیمار نیترات نیکل نیز بیشترین میزان پروتئین محلول برگ مربوط به کاربرد ورمی‌کمپوست با میانگین ( $\mu\text{gmg}^{-1}\text{FW}$ ) (۲۴/۶۰) و کمترین

مقایسه میانگین ترکیبات مختلف بستر کاشت در هر نوع از فلزات سنگین برای پروتئین محلول برگ نشان داد که در سطح شاهد (بدون تنش فلزات سنگین) بیشترین میزان پروتئین محلول برگ مربوط به کاربرد ورمی‌کمپوست با میانگین ( $\mu\text{gmg}^{-1}\text{FW}$ ) (۳۰/۹) بود. اما کمترین مقدار این

مقدار این صفت در سطح خاک‌اره با میانگین ( $\mu\text{mg}^{-1}\text{FW}$ ) سنگین به کاربرد ورمی‌کمپوست در بستر کاشت مربوط می‌شد که می‌توان دلیل آن را میزان زیاد فلزات سنگین در این ترکیب نسبت به شاهد یا خاک‌اره و یا افزایش جذب آن توسط ورمی‌کمپوست مربوط دانست (جدول ۱ و ۴).

جدول ۴- مقایسه میانگین اثر ترکیبات مختلف بستر کاشت در هر نوع از فلزات سنگین برای فعالیت آنزیم‌های **POX** و **PPO** در گیاه لوبیا چیتی رقم صدری

| عملکرد دانه<br>(گرم در بوته) | PPO<br>(تغییرات جذب به میکروگرم پروتئین در<br>میلی‌گرم بافت تازه) | POX<br>(تغییرات جذب به میکروگرم پروتئین در<br>میلی‌گرم بافت تازه) | پروتئین محلول برگ<br>(میکروگرم بر میلی<br>گرم وزن تر برگ) | ترکیبات بسترکاشت<br>(پنج درصد وزنی<br>خاک) | فلزات سنگین<br>(میلی‌گرم در کیلوگرم<br>وزن خشک خاک) |
|------------------------------|---|---|---|--|---|
| ۴/۴۷ab                       | ۰/۵۵ a  | ۰/۵۵ a  | ۲۴/۱۰ ab  | شاهد (خاک)                                 |   |
| ۵/۵۶ a                       | ۰/۴۸ a  | ۰/۹۹ a  | ۲۸/۶۳a  | کمپوست                                     | شاهد (بدون فلز)                                     |
| ۳/۴۲b                        | ۰/۳۱ b  | ۱/۰۶ a  | ۳۰/۹۰ a   | ورمی‌کمپوست                                |   |
| ۳/۹۰b                        | ۰/۵۸ a  | ۰/۹۵ a  | ۱۸/۰۰b  | خاک‌اره                                    |   |
| ۴/۳۳                         | ۰/۴۸  | ۰/۸۹  | ۲۵/۴۰   | میانگین                                    |   |
| ۳/۱۵a                        | ۰/۷۱ ab   | ۱/۴۰ ab   | ۱۸/۵۷a  | شاهد (خاک)                                 | نیترا کادمیوم                                       |
| ۱/۵۷b                        | ۰/۵۱ bc   | ۱/۱۰ ab   | ۱۹/۳۶a  | کمپوست                                     |   |
| ۳/۸۸a                        | ۰/۴۷ c  | ۱/۶۸ a  | ۱۵/۶۰ a   | ورمی‌کمپوست                                |   |
| ۱/۸۰b                        | ۰/۷۳ a  | ۰/۸۶ b  | ۱۹/۱۶ a   | خاک‌اره                                    |   |
| ۲/۶۰                         | ۰/۶۰  | ۱/۲۶  | ۱۸/۱۷   | میانگین                                    |   |
| ۵/۶۶a                        | ۰/۳۷ a  | ۱/۳۰ a  | ۲۴/۸۷a  | شاهد (خاک)                                 | نیترا ت سرب   |
| ۳/۶۷b                        | ۰/۴۳a   | ۱/۳۵ a  | ۲۴/۹۷a  | کمپوست                                     |   |
| ۳/۳۰b                        | ۰/۳۵ a  | ۱/۴۱ a  | ۲۶/۰۳ a   | ورمی‌کمپوست                                |   |
| ۵/۵۱a                        | ۰/۶۴ a  | ۱/۵۹ a  | ۲۱/۹۳ a   | خاک‌اره                                    |   |
| ۴/۵۳                         | ۰/۴۵  | ۱/۴۱  | ۲۴/۴۵   | میانگین                                    |   |
| ۳/۴۳ a                       | ۰/۴۰ bc   | ۱/۸۶ ab   | ۲۱/۴۰a  | شاهد (خاک)                                 | نیترا ت نیکل  |
| ۳/۴۲ a                       | ۰/۵۶b   | ۱/۸۸ ab   | ۲۲/۳۶a  | کمپوست                                     |   |
| ۱/۹۶b                        | ۰/۳۲ c  | ۱/۴۸ b  | ۲۴/۶۰ a   | ورمی‌کمپوست                                |   |
| ۲/۰۱b                        | ۱/۰۷ a  | ۲/۲۹ a  | ۱۳/۹۵b  | خاک‌اره                                    |   |
| ۲/۷۰                         | ۰/۵۹  | ۱/۸۸  | ۲۰/۵۷   | میانگین                                    |   |
| ۴/۱۱a                        | ۰/۸۴ ab   | ۱/۷۷ b  | ۱۶/۴۱a  | شاهد (خاک)                                 | سولفات مس   |
| ۴/۶۶a                        | ۰/۵۴ b  | ۱/۸۲ b  | ۱۵/۲۳a  | کمپوست                                     |   |
| ۴/۴۳a                        | ۰/۵۵ b  | ۱/۷۷ b  | ۱۹/۶۰ a   | ورمی‌کمپوست                                |   |
| ۳/۹۷a                        | ۰/۹۰ a  | ۲/۵۶ a  | ۱۳/۵۱ a   | خاک‌اره                                    |   |
| ۴/۲۹                         | ۰/۷۱  | ۱/۹۶  | ۱۶/۱۹   | میانگین                                    |   |

در هر ستون و در هر سطح از فلزات سنگین وجود حداقل یک حرف مشترک نشان‌دهنده‌ی عدم تفاوت آماری معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد بر اساس رویه **L.S.Means** می‌باشد.

برهم کنش ترکیبات مختلف بستر کاشت و فلزات سنگین در سطح احتمال پنج درصد بر میزان فعالیت آنزیم POX از نظر آماری دارای تفاوت معنی‌دار بود (جدول ۲). نتایج برش‌دهی ترکیبات مختلف بستر کاشت برای انواع فلزات سنگین (جدول ۳) نشان داد که بین بسترهای مختلف کاشت مورد بررسی برای آنزیم POX در تیمار نیترا ت سرب و شاهد (بدون کاربرد فلز سنگین) تفاوت معنی‌دار مشاهده نشد و تیمارهای نیترا ت کادمیوم، نیترا ت نیکل و سولفات مس دارای اختلاف آماری معنی‌داری در سطح احتمال پنج درصد بودند.

مقایسه میانگین ترکیبات مختلف بستر کاشت در هر نوع از فلزات سنگین برای فعالیت آنزیم POX نشان داد، در تیمار نیترا ت کادمیوم بیشترین میزان آنزیم POX مربوط به کاربرد ورمی‌کمپوست با میانگین (۱/۶۸) تغییرات جذب به میکروگرم پروتئین در میلی‌گرم بافت تازه) بود که می‌تواند به دلیل هم‌افزایی مقدار کادمیوم موجود در ورمی‌کمپوست در این شرایط و جذب بیشتر کادمیوم در حضور ورمی‌کمپوست باشد. کمترین مقدار آن مربوط به کاربرد خاکاره با میانگین (۰/۸۶) تغییرات جذب به میکروگرم پروتئین در میلی‌گرم بافت تازه) بود که می‌تواند به دلیل جذب کمتر کادمیوم خاک در حضور خاک اره باشد (۱). در تیمار سولفات مس بیشترین میزان آنزیم POX مربوط به کاربرد خاکاره با میانگین (۲/۵۶) تغییرات جذب به میکروگرم پروتئین در میلی‌گرم بافت تازه) بود و با سطح شاهد و سایر ترکیبات دارای اختلاف آماری معنی‌دار داشت، که دلیل آن احتمالاً افزایش جذب مس در حضور خاک اره می‌باشد (۱). در سطح نیترا ت نیکل بیشترین میزان آنزیم POX مربوط به کاربرد خاکاره با میانگین (۲/۲۹) تغییرات جذب به میکروگرم پروتئین در میلی‌گرم بافت تازه) بود و با سطح شاهد تفاوت آماری معنی‌داری نداشت. کمترین مقدار این صفت مربوط به کاربرد ورمی‌کمپوست با میانگین (۱/۴۸) تغییرات جذب به میکروگرم پروتئین در میلی‌گرم بافت تازه) بود و با سطح

در زمان کاربرد نیترا ت نیکل بدلیل جذب بیشتر نیکل توسط ورمی‌کمپوست میزان پروتئین محلول در این تیمار افزایش نشان می‌دهد، در حالی که خاک اره مقدار کمتری نیکل را جذب گیاه می‌کند (۱). نتایج این مطالعه با نتایج تحقیقات Bhardwaj و همکاران (۱۱) در گیاه لویا و مطالعات Irfan و همکاران (۲۳) در گیاه نخود ایرانی مبنی بر کاهش محتوای پروتئین محلول برگ با کاربرد فلز کادمیوم هم‌خوانی دارد. تنش فلزات سنگین با تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن سبب تخریب ساختار پروتئین‌ها و اسید آمینه‌ها می‌شوند، همچنین رادیکال‌های آزاد اکسیژن میل ترکیبی بالایی با پروتئین داشته و سبب اکسید شدن آن‌ها می‌شوند (۲۷). همچنین کاهش میزان پروتئین می‌تواند بدلیل افزایش فعالیت پروتازها باشد که تحت شرایط تنش مقدارشان افزایش می‌یابد و یا ممکن است که عناصر سنگین، القاکننده پراکسیداسیون لیپیدها و تکه تکه شدن پروتئین‌ها باشند که از اثرات سمی نمونه‌هایی از گونه‌های فعال اکسیژن نتیجه شده باشد (۲۶).

مطالعات Lakhdar و همکاران (۲۸) نشان داد با کاربرد کمپوست محتوای پروتئین و ظرفیت روبیسکو در گیاه جو افزایش یافت. مولکول‌های پروتئین به فلز متصل شده و تولید کمپلکس‌های پروتئین - فلز به نام متالوتیونین‌ها را می‌کنند که اثرات سمی ناشی از فلز را خنثی می‌نمایند، همچنین تولید دسته‌ی دیگری از مولکول‌های پروتئینی بنام فیتوکلاتین‌ها تحت اثر غلظت‌های بالای فلزاتی مانند کادمیوم، مس و روی افزایش پیدا می‌کند. این پروتئین‌ها بدلیل داشتن گروه‌های سولفیدریل موجود در ساختمان سیستمین خود قادر هستند کاتیون‌ها را به دام انداخته و در نتیجه سبب کاهش خسارت ناشی از آن باشند (۱۴).

**آنزیم پراکسیداز:** نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که کاربرد ترکیبات مختلف بستر کاشت فاقد اختلاف آماری معنی‌دار برای میزان فعالیت آنزیم POX بود؛ اما تأثیر فلزات سنگین در سطح احتمال یک درصد و

جو نشان دادند که فعالیت آنزیم PPO در بافت‌های برگ و ریشه با افزایش غلظت کادمیوم افزایش می‌یابد و همچنین تحمل به تنش کادمیوم در گیاهان بهتر از تنش اکسایشی توسط آنزیم‌های پاداکساینده حفظ می‌شود، بنابراین چنین استدلال می‌شود که افزایش سطوح آنزیم‌های پاداکساینده تحت تنش یک تأثیر بسیار مهم برای تحمل به تنش در گیاهان حساس می‌باشد و POX باید یک نقش خیلی معنی‌دار را نسبت به CAT در رفع مسمومیت ایجاد شده توسط  $H_2O_2$  ایفا کند. Zhang و همکاران (۳۴) بیان کردند که افزایش در فعالیت آنزیم PPO در شرایط تنش کادمیوم در رابطه با فعال شدن آنزیم POX از دیواره‌های سلولی می‌باشد. نتایج بدست آمده در این تحقیق نشان می‌دهد که بستر کاشت ورمی‌کمپوست با جذب احتمالا بیشتر فلزات سنگین موجب کاهش اثر سمی این فلزات شده در نتیجه میزان فعالیت آنزیم‌های پاداکساینده را بیشتر از سایر ترکیبات کاهش می‌دهد.

**آنزیم کاتالاز:** نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد، که بین ترکیبات مختلف بستر کاشت و فلزات سنگین بر میزان آنزیم CAT در سطح احتمال یک درصد اختلاف آماری معنی‌داری وجود داشت؛ ولی برهمکنش آن‌ها بر صفت فوق فاقد اختلاف آماری معنی‌دار بود (جدول ۲). مقایسه میانگین ترکیبات مختلف بستر کاشت بر میزان فعالیت این آنزیم مشخص کرد که بیشترین میزان فعالیت آنزیم CAT برگ مربوط به کاربرد خاکاره بود که نسبت به شاهد ۲۱/۳۶ درصد افزایش نشان داد و این افزایش معنی‌دار بود. با افزودن کمپوست و ورمی‌کمپوست میزان فعالیت آنزیم CAT کاهش یافت؛ هرچند که این کاهش در کاربرد کمپوست معنی‌دار نبود و همچنین کمترین مقدار آنزیم فوق در سطح ورمی‌کمپوست مشاهده شد (جدول ۵).

شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت (جدول ۴). پراکسیدازها از جمله آنزیم‌هایی به شمار می‌روند که نقش بسیار مهمی را در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی دارند. پراکسیدازها مسئول حذف مقادیر اضافی پراکسید هیدروژن می‌باشند. نیکل سبب افزایش فعالیت آنزیم POX در اندام هوایی و ریشه هر دو رقم Hyola و PF در گیاه کلزا شد (۱۹). Skłodowska و Gajewska (۱۷) افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم POX را در حضور نیکل و کادمیوم در شاخساره گیاه گندم گزارش نمودند و بیشترین مقدار فعالیت این آنزیم را در حضور فلز نیکل مشاهده کردند. در این مطالعه نیز در سطح‌های نیکل و کادمیوم نتایج مشابهی به دست آمد.

**آنزیم پلی‌فنل اکسیداز:** نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد کاربرد ترکیبات مختلف بستر کاشت، فلزات سنگین و برهمکنش آن‌ها بر میزان فعالیت آنزیم PPO در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۲). نتایج برش‌دهی ترکیبات مختلف بستر کاشت برای انواع فلزات سنگین نشان داد، که بین ترکیبات مختلف بستر کاشت برای میزان فعالیت این آنزیم در تیمارهای شاهد، نیترات کادمیوم و نیترات سرب در سطح پنج درصد و تیمارهای نیترات نیکل و سولفات مس در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی‌داری مشاهده شد (جدول ۳).

مقایسه میانگین کاربرد ترکیبات مختلف بستر کاشت در هر نوع از فلزات سنگین برای فعالیت آنزیم PPO نشان داد که در سطح شاهد، نیترات کادمیوم، نیترات نیکل و سولفات مس بیشترین میزان فعالیت آنزیم PPO مربوط به کاربرد خاکاره بود و کمترین مقدار این صفت در کاربرد ورمی‌کمپوست مشاهده شد که در نیترات نیکل و سولفات مس با سطح شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت (جدول ۶).

در این تحقیق در تیمارهای نیترات کادمیوم، نیترات نیکل و سولفات مس میزان فعالیت آنزیم PPO نسبت به شاهد افزایش نشان داد. Metwally و همکاران (۲۹) روی گیاه



جدول ۵- مقایسه میانگین اثر ترکیبات بستر کاشت برای صفات **SOD** و **CAT** در گیاه لوبیا چیتی رقم صدی

| SOD   | CAT     | بستر کاشت   |
|---|---------|-------------|
| (پنج درصد وزنی خاک) (تغییرات جذب به میکروگرم پروتئین در میلی‌گرم بافت تازه) |         |             |
| ۱۵/۶۶ ab  | ۱۰/۶۷ b | شاهد (خاک)  |
| ۱۴/۳۳ b   | ۹/۸۰۳ b | کمپوست      |
| ۱۱/۶۰ c   | ۶/۸۷ c  | ورمی‌کمپوست |
| ۱۷/۵۳ a   | ۱۲/۹۵ a | خاک‌اره     |

در هر ستون وجود حداقل یک حرف مشترک نشان‌دهنده‌ی عدم تفاوت آماری معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد بر اساس آزمون **LSD** می‌باشد.

ورمی‌کمپوست با جذب احتمالا بیشتر فلزات سنگین موجب کاهش اثر سمی این فلزات شده در نتیجه میزان فعالیت کاتالاز را بیشتر از سایر ترکیبات کاهش می‌دهد. بطور کلی با اضافه کردن هر کدام از فلزات سنگین، میزان فعالیت آنزیم **CAT** برگ افزایش یافت. بیشترین میزان فعالیت آنزیم **CAT** برگ در سطح سولفات مس مشاهده شد و نسبت به شاهد ۸۰/۵۰ درصد افزایش نشان داد، همچنین کمترین مقدار این صفت در سطح شاهد بود. پس از سولفات مس، در نیترات نیکل بیشترین میزان فعالیت آنزیم **CAT** مشاهده شد و نسبت به شاهد ۴۲/۳۲ درصد افزایش نشان داد. تیمارهای نیترات کادمیوم، نیترات نیکل و سولفات مس نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری در این صفت ایجاد نمودند؛ اما نیترات سرب فاقد اختلاف آماری معنی‌دار با شاهد بود (جدول ۶).

جدول ۶- مقایسه میانگین اثر فلزات سنگین برای صفات **SOD** و **CAT** در گیاه لوبیا چیتی رقم صدی

| SOD   | CAT     | فلزات سنگین     |
|---|---------|-----------------|
| (میلی‌گرم در کیلوگرم خاک) (تغییرات جذب به میکروگرم پروتئین در میلی‌گرم بافت تازه) |         |                 |
| ۱۱/۹۱ c   | ۷/۴۹ c  | شاهد (بدون فلز) |
| ۱۶/۰۰ b   | ۱۰/۵۶ b | نیترات کادمیوم  |
| ۱۱/۷۵c  | ۸/۱۳ c  | نیترات سرب      |
| ۱۵/۶۶b  | ۱۰/۶۶ b | نیترات نیکل     |
| ۱۸/۵۸a  | ۱۳/۵۲a  | سولفات مس       |

در هر ستون وجود حداقل یک حرف مشترک نشان‌دهنده‌ی عدم تفاوت آماری معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد بر اساس آزمون **LSD** می‌باشد.

ایرانبخش و همکاران (۲) گزارش دادند فعالیت آنزیم **CAT** در گیاه سویا تحت تیمار کلرید سرب با افزایش غلظت این فلز از ۰/۵ به ۶/۵ میلی‌مولار افزایش نشان داد. فعالیت آنزیم **CAT** با افزایش شدت و مدت تنش سرب در هر دو گونه گیاه نخود رسمی و هورسگرام افزایش یافت (۳۱). در این مطالعه نیز مقدار این آنزیم تحت تنش سرب هرچند که فاقد اختلاف آماری معنی‌دار بود، با این وجود بیشتر از شاهد بود. فلز سنگین نیکل سبب افزایش فعالیت آنزیم **CAT** در اندام هوایی و ریشه هر دو رقم

هایولا و پی‌اف در گیاه کلزا گردید (۱۹). در مطالعه‌ای دیگر پوراکبر و ابراهیم‌زاده (۴) در گیاه ذرت تیمار شده با سولفات مس افزایش فعالیت آنزیم **CAT** را هم در اندام هوایی و هم در ریشه ذرت گزارش نمودند که نتیجه‌ی آزمایش حاضر را تأیید می‌کند.

آنزیم سوپراکسید دیسموتاز: با توجه به نتایج تجزیه واریانس داده‌ها ترکیبات مختلف بستر کاشت و فلزات سنگین برای میزان آنزیم **SOD** در سطح احتمال یک

(۳۵) بر گیاهان ماش علوفه‌ای و ماش سبز تحت تنش کادمیوم افزایش فعالیت SOD آپوپلاستی و سیمپلاستی را در برگ‌های هر دو گونه نشان دادند. Howladar (۲۲) در گیاه لوبیا افزایش فعالیت آنزیم SOD را در حضور کلرید کادمیوم گزارش نمود، در این مطالعه نیز نتایج مشابهی به دست آمد. Reddy و همکاران (۳۱) در گیاه نخود تحت تنش سرب افزایش فعالیت SOD را گزارش دادند. هرچند که در مطالعه حاضر در تیمار سرب میزان این آنزیم کاهش یافت؛ ولی این کاهش با شاهد فاقد تفاوت آماری معنی‌دار بود. افزایش ظرفیت آنزیم‌های پاداکساینده یک پاسخ عمومی به مقادیر سمی فلزات سنگین می‌باشد (۳۳). آنزیم‌های پاداکساینده مهم‌ترین ترکیبات در جلوگیری از تنش اکسایشی در گیاهان می‌باشند. موضوع فوق بر اساس این واقعیت استوار است که عموماً فعالیت یک یا چند مورد از این آنزیم‌ها در گیاهان تحت تنش افزایش می‌یابد (۸). از آنجایی که ورمی‌کمپوست به عنوان یک کود آلی سرشار از عناصر ماکرو و میکرو است می‌تواند نقش مثبتی را در تعدیل اثرات فلزات سنگین ایفا کند، بنابراین منجر به کاهش مقدار فعالیت آنزیم SOD می‌شود. بنظر می‌رسد که فعال شدن آنزیم‌های SOD و CAT در پاسخ به اثرات مخرب اکسیژن‌های تولید شده از فلزات سنگین در این گونه گیاهی بوده است.

**عملکرد (وزن دانه در بوته):** نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد ترکیبات آلی خاک بر صفت وزن دانه در بوته در سطح احتمال پنج درصد، فلزات سنگین و برهمکنش ترکیبات آلی خاک و فلزات سنگین بر این صفت در سطح احتمال یک درصد از نظر آماری دارای اختلاف معنی‌دار بود (جدول ۲). نتایج برش‌دهی ترکیبات آلی خاک نشان داد در سطح‌های شاهد، نیترات کادمیوم، نیترات سرب و نیترات نیکل صفت وزن دانه در بوته در سطح احتمال یک درصد دارای اختلاف آماری معنی‌دار بود؛ ولی در سطح

درصد اختلاف آماری معنی‌داری داشتند؛ ولی برهمکنش آن‌ها بر این آنزیم فاقد اختلاف آماری معنی‌دار بود (جدول ۲). مقایسه میانگین ترکیبات مختلف بستر کاشت بر میزان فعالیت آنزیم SOD نشان داد که بیشترین میزان فعالیت آنزیم SOD مربوط به کاربرد خاک‌اره بود که نسبت به شاهد ۱۱/۹۴ درصد افزایش نشان داد و این افزایش فاقد تفاوت آماری معنی‌دار بود. کمترین مقدار این صفت مربوط به کاربرد ورمی‌کمپوست بود که نسبت به سطح شاهد ۲۵/۹۳ درصد کاهش معنی‌داری از نظر آماری نشان داد؛ اما افزودن کمپوست نیز این مقدار را کاهش داد؛ هرچند که این کاهش معنی‌دار نبود (جدول ۵). مقایسه میانگین فلزات سنگین بر میزان فعالیت آنزیم SOD نشان داد که بیشترین میزان آن در سطح سولفات مس با ۵۶ درصد افزایش نسبت به سطح شاهد احتمالاً به دلیل تأثیر سمی سولفات مس بر فرایندهای متابولیکی گیاه از جمله تمایل زیاد به گروه‌های سولفیدریل است که می‌توانند فعالیت آنزیم‌ها را از طریق تأثیر بر ساختمان سوم پروتئین‌ها تغییر دهند، و کمترین مقدار این صفت در سطح نیترات سرب (احتمالاً به دلیل جذب کمتر توسط گیاه) مشاهده شد که نسبت به سطح شاهد فاقد اختلاف معنی‌دار بود. سطح‌های نیترات کادمیوم، نیترات نیکل و سولفات مس نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری در این صفت ایجاد نمودند (جدول ۶).

مشخص شده است که سوپراکسید دیسموتاز اولین خط دفاعی در بافت‌های گیاهان برای مقابله با رادیکال سوپراکسید ( $O_2^-$ ) است، این آنزیم تبدیل سوپراکسید به پراکسید هیدروژن را کاتالیز می‌کند که به نوبه‌ی خود توسط آنزیم پراکسیداز به آب تبدیل می‌شود. کاتالاز آنزیمی است که پراکسید هیدروژن را با تبدیل آن به آب و در نهایت به اکسیژن سم‌زدایی می‌کند، بعلاوه آنزیم پراکسیداز، پراکسید هیدروژن را با استفاده از چندین احیاکننده از قبیل آسکوربات، گایاکول و ترکیبات فنولیک کاهش می‌دهد (۳۵). نتایج آزمایشات Zhang و همکاران

سرب احتمالاً بدلیل جذب کمتر سرب توسط گیاه و کمترین مقدار این صفت در سطح نیترات کادمیوم بدلیل اثر سمی زیاد کادمیوم و حساسیت گیاه به آن مشاهده شد.

Irfan و همکاران (۲۳) گزارش نمودند که کادمیوم عملکرد گیاهان یونجه، ذرت و نخود ایرانی را کاهش داد که با نتایج این مطالعه مطابقت دارد. Giller و همکاران (۲۱) به عدم کارایی ریزوبیوم همزیست با شبدر از نظر تثبیت نیتروژن در خاک آلوده به فلزات سنگین اشاره کردند و نشان دادند که این امر سبب کاهش عملکرد ماده‌ی خشک شبدر سفید به میزان ۴۰٪ شد. Courtney و Mullen (۱۵) در مطالعه خود روی تأثیر کاربرد دو نوع کمپوست بر رشد گیاه جو نشان دادند که عملکرد دانه به‌طور معنی‌داری افزایش یافت و این موضوع با نتایج مطالعه‌ی حاضر در سطح‌های شاهد و سولفات مس مطابقت دارد؛ هرچند که در این سطح‌ها تفاوت با شاهد فاقد اختلاف آماری معنی‌داری بود که احتمالاً به دلیل جذب بیشتر مس توسط کمپوست و اثرات تغذیه‌ای کمپوست در شرایط بدون تنش می‌باشد. Ahlawat و Jat (۲۵) گزارش نمودند با مصرف سه تن در هکتار ورمی‌کمپوست عملکرد بیولوژیک در گیاه نخود در مقایسه با شاهد به‌طور چشم‌گیری افزایش یافت که با نتایج این مطالعه در سطح‌های نیترات کادمیوم و سولفات مس هماهنگی دارد؛ هرچند که در این سطح‌ها اختلاف آماری معنی‌داری نبود. غلظت‌های بالای مس قادر به تأثیر بر واکنش‌های فتوسیستم II و در نهایت موجب کاهش انرژی گرمایی و کاهش کارایی واکنش‌های فتوسنتزی می‌شود و در نهایت موجب کاهش تولید کربوهیدرات‌ها و انتقال آن به دانه می‌گردد.

**نتیجه‌گیری کلی:** نتایج این تحقیق نشان داد که در گیاه لوبیا چیتی رقم صدری در حضور فلزات سنگین فعالیت آنزیم‌های پاداکساینده CAT، POX، PPO و SOD به عنوان یک خط دفاعی در برابر این عناصر افزایش یافت.

سولفات مس اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۳).

نتایج مقایسه میانگین ترکیبات آلی خاک در هر نوع از فلزات سنگین بر صفت وزن دانه در بوته نشان داد در سطح شاهد (بدون تنش فلزات سنگین) بیشترین میزان وزن دانه در بوته مربوط به کاربرد کمپوست با میانگین ۵/۵۶ گرم بود که با سطح عدم کاربرد ترکیبات آلی اختلاف آماری معنی‌داری نداشت. کمترین وزن دانه در بوته مربوط به کاربرد ورمی‌کمپوست با میانگین ۳/۴۲ گرم بود و با سطح عدم کاربرد ترکیبات آلی اختلاف آماری معنی‌داری نداشت (جدول ۴). در سطح نیترات کادمیوم، بیشترین میزان وزن دانه در بوته مربوط به کاربرد ورمی‌کمپوست با میانگین ۳/۸۸ گرم بود که با سطح شاهد از نظر آماری اختلاف معنی‌داری نداشت، کمترین مقدار این صفت در کاربرد کمپوست با میانگین ۱/۵۷ گرم مشاهده شد و با سطح شاهد دارای اختلاف آماری معنی‌داری بود (جدول ۴). در شرایط نیترات سرب، نیز بیشترین میزان وزن دانه در بوته مربوط به سطح عدم کاربرد ترکیبات آلی با میانگین ۵/۶۶ گرم بود، کمترین مقدار این صفت در استفاده از ورمی‌کمپوست با میانگین ۳/۳۰ گرم مشاهده شد و با سطح عدم کاربرد ترکیبات آلی از نظر آماری دارای اختلاف معنی‌داری بود (جدول ۴). در شرایط نیترات نیکل، بیشترین میزان وزن دانه در بوته مربوط به عدم کاربرد ترکیبات آلی با میانگین ۳/۴۳ گرم بود، کمترین مقدار این صفت مربوط به کاربرد ورمی‌کمپوست با میانگین ۱/۹۶ گرم بود و با سطح عدم کاربرد ترکیبات آلی اختلاف آماری معنی‌داری نداشت. نتایج بدست آمده در این تحقیق نشان می‌دهد که کاربرد سولفات مس بر میزان وزن دانه در بوته فاقد اختلاف آماری معنی‌داری بود (جدول ۴). بطور کلی تمام سطح‌های فلزات سنگین به غیر از سطح نیترات سرب وزن دانه در بوته را نسبت به سطح شاهد (بدون فلزات سنگین) کاهش دادند. بیشترین میزان وزن دانه در بوته در سطح نیترات

محافظت پاداکساینده مانند کاروتنوئید، فنل و آنتوسیانین‌ها ضروری به نظر می‌رسد.

### سپاسگزاری

بدین وسیله نویسندگان مقاله از مشاوره آقای دکتر محسن موحدی دهنوی و معاونت محترم پژوهشی دانشگاه یاسوج جهت حمایت مالی انجام این طرح که بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد خانم فاطمه امینی بود، کمال تشکر را دارد.

کاربرد کمپوست و ورمی‌کمپوست منجر به کاهش فعالیت آنزیم‌های CAT و SOD شدند؛ ولی با کاربرد خاکاره فعالیت این دو آنزیم افزایش یافت. بنظر می‌رسد که کاربرد کمپوست و ورمی‌کمپوست بعنوان یک کود آلی سرشار از عناصر ماکرو و میکرو است می‌تواند نقش مثبتی را در تعدیل اثرات فلزات سنگین ایفا کند و با کاهش اثرات سمی فلزات سنگین منجر به کاهش فعالیت آنزیم‌های پاداکساینده شود. اما در فلزات سنگین مختلف، ترکیب‌های آلی مختلفی منجر به بهبود وزن دانه در بوته شدند. جهت تکمیل نتایج آنزیمی بررسی مولکول‌های موثر در سیستم

### منابع

- ۱- امینی، ف. ۱۳۹۳. تاثیر کمپوست، ورمی کمپوست و خاک اره سپیدار بر رشد و خصوصیات فیزیولوژیکی لوبیا چیتی رقم صدری تحت تنش فلزات سنگین. پایان‌نامه کارشناسی ارشد زراعت. دانشگاه یاسوج.
- ۲- ایرانبخش، ع. مجد، ا. و نقوی، ف. ۱۳۸۹. بررسی تأثیر کلرید روی و کلرید سرب بر جوانه‌زنی و رشد دانه‌رست‌های سویا (*Glycine max L.*). فصلنامه پژوهش‌های علوم گیاهی، ۴: ۶۳-۷۳.
- ۳- بیضایی، ا. ح. دری، ع. ا. قنبری، ح. غفاری خلیق، ع. رحمانی قبادی، م. طاهری مازندرانی، ن. ۱۳۹۱. صدری رقم جدید لوبیا چیتی دانه درشت برای کاشت در مناطق معتدل سرد ایران. مجله به‌نژادی نهال و بذر، ۲۸ (۲): ۳۳۷-۳۳۵.
- ۴- پوراکبر، ل. و ابراهیم‌زاده، ن. ۱۳۹۲. اثر نیکل و مس بر بیومس، محتوای رنگیزه‌ای و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در ریشه‌ها و and plant growth. *Bioresource Technol.* 78: 11-20.
- ۵- قلیچ، س. زرین کمر، ف. و نیکنام، و. ۱۳۹۴. بررسی میزان انباشتگی سرب و تاثیر آن بر فعالیت آنزیم پراکسیداز، محتوای ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی در مرحله جوانه زنی در گیاه یونجه (*Medicago sativa L.*). مجله پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست‌شناسی ایران)، ۲۸ (۱): ۱۷۴-۱۶۴.
- ۶- کافی، م. ا. برزویی، م. صالحی، ع. معصومی و ج. نباتی. ۱۳۸۸. فیزیولوژی تنش‌های محیطی در گیاهان. انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد. ۵۰۲ صفحه.
- ۷- کرامت، ب. دریایی، ف. و آروین، م. ج. ۱۳۹۳. اثر متقابل سلنیوم و کادمیوم بر محتوای آلدئیدها، پراکسیدهایروژن و فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاهچه گندم رقم کویر. مجله پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست‌شناسی ایران)، ۲۷ (۳): ۴۹۰-۵۰۰.
- 8- Allen RD (1995) Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. *J. Plant Physiol.* 107: 1049-1054.
- 9- Angelova V, Ivanova R, Pevicharova G, Ivanov K (2010) Effect of organic amendments on heavy metals uptake by potato plants. *World Congress of Soil Science, Soil Solutions for a Changing World, 1-6 August (2010) Brisbane, Australia.* 84-87.
- 10- Atiyeh RM, Edwards CA, Subler S, Metzger JD (2001) Pig manure vermicompost as a component of a horticultural bedding plant medium: effects on physiochemical properties
- 11- Bhardwaj P, Chaturvedi AK, Prasad P (2009) Effect of Enhanced Lead and Cadmium in soil on Physiological and Biochemical attributes of *Phaseolus vulgaris L.* *J. Nature and Scie.* 7(8): 63-66.
- 12- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *J. Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- 13- Cakmak I, Horst W (1991) Effect of aluminum on lipid peroxidation, superoxide dismutase,

- catalase and peroxidase activities in root tip of soybean. *J. Plant Physiol.* 83: 463-468.
- 14- Cobbett CS (2000) Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification. *J. Plant Physiol.* 123: 825-832.
  - 15- Courtney RG, Mullen GJ (2008) Soil quality and barley growth as influenced by the land application of two compost types. *Bioresource Technol.* 99: 2913-2918.
  - 16- Davey MW, Stals E, Panis B, Keulemans J, Swennen RL (2005) High throughput determination of malondialdehyde in plant tissues. *Analytical Biochem.* 374: 201-207.
  - 17- Gajewska E, Sklodowska M (2010) Differential effect of equal copper, cadmium and nickel concentration on biochemical reactions in wheat seedlings. *J. Ecotoxic & Environ Safety.* 73: 996-1003.
  - 18- Ghanati F, Morita A, Yokota H (2002) Induction of suberin and increase of lignin content by excess Boron in Tobacco cell. *J. Soil Sci.* 48: 357-364.
  - 19- Ghorbanli M, Hajihosseini R, Hzarkhany S, Shyrdem R (2005) Effect of nickel on germination percentage and proline metabolism and activity of peroxidase and catalase enzymes in two varieties rapeseed (*Brassica napus* L.). *J. Environ. Sci. and Technol.* 27: 48-36.
  - 20- Gianni-politis C, Ries S (1997) Super oxididesmutas occurrence in higher plant. *J. Plant Physiol.* 59: 304-314.
  - 21- Giller KE, Mc Grath SP, Hirsch PR (1989) Absence of nitrogen fixation in clover grown on soil subject to long-term contamination with heavy metals is due to survival of only ineffective *Rhizobium*. *Soil Biol. and Biochem.* 21: 841-848.
  - 22- Howladar SM (2014) A novel *Moringa oleifera* leaf extract can mitigate the stress effects of salinity and cadmium in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants. *J. Ecotoxic & Environ Safety.* 100: 69-75.
  - 23- Irfan M, Hayat Sh, Ahmad A, Alyemeni MN (2013) Soil cadmium enrichment: Allocation and plant physiological manifestations. *Saudi J. Biol. Sci.* 20: 1-10.
  - 24- Jadia CD, Fulekar MH (2008) Phytoremediation: The application of vermin-compost to remove zinc, cadmium, copper, nickel and lead by sunflower plant. *J. Environ. Engin & Manage.* 7(5): 547-558.
  - 25- Jat RS and Ahlawat IPS (2006) Direct and residual effect of vermicompost, biofertilizers and phosphorus on soil nutrient dynamics and productivity of chickpea-fodder maize sequence. *Sustainable Agriculture.* 28: 41-54.
  - 26- John R, Ahmad P, Gadgil K, Sharma S (2009) Heavy metal toxicity: effect on plant growth, biochemical parameters and metal accumulation by *Brassica juncea* L. *J. Plant. Produc.* 3: 65-76.
  - 27- Khudsar T, Mahmood-uzzafar M, Iqbal M (2001) Cadmium induced changes in leaf epidermis, photosynthetic rate and pigment concentrations in *Cajanus cajan*. *J. Biologia. Planta.* 44(1): 59-64.
  - 28- Lakhdar A, Hafsi C, Rabhi M, Debez A, Montemurro F, Abdelly C, Jedidi N, Ouerghi Z (2008) Application of municipal solid waste compost reduces the negative effects of saline water in *Hordeum maritimum* L. *J. Bioresource. Technol.* 99: 7160-7167.
  - 29- Metwally A, Finkemeier I, Georgi M, Dietz M (2003) Salicylic acid alleviates the cadmium toxicity in barley seedlings. *J. Plant Physiol.* 132: 272-281.
  - 30- Perminova IV, Hatfield K (2005) Remediation chemistry of humic substances; theory and implication for technology In Use of Humic Substances to Remediate Polluted Environments:. Springer Netherlands. 3-36p.
  - 31- Reddy AM, Kumar SG, Jyothsnakumari G, Thimmnanik S, Sudhakar C (2005) Lead induced changes in antioxidant metabolism of horsegram (*Macrotyloma uniflorum* (Lam) Vdrdc.) and bengalgram (*Cicer arietinum* L.). *J. Chem.* 60(1): 97- 104.
  - 32- Sharma SS, Kaul S, Metwally A, Goyal KC, Finkemeier I, Dietz KJ (2004) Cadmium toxicity in barely (*Hordeum vulgare*) as affected by varying Fe nutritional status. *Plant Science.* 166: 1287- 1295.
  - 33- Van-assche F, Cardinales H, Clijsters J (1988) Induction of enzyme capacity in plants as a result of heavy metal toxicity: Dose response relations in *Phaseolus vulgaris* L. treated with zinc and cadmium. *J. Environ Pollut.* 52: 103-115.
  - 34- Zhang F, Wang Y, Dong J (2007) Effect of heavy metal stress on ant oxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of two mangrove plant seedlings. *J. Chem.* 67: 44-50.
  - 35- Zhang F, Zhang H, Wang G, Xu L, Shen Z (2009) Cadmium-induced accumulation of

hydrogen peroxide in the leaf apoplast of *Phaseolus aureus* and *Vicia sativa* and the roles

of different antioxidant enzymes. J. Hazardous Materials. 168: 76-84.

## **The effect of heavy metals and different combination of planting beds on antioxidant enzymes and yield pinto bean (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Sadri)**

**Amini F. and Balouchi H.R.**

**Agronomy and Plant Breeding Dept., Yasouj University, Yasouj, I.R. of Iran**

### **Abstract**

In order to investigate of heavy metal effect on antioxidant enzymes in pinto bean (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Sadri) under different combination of planting beds, a greenhouse experiment was conducted as a factorial based on CRD design with three replications in Yasouj University, 2013. The first factor included of five levels of heavy metals (control, Cd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, Ni(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> and CuSO<sub>4</sub> with 50 mg kg<sup>-1</sup> soil concentration) and the second factor included of four levels of different combination of planting bed (control, compost, vermicompost and sawdust). Results showed that maximum enzymes catalase and superoxide dismutase activity were related to the application of Sawdust that compared to control respectively 21.36 and 11.94% increased; But with the addition of compost and vermicompost these two enzymes activity decreased. All levels of heavy metals increased the peroxidase activity: but soluble protein content decreased and the polyphenol oxidase activity reduced in levels of lead nitrate. Heavy metals reduced seed weight compared to control (without heavy metals) except Pb nitrate. Most of the seed weight at the level of Pb nitrate and cadmium nitrate were the lowest. In general, the use of compost and vermicompost as organic fertilizers rich in macro and micro elements could play a positive role in modulating the effects of heavy metals and to reduce the toxic effects of heavy metals leads to a reduction in the activity of antioxidant enzymes.

**Key words:** Pinto bean (*Phaseolus vulgaris* L.), Heavy metals, Planting bed, Antioxidant enzymes