

بررسی میزان انباشتگی سرب و تأثیر آن بر فعالیت آنزیم پراکسیداز، محتوای ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی در مرحله جوانه‌زنی در گیاه یونجه (*Medicago sativa* L.)

سیما قلیچ^۱، فاطمه زرین کمر^{۱*} و وحید نیکنام^۲

^۱ تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی، گروه علوم گیاهی

^۲ تهران، دانشگاه تهران، پردیس علوم، دانشکده زیست‌شناسی

تاریخ پذیرش: ۹۲/۳/۱۱

تاریخ دریافت: ۹۱/۹/۸

چکیده

براساس داده‌های آژانس حفاظت محیط‌زیست، سرب مهم‌ترین فلز آلاینده محیط می‌باشد. در این تحقیق تأثیر فلز سرب بر گیاه یونجه در مرحله جوانه‌زنی مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور دانه‌رست‌های ۷ روزه یونجه در محیط هیدروپونیک تحت تیمار غلظت‌های ۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۴۰۰، ۱۲۰۰۰ و ۵۰۰۰ میکرومولار سرب قرار گرفتند و پس از ۱۰ روز بررسی‌های ریخت‌شناختی و فیزیولوژیک بر روی آنها انجام شد. براساس نتایج میزان جذب سرب در اندام هوایی و ریشه‌ها با افزایش غلظت سرب در محیط افزایش یافت و در نتیجه میزان رشد گیاه با افزایش میزان جذب سرب کاهش یافت. میزان تولید پراکسید هیدروژن و مالون دی‌آلدئید به‌عنوان شاخص‌های تنش اکسیداتیو افزایش یافت. تحت تنش سرب میزان تولید فلاونوئیدها و فعالیت آنزیم پراکسیداز در اندام هوایی و ریشه‌ها افزایش یافت و میزان ترکیبات فنولی در ریشه‌ها کاهش و در اندام هوایی افزایش نشان داد.

واژه‌های کلیدی: پراکسیداز، ترکیبات فنولی، سرب، فلاونوئید، یونجه

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱-۸۲۸۸۴۴۴۰، پست الکترونیکی: Zarinkamar@modares.ac.ir

مقدمه

اجزای سلول از قبیل غشاها، پروتئین‌ها و DNA شود (۲۳). گیاهان برای حذف یا کاهش انواع فعال اکسیژن از سیستم های آنتی اکسیدان آنزیمی و غیر آنزیمی استفاده می‌کنند. از میان آنتی اکسیدانهای غیر آنزیمی مشخص شده که ترکیبات فلاونوئیدی دارای خواص آنتی اکسیدانی قوی می‌باشند (۲۱، ۲۴ و ۲۶). همچنین مشخص شده است که فلاونوئیدها به‌عنوان ترکیبات کلاته‌کننده فلزات، نقش مهمی در ایجاد تحمل نسبت به تنش فلزات سنگین در گیاهان به عهده دارند (۲۰). از میان آنزیم های آنتی اکسیدان نیز آنزیم پراکسیداز نقش مهمی در از بین بردن رادیکال های آزاد اکسیژن به‌ویژه پراکسید هیدروژن دارد. مشخص شده است که حضور فلزاتی از قبیل مس، آلومینیوم و کادمیم سبب افزایش فعالیت این آنزیم می‌گردد

آلودگی فلزات سنگین در نتیجه فعالیت‌های گسترده صنعتی و کشاورزی یکی از مهم‌ترین مشکلات بوم‌شناختی در مقیاس جهانی است (۱۴). براساس داده های آژانس حفاظت محیط زیست، سرب مهم‌ترین فلز آلاینده محیط می‌باشد. آلودگی سرب در محیط زیست باعث اثراتی از قبیل مهار جوانه‌زنی دانه، اختلال در میتوز، مهار رشد جوانه و ریشه، کاهش فتوسنتز و تنفس، اختلال در توزیع مواد غذایی، بر هم زدن تعادل آب، تغییر در تعادل هورمونی گیاه، تغییر در قابلیت نفوذپذیری غشا و مهار یا فعال سازی فعالیت‌های آنزیمی می‌شود (۱۴، ۱۵، ۲۵). فلزات سنگین از طریق واکنش فتون اقدام به تولید انواع فعال اکسیژن می‌کنند (۱۰). تجمع انواع فعال اکسیژن منجر به تنش اکسیداتیو می‌گردد که می‌تواند باعث آسیب به

غلظت‌های ۰، ۱۲۰، ۲۴۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار سرب قرار گرفتند. برای بررسی اثر سرب بر جوانه‌زنی این بذرها تعدادی از پتری‌های حاوی بذر با غلظت‌های ۱۲۰، ۲۴۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار سرب تحت تیمار قرار گرفتند و درصد جوانه‌زنی آنها بعد از ۳ و ۷ روز محاسبه گردید.

اندازه‌گیری وزن خشک اندام هوایی و ریشه: پس از خارج کردن گیاهان از محلول هوگلند و شستشوی ریشه‌ها، اندام هوایی از محل یقه از ریشه‌ها جدا شد. سپس نمونه‌ها در انکوباتور در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد به مدت ۷۲ ساعت خشک شدند و وزن خشک آنها اندازه‌گیری شد.

آماده‌سازی نمونه‌ها برای هضم اسیدی و استخراج سرب از گیاه: نمونه‌های خشک شده اندام هوایی و ریشه توسط نیتروژن مایع در هاون کوبیده و به پودر تبدیل شدند.

۰/۱ گرم از پودر تهیه شده از اندام هوایی ریشه برای انجام فرایند هضم اسیدی توزین شد. در این تحقیق از روش اکسیداسیون تر برای استخراج سرب از گیاه استفاده شد. بدین منظور آمیزه نیتریک اسید، پرکلریک اسید و سولفوریک اسید با نسبت حجمی ۴:۴:۱ بکار برده شد (۱۳).

اندازه‌گیری میزان سرب در نمونه‌های گیاهی: نمونه‌های گیاهی و محلولهای استاندارد به‌منظور اندازه‌گیری میزان سرب موجود در آنها توسط دستگاه جذب اتمی SHIMADZU مدل AA-6709 آنالیز شدند.

(۵، ۸، ۲۷). مطالعات نشان داده که گونه *Medicago sativa* L. قادر به تحمل فلزات سنگین و رشد در خاکهای آلوده است. این گونه دارای بیومس زیاد جوانه و ریشه می‌باشد (۲۸) و گزارشها حکایت از تجمع مقادیر بالای فلزات سنگینی از جمله روی، سرب، نیکل، کروم، کادمیم، مس و نقره در بافت‌های این گیاه دارد (۲۸، ۲۲، ۱۲، ۱۱، ۴). بنابراین هدف مطالعه حاضر بررسی میزان انباشتگی سرب و تأثیر آن بر برخی سازوکارهای فیزیولوژیک دخیل در تحمل تنش فلز سرب در گیاه یونجه در مرحله جوانه‌زنی می‌باشد.

مواد و روشها

آماده‌سازی بذرها، کشت گیاه و اعمال تیمار سرب: بذرهای گیاه یونجه (*Medicago sativa* L. cv. Hamedani) از مؤسسه تهیه و اصلاح نهال و بذر کرج تهیه شد. برای آماده‌سازی ابتدا بذرها با شوینده‌های معمولی به خوبی شسته شدند و پس از آبکشی به مدت ۲۰ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۲۰ درصد (دارای ۵ درصد کلر فعال) ضد عفونی سطحی شدند. پس از ۳ بار آبکشی با آب مقطر در ظروف پتری حاوی کاغذ صافی مرطوب در شرایط تاریکی برای جوانه‌زنی قرار داده شدند. پس از جوانه‌زنی دانه‌رست‌های ۵ روزه یکدست و همسان به محیط هوگلند ۱/۲ منتقل شدند و pH محلول غذایی روی ۶/۵ تنظیم شد. سپس نمونه‌ها در اتاق رشد با دمای شب 2 ± 18 و دمای روز 2 ± 22 ، نور ۱۶ ساعت و تاریکی ۸ ساعت و رطوبت ۷۰-۶۵ درصد قرار داده شدند. دانه‌رست‌های ۷ روزه، به مدت ۱۰ روز تحت تیمار با

محاسبه Bioconcentration Factor (BCF) و Transfer Factor (TF):

$$BCF = \frac{\text{غلظت فلز در ریشه}}{\text{غلظت فلز در محیط}}$$

$$TF = \frac{\text{غلظت فلز در اندام هوایی}}{\text{غلظت فلز در محیط رشد}}$$

مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفوژ شد. از بخش رویی برای اندازه‌گیری فعالیت پراکسیداز استفاده گردید. ترکیب واکنش در حجم نهایی ۳ میلی لیتر شامل مواد زیر بود (۱۸):

بافر Na-Phosphate ۶۰ میلی مولار با $\text{pH}=6/1$ ، محلول گایاکول ۲۸ میلی مولار، محلول پراکسید هیدروژن ۵ میلی مولار و عصاره آنزیمی به مقدار مناسب.

فعالیت آنزیم به صورت تغییر در جذب در ۴۷۰ نانومتر بعد از یک دقیقه نسبت به میلی‌گرم پروتئین محاسبه گردید. میزان پروتئین طبق روش برادفورد و با استفاده از BSA (آلبومین سرم گاوی) به‌عنوان استاندارد تعیین شد.

استخراج و سنجش میزان پراکسید هیدروژن (H_2O_2):

نمونه‌های منجمد ریشه و اندام هوایی به میزان ۰/۱ گرم در ۲ میلی لیتر TCA (Trichloroacetic acid) ۰/۱٪ عصاره‌گیری شدند. سوسپانسیون حاصل در $12000 \times \text{g}$ ، به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفوژ شد. سپس به ۰/۵ میلی لیتر از محلول رویی، ۰/۵ میلی لیتر بافر K-Phosphate ۱۰ میلی مولار با $\text{pH}=7$ و ۱ میلی لیتر محلول KI یک مولار اضافه شد. مخلوط واکنش را به مدت ۱ ساعت در تاریکی در دمای اتاق قرار داده و بعد جذب آنها در طول موج ۳۹۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مدل UV2100 خوانده شد. میزان پراکسید هیدروژن با توجه به منحنی استاندارد غلظت‌های مختلف پراکسید هیدروژن محاسبه گردید (۳).

تعیین میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشا: این آزمایش بر اساس روش (۹) با استفاده از اندازه‌گیری مالون‌دی‌آلدئید (MDA)، به عنوان فرآورده نهایی پراکسیداسیون لیپید غشا انجام شد. نمونه‌های منجمد شده به میزان ۰/۵ گرم در ۳ میلی لیتر TCA (Trichloroacetic acid) ۱۰٪ عصاره‌گیری شدند. سپس به یک میلی لیتر از سوسپانسیون صاف شده ۱ میلی لیتر TBA (Thiobarbituric acid) ۰/۵٪ به هر کدام از نمونه‌ها اضافه شد و در حمام آب گرم 100°C به مدت

استخراج و سنجش محتوای فلاونوئید کل: نمونه‌های منجمد شده ریشه به میزان ۰/۱ گرم در ۱۰ میلی لیتر اتانول: اسید استیک (۷:۷، ۹۹:۱) عصاره‌گیری شد. سپس لوله‌های آزمایش به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۸۰ درجه سانتیگراد قرار گرفتند و بعد سرد شدند. آنگاه جذب آنها در طول موج‌های ۲۷۰، ۳۰۰ و ۳۳۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر مدل UV2100 اندازه‌گیری شد. محتوای فلاونوئید با استفاده از ضریب خاموشی $\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1} 33000$ محاسبه گردید (۱۷).

سنجش محتوای ترکیبات فنلی محلول: میزان ۰/۱ گرم از

بافت‌های خشک ریشه و اندام هوایی گل در ۲۰ میلی لیتر متانول ۸۰ درصد همگن شد و به مدت ۳ ساعت در حمام آب گرم در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد گذاشته شد. سپس با سرعت ۹۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق سانتریفوژ شد. عصاره متانولی از رسوب جدا شد و حجم عصاره متانولی اندازه گرفته شد. ۵ میلی لیتر از عصاره متانولی برداشته و خشک گردید. عصاره خشک شده در ۵ میلی لیتر آب دیونیزه حل شد (۱۹). برای اندازه‌گیری ترکیبات فنلی کل از معرف Folin-Ciocalteu استفاده شد و گالیک اسید به‌عنوان استاندارد مورد استفاده قرار گرفت. ۰/۵ میلی لیتر از این معرف به ۰/۵ میلی لیتر عصاره استخراج شده گیاهی و استانداردهای گالیک اسید اضافه و بعد به مخلوط حاصل ۴ میلی لیتر سدیم کربنات ۱ مولار اضافه شد. پس از ۱۵ دقیقه نگهداری در دمای محیط، جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۶۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مدل UV2100 خوانده شد و نتایج به صورت میلی‌گرم هم گالیک اسید بر گرم وزن خشک گزارش گردید (۷).

استخراج و سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز: نمونه‌های

منجمد ریشه و اندام هوایی به میزان ۰/۲ گرم در ۳ میلی لیتر بافر Na-Phosphate ۶۰ میلی مولار با $\text{pH}=6/1$ عصاره‌گیری شدند. سوسپانسیون حاصل در $15000 \times \text{g}$ ، به

درصد جوانه زنی بذرها به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد ($P \leq 0.05$). همچنین درصد جوانه‌زنی بعد از ۷ روز نسبت به ۳ روز در نمونه‌های شاهد افزایش و در نمونه‌های تحت تیمار کاهش نشان داد (شکل ۱).

مقایسه میانگین وزن خشک اندام هوایی و ریشه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد میان گیاهان شاهد و گیاهان تحت تیمار سرب می‌باشد. میانگین وزن خشک ریشه و اندام هوایی گیاهان با افزایش میزان غلظت سرب کاهش نشان می‌دهد (جدول ۱). همچنین طول ریشه گیاهان تحت تیمار سرب در مقایسه با گیاهان شاهد کاهش یافته است (جدول ۱). طول ریشه در گیاهان تحت تیمار ۱۲۰ میکرومولار سرب با گیاهان شاهد دارای تفاوت معنی‌دار نمی‌باشد اما در سایر غلظت‌ها کاهش طول ریشه در سطح ۵ درصد معنی‌دار بوده است (جدول ۱).

۳۰ دقیقه قرار گرفتند. بعد از گذشت ۳۰ دقیقه، لوله‌ها از حمام خارج شده و پس از سرد شدن میزان MDA با اندازه‌گیری جذب در طول موج‌های ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر با استفاده از ضریب ثابت ($\epsilon = 155 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) محاسبه گردید.

تحلیل‌های آماری: کلیه آزمایش‌ها در ۳ تکرار با حداقل ۳ نمونه مستقل انجام شد. بررسی‌های آماری با نرم‌افزار MSTAT-C انجام شد. برای انجام آنالیز واریانس داده‌ها از ANOVA یکطرفه و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن با ضریب اطمینان ۹۵ درصد استفاده شد.

نتایج

محاسبه درصد جوانه‌زنی بذرها یونجه پس از ۳ و ۷ روز نشان داد که تحت تأثیر غلظت‌های در حال افزایش سرب

جدول ۱- تغییر میزان وزن خشک ریشه، اندام هوایی و طول ریشه تحت تأثیر غلظت‌های مختلف سرب (حروف یکسان نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ هستند).

عوامل رشد			غلظت سرب (μM)
طول ریشه (cm)	وزن خشک اندام هوایی (g)	وزن خشک ریشه (g)	
۲۱a	۱/۱۲۵a	۰/۳a	۰
۲۱a	۱/۱ b	۰/۲ab	۱۲۰
۱۷/۵ b	۱ b	۰/۱b	۲۴۰
۱۰ c	۰/۸c	۰/۰۹b	۵۰۰
۵/۵ d	۰/۵ d	۰/۰۵b	۱۰۰۰

میکرومولار سرب بوده و کمترین مقادیر متعلق به گروه شاهد بود (شکل ۲).

محاسبه شاخص‌های تجمع و انتقال سرب نشان داد که شاخص BCF در ریشه‌های تحت تیمار بیشتر از اندام هوایی بوده است. میزان شاخص BCF هم در اندام هوایی و هم در ریشه‌ها کمتر از یک می‌باشد و تنها در غلظت ۱۲۰

نتایج حاصل از سنجش میزان سرب در ریشه و اندام هوایی نشان‌دهنده افزایش میزان جذب سرب با افزایش میزان غلظت سرب در محیط رشد گیاهان می‌باشد. مقایسه میانگین داده‌های حاصل از سنجش میزان سرب در اندام هوایی و ریشه گیاهان تحت تیمار نشان داد که بیشترین میزان جذب در ریشه و اندام هوایی در غلظت ۱۰۰۰

محیط رشد افزایش یافت و در همه تیمارها مقدار این شاخص کمتر از یک محاسبه شد (جدول ۲).

میکرومولار سرب در ریشه بیشتر از یک است. همچنین میزان این شاخص با افزایش غلظت سرب در محیط رشد افزایش یافت. شاخص TF نیز با افزایش غلظت سرب در

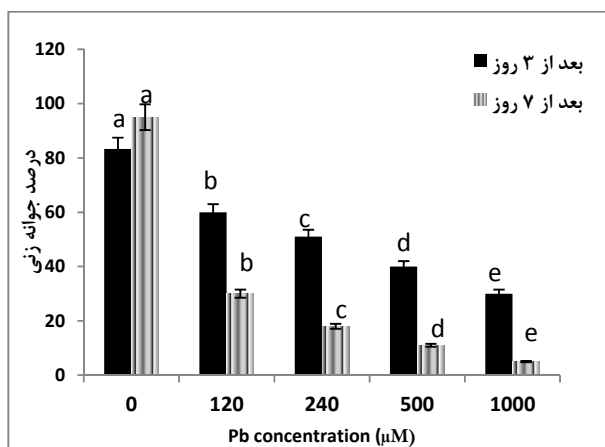
جدول ۲- مقایسه شاخص های BCF, TF در گیاهچه های یونجه تحت تیمار سرب

شاخص	غلظت سرب در محیط (μM)	BCF	TF
	۱۲۰	۱/۵۴	۰/۰۸۱
	۲۴۰	۰/۸۶۴	۰/۳۴۳
	۵۰۰	۰/۳۶۶	۰/۴۹۵
	۱۰۰۰	۰/۲۲۱	۰/۷۵

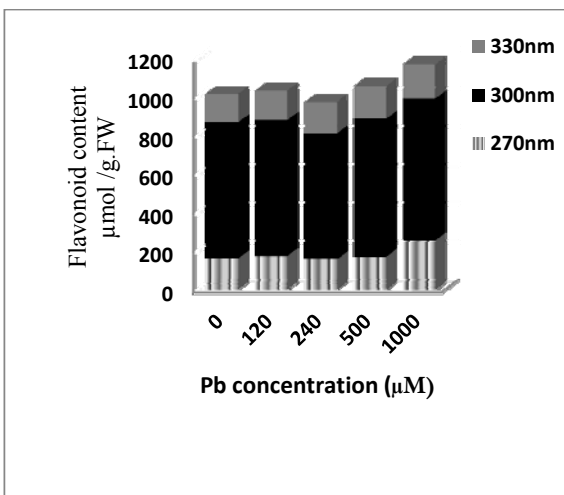
گیاهان شاهد و تحت تیمار سرب می‌باشد. محتوای فنول کل در اندام هوایی گیاهان تحت تیمار نسبت به گروه شاهد با افزایش غلظت سرب در محیط رشد افزایش یافته است، در حالیکه در ریشه گیاهان تحت تیمار محتوای ترکیبات فنلی کل با افزایش غلظت سرب در محیط رشد کاهش یافته است (شکل ۵).

نتایج نشان می‌دهد که محتوای فلاونوئید کل در ریشه و اندام هوایی گیاهان تحت تیمار با افزایش غلظت سرب افزایش یافته است و این افزایش در هر ۳ طول موج از لحاظ آماری معنی‌دار می‌باشد (شکل ۳ و ۴).

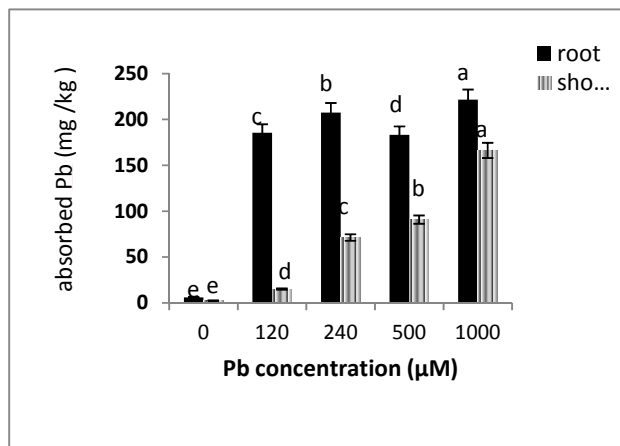
نتایج حاصل از سنجش محتوای فنول کل در اندام هوایی و ریشه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار محتوای فنول کل در



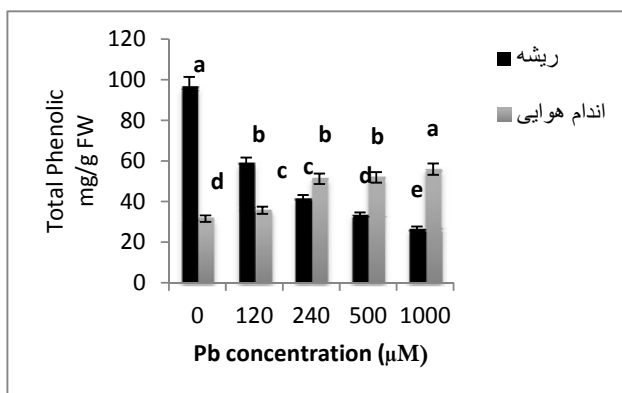
شکل ۱- درصد جوانه‌زنی بذرهای تیمار سرب



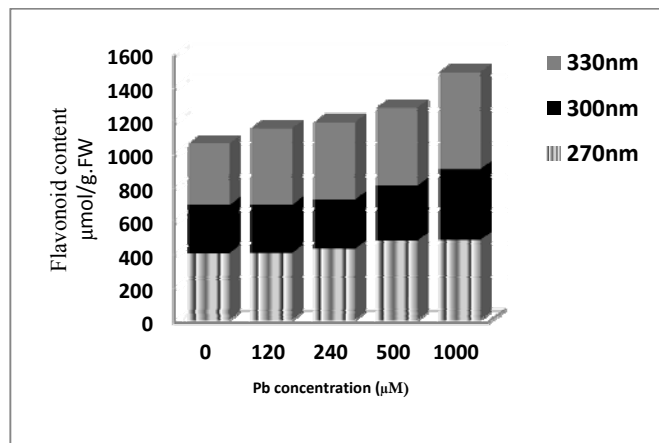
شکل ۳- تغییرات محتوای فلاونوئید کل ریشه



شکل ۲- میزان سرب جذب شده در ریشه و اندام هوایی تحت تأثیر مقدار سرب در محیط



شکل ۵- تغییرات محتوای ترکیبات فنلی کل (ستونهایی که با حروف یکسان نشان داده شده است در سطح ۵٪ و بر اساس آزمون دانکن اختلاف معنی‌داری با هم ندارند)



شکل ۴- تغییرات محتوای فلاونوئید کل اندام هوایی

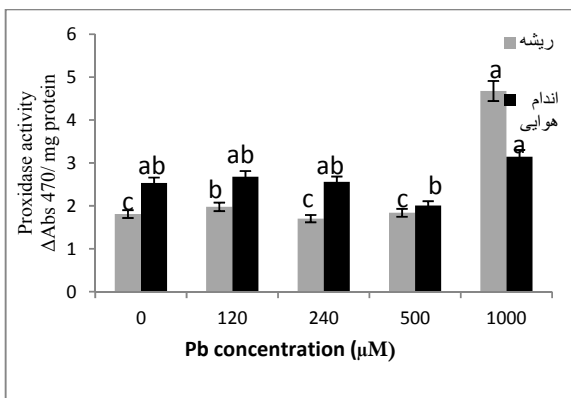
سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز نشان داد که در ریشه گیاهان تحت تیمار سرب فعالیت آنزیم پراکسیداز نسبت به گروه شاهد افزایش یافته است. این افزایش از لحاظ آماری در سطح ۵ درصد معنی‌دار است و بیشترین میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز مربوط به ریشه گیاهچه‌های تحت تیمار ۱۰۰۰ میکرو مولار سرب می‌باشد. سنجش فعالیت پراکسیداز در اندام هوایی نمونه‌های تحت تیمار سرب

نتایج حاصل از اندازه‌گیری میزان تولید مالون دی‌آلدئید به عنوان فراورده نهایی پراکسیداسیون لیپیدهای غشا نشان‌دهنده افزایش معنی‌دار MDA در ریشه‌های گیاهچه‌های یونجه تحت تنش سرب می‌باشد. البته بیشترین میزان MDA مربوط به تیمار ۱۰۰۰ میکرو مولار سرب است (نمودار ۶).

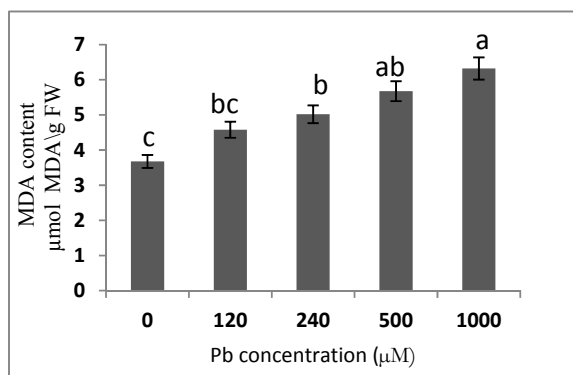
هوایی و ریشه گیاهچه‌های تحت تیمار با غلظت‌های مختلف سرب به‌طور معنی‌داری افزایش یافته است (شکل ۸).

هیچ‌گونه تفاوت معنی‌داری را با گروه شاهد نشان نداد (شکل ۷).

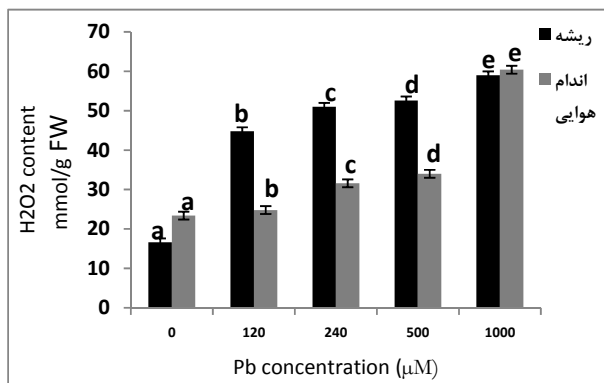
نتایج حاصل از سنجش میزان پراکسید هیدروژن در گیاهچه‌های یونجه نشان داد که میزان این ماده در اندام



شکل ۷- فعالیت آنزیم پراکسیداز (ستون‌هایی که با حروف یکسان نشان داده شده است در سطح ۵٪ و بر اساس آزمون دانکن اختلاف معنی‌داری با هم ندارند)



شکل ۶- تغییرات میزان مالون دی‌آلدئید (ستون‌هایی که با حروف یکسان نشان داده شده است در سطح ۵٪ و بر اساس آزمون دانکن اختلاف معنی‌داری با هم ندارند)



شکل ۸- تغییرات میزان H₂O₂ (ستون‌هایی که با حروف یکسان نشان داده شده است در سطح ۵٪ و بر اساس آزمون دانکن اختلاف معنی‌داری با هم ندارند)

زدن تعادل آب، تغییر در تعادل هورمونی گیاه، تغییر در قابلیت نفوذپذیری غشا و مهار یا فعال‌سازی فعالیت‌های آنزیمی می‌گردد (۲۵، ۱۴). درصد جوانه‌زنی بذره‌های گیاه یونجه تحت تأثیر غلظت‌های مختلف سرب کاهش یافت. نتایج مطالعات مختلف نشان‌دهنده کاهش میزان جوانه‌زنی بذره‌های گونه‌های گیاهی مختلف تحت تنش فلزات سنگین

بحث و نتیجه‌گیری

آلودگی سرب در محیط زیست باعث اثراتی از قبیل مهار جوانه‌زنی دانه، اختلال در میتوز، القای کلروز و نکروز در برگ، مهار رشد جوانه و ریشه، کاهش فتوسنتز و تنفس، کاهش سنتز DNA، اختلال در توزیع مواد غذایی، بر هم

در گیاهچه‌های یونجه نیز میزان تولید پراکسید هیدروژن و هم میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز با افزایش میزان غلظت سرب افزایش می‌یابد. این نتایج نشان‌دهنده ایجاد تنش اکسیداتیو ناشی از تنش سرب و افزایش میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز به‌عنوان یک آنزیم آنتی‌اکسیدان مهم برای به حداقل رساندن آسیب‌های ناشی از افزایش میزان تولید پراکسید هیدروژن می‌باشد. همچنین افزایش میزان دی‌آلدئید در این مطالعه بیانگر افزایش میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشا در شرایط تنش فلزات سنگین از جمله سرب است. افزایش پراکسیداسیون لیپیدهای غشا نیز می‌تواند به دلیل تجمع H_2O_2 و افزایش سایر انواع فعال اکسیژن تحت تنش سرب باشد (۳۰، ۳۳، ۲۹).

یکی از سازوکارهای مؤثر در افزایش میزان تحمل فلزات سنگین تولید و انباشتگی ترکیبات فنولی است. نتایج به‌دست آمده در این مطالعه نشان‌دهنده کاهش میزان ترکیبات فنولی محلول در ریشه و افزایش آنها در اندام هوایی می‌باشد. مطالعات قبلی نشان داده است که کاهش میزان ترکیبات فنولی محلول می‌تواند به علت سنتز سایر ترکیبات فنولی از جمله لیگنین باشد. همچنین مشخص شده است که در استرس فلزات سنگین فنول‌های متصل به دیواره بیشتر از فنل‌های محلول تحت تأثیر قرار می‌گیرند (۱۶). یکی از بزرگترین گروه‌های ترکیبات فنولی فلاونوئیدها هستند که به‌طور وسیعی در تمام سلسله گیاهی حضور دارند. فلاونوئیدها هم به‌عنوان عوامل آنتی‌اکسیدان و هم به‌عنوان ترکیبات کلاته‌کننده فلزات، نقش مهمی در ایجاد تحمل نسبت به تنش فلزات سنگین در گیاهان به عهده دارند (۲۰). گیاه یونجه دارای ترکیبات متعدد فلاونوئیدی در ریشه‌ها و برگ‌های خود می‌باشد. افزایش محتوای فلاونوئید کل در اندام هوایی و ریشه گیاهچه‌های یونجه در پاسخ به تنش سرب نشان‌دهنده نقش این گروه از متابولیت‌های ثانویه در افزایش تحمل گیاهچه‌های یونجه نسبت به تنش سرب می‌باشد.

می‌باشد (۱۴، ۳۱). همچنین بیشتر مطالعات انجام شده نشان‌دهنده کاهش زیتوده خشک اندام هوایی و ریشه تحت تنش سرب و سایر فلزات سنگین است که مشابه نتایج به‌دست آمده در این مطالعه می‌باشد. بنابراین به نظر می‌رسد که کاهش زیتوده گیاهان به دلیل کاهش تقسیمات سلولی، کاهش میزان فتوسنتز و یا کاهش جذب آب و مواد معدنی می‌باشد (۳۲، ۳۱، ۲۹، ۲۵، ۶، ۱). مقایسه میزان سرب جذب شده در ریشه و اندام هوایی نشان می‌دهد که بیشتر سرب جذب شده در گیاه در ریشه‌ها انباشته شده است و بخش کمی از آن به اندام هوایی منتقل شده است. البته نتایج مشابهی در مورد انباشتگی سرب در سایر گونه‌ها به‌دست آمده است (۳۳، ۱۵). همچنین مقایسه شاخص‌های BCF و TF نشان می‌دهد که هرچه بر میزان غلظت سرب در محیط رشد گیاه افزوده می‌شود میزان انتقال آن از ریشه به اندام هوایی افزایش می‌یابد و در غلظت‌های بسیار بالای سرب، تجمع سرب در ریشه برای کاهش سمیت این فلز سنگین در گیاه به تنهایی مؤثر نبوده و گیاه از سازوکار انتقال و کدبندی سرب در اندام هوایی استفاده می‌کند.

در بسیاری از گونه‌های گیاهی تنش فلزات سنگین منجر به ایجاد تنش اکسیداتیو و تولید انواع فعال اکسیژن می‌گردد. انواع فعال اکسیژن از طریق پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی سبب آسیب غشا شده و همچنین می‌توانند سبب آسیب به پروتئین‌ها، مولکول DNA و کلروفیل شوند (۲۱، ۲). در میان انواع فعال اکسیژن مولکول پراکسید هیدروژن (H_2O_2) نسبتاً پایدارتر و خطرناکتر است، زیرا می‌تواند از غشا عبور کرده و به اندامک‌های درون سلولی برسد (۲۱). گیاهان برای حذف یا کاهش ROS از سیستم‌های آنتی‌اکسیدان آنزیمی و غیرآنزیمی استفاده می‌کنند (۲۶، ۲۴، ۲۱). از میان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان آنزیم پراکسیداز نقش مهمی در از بین بردن رادیکال‌های آزاد اکسیژن به‌ویژه پراکسید هیدروژن دارد. نتایج به‌دست آمده از مطالعه حاضر نشان می‌دهد که

محافظتی آنتی‌اکسیدان از قبیل افزایش میزان محتوای فلاونوئیدی و فنولی و افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز استفاده می‌کند.

بنابراین با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه می‌توان اینگونه نتیجه‌گیری کرد که با افزایش تجمع سرب در ریشه و اندام هوایی، میزان رشد گیاهچه‌های یونجه کاهش می‌یابد و این گیاه برای تحمل تنش سرب از سازوکارهای

منابع

۱. حافظی م، نمکی شوشتری ع، اسرار ز، ترکزاده م (۱۳۸۸) تأثیرات غلظت‌های سمی کادمیوم بر میزان گره زایی و تثبیت ازت سوشهای مختلف باکتری سینوریزوبیوم میلیوتی (وحشی و دارای پلازمید) در گیاه یونجه (*Medicago sativa*). مجله زیست‌شناسی ایران. جلد ۲۲. ۶۲۶-۶۳۵.
۲. زارع ده آبادی س، اسرار ز (۱۳۸۸) بررسی اثر مقدار اضافی عنصر روی (Zinc) بر القای تنش اکسیداتیو و تجمع برخی عناصر در گیاه نعنای سبز (*Mentha spicata* L.). مجله زیست‌شناسی ایران. جلد ۲۲. ۲۲۸-۲۱۸.
3. Alexieva, V., Sergiev, I., Mapelli, S. and Karanov, E. (2001) The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant Cell and Environment* 24:1337-1344.
4. Bali, R., Siegele, R., T. HARRISA, A. (2010) Phytoextraction of Au: Uptake, accumulation and cellular distribution in *Medicago sativa* and *Brassica juncea*. *Chemical Engineering Journal* 156: 286-297.
5. Bhuiyan, N., Liu, W., Liu, G., Selvaraj, G., Wei, Y., King, J. (2007) Transcriptional regulation of genes involved in the pathways of biosynthesis and supply of methyl units in response to powdery mildew attack and abiotic stresses in wheat. *Plant Molecular Biology* 64: 305-318.
6. Bosabalidis, A., Panou-Filothou, H. (2004) Root structural aspects associated with copper toxicity in oregano (*Origanum vulgare* subsp. *hirtum*) *Plant Science* 166: 1497-1504.
7. Boonyuen, C., Wangkarn, S., Suntornwat, O., & Chaisuksant, R. (2009). Antioxidant capacity and phenolic content of *Mimusops elengi* fruit extract. *Kasetsart Journal of Natural Sciences* 43: 21-27.
8. Claus, H. (2004) Laccases: structure, reactions, distribution. *Micron* 35: 93-96.
9. De Vos, C., Schat, H., De Waal, M., Vooijs, R and Ernst, W. (1991). Increased to copper-induced damage of the root plasma membrane in copper tolerant *silene cucubalus*, *Plant Physiol* 82:523-528.
10. Dat, J., Vandenabeele, S., Vranova, E., Van Montagu, M., Inze, D., Van Breusegem, F. (2000) Dual action of the active oxygen species during plant stress responses, *Cellular and Molecular life sciences* 57: 779-795.
11. Gardea-Torresdey, J.L., Tiemann, K.J., Gamez, G., Dokken, K. (1999) Effects of chemical competition for multi-metal binding by *Medicago sativa* (alfalfa). *Journal of Hazardous Materials B69*: 41-51.
12. Gardea-Torresdey, J.L., Tiemann, K.J., Gamez, G., Rodriguez, O. (1998) Phytofiltration of hazardous cadmium, chromium, lead and zinc ions by biomass of *Medicago sativa* (Alfalfa). *Journal of Hazardous Materials* 57 : 29-39.
13. Gupta, P.K. (2000) Soil, plant, water and fertilizer analysis. *Agrobios, New Dehli, India* P: 438.
14. Islam, E., Li, T., Yang, X., Liu, D., Jin, X., Meng, F. (2007) Effect of Pb toxicity on root morphology, physiology and ultrastructure in the tow ecotype *Elsholtzia argyi*. *Journal of hazardous material* 147: 806-816.
15. Kopittke, M., Asher, P. J., Mensies, N. (2007) Toxic effect of Pb²⁺ on growth of cowpea (*Vigna unguiculata*). *Environmental pollution* xx.1-8.
16. Kovacik, J., Klejdus, B., Hedbavny, J., covska, S., Zon, J. (2010) Significance of phenols in cadmium and nickel uptake. *Journal of Plant Physiology* 168: 576-584.
17. Krizek, D.T., Kramer, G.F., Upadyaya, A., Mirecki, R.M. (1993) UV-B response of cucumber seedling grown under metal halide and high pressure sodium/deluxe lamps. *Physiol. Plant* 88: 350 - 358.

18. Kar, M., Mishra, D. (1976): Polyphenol oxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiol.* 57: 315-319.
19. Marinova, D., Ribarova, F., Atanassova, M. (2005) Total phenolics and total flavonoids in Bulgarian fruits and vegetables. *J. Univ. Chem. Technol. Metall.* 40: 255-260.
20. Matsouka, I., Beri, D., Chinou, I., Haralampidis, K., G. Spyropoulos, C. (2011) Metals and selenium induce medicarpin accumulation and excretion from the roots of fenugreek seedlings: a potential detoxification mechanism. *Plant soil* published online.
21. Michalak, A. (2006) Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal Stress. *Polish J. of Environ. Stud* 15: 523-530.
22. Peralta-Videa, J.R. , Gardea-Torresdey, J.L., Gomez, E., Tiemann, K.J., Parsons, J.G., Carrillo, G. (2002) Effect of mixed cadmium, copper, nickel and zinc at different pHs upon alfalfa growth and heavy metal uptake. *Environmental Pollution* 119: 291-301.
23. Pietta, P. G.(2000) Flavonoids as Antioxidants. *J. Nat. Prod* 63: 1035-1042.
24. Pourcel, L., Routaboul, J., Cheynier, V., Lepiniec, L., Debeaujon, I .(2006) Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions. *TRENDS in Plant Science* 12: 29-36.
25. Sharma, P and Dubey, R. (2005) Lead toxicity in plant. *Plant physiology* 17: 32-52
26. Skorzynska-Polit, E., Drakiewicz, M., Wianowskab, D., Maksymieca, W., L.Dawidowiczb, A., Tukiendorfa, A. (2004) The influence of heavy metal stress on the level of some flavonols in the primary leaves of *Phaseolus coccineus*. *Acta physiologiae plantarum* 26: 247-254.
27. Snowden, K. C., Gardner, R. C. (1993) Five genes induced by aluminum in wheat (*Triticum aestivum* L.) roots. *Plant Physiology* 103: 855-861.
28. Singh, A., Eapen, S., Fulekar, M.H. (2008) Potential of *Medicago sativa* for uptake of cadmium from contaminated environment. *Romanian Biotechnological Letters* 14 : 4164-4169.
29. Tripathi, R.D., Mishra, S., Srivastava, S., Kumar, R., Seth, C.S. , Gupta, D.K. (2006) Lead detoxification by coontail (*Ceratophyllum demersum* L.) involves induction of phytochelatins and antioxidant system in response to its accumulation. *Chemosphere* 65: 1027-1039.
30. Verma, S and Dubey R.S. (2003) Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Science* 164 : 645-655.
31. Vollenweider, S., Cosio, C., Gunthardt-Georg, M., Keller, C. (2006) Localization and effects of cadmium of cadmium-tolerant willow (*Salix viminalis*) II. Microlocalization and cellular effects of cadmium. *Environmental and Experimental Botany* 58: 25-40.
32. Vollenweider, S., Cosio, C., Keller, C. (2006) Localization and effects of cadmium of cadmium-tolerant willow (*Salix viminalis*) I. Macrolocalization and phytotoxic effects of cadmium. *Environmental and Experimental Botany* 58: 64-74.
33. Yu, D., Yan, X. , Wang, H. , Wang. (2006) Response of submerged plant (*Vallisneria spirulosa*) clones to lead stress in the heterogenous soil. *Chemosphere* 63 : 1459-1465.

Lead accumulation and its effects on peroxidase activity, phenolic and flavonoid compounds in seedling stage of *Medicago sativa* L.

Ghelich S.¹, Zarinkamar F.¹ and Niknam V.²

¹Faculty of Biological Sciences, University of Tarbiat Modares, Tehran, I.R. of Iran

²Faculty of Biology, University of Tehran, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

Heavy metal pollution is one of the most significant ecological problems in the whole world. According to the environmental protection agency (EPA), Pb is the most important heavy metal contaminant in the environment. In this study the effects of Pb stress (0, 120, 240, 500, 1000 μ M Pb) on 7-day seedlings of *Medicago sativa* L. were investigated in a hydroponic culture. The results indicated Pb accumulation in roots and aerial parts increased and an increasing trend in total biomass was observed with increase of Pb concentration in medium which reduced later due to increasing Pb accumulation. Compared with control seedlings, increase in the production of MDA and H₂O₂ which are the indices of oxidative stress, were observed in the seedlings under Pb stress. Moreover, increase in total flavonoids production, and peroxidase activity in roots and shoots of the treated seedlings were observed under Pb stress. Content of total phenolics decreased in roots and increased in shoots comparing with the control.

Key words: Flavonoids, Lead, *Medicago sativa* L., Phenolic compounds, Peroxidase.