بررسی اثر مس بر برخی از شاخص‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی گیاه مریم‌گلی کبیر (*Salvia sclarea* L.)

مهناز پرندوار و طهماسب آسمانه*

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه یاسوج

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۵/۲۵، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۶/۱۰/۰۵)

چکیده

در حال حاضر، انباشتگی فلزات سنگین در آب و خاک از عوامل مهم آلودگی‌های محیطی محسوب می‌شود. انباشتگی عنصر مس در محیط زیست ناشی از کاربرد انواع کودها، قارچ کش‌ها و فعالیت‌های صنعتی و شهری، منجر به بروز سمیت و اثرات سوء این فلز سنگین بر بسیاری از فرآیندهای حیاتی گیاه می‌گردد. گیاه‌پالایی، روشی مؤثر و ارزان قیمت برای استخراج، تثبیت و سمیت‌زدایی فلزات سنگینی نظیر مس می‌باشد. در پژوهش حاضر، اثرات سطوح مختلف سولفات مس (صفر، ۵، ۲۵، ۵۰ و ۷۵ میکرومولار سولفات‌مس) بر شاخص‌های رویشی و فیزیولوژیک گیاهچه‌های مریم‌گلی کبیر در محیط‌کشت هیدروپونیک، در قالب طرح آماری کاملاً تصادفی، مورد بررسی قرار گرفت. اثر غلظت‌های بالاتر از ۵ میکرومولار سولفات‌مس بر محتوای کاروتنوئیدها و آنتوسیانین‌های برگ افزایشی و معنی‌دار و بر محتوای کلروفیل کل غیرمعنی‌دار بود. همچنین این سطوح تیمار، باعث کاهش اکثر شاخص‌های رشدی و فیزیولوژیکی گیاه از جمله وزن‌تر و خشک گیاهی، طول ساقه و ریشه، متوسط سطح برگ، کربوهیدارت‌های محلول، پروتئین کل و فعالیت آنزیم پراکسیداز گردید درحالیکه سطح ۵ میکرومولار این تیمار، منجر به افزایش تمامی شاخص‌های مذکور گردید. نتایج نشان داد که غلظت مس اندام‌هوایی، با افزایش سطح سولفات مس به طور خطی و قابل ملاحظه‌ای افزایش می‌یابد، حال آنکه محتوای مس در ریشه با نسبت کمتری افزایش یافت. به طورکلی به نظر می‌رسد که گیاه مریم‌گلی کبیر، دارای مقاومت نسبی به سطح پایین تنش مس و حساس به سطوح متوسط و بالای مس می‌باشد و به عنوان گیاه مناسب برای گیاه‌پالایی مس پیشنهاد نمی‌گردد.

واژگان کلیدی: سولفات مس، شاخص‌های فیزیولوژیک، فلزات سنگین، مریم‌گلی کبیر

مقدمه

در بسیاری از نقاط جهان با گسترش شهرها، پیشرفت فناوری، افزایش صنایع و استفاده‌ی بی‌رویه از کودهای شیمیایی و فاضلاب‌های شهری، اکثر خاک‌های کشاورزی به‌وسیله‌ی فلزات سنگین آلاینده شامل کادمیوم، مس، روی، نیکل، کبالت، سرب و آرسنیک در حد کم تا متوسط آلوده شده است (Yadav, 2010). وجود این عناصر در اتمسفر، آب و خاک حتی در مقادیر بسیار کم می‌تواند مشکلاتی را برای موجودات به‌وجود آورد (Groppa *et al.*, 2007). این فلزات به‌دلیل تجزیه‌ناپذیری، داشتن نیمه عمر بیولوژیکی طولانی، پتانسیل تجمع در اندام‌های گیاهی (Jarup, 2003; Sathawara *et al.*, 2004)، ورود به زنجیره‌ی غذایی (Zaidi *et al.*, 2005)،

*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: asemaneh@yu.ac.ir

جهش‌زا و سرطان‌زا بودن (Kovalchuk *et al*., 2001)، به‌عنوان مهمترین مشکل محیط زیست به‌حساب می‌آیند. تعدادی از فلزات (مس، روی، نیکل، مولیبدن، منگنز و آهن) عناصر کم مصرف ضروری هستند که در رشد طبیعی، واکنش‌های اکسایش-کاهش، انتقال الکترون و بسیاری از فرآیندهای متابولیکی دیگر شرکت می‌کنند، ولی مقدار اضافی آن در خاک‌ها موجب اختلالات متابولیکی و بازدارندگی رشد در بیشتر گونه‌های گیاهی می‌شود (Anjum *et al*., 2015; Singh *et al*., 2016). تعداد دیگری از آن‌ها مانند سرب، کادمیم، کروم و جیوه غیرضروری بوده و حتی در غلظت‌های کم هم برای گیاه سمی هستند (Rubio *et al*., 2012; Sebastiani *et al*., 2004). در این میان، مس عنصر کم‌مصرف ضروری برای رشد گیاهان می‌باشد (تایز و زایگر، ۱۳۸۸)، که دارای نقش‌های متابولیک فراوانی در گیاه است (Berglund *et al*., 2000). این عنصر، از جمله عناصر فلزی است که در واکنش‌های اکسیداسیون به‌عنوان کاتالیزور عمل می‌کند و در سیستم انتقال الکترون در فتوسنتز، از طریق پلاستوسیانین و اکسیداسیون نهایی از طریق سیتوکروم‌اکسیداز نیز مؤثر است. مس به عنوان بخشی از ساختمان آنزیم‌های پلی‌فنل‌اکسیداز و آسکوربیک-اسیداکسیداز معرفی شده که بیانگر اهمیت وجود این عنصر در گیاه است (هاپکینز، ۱۳۸۸؛ Devlin *et al*., 2002; Nagajyoti *et al*., 2010).

از سویی، زمانی که غلظت مس در خاک از سطح بسیار اندک تجاوز کند، به شدت سمی می‌شود (Berglund *et al*., 2000). این عنصر، به‌وسیله‌ی گیاهان جذب شده و به بخش-های مختلف آن‌ها منتقل می‌شوند و سلامت بالقوه انسان‌ها و دام را از طریق زنجیره‌های غذایی تهدید می‌کند (Tani, 2005). میزان سمیت مس بسته به نوع گیاه و غلظت بحرانی آن متفاوت است (Sheldon and Menzies, 2004). مس با ممانعت از جذب سایر عناصر به‌ویژه آهن، پتاسیم و کلسیم که جزء عناصر غذایی ضروری محسوب می‌شوند از رشد گیاه می‌کاهد (Ouzounidou *et al*., 1997). مس اضافی از طویل شدن سلول جلوگیری می‌کند (Ouzounidou *et al*., 1995). مس مازاد، با کاهش محتوی رنگیزه‌های فتوسنتزی، آسیب رساندن به دستگاه فتوسنتزی و ساختار کلروپلاست، تغییر ترکیب پروتئین و لیپید غشاء تیلاکوئید رشد و نمو گیاه را می‌تواند تحت تأثیر قرار دهد (KeShi-Sheng *et al*., 2007). غلظت‌های بالای مس می‌تواند بسیاری از تغییرات را در یاخته القاء نماید و موجب تغییر در نفوذپذیری غشاء، ساختار کروماتین و القاء پیری گردد (Tewari *et al*., 2006). یکی از علائم آثار سمی این فلز در گیاه، پراکسیده شدن لیپیدهای غشایی است که موجب تغییر ساختار غشای سلولی و بازدارندگی رشد گیاه می‌شود. از نشانه‌های پراکسیده شدن لیپیدهای غشایی، تشکیل مالون‌دی‌آلدهید (MDA) است که یکی از فراورده‌های حاصل از تجزیه‌ی اسیدهای چرب اشباع شده است (Molassiotis *et al*., 2005).

تکنولوژی‌های رایج در حذف فلزات سنگین هزینه بر بوده و اثرات منفی زیادی بر اکوسیستم‌ها دارند. در مقابل، گیاه‌پالایی روشی مقرون‌به‌صرفه است که در آن از گیاهان مقاوم برای پالایش خاک‌های آلوده به فلزات سنگین استفاده می‌شود (Khan, 2006). جنس مریم‌گلی متعلق به خانواده‌ی نعناع (Lamiaceae=Labiatae)، گیاهی علفی و چندساله، برای مقاصد دارویی در سراسر جهان استفاده می‌شود (Topcu, 2006). از آنجا که همه‌ی گیاهان از جمله مریم‌گلی‌کبیر (*Salvia Sclarea* L.) توانایی جذب مس را دارند و با توجه به اینکه گیاه مریم‌گلی‌کبیر، پراکنش وسیعی در زیستگاه‌های مختلف دارد که امکان آلودگی آنها به فلزات سنگین از جمله مس وجود دارد، مصارف دارویی دارد و از این جهت ضروری است که امکان تجمع مس در اندام‌های این گیاه بررسی گردد، برگ‌های وسیع و زیتوده‌ی بالا دارد که از جمله ویژگی‌های گیاهان مناسب برای اهداف گیاه‌پالایی است و از طرفی تا کنون اثرات عنصر مس بر این گیاه بررسی نشده است، بر این اساس، در این پژوهش، اثرات سطوح مختلف مس بر شاخص‌های وزن و طول ساقه و ریشه، سطح برگ، مقدار رنگیزه‌های گیاهی، کربوهیدرات‌های محلول و پروتئین کل، فعالیت آنزیم پراکسیداز و تجمع مس در اندام‌های گیاه

مریم‌گلی کبیر و پتانسیل گیاه‌پالایی آن مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های بذری مریم‌گلی کبیر طبق استاندارد ISTA از رویشگاه‌های طبیعی یاسوج در استان کهگیلویه و بویراحمد در ماه‌های خرداد و تیر سال ۱۳۹۵ جمع‌آوری گردید. پس از خشک کردن، بذور ضدعفونی‌شده در گلدان کشت گردید. پس از ۸ روز از زمان کاشت، گیاهچه به محیط‌کشت هیدروپونیک انتقال داده شدند.

تغییر در غلظت عناصر موجود در محلول‌غذایی هوگلند بر اساس بازنگری اخیر Parker and Norvell در سال ۱۹۹۹ صورت گرفت. محلول‌غذایی پایه‌ی تغییر یافته‌ی هوگلند شامل ترکیبات ذیل بود (اعداد جدول ۱ پرانتز غلظت ترکیب بر اساس میکرومولار می‌باشد) : معادله ۲

نیترات پتاسیم (۱۰۰۰)، دی هیدروژن پتاسیم (۲۰)، هیدروکسید سدیم (۹۰)، نیترات کلسیم (۱۵۰۰)، نیترات آمونیوم (۵۰۰)، سولفات منیزیوم (۵۰۰)، اتیلن دی آمید تترا استیک اسید (۵۰)، سولفات آهن (۵۰)، سولفات روی (۰/۵)، سولفات منگنز (۰/۷)، مولیبدات آمونیوم (۰/۱)، اسید بوریک (۱)، سولفات مس (۰/۱)، کلرید سدیم (۱۰۰).

تیمار شامل پنج سطح سولفات مس (غلظت‌های صفر، ۵، ۲۵، ۵۰ و ۷۵ میکرومولار)، اعمال گردید. هر تیمار ۳ تکرار و هر تکرار شامل ٤ گیاه در ظروف حاوی محلول‌غذایی بود که در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا گردید. نمونه‌ها در اتاق کشت در دمای متناوب ۱۸ درجه سانتی‌گراد برای شب و ۲۲ درجه سانتی‌گراد برای روز نگهداری و اسیدیته (pH) محلول غذایی توسط دستگاه pH متر مدل ۳۰۲ درحدود ۰/۲± ٦ ثابت نگه داشته شد. محلول‌های غذایی نیز، ۲ بار در هفته تعویض گردیدند. گیاهان، پس از ٤ هفته اعمال تیمار، برداشت گردیده و صفات مورد نظر، مورد سنجش و ارزیابی قرارگرفتند.

ساقه‌ها و ریشه‌ها از ناحیه‌ی یقه قطع گردید و طول آن‌ها اندازه گیری شد. اندام‌ها به صورت جدا در پاکت‌های کاغذی در آون در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤٨ ساعت قرار گرفتند. سپس وزن‌خشک آن‌ها تعیین گردید. در نهایت جمع داده‌ها به صورت میانگین برای هر گلدان محاسبه گردید. متوسط سطح برگ مربوطه برای هر تکرار و تیمار با استفاده از روش مهدویان و همکاران، ۱۳۸۵ محاسبه گردید.

رنگیزه‌های فتوسنتزی: اندازه‌گیری مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی با استفاده از روش لیچن‌تالر (Lichtenthaler, 1987) انجام پذیرفت. ۰/ ۲ گرم از برگ‌های تازه گیاه در هاون چینی با ۱۵ میلی‌لیتر استن ۸۰ درصد سائیده شده و پس از صاف کردن، جذب آن‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر مدلUV-2100 در طول موج‌های ٦٤٦/٨، ٦٦٣/٢ و ٤٧٠ نانومتر خوانده شد. از استن ۸۰ درصد به عنوان بلانک استفاده شد. غلظت رنگیزه‌ها با استفاده از رابطه‌های زیر محاسبه گردید.

(کلروفیل a) $Chla = 12.25\ A_{663.2} - 2.79\ A_{646.8}$

(کلروفیل b) $Chlb = 21.21\ A_{646.8} - 5.1\ A_{663.2}$

(کلروفیل کل) $ChlT = Chla + Chlb$

(کاروتنوئید) $Car = (1000A_{470} - 1.8\ Chla - 85.02\ Chlb)/198$

به ترتیب Car ,ChlT ,Chlb ,Chla در این فرمول‌ها غلظت کلروفیلa، غلظت کلروفیل b، غلظت کلروفیل کل و غلظت کاروتنوئیدها (شامل کاروتن‌ها و گزانتوفیل‌ها) است. نتایج حاصل از اندازه‌گیری مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر محاسبه و ارائه گردید.

آنتوسیانین: از روش واگنر (Wagner, 1979) جهت اندازه گیری مقدار آنتوسیانین‌های اندام هوایی استفاده شد. ۰/۱ گرم از اندام هوایی گیاهان در هاون چینی با ۱۰ میلی‌لیتر متانول اسیدی (متانول خالص و اسیدکلریدریک خالص به نسبت حجمی۱:۹۹) کاملاً سائیده و عصاره در لوله‌های آزمایش سر پیچ‌دار ریخته شد و به مدت ٢٤ ساعت در تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دور ٤۰۰۰ توسط سانتریفیوژ مدل itd-2010 قرار داده شد و جذب محلول بالایی با دستگاه اسپکتروفتومتر مدلUV-2100 در طول موج ۵۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. محاسبه غلظت با استفاده از ضریب خاموشی $33000\ cm^{-1}\ M^{-1}$ انجام و نتایج بر حسب

میکرو گرم بر گرم وزن تر ارائه گردید.

اندازه‌گیری مقدار پروتئین کل: برای اندازه‌گیری مقدار پروتئین‌کل در نمونه‌های گیاهی از روش برادفورد (Bradford, 1976) استفاده گردید. در این روش، برای استخراج عصاره پروتئینی، ۰/۰۵گرم از ماده تر گیاهی وزن گردید و ٤ سی‌سی از بافرتریس اسیدکلریدریک به آن اضافه شد. سپس نمونه‌ها روی شیکر مدل ۳۰۰۵ به مدت ۲۰ دقیقه ورتکس گردید. سپس به مدت ۳۰ دقیقه در دور ۵۰۰ توسط دستگاه سانتریفیوژ مدل-itd 2010 سانتریفیوژ گردیدند و فاز بالایی جدا گردید که حاوی پروتئین‌کل است. سپس به ۰/۱ سی‌سی عصاره پروتئینی از هر نمونه ۵ سی‌سی محلول‌برادفورد اضافه شد و سپس به مدت ۲۰ دقیقه ورتکس گردیده و سپس جذب با دستگاه اسپکتروفتومتر مدل UV-2100 در طول موج ۵۹۵ نانومتر یادداشت گردید. سپس با استفاده از غلظت معلوم پروتئین در محلول‌های استاندارد، خط رگرسیون ترسیم شد و با نسبت‌دادن جذب تیمارها با منحنی‌استاندارد، میزان غلظت پروتئین در نمونه‌ها بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر بدست آمد و سپس با تبدیل حجمی به وزنی میزان پروتئین بر حسب میلی‌گرم برگرم نمونه تعیین شد.

فعالیت آنزیم پراکسیداز: ابتدا عصاره آنزیمی بر اساس روش پورقاسمیان و احسان‌زاده (۱۳۹۲) تهیه شد. ۰/۱ گرم نمونه برگی تازه به همراه یک میلی لیتر بافر استخراج شامل: فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار با pH برابر ۷/۸، EDTA ۰/۱ میلی‌مولار و PVP (پلی وینیل پیرولیدون) ۱ ٪ بر روی یخ همگون گردید. سپس عصاره‌ی حاصل در دور ۱٤۰۰۰ g و دمای ٤ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و محلول رویی حاصل در ظرف استریل جمع آوری گردید. محلول رویی بدست آمده به عنوان عصاره‌ی آنزیمی جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز استفاده شدند. به منظور حفظ فعالیت آنزیمی، تمامی مراحل استخراج و اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم بر روی یخ انجام شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌پراکسیداز به روش ریسنده و همکاران (۲۰۰۲) با اندکی تغییرات انجام شد. مخلوط واکنش حاوی ۲/۷۵۰ میلی‌لیتر بافر فسفات‌مونوسدیک (۲۵ میلی‌مولار) با pH برابر ٦/۸، ۱۰۰ میکرولیتر پیروگالول (۱۰ میلی‌مولار)، ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی و ۱۰۰ میکرولیتر آب‌اکسیژنه (٤۰ میلی‌مولار) به حجم نهایی ۳ میلی‌لیتر بود. با اضافه کردن آب اکسیژنه به مخلوط واکنش فعالیت آنزیمی شروع شد. در محلول بلانک به جای آب‌اکسیژنه از آب‌مقطر استفاده گردید. تغییرات جذب نور در اثر تولید پورپوروگالین از پیروگالول در طول موج ٤۲۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت گردید. فعالیت آنزیم پراکسیداز بر اساس ضریب خاموشی برابر با ۲/٤۷ mM^{-1} Cm^{-1} محاسبه گردید (قادری‌فر و همکاران، ۱۳۹۳).

اندازه‌گیری کربوهیدرات: این اندازه‌گیری با روش فنل سولفوریک اسید (Chapin and Kennedy, 1987) انجام گرفت. ۰/۱ گرم از ماده‌ی خشک بخش‌هوایی گیاه که کاملاً پودر شده در ۱۰ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد ریخته شد و پس از یک هفته از بخش روئی محلول ۱ میلی‌لیتر برای بخش‌هوایی برداشته و با آب‌مقطر به ۲ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس به آن ۱ میلی‌لیتر فنل ۵ درصد اضافه و بعد از آن‌که خوب بهم زده شد به آن ۵ میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ افزوده گردید، حدود نیم ساعت پس از خنک شدن کامل محلول، جذب آن توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مدل UV-2100 در طول‌موج ٤۸۵ نانومتر خوانده شد. برای اندازه‌گیری مقدار قند از منحنی استاندارد تهیه شده از گلوکز استفاده شد.

اندازه‌گیری غلظت عنصر مس در نمونه‌های گیاهی: به منظور اندازه‌گیری غلظت عنصر مس ریشه و بخش هوایی گیاه، از روش جذب اتمی استفاده شد (Lozak and Soltyk, 2002). برای این سنجش، ۰/۱ گرم از اندام گیاهی خشک شده هر گلدان با ۲ میلی‌لیتر اسیدنیتریک ٦۰ درصد به مدت یک شبانه‌روز هضم گردیده و سپس در حمام آبی به مدت ۲ ساعت در ۹۰ درجه‌ی سانتی‌گراد گذاشته شدند. پس از سرد شدن به نمونه‌ها ۱ میلی‌لیتر آب‌اکسیژنه اضافه کرده و لوله‌ها را برای نیم‌ساعت در حمام آبی در دمای ۹۰ درجه‌ی سانتی‌گراد گذاشته و پس از سرد شدن نمونه‌ها با آب‌مقطر به حجم ۱۰

میلی‌لیتر رسانده شد و مقادیر مس ریشه و بخش هوایی گیاه با استفاده از دستگاه طیف‌سنج جذب‌اتمی مدل AAS. Shimadzu, 6200 اندازه‌گیری شد. در نهایت آنالیز و تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزارهای SPSS و Excelانجام گردید.

نتایج

اثر غلظت‌های مختلف سولفات‌مس بر برخی شاخص‌های رشد و فیزیولوژیک گیاه مریم‌گلی کبیر در جدول۱ نشان داده شده است.

بر اساس نتایج حاصل از جدول ۱، چنانچه مشاهده می‌شود، اثر تیمار غلظت‌های مختلف سولفات‌مس بر محتوای کاروتنوئیدها، آنتوسیانین‌ها، محتوای مس ریشه، محتوای مس بخش هوایی، کربوهیدارات محلول، پروتئین کل بخش هوایی و فعالیت آنزیم پراکسیداز و نیز کلیه شاخص‌های رشد در سطح آماری ۱ درصد و بر کلروفیل کل در سطح آماری ۵ درصد معنی‌دار می‌باشد. بر این اساس در ادامه، بررسی و مقایسه تفکیکی این اثرات به عمل آمده است (شکل ۱ تا ۳).

مطابق شکل ۱– a، سطح ۲۵ میکرومولار سولفات مس نیز، بدون تفاوت معنی‌دار نسبت به سطوح صفر و ۵ میکرومولار، موجب افزایش معنی‌دار مقدار این شاخص نسبت به دو سطح بالاتر سولفات مس، یعنی سطوح ۵۰ و ۷۵ میکرومولار شده است.

چنانچه مشاهده می‌شود سطوح پایین‌تر سولفات‌مس موجب افزایش نسبی رنگیزه کلروفیل نسبت به دو سطح بالاتر سولفات مس شد. این اثر می‌تواند ناشی از نقش مس در فرآیندهای مرتبط با کلروپلاست باشد. مس یکی از اجزای تشکیل دهنده پروتئین‌کلروپلاست یعنی پلاستوسیانین است. مس جزء جدایی‌ناپذیر آنزیم‌های متعدد انتقال الکترون بوده و در واکنش‌های اکسیداسیون و احیا درون میتوکندری و کلروپلاست شرکت می‌کند (Gaetke and Chow, 2003). همچنین این عنصر در اعمال سلولی مهم از جمله ساخت رنگدانه‌ها و نفوذپذیری غشای پلاسمایی نقش دارد (Bernal *et al.*, 2007).

غلظت‌های بالای مس موجب کاهش معنی‌دار کلروفیل کل در مقایسه با سطوح پایین‌تر سولفات مس گردید. عوامل ایجاد کننده تنش اکسیداتیو، مانند تنش فلزات سنگین ممکن است محتوای کلروفیل را، از طریق برهم‌زدن تعادل در بازگشت پروتئین‌های کمپلکس سیستم نوری۲ (Photosystem II)، کاهش دهند (Laspina *et al.*, 2005). مقادیر سمی فلزات سنگین، با کاهش محتوی رنگیزه‌های فتوسنتزی، تخریب دستگاه فتوسنتزی، تخریب کلروپلاست و یا تغییر ترکیب پروتئین و لیپید غشای تیلاکوئید، فعالیت‌های فتوسنتزی را کاهش می‌دهند (KeShi-Sheng, 2007). گزارش شده است که فلزات سنگین با اتصال به گروه‌های تیولی پروتئین‌های مسیر سنتز کلروفیل، توانایی تخریب و غیرفعال کردن آن‌ها را دارند (Helmy, 2010).

اثر سطوح مختلف سولفات مس بر مقدار کاروتنوئیدهای برگ گیاه مریم‌گلی‌کبیر (شکل ۱– b) نشان می‌دهد که سطوح ۲۵ و ۵۰ میکرومولار سولفات مس بدون تفاوت آماری معنی‌دار نسبت به یکدیگر و سطح ۵ میکرومولار، منجر به افزایش معنی‌دار میزان کاروتنوئیدها (تا حدود ۲٤ درصد)، نسبت به شاهد و سطح ۷۵ میکرومولار گردیده است. همچنین، بیشترین مقدار آنتوسیانین‌های برگ (۸/۵۳ میکروگرم بر گرم) ، مربوط به سطح ۷۵ میکرومولار بوده و در مجموع با افزایش سطح تیمار، آنتوسیانین‌های برگ، نسبت به شاهد افزایش یافت (شکل ۱–c). تأثیر تنش فلزات سنگین در افزایش محتوای کاروتنوئیدها به عنوان بخشی از سیستم آنتی‌اکسیدانی، در گیاهان مختلفی مانند ماش گزارش شده است (Azooz *et al.*, 2011). در برخی از گزارش‌ها، غلظت‌های بالای مس، در مقایسه با سطوح پایین‌تر این عنصر، محتوای کاروتنوئیدهای گیاه را کاهش داده است (Hou *et al.*, 2007; Backer *et al.*, 2004). ترکیب های فنلی، آنتوسیانین‌ها و کاروتنوئیدها عمدتاً گزینه‌ای اصلی جهت مقابله با رادیکال‌های آزاد در تنش‌های مرتبط با فلزات سنگین هستند (Posmyk *et al.*, 2009). آنتوسیانین‌ها به احتمال زیاد باعث تسهیل ورود فلزات سنگین

جدول ۱- آنالیز واریانس اثر پنج سطح سولفات‌مس (صفر، ۵، ۲۵، ۵۰ و ۷۵ میکرومولار) برای، کلروفیل کل، کاروتنوئیدها، آنتوسیانین‌ها، مقدار مس، کربوهیدرات، پروتئین کل، فعالیت آنزیم پراکسیداز، طول ساقه، طول ریشه، سطح برگ، وزن خشک ریشه و وزن خشک بخش-هوایی گیاه مریم‌گلی کبیر *(Salvia sclarea)*.

		میانگین مربعات							
منابع تغییرات	درجه آزادی	کلروفیل کل	کاروتنوئید	آنتوسیانین	مس ریشه	مس بخش هوایی	کربوهیدرات بخش هوایی	پروتئین کل بخش هوایی	فعالیت پراکسیداز برگ
مس	٤	۰/۲۵۷ *	۰/۰۰۹ **	۱/۳۷۵ **	۳۹۷/٦۷۲ **	۳۷۸/۹۰۵ **	۱۳۲/٤۳۱ **	۰/۱۸٦ **	۱/۰۵۱ **
خطا	۱۰	۰/۰٦۰	۰/۰۰۱	۰/۱۵۰	۳/۷٤۵	٤/۰۵۳	۱/۱۵۳	۰/۰۰۰۱	۰/۰۳۹

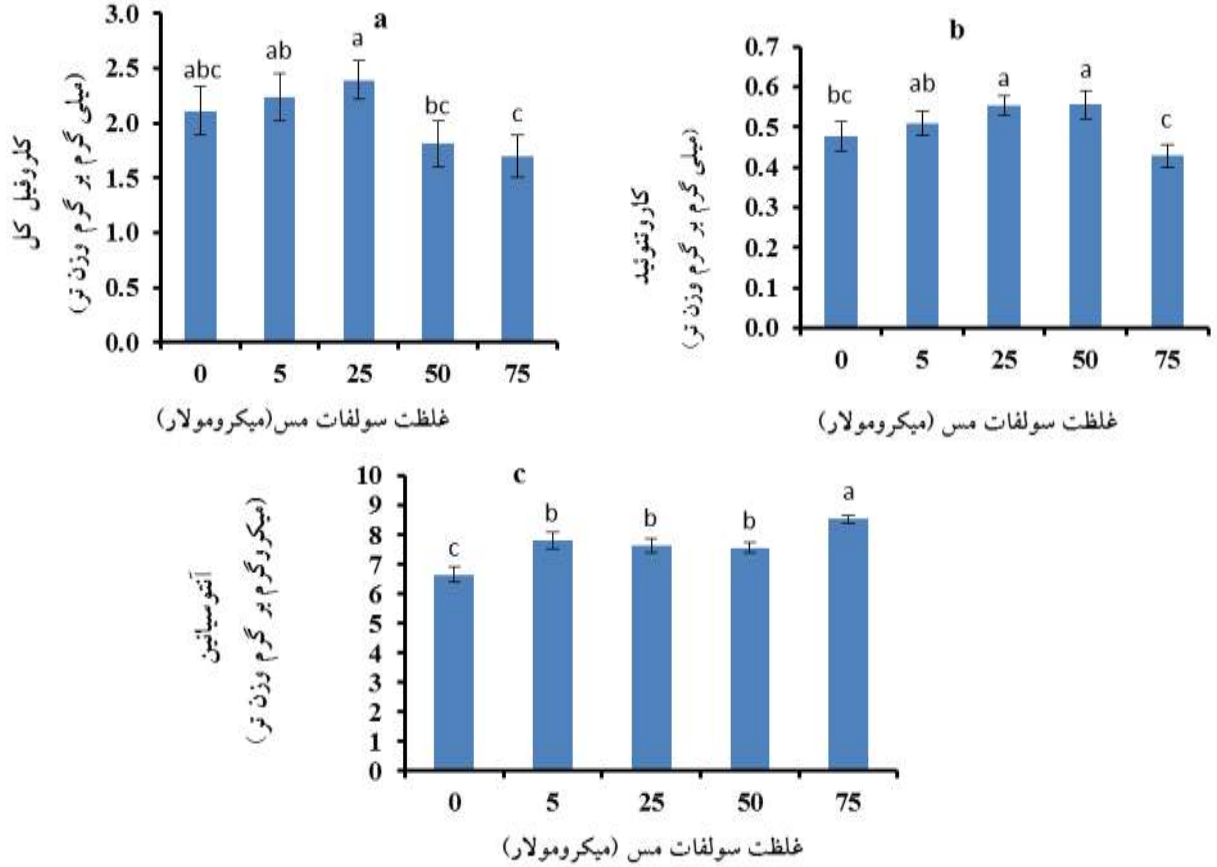
ادامه جدول ۱

		میانگین مربعات				
منابع تغییرات	درجه آزادی	طول ساقه	طول ریشه	سطح برگ	وزن خشک ریشه	وزن خشک بخش هوایی
مس	٤	۱/۱۰۹**	۳۸۵/۸**	۱۲/۱۵**	۰/۰۰٦ **	۰/۰۰۸ **
خطا	۱۰	۰/۰۵۷	۱/۱۳	۰/۰۳۸	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱

*** و ** به ترتیب در سطح ۵ و ۱ درصد معنی‌دار و ns غیر معنی‌دار می‌باشد..**

به واکوئل سلول‌ها و در نتیجه جمع‌آوری آن‌ها از سایر بخش‌ها می‌شوند (Tripathi *et al*., 2006).

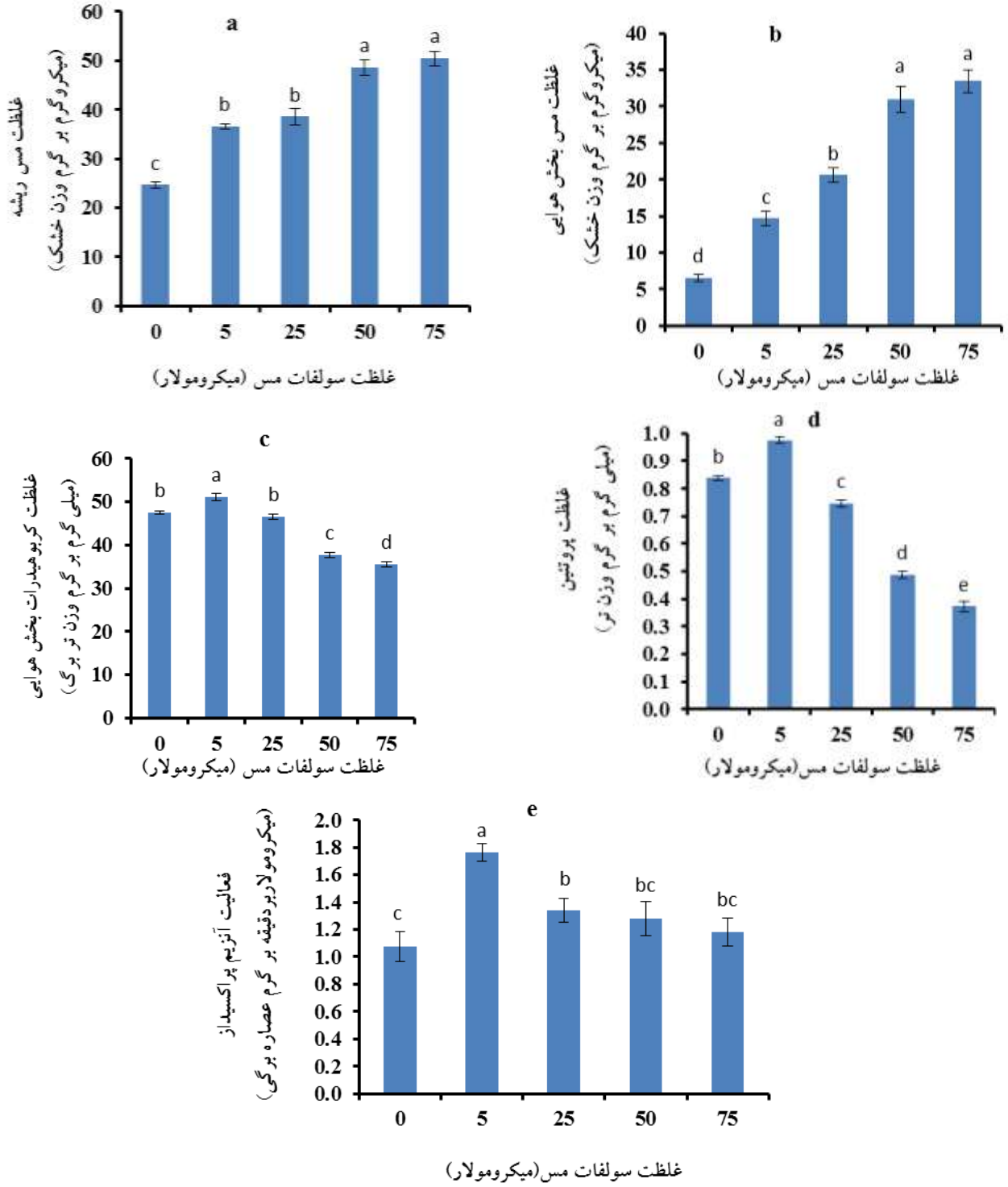
همچنین مطابق شکل ذیل، افزایش سطح سولفات مس در محلول کشت، موجب افزایش معنی‌دار غلظت مس در ریشه و بخش هوایی گیاه، به ترتیب تا حدود ۵۰ و ۸۰ درصد نسبت به شاهد گردیده است. بالاترین غلظت مس در ریشه (۵۰/٤۳ میکروگرم بر گرم وزن‌خشک) و بخش هوایی (۳۳/٤۵ میکروگرم بر گرم وزن‌خشک) در سطح ۷۵ میکرومولار سولفات مس و پایین‌ترین غلظت مس در ریشه (۲٤/٦۳ میکروگرم بر گرم وزن‌خشک) و بخش هوایی (٦/۵ میکروگرم بر گرم وزن‌خشک)، در شاهد مشاهده گردید (شکل ۲- a و b). نتایج نشان‌دهنده‌ی انباشتگی بیشتر مس در ریشه نسبت به بخش هوایی گیاه در سطوح پایین تیمار مس بر خلاف سطوح بالای این تیمار می‌باشد. به عبارت دیگر این گیاه، در سطوح پایین تیمار مس، توانسته بیشتر از سطوح بالاتر تیمار، از انتقال مس به بخش هوایی ممانعت نماید. یکی از ساز وکارهای تحمل به فلز مس در بسیاری از گیاهان از جمله، برخی گون‌ها تجمع آن در ریشه‌هاست. گزارش شده است که ۹۰ درصد کل مس در ریشه‌ها، در ساختار دیواره سلولی، یا در فضای بین دیواره و غشا متمرکز می‌شود (Marschner, 1995; Reichman, 2002; Chaffai *et al*., 2005). ترشح اسیدهای آلی، نگه‌داری مس در ریشه و عدم تحرک آن در دیواره سلولی از جمله راه کارهای گیاهان برای برطرف کردن سمیت مس می‌باشد (Hu *et al*., 2007). از طرفی در سطوح بالاتر مس افزایش محتوای مس در اندام هوایی نسبت به سطوح پایین‌تر مشاهده می‌شود (نظیر یافته‌های این پژوهش)، که این نشان از عدم توانایی گیاه در سطوح بالاتر مس برای مهار انتقال آن به بخش‌هوایی است. از عوامل تأثیرگذار در تجمع فلز در بخش‌های مختلف گیاه، انتقال یون‌های فلزی به اندام هوایی از طریق آوندهای چوبی، توسط انتقال توده‌ای آب، بر اثر تبخیر است (Welch, 1995; Liao *et al*., 2000). در این زمینه بررسی‌ها نشان می‌دهد، در وضعیتی که مقدار فلز زیاد باشد، تعرق می‌تواند در جابجایی یون‌های فلزی نقش بیشتری اعمال کند (Reichman, 2002). بنابراین، میزان تعرق، وضعیت آبی گیاه، pH و پتانسیل احیایی



شکل۱- مقایسه اثر سطوح مختلف سولفات مس در محلول غذایی بر میانگین غلظت کلروفیل‌کل (a)، کاروتنوئید (b) و آنتوسیانین برگ (c) گیاه مریم‌گلی کبیر (*Salvia sclarea*). حروف غیرمشترک نشان می‌دهد اثر تیمارهای مختلف بر شاخص‌های مورد نظر، بر اساس آزمون دانکن معنی‌دار می‌باشد ($P\leq0.05$).

شیره خام می‌تواند مقدار و تحرک یون‌های مس را در آوند چوبی و در نتیجه میزان تجمع آن را در بخش‌های مختلف گیاه، تحت تأثیر قرار دهد (Liao *et al*., 2000). از طرفی دیگر، یکی از مهمترین عوامل در موفقیت گیاه پالایی به عنوان یکی از فن‌آوری های موجود در تمیز کردن محیط زیست، توانایی گیاه در جذب، انتقال و تجمع فلزات سنگین در اندام‌های گیاهی می‌باشد. در این خصوص، گیاهانی که فاکتور انباشت زیستی (نسبت غلظت عنصر در گیاه به غلظت عنصر در محیط) و فاکتور انتقال (نسبت غلظت عنصر در بخش هوایی گیاه به غلظت عنصر در ریشه) بالایی دارند از اهمیت ویژه‌ای برای اهداف گیاه‌پالایی به‌ویژه نوع استخراج گیاهی برخوردارند (Li *et al*., 2007). گیاهان انباشت‌گر و بیش‌انباشت‌گر دارای این ویژگی بوده که مانع جذب فلزات نشده، اما سازوکارهایی را برای از بین بردن سمیت فلزات سنگین بکار می برند. این سازوکارها، انباشت زیستی مقادیر بالای فلزات سنگین را ممکن می‌سازد (Brooks, 1998). با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش، گیاه مریم‌گلی کبیر توانایی اندکی برای انتقال و تجمع مس داشته بنابراین می‌توان اذعان کرد گزینه‌ی مناسبی برای گیاه‌پالایی مس نمی‌باشد.

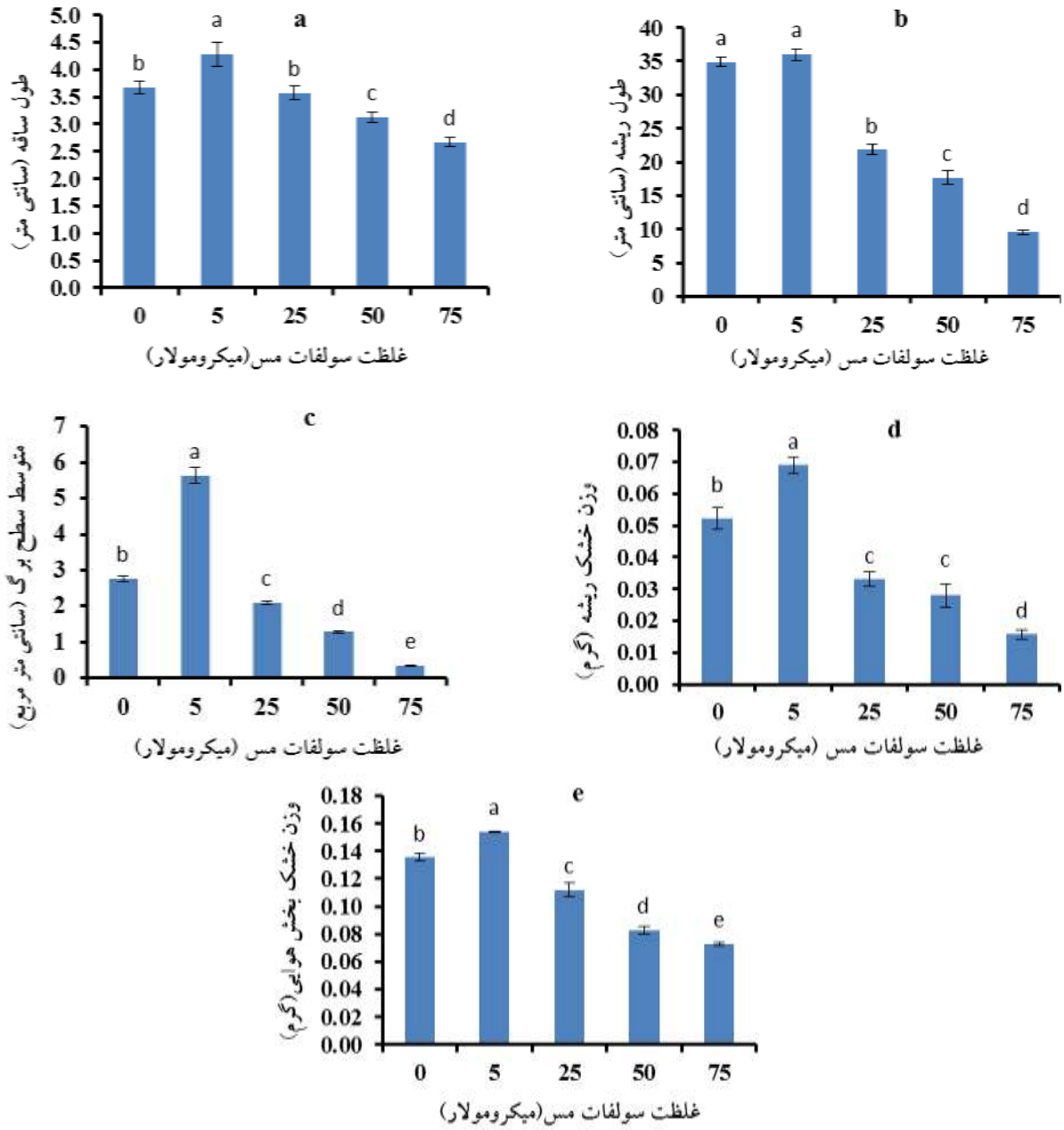
همچنین بر اساس شکل فوق سطح ۵ میکرومولار سولفات مس، منجر به افزایش معنی‌دار محتوای کربوهیدارت محلول بخش هوایی، نسبت به سطح ۲۵، ۵۰ و ۷۵ میکرومولار و نیز شاهد گردیده است. به‌طوریکه بیشترین مقدار کربوهیدارت محلول (۵۱/۰۷ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک)، در سطح ۵ میکرومولار و کمترین آن (۳۵/۵۹ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) در سطح ۷۵ میکرومولار مشاهده شد (شکل ۲- c).



شکل۲- مقایسه اثر سطوح مختلف سولفات مس در محلول غذایی بر غلظت مس ریشه (a)، مس بخش هوایی (b)، کربوهیدرات بخش هوایی (c)، غلظت پروتئین بخش هوایی (d) و فعالیت آنزیم پراکسیداز برگ (e) گیاه مریم‌گلی کبیر (*Salvia sclarea*) حروف غیرمشترک نشان می‌دهد اثر تیمارهای مختلف بر شاخص‌های مورد نظر، بر اساس آزمون دانکن معنی‌دار می‌باشد (P≤0.05).

در این مطالعه، افزایش قندها در پایین‌ترین سطح تیمار سولفات مس مشاهده گردید. محتوای قندهای محلول کل در گیاهانی

نظیر *Hibiscus esculentus* (Azooz *et al.*, 2011) و نخود (Devi *et al.*, 2007)، در پاسخ به تنش فلزات سنگین افزایش



شکل۳- مقایسه اثر سطوح مختلف سولفات مس در محلول غذایی بر میانگین طول ساقه (a)، طول ریشه (b)، متوسط سطح برگ (c)، وزن خشک ریشه (d) و وزن خشک بخش هوایی (e) گیاه مریم‌گلی کبیر (*Salvia sclarea*). حروف غیرمشترک نشان می‌دهد اثر تیمارهای مختلف بر شاخص‌های مورد نظر، بر اساس آزمون دانکن معنی‌دار می‌باشد (P≤0.05).

نشان داده است. از عوامل افزایش قندهای محلول می‌توان افزایش آنزیم‌های تجزیه کننده‌ی قندهای غیرمحلول مانند انورتاز و سوکروز سنتتاز و همچنین کاهش مصرف این قندها را مدنظر داشت (Verma and Dubey, 2001). تجمع قندهای محلول در شرایط تنش، به تنظیم اسمزی درون سلول کمک می‌کند و موجب حفظ و نگهداری مولکول‌های زیستی و غشاها می‌شود. همچنین، گیاه با افزایش قندهای محلول در شرایط تنش، علاوه بر حفظ پتانسیل‌اسمزی قادر خواهد بود تا ذخیره کربوهیدراتی خود را برای متابولیسم پایه سلولی در حد بهینه نگه دارد (Farahat *et al.*, 2007). کاهش سطح

کربوهیدرات‌ها در غلظت‌های بالای فلز سنگینی چون مس (نظیر نتایج این پژوهش در سطوح بالای سولفات مس)، می‌تواند ناشی از مهار فتوسنتز و درنتیجه کاهش سنتز این ترکیبات و یا انحراف متابولیسم به سوی فرآیندهای سنتزی دیگر باشد (Pandey and Tripathi, 2011).

مطابق شکل ۲- d، افزایش غلظت سولفات‌مس در محلول کشت از سطح ۲۵ میکرومولار، موجب کاهش چشمگیر غلظت پروتئین کل بخش هوایی (۶۱/۸۸ درصد) نسبت به سایر غلظت‌ها و شاهد گردیده است. اما سطح ۵ میکرومولار سولفات مس موجب افزایش معنی‌دار شاخص مذکور نسبت به سطوح بالاتر و شاهد گردید و بالاترین سطح پروتئین‌کل بخش هوایی (۰/۹۷۶ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) نیز در این سطح از سولفات مس مشاهده شد. مس به عنوان جزئی از پروتئین‌ها و آنزیم‌های دخیل در انتقال الکترون و واکنش‌های احیایی بوده و در بسیاری از واکنش‌های بیولوژیکی مهم به عنوان یک کوفاکتور آنزیمی و نیز بعنوان یک ناقل الکترون در تنفس و فتوسنتز شرکت می‌نماید (Wilhelm *et al*., 2007).

همچنین دو سطح ۵ و ۲۵ میکرومولار سولفات مس، منجر به افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم پراکسیداز نسبت به شاهد گردید (شکل ۲-e). در برخی از گزارش‌ها، با روندی مشابه با یافته‌های این بخش از پژوهش، افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز برگ‌ها، در پاسخ به تیمار مس مشاهده شد. در گیاه بادرنجبویه (*Melissa officinalis* L.)، تیمار سولفات مس در غلظت‌های مختلف، موجب افزایش معنی‌داری میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان گایاکول‌پراکسیداز، پلی‌فنل‌اکسیداز و پراکسیداز گردید (نادری و همکاران، ۱۳۹۴). بررسی‌ها نشان می‌دهد که مقادیر سمی فلزاتی چون مس، روی و سرب، خود عامل اصلی تولید انواع اکسیژن فعال بوده و بافت‌های گیاهی با سنتز آنتی-اکسیدان‌ها، به مبارزه با آن‌ها می‌پردازند. در این بین، پراکسیدازها نقش عمده‌ای دارند (Posmyk *et al*., 2009). از سویی مطابق نتایج این پژوهش، کاهش نسبی فعالیت آنزیم پراکسیداز از سطح ۲۵ میکرومولار سولفات مس نسبت به سطح ۵ میکرومولار مشاهده گردید. فعالیت آنزیم‌ها در غلظت کم فلزات زیاد و با افزایش غلظت آن‌ها، بعد از گذشت از آستانه‌ای (با توجه به نوع گیاه)، به‌تدریج رو به کاهش می‌گذارد (Cao *et al*., 2004). تأثیر طولانی‌مدت فلزات سنگین ابتدا سبب القاء و افزایش فعالیت آنزیم‌ها به خصوص پراکسیدازها و بعد از آن سبب کاهش فعالیت آنها می‌گردد (Qadir *et al*., 2004).

بر اساس شکل ۳، که اثر تیمار مس بر شاخص‌های رشد مریم‌گلی کبیر را نشان می‌دهد، بلندترین طول ساقه (۴/۲۸ cm)، در سطح ۵ میکرومولار سولفات مس بدست آمد. از طرفی دیگر، افزایش میزان سولفات مس در محلول از سطح ۵۰ میکرومولار به بعد، منجر به کاهش معنی‌دار شاخص مذکور، نسبت به سایر غلظت‌ها و شاهد گردید (شکل ۳ a).

طول ریشه نیز، در سطح ۵ میکرومولار سولفات مس نسبت به شاهد تفاوت معنی‌داری نداشته درحالیکه، با افزایش سطح سولفات مس در محلول از سطح ۲۵ میکرومولار به بعد، کاهش چشمگیر طول ریشه (تا حدود ۷۳ درصد) در مقایسه با شاهد و سطح ۵ میکرومولار مشاهده گردید (شکل ۳- b). بیشترین سطح برگ (۵/۶۴ سانتی‌مترمربع) نیز، در غلظت ۵ میکرومولار سولفات مس بدست آمد. از سطح ۲۵ میکرومولار تیمار، با افزایش غلظت سولفات مس در محلول، کاهش چشمگیر متوسط سطح برگ (تا حدود ۹۴ درصد) نسبت به شاهد و سطح ۵ میکرومولار مشاهده شد (شکل ۳-c). همچنین، سطح ۵ میکرومولار مس باعث افزایش وزن خشک ریشه و بخش‌هوایی نسبت به شاهد گردیده است. افزایش سطح سولفات مس در محلول کشت از سطح ۲۵ میکرومولار، موجب کاهش چشمگیر وزن خشک اندام‌های گیاهی (تا حدود ۵۲ درصد) گردیده است (شکل ۳-d و e). چنانچه مشاهده می‌شود، تنها سطح ۵ میکرومولار سولفات مس، موجب افزایش معنی‌دار طول ساقه، سطح برگ، وزن خشک ریشه و وزن خشک بخش هوایی و عدم تفاوت معنی‌دار طول ریشه نسبت به شاهد گردیده است. به نظر می‌رسد که این سطح سولفات مس، سطح قابل تحمل و یا بهینه این عنصر میکرو برای گیاه مریم‌گلی‌کبیر باشد. نتایج بدست آمده از این

پژوهش، مبنی بر تأثیر مثبت سطح ۵ میکرو مولار مس بر سطح برگ این گیاه، مشابه با برخی از یافته‌های دیگر محققین است (Zehtab-Salmasi *et al*., 2008).

از سویی دیگر، بررسی نتایج حاصل از اثر مس بر اندام‌های مریم‌گلی‌کبیر، نشان دهنده‌ی اثر کاهشی سطوح بالای فلز سنگین مس بر رشد این اندام‌ها می‌باشد. مطابق بررسی‌های انجام شده، از پیامدهای تنش مس می‌توان به کاهش رشد و میزان زیست‌توده اشاره کرد (Xu *et al*., 2006). چنانچه مشاهده می‌شود در غلظت‌های بالای مس کاهش رشد ریشه بیش از کاهش رشد ساقه می‌باشد که نشان دهنده‌ی حساسیت بیشتر رشد ریشه به سطوح بالای مس در مقایسه با رشد اندام هوایی می‌باشد. اثر کاهش بیوماس ریشه و رشد آن در اثر مسمومیت مس در گیاهان، در تحقیقات مشابه نیز گزارش شده است (Xu *et al*., 2006). فلزات سنگین با مهار تقسیم میتوزی و جلوگیری از رشد طولی سلول، سبب مهار رشد ریشه به عنوان اندام اصلی جذب مواد و درنتیجه کاهش رشد ساقه می‌شوند (Shulan *et al*., 2010). البته، کاهش رشد می‌تواند به دلیل ناهنجاری‌های کروموزومی، تقسیم‌سلولی غیرطبیعی و ممانعت از سنتز پروتئین در ریشه باشد (Lux *et al*., 2011).

کاهش معنی‌دار سطح‌برگ تحت سطوح بالای مس در این مطالعه، با نتایج حاصل از بررسی اثر فلز سنگین مس بر روی گسترش برگی ذرت (Mocquot *et al*., 1996) و گیاه *Empetrum nigrum* (Monni *et al*., 2000) دارای روندی مشابه است. با افزایش غلظت مس، شاخص میتوزی کاهش و وضعیت غیرعادی میتوز افزایش می‌یابد که این امر به نوبه خود موجب کاهش رشد طولی و سطح اندام‌های گیاهی از جمله سطح برگ می‌گردد (Panou -Filotheou *et al*., 2001).

غلظت زیاد مس در محلول غذایی موجب کاهش وز تر و خشک ریشه و اندام هوایی *Bentgrass* (Faust and Christians, 2000)، ذرت (Chaffai *et al*., 2005)، آفتابگردان (El-Tayeb *et al*., 2006)، برنج (Xu *et al*., 2006) و همچنین کاهش رشد ریشه و ساقه در گیاه علفی *Chloris gayana* شده است (Sheldon and Menzies, 2004). مهار رشد گیاهان در حضور مس به اختلال در وضعیت آب سلول، میتوز، چرخه سلولی، سخت شدن دیواره سلولی (El-Tayeb and El-Enany, 2006)، به‌هم خوردگی تعادل هورمونی (Groppa *et al*., 2007)، کاهش محتوای نیتروژن (Xiong *et al*., 2006)، کاهش محتوای پتاسیم و نرخ فتوسنتز (Guo *et al*., 2006)، انباشتگی اسیدهای‌فنولی آزاد (Gorecka *et al*., 2007) و کاهش سطح برگ (Alaoui-Sosse *et al*., 2004) نسبت داده شده است.

نتیجه‌گیری

با توجه به مقادیر مس جذب شده و تجمع آن در ریشه و اندام هوایی گیاه، به نظر می‌رسد که گیاه مریم‌گلی کبیر، گیاهی با مقاومت نسبی در مقابل تنش ملایم ناشی از افزایش فلز مس باشد. افزایش قندهای محلول، پروتئین کل، کاروتنوئیدها و آنتوسیانین‌ها، می‌تواند به عنوان ویژگی‌های سازشی این گیاه در مقابل این سطح از تنش مس محسوب گردد. در مجموع، با توجه به کاهش اکثر شاخص‌های رویشی و بیوشیمیایی گیاه مریم‌گلی‌کبیر، به خصوص در سطوح بالای سولفات مس (۵۰ و ۷۵ میکرومولار)، می‌توان اذعان داشت که این گیاه یک گونه حساس به تنش فلز سنگین مس می‌باشد.

منابع

پورقاسمیان، ن. و احسان زاده، پ. (۱۳۹۲) بررسی پاسخ‌های آنتی اکسیداتیو به آلودگی کادمیومی خاک و ارتباط آن با برخی صفات فیزیولوژیکی در ژنوتیپ‌های گلرنگ. مجله فرایند و کارکرد گیاهی ۲: ۳۱-۱۵.

چلبیان، ف.، نوروزی، ح. و موسوی، س. (۱۳۸۲) بررسی اثرات ضد میکروبی اسانس ۷ گونه‌ی گیاهی از تیره‌های مختلف بر روی برخی باکتری‌های بیماری‌زا. فصلنامه گیاهان دارویی ۷: ۴۱-۳۷.

مظفری بازرگان، ع. (۱۳۸۳) جداسازی و شناسایی عوامل همبند کننده عناصر سنگین در تعدادی از گونه‌های انباشته گر این عناصر. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز ، ایران.

تایز، ل. و زایگر، ا. (۱۳۸۸) فیزیولوژی گیاهی. گروه مترجمین، انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد. مشهد.

قادری‌فر، ف.، سلطانی، ا. و صادقی‌پور، ح. ر. (۱۳۹۳) تغییرات بیوشیمیایی طی زوال بذرهای کدوی تخم‌کاغذی. پراکسیداسیون لیپید و صدمات غشا. مجله زیست‌شناسی گیاهی ایران ٦: ۱۱۲-۹٦.

مهدویان، ک.، قربانلی، م.، منوچهری کلانتری، خ. و محمدی، غ. (۱۳۸۵) تأثیر باندهای مختلف اشعه ماوراء بنفش بر عوامل فیزیولوژیکی و ریخت‌شناسی فلفل (*Capsicum annuum* L.). مجله زیست‌شناسی ایران ۳۳: ۵۳-٤۳.

نادری، ص.، خواجه، ح. و احمدی، ح. (۱۳۹٤) تأثیر غلظت‌های مختلف سولفات مس ($CuSO_4$) بر برخی پارامترهای فیزیولوژیک بادرنجبویه (*Melissa officinalis* L.). فصلنامه اکوفیزیولوژی گیاهان زراعی ۱: ۵۳- ۳۸.

هاپکینز، و. (۱۳۸۸) مقدمه‌ای بر فیزیولوژی گیاهی. (ترجمه احمدی، ع.، احسان‌زاده، پ. و جباری، ف). جلد اول، انتشارات دانشگاه تهران. تهران.

Alaoui-Sosse, B., Genet, P., Vinit-Dunand, F., Toussaint, M. L., Epron, D. and Badot, P. M. (2004) Effect of Copper on growth in cucumber plants (*Cucumis sativus*) and its relationships with carbohydrate accumulation and changes in ion contents. Plant Science 166: 1213-1218.

Anjum, N. A., Duarte, A. C., Pereira, E., and Ahmad, I. (2015) Plant-beneficial elements status assessment in soil-plant system in the vicinity of a chemical industry complex: shedding light on forage grass safety issues. Environmental Science and Pollution Research 22: 2239–2246.

Azooz, M. M., Youssef, M. M. and Al-Omair, M. A. (2011) Comparative evaluation of Zinc and lead and their synergistic effects. Environmental and Experimental Botany 61: 67-174.

Backer, M., Fahselt, D. and Wu, C. T. (2004) Free proline content is positively correlated whit Copper tolerance of the lichen photobiont *Trebouxia ericia* (Chlorophyta). Plant Science 167: 151-157.

Berglund, H., Quartacci, M. F. and Liljenberg, C. (2000) Changes in plasma-membrane lipidcomposition: a strategy for acclimation to Copper stress. Biochemical Society Transactions 28: 905-908.

Bernal, M., Cases, R., Picorel, R. and Yruela, I. (2007) Foliar and root Cu supply affect differently Fe and Zn uptake and photosynthetic activity in soybean plants. Environmental and Experimental Botany 60: 145-150.

Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.

Brooks, R. R. (1998) Plants that hyperaccumulate heavy metals, CAB International, U.S.A.

Cao, X. Ma, L. Q. and Tu, C. (2004) Antioxidative responses to arsenic in the arsenic-hyperaccumulator Chinese brake fern (*Pteris vittata* L.). Environmental Pollution 128: 317-325.

Chaffai, R., Tekitek, A. and El-Ferjani, E. (2005) Comparative effects of Copper and Cadmium on growth and lipd content in maize seedlings (*Zea mays* L.). Pakistan Journal of Biological Sciences 8: 649-655.

Chapin, M. F. and Kennedy, J. F. (1987) Carbohydrate analysis: A practical approach. Oxford University: IRL Press.

Devi, R., N. Munjral, A. K. Gupta, and Kaur, N. (2007) Cadmium induced changes in carbohydrate status and enzymes of carbohydrate metabolism, glycolysis and pentose phosphate pathway in pea. Environmental and Experimental Botany 61: 67-174.

Devlin, E. and Witham, A. (2002) Heavy metal tolerance in plants. Plant Physiology 21: 149-150.

El-Tayeb, M. A., El-Enany, A. E. and Ahmed, N. L. (2006) Salicylic acid-induced adaptive response to Copper stress in Sunflower (*Helianthus annuus* L.). Plant Growth Regulation 50: 191-199.

Farahat, M. M., Ibrahim, M. M. S., Taha, L. S. and El-Quesni E. M. F. (2007). Response of vegetative growth and some chemical constituents of *Cupressus sempervirens* L. to foliar application of ascorbic acid and Zinc at Nubaria. World Journal of Agricultural Sciences 3: 282-288.

Faust, M. B. and Christians, N. E. (2000) Copper reduces shoot growth and root development of creeping bentgrass. Crop Science 40: 498-502.

Gaetke, L. M. and Chow, C. K. (2003) Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. Toxicology 189: 147-197.

Gorecka, K., Cvikrova, M., Kowalska, U., Eder, J., Ska, K., Gorecki, R. and Janas, K. M. (2007) The impact of Cu treatment on phenolic and polyamine levels in plant material regenerated from embryos obtained in anther culture of carrot. Plant Physiology and Biochemistry 45: 54-61.

Groppa, M. D., Tomaro, M. L., Benarides, M. P. (2007). Polyamines and heavy metal stress: the antioxidant behavior of spermine in cadmium and copper treated wheat leaves. Biometals 20: 185-195.

Guo, Y., Sun, X. Z., Song, X. L., Wang, Q. C., Li, Y. J. and Chen, S. Y. (2006) Effects of potassium nutrition on growth and leaf physiological characteristics at seedling stage of cotton. Plant Nutrition and Fertilizer Science 12: 363-368.

Helmy, L. H. (2010) The influence of nickel sulphate on some physiological aspects of two cultivars of *Raphanus Sativus* L. Archives Biology Science Belgrade 62: 683-691.

Hou, W., Chen, X., Song, G., Wang, Q. and Chang, C. (2007) Effects of Copper and Cadmium on heavy metal polluted waterbody restoration by duckweed (*Lmna minor*). Plant Physiology and Biochemistry 45: 62-69.

Hu, K. D., Hu, L. Y., Li, Y. H., Zhang, F. Q. and Zhang, H. (2007) Protective roles of Nitric oxide on germination and antioxidant metabolism in wheat seeds under Copper stress. Plant Growth Regulation 53: 173-183.

Jarup, L. (2003) Hazards of heavy metal contamination. British Medical Bulletin 68: 167-182.

KeShi-Sheng, W. S., Xiong, Z. T., Chen, S. J. and Chen, J. J. (2007) Effects of Copper and mineral nutrition on growth, Copper accumulation and mineral element uptake in two *Rumex japonicas* populations from a Copper mine and an uncontaminated field sites. Environmental and Experimenta Botany 59: 59-67.

Khan, A. G. (2006) Mycorrhiza remediation-an enhanced from of phytoremediation. Science 87: 503-514.

Kovalchuk, O., Titov, V., Hohn, B. and Kovalchuk, I. (2001) A sensitive transgenic plant system to detect toxic inorganic compounds in the environment. Nature Biotechnology 6: 568-572.

Laspina, N. V., Groppa, M. D. and Benavides, M. P. (2005) Nitric oxide protects sunflower leaves against Cd-induced oxidative stress. Plant Science 169: 323-330.

Liao, M. T., Hedley, M. J., Woolley, D. J., Brooks, R. and Nichols, M. A. (2000) Copper uptake and translocation in chicory (*Cichorium intybus* L. cv Grasslands Puna) and tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv Rondy) plants grown in NFT system. II. The role of nicotianamine and histidine in xylem sap Copper transport. Plant and Soil 223: 243-252.

Lichtenthaler, H. K. (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigmants of photosynthetic biomembranes. Methods in Enzymology 148: 350-382.

Li, M. S., Luo, Y. P. and Su, Z. Y. (2007) Heavy metal concentrations in soils and plant accumulation in a restored manganese mine land in Guangxi, South China. Environmental Pollution 147: 68–75.

Lozak, A. and Soltyk, K. (2002). Determination of selected trace elements in herbs and their influence. Science of the Total Environment 289: 33-40.

Lux, A., Martinka, M., Vaculik, M. and White, P. J. (2011) Root responses to Cadmium in the rhizosphere: a review. Journal of experimental botany 62: 21-37.

Marschner, H. (1995) Mineral Nutrition of Higher Plants. Academic Press, London.

Mac-Adam, J. W., Nelson, C, J. and Sharp, R. E. (1992) Peroxidase activity in the leaf elongation zone of tall fescue. Plant Physiology 99: 872-878.

Mocquot, B., Vangronsveld, J., Clijsters, H. and Mench, M. (1996) Copper toxicity in young maize (*Zea mays* L.) plants: Effects on growth, mineral and chlorophyll contents and enzyme activities. Plant and Soil 182: 287-300.

Molassiotis, A., Tanoug, G. and Patakas, A. (2005) Effects of 4–month Fe deficiency exposure on Fe reduction mechanism, photosynthetic gas exchange chlorophyll fluorescence and antioxidant defense in two peach rootstocks differing in Fe deficiency tolerance. Jurnal Plant Nutrition 25: 843-860.

Monni, S. Salemaa, M. and Millar, N. (2000) The tolerance of *Empetrum nigrum* to Copper and Nickel. Environmental Pollution 109: 221-229.

Nagajyoti, P. C., Lee, K. D. and Sreekanth, T. V. M. (2010) Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. Environmental Chemistry Letters 8: 199–216.

Ouzounidou, G., Moustakase, M. and Lannoye, R. (1995) Chlorophyll fluorescence and photoacoustic characteistics in relationship to changes in chlorophyll and Ca content of a Cu-tolerant *silene compacta* ecotype under Cu treatment. Physiologia Plantarum Journal 93: 551-557.

Ouzounidou, G., Moustakes, M. and Eleftherions, E. P. (1997) Physiological and ultrastructural effects of Copper on wheat (*Triticum aestivum* L.) Leaves. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 32: 154-160.

Pandey, P. and Tripathi, A. K. (2011) Effect of heavy metals on morphological and biochemical characteristics of *Albizia procera* (Roxb.) Benth. Seedlings. International Journal of Environmental Sciences 5: 1009-1018.

Panou-Filotheou, H., Bosabalidis, M. and Karataglis, S. (2001) Effects of Copper toxicity on leaves of oregano (*Origanum vulgare* subsp. hirtum). Annals of Botany 88: 207-214.

Parker, D. R. and Norvell, W. A. (1999) Advances in solution culture methods for plant mineral nutrition research. Advances in Agronomy 65: 151-213.

Posmyk, M. M., Kontek, R. and Janas, K. M. (2009) Antioxidant enzymes activity and phenolic compounds content in red cabbage seedlings exposed to Copper stress. Ecotoxicology and Environmental safety 72: 596-602.

Qadir, S. Qureshi, M. I. Javed, S. and Abdin, M. Z. (2004) Genotypic variation in phytoremediation potential of *Brassica juncea* cultivars exposed to Cd stress. Plant Science 167: 1171-1181.

Reichman, S. M. (2002) The responses of plants to metal toxicity: A review focusing on Copper, Manganese and Zinc. The Australian Minerals and Energy Environment Foundation 13: 1-54.

Resenda, M. L. V., Nojosa, G. B. A., Cavalcanti, L. S., Aguilar, M. A. G., Silva, L. H. C. P., Perez, J. O., Andrade, G. C. G., Carvalho, G. A. and Castro, R. M. (2002) Induction of resistance in cocoa against crinipellis perniciosa and verticillium dahliae by acibenzolar-s-methyl (ASM). Plant Pathology 51: 621-628.

Rubio, C., Lucas, J. R. D., Gutierrez, A. J., Glez-Weller, D., Perez Marrero, B., Caballero, J. M., Revert, C. and Hardisson, A. (2012) Evaluation of metal concentrations in mentha he bal teas (*Mentha piperita* L. *Mentha pulegium* L. and *Mentha species*) by inductively coupled plasma spectrometry. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis 71: 11-17.

Sathawara, N. G., Parikh, D. J. and Agarwal, Y. K. (2004) Essential heavy metals in environmental samples from western India. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 73: 756-761.

Sebastiani, L., Scebba, F. and Tognetti, R. (2004). Heavy metal accumulation and growth responses in poplar clones Eridano (*Populus deltoides maximowiczii*) and I-214 (*P. euramericana*) exposed to industrial waste. Environmental and Experimental Botany 52: 79-88.

Sheldon, A. and Menzies, N. W. (2004) The effect of Copper toxicity on the growth and morphology of Rhodes grass (*Chloris gayana*) in solution culture. Journal of American Science 8: 1-8.

Shulan, Z., Qing, L., Yanting, Q. and Lian, D. (2010). Responses of root growth and protective enzymes to Copper stress in turf grass. Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica 52: 7–11.

Singh, A., Parihar, P., Singh, R., and Prasad, S. M. (2016). An assessment to show toxic nature of beneficial trace metals: too much of good thing can be bad. International Journal of Current Multidisciplinary Study 2: 141–144.

Tani, F. H. and Barrington, S. (2005) Two Zinc and Copper uptake by plants undertranspiration rates. Part I. wheat (*Triticum aestivum* L.).

Tewari, R. K., Kumar, P. and Sharma, P. N. (2006) Antioxidant responses to enhanced generation of superoxide anion radical and hydrogen peroxide in the Copper-stressed mulberry plants. Planta 223: 1145–1153.

Topcu, G. (2006). Bioactive triterpenoids from *Salvia species*. Jurnal of Natural Production 69: 482-487.

Tripathi, B. N., Mehta, S. K., Amar, A. and Gaur, J. P. (2006) Oxidative stress in *scenedemus* sp. during short and long-term exposure to Cu and Zn. Chemosphere 62: 538-544.

Verma, S. and Dubey, R. S. (2001) Effect of Cadmium on soluble sugars and enzymes of hair metabolism in rice. Biologia Plantarum 1: 117-123.

Wagner, G. J. (1979) Content and vacuole/extra vacuole distribution of neutralsugars, free amino acids and anthocyanins in protoplasts. Plant Physiology 64: 88-93.

Welch, R. M. (1995) Micronutrient nutrition of plants. Critical Reviews in Plant Science 14: 49-82.

Wilhelm, M., Eberwein, G., Holzer, J., Gladtke, D., Angerer, J. and Marczynski, B. (2007) Influence of industrial sources on children's health–Hot spot studies in North Rhine Westphalia, Germany. International Journal of Hygiene and Environmental Health 210: 591–599.

Xiong, Z. T., Liu, C. and Geng, B. (2006) Phytotoxic effects of Copper on Nitrogen metabolism and plant growth in (*Brasica pekinensis* Rupr). Ecotoxicology and Environmental Safety 64: 273-280.

Xu, J., Yang, L., Wang, Z., Dong, G., Huang, J. and Wang. Y. (2006) Toxicity of Copper on rice growth and accumulation of Copper in rice grain in Copper contaminated soil. Hemosphere 62: 602–607.

Yadav, S. (2010) Heavy metals toxicity in plants. An overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. South African Journal of Botany 76: 167-179.

Zaidi, M. I., Asrar, A., Mansoor, A. and Farooqui, M. A. (2005) The heavy metal concentrations along roadside trees of Quetta and its effects on public health. Journal of Applied Sciences 5: 708–711.

Zehtab-Salmasi, S., Heidari, F. and Alyari, H. (2008) Effects of microelements and plant density on biomass and essential oil production of peppermint (*Mentha Piperita* L.). Plant Science Research 1: 24-26.

Investigation of copper effect on some physiological and biochemical characteristics of *Salvia sclarea* L.

Mahnaz Parandvar and Asemaneh Tahmaseb*
Department of Biology, Faculty of Science, Yasouj University.
(Received: 16/08/2017, Accepted: 26/12/2017)

Abstract

At presents, accumulation of heavy metals in water and soil is considered as an important factor of environmental pollution. Copper accumulation in the environment, resulting of application of fertilizers, fungicides and industrial and urban activities, leads to toxicity and adverse effects of this heavy metal on many biological processes of plants. Phytoremediation, is an effective and affordable way for extraction, stabilization and detoxification of heavy metals such as copper. Therefore, in this study, effects of different levels of $CuSO_4$ (0, 5, 25, 50 and 75 µM) on *S. sclarea* growth and physiological and biochemical aspects of seedlings were investigated, in hydroponic culture, in a completely randomized design. The effect of copper sulfate levels higher than 5 µM, were incremental and significant on leaves carotenoids and anthocyanins content, while were not significant on total chlorophyll content. These levels of $CuSO_4$ decreased the most of plant growth characteristics including fresh and dry weight of plant organs, stem and root length, leaf area, soluble carbohydrates, protein content and peroxidase activity of *S. sclarea*, while, 5 µM $CuSo_4$ concentration, increased all of the above-mentioned parameters. The results showed that, shoot copper concentrations increased linearly and significantly, with increasing levels of copper sulfate in nutrient solotion, while root copper concentrations increased, with lower ratio. In overall, it seemed that *S. sclarea* had relatively resistance to low level and was sensitive to intermediate and high levels of copper stress. So, it is not recommended as suitable plant species for copper phytoremediation.

Kay words: Copper sulfate, Heavy metals, Physiological charactristics, *Salvia sclarea*.

***Email of corresponding author: asemaneh@yu.ac.ir**