تنش‌های محیطی در علوم زراعی
Environmental Stresses in Crop Sciences
جلد دوازدهم، شماره اول، بهار ۱۳۹۸
۳۱۹-۳۲۹
http://dx.doi.org/10.22077/escs.2018.1196.1245

اثر پیش‌تیمار بذر لوبیا (*Phaseolus vulgaris* L.) با پرولین و گلایسین بتائین در تحمل به تنش سرب

امید صادقی پور

دانشیار گروه زراعت، واحد یادگار امام خمینی (ره) شهر ری، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۶/۰۹/۲۱؛ تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۰/۲۶

چکیده

به‌منظور بررسی مقایسه‌ای اثر پیش‌تیمار بذر لوبیاچیتی با پرولین و گلایسین بتائین در تحمل به تنش سرب آزمایشی گلدانی در بهار و تابستان سال ۱۳۹۴ انجام شد. این تحقیق به‌صورت طرح کاملاً تصادفی با شش تیمار و چهار تکرار اجرا گردید. تیمارها عبارت بودند از: شاهد، تنش سرب (۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک نیترات سرب)، تنش سرب + پیش‌تیمار بذر با محلول ۲۵ میلی‌مولار پرولین، تنش سرب + پیش‌تیمار بذر با محلول ۵۰ میلی‌مولار پرولین، تنش سرب + پیش‌تیمار بذر با محلول ۲۵ میلی‌مولار گلایسین بتائین و تنش سرب + پیش‌تیمار بذر با محلول ۵۰ میلی‌مولار گلایسین بتائین. نتایج نشان داد که تنش سرب موجب افزایش غلظت سرب ریشه و خسارت اکسیداتیو به بوته‌های لوبیا گردید. سمیت سرب همچنین موجب کاهش شاخص سبزینگی، محتوی نسبی آب، ارتفاع بوته، سطح برگ و زیست‌توده ریشه و اندام هوایی شد. بااین‌وجود، در شرایط تنش سرب، پیش‌تیمار بذر با پرولین یا گلایسین بتائین موجب کاهش جذب سرب، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت و کاهش خسارت اکسیداتیو گردید که باعث بهبود شاخص سبزینگی، محتوی نسبی آب، ارتفاع بوته، سطح برگ و زیست‌توده ریشه و اندام هوایی شد. بین تیمارهای مختلف کاربرد پرولین و گلایسین بتائین اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. بر اساس یافته‌های این پژوهش، پیش‌تیمار بذر با پرولین یا گلایسین بتائین می‌تواند از طریق کاهش جذب سرب، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت و بهبود شاخص سبزینگی و وضعیت آبی گیاه، به‌عنوان روشی مفید در بهبود تحمل به تنش سرب در لوبیا مورداستفاده قرار گیرد.

***واژه‌های کلیدی*: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت، شاخص سبزینگی، فلزات سنگین، محلول‌های سازگار**

مقدمه

آلودگی فلزات سنگین در حال تبدیل‌شدن به یک مشکل جدی برای زمین‌های کشاورزی و یک تهدید بزرگ برای پایداری زیست‌بوم‌های زراعی است. سرب یکی از خطرناک‌ترین فلزات سنگینی است که ازنظر سمیت و وقوع، دومین فلز سنگین پس از آرسنیک محسوب می‌شود (Ashraf et al., 2017a). منابع آلوده‌کننده خاک به سرب را می‌توان به سه گروه فعالیت‌های صنعتی مانند فرایندهای معدن‌کاوی و ذوب‌کاری، فعالیت‌های کشاورزی شامل: کاربرد سموم، کودهای شیمیایی و فاضلاب و فعالیت‌های شهری از قبیل استفاده از بنزین حاوی سرب، مواد رنگی و سایر مواد شیمیایی گروه‌بندی نمود. باوجودآنکه سرب نقشی ضروری در متابولیسم گیاه ایفا نمی‌کند اما به‌راحتی جذب آن شده و موجب بروز اثرات نامطلوب ظاهری، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در گیاه می‌گردد (Pourrut et al., 2011; Mahdavian et al., 2016). سرب باعث ایجاد اختلال در فعالیت‌های آنزیمی، به هم خوردن تعادل آبی و هورمونی، اختلال در جذب عناصر غذایی، کاهش تقسیم سلولی، تولید گونه‌های اکسیژن فعال (Reactive Oxygen Species, ROS) و خسارت اکسیداتیو به غشاها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک، تخریب رنگ‌دانه‌ها، کاهش فتوسنتز، تعرق و تنفس

* نگارنده پاسخگو: امید صادقی‌پور. پست الکترونیک: osadeghipour@yahoo.com

و درنهایت کاهش رشد و عملکرد گیاه می‌شود (Chen et al., 2017; Hussain et al., 2017; Khan et al., 2016a).

گیاهان جهت مقابله با تنش فلزات سنگین سازوکارهای مختلفی را در خود توسعه داده‌اند که یکی از آن‌ها تجمع محلول‌های آلی سازگار[1] است. پرولین به‌عنوان یک اسیدآمینه و گلایسین بتائین به‌عنوان یک ترکیب آمونیومی چهارگانه ازجمله معمول‌ترین محلول‌های سازگاری هستند که در طیف وسیعی از گیاهان دیده می‌شوند. افزایش انباشت پرولین و گلایسین بتائین در گیاهان، همبستگی زیادی با تحمل به تنش دارد. اهمیت این دو ماده در بهبود تحمل به تنش‌های محیطی ازجمله فلزات سنگین در گیاهان مختلف، به نقش آن‌ها در محافظت از غشاهای زیستی، پروتئین‌ها و آنزیم‌ها، تنظیم اسمزی، حفظ خودتعادلی اکسیداسیون و احیای سلول و پاک‌سازی رادیکال‌های آزاد نسبت داده شده است (Islam et al., 2009; Rasheed et al., 2014). گزارش‌های زیادی وجود دارد مبنی بر این‌که کاربرد خارجی پرولین و گلایسین بتائین موجب افزایش تحمل گیاهان به تنش‌های غیر زیستی می‌شود (Ashraf and Foolad, 2007; Hasanuzzaman et al., 2014; Osman, 2015). کاربرد خارجی پرولین و گلایسین بتائین از طریق تجمع ترکیبات فنولی، جلوگیری از تخریب کلروفیل، کاهش میزان مالون دی‌آلدئید و H_2O_2 موجب افزایش تحمل بوته‌های دو رقم گندم بهاره به سمیت کادمیوم گردید (Rasheed et al., 2014). خیساندن بذرهای لوبیا در محلول پرولین با افزایش محتوای پرولین داخلی گیاه، رنگ‌دانه‌های فتوسنتزی و محتوی نسبی آب و همچنین کاهش خسارت اکسیداتیو باعث بهبود تحمل گیاه به تنش سلنیوم شد (Aggarwal et al., 2011). کاربرد پرولین با بهبود ویژگی‌های فتوسنتزی، پتانسیل آبی و اجزای عملکرد نخود، تحمل این گیاه به تنش کادمیوم را بهبود بخشید (Hayat et al., 2013). افزودن گلایسین بتائین به محلول غذایی، گیاهچه‌های پنبه را در برابر تنش سرب محافظت نمود. این امر در اثر کاهش جذب سرب، نشت غشاء و مالون دی‌آلدئید و هم‌چنین افزایش ساخت کلروفیل، سرعت فتوسنتز و تشدید فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت اتفاق افتاد (Bharwana et al., 2014). محلول‌پاشی برگی گلایسین بتائین با کاهش تجمع کروم و نشت غشاء و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان موجب افزایش میزان کلروفیل و رشد بوته‌های ماش در شرایط تنش کروم گردید (Jabeen et al., 2016).

باوجودآنکه تحقیقات زیادی در مورد تأثیر کاربرد پرولین و گلایسین بتائین در افزایش تحمل گیاهان مختلف به تنش‌های غیر زیستی ازجمله فلزات سنگین انجام‌شده بااین‌حال اطلاعات بسیار محدودی در خصوص نقش این دو ماده در بهبود تحمل به سمیت سرب در گیاه لوبیا در دسترس است، لذا آزمایش حاضر به‌منظور مطالعه اثر پیش‌تیمار بذر لوبیاچیتی با پرولین و گلایسن بتائین در تحمل به تنش سرب، طراحی و اجرا گردید.

مواد و روش‌ها

به‌منظور بررسی مقایسه‌ای اثر پیش‌تیمار بذر لوبیاچیتی رقم تلاش با پرولین و گلایسین بتائین در تحمل به تنش سرب، آزمایشی گلدانی در محیط باز طی بهار و تابستان سال ۱۳۹۴ در جنوب تهران با مختصات طول جغرافیایی ۵۱ درجه و ۲۸ دقیقه، عرض جغرافیایی ۳۵ درجه و ۳۵ دقیقه و ارتفاع ۱۰۰۰ متر از سطح دریا انجام شد. این منطقه دارای اقلیمی خشک با تابستانی گرم و خشک و زمستانی سرد و خشک است. میانگین دما و بارندگی بلندمدت آن به ترتیب ۲۰/۴ درجه سانتی‌گراد و ۲۰۱/۷ میلی‌متر است. این تحقیق به‌صورت طرح کاملاً تصادفی با شش تیمار و چهار تکرار اجرا شد. تیمارها شامل این سطوح بودند: (۱) شاهد (عدم کاربرد سرب، پرولین و گلایسین بتائین)، (۲) تنش سرب (۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک نیترات سرب)، (۳) تنش سرب + پیش‌تیمار بذر با محلول ۲۵ میلی‌مولار پرولین، (۴) تنش سرب + پیش‌تیمار بذر با محلول ۵۰ میلی‌مولار پرولین، (۵) تنش سرب + پیش‌تیمار بذر با محلول ۲۵ میلی‌مولار گلایسین بتائین، و (۶) تنش سرب + پیش‌تیمار بذر با محلول ۵۰ میلی‌مولار گلایسین بتائین.

هر گلدان پلاستیکی با قطر و ارتفاع ۵۰ سانتی‌متر حاوی ۱۵ کیلوگرم خاک به نسبت مساوی از خاک زراعی، کود دامی کاملاً پوسیده و خاک‌برگ بود. به‌منظور انجام زهکشی مناسب، کف هر گلدان چند سوراخ ایجاد و چند سانتی‌متر سنگریزه ریخته شد. ویژگی‌های خاک گلدان‌ها قبل از اعمال تیمارها در جدول ۱ ارائه شده است.

[1]- Organic Compatible Solutes

جدول ۱. ویژگی‌های خاک گلدان‌ها

Table 1. Soil characteristics of pots

بافت خاک Soil texture	سرب Pb (mg kg^{-1})	پتاس قابل‌دسترس Ava. K (ppm)	فسفر قابل دسترس Ava. P (ppm)	نیتروژن کل Total N (%)	کربن آلی O.C. (%)	اسیدیته pH	هدایت الکتریکی EC (dS m^{-1})
شنی لومی Loamy sand	0.91	362	17.7	0.24	2.7	7.4	1.6

خاک نیمی از گلدان‌ها با نمک نیترات سرب به نسبت ۵۰۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم خاک به‌خوبی مخلوط شد (Sidhu et al., 2017; Zhou et al., 2017). جهت اطمینان از برقراری تعادل یونی در خاک، گلدان‌ها به مدت دو ماه به همین شکل نگهداری شدند. بذرهای سالم و یکنواخت لوبیاچیتی به مدت پنج دقیقه با هیپوکلریت سدیم پنج درصد ضدعفونی و پس‌ازآن به‌خوبی با آب مقطر شستشو شدند. سپس با توجه به نوع تیمارها به مدت ۱۲ ساعت در محلول‌های صفر، ۲۵ و ۵۰ میلی‌مولار پرولین و گلایسین بتائین خیسانده شدند (Ashraf and Foolad, 2007; Dawood, 2016).

در اواخر اردیبهشت ۱۳۹۴ تعداد ۱۰ بذر به عمق چهار سانتی‌متر در هر گلدان کشت‌شده و گلدان‌ها در شرایط مزرعه و محیط باز قرار داده شدند. پس از کاشت، آبیاری گلدان‌ها به‌طور منظم و دفع علف‌های هرز با دست انجام گرفت. در مرحله دوبرگی، پس از تنک کردن و با توجه به تناسب بین تراکم بوته در سطح مزرعه و سطح هر گلدان (۰/۲ مترمربع)، در هر گلدان شش بوته قوی و سالم (معادل ۳۰ بوته در مترمربع) حفظ شد. در شروع مرحله گلدهی (۴۵ روز پس از کاشت)، شاخص سبزینگی برگ، محتوی نسبی آب[1] و سطح برگ بوته‌ها به شرح ذیل اندازه‌گیری شد. شاخص سبزینگی برگ توسط دستگاه کلروفیل‌سنج (Chlorophyll Content Meter CL-01, Hansatech Instruments Ltd. England) از جوان‌ترین برگ‌های کاملاً توسعه‌یافته بوته‌ها قرائت و ثبت گردید (Bharwana et al., 2014). برای تعیین محتوی نسبی آب، از تقسیم تفاضل وزن تر و خشک بر تفاضل وزن اشباع و خشک نمونه‌های برگ، استفاده شد (Hasanuzzaman et al., 2014). جهت برآورد سطح برگ بوته‌ها نیز دستگاه سطح برگ‌سنج (Leaf Area Meter CI-202, CID, Bio-Science, USA) مورداستفاده قرار گرفت (Bharwana et al., 2014). هم‌چنین نمونه‌هایی از برگ‌های بالایی و کاملاً توسعه‌یافته بوته‌ها جداشده و در ظروف محتوی یخ جهت سنجش صفات بیوشیمیایی بلافاصله به آزمایشگاه منتقل و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز بر اساس سنجش مهار احیای نوری نیتروبلو تترازولیوم اندازه‌گیری شد (Beyer and Fridovich, 1987). سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز توسط پایش تجزیه H_2O_2 در طول‌موج ۲۴۰ نانومتر انجام گرفت (Aebi, 1984). فعالیت آنزیم اسکوربات پراکسیداز نیز با اندازه‌گیری کاهش در جذب اسکوربات اکسیدشده در ۲۹۰ نانومتر سنجیده شد (Nakano and Asada, 1981). علاوه بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت، محتوای مالون دی‌آلدئید برگ‌های گیاه نیز به‌عنوان یکی از آخرین فراورده‌های پراکسیداسیون چربی غشاها به روش هیث و پکر (Heath and Packer, 1968) اندازه‌گیری شد.

بوته‌ها پس از تعیین ارتفاع، به‌دقت از خاک خارج‌شده و به اندام هوایی و ریشه تفکیک‌شده و در آون با دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت خشک شدند. جهت تعیین غلظت سرب ریشه نیز، ۰/۲ گرم از ریشه‌های آون خشک پس از پودر شدن، با ترکیبی از اسید نیتریک و اسید پرکلریک به نسبت ۴ به ۱ هضم شدند. محلول حاصل پس از عبور از کاغذ صافی با آب مقطر به حجم ۵۰ میلی‌لیتر رسانده شد (Ashraf et al., 2017b). اندازه‌گیری غلظت سرب نمونه‌ها به‌وسیله دستگاه طیف‌سنج جذب اتمی (Shimadzu 6200, Japan) انجام گرفت. درنهایت تجزیه‌وتحلیل داده‌ها توسط نرم‌افزار آماری MSTAT-C، مقایسه میانگین‌ها به کمک آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد و رسم نمودار نیز با نرم‌افزار اکسل انجام شد.

[1] - Relative Water Content (RWC)

نتایج و بحث

بر اساس نتایج جدول تجزیه واریانس، اثر تیمار بر تمامی صفات اندازه‌گیری شده در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۲).

غلظت سرب ریشه

در اثر اعمال تیمار سرب در خاک، غلظت این عنصر در ریشه لوبیا به‌شدت افزایش یافت. مصرف ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک نیترات سرب، غلظت سرب در ریشه گیاه را در مقایسه با عدم مصرف آن حدود ۲۴۰ برابر بیشتر کرد. بااین‌حال، کاربرد پرولین و یا گلایسین بتائین باعث کاهش غلظت سرب در ریشه لوبیا تحت شرایط تنش سرب گردید. همان‌طور که جدول ۳ نشان می‌دهد اختلاف بین تیمارهای مختلف پرولین و گلایسین بتائین از این نظر معنی‌دار تشخیص داده نشد. مسیر اصلی تجمع سرب در گیاه، از طریق جذب ریشه‌ای است. بخشی از سرب موجود در محلول خاک، جذب ریشه‌ها شده و سپس یا به گروه‌های کربوکسیل اسید یورونیک و یا مستقیماً به پلی ساکاریدهای سطح سلول‌های ریزودرم متصل می‌شود (Pourrut et al., 2011). مشابه یافته‌های حاضر، تحقیقات بسیاری نشان داده که با افزایش غلظت سرب در خاک، جذب آن توسط ریشه گیاه نیز افزایش می‌یابد (Ashraf et al., 2017a; Khan et al., 2016a; Mahdavian et al., 2016; Sidhu et al., 2016; Tang et al., 2017). از سوی دیگر در پژوهش حاضر مشاهده شد که پیش‌تیمار بذرهای لوبیا با پرولین یا گلایسین بتائین میزان جذب سرب توسط ریشه گیاه را کاهش داد. نتایج سایر تحقیقات نیز نشان داده که کاربرد پرولین یا گلایسین بتائین جذب فلزات سنگین را در سایر گونه‌های گیاهی کاهش می‌دهد (Bharwana et al., 2014; Duman et al., 2011; Islam et al., 2009). کاهش جذب فلزات سنگین یکی از سازوکارهای مهم در بهبود تحمل گیاهان به سمیت این عناصر محسوب می‌شود. فعال شدن این سازوکار در اثر کاربرد پرولین و گلایسین بتائین می‌تواند مربوط به نقش حفاظتی این مواد بر غشای سلولی و درنتیجه کاهش ورود فلزات سنگین به سیتوپلاسم و همچنین کاهش رقابت بین سرب و سایر عناصر غذایی برای جذب باشد (Jabeen et al., 2016).

مالون دی‌آلدئید

سمیت سرب موجب افزایش شدید محتوی مالون دی‌آلدئید بافت برگ لوبیا شد، به‌طوری‌که افزودن ۵۰۰ میلی‌گرم نیترات سرب به هر کیلوگرم خاک، نسبت به عدم مصرف آن، میزان مالون دی‌آلدئید را ۱۰۷ درصد بیشتر کرد. بااین‌وجود، پیش‌تیمار بذرهای لوبیا در محلول‌های پرولین و یا گلایسین بتائین باعث کاهش محتوی مالون دی‌آلدئید برگ تحت سمیت سرب گردید. در این مورد باوجود این‌که تیمار ۵۰ میلی‌مولار گلایسین بتائین مؤثرتر از سه تیمار دیگر بود ولی اختلاف بین این تیمارها معنی‌دار نبود (شکل ۱). مالون دی‌آلدئید به‌عنوان یکی از آخرین محصولات پراکسیداسیون چربی‌های غشاء شناخته می‌شود. افزایش میزان این ماده، نشان‌دهنده پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع موجود در غشاهای زیستی است که شاخصی کلیدی در تشخیص تنش اکسیداتیو محسوب می‌شود. در اثر سمیت سرب، تولید گونه‌های اکسیژن فعال، افزایش می‌یابد که این امر موجب اکسیداسیون

جدول ۲. تجزیه واریانس اثر پیش‌تیمار بذر با پرولین و گلایسین بتائین بر صفات اندازه‌گیری شده لوبیا تحت تنش سرب.

Table 2. Analysis of variance of effect of seed pretreatment with proline and glycine betaine on common bean measured traits under Pb stress.

منابع تغییرات S.O.V.	درجه آزادی df	Mean Square / میانگین مربعات				
		سرب ریشه Root Pb	مالون دی‌آلدئید MDA	سوپراکسید دیسموتاز SOD	کاتالاز CAT	اسکوربات پراکسیداز APX
تیمار Treatment	5	336.55**	332.84**	867.85**	2204.30**	353.49**
خطا Error	18	2.71	98.73	83.50	295.07	29.11
ضریب تغییرات (٪) C.V. (%)	-	*7.38*	*8.51*	*9.82*	*8.98*	*8.44*

**: Significant at the 1% probability level. **: معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد.

جدول ۲. ادامه

Table 2. Continued.

منابع تغییرات S.O.V.	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean Square					
		شاخص سبزینگی Chlorophyll value	محتوی نسبی آب RWC	ارتفاع بوته Plant height	سطح برگ Leaf area	زیست‌توده ریشه Root biomass	زیست‌توده اندام هوایی Shoot biomass
تیمار Treatment	5	128.36**	272.86**	659.17**	4417.29**	31.74**	153.26**
خطا Error	18	17.19	27.73	32.82	476.91	1.62	22.91
ضریب تغییرات (٪) C.V. (%)	-	*4.11*	*6.43*	*5.66*	*6.09*	*4.89*	*5.16*

**: معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد. **: Significant at the 1% probability level.

ساختارهای سلولی و پراکسیداسیون چربی‌های غشاهای سلولی شده و درنتیجه سطح مالون دی‌آلدئید افزایش می‌یابد که نشانه تخریب ساختار غشای سلولی است (Ashraf et al., 2017a; Khan et al., 2016a). افزایش محتوی مالون دی‌آلدئید در اثر سمیت سرب به دلیل بیش‌تولید گونه‌های اکسیژن فعال، توسط بسیاری از محققان و در گونه‌های مختلف گیاهی به اثبات رسیده است (Chen et al., 2017; Hussain et al., 2017; Khan et al., 2016b; Mahdavian et al., 2016; Sidhu et al., 2016; Tang et al., 2017).

از سوی دیگر نتایج تحقیق حاضر نشان داد که کاربرد پرولین یا گلایسین بتائین از طریق فعال‌سازی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت، از پراکسیداسیون چربی غشاها جلوگیری نمود و به دنبال آن میزان مالون دی‌آلدئید برگ‌های لوبیا را در شرایط مسمومیت سرب کاهش داد. اثر مثبت این دو ماده در جلوگیری از تخریب غشاهای زیستی در اثر خسارت اکسیداتیو به نقش بالقوه آن‌ها در پایداری غشاها، پاک‌سازی گونه‌های اکسیژن فعال و همچنین فعال‌سازی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت نسبت داده شده است (Aggarwal et al., 2011; Ashraf and Foolad, 2007; Bharwana et al., 2014). کاهش میزان مالون دی‌آلدئید که نشانه کاهش خسارت اکسیداتیو به غشاهای زیستی است در اثر کاربرد پرولین و گلایسین بتائین در شرایط تنش کادمیوم (Islam et al., 2009; Rasheed et al., 2014)، سلنیوم (Aggarwal et al., 2011)، کروم (Jabeen et al., 2016) و شوری (Hasanuzzaman et al., 2014) نیز گزارش شده است.

فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت

تنش سرب موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت برگ‌های لوبیا شد اگرچه این افزایش معنی‌دار نبود. به‌طوری‌که در اثر سمیت سرب در مقایسه با تیمار شاهد، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و اسکوربات پراکسیداز به ترتیب حدود ۲۸، ۲۹ و ۱۳ درصد افزایش یافت. این در حالی است که کاربرد خارجی پرولین و یا گلایسین بتائین تحت تنش سرب، موجب افزایش معنی‌دار فعالیت این آنزیم‌ها گردید. بین غلظت‌های مختلف کاربرد پرولین و گلایسین بتائین از این نظر، اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (شکل ۱). گونه‌های اکسیژن فعال، شامل سوپر اکسید ($O_2^{\bullet-}$)، پراکسید هیدروژن (H_2O_2)، رادیکال‌های هیدروکسیل ($OH^{\bullet-}$) و اکسیژن نو زاد ($^1O_2$) است که طی متابولیسم عادی سلول و به میزان کم تولید می‌شوند. گونه‌های اکسیژن فعال، در سطوح پایین به‌عنوان مولکول‌های پیام‌رسان در فعال‌سازی مسیرهای واکنش به تنش‌های محیطی عمل می‌کنند اما در سطوح بالا، می‌توانند با ایجاد خسارت اکسیداتیو موجب تخریب چربی‌ها، پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک و درنهایت مرگ سلول شوند. در اثر بروز تنش‌های محیطی ازجمله فلزات سنگین، تولید این گونه‌های اکسیژن افزایش می‌یابد. این امر در اثر سمیت فلزات سنگین مانند سرب به‌خوبی اثبات شده است (Liu et al., 2008; Singh et al., 2010).

در شرایط تنش‌های محیطی ازجمله تنش سرب، گیاهان جهت اجتناب از تنش اکسیداتیو و پاک‌سازی گونه‌های اکسیژن فعال، سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی آنزیمی (سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، پراکسیداز، گلوتاتیون ردکتاز

و اسکوربات پراکسیداز) و غیر آنزیمی (گلوتاتیون، اسکوربات، توکوفرول‌ها، کارتنوئیدها و پرولین) را در خود فعال می‌کنند (Khan et al., 2016b; Mahdavian et al., 2016; Tang et al., 2017; Zhang et al., 2017). آنزیم سوپراکسید دیسموتاز به‌عنوان اولین خط دفاعی، یون‌های $O_2^{\bullet-}$ را به اکسیژن و H_2O_2 تبدیل می‌کند و به دنبال آن H_2O_2 می‌تواند به‌سرعت توسط آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و اسکوربات پراکسیداز به آب و اکسیژن تجزیه شود (Chen et al., 2017; Sidhu et al., 2016). بررسی‌ها نشان داده که تحت تنش فلزات سنگین، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت ممکن است افزایش یا کاهش‌یافته و یا حتی بدون تغییر بماند. این امر بستگی به ژنوتیپ گیاهی، شدت و مدت تنش، نوع و غلظت فلز، سن گیاه و فرم شیمیایی فلز در منطقه ریشه دارد (Ashraf et al., 2017b). مشابه نتایج آزمایش حاضر، تحقیقات دیگری نیز افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در اثر تنش سرب را تائید می‌کنند (Chen et al., 2017; Mahdavian et al., 2016; Sidhu et al., 2016; Zafari et al., 2016).

بر اساس یافته‌های ما، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و اسکوربات پراکسیداز در اثر تنش سرب به میزان اندکی افزایش یافت. به‌عبارت‌دیگر، این افزایش فعالیت به‌اندازه‌ای نبود که اثرات سوء تنش اکسیداتیو حاصل از سرب را برطرف نماید و نتوانست از افزایش شدید سطح مالون دی‌آلدئید جلوگیری کند. این امر نشان می‌دهد که گیاه لوبیا از قابلیت ضعیفی در دفاع سیستم آنتی‌اکسیدانی آنزیمی در برابر تنش سرب برخوردار است. بااین‌وجود، در آزمایش حاضر، پیش‌تیمار با پرولین یا گلایسین بتائین، در شرایط تنش سرب، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت فوق را به‌طور معنی‌داری افزایش داد که این امر موجب کاهش پراکسیداسیون چربی غشاها گردید که نتیجه آن کاهش محتوی مالون دی‌آلدئید بود. اسلام و همکاران (Islam et al., 2009) نیز دریافتند که در شرایط مسمومیت کادمیوم، کاربرد پرولین و گلایسین بتائین فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت را افزایش داد. مشابه با این یافته‌ها، نتایج برخی از تحقیقات نیز نشان داده که کاربرد خارجی پرولین موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در شرایط تنش سلنیوم در لوبیا (Aggarwal et al., 2011) و کادمیوم در نخود (Hayat et al., 2013) شد. همچنین کاربرد خارجی گلایسین بتائین باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت تحت شرایط تنش سرب در پنبه (Bharwana et al., 2014)، کادمیوم

جدول ۳. مقایسه میانگین صفات اندازه‌گیری شده لوبیا تحت تأثیر تنش سرب و پیش تیمار بذر با پرولین و گلایسین بتائین

Table 3. Mean comparison of common bean measured traits as affected by Pb stress and seed pretreatment with proline and glycine betaine (GB)

Treatment / تیمار	Root Pb (mg kg^{-1} DW) / میزان سرب ریشه (میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن خشک)	Chlorophyll value (Spad unit) / شاخص سبزینگی (واحد اسپد)	RWC (%) / محتوی نسبی آب (درصد)
Control / شاهد	0.11 c	39.91 a	91.21 a
Pb stress (500 mg kg^{-1} of soil) / تنش سرب (۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک)	26.30 a	18.27 c	66.40 c
Pb stress+25 mM proline / تنش سرب + ۲۵ میلی‌مولار پرولین	20.99 b	29.60 b	81.66 b
Pb stress+50 mM proline / تنش سرب + ۵۰ میلی‌مولار پرولین	20.58 b	30.59 b	81.74 b
Pb stress+25 mM GB / تنش سرب + ۲۵ میلی‌مولار گلایسین بتائین	20.78 b	31.62 b	83.36 b
Pb stress+50 mM GB / تنش سرب + ۵۰ میلی‌مولار گلایسین بتائین	20.10 b	32.79 b	85.27 b

در هر ستون، میانگین‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک می‌باشند ازنظر آماری و بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد اختلاف معنی‌داری ندارند.

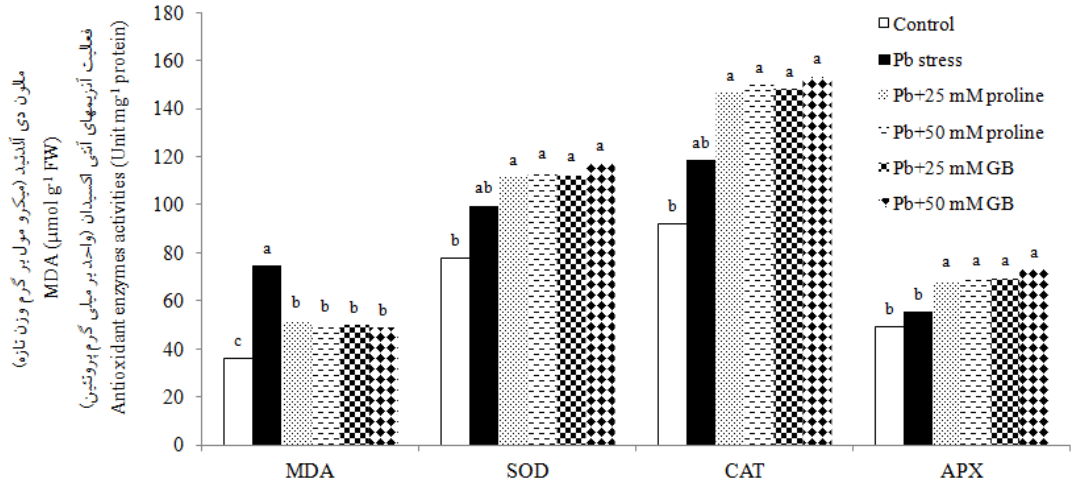
Means with the same letter in each column are not significantly different at probability level of 5% using DMRT

Table 3. Continued. **جدول ۳. ادامه**

Treatment / تیمار	ارتفاع بوته (سانتی‌متر) Plant height (cm)	سطح برگ (سانتی‌مترمربع بر بوته) Leaf area (cm^2 $plant^{-1}$)	زیست‌توده ریشه (گرم بر بوته) Root biomass (g $plant^{-1}$)	زیست‌توده اندام هوایی (گرم بر بوته) Shoot biomass (g $plant^{-1}$)
شاهد Control	83.95 a	404.11 a	10.89 a	43.55 a
تنش سرب (۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک) Pb stress (500 mg kg^{-1} of soil)	51.85 c	304.42 c	6.69 c	30.17 c
تنش سرب + ۲۵ میلی‌مولار پرولین Pb stress+25 mM proline	65.80 b	349.53 b	9.31 b	37.25 b
تنش سرب + ۵۰ میلی‌مولار پرولین Pb stress+50 mM proline	66.82 b	354.10 b	9.42 b	37.70 b
تنش سرب + ۲۵ میلی‌مولار گلایسین بتائین Pb stress+25 mM GB	66.50 b	359.95 b	9.11 b	36.43 b
تنش سرب + ۵۰ میلی‌مولار گلایسین بتائین Pb stress+50 mM GB	68.00 b	369.08 b	9.55 b	38.22 b

در هر ستون، میانگین‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک می‌باشند ازنظر آماری و بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد اختلاف معنی‌داری ندارند.

Means with the same letter in each column are not significantly different at probability level of 5% using DMRT



شکل ۱. اثر تنش سرب (۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک) و پیش‌تیمار بذر با پرولین و گلایسین بتائین بر میزان مالون دی‌آلدئید و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت لوبیا

Fig. 1. Effect of Pb stress (500 mg kg^{-1} of soil) and seed pretreatment with proline and glycine betaine (GB) on MDA content and antioxidant enzymes activities of common bean.

در عدسک آبی (Duman et al., 2011) و کروم در ماش (Jabeen et al., 2016) گردید. این نتایج نشان می‌دهد که در اثر کاربرد پرولین و یا گلایسین بتائین، فعال‌سازی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت یکی از مکانیسم‌های تحمل گیاهان به تنش فلزات سنگین است. ثابت‌شده که پرولین به‌عنوان یک چپرون مولکولی قادر به حفظ یکپارچگی پروتئین‌ها و افزایش فعالیت آنزیم‌های مختلف است (Osman, 2015). هم‌چنین پرولین از طریق تأثیر در سطح رونویسی و یا ترجمه، تولید آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت را افزایش می‌دهد (Hayat et al., 2013).

شاخص سبزینگی

تنش سرب موجب کاهش معنی‌دار شاخص سبزینگی برگ‌های لوبیا شد، به‌طوری‌که در اثر اعمال این تیمار، در مقایسه با تیمار شاهد، این صفت حدود ۵۴ درصد کاهش یافت. از سوی دیگر، پیش‌تیمار بذر با پرولین و یا گلایسن بتائین به‌طور مؤثری موجب بهبود شاخص سبزینگی تحت تنش سرب گردید. از این نظر، بین تیمارهای مختلف کاربرد پرولین و گلایسین بتائین اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۳). تحت تنش سرب، یون سرب جایگزین یون منیزیوم در مولکول کلروفیل شده، غشاء اندامک‌های سلول از قبیل کلروپلاست‌ها آسیب‌دیده، فعالیت آنزیم کلروفیلاز تشدید شده و همچنین یون‌های سرب با گروه سولفیدریل آنزیم‌های سنتز کننده کلروفیل واکنش می‌دهند. این عوامل درنهایت باعث کاهش تولید و افزایش تخریب کلروفیل در اثر مسمومیت سرب می‌شوند (Ashraf et al., 2017b; Sidhu et al., 2017). هم‌راستا با نتایج پژوهش حاضر، گزارش‌های دیگری نیز وجود دارند که کاهش میزان کلروفیل در اثر تیمار سرب را در گیاهان مختلف تائید می‌کنند (Hussain et al., 2017; Khan et al., 2016b; Zhou et al., 2017).

در آزمایش حاضر ثابت شد که در شرایط تنش سرب، کاربرد پرولین یا گلایسین بتائین موجب بهبود شاخص سبزینگی برگ‌های لوبیا گردید. این نتایج با یافته‌های رشید و همکاران (Rasheed et al., 2014) مطابقت دارد. آن‌ها دریافتند که در شرایط تنش کادمیوم، کاربرد پرولین و یا گلایسین بتائین باعث افزایش میزان کلروفیل گیاهچه‌های گندم شد. هم‌چنین حسن الزمان و همکاران (Hasanuzzaman et al., 2014) نشان دادند که کاربرد خارجی پرولین و گلایسین بتائین موجب افزایش محتوی کلروفیل گیاهچه‌های برنج در شرایط تنش شوری گردید. افزایش محتوی کلروفیل در بوته‌های لوبیا تحت تنش سلنیوم در اثر کاربرد پرولین (Aggarwal et al., 2011) و هم‌چنین افزایش میزان کلروفیل بوته‌های پنبه تحت تنش سرب در اثر کاربرد گلایسین بتائین (Bharwana et al., 2014) نیز گزارش شده است. اهمیت پرولین و گلایسین بتائین در افزایش محتوی کلروفیل تحت شرایط تنش فلزات سنگین به نقش آن‌ها در پاک‌سازی گونه‌های اکسیژن فعال، افزایش فعالیت آنزیم‌های سنتز کننده کلروفیل، پایداری ساختارهای زیرسلولی از قبیل کلروپلاست‌ها و تایلاکوئیدها نسبت داده شده است (Aggarwal et al., 2011; Jabeen et al., 2016; Rasheed et al., 2014).

محتوی نسبی آب

محتوی نسبی آب برگ‌های لوبیا در اثر سمیت سرب، به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. تیمار ۵۰۰ میلی‌گرم نیترات سرب بر کیلوگرم خاک، این صفت را نسبت به تیمار شاهد حدود ۲۷ درصد کاهش داد. بااین‌حال، خیساندن بذرها در غلظت‌های مختلف پرولین و یا گلایسین بتائین، تحت تنش سرب، موجب افزایش محتوی نسبی آب شد. اختلاف بین تیمارهای پرولین و گلایسین بتائین در مورد این صفت نیز معنی‌دار نبود (جدول ۳). محتوی نسبی آب یکی از مهم‌ترین شاخص‌های وضعیت آبی در گیاه است که با جذب آب توسط ریشه‌ها و تعرق آب از برگ‌ها مرتبط است. سرب با کاهش رشد ریشه و تعرق، محتوی آب گیاه را کاهش می‌دهد. هم‌چنین سطح ترکیباتی که باعث حفظ آماس سلولی و انعطاف‌پذیری دیواره سلولی می‌شوند را تقلیل داده و بنابراین پتانسیل آبی گیاه را کم می‌کند (Khan et al., 2016a). در آزمایش حاضر، کاهش محتوی نسبی آب برگ‌های لوبیا در اثر سمیت سرب را می‌توان به کاهش رشد ریشه و جذب آب و همچنین خسارت وارده به غشای سلولی در اثر تنش اکسیداتیو نسبت داد. کاهش محتوی نسبی آب در اثر تیمار سرب در بوته‌های لوبیا چشم‌بلبلی نیز گزارش شده است (Sadeghipour, 2016).

در آزمایش جاری نشان داده شد که تحت تنش سرب، پیش‌تیمار با پرولین یا گلایسین بتائین موجب بهبود محتوی نسبی آب برگ‌های لوبیا گردید. این نتیجه با یافته‌های تحقیق دیگری مبنی بر افزایش محتوی نسبی آب برگ‌های ارقام برنج در شرایط تنش اکسیداتیو در اثر کاربرد خارجی پرولین و گلایسین بتائین کاملاً مطابقت دارد (Hasanuzzaman et al., 2014). بهبود وضعیت آبی گیاه در اثر کاربرد پرولین تحت تنش کادمیوم (Hayat et al., 2013) و سلنیوم (Aggarwal et al., 2011) و همچنین در اثر کاربرد گلایسین بتائین تحت تنش شوری (Nawaz and Ashraf, 2007) نیز گزارش شده است. پرولین و گلایسین بتائین از طریق تنظیم اسمزی و کمک به جذب آب و همچنین حفظ ساختارهای غشایی موجب حفظ آب بافت‌های گیاهی تحت شرایط تنش‌های محیطی می‌شوند (Ashraf and Foolad, 2007). در تحقیق حاضر، کاربرد پرولین یا گلایسین بتائین

از طریق بهبود رشد ریشه، فعال‌سازی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت و پایداری غشای سلولی (کاهش میزان مالون دی‌آلدئید) موجب بهبود جذب آب و وضعیت آبی بوته‌های لوبیا در شرایط تنش سرب گردید.

ویژگی‌های رشدی لوبیا

در اثر مسمومیت سرب، ارتفاع بوته، سطح برگ و زیست‌توده ریشه و اندام هوایی لوبیا نسبت به تیمار شاهد به ترتیب حدود ۳۸، ۲۵، ۳۹ و ۳۱ درصد کاهش یافت، بااین‌وجود، خیساندن بذرها در محلول پرولین و یا گلایسین بتائین تمامی ویژگی‌های رشدی فوق را در شرایط تنش سرب به‌طور معنی‌داری افزایش داد. اگرچه در این موارد تیمار ۵۰ میلی‌مولار گلایسین بتائین کمی مؤثرتر بود ولی با سایر پیش‌تیمارها تفاوت معنی‌داری نداشت (جدول ۳). فلزات سنگین ازجمله سرب، بر تقسیم، رشد و ساختارهای سلولی تأثیر منفی گذاشته و درنهایت رشد و نمو گیاه را کاهش می‌دهند. کاهش صفات رشدی گیاه در اثر سمیت سرب همچنین به اختلال در فرایندهای متابولیکی گیاه، فتوسنتز و جذب آب و عناصر غذایی نسبت داده شده است (Ashraf et al., 2017a; Khan et al., 2016b).

در تحقیق جاری، کاهش صفات رشدی بوته‌های لوبیا در اثر سمیت سرب به خسارت اکسیداتیو و تخریب غشاهای زیستی سلول، کاهش شاخص سبزینگی و عدم تعادل آبی گیاه مربوط بود. در راستای نتایج پژوهش حاضر، کاهش زیست‌توده اندام هوایی و ریشه، سطح برگ و ارتفاع بوته در اثر مسمومیت سرب در گیاهان مختلفی همچون پنبه (Bharwana et al., 2014)، برنج (Verma and Dubey, 2003)، گل‌کلم (Chen et al., 2017) و بامیه (Hussain et al., 2017) نیز گزارش شده است. گزارش‌های زیادی در خصوص بهبود رشد گیاه در اثر کاربرد خارجی پرولین و گلایسین بتائین در شرایط تنش‌های مختلف محیطی ازجمله خشکی، شوری و سرما وجود دارد (Ashraf and Foolad, 2007). همچنین نقش مثبت کاربرد پرولین و گلایسین بتائین در بهبود رشد گیاه تحت تنش فلزات سنگینی همچون کادمیوم (Islam et al., 2009; Rasheed et al., 2014)، سلنیوم (Aggarwal et al., 2011) و کروم (Jabeen et al., 2016) نیز گزارش شده است. اهمیت کاربرد پرولین و گلایسین بتائین در بهبود صفات رشدی گیاهان مختلفی که تحت تنش فلزات سنگین قرار داشتند به عواملی همچون بهبود سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی و کاهش خسارت اکسیداتیو، ثبات و حفاظت از غشاهای زیستی، ساختارهای سلولی، پروتئین‌ها و آنزیم‌ها، تأمین انرژی، سنتز سایر محلول‌های آلی سازگار و افزایش سرعت فتوسنتز نسبت داده شده است (Aggarwal et al., 2011; Bharwana et al., 2014; Hayat et al., 2013; Osman, 2015). در آزمایش حاضر نیز با توجه به نتایج حاصل، پیش‌تیمار بذر با پرولین یا گلایسین بتائین موجب بهبود صفات رشدی لوبیا در شرایط تنش سرب گردید. این امر به کاهش جذب سرب، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت و کاهش خسارت اکسیداتیو، بهبود شاخص سبزینگی و وضعیت آبی گیاه مربوط بود.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این پژوهش نشان داد که تنش سرب موجب افزایش غلظت سرب ریشه و خسارت اکسیداتیو به بوته‌های لوبیا گردید. سمیت سرب همچنین موجب کاهش شاخص سبزینگی، محتوی نسبی آب، ارتفاع بوته، سطح برگ و زیست‌توده ریشه و اندام هوایی شد. بااین‌وجود، در شرایط تنش سرب، پیش‌تیمار بذر با پرولین یا گلایسین بتائین موجب کاهش جذب سرب، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت و کاهش خسارت اکسیداتیو گردید که باعث بهبود شاخص سبزینگی، محتوی نسبی آب، ارتفاع بوته، سطح برگ و زیست‌توده ریشه و اندام هوایی شد. بین تیمارهای مختلف کاربرد پرولین و گلایسین بتائین اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. این نتایج نشان داد که پیش‌تیمار بذر با این دو محلول سازگار می‌تواند از طریق کاهش جذب سرب، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت و بهبود شاخص سبزینگی و وضعیت آبی گیاه، به‌عنوان روشی مفید در تحمل به تنش سرب در لوبیا مورداستفاده قرار گیرد.

منابع

Aggarwal, M., Sharma, S., Kaur, N., Pathania, D., Bhandhari, K., Kaushal, N., Kaur, R., Singh, K., Srivastava, A., Nayyar, H., 2011.

Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. Methods in Enzymology. 105, 121-126.

Exogenous proline application reduces phytotoxic effects of selenium by minimizing oxidative stress and improves growth in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings. Biological Trace Element Research. 140, 354-367.

Ashraf, M., Foolad, M.R., 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. Environmental and Experimental Botany. 59, 206-216.

Ashraf, U., Hussain, S., Anjum, S.A., Abbas, F., Tanveer, M., Noor, M.A., Tang, X., 2017a. Alterations in growth, oxidative damage, and metal uptake of five aromatic rice cultivars under lead toxicity. Plant Physiology and Biochemistry. 115, 461-471.

Ashraf, U., Kanu, A.S., Deng, Q., Mo, Z., Pan, S., Tian, H., Tang, X., 2017b. Lead (Pb) toxicity; physio-biochemical mechanisms, grain yield, quality, and pb distribution proportions in scented rice. Frontiers in Plant Science. 8, 259.

Beyer, W.F., Fridovich, I., 1987. Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. Analytical Biochemistry. 161(2), 559-566.

Bharwana, S.A., Ali, S., Farooq, M.A., Iqbal, N., Hameed, A., Abbas, F., Ahmad, M.S.A., 2014. Glycine betaine-induced lead toxicity tolerance related to elevated photosynthesis, antioxidant enzymes suppressed lead uptake and oxidative stress in cotton. Turkish Journal of Botany. 38, 281-292.

Chen, Z., Yang, B., Hao, Z., Zhu, J., Zhang, Y. Xu, T., 2017. Exogenous hydrogen sulfide ameliorates seed germination and seedling growth of cauliflower under lead stress and its antioxidant role. Journal of Plant Growth Regulation. Online published. DOI: 10.1007/s00344-017-9704-8

Dawood, M.G., 2016. Influence of osmoregulators on plant tolerance to water stress. Scientia Agriculturae. 13(1), 42-58.

Duman, F., Aksoy, A., Aydin, Z. Temizgul, R., 2011. Effects of exogenous glycine betaine and trehalose on cadmium accumulation and biological responses of an aquatic plant (*Lemna gibba* L.). Water, Air, and Soil Pollution. 217, 545-556.

Hasanuzzaman, M., Alam, M., Rahman, A., Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Fujita, M., 2014. Exogenous proline and glycine betaine mediated upregulation of antioxidant defense and glyoxalase systems provides better protection against salt-induced oxidative stress in two rice (*Oryza sativa* L.) varieties. Biomed Research International. Volume 2014, Article ID 757219, 17 pages.

Hayat, S., Hayat, Q., Alyemeni, M.N., Ahmad, A., 2013. Proline enhances antioxidative enzyme activity, photosynthesis and yield of *Cicer arietinum* L. exposed to cadmium stress. Acta Botanica Croatica. 72(2), 323-335.

Heath, R.L., Packer, L., 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Archives of Biochemistry and Biophysics. 125(1), 189-198.

Hussain, I., Siddique, A., Ashraf, M.A., Rasheed, R., Ibrahim, M., Iqbal, M., Akbar, S., Imran, M., 2017. Does exogenous application of ascorbic acid modulate growth, photosynthetic pigments and oxidative defense in okra (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench) under lead stress? Acta Physiologiae Plantarum. 39, 144.

Islam, M.M., Hoque, A., Okuma, E., Banu, N.A., Shimoishi, Y., Nakamura, Y., Murata, Y., 2009. Exogenous proline and glycine betaine increase antioxidant enzyme activities and confer tolerance to cadmium stress in cultured tobacco cells. Plant Physiology. 166, 1587-1597.

Jabeen, N., Abbas, Z., Iqbal, M., Rizwan, M., Jabbar, A., Farid, M., Ali, S., Ibrahim, M., Abbas, F., 2016. Glycine betaine mediates chromium tolerance in mung bean through lowering of Cr uptake and improved antioxidant system. Archives of Agronomy and Soil Science. 62, 648-662.

Khan, I., Iqbal, M., Ashraf, M.Y., Ashraf, M.A., Ali, S., 2016 a. Organic chelats-mediated enhanced lead (Pb) uptake and accumulation is associated with higher activity of enzymatic antioxidants in spinach (*Spinacea oleracea* L.). Journal of Hazardous Materials. 317, 352-361.

Khan, M., Daud, M.K., Basharat, A., Khan, M.J., Azizullah, A., Muhammad, N., Muhammad, N., Rehman, Z., Zhu, S.J., 2016 b. Alleviation of lead-induced physiological, metabolic, and ultramorphological changes in leaves of upland cotton through glutathione. Environmental Science and Pollution Research. 23, 8431-8440.

Liu, D., Li, T., Jin, X., Yang, X., Islam, E., Mahmood, Q., 2008. Lead induced changes in

the growth and antioxidant metabolism of the lead accumulating and non-accumulating ecotypes of *Sedum alfredii*. Journal of Integrative Plant Biology. 50(2), 129-140.

Mahdavian, K., Ghaderian, S.M., Schat, H., 2016. Pb accumulation, Pb tolerance, antioxidants, thiols, and organic acids in metallicolous and non-metallicolous *Peganum harmala* L. under Pb exposure. Environmental and Experimental Botany. 126, 21-31.

Nakano, Y., Asada, K., 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant and Cell Physiology. 22(5), 867-880.

Nawaz, K., Ashraf, M., 2007. Improvement in salt tolerance of maize by exogenous application of glycine betaine: growth and water relations. Pakistan Journal of Botany. 39(5), 1647-1653.

Osman, H.S., 2015. Enhancing antioxidant-yield relationship of pea plant under drought at different growth stages by exogenously applied glycine betaine and proline. Annals of Agricultural Sciences. 60(2), 389-402.

Pourrut, B., Shahid, M., Dumat, C., Winterton, P., Pinelli, E., 2011. Lead uptake, toxicity, and detoxification in plants. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. 213, 113-136.

Rasheed, R., Ashraf, M.A., Hussain, I., Haider, M.Z., Kanwal, U., Iqbal, M., 2014. Exogenous proline and glycine betaine mitigate cadmium stress in two genetically different spring wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. Brazilian Journal of Botany. 37, 399-406.

Sadeghipour, O., 2016. Pretreatment with nitric oxide reduces lead toxicity in cowpea (*Vigna unguiculata* [l.] Walp.). Archives of Biological Sciences. 68(1), 165-175.

Sidhu, G.P.S., Singh, H.P., Batish, D.R., Kohli, R.K., 2016. Effect of lead on oxidative status, antioxidative response and metal accumulation in *Coronopus didymus.* Plant Physiology and Biochemistry. 105, 290-296.

Sidhu, G.P.S., Singh, H.P., Batish, D.R., Kohli, R.K., 2017. Alterations in photosynthetic pigments, protein, and carbohydrate metabolism in a wild plant *Coronopus didymus* L. (Brassicaceae) under lead stress. Acta Physiologiae Plantarum. 39,176.

Singh, R., Tripathi, R.D., Dwivedi, S., Kumar, A., Trivedi, P.K., Chakrabarty, D., 2010. Lead bioaccumulation potential of an aquatic macrophyte *Najas indica* are related to antioxidant system. Bioresource Technology. 101, 3025-3032.

Tang, C., Song, J., Hu, X., Hu, X., Zhao, Y., Li, B., Ou, D., Peng, L., 2017. Exogenous spermidine enhanced Pb tolerance in *Salix matsudana* by promoting Pb accumulation in roots and spermidine, nitric oxide, andantioxidant system levels in leaves. Ecological Engineering. 107, 41-48.

Verma, S., 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.

Zafari, S., Sharifi, M., Ahmadian Chashmi, N., Mur, L.A.J., 2016. Modulation of Pb-induced stress in *Prosopis* shoots through an interconnected network of signaling molecules, phenolic compounds and amino acids. Plant Physiology and Biochemistry. 99, 11-20.

Zhang, L.L., Zhu, X.M., Kuang, Y.W., 2017. Responses of *Pinus massoniana* seedlings to lead stress. Biologia Plantarum. 61(4), 785-790.

Zhou, J., Jiang, Z., Ma, J., Yang, L., Wei, Y., 2017. The effects of lead stress on photosynthetic function and chloroplast ultrastructure of *Robinia pseudoacacia* seedlings. Environmental Science and Pollution Research. 24(11), 10718-10726.