یافته های نوین کشاورزی
سال ششم- شماره۲- زمستان ۱۳۹۰

ارزش تحمل به سرب و اثر آن بر پروتئین و پرولین ریشه و اندام هوایی ارقام کلزا (*Brassica napus* L.)

معصومه گوهری*، باشگاه پژوهشگران جوان دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهواز
محمد خیاط، باشگاه پژوهشگران جوان دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهواز

چکیده

جهت بررسی مکانیسم دفاعی کلزا در مقابل سرب غلظت های متفاوت سرب (صفر ، ۱۰۰ ،۲۰۰ و ٤۰۰ میکرومول) از فاکتورهای سلولی همچون پروتئین و پرولین در ریشه و اندام هوایی کلزا مورد اندازگیری قرار گرفت. این طرح در شرایط آزمایشگاهی و کشت به روش هیدروپونیک با استفاده از هوگلند انجام شد. طول ریشه بر حسب میلی متر و محتوای پروتئین و پرولین در ریشه و اندام هوایی توسط دستگاه اسپکتوفتومتر (U.V) مدل ۲۰۰ هیتاچی اندازه گیری شد. بر اساس نتایج حاصل از این پژوهش افزایش غلظت سرب محلول غذایی در هر دو رقم کلزا موجب کاهش طول ریشه شد و با توجه به میانگین طول ریشه ارزش تحمل به سرب در رقم آر.جی.اس ۰۰۳ بیشتر از رقم هایولا ٤۰۱ بود. با افزایش غلظت سرب محلول غذایی مقدار پروتئین و پرولین در ریشه در دو رقم نسبت به شاهد افزایش یافت و مقدار پروتئین با افزایش غلظت سرب محلول غذایی در اندام هوایی هیبرید هایولا ٤۰۱ کاهش و در رقم آر.جی.اس ۰۰۳ افزایش یافت. آنالیزی آماری نمونه ها با تجزیه توسط نرم افزار SPSS و رسم نمودار با کمک نرم افزار۲۰۰۳ Excel انجام شد.

واژه های کلیدی: کلزا، مقاومت ملکولی، مرفولوژیکی، سرب

* نویسنده مسئول: E-mail: Gohari_agri@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله: ۸۹/۷/۳۰ تاریخ پذیرش مقاله: ۹۰/۱/۲۰

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

گیاهان به عنوان بزرگترین گروه موجودات زنده نیز تحت تأثیر اینگونه دشواری ها قرار دارند. از آن جایی که رشد گیاهان زراعی و تولید محصولات تحت تأثیر تنش قرار دارد. لذا مسئله تنش در کشاورزی و خصوصاً محصولات زراعی مسلم جهان در دهه اخیر به عنوان یکی از ابعاد تحقیقاتی وسیع، نظر بسیاری از محققان را به خود جلب کرده است (۱، ۷ و ۱۱).

افزایش جمعیت دنیا و بهبود استانداردهای زندگی موجب افزایش تولید کلزا برای مصارف روغن خوراکی و بازارهای خاص صنعتی شده است. کلزا نقش مهمی در تأمین روغن خوراکی، خوراک دام و طیور و تولید سوخت های زیستی (بیودیزل) در جهان ایفا می کند. میزان روغن کلزا در برخی از ارقام به ٤٨ ٪ وزن خشک دانه بالغ می شود، این گیاه در بین دانه های روغنی مهم جهان جایگاه ویژه ای داشته و از اهمیت خاصی برخوردار است (۳ و ٤). بر این اساس به مطالعه آلودگی‌های محیطی بر این گیاه پرداختیم یکی از این آلودگی‌ها سرب می باشد. سرب خطرناک ترین فلز آلاینده محیط است سرب موجود در طبیعت از طریق صنایع ساخت سربی افزودنی های رنگ و بنزین حشره کش ها کودها اگزوزهای اتومبیل و لحیم کاری ناشی می شود. گیاهان برای کاهش سمیت سرب دارای مکانیسم های متفاوتی هستند که شامل تولید عوامل و پروتین های باند شونده به فلزات سنگین اجازه ورود ندادن فلزات سنگین به سلولها بوسیله انتخاب انتقال یون فلز و دفع فلز یا کده بندی کردن در واکوئل است. یکی از مکانیسم های سمیت زدایی فلزات سنگین با کاهش آسیب غشاء و پروتئین های ارتباط دارد (٦ و ۱۰). طی یک تحقیق میزان تغییرات پرولین وپروتئین را نسبت به استرس در ژنوتیپ های هایولا ٤۰۱ و پی.اف بررسی گردید. دراین آزمایش ارزش تحمل به سرب هیبرید هایولا ٤۰۱ بیشتر از رقم پی.اف بود. با افزایش غلظت سرب محلول غذایی مقدار پروتئین وپرولین در ریشه هر دو هیبرید نسبت به شاهد افزایش یافت و مقدار پروتئین با افزایش غلظت سرب محلول غذایی در اندام هوایی هیبرید هایولا ٤۰۱ کاهش و در رقم پی.اف افزایش یافت. همچنین در بررسی تفاوت بین رفتار فیزیولوژیک ژنوتیپ های کلزا نسبت به تیمارهای کلرید مس مشاهده گردید که با افزایش غلظت کلرید مس در محیط، افزایش غلظت یون مس و پرولین و کاهش یون های آهن، منگنز و پتاسیم در رقم پی.اف در مقایسه با هیبرید هایولا ٤۰۱ چشم گیرتر بود (۱۰). در تحقیقی دیگر میزان تغییرات پرولین را نسبت به تنش های شوری درژنوتیپ های کلزا بررسی شد. آزمایش ها نشان داد با افزایش شوری مقدار پرولین و سایر عناصر مانند کلر، سدیم افزایش می یابد (۵). در مجموع با توجه به پیشینه ذکر شده، در این پژوهش ارزش تحمل به سرب در اندازگیری مقدار پروتینن در دو رقم کلزا مورد بررسی قرار گرفت است.

Archive of SID

www.SID.ir

مواد و روش ها

بذرهای دو رقم کلزا که از مرکز تحقیقات صفی آباد دزفول تهیه شده بود را به اندازه سه برابر مورد نیاز در عمق ۱/۵ سانتی‌متری در فواصل مساوی در دو ظرف جداگانه دارای ماسه شسته کشت داده شدند. ماسه را با اسید کلریدریک سه درصد به مدت حداقل ۲٤ ساعت شسته و سپس آنها را به تکرار با آب معمولی و در نهایت با آب مقطر شستشو داده شد. این شستشو به منظور گرفتن املاح مخلوط با ماسه انجام شده است. بذرها در دمای حدود ۲۵ درجه سانتی گراد جوانه زدند. پس از خارج شدن لپه ها و پدیدار شدن اولین برگ ها که حدود ۷ روز به‌طول انجامید دانه رست ها در طی این مدت با مقدار مناسب آب مقطر و محلول غذایی هوگلند تغذیه می شدند. دانه رست های یکنواختی انتخاب و با ظروف پلاستیکی محتوای ٤۰۰ میلی لیتر محلول غذایی هوگلند منتقل شدند و ظروف فوق در شرایط کنترل شده آزمایشگاهی با درجه حرارت متوسط روزانه ۱ ± ۲۵ و شبانه ۱ ± ۱۸ درجه سانتی گراد و طول دوره روشنایی و تاریکی در شبانه روز به ترتیب ۱٤ و ۱۰ ساعت قرار گرفتند. هوادهی محلول غذایی تجدید شد.

البته این بار محلول غذایی هوگلند با غلظت های مختلف سرب (صفر، ۱۰۰، ۲۰۰، ٤۰۰ میکرومول بر لیتر به صورت نیترات سرب) تهیه شد و بر اساس برچسب هر ظرف، محلول های مورد نظر در آن ریخته شد. آب تعرق شده توسط گیاه به صورت روزانه با آب مقطر جبران گردید. پس از گذشت ده روز برداشت انجام شد. به منظور تعیین ارزش تحمل به سرب و اندازه گیری مقدار پروتئین و پرولین ریشه و اندام هوایی دو رقم کلزا در قالب طرح، آماری کاملاً تصادفی با چهار تکرار آزمایشگاهی زیر اتخاذ گردیده است.

ارزش تحمل

ارزش تحمل (IT) بر اساس فرمول ذیل محاسبه گردید (۱۰).

$$IT = \frac{\text{میانگین طول ریشه ها در محلول آزمایش}}{\text{میانگین طول ریشه ها در شاهد}}$$

اندازه گیری مقدار پروتئین

نمونه ای خشک گیاهی توزین شده (۱-۰/۵ گرم) در ۵ میلی لیتر بافر تریس اسید کلریدریک سائیده و سپس نمونه ها با دور بالا سانتریفیوژ شدند. ۰/۰۵ میلی لیتر از محلول رویی نمونه دستگاه سانتریفیوژ را برداشته و به آن یک میلی لیتر معرف (شامل ۰/۵ میلی لیتر تارتارات سدیم ۲ ٪ + ۰/۵ میلی لیتر سولفات

Archive of SID

www.SID.ir

۱ ٪ + ۱۰ میلی لیتر کربنات سدیم ۱۰ ٪ محلول در هیدروکسید ۰/۵ نرمال) افزوده شد و در حرارت آزمایشگاه به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شد و سپس سه میلی لیتر معرف فولین ۰/۲ نرمال به محلول بالا اضافه شد.

محلول حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در بن ماری در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و سپس میزان جذب را با دستگاه اسپکترفتومتر (U.V) مدل ۲۰۰۰ هیتاچی در طول ٦٢٥ نانومتر قرائت شد و با استفاده از فرمول ذیل، مقدار پروتئین محاسبه گردید (۱۰).

$$M = \frac{C \times 0.005}{W}$$

M = مقدار پروتئین در هر گرم ماده خشک گیاهی

W = وزن خشک نمونه

C = غلظت

اندازه گیری مقدار پرولین

نمونه های تر گیاهی توزین شده (یک گرم) را در ۱۰ میلی لیتر محلول ۳ ٪ اسید سولفوسالیسیلیک سائیده و سپس نمونه ها صاف گردیدند آنگاه ۲ میلی لیتر معرف نینهیدرین و ۲ میلی لیتر اسید استیک خالص افزوده شد و لوله ها در بن ماری با دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد به مدت یک ساعت قرار داده شد سپس لوله ها در حمام یخ به مدت نیم ساعت قرار گرفتند. به هر لوله آزمایش ٤ میلی لیتر تولوئن افزوده و آنها را خوب تکان داده و سپس میزان جذب لایه رنگی فوقانی(حاوی تولوئن و پرولین) با دستگاه اسپکتوفتومتر (U.V) مدل ۲۰۰۰ هیتاچی در طول موج ۵۲۰ نانومتر قرائت گردید. تجزیه واریانس و آزمون F توسط نرم افزار SPSS در سطح احتمال ۵٪ و رسم نمودارها با کمک نرم افزارExcel 2003 انجام شد.

نتایج و بحث

طول ریشه

جهت تعیین تأثیر سرب بر ارزش تحمل، مقدار پروتئین و پرولین در ریشه و اندام هوایی کلزا آزمایش بر روی دو ژنوتیپ هایولا ۳۰۸ و آر.جی.اس ۰۰۳ انجام شد که نتایج آن بشرح ذیل است. نتایج حاصل از این تحقیق نشان می دهد از لحاظ طول ریشه هر دو ژنوتیپ با افزایش غلظت سرب محلول غذایی نسبت به شاهد کاهش معنی داری در سطح ۵٪ وجود داشت (جدول۱). با توجه به درصد میانگین های طول ریشه مشخص گردید که ارزش تحمل به سرب رقم آر.جی.اس ۰۰۳ بیشتر از هیبرید هایولا ۳۰۸ است (جدول ۲).

Archive of SID

www.SID.ir

افزایش مقدار پروتئین در ریشه هر دو هیبرید نسبت به شاهد با افزایش غلظت سرب محلول غذایی در سطح احتمال ۵٪ معنی دار بود. مقدار پروتئین ریشه هیبرید هایولا ۳۰۸ بیشتر از رقم آر.جی.اس ۰۰۳ بود. مقدار پروتئین در اندام هوایی هیبرید هایولا ۳۰۸ در همه تیمارهای سرب نسبت به شاهد کاهش معنی داری در سطح ۵٪ نشان می داد (جدول۲). از طرف دیگر هرچند افزایش مقداری پروتئین در اندام هوایی هیبرید هایولا ۳۰۸ با افزایش غلظت سرب محلول غذایی مشاهده می شد و این افزایش از نظر آماری در سطح احتمال ۵٪ نسبت به شاهد معنی دار بود (جدول ۱). با مقایسه میانگین ها مشخص گردید که درصد افزایش مقدار افزایش پروتیئن در ریشه هیبرید هایولا ۳۰۸ بیشتر از رقم آر.جی.اس ۰۰۳ بود (جدول۲). فیتوکلاتین ها پپتیدهای مشتق از گلوتایتون با ساختار عمومی (y-Glu-Gys) Gly) از ۱۱-۲ واحد می باشند و در گیاهان در زمان قرار گرفتن در معرض تنش فلزات سنگین ساخته می شوند (ورما، ۱۹۹۹). نقش فیتوکلاتین ها در هموستازی متابولیسم یون های فلزی ضروری است یون های فلزی زیاد از جمله Cu(II)، pb(II) و Cd(II) سنتز فیتوکلاتین ها را در گیاهان القا می نمایند و از طرف دیگر محققانی ضمن مطالعه اثر سرب بر سه گونه *Pisum sativum* ، *Vicia faba* و *phaseolus vulgaris* نشان دادند که سرب موجب افزایش شدید مقدار پپتیدهای تیولی، فیتو و هوموفیتوکلاتینها در حدود ٤٥٠٠ nmol $SHg^{-1}FW$ در ریشه های *P.sutivum* می گردد؛ که ارزش تحمل متوسطی به سرب داشت. در حالی‌که غلظت فیتوکلاتین ها در ریشه *V.faba* که ارزش تحمل بالاتری نسبت به *P.sutivm* داشت خیلی پایین تر بوده است. *P.vulgaris* نیز دارای پایین ترین ارزش تحمل بود ولی مقدار متوسط فیتوکلاتین را تولید می کرد (۲ و ۸).

جدول ۱: خلاصه نتایج تجزیه واریانس و سطح معنی داری صفات مورد بررسی

منابع تغییرات	درجات آزادی	میانگین مربعات					
		طول ریشه	ارزش تحمل ریشه	پروتئین ریشه	پروتئین اندام هوایی	پرولین در ریشه	پرولین در اندام هوایی
تیمار	۷	٦/۱۲ *	۱۰/۲٥ *	۹/۲۱ *	۳/۱۹ *	۱۱/۸٤ *	۳٤/٦۳ *
ژنوتیپ	۱	۲۱/۱۳ *	۱۷/۷٥ *	۰/۹٥ *	۹/۲٤ *	۱/۱۳ *	۱۷۸/۷٤ *
غلظت	۳	٦/٤٦ *	۱۱/٥۲ *	۱۰/۱۷ *	۱/۷٤ *	۲٥/۳۷ *	۷/۲٤ *
ژنوتیپ× غلظت	۳	۰/۷۳ ns	۱٤/۱۹ *	۷/٦۸ *	۲/٥۷ *	۱/۷۹ *	۷/۷ ns
خطا	۱٤	۱/٤٦	٥/٥۱	۰/۲	۰/۷٤	۱/۱۲	٥/۱۱
ضریب تغییرات (٪)		٦/۷٥	۷/۷۹	۷/۸۹	۸/٥	٦/۲٥	۹/۹

**، * و ns: به ترتیب اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ ، ۵٪ و غیر معنی‌دار

هیبرید هایولا ۳۰۸ دارای ارزش تحمل کمتری نسبت به رقم آر.جی.اس ۰۰۳ بود ولی درصد افزایش مقدار پروتئین در اندام هوایی با افزایش سرب محلول غذایی نسبت به شاهد کاهش معنی داری یافته

Archive of SID

www.SID.ir

است که این نتیجه با نتایج برخی پژوهشگران مطابقت دارد (۲ و ۱۰). آنها اعلام کردند مقدار N– آمینواسید و N– پروتئین در اندام‌های هوایی برخلاف ریشه گیاه در معرض مس با افزایش غلظت مس، کاهش یافته است. بعبارتی مس اثر منفی بر متابولیسم N– آمینواسیدها و پروتینهای اندام هوایی گیاه داشت. همین طور سرب سبب تجمع و تراکم کروماتین و تثبیت مارپیچ مضاعف دی.ان.آ و به‌دنبال آن مانع از فرآیندهای رونویسی و ترجمه می گردد. از طرف دیگر نتایج حاصل از این پژوهش نشان می دهد که مقدار پرولین ریشه در هر دو هیبرید نسبت به شاهد با افزایش غلظت سرب محلول غذایی در سطح احتمال ۵٪ افزایش معنی داری یافته است. اما افزایش غلظت سرب محلول غذایی افزایش معنی داری یافته، اما افزایش مقدار پرولین و اندام هوایی هر دو هیبرید کلزا نسبت به شاهد در سطح ۵٪ معنی دار نبود (جدول ۲). درصد افزایش مقدار پرولین در ریشه و اندام هوایی رقم آر.جی.اس ۰۰۳ بیشتر از هیبرید هایولا ۳۰۸ است. و درصد افزایش مقدار پرولین در ریشه هر دو هیبرید بیشتر از اندام هوایی بود (جدول ۲).

جدول۲: مقایسه میانگین اثرات اصلی صفات مورد بررسی

تیمار	طول ریشه میلی متر	درصد ارزش تحمل به سرب ریشه	پروتئین ریشه میکرو گرم بر گرم ماده خشک	پروتئین اندام هوایی میکرو گرم بر گرم ماده خشک	پرولین در ریشه میلی گرم بر گرم ماده خشک	پرولین در اندام هوایی میلی گرم بر گرم ماده خشک
ژنوتیپ						
Hyola 308	۱۷ a	۱٤۸/۱٤ a	۱۱٤۸ a	۱۳٤۰ a	۲۹/٥ ab	۲۹/۳ a
RGS 003	۱۰/٥ b	۲۱٤/٦۷ b	۱۰۱۰ ab	۹۱۰ b	۳۱ a	۲۷ ab
غلظت سرب (میکرو مول بر لیتر)						
۰	۸/٥ a	-----	۱٦۸ d	۷۰۰ a	۱۱ c	۱۲/٥ b
۱۰۰	۸ ab	۱٥٤	۳۸۰ c	٥۳۰ ab	۱۳/٥ bc	۱۱ ab
۲۰۰	٦/٥ b	۱۱۰/۸۲	۷۱۰ b	٥۲۰ ab	۱۷ b	۱۰/۳ ab
٤۰۰	٤/٥ b	۹۷/۹۹	۹۰۰ a	٥۰۰ b	۱۹ a	۱۸/٥ a

حروف مشابه در یک ستون نشانگر عدم وجود تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ ٪ احتمال بر اساس آزمون دانکن است.

پرولین در بهبود تنش های فلزات محیطی از جمله تنش های فلزات سنگین در گیاهان و میکروارگانیسم ها نقش مهمی دارد. احتمالاً پرولین در سلولهای تحت تنش نقش آنتی اکسیدانی دارد (ورزبیکا، ۲۰۰٦، سیریپورنادول، ۲۰۰۲). همچنین مکانیسم اکثر گیاهان و جلبک ها در پاسخ به فلزات سنگین تولید پرولین می باشد و انباشتگی پرولین در گیاهان تحت تنش با کاهش آسیب غشاها ارتباط دارد (۱۵). از طرف دیگر محققانی با ایجاد جلبک کلامیدوموناسی با بیان بسیار زیاد Δ'- پیرولین -۵- کربوکسیلاز نستتاز که باعث افزایش تولید پرولین می شود. به این نتیجه رسیدند که تولید پرولین در

Archive of SID

www.SID.ir

جلبک تراریخت ۸۰ ٪ بیشتر از نوع وحشی است و سرعت رشد در جلبک تراریخت بیشتر از نوع وحشی بوده است.

در این پژوهش نیز درصد افزایش مقدار پرولین در رقم آر.جی.اس ۰۰۳ بیشتر از هیبرید هایولا ۳۰۸ بود با توجه به مشاهدات فوق، چنین به نظر می رسد که رقم آر.جی.اس ۰۰۳ نسبت به سرب بردبارتر می باشد. این مورد با درصد کاهش کمتر رشد ریشه رقم آر.جی.اس ۰۰۳ و به تبع آن با ارزش تحمل به سرب بیشتر این هیبرید نسبت به هیبرید هایولا ۳۰۸ مطابقت دارد. در مجموع بر اساس نتایج حاصل از این پژوهش به نظر می رسد که گیاه کلزا بویژه رقم آر.جی.اس ۰۰۳ برای آلایش زدایی خاک‌های آلوده به سرب استعداد بالقوه ایی دارد.

سپاسگزاری

از باشگاه پژوهشگران جوان دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهواز که هزینه این طرح تحقیقاتی را تقبل نموده است کمال تشکر و قدردانی ابراز می گردد.

منابع

1- Ajam, Sh. 2005. Effect of planting date and nitrogen fertilizer levels on yield of canola variety Hyola401 in Khuzestan. M.Sc. Thesis of Agriculture. Islamic Azad University. Science and Research Khuzestan Branch.

2- Akhondi, M. 2006. Effect of Drought stress on Prolin and elements on alfalfa (*Medicago sativa* L.). Journal. Plant and breeding. Vol 4: 115-130.

3- Azizi, M., Soltani, A. and Khavari, S. 1999. Canola, physiology, race, biological technology (translated in persian). First Edition. University of Mashhad Press. 419 Pp

4- Bates, L., Waldern, S. and Treare, R. 2003. Rapid determination of free prolin for water stress studies. Plant and soil. 39:205-207.

5- Erick, M. and Peatk, J. 1999. Kinetics of lead absorption/desorption on goethite:residence time effect, Soil Sci. 164:28-39

6- Hu, S., Lau, K. w. k. and Wu, M. 2001. Cadmium sequestration in Chlamydomonas Reinhardt. Plant Science. 161. 987-996

7- Khayat, M., Rahnama, A. A., Lorzadeh, S. and Lack, S. 2007. Curve of growth, yield and yield components of rapeseed promising genotypes on different sowing conditions Khuzestan (Ahwaz). Msc. Thesis of Agriculture. Islamic Azad University. Science and Research Khuzestan Branch

8- Lowary, O., Rosebrough, H. and Far, N. J. 1999. Protein measurement with the pholin phenol reagent. Journal. Biology. Chemical. 193:256-275

9- Piechalak, A., Tomaszewska, B., Baralkiewicz, A. and Maleckaa, D. 2002. Accumulation and detoxification of lead ions in legumes. Phytochemistry. 60: 153-162.

10- Qorbanli, M. L. 2005. Assessment tolerance and root and shoot protein and prolin, under application the lead, canola varieties. J. Plant and ecosystem. 1(2): 56-67

11- Shariati, Sh. 2000. Rapeseed. First Edition. Department Budget Planning Ministry of Agriculture Press. 125 Pp.

12- Siripornadulsil, S. and Traina, M. 2002. Molecular Mechanisms of praline- Mediated Tolerance to Toxic Heavy Metals in Transgenic Microalgae. The Plant Cell. 14:2837-2847.

13- Verma, D. P. S. 1999. Osmotic stress tolerance in plant: Role of prolin and sulfur metabolism. In Molecular Responses to cold Drought, Heat and Salt Stress in Higher Plant , K. Shinozaki and K. Yamaguchi- shinozaki, eds, pp.153-168

14- Wierzbicka, M. 2006. Lead translocation and location *Allium cepa* roots. Candian. Journal. Botany. 65:1851-1860

Archive of SID

www.SID.ir

15- Wilkins, D. A. 2000. A technique for the measurement of lead tolerance in plants. Nature 180, 37-38.

Archive of SID

www.SID.ir