

بررسی اثر فلوراید بر ساختار تشریحی اندام‌های رویشی گیاه لوبیا *Phaseolus vulgaris* L.

صدیقه اربابیان*، سیمین تاجیک اسمعیلی و سایه جعفری مرندی
گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاداسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران

چکیده

فلوراید، ماده‌ای سمی برای طبیعت است که از منابع مختلفی وارد محیط زیست می‌شود. از مهمترین منابع تولید فلوراید صنعت آلومینیوم سازی است که با ورود آن به طبیعت به صورت سدیم فلوراید، هیدروژن فلوراید، ترکیبات گاز فلوراید و ذرات فلوراید، تأثیرات مضر بر گیاهان، جانوران و انسان در پی خواهد داشت. در این تحقیق، اثر آلودگی محلول سدیم فلوراید بر گیاه لوبیا بررسی گردید. طی دو مرحله تیماردهی با دو نوع غلظت از محلول سدیم فلوراید، جوانه‌زنی بذرها آزمایش شد. در مرحله اول از محلول سدیم فلوراید با غلظت‌های ۰/۲، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر استفاده شد که به دلیل سمیت بالای محلول‌ها (جز تیمار ۰/۲ که مانع از جوانه زنی نشد) کنار گذاشته شدند. در مرحله دوم از غلظت‌های ۰/۵، ۰/۸ و ۱/۲ میلی‌گرم در لیتر استفاده شد که در همه موارد جوانه‌زنی مشاهده گردید. در فاز رویشی نیز آثار زیان‌بار سدیم فلوراید طی آبیاری‌های روزانه به صورت نکروزه شدن، کلروزه شدن، زخم در سطح پهنک برگ، پیری زودرس بوته گیاه و پژمردگی گیاهان تحت تیمار نسبت به شاهد مشاهده شد. همچنین، سدیم فلوراید باعث افزایش طول ساقه و کاهش طول ریشه و انشعابات ریشه گردید. در بررسی تشریحی افزایش تعداد آوندهای چوبی و به هم ریختگی نظم آوندها مشاهده شد. تأخیر در گذر از مرحله رویشی به مرحله زایشی در جوانه انتهایی یکی دیگر از آثار مورد مشاهده فلوراید بود.

واژه‌های کلیدی: جوانه‌زنی، سدیم فلوراید، فاز رویشی، کلروزه شدن، لوبیا، نکروزه شدن

مقدمه

فلوراید یکی از آلاینده‌های زیست‌محیطی است که اگرچه برای بهداشت و سلامت دندان ضروری است، اما در غلظت‌های بالا آثاری سمی دارد (Mullenix et al., 1995). سمیت فلوراید بر سیستم‌های زیستی و انسان؛ حتی کمی بیشتر از سرب ارزیابی شده است و

آلودگی محیط‌زیست از مهمترین مشکلاتی است که در حال حاضر جهان با آن رو به روست. اگر کنترلی بر روند رشد تصاعدی این پدیده انجام نگیرد، با فاجعه محیط‌زیست رو به رو خواهیم شد (Aardema, 1981).

در سایر اندام‌ها، به ویژه کبد نیز اختلالاتی مشاهده شده است. در پژوهشی نشان داده شد که حتی مقادیر بسیار اندک فلوراید در کودکان ایجاد مسمومیت می‌کند و پیشنهاد شد که در حد سمیت فلوراید باید تجدید نظر شود (Akiniwa, 1997). در سال ۲۰۰۶ مؤسسه استاندارد بین‌المللی آمریکا پیشنهاد کرد که در فلوراید اضافه شده به آب آشامیدنی یعنی ۴ ppm بر اساس استاندارد مؤسسه آمریکا (EPA) باید تجدید نظر شود و استاندارد مربوطه کاهش یابد (Fluoride Action Network, 2006).

از آنجایی که گیاهان در زنجیره غذایی انسان قرار دارند و نیز به علت داشتن خواص دارویی مورد توجه بشر بوده‌اند، هر گونه آسیب به آنها می‌تواند زندگی انسان را تهدید کند. تحقیق حاضر در این راستا به بررسی آلودگی فلوراید - که در حال حاضر از آلاینده‌های مهم محسوب می‌شود - می‌پردازد. در این پژوهش محلول سدیم فلوراید به عنوان آلاینده آب آزمایش و آثار آن بررسی شده است. بر اساس مطالعات مرجع شناختی، به آثار سمی فلوراید در گیاهان کمتر توجه شده است.

مواد و روش‌ها

گیاه مورد استفاده در این بررسی، گیاه لوییا با نام علمی *Phaseolus vulgaris* L. از تیره باقلا (Fabaceae) است. گیاهان این تیره به علت همزیستی با باکتری‌هایی به نام *Rhizobium leguminosarum* به حاصلخیزی خاک کمک زیادی می‌کنند.

آزمون جوانه‌زنی

در این مطالعه بذره‌های سالم لوییا که از شرکت آوند

می‌تواند موجب شکستگی و اختلال در رفتار کروموزوم‌های سلول‌های گیاهی، جانوری و انسانی شود (Zeiger et al., 1993). هنوز مشخص نیست که چه غلظت‌هایی از فلوراید در حد سمیت قرار دارند (Yiamouyiannis, 1983). فلوراید تمایل زیادی به پیوند با هیدروژن دارد و در ترکیب با DNA به فراوانی یافت می‌شود، بنابراین، احتمالاً علت سرطان‌زا بودن آن، ایجاد آسیب‌های مغزی و دخالت در ایجاد آلرژی به علت واکنش فلوراید با هیدروژن‌های DNA است (ATSDR, 1993). فلوراید سبب تحریک شدن کلاژن در بافت‌ها و به دنبال آن معدنی شدن آنها می‌شود. این عمل اگرچه موجب افزایش استحکام دندان‌ها می‌شود ولی در عین حال می‌تواند موجب معدنی شدن و سخت شدن بافت‌های نرم شود (Yiamouyiannis, 1983). برخی پژوهش‌ها نشان داده است که فلوراید می‌تواند بیش از ۱۰۰ سیستم آنزیمی را مهار کند. بسیاری از این آنزیم‌ها با مقادیری از فلوراید مهار می‌شوند که کمتر از حد اضافه شده به آب شرب است. بسیاری از این آنزیم‌ها مانند acetylcholinesterase و ATPase نقش مهمی در عملکرد مغز و سیستم عصبی دارند (Yiamouyiannis, 1983). کمبود پروتئین، ویتامین C و منیزیم، مسمومیت با فلوراید را افزایش می‌دهد. همچنین، فلوراید با تولید انرژی در تضاد است، لذا اعتقاد بر این است که افراد با بیماری قلبی و کلیوی آسیب بیشتری در حالت مسمومیت با فلوراید متحمل می‌شوند (Aardema, 1993). Sharma و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند که افزایش سدیم فلوراید بیش از ۱/۵ ppm سبب اختلال در اندام‌های تولید مثلی موش شده، باروری را به شدت کاهش می‌دهد. علاوه بر این،

با اهداف پژوهش برگ و ساقه در تثبیت کننده الکل - گلیسرین برای تهیه برش‌های دستی (دو هفته) و مریستم رویشی در تثبیت کننده FAA برای تهیه برش‌های میکروتومی (۱۶ ساعت) قرار گرفتند. پس از طی زمان یاد شده، برش‌گیری دستی با استفاده از تیغ معمولی انجام و پس از رنگ آمیزی (با سبز متیل و کارمن زاجی) با میکروسکوپ نوری بررسی شد. ساختار تشریحی نمونه‌های شاهد و تحت تیمار مقایسه، تفاوت‌های موجود یادداشت و از آنها عکس برداری شد.

در برش‌گیری میکروتومی پس از شستشو و آب‌گیری نمونه‌ها، شفاف‌سازی و مرحله نفوذ پارافین انجام شد. سپس قالب‌گیری و برش‌گیری با دستگاه میکروتوم (برش‌های طولی با ضخامت ۸-۱۰ میکرون و برش‌های عرضی به ضخامت ۱۰-۱۲ میکرون) صورت پذیرفت. پس از چسباندن برش‌ها روی لام و در مراحل حذف پارافین، آبدهی، رنگ آمیزی (با همتاکسیلین - اتوزین)، شفاف‌سازی و چسباندن لامل با چسب انتالن انجام گرفت. سپس نمونه‌ها با میکروسکوپ نوری بررسی و نمونه‌های شاهد و تحت تیمار مقایسه شدند.

نتایج

بررسی جوانه‌زنی

در این مطالعه، تیماردهی در مرحله جوانه‌زنی در دو مرحله و با دو گروه غلظت متفاوت انجام شد. در مرحله اول از غلظت‌های ۰/۲، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر استفاده شد و نتایج نشان داد که همه تیمارها، به جز تیمار ۰/۲ از جوانه‌زنی بذرها جلوگیری می‌کنند. در تیمار اخیر، ۴۰٪ جوانه‌زنی مشاهده شد که نسبت به گیاهان شاهد ۶۰٪ کاهش را نشان داد. این نتایج با

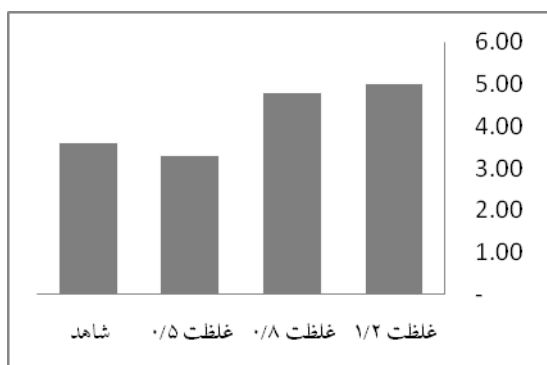
تهران تهیه شدند، با آب ژاول ۵٪ ضد عفونی و درون پلیت‌های استریل برای جوانه‌زنی قرار داده شدند و تیماردهی به صورت روزانه با اسپری محلول سدیم فلورااید با غلظت‌های ۰/۵، ۰/۸ و ۱/۲ میلی‌گرم در لیتر انجام گرفت. پس از یک هفته درصد جوانه‌زنی در گروه‌های مختلف تحت تیمار سنجش و مقایسه شد.

مطالعه اثر سدیم فلورااید (NaF) بر مرحله رویشی گیاه

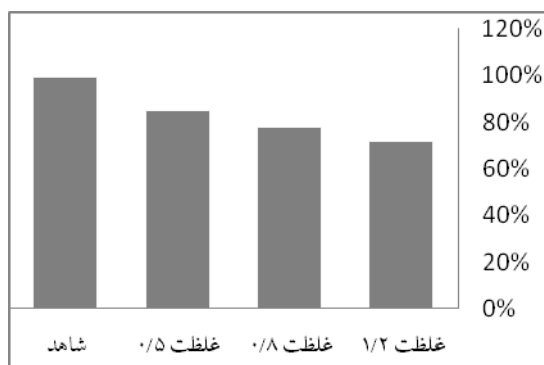
بذرها برای کشت به قطعه زمینی با ابعاد ۱/۵×۳ متر در محوطه ساختمان زیست‌محیطی شهرداری منطقه ۲۱ واقع در کیلومتر ۱۱ جاده مخصوص کرج منتقل شدند. این قطعه زمین به ۴ قسمت کوچکتر تقسیم شد (یک قطعه شاهد و ۳ قطعه برای گیاهان تحت تیمار). بذرها به صورت منظم و در فواصل ۲۰ سانتی‌متری از یکدیگر در عمق ۱۰ سانتی‌متر از سطح خاک کاشته شدند. ابتدا آبیاری به صورت روزانه با آب شهری صورت گرفت. پس از مشاهده اولین برگ مرکب در گیاه (به علت مستقل شدن فتوسنتز) تیماردهی همراه با آبیاری روزانه آغاز گردید. برای آبیاری و تیمار از محلول‌های سدیم فلورااید با غلظت‌های ۰/۵، ۰/۸ و ۱/۲ میلی‌گرم در لیتر استفاده شد. پس از گذشت یک دوره ۲۵ روزه، نمونه برداری به طور همزمان از بخش‌های یکسان گیاهان شاهد و گیاهان تحت تیمار انجام گرفت و به علایم مسمومیت از قبیل: نکروز و کلروز برگی توجه شد و اندازه‌گیری شاخص‌های رشد اندام‌های رویشی انجام گرفت.

مطالعه ساختمان داخلی

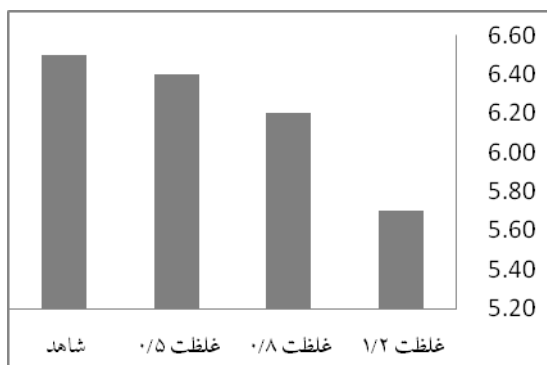
برای بررسی تشریحی و تکوینی در مرحله رویشی نمونه‌های هم‌سن، از برگ، ساقه و مریستم رویشی گیاهان شاهد و تحت تیمار نمونه برداری شده و متناسب



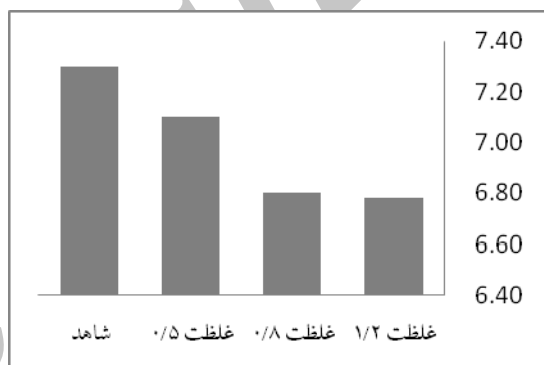
شکل ۲- اثر محلول سدیم فلوراید بر طول ریشه دانه‌رست‌های گیاه لوبیا. اختلاف بین گروه‌های تیماری و شاهد در سطح $P < 0/05$ معنی دار است.



شکل ۱- اثر سدیم فلوراید بر درصد جوانه‌زنی بذره‌های لوبیا. اختلاف بین گروه‌های تیماری و شاهد در سطح $P < 0/05$ معنی دار است.



شکل ۴- اثر محلول سدیم فلوراید بر تعداد برگ هوایی گیاه لوبیا. اختلاف بین گروه‌های تیماری و شاهد در سطح $P < 0/05$ معنی دار است.



شکل ۳- اثر محلول سدیم فلوراید بر طول بخش هوایی گیاه لوبیا. اختلاف بین گروه‌های تیماری و شاهد در سطح $P < 0/05$ معنی دار است.



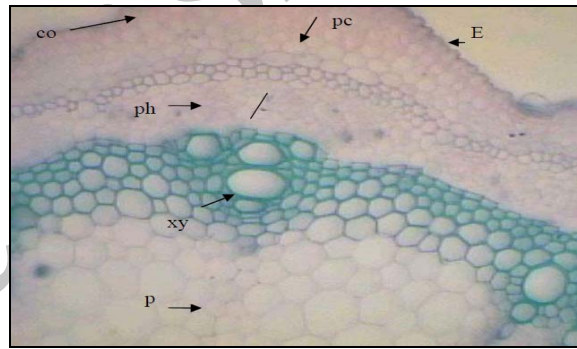
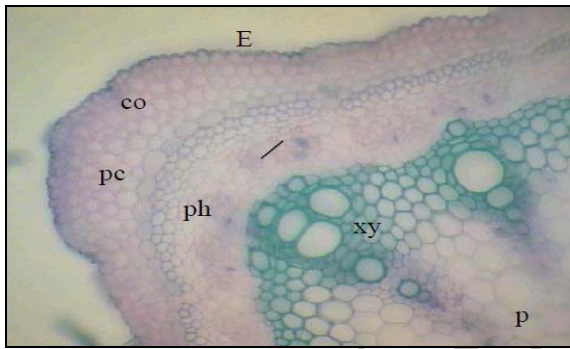
شکل ۵- نکروزه شدن برگ‌ها به ویژه در لبه و انتهای برگ در اثر تیمار با سدیم فلوراید

نظر می‌رسد به علت سازگاری گیاه با شرایط جدید و سازگاری با تنش موجود باشد. نتایج نشان داد که ساختار تشریحی برگ در گیاهان تحت تیمار تغییر کرده است. شکل ۸، ساختار تشریحی

در گیاهان تیمار شده با سدیم فلوراید اندازه دستجات آوندی و قطر آوندها بیشتر شده است. همچنین، میزان توسعه دستجات آوندی در میان بافت‌های ساقه به مراتب بیشتر است (شکل ۶)، که به

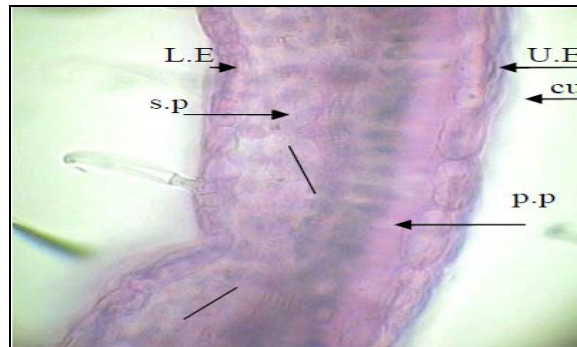
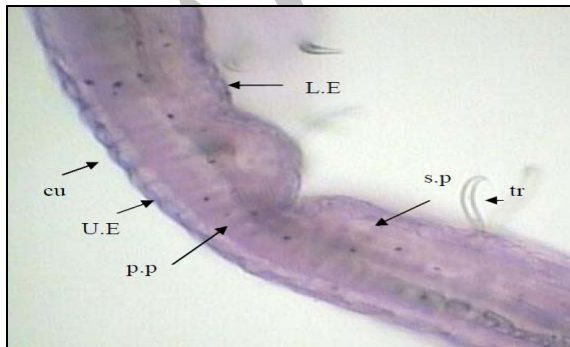
مشاهده شدند در حالی که در گیاه شاهد اندازه آنها یک دست‌تر و هم اندازه‌تر است (شکل ۹).
 مریستم رأسی در گیاهان تیمار شده در مقایسه با گیاهان شاهد در مرحله رویشی باقی مانده و فرصت رفتن به مرحله زایشی را پیدا نکرده، که این امر با رنگ‌پذیری بیشتر نواحی جانبی نسبت به نواحی میانی مشاهده گردید. در حالی که در گیاه شاهد همگن بودن رنگ در تمام مناطق (تونیکا، کورپوس و مریستم مغز) نشان‌دهنده این است که گیاه توانسته است از مرحله رویشی وارد مرحله پیش زایشی شود (شکل ۱۰).

پهنک برگ را در گیاهان شاهد و تحت تیمار نشان می‌دهد. در اثر تیمار با سدیم فلوراید، علاوه بر کاهش نظم و انسجام سلولی در ساختار برگ، بخشی از بافت‌های پارانشیمی برگ نیز از بین رفته است.
 همچنین، مقایسه ساختار رگبرگ برگ در گیاهان شاهد و تحت تیمار نشان داد که در بخش رگبرگ اصلی گیاه تیمار شده، تعداد آوندها و دستجات آوندی نسبت به شاهد افزایش می‌یابد. در قسمت دم‌برگ در گیاهان تیمار شده، آوندهای چوبی در اندازه‌های مختلف کوچک و بزرگ و حتی ریز در کنار یکدیگر

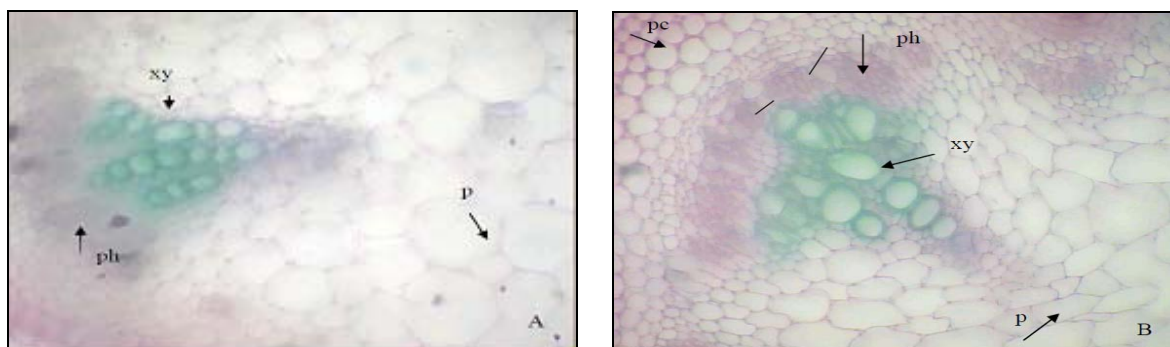


شکل ۷- برش ساقه گیاه تیمار شده با محلول سدیم فلوراید (۱۰۰X). بزرگی قطر آوندهای چوبی و میزان توسعه دستجات آوندی از اثرات تیماری است. E: اپیدرم، co: کلانشیم، pc: پارانشیم پوست، Ph: آبکش، xy: گزلبم، P: پارانشیم مغز، P: پارانشیم پوست، Ph: آبکش، xy: گزلبم، P: پارانشیم مغز.

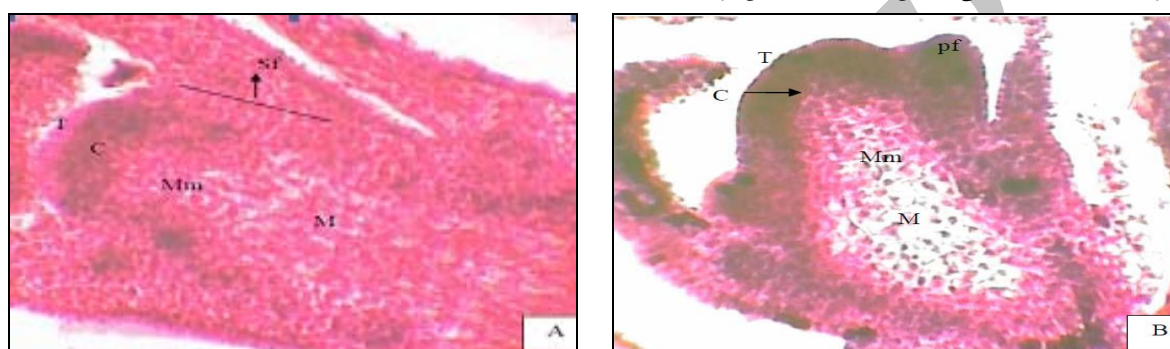
شکل ۶- برش عرضی ساقه گیاه شاهد (۱۰۰X). E: اپیدرم، co: کلانشیم، pc: پارانشیم پوست، Ph: آبکش، xy: گزلبم، P: پارانشیم مغز، (/): سلول‌های درشت که بین آبکش قرار دارند.



شکل ۸- برش عرضی پهنک گیاه شاهد (چپ) و تحت تیمار (راست) برگ شاهد (۴۰x). Cu: کوتیکول، U.E: اپیدرم فوقانی، P.P: پارانشیم نردبانی، s.p: پارانشیم حفره‌ای، L.E: پارانشیم تحتانی، xy: آوند چوبی، ph: آوند آبکش.



شکل ۹- برش عرضی دمبرگ گیاه شاهد (A) و گیاه تحت تیمار (B) (۱۰۰x). P: پارانشیم پوست، ph: آبکش، xy: چوب، P: پارانشیم مغز، (/): سلول‌های درشتی که بین سلول‌های آبکش قرار دارند.



شکل ۱۰- مقایسه مرستم رأسی گیاه شاهد (A) و گیاهان تحت تیمار (B) (۱۰۰x). در گیاه شاهد جوانه از مرحله رویشی عبور کرده و وارد مرحله زایشی شده است، اما در گیاه تحت تیمار جوانه در مرحله رویشی متوقف مانده است. T: تونیکا، C: کورپوس، Ir: بنیان برگگی، Mm: مرستم مغزی، M: مغز، Sf: سهم برگگی، Pf: پریموردیوم برگگی.

(Yiamouyiannis, 1983).

افزایش رشد طولی ریشه در دانه‌رُست‌ها به علت تنش‌های حاصل از محلول NaF است، که در کنار این امر رشد نامنظم ریشه و کاهش تولید انشعابات در ریشه نیز مشاهده می‌گردد. مطالعات انجام شده توسط Chang (۱۹۶۸) نشان می‌دهد که فلورايد با تغییراتی در وزن تر ریشه‌ها، رشد منظم آنها را تحت تأثیر قرار می‌دهد، که با نتایج حاصل از این پژوهش مطابقت دارد. بر اساس یک قانون کلی، فلورايد آلی در ریشه‌ها بیشتر از بخش‌های هوایی (ساقه و برگ) تجمع می‌یابد (Peter et al., 1965) که به تبع آن کاهش رشد (به دلیل سمیت سدیم فلورايد) در ریشه بیشتر از کاهش

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج آزمون جوانه‌زنی در گروه‌های تیماری با فلورايد نشان داد که تیمار گیاه لوبیا با محلول‌های NaF با غلظت‌های بالا (بیشتر از غلظت ۰/۲ میلی‌گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر) از جوانه‌زنی جلوگیری می‌کند که این امر نشانه سمیت بالای محلول‌هایی است که غلظت‌هایی بالاتر از غلظت فوق را دارند. تیمارهایی با غلظت پایین‌تر از غلظت مزبور، از جوانه‌زنی کامل جلوگیری نکردند، با این حال کاهش جوانه‌زنی در گیاهان تحت تیمار مشاهده شد. به نظر می‌رسد فلورايد می‌تواند با جلوگیری از عملکرد آنزیم‌هایی که در تنفس و جوانه‌زنی دخالت دارند، باعث مرگ دانه شود

صدمه دیدن آن شده، به دنبال متلاشی شدن سلول، تجزیه کلروپلاست اتفاق می‌افتد (McNulty and Newman, 1961). همچنین، نکروزه شدن گیاهان بر اثر تیماردهی با NaF با تحقیقات Rakowski (۱۹۹۷) مطابقت دارد. بر اساس مطالعات Ming و Miller (۱۹۶۷) روی اسفناج و سویا غلظت پایین فلوراید، ابتدا سبب افزایش جذب اکسیژن و در پایان کاهش مصرف اکسیژن را سبب شد. افزایش تنفس عموماً پیش از اینکه آسیب مشهودی رخ دهد، اتفاق می‌افتد و کاهش تنفس به آسیب قطعی بافت منجر می‌شود.

در نتیجه شرایط تغذیه‌ای نامناسب به دلیل حضور NaF، انتقال شیره خام با وجود عناصر آوندی متاگزیملی فراخ‌تر تا حدی بهبود می‌یابد. تأثیرات NaF بر ساقه به علت ایجاد تنش در محیط‌زیست گیاه، سبب پاسخ‌های سازشی از طرف گیاه می‌شود (Ming and Miller, 1967).

رشد در ساقه است و این امر با یافته‌های به دست آمده در این پژوهش مطابقت دارد.

فلوراید سدیم بر ویژگی‌های مورفولوژیک گیاه تأثیر گذاشته و به آسیب‌های شدید در گیاه منجر می‌شود، که برخی از آنها دیده می‌شوند و برخی دیگر قابل رؤیت نیستند. از جمله آسیب‌های قابل مشاهده کلروزه شدن (از بین رفتن کلروفیل)، مرگ حاشیه برگ، نکروزه شدن (مرگ بافت‌ها)، پارگی برگ و پژمردگی گیاه است که این تغییرات به ورود یون سمی فلوراید به داخل گیاه و تأثیر بر ساختار گیاه مربوط است؛ به طوری که نمای کلی از گیاهان کشت شده در ابتدای تیماردهی و اواخر آن این تغییرات، خصوصاً پژمردگی گیاهان را به خوبی نشان می‌دهد. با توجه به یافته‌های McNulty و Newman (۱۹۶۱) کلروزیس و نکروزیس به عنوان نخستین نشانه‌های اثر فلوراید در گیاهان قابل مشاهده هستند. این در حالی است که ورود یون فلوراید به سلول به عنوان یک عامل کشنده، باعث

منابع

- Aardema, M. (1981) Hydrogen bonds show their strength: Sodium fluoride-induced chromosome aberrations in different stages of the cell cycle: a proposed mechanism. *Mutation Research* 223: 191-203.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) (1993) Toxicological profile for fluorides, hydrogen fluoride, and fluorine (F). Department of Health and Human Services, Public Health Service, Atlanta.
- Akiniwa, K. (1997) R-examination of acute toxicity of fluoride. *Fluoride* 30: 89-104.
- Chang, C. (1968) Effect of Fluoride on nucleotides and ribonucleic acid in germination corn seedling roots. *Plant Physiology* 43: 669-674.
- McNulty, I. B. and Newman, D. W. (1961) Mechanism(s) of fluoride induced chlorosis. *Plant Physiology* 36: 385- 388.
- Ming, H. and Miller, G. (1967) Effect of fluoride on the respiration of leaves from higher plants. *Plant and Cell Physiology* 3: 483-493.
- Mullenix, P., Denbesten, P., Schunior, A. and Kernan, W. (1995) Neurotoxicity of sodium fluoride in rats. *Neurotoxicology and Teratology* 17: 169-177.
- Fluoride Action Network: EPA Fluoride Standards Database. Retrieved from <http://www.fluoridealert.org/health/epa/nrc/excerpts.html> at: 11 February 2006.
- Peters, R., Murray, R. and Shorthouse, M. (1965) Fluoride metabolism in *Acacia*

- georginae*. Biochemistry Journal 95: 724-730.
- Rakowski, K. (1997) Hydrogen fluoride effects on plasma membrane composition and ATPase activity in needles of white pine (*Pinus strobus*) seedlings pretreated with 12 h photoperiod. Trees-Structure and Function 11: 248-253.
- Sharma, J. D., Solanki, M. and Solanki, D. (2007). Sodium fluoride toxicity on reproductive organs of female albino rats. Asian Journal of Experimental Science 21: 359-364.
- Yiamouyiannis, J. (1983) Fluoride, the aging factor. Health Action Press, Delaware, Ohio, USA.
- Zeiger, E., Shelby, M. and Witt, K. (1993) Genetic toxicity of fluoride. Environmental and Molecular Mutagenesis 21: 309-318.

Archive of SID

Archive of SID

Effect of Fluoride on anatomical structure of vegetative organs in *Phaseolus vulgaris* L.

Sedigheh Arbabian *, Simin Tajik Esmaili and Sayeh Jafari Marandi

Department of Biology, Islamic Azad University, North-Tehran Branch, Tehran, Iran

Abstract

Fluoride is a toxic solution for the nature and enters environment from different sources. Aluminum industry is the most important source of fluoride which empties to the nature as sodium fluoride, hydrogen fluoride, gas components of fluoride and fluoride particles causing damaging effects on plants, animals and the humans. In this research, toxic effect of sodium fluoride as a nature pollutant has been examined on bean *Phaseolus vulgaris*. At first, bean seeds were exposed to different concentrations of sodium fluoride (0.2, 0.5, 1 and 2 mg/100 cc water) while three other treatments put aside because of high toxicity of the solution and anti-germinative effects in these concentrations. In the second stage, we applied new solutions with concentrations of 0.5, 0.8 and 1.2 mg/l sodium fluoride for germination and tilling the seeds, and just watered the controls. In vegetative phase, damaging effects of NaF during daily irrigation were observed as necrosis, chlorosis and wounds on leaf blade, early senescence and plants fading. Increase in root and shoot length and decrease in generation rate and root ramification also could be attributed to NaF. Delay in transition of shoot apex from vegetation phase to generation phase was another observed effect of fluoride treatment.

Key words: Seed Germination, Chlorosis, Necrosis, *Phaseolus vulgaris*, Sodium fluoride, Vegetative phase

* Corresponding Author: arbabias@yahoo.com