

مطالعه کروموزومی گیاه یونجه زرد (*Melilotus officinalis* (L.) Lam.)

تحت آلودگی معدن سرب و روی زه آباد قزوین

فاطمه حاج مرادی^{۱*} و علیرضا طالب بیدختی^۲

۱- استادیار گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

۲- استادیار گروه زمین شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره)

(تاریخ دریافت ۹۷/۰۸/۰۲ - تاریخ پذیرش ۹۷/۱۰/۰۳)

چکیده:

گونه گیاهی یونجه زرد (*Melilotus officinalis* (L.) Lam.) به طور طبیعی در نزدیکی معدن سرب و روی زه آباد در استان قزوین رشد می کند. هدف از این مطالعه تعیین میزان آلودگی سرب و روی در آب و خاک محل نمونه برداری و بررسی تاثیر طولانی مدت این آلاینده ها در رفتار میوزی و نازایی دانه های گرده در گونه یونجه زرد می باشد. آنالیز شیمیایی آب و خاک محل نمونه برداری به روش-ICP MS نشان دهنده وجود فلزات سنگین سرب و روی با غلظتی بسیار بیشتر از حد استاندارد می باشد. اثر خاک و آب آلوده به فلزات سنگین سرب و روی بر روی گیاه یونجه زرد با مطالعه درصد ناهنجاری های میوزی در سلول های مادر دانه گرده، مورد مطالعه قرار گرفت. با توجه به افزایش ناهنجاری های میوزی، کاهش شاخص میوزی و کاهش توانایی حیات دانه های گرده در گیاه آلوده، نتایج نشان داد که خاک و آب آلوده به فلزات سنگین دارای اثرات قابل ملاحظه ای بر روی تقسیم میوزی سلول های مادر گرده در گیاه آلوده نسبت به گیاه شاهد می باشند و می توانند باعث سمیت ژنتیکی در گیاه مورد مطالعه شوند. این داده ها نشان می دهند که گیاه یونجه زرد از نظر میوزی پایدار نمی باشد. به طور کلی سلول های مادر گرده در نمونه های آلوده افزایش ناهنجاری هایی مانند چسبندگی کروموزوم، B کروموزوم، پل، لاگارد، میکرونوکلئوس، سیتومیکسیسو سه قطبی را نشان دادند.

کلیدواژگان: روی، سرب، مطالعات کروموزومی، یونجه زرد

۱. مقدمه

عنوان گیاه پالایی برای حذف فلزات سنگین استفاده

کرد (Dalvand؛ Martinez-Sanchez *et al.*, 2012)

Hamidian *et al.*, 2014؛ *et al.*, 2014

؛ Norouznia and Hamidian, 2014؛ 2014

(Hamidian *et al.*, 2016).

سرب و روی و دیگر یون‌های فلزی مانند نیکل، مس،

آلومینیوم، کروم، جیوه و کبالت ممکن است منجر به

آشفتگی‌هایی در الگوی چرخه میوزی و میتوزی و در

نتیجه باعث ایجاد انواع ناهنجاری‌های کروموزومی

مثل میکرونوکلئوس، پل، چسبندگی و غیره شوند

(Seregin *et al.*, 1978؛ Ravindran, 2001)

Zohari *et al.*, 2008؛ Yucel *et al.*, 2001

2012). انواع اختلالات نموی در بساک و تخمدان

گیاهان منجر به ایجاد دانه‌های گرده و تخمک‌های

ناقص می‌شود (Micieta and Ostrolucka, 1989)

Koscinska-Izmailow, 2000؛ Murin, 1996

Biscupa and Izmailow, 2000؛ Pajak, 2000

2004؛ 2009؛ Kłosowska *et al.*, 2009). از آزمون‌های

مختلفی برای بررسی توانایی حیات دانه گرده بر

اساس تکنیک رنگ و به منظور تعیین فعالیت

آنزیمی، یکپارچگی غشا و توانایی رنگ‌پذیری

سیتوپلاسم و هسته دانه گرده استفاده می‌شود

(Nepi and Khatun and Flowers, 1995)

Vizintin and Bohanec, 2000؛ Franchi, 2000

(Slomka *et al.*, 2010؛ 2004).

از بین فلزات سنگین، روی (Zn) و سرب (Pb)

گسترش بیشتری دارند. وجود فلز روی در گیاهان

برای رشد طبیعی آنها ضروری است ولی غلظت بالای

این فلز به شدت سمی است. سرب یکی دیگر از

فلزات سنگین و خطرناک حاصل از فعالیت‌های

انسانی می‌باشد. این عنصر از خاک و از طریق ریشه‌ها

جذب می‌شود و به اندام‌های هوایی گیاه با نسبت‌های

فاکتورهای ژنتیکی و محیطی در رشد و نمو گیاهان

موثرند. هرگونه تغییر در این پارامترها منجر به تغییر

در گیاهان می‌شود. محیط شامل عوامل زنده و

غیرزنده است که با یکدیگر دارای میانکنش بوده و

روی اطرافشان اثر می‌گذارند. آلودگی‌های محیط

زیست ناشی از فعالیت انسان موجب اختلال در

عملکرد این سیستم می‌شود. در سال‌های اخیر

افزایش روبه رشد صنعت منجر به اضافه شدن آلودگی

به آب، هوا و خاک شده است. آلودگی فلزات سنگین

در خاک همواره مورد توجه محققان بوده است زیرا

این آلودگی‌ها نه تنها در سلامت انسان بلکه در رشد

گیاهان نیز موثر می‌باشند (Tripathi and Girjesh,

Bhuyan and Bifeng *et al.*, 2017؛ 2010

2017؛ Islam, 2017؛ Wu *et al.*, 2018). اکوسیستم

کشور ایران نیز مانند سایر کشورهای در حال توسعه

در معرض انواع آلودگی‌هایی است که تنوع زیستی

طبیعی را به شکل‌های مختلف مختل می‌کند. جذب

فلزات سنگین می‌تواند منجر به تغییرات مخربی در

گیاهان از جمله ممانعت از رشد ریشه به عنوان اثر

ریخت شناسی حاصل از سمیت فلزی شود

(Samardakiewicz *et al.*, 2005). سمیت فلزی

در گیاهان توسط نویسندگان مختلفی گزارش شده

است (Kumar *et al.*, 2016؛ Dalvand *et al.*, 2016)

2017؛ Abubacker and Sathya, 2017

(Ackova, 2018).

واکنش گیاهان نسبت به آلودگی‌های فلزات سنگین

متفاوت است. برخی گیاهان مانند گون، بارهنگ آبی

و غیره قادرند مقادیر بالایی از فلزات سنگین را در

اندام‌های خود جذب کنند. می‌توان از این گیاهان به

شده و پس از ته‌نشینی رسوبات بخشی از آب پساب مجدداً در فرآیند فرآوری مورد مصرف قرار می‌گیرد. مطالعات Sotohian و همکاران (۲۰۱۴) نشان می‌دهد که بدلیل بهره برداری از معدن، میزان سرب و روی در منابع آبی و خاکی اطراف منطقه مورد بهره برداری خیلی بیشتر از حد مجاز بوده و فعالیت معدنی در این منطقه منجر به آلودگی شدید محیط زیست در منطقه شده است.

اغلب مطالعات پیرامون اثرات آلاینده‌ها در گیاهان، بر روی گیاهان کشت شده خصوصاً گیاهان زراعی انجام شده است و مطالعات کمی بر روی اثرات آلاینده‌ها بر گیاهان در طبیعت صورت گرفته است. بنابراین هدف از این مطالعه ضمن تعیین سطح آلودگی آب و خاک در محل رویش گیاه یونجه زرد (*M. officinalis*)، بررسی اثرات احتمالی سمیت ژنتیکی آلاینده‌ها در گیاه مورد مطالعه به عنوان گیاه مرتعی خودرو در ناحیه آلوده می‌باشد. در این مطالعه به بررسی ناهنجاری‌های میوزی و ارزیابی توانایی حیات دانه‌های گرده در گیاه یونجه زرد تحت آلودگی معدنی آب و خاک و مقایسه آن با نمونه شاهد پرداخته می‌شود.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. منطقه مورد مطالعه

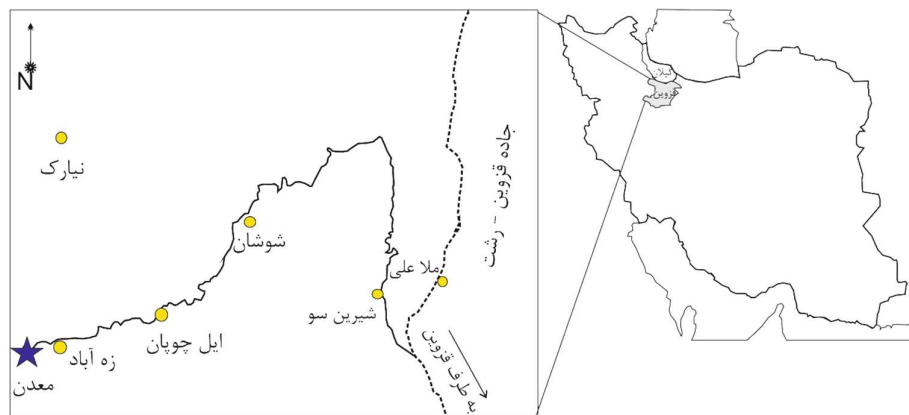
معدن سرب و روی روستای زه آباد در ۸۹ کیلومتری شمال غربی قزوین با طول جغرافیایی ۴۹ درجه و ۲۵ دقیقه و عرض ۳۶ درجه و ۲۸ دقیقه قرار دارد. به منظور مطالعه ناهنجاری‌های میوزی و ارزیابی توانایی حیات دانه‌های گرده در گیاه یونجه زرد (*M. officinalis*)، این گیاه به عنوان جمعیت آلوده از محدوده معدن مورد نظر جمع‌آوری شد. با توجه به

مختلف منتقل می‌شود (Yucel et al., 2008). مقادیر زیاد سرب و روی در آب، خاک و هوا در محیط زیست می‌تواند اثرات اکولوژیکی و زیست-شناختی قابل توجهی داشته باشد. با وجود این، داده‌های اندکی در مورد اثرات سرب و روی بر مواد ژنتیکی گیاهان در دسترس است.

معدن مورد بررسی در این مطالعه، معدن سرب و روی زه‌آباد از توابع استان قزوین می‌باشد. کانی‌زایی در کانسار سرب و روی زه‌آباد به طریقه گرمابی انجام گرفته که در سنگ‌های آذرین و آذرآواری سازند کرج تشکیل شده است. توده معدنی به صورت رگه‌های نامنظم با ضخامت متغیر مشاهده می‌شود. در محدوده معدن زه‌آباد چهار رگه، بروزند دارد. طول رگه‌ها در کانسار زه‌آباد متفاوت بوده و حداکثر به ۸۰۰ متر می‌رسد. ضخامت رگه‌ها در بخش استخراجی بین ۰/۳ تا ۴ متر بوده و این رگه‌ها تا عمق ۱۲۰ متری استخراج شده‌اند. از مهمترین کانه‌های این رگه‌ها می‌توان به گالن (PbS) اسفالریت (ZnS)، طلا، نقره، پیریت (FeS_2) و کالکوپیریت ($CuFeS_2$) اشاره کرد. فعالیت معدن کاری در این معدن در دو فاز استخراج ماده معدنی، فرآوری ماده معدنی و تهیه کنسانتره دیده می‌شود. به دلیل استخراج زیرزمینی ماده معدنی و واقع شدن آن در زیر سطح ایستابی، عملیات آبکشی از عمق سینه‌کار معدن انجام می‌شود. آب تخلیه شده، بمنظور فرآوری ماده معدنی در کارخانه تولید کنسانتره مورد استفاده قرار می‌گیرد. فعالیت کارخانه فرآوری و تولید کنسانتره سرب و روی منجر به تولید مواد باطله معدنی و پساب‌های معدنی می‌گردد. مواد باطله معدنی به همراه پساب تولید شده به محل سد باطله که در فاصله یک کیلومتری از معدن قرار دارد، منتقل

آلودگی در ۷ کیلومتری شمال شرقی معدن برداشت شدند. منطقه مورد مطالعه در شکل ۱ مشخص شده است.

روند کانی سازی سرب و روی در منطقه، نمونه‌های شاهد از همین گونه از محدوده‌ای در تراز ارتفاعی بالاتر از رگه های معدنی و سد باطله و عاری از



شکل ۱- موقعیت جغرافیایی منطقه مورد مطالعه

نمونه های آب برای تجزیه عنصری به روش-ICP OES به آزمایشگاه ارسال شد.

۲.۲. نمونه برداری آب و خاک

در این پژوهش به منظور بررسی اثرات آلودگی معدن زه آباد بر تقسیم میوز در گیاه یونجه زرد، نمونه برداری خاک و آب از محدوده رویش طبیعی این گیاه در سایت معدن بعمل آمد. نمونه برداری از خاک درمجاورت سد باطله نزدیک به معدن در محل رویش گیاه یونجه زرد صورت گرفت. حدود ۴-۵ کیلوگرم نمونه خاک تا عمق حدود ۶۰ سانتی متری برداشت شد و پس از آماده سازی نمونه‌ها به منظور انجام آنالیز توسط روش ICP-MS به آزمایشگاه ارسال گردید.

۳.۲. نمونه برداری گیاهی

گونه گیاهی یونجه زرد (*M. officinalis*) متعلق به تیره بقولات (Fabaceae) از منطقه آلوده درمجاورت سد مواد باطله جمع آوری شد. نمونه‌های شاهد از همین گونه در ۷ کیلومتری شمال شرقی معدن برداشت شد. نمونه‌ها با استفاده از منابع موجود (Rechinger, 1982) شناسایی شدند. به منظور مطالعه کروموزومی، حدود ۱۵ غنچه گل از حداقل پنج گیاه در مرحله مناسبی از نمو در خرداد ماه سال ۱۳۹۵ جمع آوری شده و در فیکساتور کارنوی (شامل اتانول، کلروفورم و اسید پیروپینیک به نسبت ۲:۳:۶) به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق فیکس شدند و بعد از این مدت و شستشو با آب مقطر تا زمان استفاده در الکل اتیلیک ۷۰ درصد و دمای ۴۰°C نگهداری شدند.

نمونه برداری از منابع آب از سهم حل حوضچه زهکشی (S-1)، آب خروجی از کارخانه فرآوری (S-2) و آب موجود در محل سد باطله (S-3) انجام پذیرفت. برای این منظور حدود ۵۰ میلی لیتر نمونه آب از هر محل در بطری پلاستیکی مخصوص جمع آوری شد و پس از برداشت به منظور جلوگیری از ته نشست عناصر ۲-۳ قطره اسید نیتریک به آن اضافه شد.

۴.۲. مطالعه سیتوژنتیکی

مطالعه کروموزومی روی جوانه‌های فیکس شده گیاه یونجه زرد (*M. officinalis*) صورت گرفت. به این منظور بساک‌های جدا شده در ۱-۲ قطره رنگ استوکارمن ۲ درصد و در طی تکنیک اسکواش کاملاً له شدند. تمام اسلایدها با استفاده از چسب تریپانتین ونیزی دائمی شدند. تترادهای نیز در جمعیت‌های آلوده و شاهد بررسی شدند. حدود ۳۰۰ سلول در مرحله تتراد در هر دو جمعیت مشاهده شدند. بر اساس این شمارش‌ها، شاخص میوزی (MI) با تقسیم تعداد تترادهای عادی بر تمام تترادهای مشاهده شده و ضرب عدد حاصل در ۱۰۰ بدست آمد (Love, 1949). در نهایت سلول‌های دارای تقسیم توسط میکروسکوپ Olympus BX-41 با بزرگنمایی‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفتند و عکسبرداری نیز توسط دوربین دیجیتال Olympus انجام شد.

۵.۲. آزمون توانایی حیات دانه‌های گرده

توانایی حیات دانه‌های گرده بر اساس قابلیت دانه گرده در رنگ‌پذیری مشخص می‌شود. به این منظور دانه‌های گرده در جمعیت‌های آلوده و شاهد گونه *M. officinalis*، به آرامی از بساک خارج شدند. رنگ آمیزی توسط مخلوط رنگ استوکارمن ۲٪ و گلیسرین به نسبت ۱:۱ انجام شد. بعد از رنگ آمیزی لامل را به آرامی روی لام قرار داده و بمدت ۲۴ تا ۴۸

ساعت در جای تاریک در دمای اتاق نگهداری شد. پس از اطمینان از رنگ پذیری مناسب، ۲۰۰ دانه گرده مورد بررسی قرار گرفتند. گرده‌هایی که به‌خوبی رنگ گرفته بودند، دارای توانایی حیات و آنهایی که چروکیده یا بی‌رنگ بودند، بدون توانایی حیات محسوب شدند. پس از شمارش گرده‌ها در هر جمعیت درصد توانایی حیات آنها محاسبه گردید. در نهایت دانه‌های گرده توسط میکروسکوپ نوری مورد بررسی و عکس برداری قرار گرفت.

۳. نتایج

۱.۳. بررسی مقادیر عناصر سرب و روی در

نمونه‌های آب و خاک معدن زه آباد

مقادیر سرب و روی حاصل از تجزیه نمونه‌های آب و خاک منطقه آلوده معدن زه آباد به همراه حد استاندارد این عناصر در آب و خاک در جدول ۱ و ۲ آورده شده است. بر اساس نتایج بدست آمده مقایسه آنها با استاندارد سازمان حفاظت محیط زیست ایران مشخص شد از بین عناصر مورد آزمایش، غلظت دو عنصر سرب و روی در منطقه نمونه برداری شده بسیار بیشتر از حد استاندارد می‌باشد. با توجه به بالا بودن غلظت سرب و روی، احتمال تاثیر این دو عنصر در رشد گیاهان منطقه بسیار زیاد است. سرب و روی از طریق آب و خاک آلوده جذب ریشه شده و وارد گیاه می‌شوند.

جدول ۱- میانگین نتایج تجزیه دو عنصر سرب و روی در نمونه خاک معدن زه آباد

عنصر	Pb	Zn
واحد	mg/kg	mg/kg
حد استاندارد	۵۰	۲۰۰
نمونه خاک	۴۷۳۰	۳۰۶۵

جدول ۲- میانگین نتایج تجزیه دو عنصر سرب و روی در نمونه آب معدن زه آباد

عنصر	Pb	Zn
واحد	mg/lit	mg/lit
حد استاندارد	۰/۱	۲
S-1	۸۲	۳۰
S-2	۷۸	۲۹
S-3	۵۹	۲۱

۲.۳. مطالعه سیتولوژیکی

تمام نمونه‌های مورد بررسی از دو جمعیت آلوده و شاهد گیاه *M. officinalis*، دیپلوئید بودند و عدد کروموزومی $2n=2x=16$ را نشان دادند (شکل ۲A). در مجموع ۱۱۳۵ سلول مادر دانه گرده در مرحله دیاکینز/متافاز I، ۷۵۰ سلول در مرحله آنافاز I/تروفاز I، ۴۲۰ سلول در مرحله متافاز II و ۱۶۳۳ سلول در مرحله آنافاز II/تروفاز II در هر دو جمعیت آلوده و شاهد گیاه *M. Officinalis* مورد بررسی قرار گرفتند (شکل ۲). ناهنجاری‌های میوزی مشاهده شده در جمعیت‌های مورد مطالعه شامل چسبندگی کروموزوم، B کروموزوم، سیتومیکسیس، پل کروموزومی ناشی از چسبندگی، حضور کروموزوم سرگردان، میکرونوکلئوس در سلول‌های تتراد و سه قطبی می‌باشد که در ادامه به آنها پرداخته می‌شود. داده‌های مربوط به مراحل میوزی و ناهنجاری‌های دیده شده به تفکیک در هر مرحله و در هر یک از جمعیت‌های مورد مطالعه در جدول ۳ آورده شده است. B کروموزوم یا کروموزوم اضافی که علاوه بر کروموزوم A و عادی در برخی گیاهان دیده می‌شود، کوچکتر از سایر کروموزوم‌ها بوده و با آنها جفت نمی‌شود. ۸/۴۵ درصد از سلول‌های مادر گرده جمعیت آلوده B کروموزوم را نشان دادند (شکل

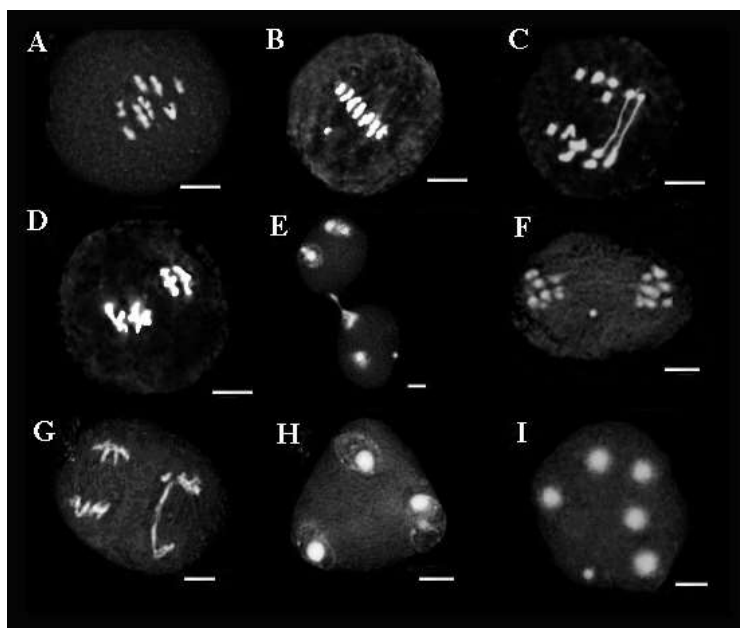
۲B). در حالیکه این ناهنجاری اصلاً در گیاه شاهد دیده نشد. B کروموزوم در مرحله متافاز I گیاه آلوده دیده شد. در جمعیت آلوده، پل کروموزومی حاصل از چسبندگی در ۱۶/۸۴ درصد از سلول‌های مرحله آنافاز I و ۵/۹۱ درصد سلول‌های مرحله آنافاز II دیده شد (شکل ۲C و ۲G) در حالیکه در گیاه شاهد تنها ۱/۲۹ درصد از سلول‌های مادر گرده این ناهنجاری را نشان دادند.

چسبندگی کروموزوم در هر دو جمعیت آلوده و شاهد دیده شد (شکل ۲D). این پدیده با درصد بسیار بیشتری در نمونه‌های آلوده وجود داشت. چسبندگی کروموزوم در گیاه آلوده در مرحله دیاکینز و اوایل متافاز I (۳۰/۷۸ درصد) و متافاز II (۱۰/۱۳ درصد) و در گیاه شاهد فقط در مرحله پروفاز و با درصد بسیار کمتری (۱۱/۸۱ درصد) دیده شد. پدیده سیتومیکسیس شامل مهاجرت کروموزوم‌ها بین میوسیت‌ها از طریق ارتباطات سیتوپلاسمی می‌باشد. این پدیده در ۷/۸۸ درصد از سلول‌ها در مراحل آنافاز I/تروفاز I و در ۱۲/۷۷ درصد از سلول‌های مرحله متافاز II جمعیت آلوده دیده شد (شکل ۲E). فقط ۲/۸۷ درصد از سلول‌های گیاه شاهد در مرحله تروفاز I سیتومیکسیس را نشان دادند. سلول‌های مادر گرده با کروموزوم سرگردان در ۱۲/۷۷ درصد از سلول‌ها در مرحله آنافاز I و ۱۰/۹ درصد از سلول‌ها در مرحله

آنافاز II در جمعیت آلوده دیده شدند (شکل ۲F)؛ در آنافاز I و آنافاز II این ناهنجاری را نشان دادند. در حالی که در جمعیت شاهد فقط ۳/۴ درصد و ۲/۱ درصد از سلول‌های مادر گرده به ترتیب در مراحل

جدول ۳- اطلاعات مربوط به داده‌ها و ناهنجاری‌های میوزی، عدد کروموزومی، شاخص میوزی و توانایی حیات دانه گرده در دو جمعیت آلوده و شاهد از گونه *M. officinalis*

نمونه شاهد	نمونه آلوده	ناهنجاری‌های میوزی/نمونه
۱۸۵۴	۱۹۸۴	تعداد کل سلول‌های مادر دانه گرده
۵۰۸	۶۲۷	دیاکینز/متافاز I
۲۷/۴	۳۱/۶	دیاکینز/متافاز I (%)
۱۱/۸۱	۳۰/۷۸	چسبندگی و جدا افتادگی کروموزوم (%)
-	۸/۴۵	B کروموزوم (%)
-	۱۵/۱۵	سیتومیکسیس (%)
۳۸۲	۳۶۸	آنافاز I/تلوفاز I
۲۰/۶	۱۸/۵۴	آنافاز I/تلوفاز I (%)
۲/۸۷	۷/۸۸	سیتومیکسیس (%)
-	۱۶/۸۴	پل (%)
۳/۴	۱۲/۷۷	کروموزوم سرگردان (%)
۱۹۳	۲۲۷	متافاز II
۱۰/۴	۱۱/۴۴	متافاز II (%)
-	۱۲/۷۷	سیتومیکسیس (%)
-	۱۰/۱۳	چسبندگی و جدا افتادگی کروموزوم (%)
۷۷۱	۸۶۲	آنافاز II/تلوفاز II
۴۱/۵۸	۴۳/۴۴	آنافاز II/تلوفاز II (%)
۲/۱	۱۰/۹	کروموزوم سرگردان (%)
۱/۲۹	۵/۹۱	پل (%)
-	۲۱/۱۱	میکرونوکلئوس (%)
-	۱۷/۷۴	سه قطبی (%)
۹۷	۷۴	شاخص میوزی (%)
۹۵	۶۵	توانایی حیات دانه گرده (%)
۸	۸	عدد پایه کروموزومی (n)



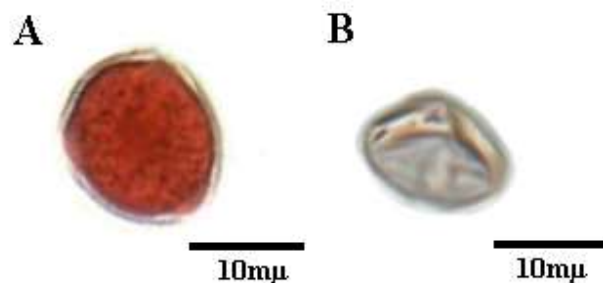
شکل ۲- ناهنجاری‌های کروموزومی در مراحل مختلف تقسیم میوزی در گیاه *M. officinalis* تحت آلودگی فلزات سنگین. A- دیاکینز. B-B- کروموزوم. C- پل در مرحله آنافاز I. D- چسبندگی کروموزومی در مرحله دیاکینز. E- سیتومیکسیس در مرحله تلوفاز I. F- لاگارد در مرحله تلوفاز I. G- پل در مرحله آنافاز II. H- سه قطبی. I- میکرونوکلئوس در مرحله تلوفاز II. (مقیاس: ۳ میکرومتر)

Rani and Kumar, Paupiere *et al.*, 2014 (2016). در این مطالعه اثر سرب و روی بر دانه‌های گرده گیاه *M. Officinalis* در دو جمعیت آلوده و شاهد مورد بررسی قرار گرفت. به همین منظور از روش رنگ آمیزی استفاده شد. نتایج حاصل از مطالعه توانایی‌های دانه‌های گرده در جدول ۳ آورده شده است. کمترین مقدار توانایی حیات در دانه‌های گرده جمعیت آلوده دیده شد درحالی‌که بیشترین مقدار توانایی‌های مربوط به دانه‌های گرده جمعیت شاهد بود. درصد توانایی حیات در دانه‌های گرده در جمعیت آلوده ۶۵ درصد و در جمعیت شاهد ۹۵ درصد گزارش شد. به نظر می‌رسد توانایی حیات دانه‌های گرده تحت تاثیر حضور فلزات سنگین در منطقه مربوطه می‌باشد. شکل ۳ دانه‌های گرده با توانایی حیات و بدون توانایی حیات را نشان می‌دهد.

۲۱/۱۱ درصد از سلول‌های مادر گرده در مرحله تلوفاز II از جمعیت آلوده گیاه *M. officinalis* ناهنجاری سه قطبی را نشان داد (شکل ۲H). این ناهنجاری در جمعیت شاهد دیده نشد. میکرونوکلئوس یکی دیگر از ناهنجاری‌های میوزی است که فقط در جمعیت آلوده و در مرحله تلوفاز II (۳۲/۶ درصد) دیده شد (شکل ۲I). به منظور محاسبه شاخص میوزی، حدود ۳۰۰ تتراد از هر جمعیت مطالعه شد. شاخص میوزی در جمعیت آلوده، ۷۴ درصد و در جمعیت شاهد ۹۷ درصد محاسبه شد (جدول ۳). فراوان‌ترین ناهنجاری‌ها در مرحله تتراد، سه قطبی و تترادهای غیر عادی با میکرونوکلئوس بود.

۳.۳. توانایی حیات دانه‌های گرده

آلاینده‌ها و استرس‌های مختلف محیطی نقش عمده‌ای در توانایی‌های و اندازه دانه‌های گرده در گونه‌های مختلف گیاهی ایفا می‌کنند (Gottardini *et al.*, 2004, 2013; Higashitani, 2013; Rezanejad,



شکل ۳- A: دانه گرده زایا و B: دانه گرده نازا در گیاه آلوده *M. officinalis*.

درصد سلول‌های مادر گرده با ناهنجاری‌های میوزی در گیاهان رشد یافته در مناطق آلوده بیشتر از نمونه‌های شاهد می‌باشد. این مطالعه روی گونه یونجه زرد (*M. officinalis*) نشان داد عناصر سنگین سرب و روی به عنوان عوامل جهش‌زای قوی عمل می‌کنند. درصد ناهنجاری‌ها از ۵/۴۴ درصد در گیاه شاهد به ۵۳/۴۷ درصد در گیاه آلوده افزایش یافت. میوز آنسبت به میوز II، درصد ناهنجاری‌های بیشتری نشان داد و اغلب ناهنجاری‌ها در مراحل متافاز I، آنافاز I و II و تلوفاز II دیده شدند.

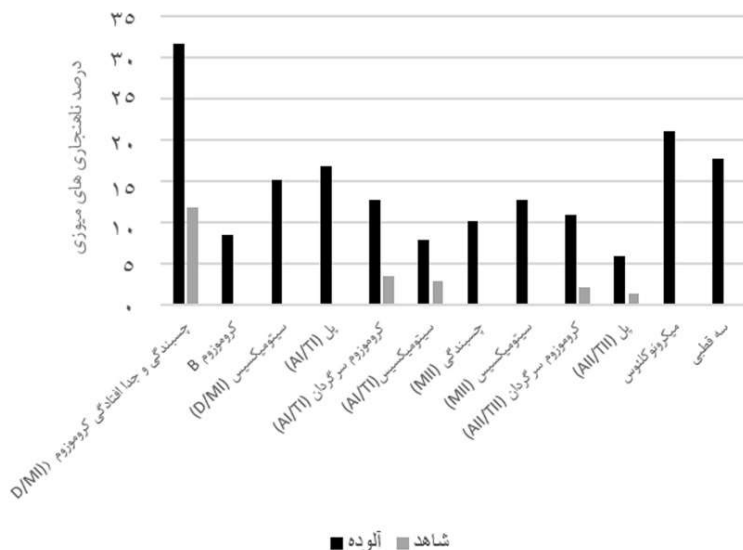
مقایسه ناهنجاری‌های میوزی در گیاهان آلوده و شاهد نشان می‌دهد درحالی‌که که بیشترین درصد ناهنجاری میوزی در گیاهان تحت تاثیر آلودگی، ۳۰/۷۸ درصد است، بیشترین مقدار ناهنجاری در گیاه شاهد فقط ۱۱/۸۱ درصد می‌باشد (جدول ۳ و شکل ۴). در بین این ناهنجاری‌ها چسبندگی کروموزوم معمول‌ترین ناهنجاری کروموزومی دیده شده است. به طور کلی فراوانی ناهنجاری‌های کروموزومی به این ترتیب می‌باشد:

چسبندگی کروموزوم < میکرونوکلئوس < سه قطبی < پل < سیتومیکسیس < کروموزوم سرگردان < B کروموزوم.

به علت حضور فلزات سنگین، اثرات منفی قابل توجهی در دانه‌های گرده گیاه مورد مطالعه دیده شد. دانه‌های گرده زایا تیره رنگ و صاف بوده درحالی‌که دانه‌های گرده نازا شفاف و چروکیده می‌باشند. توانایی‌های در گونه گیاهی مورد مطالعه مرتبط با حضور فلزات سنگین در منطقه‌ای که رویش دارد می‌باشد. این ویژگی نشانگر خوبی از فرآیند اسپورزایی می‌باشد. میوز طبیعی منجر به تولید دانه‌های گرده با سایز عادی و توانایی حیات بالا می‌شود ولی تقسیم میوز نامنظم منجر به کاهش توانایی حیات و تنوع در اندازه دانه گرده می‌گردد (دانه‌های خیلی بزرگ و خیلی کوچک). مطابق نظر Stace (۱۹۹۱) عواملی مانند مشکلات تولید مثلی، اتو پلی پلوئیدی، آلوپلی پلوئیدی قطعه‌ای، جهش‌ها، دورگ‌گیری و همچنین عوامل محیطی روی این تنوع اثر دارند.

۴. بحث و نتیجه گیری

نتایج بیانگر آن است که آلودگی ناشی از فعالیت معدن با رهاسازی دپوهای باطله در مکان‌های نامناسب سبب آلودگی آب‌های سطحی و خاک منطقه شده است. میزان فلزات سنگین سرب و روی در نمونه‌های آب و خاک در محل نمونه برداری بیش از حد مجاز می‌باشد. نتایج به طور واضح نشان داد که



شکل ۴- مقایسه درصد ناهنجاری های مختلف میوزی بین گیاه آلوده *M. officinalis* و نمونه شاهد.

میوسیت های مختلف در جمعیت آلوده دارای تنوع است. عوامل محیطی و همچنین ژنتیکی به عنوان دلایلی برای چسبندگی کروموزومها در گونه های مختلف گیاهی ذکر می شوند (Nirmala and Rao, 1996). جا به جایی کروماتین بین سلول های مادر دانه گرده از طریق کانال های ظریف سیتوپلاسمی ناهنجاری معمول در جمعیت آلوده می باشد. سیتومیکس منجر به ایجاد تنوع در تعداد کروموزومها در گامت ها می شود. بنابراین می تواند به عنوان مکانیسمی با نقش تکاملی در نظر گرفته شود (Ghaffari, 2006). کروموزوم هایی که میکرونوکلئوس را در طی میوز ایجاد می کنند به عنوان میکروسیت از میکرواسپور جدا می شوند. میکرونوکلئوسها خود را به دیواره میکرواسپور رسانده و ایجاد جوانه می کنند سپس به صورت میکرواسپور جدا می شوند (Baptists-Giacomoelli et al., 2000). جدا شدن میکروسیتها در جمعیت آلوده منجر به ایجاد دانه های گرده نازا و کوچک شده است. کروموزوم سرگردان یا لاگارد ممکن است به

چسبندگی کروموزوم که در جمعیت آلوده با فراوانی بالایی نسبت به نمونه های شاهد دیده شد ممکن است در اثر عوامل ژنتیکی و محیطی به وجود آمده باشد (Pagliarini, 2000). اگر کروموزوم سرگردان موفق به رسیدن به قطبها در زمان مناسب در تلوفاز نشود می تواند منجر به ایجاد دانه های گرده کوچک و یا احتمالاً گامت هایی با تعداد کروموزوم های غیر عادی مانند آنیوپلی پلوئیدی شود (Koduru and Utsunomiya et al., 2002; Rao, 1981; Ranjbar et al., 2012). ناهنجاری B کروموزوم فقط در جمعیت آلوده دیده شد. این کروموزوم های اضافی هنگامی که در تعداد زیاد دیده شوند روی رشد و قدرت گیاه اثر منفی دارند (Jones and Houben, 2003). پل های کروموزومی ممکن است به علت چسبندگی کروموزوم و در ادامه شکست در جدا شدن به صورت آزاد در آنافاز ایجاد شوند. همچنین می توان این پدیده را به انتقال نابرابر بخشی از کروموزوم نسبت داد (Gomurge, 2000). ضخامت پل ها و تعداد کروموزوم های درگیر در ایجاد آن در بین

(۶۵ درصد) با توجه به گزارش فراوانی بالای ناهنجاری‌های کروموزومی مانند سیتومیکیسیس، میکرونوکلئوس، لاگارد، چسبندگی کروموزومی و غیره قابل توجه است. در این جمعیت درصد بالایی از سلول‌ها جابه‌جایی کروماتین در مراحل مختلف میوزی و به تبع آن کاهش توانایی حیات دانه‌گرده دیده شد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که ناهنجاری‌های دیده شده فرآیند میوزی را به صورت قابل توجهی تحت تاثیر قرار می‌دهند و منجر به کاهش توانایی حیات دانه‌های گرده می‌شود. مطالعات قبل نیز بیانگر وجود ارتباط مستقیم بین سیتومیکیسیس و دیگر ناهنجاری‌های میوزی با توانایی حیات دانه‌گرده می‌باشند (Lattoo et al., 2006; Singhal and Kumar, 2008; Ranjbar et al., 2011).

این مطالعه نشان داد که فلزات سنگینی مانند سرب و روی، دارای اثرات قابل ملاحظه‌ای در افزایش ناهنجاری‌های کروموزومی در سلول‌های مادر گرده گیاه یونجه زرد (*M. Officinalis*) می‌باشند. بنابراین احتمالا می‌توان بیان کرد که فلزات سنگین باعث سمیت ژنتیکی در گیاهان می‌شوند. علاوه بر این، جمعیت آلوده ناهنجاری‌های کروموزومی بیشتر و افزایش نازایی گرده را نشان داد. داده‌های این مطالعه بیانگر وجود ارتباط مستقیم بین ناهنجاری‌های کروموزومی مشاهده شده در طی مراحل مختلف تقسیم میوز و توانایی باروری در دانه‌های گرده می‌باشند. این نتایج می‌تواند به علت اثرات سمی سرب و روی بر تقسیم میوزی سلول‌های مادر گرده در گونه *M. Officinalis* باشد.

علت اتصال ناقص به دوک تقسیم یا اتمام دیرهنگام کیاسما مرتبط باشد یا حتی ممکن است به علت فراوانی کم کیاسما یا جهش در ژن‌های سینپتیک ایجاد شود (Nicklas and Ward, 1990; Pagliarini, 1994). کروموزوم‌های سرگردان عموماً مانند کروموزوم‌های یونی والانت در مراحل پایانی پروفاز توسط اتمام زود هنگام کیاسما در اوایل متافاز ایجاد می‌شود. کروموزوم‌های سرگردان با ایجاد میکرونوکلئوس منجر به ایجاد دانه‌های گرده ریز و گامت‌هایی با تعداد کروموزوم نابرابر می‌شوند (Mansuelli et al., 1995). شکست در جابجایی کروموزوم به پل‌هادر طی آنافاز و هر گونه اختلال یا شکست در دوک ممکن است منجر به ایجاد سلول‌های سه قطبی شود. این قبیل تترادهای غیر عادی منجر به کاهش شاخص میوزی در جمعیت آلوده و افزایش دانه‌های گرده نازا شده است.

علاوه بر درصد بالای ناهنجاری در مراحل مختلف میوزی، دانه‌گرده جمعیت آلوده درصد بالاتری عدم توانایی حیات را نیز نشان دادند. این درحالی است که دانه‌های گرده در جمعیت شاهد از گونه *M. Officinalis*، دارای درصد توانایی حیات بالایی (۹۵ درصد) بودند. این نتایج منطبق بر داده‌های رفتار شناسی میوزی و درصد کم ناهنجاری میوزی در این جمعیت می‌باشد (جدول ۳). بنابراین در جمعیتی که ناهنجاری‌های کروموزومی کمی نشان دادند و جابه‌جایی کروماتین در بین سلول‌های مادر گرده آنها وجود نداشت یا دارای فراوانی کمی بود، دانه‌های گرده بیشتری با توانایی حیات ایجاد کردند. برعکس، درصد کم توانایی حیات دانه‌گرده در نمونه‌های آلوده

References:

- Abubacker, M.N., Sathya, C., 2017. Genotoxic Effect of Heavy Metals Cr, Cu, Pb and Zn using *Allium cepa* L. Biosciences, Biotechnology Research Asia 14(3), 1181–1186.
- Ackova, D.G., 2018. Heavy metals and their general toxicity on plants. Plant Science Today 5(1), 14–18.
- Assistance of the human environment. Office of water and soil: Standards for quality of soil resources and its guides. 2014, 166 p.
- Assistance of the human environment. Office of water and soil: Sewage outlet standard, 4 p.
- Baptists-Giacomoelli, F.R., Pagliarini, M.S., Almeida, J.L., 2000. Elimination of micronuclei from microspores in a Brazilian oat (*Avena sativa* L.) variety. Genetics and Molecular Biology 23 (3), 681–684.
- Bhuyan, S., Islam, S., 2017. A Critical Review of Heavy Metal Pollution and Its Effects in Bangladesh, Science Journal of Energy Engineering 5 (4), 95–108.
- Bifeng, H., Xiaolin J., Jie, H., Dongyun, X., Fang, X., Yan, L., 2017. Assessment of Heavy Metal Pollution and Health Risks in the Soil-Plant-Human System in the Yangtze River Delta, China. International Journal of Environmental Research and Public Health 12, 1–18.
- Biscupa A., Izmailow, R., 2004. Endosperm development in seed of *Echium vulgare* L. (Boraginaceae) from polluted sites. Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica 46, 29–44.
- Dalvand M., Hamidian A.H., Zare Chahooki M.A., Moteshare Zadeh B., Mirjalili S.A.A., Esmacil Zade E., 2014. Comparing heavy metal accumulation abilities in *Artemisia aucheri* and *Astragalus gummifer* in Darreh Zereshk region, Taft, Desert 19(2), 137–140.
- Dalvand M., Hamidian A.H., Zare Chahouki M.A., Mirjalili A.A., Motesharrezadeh B. Esmacilzadeh E., 2016. Determination of the concentration of heavy metals (Cu, Pb, Zn) in roots of *Artemisia* sp. in natural lands of Darreh Zereshk copper mine, Taft, Yazd, Journal of Natural Environment 69 (1), 35–46.
- Ghaffari, S.M., 2006. Occurrence of diploid and polyploidy microspores in *Sorghum bicolor* (Poaceae) is the result of cytotoxicity. African Journal of Biotechnology 5, 1450–1453.
- Gomurge, A.N., 2000. Cytological effect of the herbicide 2,4-D isooctylester 48% on root mitosis of *Allium cepa*. Cytologia 65, 383–388.
- Gottardini, E., Cristofolini, F., Paoletti, E., Lazzeri, P., Peponi, G., 2004. Pollen viability for air pollution biomonitoring. Journal of Atmospheric Chemistry 49, 149–159.
- Hamidian, A.H., Norouznia H., Mirzaei R., 2016. Phytoremediation efficiency of *Nelumbo nucifera* in removing heavy metals (Cu, Cr, Pb, As and Cd) from water of Anzali wetland, Journal of Natural Environment, 69(3), 669–679
- Higashitani, A., 2013. High temperature injury and auxin biosynthesis in microsporogenesis. Frontier of Plant Sciences 4, 1–4.
- Izmailow R., 2000. Reproduction of *Vicia cracca* L. in the polluted environment of the Legnica – Głogow copper basin (Poland). Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica 42(2), 125–133.
- Jones, N., Houben, A., 2003. B-chromosomes in plant: escapees from the A-chromosome genome? Trends in plant science 8(9), 417–423.
- Klosowska, K., Izmailow, R., Muszynska, E., 2009. Wpływ warunków skażonego siedliska poboczny szlaków komunikacyjnych na procesy embriologiczne u wybranych gatunków roślin (*Lotus corniculatus* L. i *Lepidium ruderales* L.). Journal of Elementology 14, 47–48.
- Koduru, P.R.K., Rao, M.K., 1981. Cytogenetics of synaptic mutants in higher plants. Theoretical and applied genetics 59(4), 197–214.
- Koscinska-Pajak, M., 2000. Microspores and pollen grain in triploid *Chondrilla juncea* L. from unpolluted and polluted areas. Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica 42(2), 135–140.

- Kumar, G., Bhardwaj, M., 2017. Comparative genotoxicity of heavy metals in root meristems of *Cuminum cyminum* L. *Chromosome Botany* 12(3), 56–62.
- Lattoo, S.K., Khan, S., Bamotra, S., Dhar, A.K., 2006. Cytomixis impairs meiosis and influences reproductive success in *Chlorophytum comosum* (Thunb) Jacq., an additional strategy and possible implications. *Journal of Bioscience* 31, 629–637.
- Love, R.M., 1949. Estudos citológicos preliminares de trigos rio-grandenses. Secretaria do Estado dos Negócios da Agricultura, Indústria e Comércio, Porto Alegre, 23p. (Circular 74).
- Mansuelli, R.W., Tanimoto, E.Y., Brown, C., Comai, L., 1995. Irregular meiosis in a somatic hybrid between *Solanum bulbocastanum* and *S. tuberosum* detected by species-specific PCR markers and cytological analysis. *Theoretical and applied genetics* 91(3), 401–408.
- Martinez-Sanchez M.J., Garcia-Lorenzo M.L., Perez- Sirvent C., Bech J., 2012. Trace element accumulation in plants from an aridic area affected by mining activities. *Geochemical Exploration*, 123, 8–12.
- Micieta K., Murin G., 1996. Microspore analysis for genotoxicity of a polluted environment. *Environmental and Experimental Botany* 36(1), 21–27.
- Nepi, M., Franchi, G.G., 2000. Cytochemistry of mature angiosperm pollen. *Plant Systematics and Evolution* 222, 45–62.
- Nicklas, R.B., Ward, S.C., 1994. Elements of error correction in mitosis: microtubule capture, release and tension. *Cell Biology* 126(5), 1241–1253.
- Nirmala, A., Rao, P.N., 1996. Genetics of chromosome numerical mosaism in higher plants. *The nucleus* 39, 151–175.
- Norouznia H. Hamidian A.H. 2014. Phytoremediation efficiency of pondweed (*Potamogeton crispus*) in removing heavy metals (Cu, Cr, Pb, As and Cd) from water of Anzali wetland, *International Journal of Aquatic Biology*, 2(1): 206–214.
- Ostrolucka M.G., 1989. Differentiation of male reproductive organs and oak fertility in urban environment. *Biologia (Bratislava)* 44(9), 793–799.
- Pagliarini, M.S., 1990. Meiotic behavior and pollen fertility in *Aptenia cordifolia* (Aizoaceae). *Caryologia* 43(2), 157–162.
- Pagliarini, M.S., 2000. Meiotic behavior of economically important plant species: the relationship between fertility and male sterility. *Genetic and Molecular Biology* 23, 997–1002.
- Paupiere, M.J., Van Heusden, A.W., Bovy, A.G., 2014. The metabolic basis of pollen thermo-tolerance: *Perspectives for Breeding. Metabolites* 4, 889–920.
- Rani, N., Kumar, K., 2016. Mutagenic Effects of EMS on Pollen Mother Cells of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Chromosome Botany* 11(3), 51–55.
- Ranjbar, M., Hajmoradi, F., Karamian, R., 2012. An overview on cytogenetics of the genus *Onobrychis* (Fabaceae) with special reference to *O. sect. Hymenobrychis* from Iran. *Caryologia*. 65 (3), 187–198.
- Ranjbar, M., Hajmoradi, Z., Karamian, R., 2011. Cytogenetic study and pollen viability of four populations of *Trigonella spruneriana* Boiss. (Fabaceae) in Iran. *Journal of Cell and Molecular Research* 3 (1), 19–24.
- Ravindran, P.N., 1978. Cytological Irregularities Induced by Water Polluted with Factory Effluents: A preliminary report. *Cytologia* 43, 565–568.
- Rechinger, K.H., 1982. *Stachys*. In: Rechinger, K.H. (Ed.), *Flora Iranica*, Graz: Akademische Druck- und Verlagsanstalt, 150, 354–396.
- Rezanejad, F., 2013. The response of anther and pollen development, pollen cellular material release and pollen proteins to air pollution in *Petunia* hybrid Juss. (Solanaceae). *Iranian Journal of Science and Technology, Transaction A: Science* 1, 63–68.

- Samardakiewicz, S., Wozny, A., 2005. Cell division in *Lemna minor* roots treated with lead, Aquatic Botany 83, 289–295.
- Seregin, I.V., Ivanov, V.B., 2001. Physiological Aspects of Cadmium and Lead Toxic Effects on Higher Plants, Russian Journal of Plant Physiology 48 (4), 523–544.
- Singhal, V.K., Kumar, P., 2008. Impact of cytotoxicity on meiosis, pollen viability and pollen size in wild populations of Himalayan poppy (*Meconopsis aculeata* Royle). Journal of Biosciences, 33: 371–380.
- Slomka, A., Walec, P., Kellner, K., Jedrzejczyk-Korzycki, M., Rostanski, A., Kuta, E., 2010. Was reduced pollen viability in *Viola Tricolor* L. the result of heavy metal pollution or rather the tests applied? Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica 52(1), 123–127.
- Sotohian; F., Hojjati; L., Sharifi S., 2014. Environmental Effects of Zehabad-e-Qazvin Lead and Zinc Mine. J. Hum. Env. 28, 17–29.
- Stace, C.A., 1991. Plant Taxonomy and Biosystematics. Cambridge University Press, Cambridge.
- Tripathi, R., Girjesh, K., 2010. Genetic loss through heavy metal induced chromosomal stickiness in Grass pea. Caryologia 63 (3), 223–228.
- Utsunomiya, K.S., Bione, N.C.P., Pagliarini, M.S., 2002. How many different kinds of meiotic abnormalities could be found in a unique endogamous maize plant? Cytologia 67(2), 169–176.
- Vizintin, L., Bohanec, B., 2004. In vitro manipulation of Cucumber (*Cucumis sativus* L.) pollen and microspores: isolation procedures, viability tests, germination, maturation. Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica 46, 177–183.
- Wu, W., Wu, P., Yang, F., Sun, D.L., Zhang, D.X., Zhou, Y.K., 2018. Assessment of heavy metal pollution and human health risks in urban soils around an electronics manufacturing facility. Science of The Total Environment 630, 53–61.
- Yucel, E., Hatdpoglu, A., Sozeni, E. Guner, S.T., 2008 The effects of the lead (PbCl₂) on mitotic cell division of Anatolian Black Pine (*Pinus nigra* ssp. *pallasiana*) *Biological Diversity and Conservation* 1 (2), 124–129.
- Zohari, S., Khatooni, S. Zaidi, S., 2012. Cytological Studies on 14 plant species under polluted conditions. Pakistan Journal of Botany 44(6), 1977–1982.