Archive of SID

پژوهش و سازندگی

در زراعت و باغبانی

شماره ۷۱، تابستان ۱۳۸۵

بررسی انباشتگی سرب واثرآن برمحتوای کلروفیل، آهن وکلسیم دردو رقم کلزا (*Brassica napus* L.)

• **مه لقا قربانلی**، عضو هیأت علمی دانشکده زیست شناسی دانشگاه آزاد واحد گرگان
• **ملیحه خانلریان خطیری**، کارشناس ارشد رشته علوم گیاهی
• **رضا حاج حسینی**، عضو هیأت علمی دانشکده زیست شناسی دانشگاه پیام نور مرکز تهران
• **حسن زالی**، عضو هیأت علمی دانشکده منابع طبیعی دانشگاه مازندران

تاریخ دریافت: بهمن ماه ۱۳۸۳ تاریخ پذیرش: اسفند ماه ۱۳۸۴

E - mail: Ghorbanli@Yahoo.com

چکیده

به منظور بررسی اثر محلول‌های غذایی بدون سرب، با غلظت سرب کم، متوسط و زیاد (۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ میکرومول $Pb(NO_3)_2$) بر محتوای کلروفیل a،b ، کل کلروفیل و یون‌های کلسیم، آهن و سرب در ریشه و اندام هوایی کلزا (*Brassica napus* L.) در دو رقم ۴۰۱ Hyola و PF۷۰۴۵/۹۱ در شرایط آزمایشگاهی و کشت به روش هیدروپونیک با استفاده از محلول غذایی هوگلند انجام شد. روش هضم تر (هضم اسیدی با استفاده از مخلوط اسید نیتریک و اسید پرکلریک) جهت اندازه‌گیری یون‌های کلسیم، آهن و سرب به کار گرفته شد. میزان کلروفیل a و b و غلظت فلزات به ترتیب توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (U.V) مدل ۲۰۰۰ هیتاچی و دستگاه جذب اتمی مدل شیمادزو ۶۳۰۰ – Aa اندازه گیری شد. آنالیز آماری نمونه‌ها با تجزیه واریانس و آزمون F و توسط نرم‌افزار SPSs در سطح احتمال ۵٪ و چهار تکرار و رسم نمودارها با کمک نرم‌افزار Excel انجام شد. بنابر نتایج حاصل از این پژوهش افزایش غلظت سرب محلول غذایی در هر دو رقم کلزا موجب کاهش محتوای کلروفیل b، a و کل کلروفیل در برگ و یون‌های کلسیم، آهن در ریشه و اندام هوایی شد ($p<0/05$). درصد این کاهش نسبت به شاهد در مورد اندازه‌گیری محتوای آهن در اندام هوایی، کلروفیل‌های a و b و مجموع کلروفیل‌ها در رقم PF بیشتر از رقم Hyola است. با افزایش غلظت سرب محلول غذایی، تجمع یون سرب در ریشه و اندام هوایی هر دو رقم افزایش یافت($p<0/05$). درصد انباشتگی سرب در ریشه و اندام هوایی رقم Hyola بیشتر ازرقم PF است.

کلمات کلیدی: انباشتگی، سرب، کلروفیل، کلسیم، آهن، کلزا

Pajouhesh & Sazandegi No 71 pp: 34-40

The influence of accumulation of lead on the contents chlorophyll, iron and calcium in two varieties of rape seed (*Brassica napus* L.)

By: M. Ghorbanli, Member of Scientific Board of Plant Physiology, Department of Biology, Gorgan Azad University, Gorgan, Iran

M. Khanlarian Khatiri, Expert in Plant Sciences, R. Hajhossini, Member of Scientific Board of Biochemistry,

www.SID.ir

Archive of SID

Department of Biology, Payam Noor University, Tehran Iran, H. Zali, Member of Scientific Board of Botany, Department of Natural Resources, Mazandaran University, Mazandaran Iran

In this research, the effects of Hoagland, s nutrient with different concentrations of lead (0, 100, 200, 400, µM $Pb(NO_3)_2$ on contents; chlorophylls a, b, total chlorophyll in leaves, ions calcium, iron and Pb^{2+}accumulation in root and shoot of two varieties of rape seed (*Brassica napus* L.) PF7045.91 and Hyola 401; in hydroponic culture conditions were studied. Samples were digested (wet digstion) using mixture of nitric and perchloric acid was used to contents, ions calcium, iron and lead Concentration of chlorophylls a and b and metals were determined using Spectrophotometer(U.V) model Hitachy U – 2000 and atomic absorption instrument model shimadzo AA – 6300, respectively. In order to interpretation of data, different statistical methods were used. Results showed that, lead caused decrease the contents; chlorophylls a, b and total chlorophyll in leaves and ions Ca^{2+}, Fe^{2+} in root and shoot of two varieties of rape seed in comparison with control ($p< 0.05$). By increasing lead concentration of nutrient solution, Pb^{2+}accumulation in root and shoot of each two varieties in comparison with control was increased ($p< 0.05$).

Key words : Accumulation, Lead, Chlorophylls, Calcium, Iron, *Brassica napust*

مقدمه

سرب از عناصر غیرضروری جهت رشد گیاهان است و مقدار سربی که در گیاهان یافت می‌شود، بیانگر میزان تحمل آن گیاه در رابطه با جذب سرب میباشد. همچنین سرب موجود در گیاه نشانگر سرب قابل دسترسی برای فعالیت‌های بیولوژیکی است. بیشتر سربی که توسط برگ‌ها جذب شده در همانجا بدون حرکت باقی میماند. هنگامی‌که ریشه‌ها مورد مطالعه قرار گرفتند مشخص شد سرب اندکی از این طریق وارد میوه‌ها می‌گردد. میزان سرب در میوه‌جات و دانه گیاهان به مراتب کمتر از سایر قسمت‌های رویشی است. گیاهانی که ریشه‌های آنها در معرض آلودگی سرب قرار دارند، میزان سرب در ریشه‌های میانی به‌طور چشمگیری زیادتر از سایر بافت‌ها است (۷). انباشتگی بیش از حد سرب در بافت گیاهان می‌تواند برای بیشتر آنان سمی‌باشد. میزان بالای سرب در دانه علف‌هایی با ریشه افشان در جلوگیری از بیوسنتز کلروفیل مؤثر است (۱۰). گیاهان معمولاً توانایی انباشتگی مقادیر بالایی از سرب را دارند. گیاهان بواسطه توانایی انباشتگی سرب و فلزات سنگین دیگر در بافت‌هایشان، در فن آلایش زدایی[۱] استفاده می‌شوند (۱۱). امروزه دانشمندان تلاش میکنند تا گیاهان بیش انباشت کننده‌ای[۲] برای آلایش زدایی انتخاب شوند که شرایط زیرا دارا باشند:

- مقدار زیاد تجمع فلز در غلظت‌های کم محیط کشت
- سطح تجمع کل فلزات گیاه بالا باشد
- گیاه قدرت جمعکردن چند فلز با هم را داشته باشد
- سرعت رشد و تولید بیوماس زیاد در گیاه
- مقاومت در برابر بیماریها و آفت‌کشها (۳).

با توجه به موارد بالا از گیاهان مطالعه شده تاکنون در این زمینه تیره خردل (براسیکا) و از آن خانواده نیز سرده‌های زیر بهترین انباشت کننده‌ها هستند Brassica, Alyssum, Thlaspi. واز خانواده‌های دیگر می‌توان جنس Astragalus (بیش انباشت کننده سلنیوم)، گونهٔ *Carotalaria cobalbicda* (بیش انباشت کننده کبالت) و جلبک *Chlorella vulgaris* به عنوان بیش انباشت کننده طلا را نام برد (۱۴). دراین پژوهش میزان انباشتگی یون سرب، اندازه گیری محتوای کلروفیل a، b و مجموع، یون‌های کلسیم، آهن در دو رقم کلزا (PF۷۰۴۵,۹۱ و Hyola ۴۰۱) مورد بررسی قرار گرفته است.

www.SID.ir

Archive of SID

مواد و روش‌ها

بذرهای دو رقم کلزا 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 اسیدکلریدریک ۳ درصد به مدت حداقل ۲۴ ساعت شسته سپس به کرات 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 سانتیگراد جوانه زدند پس از خارج شدن لپه‌ها و پدیدارشدن اولین برگ‌ها که حدود ۷ روز بطول انجامید دانه رستها در طی این مدت با مقدار مناسب آب مقطر و محلول غذایی هوگلند (۸) تغذیه می شدند. دانه رست‌های یکنواختی انتخاب و به ظروف پلاستیکی محتوای ۴۰۰ میلی‌لیتر 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 دورهٔ روشنایی و تاریکی در شبانه‌روز به ترتیب ۱۴ و ۱۰ ساعت قرار گرفتند. هوادهی محلول غذایی، ۵ بار در هر روز و هر دفعه به مدت نیم ساعت انجام می شد. پس از گذشت شش روز محلول غذایی تجدید شد، البته این بار محلول غذایی هوگلند با غلظت‌های مختلف سرب (۰ ، ۱۰۰، ۲۰۰ ، ۴۰۰ میکرومول بر لیتر به صورت نیترات سرب) تهیه شد و طبق برچسب هر ظرف، محلول‌های 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 اندازه گیری غلظت یون‌های کلسیم، آهن و سرب در ریشه و اندام هوایی و میزان کلروفیل a، b و کل کلروفیل در برگ دو رقم کلزا در قالب طرح آماری کاملاً تصادفی با چهار تکرار به روش آزمایشگاهی زیر اتخاذ گردیده است:

الف) عصاره گیری کلروفیل با استن ۸۰٪

به نمونه برگ‌های توزین شده (۵ – ۳ گرم) تدریجاً ۱۰ میلی‌لیتر استن ۸۰ درصد می‌افزاییم (درهاون) و کاملاً می‌سائیم، سپس نمونه‌ها را صاف می‌کنیم آنگاه ۵ میلی لیتر دیگر از استن را در لوله آزمایش ریخته و یک میلی لیتر از عصاره کلروفیل صاف شده را به آن اضافه می‌کنیم و آنگاه آن را خوب به هم زده و سپس میزان جذب را با دستگاه اسپکتروفتومتر (U.V) در طول موج‌های ۶۴۵، ۶۵۲، ۶۶۳ نانومتر قرائت می‌کنیم و با استفاده از فرمول -۱، میزان غلظت کلروفیل برگ محاسبه می‌شود (۴).

فرمول - ۱

$$\text{مقدار کلروفیل} = \frac{C \times a \times V}{FW} Mg.g^{-1} Fw$$

C = غلظت کلروفیل

a = ضریب رقت

V = حجم عصاره

Fw = وزن تر

ب) هضم نمونه‌ها

در این مرحله نمونه‌ها ی خشک (۳ – ۱ گرم) را با استفاده از روش هضم تر (هضم اسیدی، مخلوط اسید نیتریک و اسید پرکلریک) به نسبت(۹:۱)، به منظور تجزیه شیمیایی نمونه‌ها بکار گرفته و سپس غلظت فلزات (Fe, Ca و Pb) نمونه‌های هضم شدهٔ ریشه و اندام هوایی توسط دستگاه جذب اتمی قرائت می‌گردد (۵). تجزیه واریانس و آزمون F نتایج حاصله توسط نرم‌افزار SPSS در سطح احتمال ۵٪ و چهار تکرار و رسم نمودارها با کمک نرم‌افزار Excel انجام شد.

نتایج و بحث

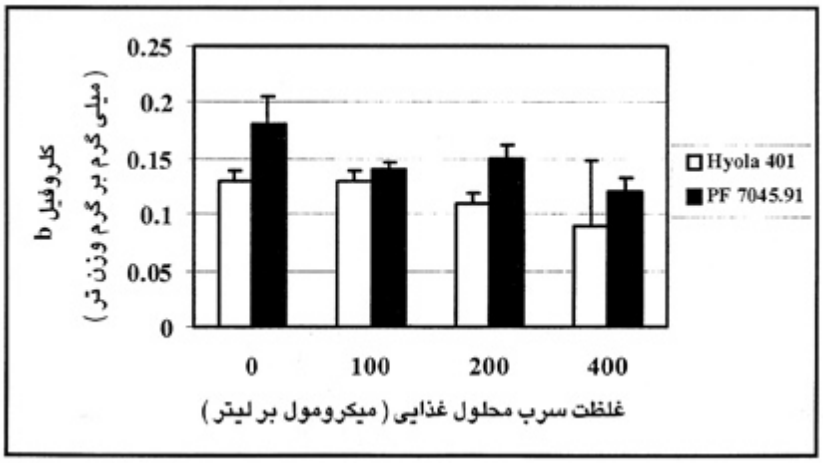
جهت تعیین تأثیر سرب بر مقدار کلروفیل a ، b و کل کلروفیل برگ و یون‌های کلسیم و آهن و انباشتگی یون سرب در ریشه و اندام هوایی کلزا، آزمایشی بر روی دو رقم (۴۰۱ Hyola و PF۷۰۴۵/۹۱) انجام شد که نتایج آن به شرح زیر بوده است:

نتایج حاصل از این تحقیق نشان می دهد که از لحاظ مقدار کلروفیل a, b و کل کلروفیل در برگ هر دو رقم با افزایش غلظت سرب محلول غذایی نسبت به شاهد کاهش معنی داری در سطح ۵٪>p وجود دارد (نمودار شماره ۱، ۲ و ۳). با مقایسه میانگین‌ها مشخص گردید که درصد کاهش مقدارکلروفیل a, b و کل کلروفیل در برگ رقم PF بیشتر از رقم Hyola می‌باشد. سرب پیوند قوی با N - پروتئین و لیگاندهای- S برقرار می‌کند و مانع سنتز کلروفیل می‌شود (۱۵) و همینطور غلظت ۵۰میکرومول بر لیتر سرب مقدار کلروفیل‌ها را در برگ خیار کاهش می‌دهد (۱۳). از طرف دیگر محققانی ضمن مطالعه اثر سرب بر دوگونه *Vetveria nemoralis* و *Vetveria zizanioides* نشان دادند که مقدار کل کلروفیل هر دو گونه کاهش پیدا کرده است و مقدار کل کلروفیل گونه *V. zizanioides* در غلظت‌های $g.l^{-1}$ ۱۱ و ۹ کاهش یافته است ولی در مورد گونه *V. nemoralis* در غلظت‌های $g.l^{-1}$ ۱۱، ۹ و ۷ مقدار کل کلروفیل کاهش یافته است. بر این اساس آنها بیان کردند *V. zizanioides* نسبت به سرب مقاومتر از گونهٔ *V. nemoralis* می‌باشد (۲). براساس این بررسی‌ها می‌توان نتیجه گرفت که رقم Hyola نسبت به سرب بردبارتر از رقم PF می‌باشد.

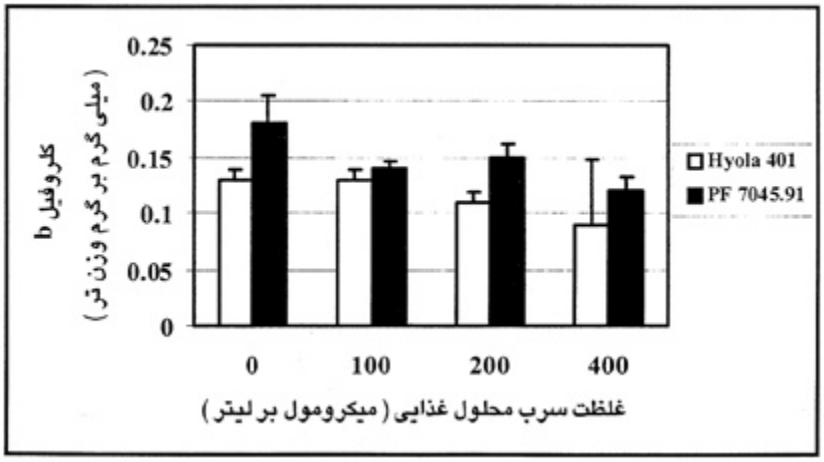
کاهش مقدار یون کلسیم و آهن در ریشه و اندام هوایی هر دو رقم کلزا نسبت به شاهد با افزایش غلظت سرب محلول غذایی در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار بود (نمودار شماره ۴، ۵، ۶ و ۷). به طور کلی درصد کاهش مقدار یون کلسیم در ریشه و اندام هوایی رقم Hyola بیشتر از رقم PF می‌باشد همچنین درصد کاهش مقدار یون آهن در ریشه رقم Hyola بیشتر از رقم PF بود و در اندام هوایی رقم PF بیشتر از رقم Hyola می‌باشد. از طرف دیگر نتایج حاصل از این پژوهش نشان می‌دهد که انباشتگی یون سرب در ریشه و اندام هوایی هر دو رقم نسبت به شاهد با افزایش غلظت سرب محلول غذایی در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار بود (نمودار شماره ۸ و ۹) و مقدار یون سرب در اندام هوایی هر دو رقم کمتر از ریشه می‌باشد. به طور کلی درصد افزایش مقدار یون سرب در ریشه و اندام هوایی رقم Hyola بیشتر از رقم PF بود. براساس تحقیقات پژوهشگران مبنی براینکه فلزات سنگین از جمله سرب موجب کمبود عناصر ضروری (کلسیم و آهن) در گیاهان می‌گردند (۱۶) همینطور افزایش غلظت سرب محلول غذایی موجب کاهش یون آهن و نشانه‌های کمبود آهن نظیر کاهش مقدار کلروفیل و فتوسنتز در چغندر می‌شود (۶) و با توجه به اینکه در این پژوهش درصد کاهش مقدار کلروفیل در برگ رقم PF بیشتر از رقم Hyola می‌باشد لذا داده‌های حاصل از این تحقیق، کاهش بیشتر مقدار کلروفیل در برگ رقم PF نسبت به رقم Hyola را با کاهش بیشتر مقدار یون آهن در برگ رقم

www.SID.ir

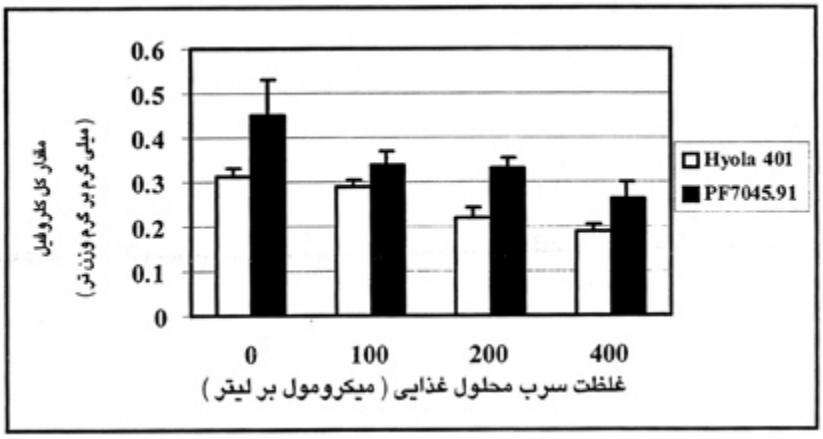
Archive of SID



نمودار شماره ۱- مقدار کلروفیل a دو رقم کلزا (Hyola۴۰۱,PF ۷۰۴۵/۹۱) پس از ده روز رشد در



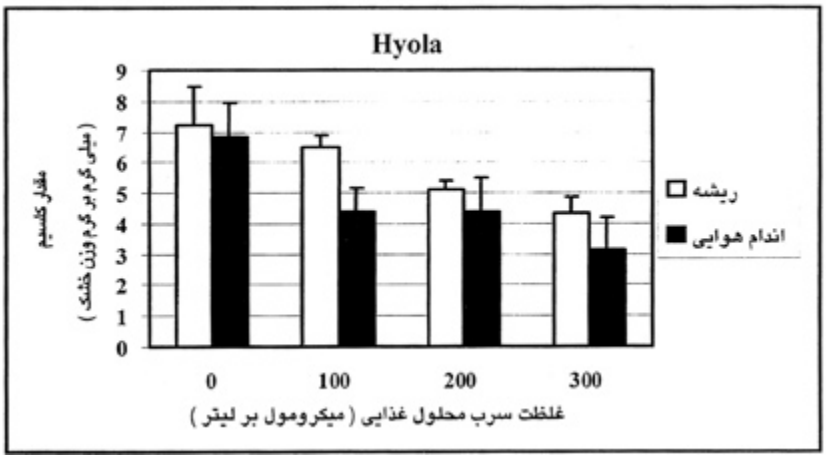
نمودار شماره ۲- مقدار کلروفیل b دو رقم کلزا (Hyola۴۰۱,PF ۷۰۴۵/۹۱) پس از ده روز رشد در
محلول غذایی هوگلند با غلظت‌های متفاوت سرب. ستون‌هاوشاخص‌ها نشانگر میانگین وخطای معیار هستند



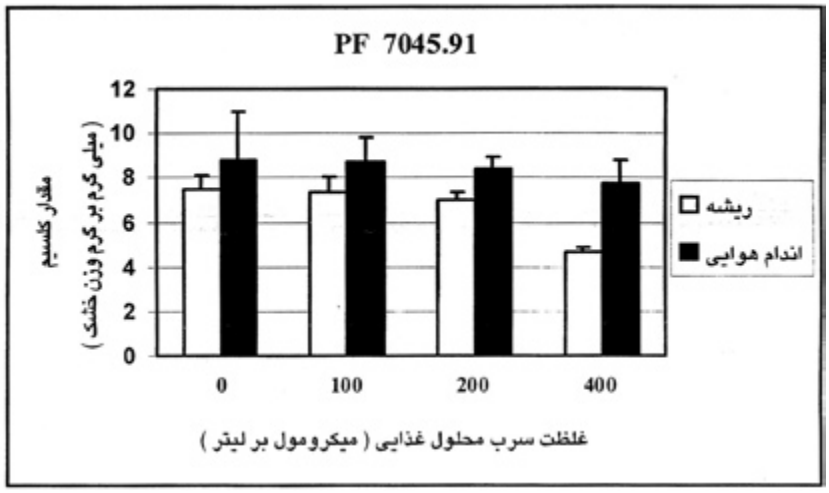
نمودار شماره ۳- مقدارکل کلروفیل دو رقم کلزا (Hyola۴۰۱,PF ۷۰۴۵/۹۱) پس از ده روز رشد در
محلول غذایی هوگلند با غلظت‌های متفاوت سرب. ستون‌ها و شاخص‌ها نشانگر میانگین وخطای معیار هستند

www.SID.ir

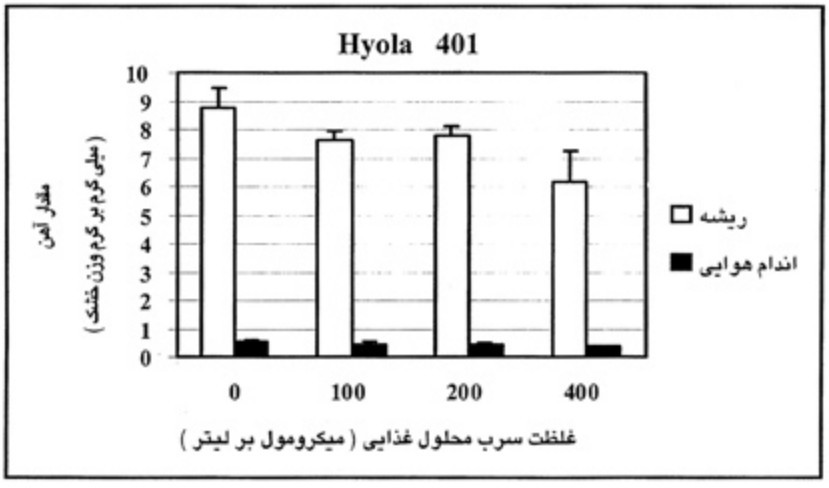
Archive of SID



نمودار شماره ۴- مقدار کلسیم در ریشه واندام هوایی کلزا رقم (Hyola ۴۰۱) پس ازده روز رشد در محلول غذایی هوگلند با غلظت‌های سرب متفاوت. ستون‌ها و شاخص‌ها نشانگر میانگین و خطای معیار هستند



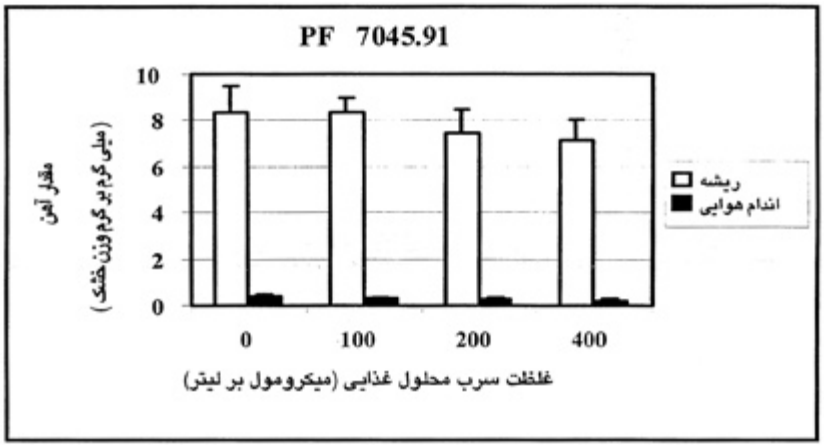
نمودار شماره ۵- مقدار کلسیم در ریشه واندام هوایی کلزا رقم (PF ۷۰۴۵/۹۱) پس ازده روز رشد در محلول غذایی هوگلند با غلظت‌های سرب متفاوت. ستون‌ها و شاخص‌ها نشانگر میانگین و خطای معیار هستند



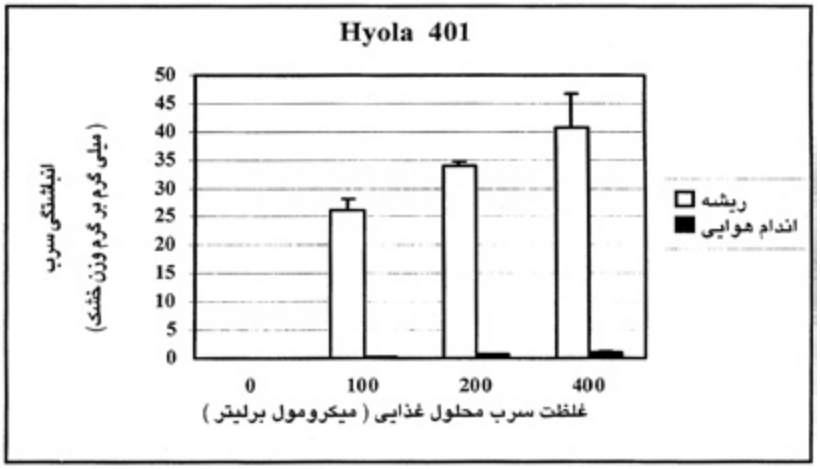
نمودار شماره ۶- مقد ار آهن در ریشه و اندام هوا یی کلزا رقم (Hyola ۴۰۱) پس از ده روز رشد در محلول غذایی هوگلند با غلظت‌های متفاوت سرب. ستون‌ها و شاخص‌ها نشانگر میانگین وخطای معیارهستند

www.SID.ir

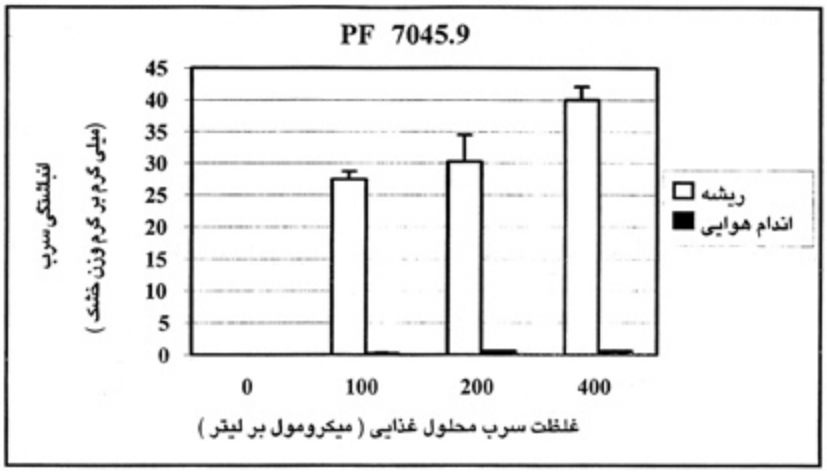
Archive of SID



نمودار شماره ۷- مقدارآهن در ریشه و اندام هوا یی کلزا رقم (PF ۷۰۴۵/۹۱) پس از ده روز رشد در محلول غذایی هوگلند با غلظت‌های متفاوت سرب. ستون‌ها و شاخص‌ها نشانگر میانگین و خطای معیار هستند



نمودار شماره ۸- مقدار انباشتگی سرب در ریشه واندام هوایی کلزا رقم (Hyola۴۰۱) پس از ده روز رشد در محلول غذایی هوگلند با غلظت‌های سرب متفاوت. ستون‌ها و شاخص‌ها نشانگر میانگین و خطای معیار هستند



نمودار شماره ۹- مقدار انباشتگی سرب در ریشه و اندام هوایی کلزا رقم (PF ۷۰۴۵/۹۱) پس از ده روز رشد در محلول غذایی هوگلند با غلظت‌های سرب متفاوت. ستون‌ها و شاخص‌ها نشانگر میانگین و خطای معیار هستند

PF نسبت به رقم Hyola توجیه می‌کند. با ملاحظه درصد تغییر مقدار یون‌های سرب و کلسیم در دو رقم کلزای این پژوهش، که درصد کاهش یون کلسیم در ریشه و اندام هوایی رقم Hyola بیشتر از رقم PF و در مورد یون سرب عکس این حالت می‌باشد، براساس این بررسی‌ها به نظر می‌رسد که کمبود کلسیم می‌تواند به غشاء آسیب برساند و انباشتگی غیرفعال سرب را در بافت‌های گیاهی تسریع بخشد. گونه *Brassica juncea* به طور عمده قادر به انباشتن سرب در ریشه‌ها بود و غلظت‌های خیلی پایین تر سرب را در اندام هوایی متمرکز می‌کرد (۹). تفاوت‌های غلظت سرب در ریشه و اندام هوایی این حقیقت را بیان می‌کرد که ریشه به طور انتخابی یون‌ها را از خاک تحویل گرفته در حالیکه بافت‌های اندام هوایی این نقش را نداشته اند (۱۲). صفت کلیدی و مهم برای انباشتن فلز سنگین در گیاهان بردباری یا تحمل بیشتر گیاهان نسبت به فلزات سنگین است (۱). به طور کلی درصد تجمع بیشتر یون سرب در ریشه و اندام هوایی رقم Hyola و درصد کاهش کمتر کلروفیل‌ها در برگ این رقم نسبت به رقم PF مشخص می‌کند که رقم Hyola نسبت به سرب بردبارتر از رقم PF است و چنین به نظر می‌رسد که رقم Hyola نسبت به PF انباشت کنندهٔ بهتری برای سرب باشد. با توجه به یافته‌های حاضر، کلزا (بویژه رقم Hyola) توانایی بالقوه‌ایی برای آلایش‌زدایی سرب خاک دارد و استفاده از این گونه در آلایش زدایی خاک‌های حاشیه جاده‌های آلوده به سرب پیشنهاد می‌شود.

پاورقی‌ها

1- Phytoremediation

2- Hyperaccumulator

منابع مورد استفاده

1-Chaney, R.L, M. Malik, Y.M. Li, S.L. Brown, J.S. Angle and A.J.M.Baker.1997; Phytoremediation of soil metals. Current opinion in Biotechnol., 8:279-284.

2-Chantachon, S., Kruatrachue, M., Pokethitiyook, P., Tantanasarit, S., Upatha Upatham, S., and Soonthornsarathool,V. 2002; Phytoextraction of lead from contaminated soil by Vetivergrass (*Vetiveria* Sp.) . Symposium no. 42., 17th WCSS, 14-12 August. Thailand., 2308:1110.

3-Fredrec Baud-Grasset, 1999 Technical and economic evaluation of phytoremediation. available at:http//1bewww.epf1.ch/COST 837/

www.SID.ir

Archive of SID

WG2- abstracts. html # Boud.

4- Jensen, A., 1978; Chlorophylls and carotenoides, In Handbook of phycological methods, phycological and biochemical methods, Cambridge Univ. Press.

5- Jone Vanloon, 1985; Selected methods of trace metal analysis biological and environmental samples, 83- 167.

6- Larbi, A., Morales, F., Abadía, A., Gogorcena, Y., Lucena, J. and Abadía, J. 2002; Effects of Cd and Pb in sugar beet plant grown in nutrient solution: induced Fe deficiency and growth inhibition., Func. Plant Biol., 29:1453-1464.

7-Lepp.N.W.,1981.Effect of Heavy metal Pollution plants .Great Britain Press.1,2:257-262.

8-Liu, D., Jiang, W., Liu, C., and Xin, C., 2000; Uptake and accumulation of lead by roots, hypocotyls and shoots of Indian mustard [*Brassica juncea* (L.)]. Bioresource Technology., 71:273-27.

9-Liu, P., Zheng, C., Lin, Y. Luo, F., Lu, X. and Yu, D., 2002; Dynamic State of Nutrient Contents of Vetiver Grass., Guangdong Academy of Agricultural Sciences., 293-296.

10-Olajire. A. A and Ayodede. E. T., 1997; Contamination of roadside soil and grass with heay metals. in Bull. Environment internatiol., 23:91-101.

11-Piechalak, A ., Tomaszewska, B., anuta Baralkiewicz, D., Malecka, A., 2002; Accumulation and detoxification of lead ions in legumes Phytochemistry., 60:153–162.

12- Salt, D. E., Pickering, I. J., Prince, R. C., Gleba, D., Dushenkov, S . Smith, R. D., and Raskin, I., 1997; Metal accumulation by aquacultured seedlings of indian mustard. Environ. Sci. Technol., 31: 1636-1644.

13-Sarvari, E., Gaspar, L., Fodor, F., Cseh,E., Kropfl, K., Varga, A., and Baron, M., 2002; Comparison of the effcts of Pb treatment on thylakoid development in popular and cucumber plants. Acta Biologica Szegediensis., 46(3-4):163-165.

14-Satake, M., and Mido, Y., 1997; Environmental toxicology,New delhi, Discovery Publishing house.

15-sengar, R. S., and Pandey, M. 1996; Inhibition of chlorophyll biosynthesis by lead in greening Pisum sativum leaf segments. Biol Plant., 38:459-462.

16-Van Assch, F., and Clijsters H., 1990; Effects of metals on enzyme activity in plants. Plant Cell Environ ., 13:195-206.

www.SID.ir