Archive of SID

مجله زارعت و اصلاح نباتات
جلد ۸، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۱
صفحات ۱۴-۱

ارزیابی توان چند گونه زراعی درکاهش آلودگی خاک به فلز سنگین کادمیوم

Evaluation Ability of Some Crop Species for Remedation of Heavy Metal Cadmium (Cd) In Contaminated Soils

افشین مظفری[۱]، داود حبیبی[۲]، عباس ملکی[۱]، فرزاد بابایی[۱]

چکیده

این تحقیق به منظور ارزیابی چند گونه زراعی درکاهش آلودگی فلز سنگین کادمیوم درخاکهای آلوده، در شرایط گلخانه‌ای در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج در سال ۸۹-۱۳۸۸ به اجرا در آمد. این آزمایش بصورت فاکتوریل در قالب طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی با ۳ تکرار اجرا شد. فاکتورهای آزمایش شامل میزان کادمیوم خاک در سه سطح (صفر، ۴۰ و ۸۰ میلی گرم در کیلو گرم) و گونه‌ها ی زراعی در سه سطح (یونجه یکساله (Medicago rigidula)، ماشک گل خوشه‌ای (Vicia villosa) و کلزا (Barassica napus)) بود. نتایج آزمایش نشان داد میزان کادمیوم خاک بر روی کلیه صفات مورد مطالعه اثر معنی داری داشته است. در حالیکه گونه‌های زراعی فقط روی میزان کادمیوم در اندام‌های هوایی، بیومارکر بیوشیمیایی مالون دی آلدهید و کلروفیل a تاثیر گذار بوده است. دربین گونه‌های زراعی مختلف، کلزا با ۳۴/۱۹ میلی گرم در کیلو گرم وزن خشک و ماشک با ۱۹/۲۳ میلی گرم در کیلو گرم وزن خشک به ترتیب بالاترین و کمترین میزان غلظت کادمیوم در اندام‌های هوایی را بخود اختصاص دادند. ماشک با ۴/۰۲ میلی گرم درگرم وزن تازه و یونجه با ۳/۷۶ میلی گرم درگرم وزن تازه به ترتیب بیشترین و کمترین میزان کلروفیل a را بخود اختصاص دادند. همچنین، کلزا با ۳۷/۱۳ میکرو مول درگرم وزن تازه و یونجه با ۳۳/۷۰ میکرو مول درگرم وزن تازه به ترتیب بیشترین و کمترین میزان بیومارکر بیوشیمیایی مالون دی آلدهید را بخود اختصاص دادند. نتایج آزمایش نشان داد دوز ۸۰ میلی کرم کادمیوم در کیلوگرم وزن خشک خاک، بیشترین میزان کادمیوم در اندام‌های هوایی و مالون دی آلدهید را به ترتیب با ۵۵/۵۱ میلی گرم در کیلوگرم وزن خشک و ۳۸/۷۲ میکرو مول در گرم وزن تازه بخود اختصاص داد و کمترین این صفات متعلق به تیمار شاهد بود. با افزایش میزان کادمیوم در خاک، میزان آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) و محتوی کلروفیل a, b و a+b کاهش یافت.

واژه‌های کلیدی: گیاه پالایی، فلز سنگین، کادمیوم، گونه‌های زراعی، محتوی کلروفیل، سوپر اکسید دیسموتاز و بیومارکر مالون دی آلدهید.

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ایلام، گروه زراعت و اصلاح نباتات، ایلام، ایران
۲- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، گروه زراعت، کرج، البرز، ایران

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

تنش‌های محیطی از قبیل (خاک، آب و فلزات سنگین) یکی از موانع اصلی در تولید محصولات زراعی و باغی در بسیاری از نقاط دنیا به ویژه مناطق خشک و نیمه خشک مانند ایران محسوب می‌شوند. نظر به صنعتی شدن جوامع در دهه‌های اخیر و تولید مقادیر قابل توجهی پسابهای صنعتی توسط کارخانجات و رها سازی آنها در اکوسیستم‌های طبیعی و روان آبها و از سوی دیگر افزایش استفاده از سوختهای فسیلی و احتمال بازگشت ترکیبات احتراق یافته به محیط، استفاده از آفت کشها در مزارع، خطر وقوع تنش غیر زنده تجمع فلزات سنگین در خاک را افزایش می‌دهد، از سوی دیگر مشکلات عدیده کم آبی در برخی از نقاط و از جمله آبهای با کیفیت پایین کشاورزان را بر آن داشته تا از تمامی منابع آبی استفاده نمایند، مشروط بر آنکه گیاهان کشت شده در برابر عناصر سنگین موجود در آب آبیاری متحمل باشند و همچنین بتوانند از تجمع این عناصر در خاک ممانعت بعمل آورند. عناصر سنگین عناصری هستندکه وزن اتمی آنها بین ۶۳/۵۴۶ تا ۲۰۰/۵۹۰ باشد و جرم مخصوص آنها بزرگتر از ۵ گرم بر سانتیمتر مکعب باشد (Pais و Benton Jones،1997). به این ترتیب عناصری از قبیل روی، کروم، کادمیوم، سرب، نیکل و نقره جزء فلزات سنگین محسوب می‌شوند. عناصرسنگین اغلب به فرم اکسید، هیدرواکسید، سیلیکات و سولفات و یا بصورت جذب شده بر روی رس، سیلیکات و ماده آلی یافت می‌شوند.

خاک‌های آلوده به فلزات سنگین می‌توانند به روشهای شیمیایی، فیزیکی و بیولوژیکی پالایش شوند (McEldowney و همکاران، ۱۹۹۳). یکی از روشهایی که در سالهای اخیر مورد توجه قرار گرفته است روش گیاه پالایی (Phytoremediation) است. گیاه پالایی یک تکنولوژی با هزینه کم و ساده که از گیاهانی نظیر گیاهان علوفه ای، گونه‌های چوبی و بوته‌ها به منظور خروج، نگهداری و بی اثرکردن آلاینده‌های زیست محیطی نظیر فلزات سنگین، عناصر کمیاب، ترکیبات آلی نفتی و مواد رادیواکتیو در خاک و آب استفاده می‌کند. این گیاهان قادرند فلزات سنگین را از خاک جذب، انتقال و تثبیت کرده و در اندام‌های خود تجزیه کنند (Kling، 1997). در این میان تحقیقات قبلی موید آنست که برخی از گونه‌های زراعی همچون جو، یونجه، خردل، تربچه، آفتابگردان، بادام زمینی، کرچک اصلاح کننده خاکهای آلوده می‌باشند بطوریکه که این گیاهان در برابر فلزات سنگین از تحمل بالایی برخوردار بوده و تحت شرایط تنش‌های غیر زنده فلزات سنگین می‌توانند بیوماس مناسبی تولید کنند و همچنین توانایی بالایی برای جذب فلزات سنگین از خاک را دارا می‌باشند. پاکسازی گیاهی در مقایسه با سایر روشهای اصلاح خاک از هزینه بسیار پایین‌تری برخوردار می‌باشد و خطرات آلوده شدن آبهای زیرزمینی برای این روش مطرح نمی‌باشد و همچنین روشی پایدار و منطبق با محیط زیست می‌باشد. لذا شناخت و گزینش گونه‌های زراعی با توانایی پاکسازی مستلزم بررسی پاسخ‌های این گیاهان در برابر تنش غیر زنده فلزات سنگین می‌باشد و مطالعه ترکیبی از صفات کل گیاهی و سلولی تحت این شرایط می‌تواند ما را در دستیابی به این مهم یاری نماید و همچنین زمینه را برای تحقیقات بعدی مهندسی ژنتیک به منظور اصلاح گیاهان متحمل در برابر فلزات سنگین مساعد نماید.

در ارتباط با گیاه پالایی آزمایش‌های زیادی در مقیاس گلخانه‌ای و مزرعه‌ای در کشور آمریکا و کشورهای اروپایی صورت گرفته است (Baker و همکاران، ۱۹۹۴). محل‌های آلوده شده به فلزات سنگین اغلب توسط گونه‌های گیاهی خاصی حمایت می‌شوند که برخی از این گیاهان مقادیر بالایی از این فلزات را در بافت‌های خود تجمع می‌دهند (Baker و Brooks, 1989, Hegde و Fletcher, 1996). در حال حاضر بطور تقریبی ۴۰۰ گونه گیاهی بیش انباشتگر (Hyperaccumulator) شناسایی شده است که بخش عمده‌ای از این گونه‌ها در نواحی آلوده شده اروپا، ایالات متحده آمریکا، نیوزلند و استرالیا یافت می‌شوند (Kramer, 1997). نمونه‌هایی از گیاهان بیش انباشتگر در

www.SID.ir

Archive of SID

گزارشات Chaudhry و همکاران (۱۹۹۸) و Bonaventura و Johnson (۱۹۹۷) فهرست شده است. گیاه پالایی یک داروی کلی برای درمان خاک‌های آلوده شده به فلزات سنگین نیست (Khan و همکاران، ۲۰۰۰). برای طراحی پروژه گیاه پالایی فاکتورهایی مانند مناسب بودن شرایط رشدی گیاه و امکان استفاده از گیاهان بومی اهمیت زیادی دارد.

مالون دی آلدهید (MDA) یک محصول سمی‌سلولی (Cytotoxic product) ناشی از پروکسیداسیون چربی‌ها (Lipid peroxidation) و نشان دهنده میزان تولید رادیکال‌های آزاد و بافت‌های تخریب شده است (Ohkawa و همکاران، ۱۹۷۹). میزان بیومارکر مالون دی آلدهید (MDA) در بافت گیاهی معیاری برای تعیین وضعیت پرو اکسیداسیون چربی‌ها است. پرو اکسیداسیون چربی‌ها در ارتباط با تولید سوپر اکسید (O_2^-) می‌باشد. وجود مقادیر بالای فلزات سنگین نظیر مس (Cu) و آهن (Fe) در گیاه باعث افزایش تولید سوپر اکسید O_2^- می‌شود. بنا براین، افزایش میزان بیومارکر مالون دی آلدهید (MDA) نشان دهنده آن است که یون‌های فلزی توانسته‌اند باعث تحریک ظرفیت تولید رادیکال‌های آزاد در گیاهان عالی بشوند (Luna و همکاران، ۱۹۹۴).

آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) یک آنزیم فلز دار (Metalloenzyme) است که آنیون‌های سوپر اکسید (O_2^-) موجود در اکسیژن و پرواکسید هیدروژن (H_2O_2) را کاتالیز می‌کند. آنزیم‌هایی نظیر آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) سیستم دفاعی برای بقای موجودات زنده هوازی را مهیا می‌سازد (Beyer و همکاران، ۱۹۹۱). شواهد زیادی وجود دارد که بیان می‌کند گیاهان در معرض غلظت‌های بالای فلزات سنگین نظیر آهن و مس باعث آسیب‌های اکسیداتیو در گیاه می‌شود (Yamamoto و همکاران، ۱۹۹۷). توانایی گیاهان در افزایش حفاظت آنتی اکسیدانتی در برابر تنش فلزات سنکین محدود می‌باشد تعداد، زیادی از مطالعات نشان داده که غلظت‌های بالای فلزات سنگین بیشتر باعث کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانتی می‌شود تا افزایش فعالیت آنها (Schutzendubel و Polle، 2002). واکنش‌های خود اکسیداسیون (Autoxidation) و فنتون (Fenton) ممکن است باعث تضعیف سیستم دفاع آنزیمی شود. بعنوان مثال فعالیت آنزیم کاتالاز بطور مستقیم توسط رادیکال سوپر اکسید O_2^- متوقف می‌شود (Kono و Fridovich, 1982). رادیکال‌های هیدروکسیل HO^- باعث توقف فعالیت آنزیم Cu-Zn-سوپراکسید دیسموتاز می‌شوند (Casano و همکاران، ۱۹۹۷). بر اساس خصوصیات فیزیکی و شیمیایی سه مکانیزم مولکولی مختلف برای سمیت فلزات سنگین را می‌توان بیان کرد: الف) تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) توسط واکنش‌های خود اکسیداسیون و فنتون ب) بلوکه کردن گروه‌های کارکرد ضروری بیومولکول‌ها ج) جایگزینی یون‌های فلزات ضروری در بیومولکول‌ها کادمیوم و دیگر فلزات سنگین باعث تخلیه GSH (گلوتاتیون سولفور دار) و جلوگیری از فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانتی بویژه گلوتاتیون ریدکتاز (GR) می‌شود (Schutzendubel و Polle, 2002). ۵۳ عنصر از ۹۰ عنصر طبیعی جزو فلزات سنگین محسوب می‌شوند، اما تمامی آنها اهمیت بیولوژیکی ندارند. بر اساس حلالیت این فلزات در محیط فیزیکی، ۱۷ عنصر سنگین ممکن است در دسترس سلول‌های زنده بوده و برای موجودات زنده و اکوسیستم‌ها اهمیت داشته باشند (Weast, 1984). از میان این فلزات آهن (Fe)، مولیبدن (Mo)، منگنز (Mn) بعنوان ریزمغذی مهم هستند. روی (Zn)، نیکل (Ni)، مس (Cu)، وانادیوم (V)، کبالت (W ،Co) و کروم (Cr) فلزات سمی هستند با اهمیت بالا و پایین بعنوان Trace elements. آرسنیت (As)، جیوه (Hg)، نقره (Sb ،Ag)، کادمیوم (Cd)، سرب (Pb) و اورانیوم (U) هیچ نوع نقشی از نظر غدایی نداشته و به نظر برای گیاهان و میکرو ارگانیسم‌ها از سمیت بالا یا پایینی برخوردار است. غلظت کادمیوم در خاک‌های غیر آلوده ۱/۵-۱ میلی گرم در کیلوگرم است، اما در خاک‌های آلوده انگلیس بیش از ۱۵۰ میلی گرم در کیلوگرم می‌باشد (Schutzendubel و Polle 2002).

www.SID.ir

Archive of SID

در این آزمایش اهداف زیر مورد بررسی قرار گرفت: بر رسی توانایی گونه‌های زراعی یونجه یکساله، کلزا و ماشک گل خوشه‌ای در پالایش خاکهای آلوده به فلز سنگین کادمیوم، بررسی تاثیر گونه‌های زراعی مختلف بر میزان جذب عنصر سنگین کادمیوم از خاک، شناسایی و کاشت گیاهان زراعی بیش انباشتگر در اراضی آلوده به فلز سنگین کادمیوم از بین گونه‌های زراعی مختلف، بررسی اثر متقابل خاک و گیاه در برداشت عناصر سنگین خاک، مقایسه غلظت فلزات سنگین در اندامهای هوایی گیاه زراعی یونجه یکساله، کلزا و ماشک گل خوشه ای، ارائه راهکار مناسب و با صرفه برای کاهش آلودگی خاک، بررسی تغییرات میزان آنزیم آنتی اکسیدانتی سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) و بیومارکر بیو شیمیایی مالون دی آلدهید (MDA) در گونه‌های زراعی مختلف و استفاده از آن جهت شناسایی گونه یا گونه‌های زراعی مقاوم به تنش فلز سنگین کادمیوم، بررسی تغییرات میزان کلروفیل a، b و a+b ارتباط آن با تنش فلزات سنگین.

مواد و روش‌ها

این آزمایش به منظور ارزیابی چند گونه زراعی درکاهش آلودگی فلز سنگین کادمیوم درخاکهای آلوده بصورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملا تصادفی با ۹ تیمار و ۳ تکرار و در شرایط گلخانه‌ای اجرا گردید. فاکتورهای آزمایشی شامل فلز سنگین کادمیوم بصورت خالص (از منبع کلرید کادمیوم) در سه سطح صفر، ۴۰ و ۸۰ میلی گرم در کیلو گرم وزن خشک خاک و سه گونه گیاه زراعی شامل یونجه یکساله (Medicago rigidula)، کلزا (Barassica napus) رقم Okapi و ماشک (Vicia villosa) بودند. آزمایش بصورت گلخانه‌ای در گلدانهای پلاستیکی با ارتفاع ۱۵ و قطر ۲۰ سانتی‌متر که حاوی ۵ کیلو خاک خشک لومی رسی در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی کرج انجام گردید. میزان غلظت اولیه فلز کادمیوم Cd خاک گلدان‌ها توسط آزمایشگاه تعیین گردید، پس از آن خاک‌های مورد مطالعه را از الک ۲ میلیمتری عبور داده و ۳ گونه گیاه زراعی در شرایط گلخانه‌ای در گلدانها کشت شدند و خاک گلدانها بطور مساوی و حداقل به مقدار ۵ کیلوگرم در نظر گرفته شد. بر اساس وضعیت حاصلخیزی خاک ازت، فسفر و پتاسیم مورد نیاز گیاهان زراعی قبل از کشت و در طول دوره رشد به آنها داده شد. در زمان کاشت ۵ بذر با قوه نامیه بالا با فواصل یکنواخت در هر گلدان کشت و گلدانها در همان روز آبیاری شدند. آبیاری‌های بعدی در زمان مورد نیاز با آبپاش انجام گردید. بسته به دوز فلز سنگین کادمیوم در خاک بعد از سبز شدن گیاهان در گلدان‌ها، آلوده‌سازی خاک گلدانها به فلز سنگین کادمیوم صورت گرفت. یک ماه پس از رویش گیاهان، اندامهای هوایی از سطح خاک کف بر شده و بمنظور بررسی میزان برداشت عنصر سنگین کادمیوم، میزان کلروفیل a و b، میزان آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) و بیومارکر بیوشیمیایی مالون دی آلدهید (MDA) به آزمایشگاه تحویل داده شد. از خاک هر یک از گلدانها نیز نمونه تهیه و میزان باقیمانده فلز سنگین کادمیوم در آنها بوسیله روشهای آزمایشگاهی متداول تعیین شد.

جهت اندازه‌گیری فلز سنگین کادمیوم در اندامهای هوایی، کل گیاه پس از برداشت از سطح خاک بصورت کامل توسط آب دیونیزه شده شستشو شده و در آون ۷۰ درجه سانتی‌گراد خشک شدند. جهت هضم پس از آسیاب نمودن نمونه‌ها، به یک گرم از آن ۵ میلی‌لیتر اسید دوتایی (پرکلریک اسید $HCLO_4$ و اسید نیتریک HNO_3) با نسبت‌های ۲:۳ در دمای ۱۱۰ درجه سانتیگراد به مدت ۸ ساعت اضافه شد. سپس با اضافه کردن آب مقطر حجم آن به ۵۰ میلی‌لیتر رسانده و این محلول از کاغذ صافی واتمن ۴۲ عبور داده شد و نهایتا میزان عنصر کادمیوم نمونه‌ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر جذب اتمی (Atomicabsorbtion spectrophotometer) مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. پس از برداشت گیاهان، از خاک نیز نمونه‌برداری بعمل آمده و میزان کادمیوم آنها تعیین گردید.

جهت اندازه گیری آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)،

www.SID.ir

Archive of SID

پس از نمونه گیری از گلدان‌ها دو برگ با آب مقطر شستشو داده شده و بلا فاصله در بافر فسفات – تریس ۰/۱۶ مولار با pH=۷/۵ خرد و هموژن گردید. آنگاه حجم مشابه از همان بافر دیجیتونین و آنزیم هضم کننده دیواره اضافه گردیده و اجاز داده شد تا فرآیند هضم غشا و دیواره سلول انجام گیرد. در پایان مقدار ۰/۵ میلی لیتر از محلول هموژن برای سنجش پروتئین توسط روش Lowry (۱۹۵۱) برداشته شد و مقدار پروتئین آب بر حسب میلی گرم بر میلی لیتر تعیین گردید. سپس در باقیمانده محلول استخراجی مقدار آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز اندازه گیری شد. بدین منظور از روش Misra (۱۹۷۹) استفاده خواهد شد. محلول زمینه بافر تریس /Tris) (base حاوی فسفات دی سدیک با pH =۷/۲ به همراه ۱/۳ میلی مول EDTA به همراه ۰/۱ مول کربنات منو سدیک تهیه و از اپی نفرین با غلظت ۰/۲۵ میلی مول بعنوان سوبسترا استفاده شد و سپس مجموعه عصاره به آنها اضافه و تغییرات جذب نوری حاصل از اکسیداسیون اپی نفرین اندازه گیری و بعنوان فعالیت آنزیمی ارزیابی شد. از آنزیم استاندارد و خالص برای استاندارد شدن نتایج استفاده شد که واحد آن قادر به اکسیداسیون ۰/۵ میلی مول اپی نفرین در یک دقیقه بود.

جهت اندازه گیری مالون دی آلدئید (MDA)، دو برگ از گیاه جدا و با آب مقطر شستشو داده شد و بلافاصله در بافر فسفات تریس ۰/۱۶ مولار با pH=۷/۵ وارد، خرد و هموژن گردید. آنگاه اجازه داده شد تا حجم مشابه از همان بافر حاوی دیجیتونین و آنزیم هضم کننده دیواره فرآیند هضم غشا و دیواره سلول را انجام دهد. در پایان مقدار ۰/۵ میلی لیتر از محلول هموژن برای سنجش پروتئین توسط روش Steven (۱۹۸۷) برداشته شد و مقدار پروتئین آن بر حسب میلی گرم بر میلی لیتر تعیین گردید. پس از آن در باقیمانده محلول استخراجی مقدار مالون دی آلدئید و دی تیروزین بر اساس روش Steven (۱۹۸۷) مورد ارزیابی قرار گرفت. دراین روش میزان فعالیت بر اساس واکنش به مایع کروماتوگرافی ارزیابی شد. بافر زمینه برای کار حاوی تریس اسید کلریدریک با pH=۷/۲ ۰/۲ میلی مول بر لیتر سدیم دی سدیک و ۰/۲ میلی مول بر لیتر آسکوربات می‌باشد. یک واحد فعالیت مالون دی آلدئید معادل مقدار آنزیمی که بتواند یک میکرومول از سوبسترا را در یک دقیقه کاتالیز کند، در نظر گرفته شد.

جهت اندازه‌گیری محتوی کلروفیل (a)و (b) از روش Arnon (۱۹۴۹) و دستگاه اسپکترو فتومتر ماورای بنفش استفاده شد. بدین منظور ابتدا ۰/۵ گرم برگ از هر گلدان انتخاب و درون یک هاون چینی ریخته و به آن یک گرمسولفات منیزیم و ۱۰ میلی لیتر استون ۱۰۰ درصد اضافه کرده و آنقدر در هاون ساییده شد تا خمیری شل حاصل گردید. هاون مربوطه رادر داخل ظرف آب و یخ قرار داده و آزمایشگاه حتی الامکان تاریک شد تا فعل و انفعالات شیمیایی به حداقل برسد. سپس خمیر شل حاصله را برداشته و در داخل سانتریفوژ با ۲۵۰۰ دوردر دقیقه و به مدت ۵ دقیقه قرار داده شد، سپس مقدار ۱ میلی لیتراز این عصاره هموژن (سوپرناتانت) را با ۹ میلی لیتر استن داخل سل‌های دستگاه اسپکتروفتومتر ریخته و در طول موجهای ۶۴۷ نانومتری برای کلروفیل (a) و ۶۶۳ نانومتر برای کلروفیل (b) میزان جذب نور قرائت شد و از فرمولهای زیر کلروفیل (a) و (b) بدست آمد، (دستگاه قبل از آزمایش با استون خالص کالیبره گردید):

$$Chl.a(mgl^{-1}) = (12.25 \times A663 - 2.79 \times A647) \times D$$

$$Chl.b(mgl^{-1}) = (21.5 \times A647 - 5.1 \times A663) \times D$$

D = ضخامت سل‌های دستگاه اسپکترو فوتومتر

نتایج و بحث

با توجه به نتایج تجزیه واریانس، اختلاف بسیار معنی داری بین گونه‌های زراعی و دوز کادمیوم در خاک از نظر میزان غلظت فلز سنگین کادمیوم در اندام‌های هوایی مشاهده شد (جدول ۱). با توجه به جدول مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن (جدول ۲)، می‌توان اظهار داشت که در بین گونه‌های زراعی از نظر میزان غلظت کادمیوم در اندام‌های هوایی، گونه زراعی

www.SID.ir

Archive of SID

کلزا با ۳۴/۱۹ میلی گرم کادمیوم در کیلو گرم وزن خشک گیاه و ماشک با ۱۹/۲۳ میلی گرم کادمیوم در کیلو گرم وزن خشک گیاه به ترتیب بیشترین و کمترین مقدار تجمع کادمیوم در اندام‌های هوایی را بخود اختصاص دادند (نمودار ۱).

با توجه به جدول مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن (جدول ۲)، در بین دوزهای مصرفی کادمیوم در خاک از نظر میزان غلظت کادمیوم در اندام‌های هوایی، دوز ۸۰، ۴۰ و صفر میلی گرم کادمیوم در کیلوگرم وزن خشک خاک به ترتیب با ۵۲/۵۱، ۳۱/۶۳ و ۰/۰۳ میلی گرم در کیلو گرم وزن خشک گیاه رتبه‌های اول تا سوم را بخود اختصاص دادند (نمودار ۲).

در بین گونه‌های زراعی اختلاف معنی داری از نظر میزان کلروفیل a مشاهده شد (جدول ۱). با توجه به جدول مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن (جدول ۲)، می‌توان اظهار داشت که در بین گونه‌های زراعی، ماشک با ۴/۰۲، کلزا با ۳/۹۸ و یونجه با ۳/۷۶ میلی گرم در کیلو گرم وزن تازه گیاه به ترتیب رتبه اول تا سوم را از نظر میزان کلروفیل a بخود اختصاص دادند (نمودار ۳).

با توجه به نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱)، در بین دوزهای مصرفی کادمیوم در خاک اختلاف بسیار معنی داری از نظر میزان کلروفیل a مشاهده شد (جدول ۱). با توجه به جدول مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن (جدول ۲)، می‌توان اظهار داشت که در بین دوزهای مصرفی کادمیوم در خاک، دوز صفر، ۴۰ و ۸۰ میلی گرم کادمیوم در کیلوگرم وزن خشک خاک به ترتیب با ۴/۲۲، ۳/۸۸ و ۳/۶۷ میلی گرم در کیلو گرم وزن تازه گیاه رتبه‌های اول تا سوم را از نظر میزان کلروفیل a بخود اختصاص دادند (نمودار ۴). این نتیجه مطابق بود با نتایج Maysa و Abdel-Aal (۲۰۰۸).

با توجه به نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱)، در بین دوزهای مصرفی کادمیوم در خاک اختلاف بسیار معنی داری از نظر میزان کلروفیل b مشاهده شد، اما در بین گونه‌های زراعی اختلاف معنی داری از نظر میزان کلروفیل b دیده نشد. با توجه به جدول مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن (جدول ۲)، می‌توان اظهار داشت که در بین دوزهای مصرفی کادمیوم در خاک، دوز صفر، ۴۰ و ۸۰ میلی گرم کادمیوم در کیلوگرم وزن خشک خاک به ترتیب با ۴/۲۲، ۳/۸۸ و ۳/۶۷ میلی گرم در کیلو گرم وزن تازه گیاه رتبه‌های اول تا سوم را از نظر میزان کلروفیل b بخود اختصاص دادند (نمودار ۵).

در بین گونه‌های زراعی اختلاف معنی داری از نظر میزان کلروفیل a+b مشاهده نشد (جدول ۱). اما نتایج مقایسه میانگین‌ها بر اساس روش دانکن (جدول ۲) نشان داد که ماشک با ۷/۹۸ میلی گرم در کیلو گرم وزن تازه گیاه و یونجه با ۷/۷۲ میلی گرم در کیلو گرم وزن تازه گیاه به ترتیب بالاترین و کمترین میزان کلروفیل a+b را بخود اختصاص دادند (نمودار ۶). با توجه به نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱)، در بین دوزهای مصرفی کادمیوم در خاک اختلاف بسیار معنی داری از نظر میزان کلروفیل a+b مشاهده شد (جدول ۱). با توجه به جدول مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن (جدول ۲)، می‌توان اظهار داشت که در بین دوزهای مصرفی کادمیوم در خاک، دوز صفر، ۸۰ و ۴۰ میلی گرم کادمیوم در کیلوگرم وزن خشک خاک به ترتیب با ۸/۳۷، ۷/۵۵ و ۳/۶۷ میلی گرم در کیلو گرم وزن تازه گیاه رتبه‌های اول تا سوم را از نظر میزان کلروفیل a+b بخود اختصاص دادند (نمودار ۷).

اغلب محققین اشاره دارند به اینکه کاهش میزان کلروفیل گیاهان در معرض تنش فلز سنگین کادمیوم، بخاطر عدم سنتز کلروفیل است. این موضوع در ارتباط با گیاه گندم به اثبات رسیده است (Malik و همکاران، ۱۹۹۲). علت این امر این است که کادمیوم با فلز آهن در رقابت بوده باعث می‌شود ریشه بجای آهن فلز کادمیوم را جذب کند و نهایتا کادمیوم جای فلز منیزیم (Mg) را در مولکول کلروفیل اشغال کند و باعث عدم سنتز کلروفیل شود (Küpper و همکاران، ۱۹۹۸).

با توجه به نتایج واریانس (جدول ۳) در بین گونه‌های زراعی اختلاف معنی داری از نظر میزان آنزیم آنتی اکسیدانت سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) دیده نشد. اما در بین دوزهای مصرفی کادمیوم در خاک اختلاف بسیار معنی داری از نظر میزان

www.SID.ir

Archive of SID

آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) مشاهده شد (جدول ۳). با توجه به جدول مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن (جدول ۳)، می‌توان اظهار داشت که در بین دوزهای مصرفی کادمیوم در خاک، دوز صفر، ۴۰ و ۸۰ میلی گرم کادمیوم در کیلوگرم وزن خشک خاک به ترتیب با ۷۹/۹۳، ۶۶/۷۶ و ۶۵/۱۱ واحد/ میلی گرم پروتئین رتبه‌های اول تا سوم را از نظر میزان آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) بخود اختصاص دادند (نمودار ۸). این مطابق بود با نتایج Maysa و Abdel-Aal (۲۰۰۸).

با توجه به نتایج واریانس (جدول ۳) در بین گونه‌های زراعی اختلاف بسیار معنی داری از نظر میزان بیومارکر بیوشیمیایی مالون دی آلدهید (MDA) مشاهده شد. با توجه به جدول مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن (جدول ۴)، می‌توان اظهار داشت که در بین گونه‌های زراعی، کلزا با ۳۷/۱۳، ماشک با ۳۴/۳۰ و یونجه با ۳۳/۷۰ میکرو مول در گرم وزن تازه گیاه به ترتیب رتبه اول تا سوم را از نظر میزان بیومارکر بیوشیمیایی مالون دی آلدهید (MDA) بخود اختصاص دادند (نمودار ۹). این امر می‌تواند به واسطه تفاوت ژنتیکی گونه‌های زراعی جهت مقابله با تنش فلز سنگین، باشد. در بین دوزهای مصرفی کادمیوم در خاک اختلاف بسیار معنی داری از نظر میزان میزان بیومارکر بیوشیمیایی مالون دی آلدهید (MDA) مشاهده شد (جدول ۳). با توجه به جدول مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن (جدول ۴)، می‌توان اظهار داشت که در بین دوزهای مصرفی کادمیوم در خاک، دوز ۸۰، ۴۰ و صفر میلی گرم کادمیوم در کیلوگرم وزن خشک خاک به ترتیب با ۳۸/۷۲، ۳۷/۴۴ و ۲۸/۹۷ میکرومول/گرم وزن تازه گیاه رتبه‌های اول تا سوم را از نظر میزان بیومارکر بیوشیمیایی مالون دی آلدهید (MDA) بخود اختصاص دادند (نمودار ۱۰). این مطابق بود با نتایج Maysa و Abdel-Aal (۲۰۰۸). کادمیوم باعث تولید رادیکال هیدروکسیل (OH^-) شده و بدنبال آن پراکسیداسیون چربی که اولین علامت تنش اکسیداتیو است رخ می‌دهد بنابراین با افزایش پرواکسیداسیون چربی غشای سلول تخریب شده و نشت غشاء اتفاق می‌افتد، و میزان مالون دی آلدهید بالا می‌رود (Maysa و Abdel-Aal، ۲۰۰۸).

جدول۱- میانگین مربعات و سطوح معنی دار بودن میزان کادمیوم (Cd)، کلروفیل a، b و a+b در بخش اندام‌های هوایی تحت تاثیر کادمیوم.

Table 1. Mean Squares and Significant Levels for Cd, Chlorophyll a, b and a+b content into Shoot Parts Inflonce of Cd.

منابع تغییرات (S.O.V)	درجه آزادی (df)	میانگین مربعات Mean Squares			
		کادمیوم (Cd)	کلروفیل a Chlorophyll a	کلروفیل b Chlorophyll b	کلروفیل a+b Chlorophyll a+b
تکرار Replication	2	7.12 ns	0.03 ns	0.004 ns	0.02 ns
گونه زراعی (C)	2	552.45**	0.17 *	3.333 ns	0.18 ns
دوز کادمیوم (Cd)	2	6284.64**	0.69 **	0.262 **	1.69 **
اثر متقابل (C × D)	4	254.84**	0.11 ns	0.004 ns	0.08 ns
اشتباه آزمایشی (Error)	16	9.73	0.04	0.006	0.06
ضریب تغییرات ٪(CV)		11.12	5.1	1.96	3.11

ns، * و**: به ترتیب عدم تفاوت معنی دار، تفاوت معنی دار در سطح ۵٪، ۱٪

* ns, and **: Non significant, Significant at the 5% and 1% Levels of Probability Respectively.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول۲- مقا یسه میانگین میزان کادمیوم (Cd)، کلروفیل a, b و a+b سطوح مختلف گونه‌های زراعی و دوزهای فلز سنگین کادمیوم.

Table 2. Mean Comparison of Cd, Chlorophyll a, b and a+b Content in Different Levels of Crop Species and Cd Doses.

تیمارهای آزمایشی (Exp. Treatments)	میزان کادمیوم Cd Content (mg/kg.dw)	کلروفیل a Chlorophyll a (mg/g.Fw)	کلروفیل b Chlorophyll b (mg/g.Fw)	کلروفیل a+b Chlorophyll a+b (mg/g.Fw)
گونه زراعی (Crop Specie)				
C_1 ماشک (Hairy vetch)	19.23 ^{c*}	4.02 ^{a}	3.96 ^{a}	7.98 ^{a}
C_2 یونجه (Alfalfa)	30.75 ^{b}	3.76 ^{b}	3.96 ^{a}	7.72 ^{b}
C_3 کلزا (Canola)	34.19 ^{a}	3.98 ^{a}	3.96 ^{a}	7.94 ^{ab}
دوز کادمیوم (Cd Doses)				
D_1 ۰ (mg/kg.dw soil)	0.03 ^{c}	4.22 ^{a}	4.15 ^{a}	8.37 ^{a}
D_2 ۴۰ (mg/kg.dw soil)	31.63 ^{b}	3.88 ^{b}	3.84 ^{b}	7.72 ^{b}
D_3 ۸۰ (mg/kg.dw soil)	52.51 ^{a}	3.67 ^{c}	3.88 ^{b}	7.55 ^{b}

*اختلاف میانگین‌های هر ستون که دارای حروف مشترک هستند از نظر آماری در سطح ۵ % بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن معنی دار نمی باشد.

* Difference Means followed by Similar Latters in Each Column are not Significant at the 5% Level of Probability, According to Duncan's Multiple Range Test

جدول۳- میانگین مربعات و سطوح معنی دار بودن آنزیم آنتی اکسیدانت سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)، بیومارکر بیوشیمیایی مالون دی آلدهید (MDA) تحت تاثیر فلز سنگین کادمیوم.

Table 3. Mean Squares and Significant Levels for Antioxidant Enzyme Superoxide dismutase (SOD) and Biochemical Bio-marker Malondialdehyde (MDA) Influence of Cd Heavy Metal.

منابع تغییرات (S.O.V)	درجه آزادی (df)	میانگین مربعات Mean Squares	
		سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)	مالون دی آلدهید (MDA)
تکرار	2	5.24 ^{ns}	3.12 ^{ns}
گونه زراعی (C)	2	21.57 ^{ns}	30.26 **
دوز کادمیوم (D)	2	594.08 **	253.01 **
اثر متقابل (C × D)	4	55.30 *	5.72 *
اشتباه آزمایشی (Error)	16	18.26	291.29
ضریب تغییرات ٪(CV)		6.05	3.24

Ns، * و**: به ترت=ب عدم تفاوت معنی دار، تفاوت معنی دار در سطح ۵%، ۱%

and **: Non significant, Significant at the 5% and 1% Levels of Probability Respectively. * ns,

www.SID.ir

Archive of SID

جدول۴- مقا یسه میانگین میزان آنزیم آنتی اکسیدانت سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) و بیومارکر بیوشیمیایی مالون دی آلدهید (MDA) سطوح مختلف گونه‌های زراعی و دوزهای فلز سنگین کادمیوم.

Table 4. Mean Comparison of Antioxidant Enzymes superoxide dismutase (SOD) and and Biochemical Biomarker Malondi-aldehyde (MDA) Rate in Different Levels of Crop Species and Cd Heavy Metal Doses.

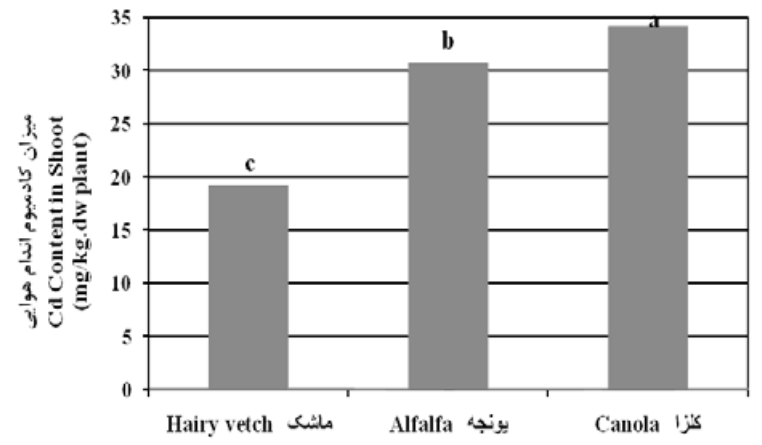
مالون دی آلدهید (µmol/kg.fw) (MDA)	سوپر اکسید دیسموتاز (U/mg.protein) (SOD)	تیمارهای آزمایشی (Exp. Treatments)
		گونه زراعی (Crop Specie)
34.30 b	70.07 a*	C_1 ماشک (Hairy vetch)
33.70 b	72.34 a	C_2 یونجه (Alfalfa)
37.13 a	69.39 a	C_3 کلزا (Canola)
		دوز کادمیوم (Cd Doses)
28.97 c	79.93 a	D_1 ۰ (mg/kg.dw soil)
37.44 b	66.74 b	D_2 ۴۰ (mg/kg.dw soil)
38.72 a	65.11 b	D_3 ۸۰ (mg/kg.dw soil)

*اختلاف میانگین‌های هر ستون که دارای حروف مشترک هستند از نظر آماری در سطح ۵ % بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن معنی دار نمی باشد.

* Difference Means followed by Similar Latters in Each Column are not Significant at the 5% Level of Probability, According to Duncan's Multiple Range Test.

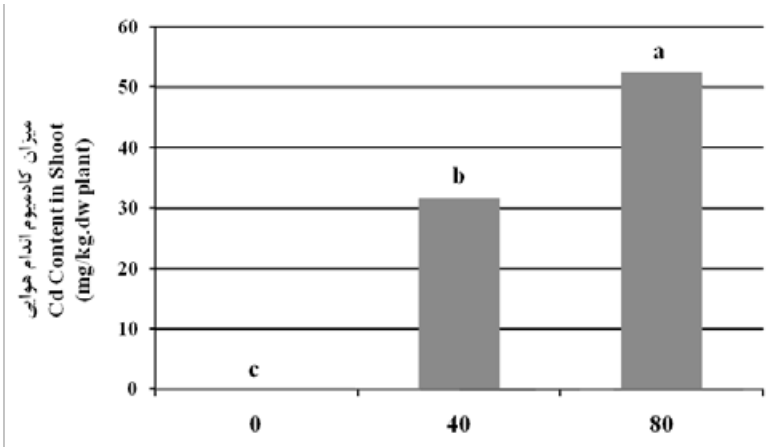
www.SID.ir

Archive of SID



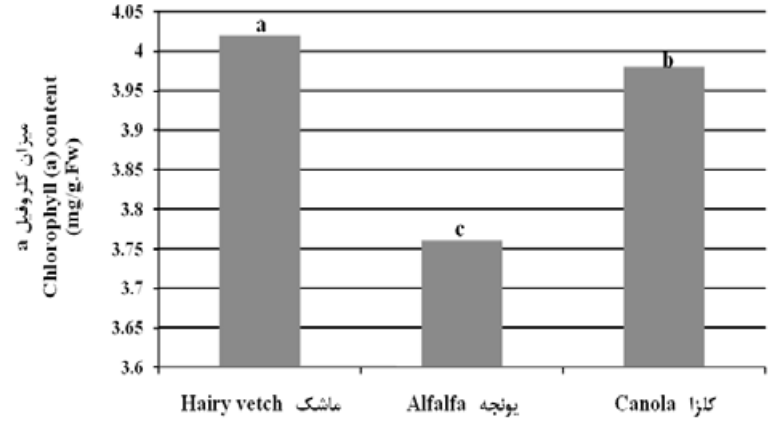
نمودار (۱) تاثیر گونه های زراعی بر روی غلظت کادمیوم در اندام های هوایی

Fig.1. Effect of Crop Species on Cd Concentration into shoot Parts



نمودار (۲) تاثیر دوز کادمیوم خاک بر روی میزان کادمیوم در اندام های هوایی

Fig.2. Effect of Cd Doses into Soil on Cd Content in Shoot Parts

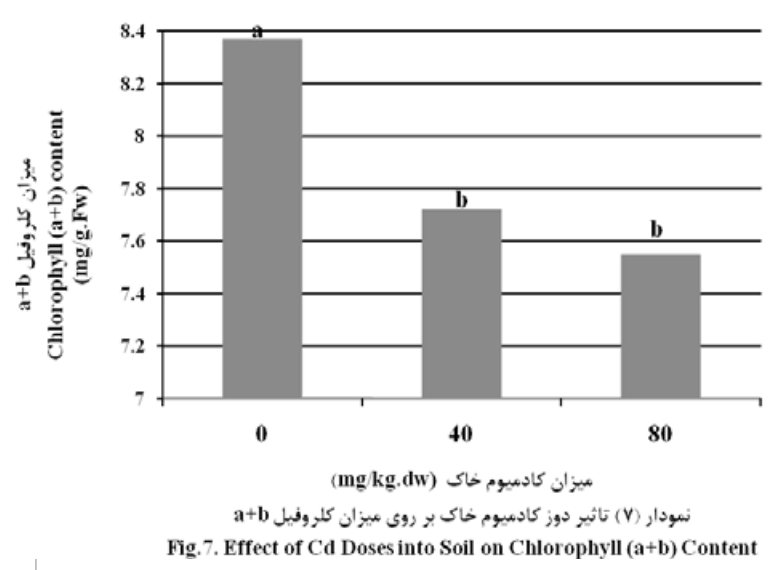


نمودار (۳) میزان کلروفیلa گونه های زراعی تحت تاثیر فلز کادمیوم

Fig.3. Chlorophyll (a) Content of Crop Species affected with Cd Metal

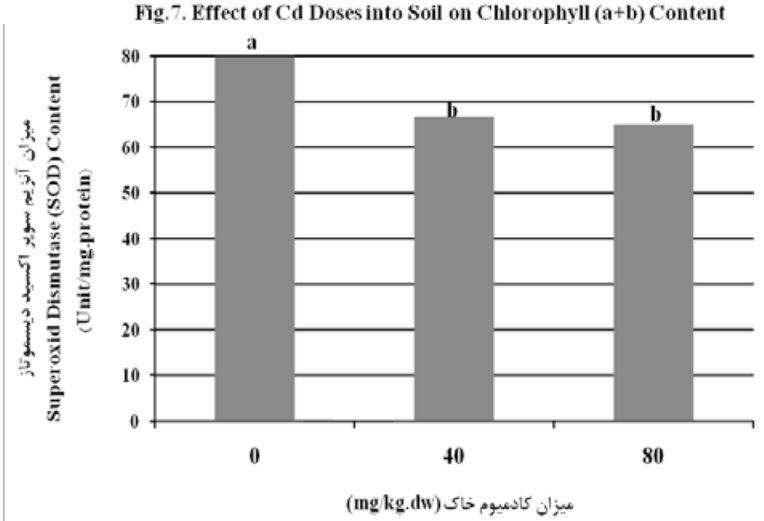
www.SID.ir

Archive of SID



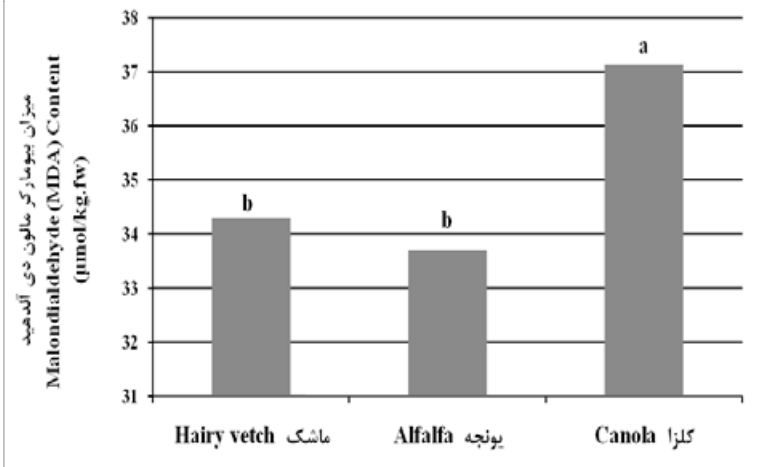
نمودار (۷) تاثیر دوز کادمیوم خاک بر روی میزان کلروفیل a+b

Fig.7. Effect of Cd Doses into Soil on Chlorophyll (a+b) Content



نمودار (۸) تاثیر دوز کادمیوم خاک بر روی میزان آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)

Fig.8. Effect of Cd Doses into Soil on Superoxid Dismutase (SOD) Content

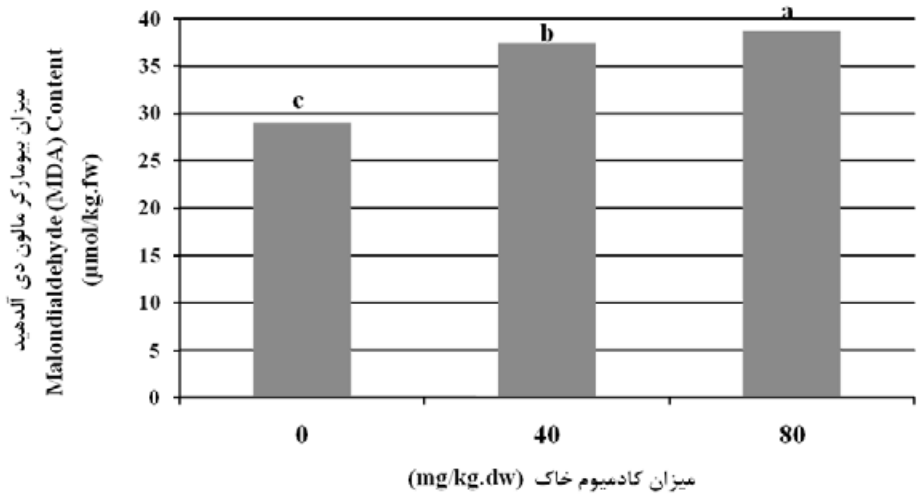


نمودار (۹) میزان مالون دی آلدهید(MDA) گونه های زراعی تحت تاثیر فلز کادمیوم

... Fig.9. Malondialdehyde (MDA) Content of Crop Species affected with Cd

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار (۱۰) تاثیر دوز کادمیوم خاک بر روی میزان مالون دی آلدهید (MDA)

Fig.10. Effect of Cd Doses into Soil on Malondialdehyde (MDA) Content

کادمیوم ابتدا با تخلیه گلوتاتیون در گیاه باعث جلوگیری از فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانتی نظیر کاتالاز (CAT)، آسکوربیت پروکسیداز (APX) وگلوتاتیون پروکسیداز (GR) می‌شود (Polle، 2001).

احتمالا کاهش در میزان فعالیت آنزیم آنتی اکسیدانت سوپر اکسید دیسموتاز در غلظت‌های بالای فلزات سنگین از جمله کادمیوم بر می‌گردد به غیر فعال شدن این آنزیم توسط تولید بیش از حد گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و تجزیه یا تخریب غیر تخصصی آنزیم (Filek و همکاران، ۲۰۰۸) یا پیوند خوردن فلزات سنگین غیر ضروری به جایگاه یا مرکز عمل آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز (Stroinski و Kozlowska, 1997). نوسان در فعالیت آنزیم‌ها ی آنتی اکسیدانتی در شرایط تنش فلزات سنگین بستگی به گونه‌های گیاهی (وضعیت فیزیولوژیکی و پتانسیل ژنتیکی گیاه)، زمان اعمال تیمار و میزان غلظت فلز سنگین دارد (Schutzendubel و Polle, 2002, Tamàs و همکاران، ۲۰۰۸).

www.SID.ir

Archive of SID

Reference

منابع

Arnon, D.I. 1949. Copper enzyme in isolated chloroplasts, polyphenol oxidase in betavulgaris. Plant Physiology. 24: 1-15.

Baker, A.J.M. and Brooks, R.R. 1989. Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metalic elements. A review of their distribution, ecology and phytochemistry.Biorecovery. 1: 81-126.

Baker, A.J.M., McGrath, S.P., Sidoli, C.D.M. and Reeves, R.D. 1994. The possibility of in situ heavy metal decontamination of polluted soils using crops of metal accumulating plants. Resour. Conserv. Recyc. 11: 41-49.

Bonaventure, C. and Johnson, F.M. 1997. Healthy environments for healthy people. Bioremediation today and tomorrow. Environ. Health Perspect. 105: 5-20.

Bowler, C., Van Montagu, M., Inze, D. 1992. Superoxide dismutase and stress tolerance. Annu. Plant Physoil. Plant Mol. Biol. 43:83-116.

Casano, L.M., Gomez, L.D., Lascano, H.R., Gonzales, C.A. and Trippi, V.S. 1997. Inactivation and degradation of CuZn-SOD by active oxygen species in wheat chloroplasts exposed to photo-oxidative stress. Plant Cell Physiology. 38: 433-440.

Chaudhry, T.M., Hayes, W. J., Khan, A.G. and Khoo, C.S. 1998. Phytoremediation focusing on accumulator plants that remediate metal contaminated soils. Australasian J. Ecotoxicol. (in press).

Filek, M., Keskinen, R., Hartikainen, H., Szarejko, I., Janiak, A., Miszalski, Z. and Golda A. 2008. The protective role of selenium in rape seedlings subjected to cadmium stress. Plant Physiol. 165: 833-844.

Halliwell, B. and Cutteridge, J.M.C. 1990. Free redicals and Catalytic metalion. Method Enzymes. 189:1-16.

Hegde, R.S. and Fletcher, J.S. 1996. Influence of plant growth stage and season on the release of root phenolics by mulberry as related to development of phytoremediation technology. Chemosphere. 32: 2471-2479.

Khan, A.G., Kuek, C., Chaudhry, T.M., Khoo, C.S. and Hay, W.J. 2000. Role of plants, mycorrhizae and phytochelators in heavy contaminated land remediation. Chemosphere. 21:197-207.

Kling, J. 1997. Phytoremediation of organics moving rapidly into field trials. Environ. Sci. Technol. 31, A129.

Kono, Y. and Fridovich, I. 1982. Superoxide radical inhibits catalase. J. Biological Chemistry. 257: 5751-5754.

Kramer, U., Smith, R.D., Wenzel, W.W., Raskin, I. and Salt, D.E. 1997. The role of metal transport and tolerance in nickel hyperaccumulation by Thelapsi geosingense Halacsy. Plant Physiol. 115: 1641-1650.

Küpper, H., Küpper, F. and Spiller, M. 1998. In situ detection of heavy metal substituted chlorophylls in water plants. Photosynthsis Res. 58: 123-133.

Lowry, O.H., N.J., Rosebrough, A.L. Farr and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. J. Biol. Chem.:193 265-275.

Malik, D., Sheoran, I.S. and Singh, R. 1992. Carbon metabolism in leaves of cadmium treated wheat seedlings. Plant Physiol. Biochem. 30: 223-229.

www.SID.ir

Archive of SID

Maysa, M. Hatata and E. Adel Abdel-Aal. 2008. Oxidative Stress and Antioxidant Defense Mechanisms in Response to Cadmium Treatments. American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci. 4: 655-669.

McEldowney, S., Hardman, D.J. and Waite, S. 1993. Treatment Technologies. In Pollution Ecology and Biotreatment Technologies (Edited by S. McEldowney J. Hardman, and S. Waite). Longman Singapore Publishers, Singapore.

Misra, H.P. and Fridovich, I..1972 The generation of superoxide radical during auto oxidation. J. Biol. Chem. 247: 6960-6966

Pais, I.J. and Benton Jones, J.R. 1997. The hand book of trace elements. Publishing by: St. Luice Press Boca Raton Florida.

Polle, A. 2001. Dissection of the superoxide dismutase-ascorbate-glutathione pathway by metabolic modeling: computer analysis as a step towards flux analysis. Plant Physiol. 126: 445-462.

Schutzendubel, A. and Polle, A. 2002. Plant responses to abiotic stress: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. J. Exp. Botany. 53: 1351-1365.

Stroinski A. and Kozlowska, M. 1997. Cadmium induced oxidative stress in potato tuber. Acta. Soc. Bot. Pol. 66: 189-195.

Tamàs, L., Dudíková, J., Ďurčeková, K., Huttová, J., Mistrík, I. and Zelinová, V. 2008. The impact of heavy metals on the activity of some enzymes along the barley root. Environ. Exp. Bot. 62: 86- 91.

Timothy, P. 2001. Glutation-related enzymes and Selenium Status: Implications for Oxidative Stress.Biochem. Pharm. 62: 237-281.

Weast, R.C. 1984. CRC Handbook of chemistry and physics, 64th edn. Boca Raton, CRC Press.

Yamamoto, Y. , Hachia, A. and Matsumoto, H. 1997. Oxidative damage to membranes by a combination of aluminum and iron in suspension-cultured tobacco cells. Plant Cell Physiology. 38: 1333-1339.

www.SID.ir