Arshive of SID

نشریه فیزیولوژی محیطی گیاهی، سال سیزدهم، شماره ۵۰، تابستان ۱۳۹۷ / صفحات: ۲۴-۱۲

بررسی پاسخ فیزیولوژیک و دفاع آنتی‌اکسیداتیو خردل سفید (*Sinapis alba*) تحت تنش کادمیم و سرب

زهرا سلیمان‌نژاد، احمد عبدل‌زاده*، حمیدرضا صادقی‌پور

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه گلستان، گرگان، ایران

تاریخ دریافت: ۹۵/۱/۲۸ تاریخ پذیرش:۹۵/۷/۵

چکیده

فلزات سنگین از مهم‌ترین آلاینده‌های خاک و محیط زیست می‌باشند. در این تحقیق، برخی پارامترهای بیوشیمیایی گیاه *Sinapis alba* رشد یافته در خاک‌های آلوده شده با غلظت‌های مختلف کادمیم (۰، ۷۵ و ۱۵۰ mg/kg) و سرب (۰، ۳۰۰ و ۶۰۰ mg/kg) مورد بررسی قرار گرفت. گیاهان حدود ۷ هفته پس از کشت در گلخانه، برداشت شدند. نتایج مطالعه نشان داد که تیمارهای کادمیم سبب کاهش طول و وزن تر بخش هوایی و کل گیاه شد. هر چند تیمارهای سرب اثر معنی‌داری در صفات رشد گیاه نداشت. تیمارهای کادمیم سبب کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز، میزان پراکسید هیدروژن، پراکسیداسیون لیپید و افزایش میزان پروتئین محلول در بخش هوایی و افزایش فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در بخش هوایی و ریشه گیاه در مقایسه با شاهد شد. گیاهان تیمار شده با ۷۵ mg/kg کادمیم در مقایسه با گیاهان شاهد میزان کلروفیل a، کلروفیل کل و نسبت کلروفیل a به b بیشتری را نشان دادند. تیمارهای سرب منجر به کاهش، فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در بخش هوایی و ریشه، میزان پروتئین محلول در ریشه و قندهای غیراحیاء کننده در بخش هوایی شد. تیمار ۳۰۰ mg/kg سرب در بخش هوایی سبب افزایش، فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز محلول و دیواره‌ای، میزان پراکسید هیدروژن، پروتئین محلول و کلروفیل a، b و کل گردید. تیمار ۶۰۰ mg/kg سرب سبب افزایش میزان پراکسید هیدروژن ریشه و کاهش کاروتنوئیدها شد. این نتایج نشان می‌دهد که خردل سفید با توجه به بیوماس بالا، افزایش میزان رنگدانه‌های فتوسنتزی و عدم وجود تنش اکسیداتیو دارای توانایی قوی برای تحمل کادمیم و سرب می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: پاسخ بیوشیمیایی، تنش اکسیداتیو، سرب، خردل سفید، کادمیم.

مقدمه

فلزات سنگین از منابع آلاینده محیط زیست از جمله خاک می‌باشند که در صورت تجمع در خاک و جذب به وسیله گیاه به زنجیره‌های غذایی وارد می‌شوند و مسمومیت‌هایی را در گیاهان و یا افراد تغذیه‌کننده از آن‌ها ایجاد می‌کنند (Antoniadis and Alloway, 2001). یکی از مهم‌ترین فلزات سنگین موجود در طبیعت کادمیم می‌باشد و به علت سمیت بالا و حلالیت زیاد آن در آب یک آلاینده قوی محسوب می‌گردد (Pinto et al., 2004). کادمیم اگر چه برای رشد گیاه ضروری نیست، اما به‌راحتی از طریق پوست ریشه جذب می‌شود و سپس از طریق مسیر سیمپلاستی یا آپوپلاستی وارد بافت چوب می‌شود (Sanita and Gabbrielli, 1999). در اغلب گونه‌های گیاهی کادمیم در ریشه تجمع می‌یابد و مقدار کمی به برگ‌ها منتقل می‌شود (Ramos et al., 2002). سرب یکی دیگر از فلزات سنگین سمی و آلوده‌کننده محیط است که اعمال بیولوژیکی آن ناشناخته می‌باشد.

*نویسنده مسئول: ah_ab99@yahoo.com

www.SID.ir

Arshive of SID

این عنصر به سرعت در خاک‌های کشاورزی افزایش یافته و آن مکان را آلوده می‌کند (Hamid et al., 2010).

تنش‌های محیطی نظیر فلزات سنگین بر رشد و نمو، ساختار فیزیولوژیک گیاه، سنتز پروتئین‌ها، فعالیت‌های آنزیمی و غیرآنزیمی، تنفس و متابولیسم سلولی اثر می‌گذارند. آثار سمی فلزات سنگین بر گیاهان ناشی از تولید گونه‌های فعال اکسیژن و تنش اکسیداتیو می‌باشد (Ferreira et al., 2002) که این گونه‌های فعال اکسیژن معمولاً با آسیب به غشاها و DNA، القای تغییر در رشد و ساختار فیزیولوژیک سلول و تخریب آنزیم‌ها، فرآیندهای مختلف سلولی را دچار اختلال می‌کنند (Sytar et al., 2013). دفاع آنتی‌اکسیدانی برای محافظت از سلول‌ها در برابر تاثیرهای خطرناک گونه‌های فعال اکسیژن وارد عمل می‌شود، طی تنش اکسیداتیو، وقایعی مانند افزایش تولید ROS، میزان آنتی‌اکسیدان‌ها، تولید پرولین و پراکسیداسیون لیپید در گیاهان صورت می‌گیرد که منجر به افزایش تحمل گیاه به تنش می‌شوند (Mobin and khan, 2007). وقتی گیاهان در معرض غلظت‌های بالای فلزات سنگین قرار می‌گیرند، وزن تر و خشک و طول بخش هوایی و ریشه گیاه کاهش می‌یابد (Nagajyoti et al., 2010). فلزات سنگین خسارات قابل رویتی نظیر کلروز و نکروز در برگ‌های گیاهان به وجود می‌آورند و باعث کاهش طول و قهوه‌ای شدن ریشه‌ها می‌گردند (Liu et al., 2008). در غلظت‌های بالای فلزات سنگین، میزان پراکسیداسیون و تجزیه لیپیدهای غشایی به‌خصوص غشای کلروپلاستی تحریک می‌شود (Gill and Tuteja, 2010). یافته‌های برخی پژوهش‌ها نشان می‌دهد که فلزات سنگین می‌توانند در غلظت‌های کم سبب افزایش میزان کلروفیل a و b (John et al., 2008؛ Ghorbanli, and Kiapour, 2012) و در غلظت‌های بالا موجب کاهش این رنگدانه‌ها شوند (John et al., 2009).

نتایج مربوط به تحقیقات مختلف نشان می‌دهد که میزان کربوهیدرات محلول و نامحلول در گیاهان رشد یافته تحت تنش فلزات سنگین، با توجه به غلظت فلزات، می‌تواند افزایش یا کاهش یابد (Gubrelay et al., 2013). کادمیم با کاهش انتقال آب به برگ‌ها، منجر به افزایش قندهای احیا کننده در گیاه می‌شود. این پدیده احتمالاً مکانیسم سازشی گیاه برای حفظ پتانسیل اسمزی در شرایط سمیت با کادمیم است. علاوه بر نقش قندها در تنظیم فشار اسمزی تصور می‌شود با افزایش قندهای حل شونده گیاه بتواند ذخیره کربوهیدراتی خود را برای حفظ متابولیسم پایه سلول در شرایط محیطی تحت تنش در حد مطلوب نگه دارد (Verma and Dubey, 2001).

Sinapis alba (خردل سفید) گیاهی علفی، یک‌ساله از تیره شب‌بو بوده که به علت طیف وسیعی از کاربردها گیاهی چند منظوره می‌باشد (Maiti et al., 2007). در تیره شب‌بو گونه‌هایی وجود دارند که تمایل به تجمع غلظت بالای فلزات سنگین را دارند، برخی از این گونه‌ها نظیر خردل سفید، رشد سریع و بیوماس بالایی دارند.

با توجه به افزایش روزافزون صنعتی شدن، استفاده از کودهای شیمیایی و آفت‌کش‌ها به‌عنوان منابع مهم آلودگی‌های چندگانه فلزات سنگین، فهم چگونگی اثر یون‌های کادمیم و سرب بر رشد، فرایندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در گیاهان ممکن است در حل مشکلات ناشی از آلودگی چندگانه فلزات سنگین موثر باشد. از این رو این تحقیق با هدف بررسی برخی پارامترهای فیزیولوژیک و مطالعه تغییر در میزان برخی ترکیبات شیمیایی در شرایط تنش ناشی از کادمیم و سرب در خردل سفید انجام شده است.

www.SID.ir

Arshive of SID

مواد و روش‌ها

شرایط کاشت: کشت گیاهان در گلخانه و در داخل گلدان‌های پر شده از خاک زراعی انجام گردید. جهت آماده‌سازی خاک، ابتدا حدود ۱۰۰ کیلوگرم خاک زراعی غیرآلوده از اطراف شهرستان نکا جمع‌آوری گردید. ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک و غلظت عناصر سنگین خاک پیش از اضافه نمودن نمک‌های فوق‌الذکر اندازه‌گیری شد (جدول ۱). برای ایجاد آلودگی فلزات سنگین در خاک به‌طور مصنوعی از غلظت‌های ۷۵ و ۱۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم کادمیم و ۳۰۰ و ٦۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم سرب به‌صورت نمک‌های (کلرید کادمیم و کلرید سرب) استفاده شد. نمک‌ها به‌طور مجزا در آب مقطر حل و به صورت لایه لایه به سطح خاک اسپری شده و خاک هر گلدان جداگانه و به‌طور یکنواخت مخلوط شد. خاک‌های آلوده به‌طور مرتب در حد ظرفیت زراعی آبیاری شده و جهت تثبیت و تعادل اجزای خاک و فلزات سنگین مورد بررسی و همسان‌سازی شرایط آلودگی مصنوعی با شرایط آلودگی طبیعی به مدت سه ماه در شرایط هوای آزاد قرار داده شد. بذر گیاه خردل سفید از مرکز تحقیقات دانه‌های روغنی استان مازندران تهیه شد. بذرهای ضدعفونی شده و رویش یافته‌ی گیاهان در اوایل فروردین ماه سال ۱۳۹٤، از پتری به گلدان‌ها (به‌طور معمول ۳ عدد در هر گلدان) منتقل شدند. در طول دوره آزمایش میانگین حداکثر و حداقل دمای روز و شب به‌ترتیب ۲۹ و ۱۸ درجه سانتی‌گراد و میانگین رطوبت نسبی ۸۱ درصد بود. آبیاری گلدان‌ها در طول دوره رشد، با آب شهری انجام شده و گیاهان پس از ۷ هفته (در آغاز فاز زایش) جهت سنجش برخی پارامترهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی برداشت شدند.

جدول ۱: برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک مورد استفاده

Clay (درصد)	silt (درصد)	Sand (درصد)	بافت خاک	pH	EC (dsm^{-1})	غلظت فلزات	
						کادمیم	سرب
٤٧	۳۹	١٤	رسی	۷	۱/۱۱	<۰/۱	۱۵

اندازه‌گیری عوامل مورد مطالعه: پس از برداشت، ابتدا ریشه گیاهان با آب شسته شده و سپس آب سطحی ریشه‌ها با دستمال کاغذی گرفته شد. بعد از آن ریشه از بخش هوایی جدا و طول و وزن آن‌ها اندازه‌گیری شد.

برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز محلول و دیواره‌ای، آسکوربات پراکسیداز و پلی‌فنل‌اکسیداز، عصاره آنزیمی بافت تر گیاهان با استفاده از بافر فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار با اسیدیته ٦/۸ استخراج شد (Liu and Huang, 2000). فعالیت آنزیم کاتالاز و پراکسیداز با استفاده از روش Kar و Mishra (۱۹۷٦) در مد سینتیک، به ترتیب در طول موج ۲٤۰ و ٤۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز از روش Nakano و Asada (۱۹۸۱) در طول موج ۲۹۰ نانومتر و فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز از روش Resende و همکاران (۲۰۰۲)، با استفاده از معرف پیروگالل در طول موج ٤۲۰ نانومتر صورت گرفت.

اندازه‌گیری پروتئین‌های محلول به روش Bradford(۱۹۷٦) با استفاده از معرف برادفورد در طول موج ۵۹۵ نانومتر انجام شد. استخراج فنل، قندهای احیایی و غیراحیایی به روش Fukoda و همکاران (۲۰۰۳) همراه با تغییراتی انجام گرفت. به این ترتیب که مقدار ۰/۰۵ گرم از بافت تر ریشه و

www.SID.ir

Arshive of SID

بخش هوایی گیاه با ۵ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد مخلوط شده و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه در بن ماری قرار داده شد و سپس به‌مدت ۸ دقیقه با سرعت ۵۳۰۰g سانتریفیوژ گردید. محلول شفاف به‌دست آمده جدا گردید و این عمل ٤ بار دیگر تکرار شد. اتانول مخلوط بدست آمده در دمای ۷۰ درجه تبخیر شده و به‌منظور حذف ترکیبات رنگی عصاره به نسبت ۱ به ۵ با کلروفرم مخلوط گردید، بعد از گذشت ۵ دقیقه عصاره شفاف رویی جدا و با سرعت ۱۰۰۰۰g سانتریفیوژ شد. از این عصاره برای سنجش فنل، قندهای احیایی و غیراحیایی استفاده شد. اندازه‌گیری فنل به روش Price و Butler (۱۹۷۷) با استفاده از دو معرف کلرید آهن (III) و هگزا فروسیانات پتاسیم و اندازه‌گیری قندهای غیراحیایی به روش Handel (۱۹٦۸) با استفاده از معرف انترون صورت گرفت. اندازه‌گیری قندهای احیایی به روش Prado و همکاران (۱۹۹۸) انجام شد، به این گونه که ۰/۰۵ میلی‌لیتر از عصاره الکلی تغلیظ شده در لوله آزمایش ریخته و به آن به‌ترتیب ۰/۰۵ میلی‌لیتر پتاسیم فری سیانید ۰/۱ مولار و ۰/۱ میلی‌لیتر بافر آلکالین اضافه گردید و پس از آن که حجم لوله با آب مقطر به ۱ میلی‌لیتر رسانده شد، به شدت ورتکس شده و به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم در دمای ۱۰۰ درجه قرار گرفت. پس از سرد شدن لوله‌ها در دمای اتاق، به‌ترتیب ۱ میلی‌لیتر بافر رنگی و ۰/۵ میلی‌لیتر آب مقطر به آن افزوده و پس از ورتکس به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۱۰۰ درجه قرار داده شد. سپس جذب نور هر یک از نمونه‌ها بعد از سرد شدن در طول موج ۵۰۵ نانومتر اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری پراکسید هیدروژن با استفاده از رنگ‌سنجی و بر طبق روش Sergive و همکاران (۱۹۹۷) در مد فتومتریک و در طول موج ۳۹۰ نانومتر انجام شد. اندازه‌گیری مقدار مالون‌دی‌آلدئید (MDA) بر طبق روش Du و Bramlage (۱۹۹۲) با استفاده از معرف اسید تیوباربیتوریک/ اسید تری‌کلرو استیک در مد فتومتریک و در ۳ طول موج ٤٤۰، ۵۳۲ و ٦۰۰ نانومتر صورت گرفت. سنجش میزان کلروفیل و کاروتنوئید با استفاده از روش Arnon (۱۹٤۹) در ۵ طول موج ٤۷۰، ٦٤۵، ٦٤٦/۸، ٦٦۳ و ٦٦۳/۲ نانومتر انجام شد.

تجزیه آماری: این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی در ۳ تکرار انجام شد (هر گلدان به‌عنوان یک تکرار می‌باشد). محاسبات آماری با استفاده از نرم‌افزار SAS و مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن صورت گرفت.

نتایج

رشد: نتایج کشت نشان داد که کمترین میزان وزن تر ریشه، بخش هوایی و کل گیاه در تیمار ۱۵۰ mg/kg کادمیم مشاهده شد. تیمارهای کادمیم منجر به کاهش معنی‌دار طول بخش هوایی و کل، وزن تر بخش هوایی و کل گیاه نسبت به تیمار شاهد (۰/۰۵ mg/kg) گردید. تیمارهای سرب اثر معنی‌داری در هیچ یک از صفات رشد مورد بررسی گیاه نداشتند (جدول ۲).

میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان: تیمارهای کادمیم باعث کاهش معنی‌دار فعالیت آنزیم کاتالاز در بخش هوایی گیاه در مقایسه با شاهد شد، در حالی‌که تیمارهای سرب در بخش هوایی و ریشه گیاه اثر معنی‌داری در فعالیت آنزیم کاتالاز نداشت (شکل ۱).

www.SID.ir

Arshive of SID

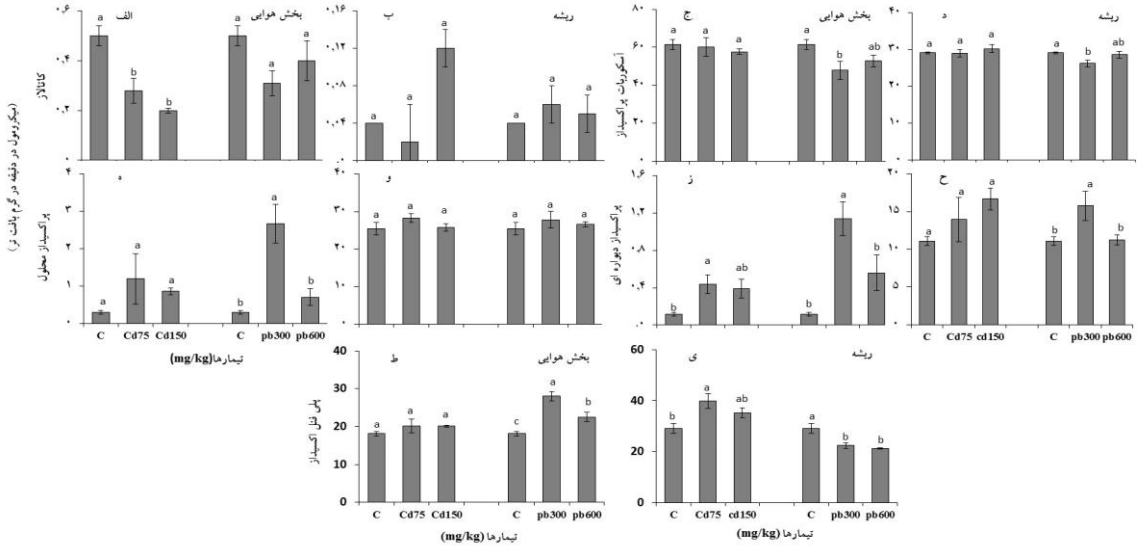
جدول ۲: اثر کادمیم و سرب در میانگین صفات رشد گیاه خردل سفید.

فلزات سنگین (mg/kg)		طول (سانتی‌متر)			وزن تر (گرم)		
		ریشه	بخش هوایی	کل	ریشه	بخش هوایی	کل
کادمیم	شاهد	۲۷/۱±۴/۲^{a}	۴۳/۸±۲/۷^{a}	۷۰/۹±۳/۳^{a}	۲/۱±۲/۴^{a}	۶/۸±۲/۸^{a}	۸/۹±۵/۱^{a}
	۷۵	۲۷/۵±۱/۳^{a}	۲۹/۸±۵/۳^{b}	۵۷/۳±۳/۸^{b}	۱/۷±۱/۴^{a}	۳/۵±۱/۷^{b}	۵/۲±۳/۱^{ab}
	۱۵۰	۲۲/۱±۳/۵^{a}	۱۸/۹±۴/۲^{c}	۴۱/۱±۴/۳^{c}	۰/۹±۰/۸^{a}	۲/۲±۲/۴^{b}	۳/۱±۳/۳^{b}
سرب	شاهد	۲۷/۱±۴/۲^{a}	۴۳/۸±۲/۷^{a}	۷۰/۹±۳/۳^{a}	۲/۱±۲/۴^{a}	۶/۸±۲/۸^{a}	۸/۹±۵/۱^{a}
	۳۰۰	۲۹/۷±۵/۰^{a}	۴۹/۰±۳/۲^{a}	۷۸/۷±۳/۲^{a}	۲/۶±۱/۷^{a}	۷/۵±۰/۲^{a}	۱۰/۱±۱/۸^{a}
	۶۰۰	۲۶/۹±۲/۲^{a}	۴۵/۲±۵/۵^{a}	۷۲/۱±۱/۹^{a}	۲/۸±۰/۵^{a}	۶/۲±۳/۳^{a}	۹/۰±۳/۸^{a}

میانگین ± خطای استاندارد با ۳ تکرار، میانگین‌های هر ستون و عنصر، که حداقل دارای یک حرف مشترک باشند در سطح ۹۵٪ با آزمون دانکن در مقایسه با شاهد اختلاف معنی‌داری ندارند.

فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز محلول ریشه خیلی بیشتر از بخش هوایی گیاه بود (بیش از ۲۵ برابر). به‌طور مشابه بیشترین فعالیت این آنزیم در بخش هوایی و ریشه گیاه در تیمارهای ۷۵ mg/kg کادمیم و ۳۰۰ mg/kg سرب مشاهده شد. در بخش هوایی تیمار ۳۰۰ mg/kg سرب نسبت به شاهد فعالیت آنزیم پراکسیداز محلول را به‌طور معنی‌دار افزایش داد، در حالی‌که اثر تیمارهای دیگر در فعالیت این آنزیم در بخش هوایی و ریشه گیاه در مقایسه با شاهد معنی‌دار نبود (شکل ۱).

در بخش هوایی تیمار ۳۰۰ mg/kg سرب فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز دیواره‌ای را به میزان ۹۰ درصد نسبت به شاهد افزایش داد. فعالیت این آنزیم در ریشه گیاه خیلی بیشتر از بخش هوایی بود، به‌طوری‌که بیشترین فعالیت این آنزیم در تیمارهای ۱۵۰ mg/kg کادمیم و ۳۰۰ mg/kg سرب، به‌ترتیب با میزان ۳۳ و ۳۰ درصد افزایش در مقایسه با شاهد مشاهده شد (شکل ۱).



شکل ۱: اثر کادمیم و سرب در فعالیت کاتالاز (الف و ب)، آسکوربات پراکسیداز (ج و د)، پراکسیداز محلول (ه و و)، پراکسیداز دیواره‌ای (ز و ح) و پلی‌فنل اکسیداز (ط و ی) در بخش هوایی و ریشه گیاه خردل سفید. میله‌ها نشان‌دهنده خطای استاندارد می‌باشد، در هر نمودار میانگین‌های هر عنصر که حداقل دارای یک حرف مشترک باشند در سطح ۹۵ درصد با آزمون دانکن در مقایسه با شاهد اختلاف معنی‌داری ندارند.

www.SID.ir

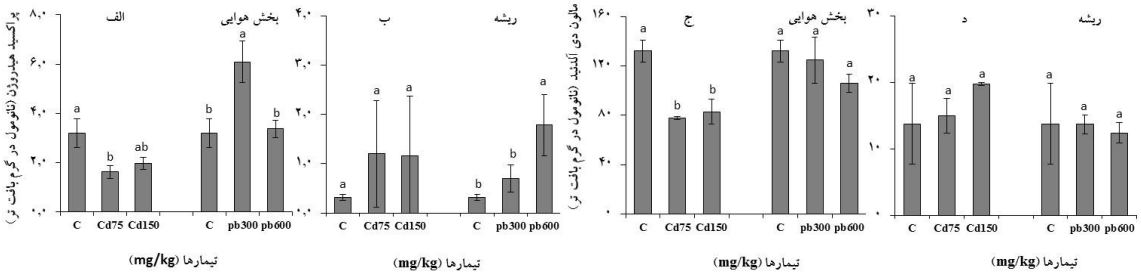
Arshive of SID

تیمارهـــای ۷۵ و ۱۵۰ mg/kg کـــادمیم در بخـــش هوایی و ریشه گیاه به‌ترتیب سـبب افـزایش ۲۷ و ۱۷ درصدی فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز در مقایسـه بـا شاهد شد. تیمارهای سرب به‌طور معنـی‌داری فعالیـت آنزیم پلی فنل اکسیداز را در بخش هـوایی افـزایش و در ریشه کاهش داد (شکل ۱).

تیمارهای کادمیم اثر معنی‌داری در فعالیـت آنـزیم آسکوربات پراکسیداز نداشتند، ولی تیمارهـای سـرب هم در بخش هـوایی و هـم در ریشـه گیـاه منجـر بـه کاهش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز گردید کـه این کـاهش در تیمـار ۳۰۰ mg/kg سـرب نسـبت بـه شاهد معنی‌دار بود (شکل ۱).

میزان فاکتورهای بیوشیمیایی: در بین تیمارهـای فلـز سـنگین، در بخـش هـوایی تیمارهـای کـادمیم سـبب کاهش و تیمار ۳۰۰ mg/kg سرب منجر به افـزایش و همچنین در ریشه گیاه تیمار ۶۰۰ mg/kg سرب منجـر به افـزایش معنـی‌دار میـزان پراکسـید هیـدروژن گیـاه نسبت به شاهد گردید. در مقایسه بـین تیمـار فلـزات سنگین، بیشترین میزان پراکسید هیدروژن تحت تیمـار ۳۰۰ mg/kg سـرب در بخـش هـوایی و تیمـار ۶۰۰ mg/kg سرب در ریشه مشاهده شد (شکل ۲).

تیمارهای کادمیم منجر به کـاهش معنـی‌دار میـزان پراکسیداسـیون لیپیـد بخـش هـوایی گیـاه گردیدنـد، به‌طوری‌که این کاهش در تیمار ۷۵ mg/kg کادمیم بـه مقـدار ۴۷ درصـد بـود. تیمـار فلـزات سـنگین اثـر معنی‌داری در میزان پراکسیداسیون لیپید ریشه گیـاه در مقایسه با شاهد نداشت (شکل ۲).



شکل ۲: اثر کادمیم و سرب در میزان پراکسید هیدروژن (الف و ب) و مالون دی‌آلدئید (ج و د) در بخش هـوایی و ریشـه گیـاه خردل سفید. میله‌ها نشان‌دهنده خطای استاندارد می‌باشد، در هر نمودار میانگین‌های هر عنصـر کـه حـداقل دارای یـک حـرف مشترک باشند در سطح ۹۵ درصد با آزمون دانکن در مقایسه با شاهد اختلاف معنی‌داری ندارند.

تیمار ۳۰۰ mg/kg سرب در بخـش هـوایی منجـر بـه افـزایش ۳۰ درصـدی میـزان پـروتئین محلـول در مقایسه با شاهد گردیـد. در ریشـه تیمارهـای کـادمیم منجر به افزایش و تیمارهای سـرب منجـر بـه کـاهش معنی‌دار میزان پروتئین محلول نسـبت بـه شـاهد شـد (شکل ۳).

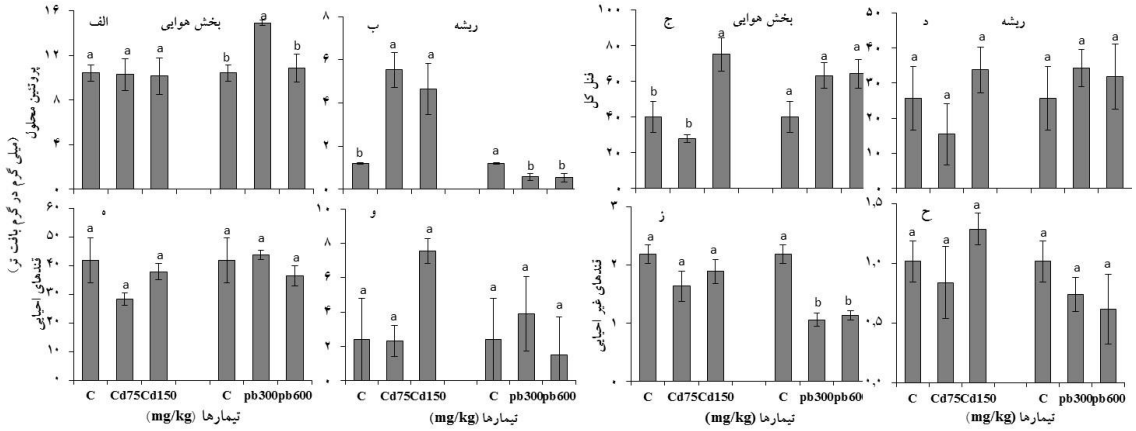
در بخش هوایی تیمـار۱۵۰ mg/kg کـادمیم منجـر به افزایش ۴۶ درصدی میزان فنل گیـاه در مقایسـه بـا شاهد گردید. اثر تیمار فلزات سـنگین در میـزان فنـل ریشه گیاه نسبت به شاهد معنی‌دار نبود (شکل ۳).

تیمـار فلـزات سـنگین اثـر معنـی‌داری در میـزان قندهای احیاء کننـده بخـش هـوایی و ریشـه گیـاه در مقایسه با شاهد نداشت، ولی بیشترین میـزان قنـدهای احیـاء کننـده بخـش هـوایی و ریشـه بـه ترتیـب در تیمارهـای ۳۰۰ mg/kg سـرب و ۱۵۰ mg/kg کـادمیم مشاهده گردید (شکل ۳).

www.SID.ir

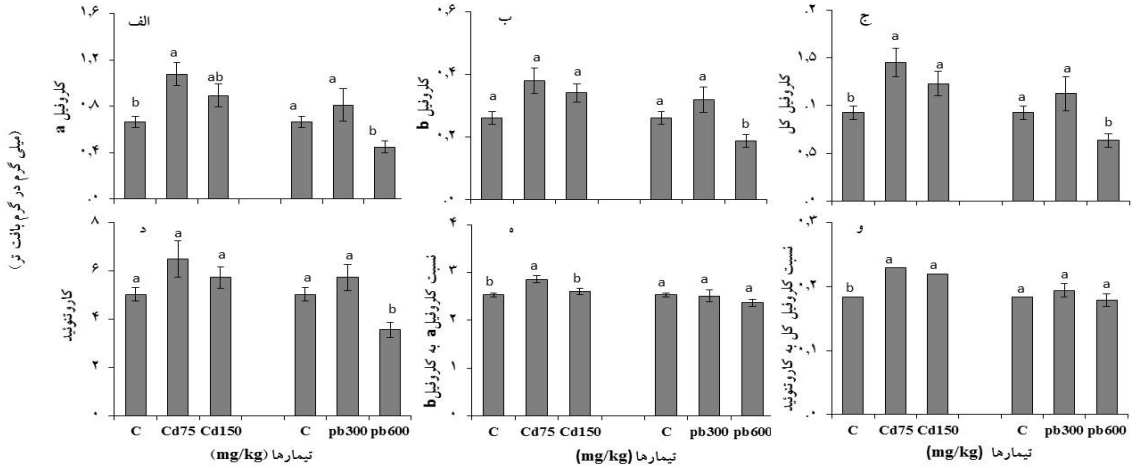
Arshive of SID

روند تغییرات میزان قندهای غیراحیاء کننده تحت تیمار فلزات سنگین در بخش هوایی و ریشه گیاه مشابه بود، به‌طوری‌که تیمارهای سرب در بخش هوایی گیاه منجر به کاهش معنی‌دار میزان قندهای غیراحیاء کننده در مقایسه با شاهد گردید. اثر تیمارهای کادمیم در بخش هوایی و ریشه گیاه در مقایسه با شاهد معنی‌دار نبود (شکل ۳).



شکل ۳: اثر کادمیم و سرب در میزان پروتئین (الف و ب)، فنل کل (ج و د)، قندهای احیایی (ه و و) و قندهای غیراحیایی (ز و ح) در بخش هوایی و ریشه گیاه خردل سفید. میله‌ها نشان‌دهنده خطای استاندارد می‌باشد در هر نمودار میانگین‌های هر عنصر که حداقل دارای یک حرف مشترک باشند در سطح ۹۵ درصد با آزمون دانکن در مقایسه با شاهد اختلاف معنی‌داری ندارند.

تیمار ۷۵ mg/kg کادمیم منجر به افزایش معنی‌دار میزان کلروفیل a، کلروفیل کل، نسبت کلروفیل a به b و همچنین تیمارهای ۷۵ و ۱۵۰ mg/kg کادمیم سبب افزایش معنی‌دار نسبت کلروفیل کل به کاروتنوئیدها در مقایسه با شاهد گردید. تیمار ۳۰۰ mg/kg سرب به‌طور معنی‌داری میزان کلروفیل a، b و کلروفیل کل گیاه را در مقایسه با شاهد افزایش داد، ولی تیمار ۶۰۰ mg/kg سرب کاروتنوئیدها را به میزان ۲۹ درصد در مقایسه با شاهد کاهش داد (شکل ٤).



شکل ٤: اثر کادمیم و سرب در میزان کلروفیل a (الف)، کلروفیل b (ب)، کلروفیل کل (ج)، کاروتنوئید (د)، نسبت کلروفیل a به کلروفیل b (ه) و نسبت کلروفیل کل به کاروتنوئید (و) در گیاه خردل سفید. میله‌ها نشان‌دهنده خطای استاندارد می‌باشد، در هر نمودار میانگین‌های هر عنصر که حداقل دارای یک حرف مشترک باشند در سطح ۹۵ درصد با آزمون دانکن در مقایسه با شاهد اختلاف معنی‌داری ندارند.

www.SID.ir

Arshive of SID

بحث

مطالعه علائم ظاهری نشان داد که با افزایش غلظت کادمیم در گیاه علائم سمیت به‌صورت کاهش رشد بخش هوایی، زرد شدن حاشیه برگ و در برخی موارد ریزش برگ‌های پایینی مشاهده شد. مشابه این نتایج در مطالعه aMolnarov و Fargasova (۲۰۱۲) نیز کادمیم به‌طور عمده منجر به کاهش بیوماس بخش هوایی گیاه *S. alba* گردید. همچنین گزارش شده است که کادمیم سبب کلروز و نکروز برگ می‌شود (Zhang et al., 2002). Nouairi و همکاران (۲۰۰۶) کاهش رشد هر دو قسمت ریشه و بخش هوایی را در *B. napus* تحت استرس کادمیم گزارش کرده و فرض نمودند که این کاهش به‌علت محدودیت در جذب و انتقال آهن و منگنز به بخش هوایی می‌باشد. علائم آسیب‌های کادمیمی مشابه علائم کمبود عناصر ضروری مانند پتاسیم، منیزیم، منگنز و آهن است (Epstein and Bloom, 2005). زیرا حضور کادمیم در داخل بافت‌های گیاهی با ایجاد اختلال در جذب و انتقال عناصر ضروری مثل آهن، روی، مس و منگنز (Wu and Zhang, 2002)، اختلال در سوخت و ساز نیتروژن (Gouia et al., 2001)، کاهش دسترسی این عناصر در خاک و یا اختلال در سوخت و ساز کربوهیدرات (Moya et al., 1993) منجر به کاهش بیوماس گیاهی می‌شود.

روند تغییر پراکسید هیدروژن و پراکسیداسیون لیپید در بخش هوایی گیاه تحت تیمار فلزات سنگین شبیه به هم بوده، به‌طوری که افزایش میزان پراکسید هیدروژن منجر به افزایش پراکسیداسیون لیپید گردیده است. معمولاً افزایش پراکسیداسیون لیپید به‌عنوان شاخص افزایش تنش اکسیداتیو مطرح شده است و کاهش در مقدار آن نشان‌دهنده استحکام مکانیسم‌های تحمل در گیاه می‌باشد (Tohidi et al., 2009). تیمارهای کادمیم در گیاه منجر به تنش اکسیداتیو نگردید، چنان که اثر این تیمارها در میزان پراکسید هیدروژن و پراکسیداسیون لیپید ریشه معنی‌دار نبوده و در بخش هوایی باعث کاهش میزان پراکسید هیدروژن شده و هیچ‌گونه اثر افزایشی در پراکسیداسیون لیپید مشاهده نشد و حتی میزان کلروفیل a و کل، نسبت کلروفیل a به b و کلروفیل کل به کاروتنوئید افزایش یافت. این امر ممکن است به دلیل بخش‌بندی یون کادمیم در واکوئل یا آپوپلاست باشد، به‌علاوه، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت نظیر پراکسیداز دیواره‌ای تحت تیمار ۱۵۰ mg/kg کادمیم و پلی‌فنل اکسیداز تحت تیمار ۷۵ mg/kg کادمیم در ریشه، ممکن است که تنش اکسیداتیو احتمالی تحمیل شده با کادمیم را کاهش داده باشد. مشابه اثر تیمار ۱۵۰ mg/kg کادمیم در این پژوهش، Vassilev و همکاران (۱۹۹۸) نیز تغییر معنی‌داری در نسبت کلروفیل a به b در گیاهان جو تیمار شده با کادمیم در مقایسه با کنترل مشاهده نکردند.

همچنین تیمارهای کادمیم منجر به افزایش میزان پروتئین محلول در ریشه گردید. گیاه در جهت مقابله با تنش فلزات سنگین شروع به سنتز پروتئین‌های دفاعی می‌کند، افزایش پروتئین تحت تیمار کادمیم احتمالاً به علت افزایش سنتز پروتئین‌ها و پلی‌پپتیدهای درگیر در سیستم دفاعی سلول در برابر یون‌ها (متالوتیونین‌ها و فیتوشلاتین‌ها) و یا سنتز بعضی از آنزیم‌ها از جمله آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان می‌باشد (Cobbett and Goldsbrough, 2002). تیمار ۱۵۰ mg/kg کادمیم منجر به افزایش میزان قندهای احیایی در ریشه و میزان فنل در بخش هوایی گیاه گردید. افزایش کربوهیدرات به‌عنوان یک پیام متابولیکی عمل می‌کند و موجب افزایش بیان ژن‌های مربوط به دفاع و کاهش فتوسنتز می‌شود. به عنوان مثال قند هگزوز در خاموش کردن ژن‌های فتوسنتز نقش دارد (Kocal et al., 2008). با افزایش قند

www.SID.ir

Arshive of SID

محلول، گیاه می‌تواند ذخیره کربوهیدراتی خود را برای حفظ متابولیسم پایه سلول تحت تنش در حد مطلوب نگه دارد (Verma and Dubey, 2001).

سرب اثرات سمی کمتری نسبت به کادمیم در گیاه *S. alba* داشت. مشابه این نتیجه، Fargasova و همکاران (۲۰۰۶) نیز در مطالعه تاثیر همزمان سلنیوم با برخی فلزات سنگین نشان دادند که سمیت سرب در مقایسه با کادمیم و مس در دانه‌رست *S. alba* کمتر است.

تیمار ۳۰۰ mg/kg سرب در بخش هوایی سبب افزایش میزان پراکسید هیدروژن شد که این امر منجر به افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت نظیر پراکسیداز، پلی‌فنل اکسیداز و پراکسیداز دیواره‌ای گردید، که با نتایج Sharma و Dubey (۲۰۰۵) مبنی بر افزایش فعالیت پراکسیداز در گیاهک‌های سویا و برنج تحت تنش سرب مطابقت دارد. تاثیر تیمارهای سرب بر میزان پروتئین محلول ریشه و بخش هوایی مشابه نبود، به طوری که تیمارهای سرب در ریشه منجر به کاهش و تیمار ۳۰۰ mg/kg سرب در بخش هوایی منجر به افزایش میزان پروتئین محلول گردید. گیاه *S. alba* احتمالاً با افزایش سنتز پروتئین‌های دفاعی جهت مقابله با تنش سرب در بخش هوایی و افزایش فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و افزایش میزان کلروفیل a، b و کل توانسته است اثر سمی سرب را خنثی نماید. عدم تغییر معنی‌دار پراکسیداسیون لیپید که شاخص تنش اکسیداتیو می‌باشد، می‌تواند دلیلی بر مقاومت گیاه در برابر تنش سرب باشد. مطابق نتایج ما در *Brassica juncea* نیز غلظت‌های صفر، ۱۵۰، ۳۰۰ و ۶۰۰ میکرومولار سرب و غلظت‌های صفر، ۱۵۰ و ۳۰۰ میکرومولار کادمیم، طی مدت ۴۰ روز تیمار، میزان کلروفیل a، کلروفیل b و کل و نیز میزان کاروتنوئیدها را در مرحله گلدهی افزایش داد، اما با تداوم شرایط تنش و گذشت زمان، میزان این رنگدانه‌ها کاهش یافت (John et al., 2009).

نتیجه‌گیری نهایی

با توجه به نتایج بدست آمده از این مطالعه می‌توان گفت که بیوماس بالا، افزایش میزان رنگدانه‌های فتوسنتزی و عدم وجود تنش اکسیداتیو به خصوص در تیمارهای سرب نشان می‌دهد که *S. alba* دارای توانایی قوی برای تحمل کادمیم و سرب می‌باشد. لذا با توجه به این‌که یکی از مشکلات مطرح در فرایند گیاه پالایی جلوگیری از رشد گیاه و تولید توده زیستی توسط فلزات سنگین در غلظت‌های بالا می‌باشد، بنابراین، درک مکانیسم اثر تحریکی غلظت مناسب این فلزات در تولید بیوماس و غلظت کلروفیل مهم است.

سپاسگزاری

این تحقیق مرتبط با بخشی از رساله دکتری زهرا سلیمان‌نژاد در دانشگاه گلستان می‌باشد، لذا از معاونت پژوهشی دانشگاه برای فراهم آوردن بودجه پژوهشی سپاسگزاری می‌شود.

References

Antoniadis, N. and Alloway, B.J. (2001). Availability of Cd, Ni and Zn to rye grass in seawage sludge treated soils at different temperatures. water, Air and Soil Pollution. 132: 201–204.

Arnon, D.I. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. polyphenoloxidase

Ghorbanli, M. and Kiapour, A. (2012). Copper-induced changes on pigments and activity of non-enzimatic and enzyatic defence systems in *Portulaca oleracea* L. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants. 28(2): 235-247.

www.SID.ir

Arshive of SID

in Beta Vulgaris. Plant Physiology. 24:1-15.

Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. 72: 248-254.

Cobbett, C. and Goldsbrough, P. (2002). Phytochelatins and metalothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. Annul Plant Biology. 53: 159-182.

Du, Z. and Bramlage, W.J. (1992). Modified thiobarbituric acid assay for measuring lipid oxidation in sugar-rich plant tissue extracts. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 40: 1566-1570.

Epstein, E. and Bloom, A.J. (2005). Mineral Nutrition of Plants: Principles and Perspectives (2nd ed.). Sinauer Associates, Inc., Massachusetts.

Fargasova, A., Pastierova, J. and Svetkova, K. (2006). Effect of Se-metal pair combinations (Cd, Zn, Cu, Pb) on photosynthetic pigments production and metal accumulation in *Sinapis alba* L. seedlings. Plant, Soil and Environment. 52 (1): 8–15.

Ferreira, R.R., Fornazir, R.F., Vitoria, A.P. and Lea, P. J. (2002). Changes in antioxidant enzyme activities in soybean under cadmium stress. Journal of Plant Nutrition. 25: 327–342 .

Fukoda, T., Ito, H. and Yoshida, T. (2003). Antioxidative polyphenols from Walnuts (*Juglans regia* L.). Phytochemistry. 63: 795-801.

Gill, S.S. and Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiology and Biochemistry. 48(12): 909-930.

Gouia, H., Ghorbal, M.H. and Meyer, C. (2001). Effect of cadmium on activity of nitrat reductase and on other enzymes of the nitrate assimilation pathway in bean. Plant Physiology.38: 629-638.

Gubrelay, U., Agnihotri, R.K., Singh, G., Kaur, R. and Sharma, R. (2013). Effect of heavy metal Cd on some physiological and biochemical parameters of barley (*Hordeum vulgare* L.). International Journal of Agriculture and Crop Sciences. 5 (22): 2743-2751.

Hamid, N., Bukhari, N. and Jawaid, F. (2010). Physiological responses of Phaseolus vulgaris to different lead concentrations. Pakistan journal of Botany. 42(1): 239- 246.

Handel, E.V. (1968). Direct microdetermination of sucrose. Analytical Biochemistry 22: 280-283.

John, R., Ahmad, P., Gadgil, K. and Sharma, S. (2008). Effect of cadmium and lead on growth, biochemical parameters and uptake in *Lemna polyrrhiza* L. Plant Soil and Environment. 54 (6): 262–270.

John, R., Ahmad, P., Gadgil, K. and Sharma, S. (2009). Heavy metal toxicity: effect on plant growth, biochemical parameters metal accumulation by *Brassica juncea* L. International Journal of Plant Production. 3 (3): 65-76.

Kar, M. and Mishra, D. (1976). Catalase, Peroxidase and polyphenolxidase activities during rice leaf senescence. Plant Phsiology. 57: 315-319.

Kocal, N., Sonnewald, U. and Sonnewald, S. (2008). Cell wall-bound invertase limits sucrose export and is involved in symptom development and inhibition of photosynthesis during compatible interaction between tomato and Xanthomonas campestris pv vesicatoria. Plant Physiology. 148: 1523-36.

Liu, D., Li, T.Q., Jin, X.F., Yang, X.E., Islam, E. and Mahmood, Q. (2008). Lead induced changes in the growth and antioxidant metabolism of the lead accumulating and nonaccumulating ecotypes *Sedum Alfredii*. Journal of Integrative Plant Biology. 50(2): 129-140.

Liu, X. and Huang, B. (2000). Heat stress injury in relation to membrane lipid peroxidation in creeping. Crop Science. 40: 503-510.

Maiti, S., Purakayasta, S. and Ghosh, B. (2007). Thermal characterization of mustard straw and stalk in nitrogen at different heating rates. Fuel. 86: 1513-1518.

Mobin, M. and Khan, N.A. (2007). Photosynthetic activity pigment

www.SID.ir

Arshive of SID

composition and antioxidative response of two mustard cultivars differing in photosynthetic capacity subjected to cadmium stress. Journal of Plant Physiology. 164: 601-610.

Molnarova, M. and Fargasova, A. (2012). Relationship between various physiological and biochemical parameters activated by cadmium in *Sinapis alba* L. and *Hordeum vulgare* L. Ecological Engineering. 49: 65–72.

Moya, J.L., Ros, R. and Picazo, I. (1993). Influence of cadmium and nickel on growth, net photosynthesis and carbohydrate distribution in rice plants. Photosynthesis Research. 36: 75-80.

Nagajyoti, P.C., Lee, K.D. and Sreekanth, T.V.M. (2010). Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. Environmental Chemistry Letters. 8(3): 199-216.

Nakano, Y. and Asada, k. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplast. Plant Cell Physiology. 22: 867-880.

Nouairi, I., Ben Ammar, W., Ben Youssef, N., Daoud, D.B., Ghorbal, M.H. and Zarrouk, M. (2006). Comparative study of cadmium effects on membrane lipid composition of *Brassica juncea* and *Brassica napus* leaves. Plant Science 170, 511–519.

Pinto, A.P., Motaa, M., Devarennes, A. and Pinto, F.C. (2004). Influence of organic matter on the uptake of cadmium, zinc, copper and iron by sorghum plants. Science of the Total Environment. 326: 239-247.

Prado, D.E., Gonzalea, J.A., Boero, C. and Sampietro, A.R. (1998). A simple and sensitive method for determining reducing sugars in plant tissues.Application to quantify the sugar contant in Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) seedlings. Phytochemical Analysis. 9: 58-63.

Price, M.L. and Butler, L.G. (1977). Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content of sorghum grain. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 25: 1268–1273.

Ramos, I., Esteban, E., Lucena, J.J. and Garate, A. (2002). Cadmium uptake and subcellular distribution in plants *of Lactuca* sp. Cd-Mn intraction . Plant Science. 162: 761-767.

Resende, M.L.V., Nojosa, G.B.A., Cavalcanti, L.S., Aguilar, M.A.G., Silva, L.H.C.P., Perez, J.O., Andrade, G.C.G., Carvalho, G.A. and Castro, R.M. (2002). Induction of resistance in cocoa against *Crinipellis perniciosa* and *Verticillium dahliae* by acibenzolar-*S*-methyl (ASM). Plant Pathology. 51: 621-628.

Sanita di Toppi, L. and Gabbrielli, R. (1999). Response to cadmium in higher plants- review. Environmental and Experimental Botany. 41: 105-130.

Sergive, I., Alexieva, V. and Karanov, E. (1997). Effect of spermine, atrazine and combination between them on some endogeneus protective systems and stress markers in plants. Comptes Rendus de l'Academie Bulgare des Sciences. 51: 121-124.

Sharma, P.R. and Dubey, S. (2005). Lead toxicity in plants. Brazilian Journal of Plant Physiology. 17(1): 35-52.

Sytar, O., Kumar, A., Latowski, D., Kuczynska, P., Strzałka, K. and Prasad, M.N.V. (2013). Heavy metal-induced oxidative damage, defense reactions, and detoxification mechanisms in plants. Acta Physiologiae Plantarum. 35(4): 985-999.

Tohidi, Z., Baghizadeh, A. and Enteshari, Sh. (2009). The effect of aluminum and phosphorous on *Brassica napus*. Agricalchural and Environment. 6: 137-142.

Vassilev, A., Berowa, M. and Zlatev, Z. (1998). Influence of Cd^{2+} on growth, chlorophyll content, and water relations in young barley plants. Biologia Plantarum. 41: 601–606.

Verma, S. and Dubey, R.S. (2001). Effect of Cd on soluble sugars and enzymes of their metabolism in rice. Biologia Plantarum. 44 (1): 117–123.

Wu, F.B. and Zhang, G.P. (2002). Genotypic variation in kernel heavy metal concentrations in barley and as affected by soil factors. Journal of Plant Nutrition and Soil Science. 25: 1163-1173.

www.SID.ir

Arshive of SID

Zhang, G., Fukami, M. and Sekimoto, H. (2002). Influence of cadmium on minral concentration and yield components in wheat genotypes differing in Cd tolerance at seedling stage. Field Crops Research. 77: 93-98.

www.SID.ir