Archive of SID

ژنتیک نوین
دوره چهاردهم، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۸
صفحه ۲۴۸ - ۲۴۱

Downloaded from mg.genetics.ir at 17:22 +0330 on Saturday March 7th 2020

گیاه‌پالایی و تجمع کادمیوم در *Azolla filiculoides*، *A. pinnata* و آزولای تالاب انزلی و تاثیر آن بر بیان ژن متالوتیونین

Phytoremediation and accumulation of cadmium in *Azolla filiculoides*, *A. pinnata* and *Azolla* from Anzali wetland and its effect on metallothionein gene expression

مجید طالبی*[۱]، بدرالدین ابراهیم سید طباطبایی[۱]، زهرا علیرضایی[۱]، حمید اکبر زاده[۱]

۱- به‌ترتیب دانشیار، استاد، دانش آموختگان کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران

Talebi M*[1], Seyed Tabatabaei BE[1], Alirezaei Z[1], Akbarzadeh H[1]

1. Associate Professor, Professor, MSc Students Department of Biotechnology, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mtalebi@iut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۸/٤/۲۲ - تاریخ پذیرش: ۹۸/۹/۲۷)

چکیده

بهبود کیفیت آب و خاک از طریق روش‌های زیست محیطی و استفاده از پتانسیل گیاهان برای حذف آلودگی‌های موجود در محیط زیست از اهمیت زیادی برخوردار است. گیاه آزولا دارای توانایی تجمع، تجزیه یا حذف فلزات از محیط است، بنابراین یک گیاه کاندید مناسب برای گیاه پالایی است. در این راستا در مطالعه فوق به بررسی میزان تجمع کادمیوم در سه نمونه شامل دو گونه *Azolla pinnata* و *A. filiculoides* و نمونه جمع‌آوری شده از تالاب انزلی پرداخته شد. بدین منظور میزان جذب کادمیوم در سه نمونه مذکور پس از ۷۲ ساعت تیماردهی با سه غلظت ۱۰، ۵۰ و ۵۰۰ میکرومولار، به‌وسیله دستگاه اسپکترومتر جذب اتمی اندازه‌گیری شد. مقایسه میانگین نشان داد که بالاترین میزان جذب این فلز در سطح ۵۰۰ میکرومولار مربوط به *A. pinnata* (٤٦٧٣/٨ mg Kg^{-1}) و پس از آن به‌ترتیب *A. filiculoides* (۲۷٤۷/۱ mg Kg^{-1}) و آزولای جمع‌آوری شده از تالاب انزلی (۲۳۰۹/٤ mg Kg^{-1}) است. میزان جذب فلز کادمیوم در هر سه نمونه تیمار شده و در هر سه سطح مورد مطالعه، نسبت به نمونه‌های شاهد تفاوت معناداری را نشان داد. با افزایش میزان کادمیوم در محیط کشت، میزان رشد نمونه‌های آزولا نیز کاهش یافت. افزایش بیان ژن متالوتیونین در نمونه‌های مورد مطالعه تحت تیماردهی سطوح مختلف کادمیوم، در سه زمان ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت پس از تیمار نشان دهنده تاثیر معنادار اعمال تیمار کادمیوم، در میزان بیان این ژن در سه نمونه آزولای مورد مطالعه بود. در مجموع اعمال تیمار کادمیوم در سه نمونه مذکور نشان داد که این گیاه پتانسیل بالایی برای جذب فلزات سنگین و استفاده برای مقاصد گیاه پالایی دارد.

واژه‌های کلیدی

آزولا
کادمیوم
گیاه پالایی
متالوتیونین

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from mg.genetics.ir at 17:22 +0330 on Saturday March 7th 2020

مقدمه

با توجه به مشکل روز افزون آلودگی فلزات سنگین در محیط زیست، مطالعات زیادی برای بهبود کیفیت آب و خاک از طریق روش‌های زیست محیطی برای بر طرف کردن این مشکل انجام گرفته است. گیاه پالایی (Phytoremediation)، پتانسیل گیاهان برای حذف آلودگی‌های موجود در محیط زیست، یک روش مقرون به صرفه و دارای پتانسیل بالایی برای دستیابی به محیط زیست پایدار است (Salt et al. 1999). گیاهان آب زیست برای تیمار آب‌های آلوده، به‌علت رشد سریع، تولید زیست توده بالا، ظرفیت جذب فلزات سنگین و پاک سازی بهتر و همچنین ارتباط مستقیم با آب، مناسب‌تر از گیاهان خاکی هستند. در این راستا سرخس آزولا مزیت‌های زیادی دارد. این گیاه طیف وسیعی از تحمل به آلودگی‌های فلزی مختلف را از خود نشان داده و قادر به تجمع فلزات سنگین متعددی است. بنابراین یک گیاه کاندید مناسب برای گیاه پالایی است (Arora et al. 2006; Upadhyay et al. 2007). سرخس آبی آزولا نقش مهمی را در جنبه‌های ساختاری و عملکردی اکوسیستم آبی به وسیله دگرگونی آب، فراهم آوردن مکان امن برای ماهی‌ها و بی مهرگان آبزی، استفاده به‌عنوان منبع غذایی، تغییر کیفیت آب به‌وسیله متعادل کردن اکسیژن آب و چرخه غذایی و تجمع فلزات سنگین ایفا می‌کند. از آزولا به‌عنوان بیوفیلتری برای جذب فلزهای سنگین و حذف این مواد از فاضلاب‌های صنعتی در مسیر ورودی آن‌ها به تالاب‌ها و رودخانه‌ها می‌توان استفاده نمود. توانایی تجمع فلزات سنگین، این گیاه را کاندید مطالعه تصفیه فاضلاب صنعتی و هرز آب‌ها کرده است. در این فرایند، گیاه آلودگی‌ها را به‌وسیله ریشه خود جمع‌آوری و به فرم کم ضرر تبدیل و یا در بافت خود ذخیره می‌کند (Sood et al. 2012).

همه گیاهان آبی و خاکی توانایی جذب و تجمع یون‌های فلزی از جمله Fe^{2+}، Mn^{2+}، Zn^{2+} و Cu^{2+} را که برای رشد و تکامل گیاهان لازم هستند، دارند. برخی از گیاهان توانایی تجمع یون‌های فلزی سمی را نیز دارند، در نتیجه می‌توان از این گیاهان برای حذف فلزات سنگین از آب و خاک استفاده کرد. گیاهان سویا، ذرت، گندم و برنج در لجن فاضلاب‌هایی که حاوی ۸۰ ppm کادمیوم است به‌ترتیب ۳۶، ۷۱، ٤١ و ۰/۳ پی پی ام کادمیوم در بافت برگ خود ذخیره می‌کنند. فلز کادمیوم (Cd) نقش بیولوژیکی شناخته شده‌ای در گیاه ندارد و در غلظت‌های بسیار کم سمی است. مطالعات انجام شده روی غلظت فلزات سنگین تجمع یافته در گیاه آزولا نشان دهنده تجمع بیشتر این فلزات در گیاه آزولا نسبت به گیاهان ذکر شده می‌باشد. غلظت تجمع یافته فلزاتی نظیر Cd، Cu، Ni و Zn در آزولا، ۵۰۰ تا ۱۰۰۰ برابر بیشتر از غلظت آن‌ها در محیط کشت گزارش شده‌است. مطالعات نشان می‌دهد که تجمع فلزات سنگین در ریشه آزولا بیشتر از اندام هوایی آن است (Sela et al. 1988).

در مطالعه‌ای *Azolla pinnata* توانست فلزات سنگین (جیوه و کادمیوم) را از دوغاب خاکستر و پساب کلر قلیایی به میزان ۷۰ تا ۹٤ درصد جذب کرده و غلظت این فلزات سنگین در دامنه بین ۳۱۰ تا ۷٤۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن خشک در بافت آزولا به‌دست آمد (۷). مطالعات دیگر نشان دادند که گونه های دیگر آزولا مانند *A. filiculoides* نیز فلزات سنگینی مانند Cd، Cr، Cu و Zn را جذب می‌کنند و محتوای آن‌ها به‌ترتیب ۱۰۰۰۰، ۱۹۹۰، ۹۰۰۰ و ٦۵۰۰ پی پی ام گزارش شد (Sela et al. 1989). محتوای کادمیوم، مس و اورانیوم در *A. filiculoides* در حضور ۱۰ ppm از این فلزات به ترتیب ٦/۰۲۱، ۵/۳٦۵ و ۵/۰۸۲ پی پی ام گزارش شد (Sela et al. 1988). مقایسه بین *A. filiculoides*، *A. microphylla* و *A. pinnata* از نظر پتانسیل گیاه پالایی فلزات Cd، Cr و Ni نشان داد که میزان جذب این عناصر در گونه‌های مختلف متفاوت است به‌طوری‌که بیشترین جذب Cd در گونه *A. microphylla* و بیشترین جذب Ni و Cr در گونه *A. pinnata* گزارش شد (Arora et al. 2004, 2006).

متالوتیونین‌ها پروتئین با وزن مولکولی کم و غنی از سیستئین و محتوی بالای فلز هستند. متالوتیونین‌ها نام خود را به‌دلیل بالا بودن محتوی فلز و گوگرد کسب کرده است که بسته به نوع فلز موجود در آن ممکن است تا ۲۰ درصد از وزن آن را شامل شود (Robinson et al. 1993; Zenk 1996). در مطالعه‌ای cDNA کد کننده ژن متالوتیونین نوع دو را از گونه *A. filiculoides* جداسازی کردند و با استفاده از روش qRT-PCR بیان این ژن را تحت تیمار Cd^{2+}، Cu^{2+}، Zn^{2+} و Ni^{2+} سنجیدند. نتایج نشان داد که سطح

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from mg.genetics.ir at 17:22 +0330 on Saturday March 7th 2020

رونوشت ژن متالوتیونین تحت تیمار فلزی افزایش قابل توجهی داشته است (Schor-Fumbarov et al. 2005).

امروزه با توجه به افزایش آلودگی‌ها به‌خصوص فلزات سنگین بشر نیازمند یک روش کم هزینه و دوست دار محیط زیست برای حذف این آلودگی‌ها جهت بهبود کیفیت آب است. آزولا یک سرخس آبی با رشد سریع و تثبیت کننده‌ی نیتروژن یک کاندید مناسب برای حذف، مصرف و بازیافت فلزات سنگین از اکوسیستم آبی می‌باشد. در این راستا در این مطالعه به بررسی میزان تجمع عناصر سنگین در دو گونه *A. pinnata* , *A. filiculoides* و نمونه جمع‌آوری شده از تالاب انزلی در شرایط گلخانه پرداخته شد. علاوه بر این بیان ژن متالوتیونین-۲ در واکنش به غلظت‌های مختلف کادمیوم و در سه زمان مختلف سنجیده شد.

مواد و روش‌ها

در مطالعه حاضر از دو گونه *Azolla pinnata* و *A. filiculoides* و یک نمونه آزولای جمع‌آوری شده از تالاب انزلی (نوع گونه این آزولا در دست بررسی است) برای اعمال تیمار کادمیوم استفاده شد. آزمایش در شرایط گلخانه با فراهم کردن دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، دمای ۲۳ تا ۲۶ درجه سلسیوس، رطوبت ۵۵ تا ۷۰ درصد و شدت نور ۶۰۰۰ تا ۸۰۰۰ لوکس انجام شد.

آزمایش در ظروف پلاستیکی حاوی ۵۰۰ میلی‌لیتر محلول غذایی IRRI2 (جدول ۱) و حدود هفت گرم بافت تازه و سالم هر نمونه آزولا انجام شد. پس از رشد کافی (یک هفته)، نمونه‌ها با صفر، ۱۰، ۵۰ و ۵۰۰ میکرومولار $CdCl_2$ و در سه تکرار تیمار شدند. پس از گذشت ۷۲ ساعت از نمونه‌های تیمار شده نمونه‌برداری شد. وزن تازه تمامی نمونه‌ها اندازه‌گیری شد.

به‌منظور تعیین محتوای فلزی در سه نمونه آزولا از آنالیز جذب اتمی استفاده شد. نمونه‌های گیاهی جمع‌آوری شده به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۶۵ درجه سلسیوس خشک شدند و وزن خشک تمامی نمونه‌ها ثبت شد. مقدار ۲۰۰ میلی‌گرم از هر بافت گیاهی خشک شده وزن و با استفاده از نیتروژن مایع به‌طور کامل پودر شد و به لوله‌های شیشه‌ای منتقل شد. در مرحله بعد به بافت‌های پودر شده پنج میلی‌لیتر نیتریک اسید غلیظ (MERK 75%) افزوده و به‌خوبی مخلوط شد؛ لوله‌های شیشه‌ای، زیر هود شیمیایی، روی هات پلیت با دمای ۹۰ درجه سلسیوس قرار گرفتند و اجازه داده شد تا نیتریک اسید غلیظ به مدت دو ساعت بجوشد. بعد از این که محلول شفاف حاصل شد، لوله‌ها سانتریفیوژ شدند و فاز رویی به‌دست آمده از کاغذ صافی عبور داده شد. سپس تمامی نمونه‌ها با آب‌مقطر به حجم ۳۰ میلی‌لیتر رسانده شدند و به‌منظور اندازه‌گیری میزان جذب کادمیوم، برای جذب اتمی ارسال شدند. اندازه‌گیری محتوای فلزی برای همه سطوح فلزی در سه تکرار به‌وسیله دستگاه اسپکترومتر جذب اتمی (Atomic Absorption Spectrometer) صورت گرفت و به‌صورت میلی‌گرم در کیلوگرم وزن خشک گزارش شد. طراحی آغازگر اختصاصی ژن متالوتیونین-۲ و ژن اکتین به‌عنوان کنترل داخلی براساس توالی‌های موجود در پایگاه FernBase (https://www.fernbase.org) و با استفاده از نرم‌افزار Oligo7 انجام شد (جدول ۲). سنتز آغازگرها توسط شرکت میکروسینت (Microsynth) سوئیس انجام گرفت. استخراج RNA از نمونه‌ها (شامل سه گونه، سه سطح کادمیوم، سه زمان و در چهار تکرار) با استفاده از کیت TaKaRa MiniBEST Universal RNA Extraction Kit (ساخت شرکت تاکارا، ژاپن) انجام شد. غلظت RNA استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ (IMPLEN مدل NP80، آلمان) تخمین زده شد و غلظت تمامی آن‌ها یکسان سازی شد. به‌منظور سنتز cDNA از کیت RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (ساخت شرکت ترموساینتیفیک، آمریکا) استفاده شد.

جدول ۱- ترکیب محلول غذایی IRRI2 در کشت آزولا

نوع ماده مغذی	نام ترکیب شیمیایی	غلظت (میکرو مولار)
درشت مغذی‌ها (Macronutrients)	$CaCl_2.2H_2O$	۴۰
	$MgSO_47H_2O$	۴۰
	K_2SO_4	۴۰
	$NaH_2PO_4.H_2O$	۲۰
ریزمغذی‌ها (Micronutrients)	$CuSO_4.5H_2O$	۰/۰۱
	H_3BO_3	۰/۲
	$Na_2MoO_4.2H_2O$	۰/۱۵
	$ZnSO_4.7H_2O$	۰/۰۱
	$CoCl_2.6H_2O$	۰/۰۱
	$MnCl_24H_2O$	۰/۵
منبع آهن	$Fe\text{- }EDTANa_2$	۰/۵

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from mg.genetics.ir at 17:22 +0330 on Saturday March 7th 2020

جدول ۲- آغازگرهای استفاده شده در واکنش qPCR

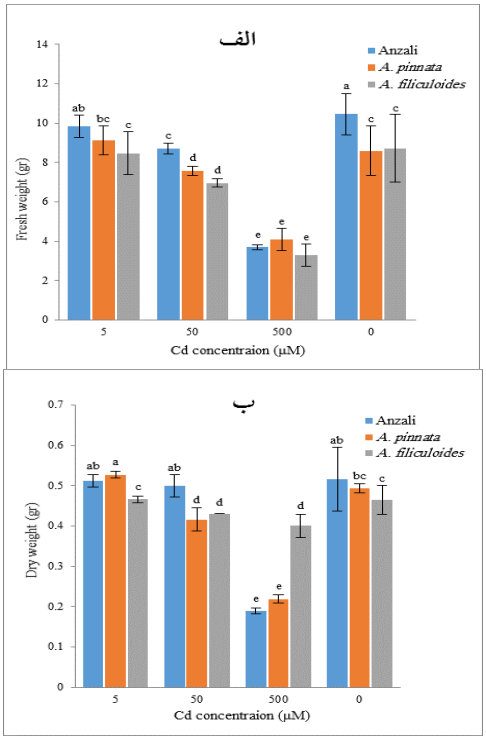
قطعه تکثیری	Tm	درصد GC	طول آغازگر	توالی آغازگر (5’ toward 3’)		ژن
۱۰۲ bp	۶۱/۷	۵۶/۵	۲۳ bp	GCAAGAGGAGCTTCGATGAGACC	F	متالوتیونین-۲ (*MT2*)
	۶۲/۹	۵۶/۵	۲۳ bp	CGCAAGAGCTATCGAACCCACAG	R	
۱۰۶ bp	۵۷/۰	۴۵/۵	۲۲ bp	TTGCTGATCGTATGAGCAAGGA	F	اکتین (*Actin*)
	۵۶/۹	۴۷/۸	۲۳ bp	GATCCTCCAATCCAGACACTGTA	R	

استخراج RNA از نمونه‌ها (شامل سه گونه، سه سطح کادمیوم، سه زمان و در چهار تکرار) با استفاده از کیت TaKaRa MiniBEST Universal RNA Extraction Kit (ساخت شرکت تاکارا، ژاپن) انجام شد. غلظت RNA استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ (IMPLEN مدل NP80، آلمان) تخمین زده شد و غلظت تمامی آن‌ها یکسان سازی شد. به‌منظور سنتز cDNA از کیت RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (ساخت شرکت ترموساینتیفیک، آمریکا) استفاده شد. پس از تعیین دمای بهینه اتصال برای جفت آغازگرهای مورد مطالعه واکنش qPCR در حجم ۱۰ میکرولیتر حاوی یک میکرولیتر از cDNA با غلظت‌های مختلف، ۳ پیکومول از هر آغازگر و مخلوط سایبر گرین انجام شد. برنامه دمایی به‌صورت ۱۵ دقیقه واسرشت اولیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه و ٤٥ چرخه شامل ۱۵، ۲۵ و ٤۰ ثانیه به‌ترتیب در دمای ۹۵، ۵۵ و ۷۲ درجه سلسیوس و در دستگاه ترموسایکلر (Applied biosystem مدل Step One 48 well) برنامه‌ریزی شد. برای ترسیم منحنی ذوب نیز از دمای ٦۰ تا ۹۵ درجه سلسیوس به مقدار ۰/۳ افزایش دما در هر ثانیه اعمال شد.

در مطالعه حاضر برای تحلیل آماری نتایج به‌دست آمده، از نرم‌افزار SPSS 16.0 و از روش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی استفاده شد. مقایسه میانگین داده‌ها نیز به روش ANOVA یک طرفه و آزمون دانکن انجام گرفت.

نتایج و بحث

به‌منظور بررسی تاثیر فلز سنگین کادمیوم روی میزان رشد نمونه‌های آزولا، وزن تر و خشک نمونه‌ها ۷۲ ساعت پس از اعمال تیمار بررسی شد و نتایج نشان داد که با افزایش میزان کادمیوم در محیط کشت میزان رشد نمونه‌های آزولا کاهش می‌یابد (شکل ۱). غلظت ۵۰۰ میکرومولار کادمیوم بیشترین تاثیر را در کاهش رشد تمامی نمونه‌های آزولا داشت. در تیمار بدون کادمیوم بیشترین وزن تر مربوط به نمونه جمع‌آوری شده از تالاب انزلی بود و در غلظت ۵ و ۵۰ میکرومولار کادمیوم نسبت به دو نمونه دیگر رشد بهتری داشت اگرچه تحت تاثیر میزان کادمیوم موجود در محیط کشت قرار گرفت. در گونه *A. filiculoides* علی‌رغم کاهش وزن تر در تیمار ۵۰۰ میکرومولار کادمیوم، وزن خشک نسبت به دو گونه دیگر افزایش داشت که حنشان دهنده میزان بیشتر بافت های مرده در این نمونه است.



شکل ۱- تغییرات وزن تر (الف) و خشک (ب) سه نمونه آزولا تحت تاثیر غلظت‌های مختلف فلز کادمیوم

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from mg.genetics.ir at 17:22 +0330 on Saturday March 7th 2020

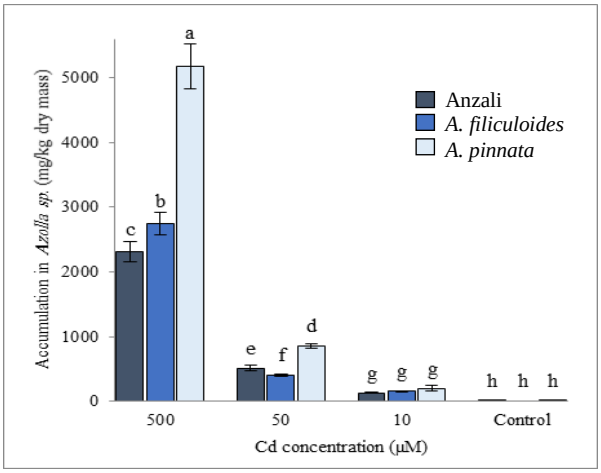
تیمار یک میلی‌گرم در لیتر کادمیوم در دو گونه *A. caroliniana* و *A. microphylla* نیز نشان داد که از نظر میزان رشد و همچنین مقدار جذب کادمیوم در بافت‌ها در دو گونه پس از یک روز اعمال تیمار، تفاوت معنی‌داری وجود دارد (Tan et al. 2011). نتایج حاصل از تیمار ۳-۰/۵ ppm کادمیوم در گونه *A. pinnata* نیز نشان داد که غلظت بیش از ۰/۵ ppm کادمیوم رشد را پس از هفت روز کاهش می دهد (Mandakini et al. 2016).

میزان جذب فلز کادمیوم در سه نمونه شامل دو گونه *A. pinnata*، *A. filiculoides* و نیز آزولای جمع‌آوری شده از تالاب انزلی پس از ۷۲ ساعت تیمار دهی، به‌وسیله دستگاه اسپکترومتر جذب اتمی اندازه‌گیری شد. اعمال تیمار کادمیوم در سطوح مختلف، در میزان جذب این فلز توسط سه نمونه مورد مطالعه بسیار معنی‌دار بود (جدول ۳).

کادمیوم یک عنصر غیر ضروری برای گیاه و با حلالیت زیاد در آب است که علاوه بر تاثیر در رشد و نمو گیاه است، به‌عنوان یک آلاینده بسیار مهم نیز شناخته شده‌است (Benavides et al. 2005). غلظت برگ بیش از ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن خشک برای گیاه نشان‌دهنده پتانسیل گیاه در تجمع این عنصر است (Baker et al. 2000). در تمام نمونه‌های آزولا در این مطالعه، انباشت کادمیوم در تمام غلظت‌های تیمار شده بیش از این مقدار بود، بنابراین می‌توان آزولا را به‌عنوان یک بیش تجمع دهنده (Hyper-accumulator) در نظر گرفت و آن را به‌عنوان یک کاندید مناسب برای کاربرد در استراتژی‌های گیاه پالایی معرفی نمود. مقایسه میانگین اعمال سطوح مختلف فلز کادمیوم در محیط کشت سه نمونه آزولای مورد مطالعه نشان داد که بالاترین میزان جذب این فلز در سطح ۵۰۰ میکرومولار مربوط به *A. pinnata* (۴۶۷۳/۸ mg Kg^{-1}) بود و پس از آن به‌ترتیب *A. filiculoides* (۲۷۴۷/۱ mg Kg^{-1}) و آزولای جمع‌آوری شده از تالاب انزلی (۲۳۰۹/۴ mg Kg^{-1}) فلز کادمیوم را از محیط کشت جذب کردند. میزان جذب فلز کادمیوم در هر سه گونه فوق در هر سه سطح مورد مطالعه، نسبت به نمونه‌های شاهد تفاوت معناداری را نشان داد (شکل ۲)، این بدین معنی است که گیاه آزولا در سطوح بسیار پایین فلز کادمیوم نیز قادر به جذب آن از محیط می‌باشد.

جدول ۳- جدول تجزیه واریانس اعمال سطوح مختلف فلز کادمیوم

منبع تغییرات	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F	سطح معنی داری
بین گروه‌ها	۳۱۹۵/۶۱۴	۱۱	۲۹۰/۵۱۰	۵۳/۰۲۷	۰/۰۰
درون گروه‌ها	۱۳۱/۴۸۴	۲۴	۵/۴۷۹		
کل	۳۳۲۷/۰۹۸	۳۵			



شکل ۲- نمودار مقایسه میانگین اعمال سطوح مختلف فلز کادمیوم

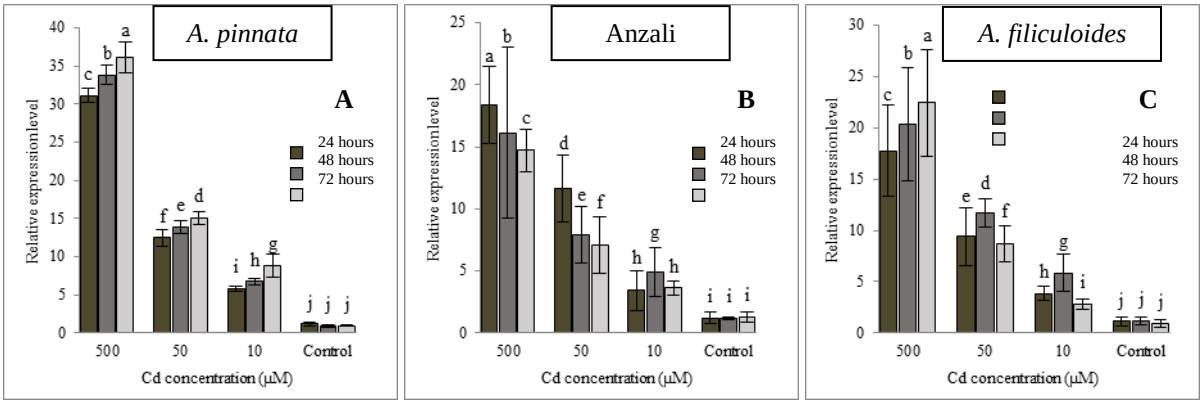
www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from mg.genetics.ir at 17:22 +0330 on Saturday March 7th 2020

در مطالعه‌ای روی *A. pinnata* مشخص شد که این گیاه فلزات سنگین جیوه و کادمیوم را از دوغاب خاکستر و پساب کلر قلیایی به‌میزان ۷۰ تا ۹٤ درصد جذب کرده و غلظت این فلزات سنگین در دامنه بین ۳۱۰ تا ۷٤۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن خشک در بافت آزولا به‌دست آمد (Rai 2008). مقایسه بین *A. filiculoides*، *A. microphylla* و *A. pinnata* از نظر پتانسیل گیاه پالایی فلز Cd هفت روز پس از اعمال تیمار نشان داد که محتوی Cd در بافت *A. microphylla* بیشترین مقدار بود و پس از آن به‌ترتیب *A. filiculoides* و *A. pinnata* قرار داشتند (Arora et al. 2004, 2006). در مطالعه حاضر میزان جذب فلز کادمیوم در سطح ۵۰۰ میکرومولار، در *A. pinnata* بیشتر از *A. filiculoides* به‌دست آمد که با نتایج مطالعات قبلی (Arora et al. 2004, 2006) مطابقت نشان نداد. گونه *A. pinnata* بومی کشور فیلیپین است و با شرایط کشور ایران به سختی تطابق پیدا می‌کند، در مقابل گونه *A. filiculoides* از نظر شرایط رشدی بسیار مشابه آزولای جمع‌آوری شده از تالاب انزلی است، همین امر موجب می‌شود تا نتایجی که در گونه *A. pinnata* به‌دست می‌آید بسته به شرایط رشدی و سن رشد گیاه متفاوت باشد. بدین صورت که در شرایط رشدی اعمال شده در مطالعه حاضر، میزان جذب بالاتری در فلز کادمیوم نسبت به *A. filiculoides* به‌دست آمد. میزان جذب فلزات سنگین در گونه‌های مختلف آزولا بستگی به نوع فلز نیز دارد. در مطالعه‌ای سه گونه *A. filiculoides*، *A. microphylla* و *A. pinnata* از نظر پتانسیل گیاه پالایی فلزات Cd، Cr و Ni مقایسه شدند. نتایج نشان داد که بیشترین مقدار جذب کادمیوم در گونه *A. microphylla* و بیشترین جذب نیکل و کروم در گونه *A. pinnata* اتفاق افتاد. در مطالعه‌ای محتوی کادمیوم، مس و اورانیوم در *A. filiculoides* در حضور ppm ۱۰ از این فلزات به‌ترتیب ٦/۰۲۱، ۵/۳٦۵ و ۵/۰۸۲ ppmگزارش شد (Sela et al. 1988). Zhang et al. (2008) تنوع زیادی در پتانسیل تجمع زیستی آرسنیک در میان ۵۰ سویه آزولا در محیط هیدروپونیک در اتاق رشد در دامنه ۲۹ تا ۳۹۷ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن خشک، گزارش کردند. در میان سویه‌های تست شده، بالاترین غلظت در *A. caroliniana* و پایین‌ترین غلظت در *A. filiculoides* گزارش شد. در مطالعه دیگری محل قرارگیری کادمیوم در بافت‌های مختلف پس از جذب در *A. filiculoides* مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد که در یک ساعت اول کادمیوم به‌سرعت در آزولا انباشته می‌شود و به تدریج تا ۷۷ ساعت افزایش می‌یابد. این تجمع با ظهور دانه‌های تیره کوچک با محتوای بالای کادمیوم، فسفات و کلسیم در سلول‌های اپیدرمال ریشه مشخص می‌شود. تجمع محتوی بالای کادمیوم در ساقه‌ها، تنها در لوپ شکمی که با محیط رشد ارتباط مستقیم داشت، مشاهده شد (Sela et al. 1990).

بیان ژن متالوتیونین در سه گونه *A. pinnata*، *A. filiculoides* و نیز آزولای جمع‌آوری شده از تالاب انزلی تحت تیماردهی سطوح مختلف کادمیوم، در سه زمان مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج بیان نسبی (Relative expression) نشان‌دهنده تاثیر معنادار اعمال تیمار کادمیوم در سطوح مختلف، در میزان بیان ژن متالوتیونین در سه گونه مورد مطالعه بود (شکل ۳).



شکل ۳– تغییرات بیان ژن متالوتیونین ۲ در واکنش به تیمارهای مختلف فلز کادمیوم در طی زمان و در سه نمونه آزولا

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from mg.genetics.ir at 17:22 +0330 on Saturday March 7th 2020

مقایسه میانگین اعمال سطوح مختلف فلز کادمیوم در محیط کشت گونه *A. pinnata* نشان داد که در هر سه سطح اعمال شده، تغییرات بیان ژن در بازه‌های زمانی ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت بعد از تیماردهی، روند افزایشی معناداری دارد. در آزولای جمع آوری شده از تالاب انزلی در غلظت‌های ۵۰۰ و ۵۰ میکرومولار تغییرات بیان ژن در طی زمان روند کاهشی معناداری نسبت به بیان در ۲٤ ساعت اول نشان داد اما در غلظت ۱۰ میکرومولار پس از افزایش بیان در ۲٤ و ٤۸ ساعت اول، با کاهش معناداری در ۷۲ ساعت همراه بود. در گونه *A. filiculoides* در غلظت ۵۰۰ میکرومولار تغییرات بیان ژن در طی زمان روند افزایشی معناداری نشان داد. در غلظت‌های ۱۰ و ۵۰ میکرومولار نیز پس از افزایش بیان ژن متالوتیونین در ۲٤ و ٤۸ ساعت اول، با کاهش معناداری در میزان بیان در ۷۲ ساعت همراه بود. تغییرات بیان ژن نسبت به نمونه کنترل در هر سه زمان مورد مطالعه، با افزایش میزان سطح فلز همسو بود (شکل ۳).

فیتوکلاتین (Phytochelatin) و متالوتیونین (Metallothionein) دو گروه عمده از پپتید و پروتئین غنی از سیستئین در گیاهان هستند که در سم زدایی فلزات سنگین نقش دارند. این ترکیبات از گروه تیول (Thiol group) خود برای کلاته کردن یون‌های فلزی استفاده می‌کنند. فیتوکلاتین، پپتید متصل شونده به فلزات سنگین است و در تجمع، سم زدایی و متابولیسم یون‌های فلزی سنگین در سلول‌های گیاهی نقش دارند. این مولکول‌ها به یون‌های فلزی متصل می‌شوند و آن‌ها را به واکوئل منتقل می‌کنند. این پپتید در گیاهان در پاسخ به فلزات سنگین تولید می‌شود. فیتوکلاتین از سه آمینو اسید گلایسین (Glycine)، سیستئین (Cysteine) و گلوتامیک اسید (Glutamic acid) تشکیل شده‌است. فیتوکلاتین محصول مستقیم بیان ژن نیست بلکه توسط آنزیم فیتوکلاتین سینتاز (Phytochelatin synthase) از گلوتاتیون (Glutathione) سنتز می‌شود. فعالیت این آنزیم به شدت تحت تاثیر یون‌های فلزی مانند کادمیوم، سرب و جیوه تنظیم می‌شود (Domenech et al. 2006). متالوتیونین‌ها پروتئین‌هایی با وزن مولکولی کم و غنی از سیستئین و محتوی بالای فلز هستند. متالوتیونین‌ها نام خود را به‌دلیل بالا بودن محتوای فلز و گوگرد کسب کرده‌اند که بسته به نوع فلز موجود در آن ممکن است تا ۲۰ درصد از وزن آن را شامل شوند (Robinson et al. 1993; Zenk 1996). در مطالعه‌ای بیان ژن متالوتیونین-۲ در *A. filiculoides* تحت تیمار مس، کادمیوم، روی و نیکل مورد ارزیابی قرار گرفت. در این مطالعه سیانوباکتر همزیست گیاه با تیمار اریترومایسین حذف شد و نتایج نشان داد که ژن متالوتیونین مورد بررسی در این آزمون، توسط ژنوم آزولا کد می‌شود. نتایج بررسی بیان ژن نشان داد که رونویسی متالوتیونین تحت تیمار فلزات سنگین افزایش می‌یابد و سطح رونوشت *AzMT2* با محتوای فلز در گیاه ارتباط دارد. تجزیه و تحلیل بیان AzMT2 نشان داد که بیان ژن تحت تیمار کادمیوم و نیکل در ٤۸ ساعت بالاترین سطح را نشان می‌دهد. بیان *AzMT2* تحت تیمار یون‌های سمی کادمیوم و نیکل نشان‌دهنده امکان حضور این ژن در مکانیسم سم زدایی است و واکنش این ژن به یون‌های روی و مس که از مواد مغذی ضروری هستند، نقش *AzMT2* در هوموتازی فلزی را نشان می‌دهد (Schor-Fumbarov et al. 2005).

ارزیابی بیان ژن فیتوکلاتین سینتاز-۱ در گیاه کلم تحت تیمار یون کادمیوم نشان داد که با افزایش غلظت این یون فلزی، بیان ژن تحت تاثیر قرار می‌گیرد. در این مطالعه هم‌زمان با تیمار کادمیوم، یون Ca^{2+} نیز اعمال شد. نتایج نشان داد که Ca^{2+} بیان ژن فیتوکلاتین سینتاز را در استرس Cd^{2+} افزایش می‌دهد که به نوبه خود تحمل گیاه و تجمع کادمیوم را افزایش می‌دهد (Zhenyan et al. 2005). در مطالعه‌ای بررسی بیان ژن فیتوکلاتین سینتاز-۱ در هیپوکوتیل‌های گیاهچه درخت نخل در معرض یون‌های کادمیوم، مس و کروم با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز کمی (qPCR) انجام گرفت. بیش بیان فیتوکلاتین سینتاز در نهال‌های این گیاه در معرض فلزات نشان داد که ژن فیتوکلاتین سینتاز و مشتقات این آنزیم عملکردی مناسب در مکانیسم‌های سم‌زدایی فلز دارند (Zayneb et al. 2017).

نتیجه‌گیری

در مجموع اعمال تیمار کادمیوم در سه نمونه شامل دو گونه *A. pinnata*، *A. filiculoides* و نیز آزولای جمع‌آوری شده از تالاب انزلی نشان داد که این گیاه پتانسیل بالایی برای جذب کادمیوم و استفاده برای مقاصد گیاه پالایی دارد. استفاده از گیاهان آبزی در محیط‌های آلوده به فلزات سنگین، نیاز به درک بهتر مکانیسم‌های

www.SID.ir

Archive of SID

مرتبط با سم زدایی فلزات در این گیاهان دارد. بیان متالوتیونین‌ها و فایتوکلاتین‌ها می‌تواند توسط محرک‌های مختلف از جمله غلظت‌های بالا از فلزات سنگین القا شود. با توجه به ظرفیت اتصال فلزی این پروتئین‌ها، احتمال می‌رود که متالوتیونین‌ها در هومئوستاز یون‌های ضروری فلزی و سم‌زدایی فلزات سنگین غیر ضروری نظیر کادمیوم نقش مهمی ایفا کنند.

سپاسگزاری

این پژوهش توسط صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور، معاونت علمی و فناوری ریاست جمهوری حمایت شده است که بدین‌وسیله تقدیر و تشکر می‌شود.

منابع

Arora A, Saxena S, Sharma DK (2006) Tolerance and phytoaccumulation of chromium by three *Azolla* species. World Journal of Microbiology and Biotechnology 22: 97-100.

Arora A, Sood A, Singh PK (2004) Hyperaccumulation of cadmium and nickel by Azolla species. Indian Journal of Plant Physiology 9: 302-304.

Baker AJM, McGrath SP, Reeves DR, Smith JAC (2000) Metal hyperaccumulator plants: a review of the ecology and physiology of a biological resource for phytoremediation of metal-polluted soils. In: Phytoremediation of Contaminated Soil and Water, Terry, N. and G. S. Banuelos (Eds.). CRC Press, Boca Raton, pp: 85-107.

Benavides MP, Gallego SM, Tomaro ML (2005) Cadmium toxicity in plants. Brazilian Journal pf Plant Physiology 17: 21-34.

Domènech J, Mir G, Huguet G, Capdevila M, Molinas M, Atrian S (2006) Plant metallothionein domains: functional insight into physiological metal binding and protein folding. Biochimie 88: 583-593.

Mandakini LLU, Bandara NJGJ, Gunawardana D (2016) A Study on the Phytoremediation Potential of *Azolla pinnata* under Laboratory Conditions. Journal of Tropical Forestry and Environment 6: 36-49.

Rai PK (2008)Technical note: Phytoremediation of Hg and Cd from industrial effluents using an aquatic free floating macrophyte *Azolla pinnata*. International Journal of Phytoremediation 10: 430-439.

Robinson NJ, Tommey AM, Kuske C, Jackson PJ (1993) Plant metallothioneins. Biochemical Journal 295: 1-10.

Salt DE, Benhamou N, Leszczyniecka M, Raskin I, Chet I (1999) A possible role for rhizobacteria in water treatment by plant roots. International Journal of Phytoremediation 1: 67-79.

Schor-Fumbarov T, Goldsbrough PB, Adam Z, Tel-Or E, (2005) Characterization and expression of a metallothionein gene in the aquatic fern *Azolla filiculoides* under heavy metal stress. Planta 223: 69-76.

Sela M, Fritz E, Huttermann A, Tel-Or E (1990) Studies on cadmium localization in the water fern *Azolla*. Physiologia Plantarum 79: 547-553.

Sela M, Garty J, Tel-Or E (1989) The accumulation and the effect of heavy metals on the water fern *Azolla filiculoides*. New Phytologist 112: 7-12.

Sela M, Tel-Or E, Fritz E, Huttermann A (1988) Localization and toxic effects of cadmium, copper, and uranium in *Azolla*. Plant Physiology 88: 30-36.

Sood A, Uniyal PL, Prasanna R, Ahluwalia AS (2012) Phytoremediation potential of aquatic macrophyte, *Azolla*. Ambio 41: 122-137.

Tan C, Shan X, Xu G, Lina YM, Chen Z (2011) Phytoaccumulation of cadmium through *Azolla* from aqueous solution. Ecological Engineering 37: 1942-1946.

Upadhyay AR, Mishra VK, Pandey SK, Tripathi BD (2007) Biofiltration of secondary treated municipal wastewater in a tropical city. Ecological Engineering 30: 9-15.

Zayneb C, Imen RH, Walid K, Grubb CD, Bassem K, Franck V, Hafedh M, Amine E (2017) The phytochelatin synthase gene in date palm (*Phoenix dactylifera* L.): Phylogeny, evolution and expression. Ecotoxicology and Environmental Safety 140: 7–17.

Zenk MH (1996) Heavy metal detoxification in higher plants-a review. Gene 179: 21-30.

Zhang X, Lin AJ, Zhao FJ, Xu GZ, Duan GL, Zhu YG (2008) Arsenic accumulation by the aquatic fern *Azolla*: comparison of arsenate uptake, speciation and efflux by *A. caroliniana* and *A. filiculoides*. Environmental Pollution 156: 1149-1155.

Zhenyan H, Jiangchuan L, Haiyan Z, Mi M (2005) Different effects of calcium and lanthanum on the expression of phytochelatin synthase gene and cadmium absorption in *Lactuca sativa*. Plant Science 168: 309-318.

Downloaded from mg.genetics.ir at 17:22 +0330 on Saturday March 7th 2020

www.SID.ir