علوم محیطی سال پنجم، شماره سوم، بهار ۱۳۸۷
ENVIRONMENTAL SCIENCES Vol.5, No.3, Spring 2008
۴۱-۵۲

بررسی تاثیر سرب بر جوانه زنی، مقدار پروتئین و پرولین و ارزش تحمل به سرب در دو رقم کلزا (*Brassica napus* L.)

علی چراتی آرائی[1*]، ملیحه خانلریان خطیری[2]

۱- مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی مازندران
۲- سازمان آموزش و پرورش مازندران

چکیده

این تحقیق به منظور بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف سرب [۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومول بر لیتر از منبع Pb(NO3)2] بر جوانه زنی وهمچنین تاثیر محلولهای غذایی بدون سرب و حاوی سرب کم، متوسط و زیاد [۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکرومول بر لیتر از منبع Pb(NO3)2] بر محتوای پروتئین و پرولین در ریشه و اندام هوایی دو رقم کلزا (Hyola401 و PF 7045.91)، میزان انباشتگی یون سرب و ارزش تحمل این دو رقم نسبت به سرب در محیط کشت به روش هیدروپونیک با استفاده از محلول غذایی هوگلند انجام گرفت. آنالیز آماری داده ها با استفاده از روش تجزیه واریانس یک طرفه ودر قالب طرح آماری بلوک های کاملا تصادفی انجام شد. نتایج بدست آمده در این پژوهش نشان داد که در رقم Hyola در غلظتهای سرب ۲۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومول بر لیتر کاهش درصد جوانه‌زنی معنی‌دار است. و در رقم PF کاهش درصد جوانه‌زنی در غلظتهای مختلف سرب معنی‌دار نیست. افزایش غلظت سرب محلول غذایی در هر دو رقم کلزا موجب کاهش طول ریشه شد و با توجه به میانگین طول ریشه، ارزش تحمل به سرب در رقم Hyola بیشتر از رقم PF تعیین گردید. مقدار پروتئین ریشه در هردو رقم با افزایش غلظت سرب محلول غذایی، افزایش معنی داری یافت. مقدار پروتئین اندام هوایی با افزایش غلظت سرب محلول غذایی، در رقم Hyola کاهش ولی در رقم PF افزایش نشان داد. درصد افزایش مقدار پروتئین در ریشه رقم PF بیشتر از رقم Hyola بود. مقدار پرولین درریشه و اندام هوایی هردو رقم با افزایش غلظت سرب محلول غذایی، افزایش یافت. درصد افزایش مقدار پرولین در ریشه و اندام هوایی رقم Hyola بیشتر از رقم PF بود. با افزایش غلظت سرب محلول غذایی، تجمع یون سرب در ریشه و اندام هوایی هر دو رقم افزایش یافت. انباشتگی سرب در ریشه و اندام هوایی رقم Hyola بیشتر ازرقمPF بود. بر اساس نتایج حاصل از این پژوهش به نظر می رسد که گیاه کلزا بویژه رقم Hyola برای آلایش زدائی خاکهای آلوده به سرب از توانائی بالقوه ای برخوردار است.

کلیدواژه‌ها: سرب، جوانه زنی، پروتئین، پرولین، ارزش تحمل، انباشتگی.

The Effects of Lead on Germination, Protein and Proline Contents and Index of Tolerance in Two Varieties of Oilseed Rape (*Brassica napus* L.)

Ali Cherati Araei,*1 Maliheh Khanlarian Khatiri2

1- Mazandaran Agricultural and Natural Resources Research Center
2- Department of Education and Culture Mazandaran Province

Abstract

This research has been conducted in order to study the effect of lead at different concentrations [0, 100, 200, 400, 600, 800, 1000 µM Pb(NO3)2] on germination and different concentrations of lead [0, 100, 200, 400 µM Pb(NO3)2] on the protein and proline contents and Pb2+accumulation in root, shoot and index of tolerance (TI) of two varieties of oilseed rape (PF 7045.91 and Hyola 401) in hydroponic culture. Samples were digested (wet digestion) using a mixture of nitric and perchloric acid which was used for the concentration of lead. The protein and proline contents were determined using a spectrophotometer (UV) model Hitachy U-2000. Statistical methods as a completely randomized block design have been used for analysis of data through a one-way analysis of variance procedure. Lead decreased seed germination in both varieties, though the reduction in Hyola 401 was greater than in PF 7045.91. Root length in both varieties decreased as the concentration of lead increased. The index of tolerance of Hyola401 was greater than that of PF 7045.91. Pb increased root protein in both varieties. The shoot protein of PF 7045.91 increased with increasing Pb while it decreased in Hyola 401. The percentage of increase for root protein in PF 7045.91 was greater than in Hyola 401. Pb increased root and shoot proline in both varieties. The percentage of increase for root and shoot proline in Hyola 401 was greater than in PF 7045.91. By increasing the lead concentration of the nutrient solution, Pb2+accumulation in root and shoot of both varieties was increased in comparison with control. Pb+2 accumulation in roots and shoots of Hyola 401 was greater than for PF 7045.91. As a result, it has been concluded that oilseed rape particularly Hyola cultivar could possibly be used for the phytoremidation of lead in polluted soils.

Keywords: lead, germination, protein, proline, index of tolerance, accumulation.

* Corresponding author. *E-mail Address*: acherati@yahoo.com

مقدمه

سرب، به‌عنوان خطرناکترین فلز سنگین آلایندهٔ محیط زیست بیشتر از طریق صنایع ساخت باطری‌های سربی، افزودنی‌های رنگ و بنزین، حشره‌کش‌ها، کودهای شیمیائی، اگزوز اتومبیل و لحیم‌کاری وارد محیط زیست می‌گردد(ایک و همکاران، ۱۹۹۹). آلودگی سرب در خاک موجب کاهش درصد جوانه‌زنی گشته و اثرات مضری بر رشد و متابولیسم گیاه بر جای می‌گذارد (کوپیرا و گزدز، ۲۰۰۳). سمیت سرب همچنین در گیاهان موجب جلوگیری از طویل‌شدن ریشه می گردد (لوان ، ۱۹۴۵). گیاهان معمولاً توانایی انباشتگی مقادیر بالایی از سرب را دارا بوده و بواسطه توانایی انباشتگی سرب و سایر فلزات سنگین در بافتشان، در فن گیاه پالائی[1] از گیاهان استفاده می شود (پیچالاک و همکاران، ۲۰۰۲). امروزه دانشمندان تلاش می‌کنند تا گیاهان بیش‌انباشت‌کننده‌ای[2] برای گیاه پالائی انتخاب شوند که شرایط زیررا دارا باشند (فردریک، ۱۹۹۹):

- توانایی لازم جهت تجمع زیاد فلز در غلظتهای کم محیط کشت
- سطح تجمع کل فلزات گیاه بالا باشد
- قدرت تجمع چند فلز را با هم داشته باشد
- سرعت رشد و تولید زیست توده گیاه زیاد باشد
- در برابر بیماریها و آفت‌کشها مقاوم باشد

با توجه به موارد فوق محققان مختلف گیاهان تیره خردل (*Brassicaceae*) و از آن خانواده نیز سرده‌های *Brassica, Alyssum ,Thlaspi* را بعنوان بهترین انباشت‌کننده‌ها معرفی کرده اند(ساتاک و میدو، ۱۹۹۷).

گیاهان برای کاهش سمیت سرب از مکانیسمهای مختلفی بهره می گیرند که مهمترین آنها شامل تولید عوامل و پروتئینهای باند شونده به فلزات سنگین (متالوتیونئین[3] و گلوتاتیون[4])، اجازه ورود ندادن فلزات سنگین به سلول‌ها به‌وسیله انتخاب انتقال یون فلز و دفع یا ذخیره کردن فلز در واکوئل است (هو و همکاران، ۲۰۰۱). یکی از مکانیسم‌های مهم سمیت زدایی فلزات سنگین سمی در اکثر گیاهان و جلبک‌ها تولید پرولین است. تجمع پرولین در گیاهانی که در معرض تنش فلزات سنگین می‌باشند، موجب کاهش آسیب به غشاء و پروتئین‌ها می گردد (ورما، ۱۹۹۹). بنابراین با توجه به نقش و اهمیت گیاهان خانواده براسیکاسه در آلایش زدائی سرب در خاک و توسعه کشت دانه های روغنی از جمله کلزا در کشور، دراین پژوهش اثر سرب بر جوانه زنی، مقدار پروتئین و پرولین، ارزش تحمل به سرب و میزان انباشتگی یون سرب در دو رقم کلزا (*PF 7045.91* و *Hyola 401*) مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

آزمایش جوانه‌زنی

ابتدا محلول نیترات سرب [$Pb(NO_3)_2$] با غلظت‌های ۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومول بر لیتر تهیه شد و پلیت به مقدار کافی با آب مقطر شستشو داده و به مدت ۲ ساعت درانکوباتور در دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد (جهت میکروب‌زدایی) قرار داده شد. در سطح هر پلیت کاغذ صافی گذاشته و ۵۰ عدد بذر کلزا (بذرها از شرکت کشت و توسعه دانه‌های روغنی در سال ۱۳۸۵ تهیه شدند) روی کاغذ صافی قرار داده شد و مجددا بذرها بوسیله کاغذ صافی دیگر پوشانده شد. سپس ۵ میلی‌لیتر از محلول تیمار های فوق در چهار تکرار بداخل پلیت ها اضافه، و درب پلیت‌ها را بسته و داخل ژرمیناتور در دمای مطلوب جوانه‌زنی (۲۵ درجه سانتی گراد) قرار داده شد. شمارش تعداد بذور جوانه‌زده براساس ظهور ریشه چه به طول حداقل ۲ میلی‌متر در کلیه تیمارها از روز دوم آغاز و تا روز نهم ادامه پیدا کرد.

آزمایش گلخانه‌ای و کشت به روش هیدروپونیک:

بذرهای دو رقم کلزا، در عمق ۱/۵ سانتی‌متری در دو ظرف حاوی ماسه شسته کشت داده شد. بدین منظور ماسه را ابتدا با اسیدکلریدریک ۳ درصد به مدت حداقل ۲۴ ساعت شسته و سپس به دفعات با آب معمولی و در نهایت با آب مقطر شستشو داده شد. بذرها در دمای حدود ۲۵ درجه سانتی‌گراد جوانه زدند. پس از خارج‌شدن لپه‌ها و پدیدارشدن اولین برگ که حدود ۷ روز به‌طول انجامید، دانه رستها با آب مقطر ومحلول غذایی هوگلند (لیو و همکاران، ۲۰۰۰) تغذیه شدند. دانه رستهای یکنواخت انتخاب و به ظروف پلاستیکی محتوی 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 پنج بار در روز و هر بار به مدت نیم ساعت انجام گرفت. پس از گذشت شش روز محلول غذایی تجدید شد، به‌نحوی که محلول غذایی هوگلند با غلظت‌های مختلف سرب [۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکرومول بر لیتر از منبع نیترات سرب $Pb(NO_3)_2$] تهیه شد و به ظروف پلاستیکی اضافه گردید. آب تعرق شده توسط گیاه به صورت روزانه با آب مقطر جبران گردید. پس از گذشت ده روز برداشت انجام شد و سپس نمونه‌ها به آزمایشگاه منتقل و مطابق روش ذیل ارزش تحمل به سرب در دو رقم کلزا تعیین و مقدار پروتئین ، پرولین و سرب در ریشه و اندام هوایی کلزا اندازه‌گیری و داده‌ها تجزیه آماری شده‌اند.

۱) ارزش تحمل

ارزش تحمل (TI) مطابق فرمول ذیل محاسبه گردید (ولکینز، ۱۹۵۷):

$$TI = \frac{\text{میانگین طول ریشه در تیمار(محلول آزمایش)}}{\text{میانگین طول ریشه در شاهد}} \times 100$$

۲) اندازه‌گیری مقدار پروتئین

نمونه‌های خشک گیاهی ابتدا (۱ -۰/۵ گرم) در ۵ میلی‌لیتر بافر تریس-اسید کلریدریک ساییده و سپس نمونه‌ها با دور بالا سانتریفوژ شدند. ۰/۰۵ میلی‌لیتر از محلول رویی نمونه سانتریفوژ شده را برداشته و به آن یک میلی‌لیتر معرف (۰/۵ میلی‌لیتر تارتارات سدیم ۲ درصد + ۰/۵ میلی‌لیتر سولفات مس ۱ درصد + ۱۰ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۱۰ درصد محلول در هیدروکسید سدیم ۰/۵ نرمال) اضافه کرده و در حرارت آزمایشگاه به مدّت ۱۵ دقیقه قرار داده شد و سپس سه میلی‌لیتر معرف فولین ۰/۲ نرمال به محلول بالا اضافه شد. محلول حاصل به مدّت ۱۵ دقیقه در بن ماری در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد قرارگرفت و سپس میزان جذب توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (U.V) مدل ۲۰۰۰ هیتاچی در طول موج ۶۲۵ نانومتر قرائت و با استفاده از فرمول ذیل، مقدار پروتئین محاسبه گردید (لوری و همکاران، ۱۹۵۱).

$$M = \frac{C \times 0.005}{W}$$

M = مقدار پروتئین در هر گرم ماده خشک گیاهی

W = وزن خشک نمونه

C = غلظت

۳) اندازه‌گیری مقدار پرولین

نمونه‌های خشک گیاهی توزین شده (یک گرم) را در ۱۰ میلی‌لیتر محلول ۳ درصد اسید سولفوسالیسیلیک ساییده و سپس نمونه‌ها صاف گردید. آن‌گاه ۲ میلی‌لیتر معرف نین هیدرین و ۲ میلی‌لیتر اسید استیک خالص به نمونه‌ها افزوده شد و لوله‌ها در بن ماری با دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدّت یک ساعت قرار داده شد،

سپس لوله‌ها در حمام یخ به مدت نیم ساعت قرار گرفتند. به هر لوله آزمایش ۴ میلی‌لیتر تولوئن افزوده و آنها را خوب تکان داده و میزان جذب لایه رنگی فوقانی (حاوی تولوئن و پرولین) با دستگاه اسپکتروفتومتر (U.V) مدل ۲۰۰۰ هیتاچی در طول موج ۵۲۰ نانومتر قرائت گردید (بیتس و همکاران، ۱۹۷۳).

٤) اندازه گیری مقدار سرب

در این مرحله نمونه‌های خشک (۳ - ۱ گرم) با استفاده از روش هضم تر (مخلوط اسید نیتریک و اسید پرکلریک) به نسبت ۹:۱، مورد تجزیه شیمیایی قرار گرفته و سپس غلظت سرب در نمونه‌های هضم شدهٔ ریشه و اندام هوایی توسط دستگاه جذب اتمی مدل شیماتزو 6300 قرائت گردید. دراین تحقیق کلیه مواد شیمیایی مورد استفاده مرک آلمان بوده است.

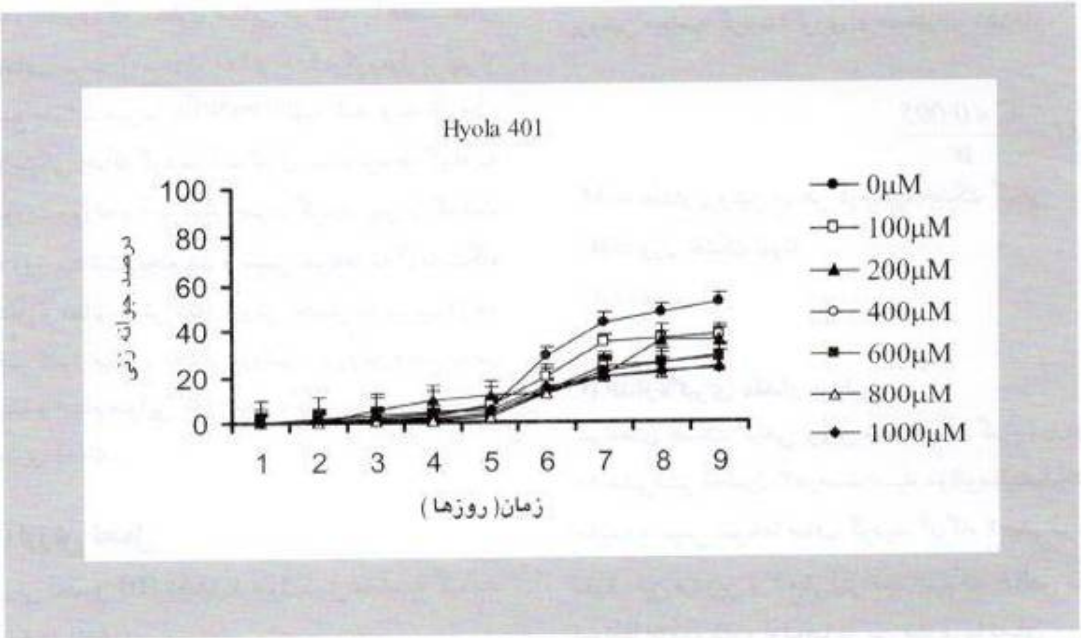
٥) آنالیز داده‌ها

با استفاده از روش تجزیه واریانس یک طرفه و آزمون F، کلیه داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS در سطح احتمال پنج درصد در قالب طرح آماری بلوک‌های کامل تصادفی و چهار تکرار تجزیه آماری شده، میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن مقایسه آماری شده و نمودارها با استفاده از برنامه Excel ترسیم شدند.

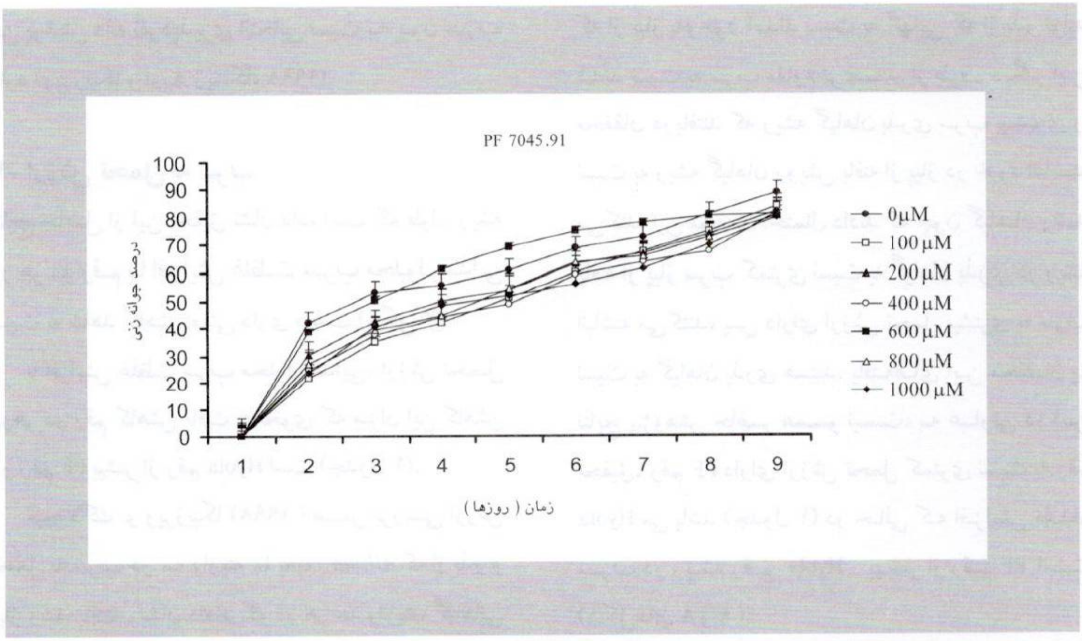
نتایج و بحث

۱- اثر سرب بر جوانه‌زنی

در این تحقیق نتایج حاصل از مقایسه درصد جوانه زنی دو رقم Hyola و PF در تیمار شاهد نشان داده است که حداکثر درصد جوانه‌زنی بعد از نه روز در هر دو رقم رخ داد (به ترتیب ۵۳ و ۸۸ درصد) و ۵۰ درصد جوانه‌زنی در رقم Hyola در روز ششم و در رقم PF در روز دوم دیده شد. بنابراین رقم PF توانایی بیشتری بر جوانه زنی دارد (شکل‌های ۱ و ۲). این نتیجه با یافته‌های مقیسه (۱۳۸۱) بر جوانه‌زنی دو رقم کلزا(Hyola 401 و PF 7045.91) همخوانی دارد.



شکل ۱- درصد جوانه زنی کلزا رقم $Hyola_{401}$ درغلظتهای مختلف سرب
(خطوط منحنی و شاخص‌ها به ترتیب بیانگر میانگین وخطای معیار هستند).



شکل ۲- درصد جوانه زنی کلزا رقم $PF_{7045.91}$ در غلظتهای مختلف سرب
(خطوط منحنی و شاخص‌ها به ترتیب بیانگر میانگین وخطای معیار هستند).

بررسی اثر سرب بر جوانه‌زنی نشان داد که غلظت‌های سرب شامل ۲۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومول بر لیتر موجب کاهش جوانه زنی در هر دو رقم کلزا گردید که این کاهش در رقم Hyola معنی‌دار است ولی در رقم PF معنی‌دار نیست. (شکل‌های ۱ و ۲).

از سوی دیگر نتایج این تحقیق نشان داد که درصد جوانه‌زنی رقم PF در غلظت های مختلف سرب بیشتر از رقم Hyola است، بنابراین توانایی جوانه زنی در غلظت‌های مختلف سرب در رقم PF بیشتر از رقم Hyola است. این نتیجه با یافته‌های بیگالیو و همکاران (۲۰۰۳) بر جوانه‌زنی هفت زیر گونه Amaranthus تحت غلظتهای متفاوت فلزات سنگین نظیر Hg, Ni , Cd , Cu و Zn همخوانی دارد. این محققان اظهار داشتند، از هفت زیرگونه Amaranthus تنها چهار زیر گونه شامل *A.paniculatus* , *A.tricolor*, *A.hypocondriacus* و هیبرید K-343 قادر به جوانه‌زنی و رشد در غلظت‌های بالایی از فلزات سنگین می‌باشند. همچنین رشد دانه رستهای *A.paniculatus* و *A.tricolor* نسبت به فلزات سنگین بردبارتر از *A.hypocondriacus* وهیبرید K-343 می‌باشند. کاهش بیشتر جوانه زنی در Hyola در مقایسه با PF ممکن است ناشی از تفاوت‌های ژنتیکی ویا تفاوت در کیفیت بذر دو رقم استفاده شده در این آزمایش باشد. جوانه‌زنی بذر و رشد دانه رستها از مراحل مهم نمو گیاهی محسوب می‌شوند. غلظت‌های بالای سرب موجب کاهش درصد جوانه‌زنی می گردد (کوپیرا و گزدز، ۲۰۰۳). وجود سرب در محیط رشد گیاه، جوانه‌زنی دانه را بواسطه کاهش جذب آب توسط دانه تحت تأثیر قرار نمی‌دهد چرا که پوشش دانه در مرحله اول جذب آب، زمانی که جذب آب نسبتاً شدید است نسبت به سرب نفوذناپذیر بوده ولی در مراحل پایانی جذب آب توسط دانه، وقتی که جذب آب کاهش می‌یابد، پوشش دانه به سرب نفوذپذیرتر می‌شود (ویرزبیکا و اوبید زیسکا، ۱۹۹۸). سربی که در مرحله پایانی جذب آب توسط دانه به داخل جنین نفوذ می کند، جوانه‌زنی را به تأخیر می‌اندازد. بنابر

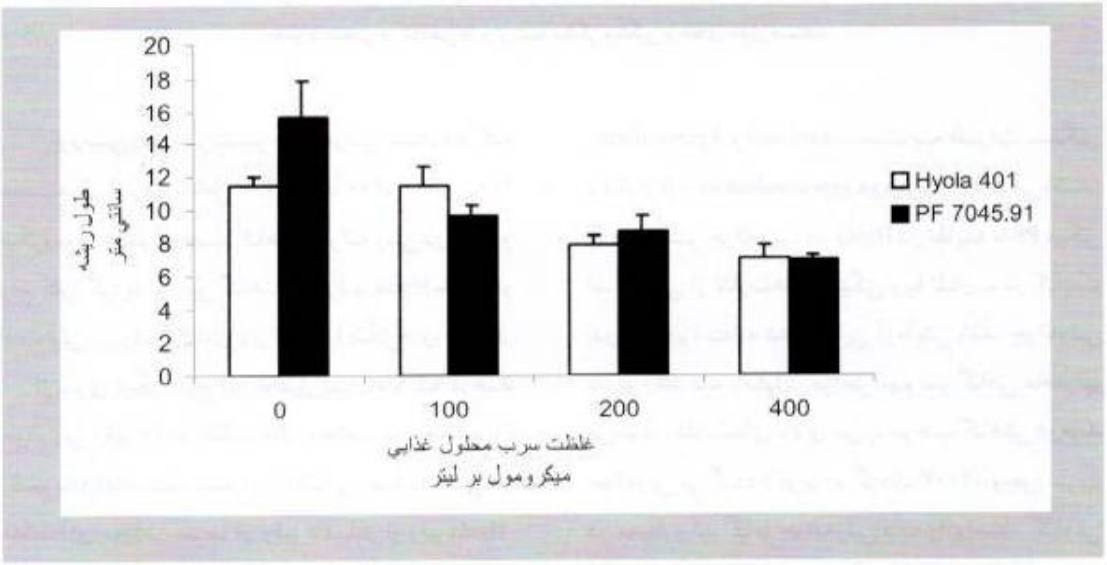
این پوشش دانه نفوذپذیری انتخابی نسبت به یون سرب دارد (ویرزبیکا و اوبید زیسکا، ۱۹۹۸).

۲- ارزش تحمل به سرب

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داده است که طول ریشه در هر دو رقم با افزایش غلظت سرب محلول غذایی نسبت به شاهد کاهش معنی داری داشت (شکل ۳).

با افزایش غلظت سرب محلول غذایی، ارزش تحمل درهر دو رقم کاهش یافت به نحوی که میزان این کاهش در رقم PF بیشتر از رقم Hyola است (جدول ۱).

میچالاک و ویرزبیکا (۱۹۹۸) ضمن بررسی ارزش تحمل به سرب در سه واریته *Allium cepa* L. که از بذر و پیاز رشد یافتند، نشان دادند که در هر سه واریته، گیاهانی که از پیاز به‌وجود آمدند نسبت به آنهایی که از بذر تولید شدند نسبت به سرب مقاوم تر هستند. از طرف دیگر این محققان دریافتند که ریشه گیاهان بذری سرب بیشتری را نسبت به ریشه گیاهان رویش یافته از پیاز در خود انباشته می‌کند. این محققان احتمال دادند که چون گیاهان رشد یافته از پیاز سرب کمتری نسبت به گیاهان بذری در ریشه انباشته می‌کنند، پس دارای ارزش تحمل بیشتری به سرب نسبت به گیاهان بذری هستند. یافته‌های این محققان با نتایج پژوهش حاضر همسو نیست، به عبارتی در این تحقیق، رقم PF دارای ارزش تحمل کمتری نسبت به رقم Hyola می باشد (جدول ۱) در حالی که افزایش مقدار سرب در ریشه رقم Hyola بیشتر از رقم PF است (شکل‌های ۸ و ۹).



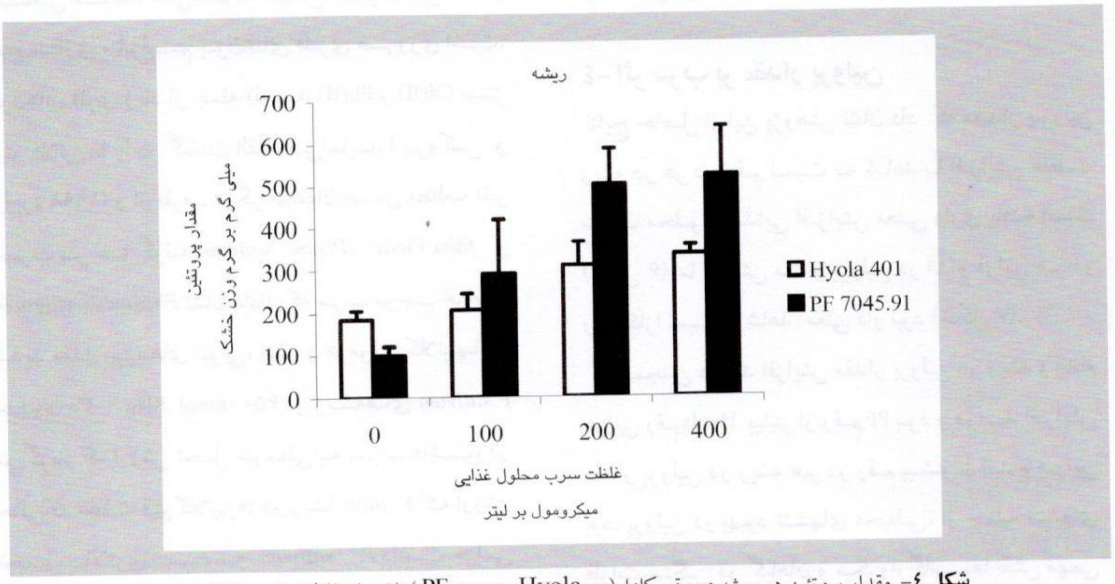
شکل ۳- طول ریشه دورقم کلزا ($Hyola_{401}$ و $PF_{7045.91}$) ناشی از غلظت‌های مختلف سرب
(خطوط متحنی و شاخص‌ها به ترتیب بیانگر میانگین وخطای معیار هستند).

جدول ۱- ارزش تحمل به سرب (درصد میانگین طول ریشه در تیمار به میانگین طول ریشه درشاهد است) در دو رقم کلزا ($Hyola_{401}$ و $PF_{7045.91}$) هر عدد برابر میانگین ± انحراف معیار است.

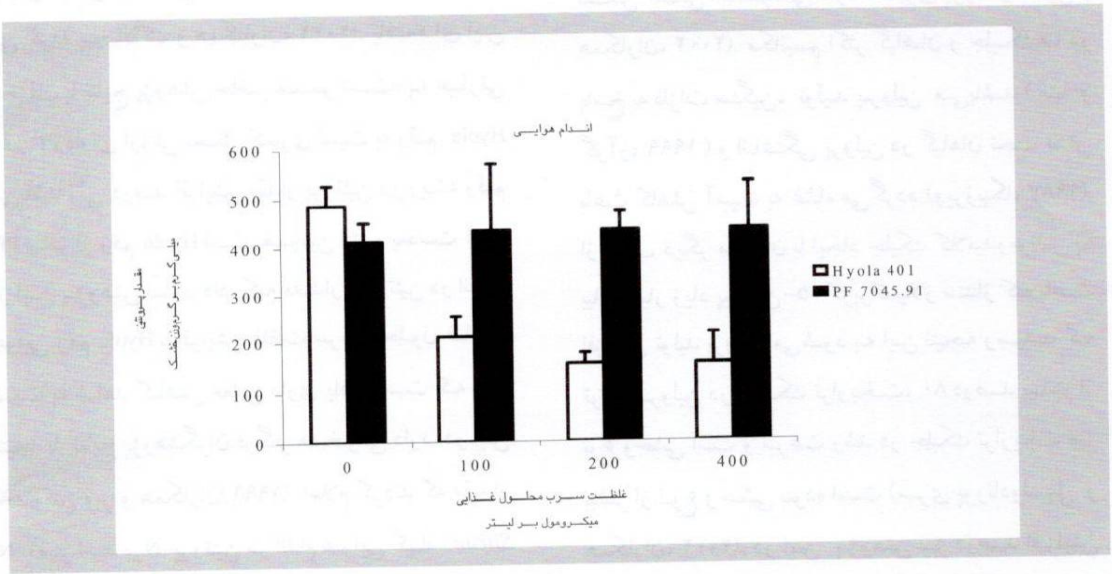
PF7045.91	Hyola401	غلظت سرب محلول غذایی	(میکرومول بر لیتر)
(درصد)			
۶۱/۷±۶ A	۱۰۰± ۱۸ a	۱۰۰	
۵۵/۹±۱۱ AB	۶۸/۵±۱۰b	۲۰۰	
۴۴/۷±۳B	۶۱/۸±۱۴ b	۴۰۰	

۳- اثر سرب بر مقدار پروتئین

با افزایش غلظت سرب محلول غذایی، مقدار پروتئین ریشه در هر دو رقم کلزا نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری یافت (شکل ۴) ولی مقدار پروتئین در اندام هوایی رقم Hyola در همهٔ تیمارهای سرب نسبت به شاهد کاهش معنی داری داشت. از طرف دیگر هر چند افزایش مقدار پروتئین در اندام هوایی رقم PF با افزایش غلظت سرب محلول غذایی مشاهده می شد ولی این افزایش از نظر آماری نسبت به شاهد معنی دار نبود (شکل ۵).



شکل ٤- مقدار پروتئین در ریشه دو رقم کلزا ($Hyola_{401}$ و $PF_{7045.91}$) ناشی از غلظت‌های مختلف سرب (خطوط منحنی و شاخص ها به ترتیب بیانگر میانگین وخطای معیار هستند).



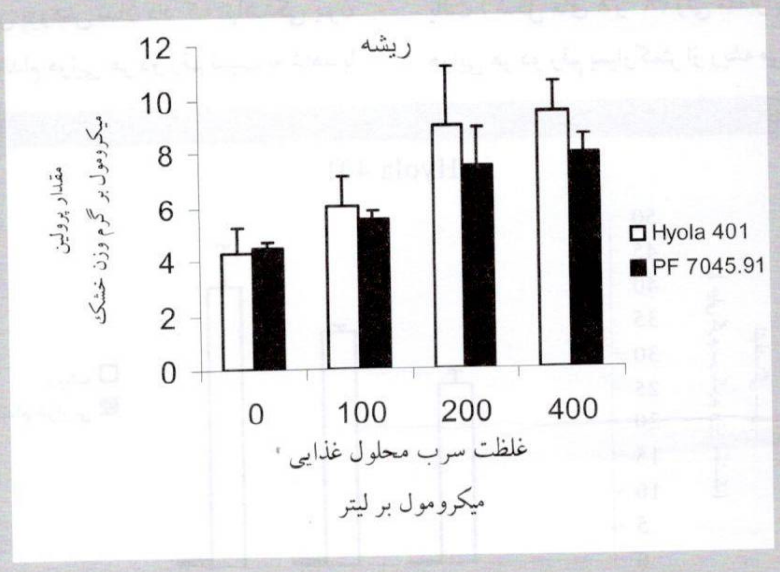
شکل۵- مقدار پرو تئین در اندام هوایی دو رقم کلزا ($Hyola_{401}$ و $PF_{7045.91}$) ناشی از غلظت‌های مختلف سرب (خطوط منحنی و شاخص‌ها به ترتیب بیانگر میانگین وخطای معیار هستند).

با مقایسه میانگین ها مشخص گردید که درصد افزایش مقدار پروتئین در ریشه رقم PF بیشتر از رقم Hyola بود. فیتوکلاتینها[5] (PC_n) [پپتیدهای مشتق از گلوتاتیون با ساختار عمومی $(\gamma - Glu - Cys)_n Gly$] از ۱۱-۲ واحد می‌باشند و در گیاهان در زمان قرارگرفتن در معرض تنش فلزات سنگین ساخته می‌شوند. نقش فیتوکلاتین‌ها در هموستازی متابولیسم یون‌های فلزی ضروری است. یون‌های فلزی زیاد از جمله Cu(II)، Pb(II) و Cd(II) سنتز فیتوکلاتین‌ها را در گیاهان القاء می‌نمایند (بروکس و روبر، ۱۹۹۸) و از طرف دیگر محققان ضمن مطالعه اثر سرب بر سه گونه *Pisum sativum*، *Vicia faba* و *Phaseolus vulgaris* نشان دادند که سرب موجب افزایش شدید مقدار پپتیدهای تیولی، فیتو و هوموفیتوکلاتینها در حدود SHg^{-1} Fw ۴۵۰۰nmol در ریشه‌های *P.sativum* می‌گردد که ارزش تحمل متوسطی به سرب داشت، در حالی‌که غلظت فیتوکلاتین‌ها در ریشهٔ *V. faba* که ارزش تحمل بالاتری نسبت به *P. sativum* داشت خیلی پایین‌تر بوده است. همچنین *P. vulgaris* دارای پایین‌ترین ارزش تحمل بوده ولی مقدار متوسط فیتوکلاتین را تولید می کرد(پیچالاک و همکاران، ۲۰۰۲). یافته‌های این محققان با نتایج پژوهش حاضر همسو است، به عبارتی رقم PF دارای ارزش تحمل کمتری نسبت به رقم Hyola می‌باشد ولی درصد افزایش مقدار پروتئین در ریشه رقم PF بیشتر از رقم Hyola است. همچنین نتایج به‌دست آمده از این پژوهش نشان داد که مقدار پروتئین در اندام هوایی رقم Hyola با افزایش غلظت سرب محلول غذایی نسبت به شاهد کاهش معنی داری یافته است که این نتیجه با نتایج پژوهشگران دیگر همخوانی دارد. در این خصوص وبر و همکاران(۱۹۹۱) اعلام کردند که مقدار N-آمینو اسید و N-پروتئین در اندام هوایی گیاه *Silene vulgaris* در مقایسه با ریشه همین گیاه با افزایش غلظت مس، کاهش یافته است. به عبارت دیگر مس اثر منفی بر متابولیسم N – آمینواسیدها و پروتئین‌های اندام هوایی گیاه داشت. سرب با اسیدهای نوکلئیک باند شده و بدین ترتیب سبب تجمع و تراکم کروماتین و تثبیت مارپیچ مضاعف DNA و به‌دنبال آن مانع از فرآیند رونویسی و ترجمه می گردد (واله و اولمار، ۱۹۷۲).

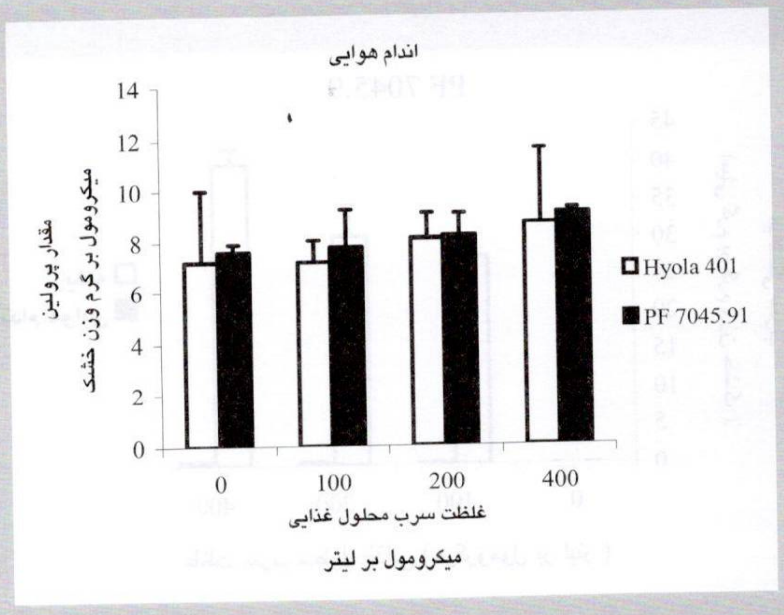
٤- اثر سرب بر مقدار پرولین

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که مقدار پرولین ریشه در هر دو رقم نسبت به شاهد با افزایش غلظت سرب محلول غذایی افزایش معنی داری یافته است (شکل ۶) اما افزایش مقدار پرولین در اندام هوایی هر دو رقم کلزا نسبت به شاهد معنی دار نبود (شکل ۷).

همچنین درصد افزایش مقدار پرولین در ریشه و اندام هوایی رقمHyola بیشتر از رقمPF بود و درصد افزایش مقدار پرولین در ریشه هر دو رقم بیشتر از اندام هوایی بود. پرولین در بهبود تنشهای محیطی، از جمله تنشهای فلزات سنگین در گیاهان و میکروارگانیسم‌ها نقش مهمی ایفاء می‌کند. پرولین احتمالاً در سلول‌های تحت تنش، نقش آنتی اکسیدانی دارد (سری پورنادولسیل و همکاران، ۲۰۰۲). مکانیسم اکثر گیاهان و جلبک‌ها در پاسخ به فلزات سنگین، تولید پرولین می‌باشد (متا و گوآر، ۱۹۹۹) و انباشتگی پرولین در گیاهان تحت تنش باعث کاهش آسیب به غشاء می‌گردد (ویرزبیکا، ۱۹۸۷). از طرف دیگر محققان با ایجاد جلبک کلامیدوموناس با بیان بسیار زیاد پیرولین-۵- کربوکسیلاز سنتتاز که باعث افزایش تولید پرولین می‌شود به این نتیجه رسیدند که تولید پرولین در جلبک تراریخت، ۸۰ درصد بیشتر از نوع وحشی است و سرعت رشد در جلبک تراریخت نیز بیشتر از نوع وحشی بوده است (سری پورنادولسیل و همکاران، ۲۰۰۲). در این پژوهش نیز درصد افزایش مقدار پرولین در رقم Hyola بیشتر از رقم PF بود.



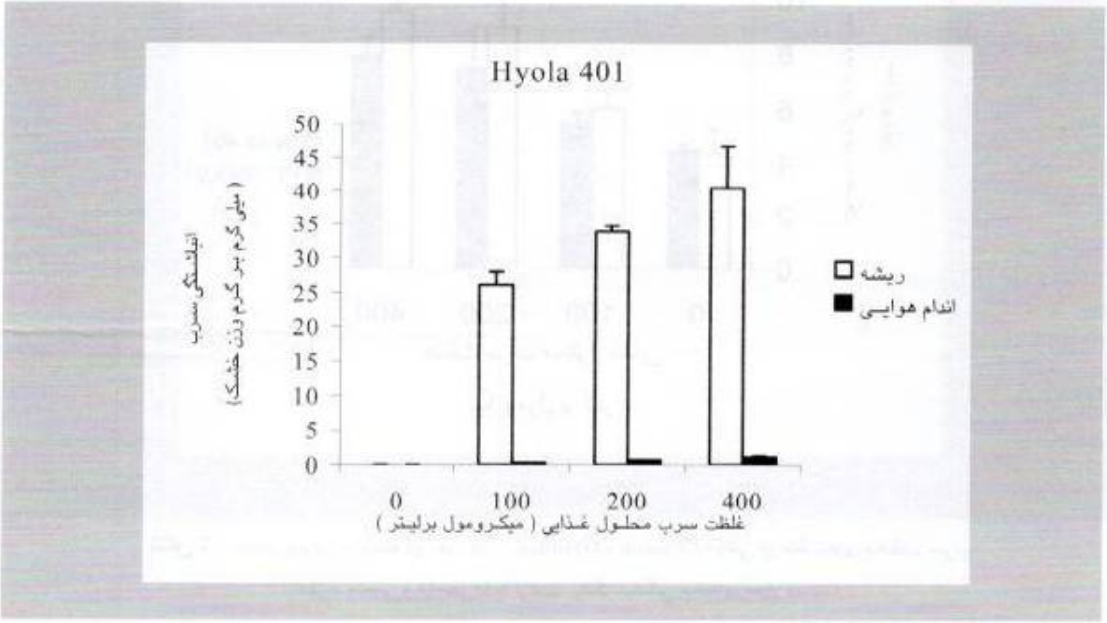
شکل ٦- مقدار پرولین در ریشه دو رقم کلزا ($Hyola_{401}$ و $PF_{7045.91}$) ناشی از غلظت‌های مختلف سرب (خطوط منحنی و شاخص‌ها به ترتیب بیانگر میانگین وخطای معیار هستند).



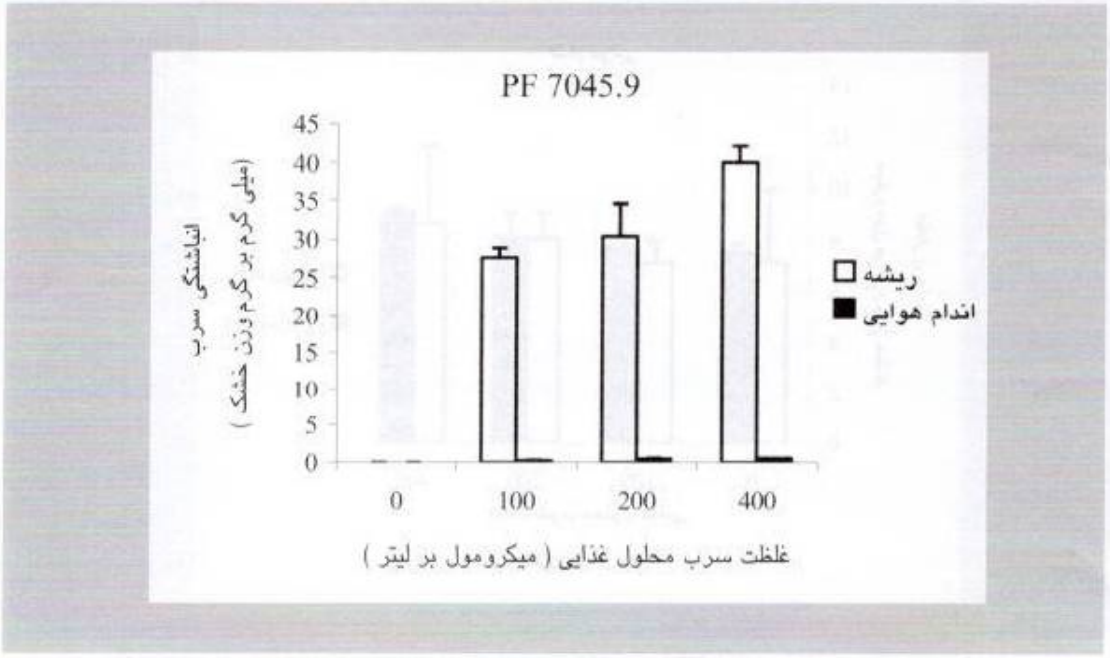
شکل ۷- مقدار پرولین در اندام هوایی دو رقم کلزا ($Hyola_{401}$ و $PF_{7045.91}$) ناشی از غلظت‌های مختلف سرب (خطوط منحنی و شاخص‌ها به ترتیب بیانگر میانگین وخطای معیار هستند).

۵- انباشتگی یون سرب

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که انباشتگی یون سرب در ریشه و اندام هوایی هر دو رقم نسبت به شاهد با افزایش غلظت سرب محلول غذایی افزایش معنی‌داری یافت (شکل های ۸ و ۹) ولی مقدار یون سرب در اندام هوایی هر دو رقم بسیار کمتر از ریشه می‌باشد.



شکل ۸- مقدار انباشتگی سرب در ریشه واندام هوایی کلزا رقم ($Hyola_{401}$) ناشی از غلظتهای مختلف سرب (خطوط منحنی و شاخص ها به ترتیب بیانگر میانگین وخطای معیار هستند).



شکل ۹- مقدار انبا شتگی سرب در ریشه واندام هوایی کلزا رقم ($PF_{7045.91}$) ناشی از غلظتهای مختلف سرب (خطوط منحنی و شاخص ها به ترتیب بیانگر میانگین وخطای معیار هستند).

بطور کلی درصد افزایش مقدار یون سرب در ریشه و اندام هوایی رقم Hyola بیشتر از رقمPF بود. ملکا و همکاران (۲۰۰۱) بیان کردند که گیاه نخود مقدار زیادی سرب را در ریشه انباشته می‌کند. بورزینسکی (۱۹۸۷) بیان کرد که گیاه نخود ۷۵ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک، سرب را در ریشه‌ها انباشته می‌کند و بردباری بالایی نسبت به سرب دارد. گیاه *Brassica juncea* حدود ۱۰۰ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک، سرب را در ریشه و ۱۰ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک، سرب را در اندام هوایی انباشته می‌کند. به عبارتی ریشه ۱۰ بار بیشتر از اندام هوایی سرب را انباشته می‌کند (کومار، ۱۹۹۵).

چانتاچون و همکاران(۲۰۰۲) اثر سرب با غلظت‌های ۵، ۷، ۹ و ۱۱ گرم بر لیتر را بر دو گونه علف خس‌خس (*Vetiveria zizanioides* و *Vetiveria nemoralis*) مورد بررسی قراردادند و ملاحظه نمودند که در غلظت‌های بالای سرب (۷، ۹ و ۱۱ گرم بر لیتر)، گونه بردبار *V. zizanioides* مقدار سرب بیشتری را نسبت به گونه حساس *V. nemoralis* در ریشه انباشته می‌کند. در حالی‌که در غلظت پایین‌تر سرب (۵ گرم بر لیتر)، گونه حساس مقدار سرب بیشتری نسبت به گونه مقاوم در ریشه انباشته می‌کند. به عبارتی گونه *V. zizanioides* نسبت به گونه *V. nemoralis* بردباری بیشتری در برابر سرب نشان می‌دهد و انباشت کننده بهتری نسبت به سرب می‌باشد.

نتیجه گیری

با توجه به نتایج بدست آمده، توانایی جوانه زنی در غلظت‌های مختلف سرب در رقم PF بیشتر از رقم Hyolaست. پایین تر بودن توانایی جوانه زنی در رقم Hyola در غلظت‌های مختلف سرب شاید به‌دلیل تفاوت‌های ژنتیکی و یا پایین تر بودن vigour بذر Hyola در مقایسه با رقم PF باشد. در مرحله رویشی رقم Hyolaنسبت به سرب بردبارتر از رقم PF می باشد. براساس نتایج حاصل از این پژوهش به نظر می‌رسد که گیاه کلزا به‌ویژه رقم Hyola برای آلایش زدایی خاک‌های آلوده به سرب از توانائی بالقوه‌ای برخوردار بوده و با کشت این محصول در خاک‌های آلوده می‌توان از ظرفیت‌های این محصول حداکثر استفاده را به‌عمل آورد. ارقامی که در هر ستون دارای حروف مشترک هستند (حروف کوچک برای رقم Hyola و حروف بزرگ برای رقم PF) طبق آزمون دانکن در سطح پنج درصد تفاوت معنی داری ندارند.

پی‌نوشت‌ها

1- Phytoremediation
2- Hyperaccumulator
3- Metallothionein
4- Glutathione
5- Phytochelatins

منابع

Bates, L.S., R.P. Waldern, and I.D. Treare. (1973). Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil*., 39:205-207.

Bigaliev, A.B., K.K., Boguspaev, E.T. Znanburshin. (2003). Phytoremediation potential of *Amaranthus sp.* for heavy metals contaminated soil of oil producing territory. Kazakh National University, Almaty, Kazakstan. *10th Annual International Petroleum Environmental Conference.*

Brooks,R., and B.Rober.(1998). *Plants that hyperaccumulate heavy metals (Their role in phytoremediation, microbiology, archaeology, mineral exploration and phytomining).* printed and bound by the University Press, New York. 392p.

Burzynski, M.(1987). The uptake and transpiration of water and the accumulation of lead by plants growing on lead chloride solutions. *Act. Soc. Bot. Pol*. 56: 271–280.

Chantachon, S., M., Kruatrachue, P.Pokethitiyook, S.T. antanasarit, S.U. patham, and V. Soonthornsarathool.(2004). Phytoextraction of lead from contaminated soil by Vetiver grass(*Vetiveria Sp.*). *Water air soil pollut*., 154:37-55

Baralkiewicz, and A.Malecka. (2002). Accumulation and detoxification of lead ions in legumes. Phytochemistry. 60:153-162.

Satake, M., and Y. Mido. (1997). *Environmental toxicology*. New delhi, Discovery Publishing House.

Siripornadulsil, S., S. Traina, D.S. Verma, and R.T. Sayre. (2002). Molecular mechanisms of proline-mediated tolerance to toxic heavy metals in transgenic microalgae. *Plant Cell*. 14:2837-2847.

Valle, B.L. and D.D. Ulmer (1972). Biochemical effects of mercury, cadmium and lead. *Annu.Rev.Biochem*., 41: 91-129.

Verma, D.P.S.(1999). Osmotic stress tolerance in plants: Role of proline and sulfur metabolisms. In Molecular responses to cold, drought, heat and salt stress in higher plants, K.Shinozaki and K. Yamaguchi-Shinozaki, eds (Austin, TX:R. G. Landers), pp. 153-168.

Weber, M.B., H. Schat, and W.M. Ten Bookum-Van der Maarel (1991).The effect of copper toxicity on the contents of nitrogen compounds in *Silene vulgaris* (Moench) Garcrke. *Plant Soil*., 133:101-109.

Wierzbicka, M.(1987). Lead translocation and localization in *Allium cepa* roots. Can. J. Bot., 65:1851-1860.

Wierzbicka, M., and J. Obidziska (1998). The effect of lead on seed imbibition and germination in different plant species. *Plant Sci*., 137:155-171.

Wilkins, D.A.(1957). A technique for the measurement of lead tolerance in plants. *Nature*., 180: 37-38.

Eick, M.J., J.D. Peak, P.V. Brady and J.D. Pesek. (1999). Kinetics of lead absorption/desorption on goethite: residence time effect. Soil Sci., 164:28-39.

Fredreic Baud-Grasset. (1999). Technical and economic evaluation of phytoremediation. available at: http// 1bewww.epfl.ch/ COST 837/ WG2 – abstracts. Htm1 # Baud.

Hu, S., K.W. Lau, and M. Wu. (2001). Cadmium sequestration in *Chlamydomonas reinhardti*. *Plant Sci*., 161: 987-996.

Kopyra, M., and E.A. Gwzdz, (2003). Nitric oxide stimulates seed germination and counteracts the inhibitory effect of heavy metals and salinity on root growth of *Lupinus luteus*. *Plant Physiol. and Bioch.*, 41:1011-1017

Kumar, P.B.A.N., V. Dushenkov, H. Motto, and I. Raskin. (1995). Phytoextraction: the use of plants to remove heavy metals from soils. *Environ. Sci. Technol*., 29:1232–1238.

Levan, A. (1945). Cytological reaction induced by inorganic salt solutions. *Nature*, 156-159.

Liu, D., W. Jiang, C. Liu, and C. Xin (2000). Uptake and accumulation of lead by roots, hypocotyls and shoots of Indian mustard [*Brassica juncea* L.]. *Bioresource Technology*, 71:273-277.

Lowary, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. (1951). Protein measurement with the foline phnenol reagent. *J.Biol.Chem*, 193:256-275.

Malecka, A., W. Jarmuszkiewicz, and B. Tomaszewska. (2001). Antioxidative defense to lead stress in subcellular compartments of pea root cells. *Acta Biochim.Polonica*, 48:687-698.

Mehta, S.K., and J.P. Gaur.(1999). Heavy-metal-induced proline accumulation and its role in ameliorating metal toxicity in *Chlorella vulgaris*. *New Phytol*. 143: 253-259.

Michalak, E. and M. Wierzbicka (1998). Differences in lead tolerance between *Allium cepa* plants developing from seeds and bulbs. *Plant and Soil*, 199: 251–260.

Piechalak, A., B. Tomaszewska, D. Anuta