

کمی‌سازی پاسخ رشد رویشی و برخی صفات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی گیاه کلزا (*Brassica napus L.*) به غلظت‌های مختلف سرب در خاک

مهرانوش امامیان طبرستانی^۱، همت‌اله پیردشتی^{۲*}، محمدعلی تاجیک قنبری^۳ و فردین صادق‌زاده^۴
^۱ گروه زراعت، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ^۲ گروه زراعت، پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان،
دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ^۳ گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ^۴ گروه علوم خاک،
دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۷/۰۶، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۷/۰۹/۲۶)

چکیده

به منظور کمی‌سازی پاسخ گیاه کلزا (*Brassica napus L.*) به سطوح مختلف سرب، آزمایشی در سه تکرار با دوازده غلظت عنصر سرب از منبع نیترات سرب (صفر، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰۰، ۲۰۰۰، ۲۵۰۰، ۳۰۰۰، ۳۵۰۰، ۴۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک) به صورت طرح کاملاً تصادفی اجرا شد. نتایج نشان داد با افزایش غلظت سرب صفات رویشی به صورت مدل دوتکه‌ای کاهش یافتد. همچنین محتوی کلروفیل *a* و *b* و شاخص سبزینگی برگ (عدد اسپد) به ترتیب حدود ۲۳، ۴۷، ۳۰ و ۲۲ درصد کاهش ولی نسبت کلروفیل *a* بر *b* و کاروتنوئید به ترتیب حدود ۴۶ و ۳۹ درصد در سطح ۴۰۰۰ میلی‌گرم سرب نسبت به شاهد روند افزایشی داشتند. به علاوه، فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، گایاکول پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز ابتدا به ترتیب تا سطح حدود ۱۰، ۴۴۷ و ۱۸ میلی‌گرم سرب افزایش و سپس با افزایش غلظت سرب کاهش یافتد. در مقایسه، فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در سطح ۴۰۰۰ میلی‌گرم سرب حدود ۲/۳ برابر بیشتر از شاهد شد. غلظت مالون دی‌آلدئید و پراکسید هیدروژن نیز در سطح ۴۰۰۰ میلی‌گرم سرب حدود دو برابر و غلظت پرولین حدود ۱۲ درصد نسبت به شاهد افزایش یافتد. در مجموع، صفات رویشی و رنگیزه‌های فتوستتیزی در سطوح پایین سرب، تا سطح ۱۰۰ میلی‌گرم سرب در کیلوگرم خاک، بیشترین حساسیت را نشان دادند. در میان رنگیزه‌های فتوستتیزی نیز حساسیت کلروفیل *b* نسبت به کلروفیل *a* بیشتر بود. همچنین، فعالیت بیشتر آنزیم سوپراکسید دیسموتاز نسبت به سایر آنزیم‌های مورد بررسی و پرولین در مقادیر بالای سرب می‌تواند دلیل احتمالی کاهش آسیب واردہ به کلزا باشد.

کلمات کلیدی: آنتی‌اکسیدانت، پرولین، رنگیزه‌های فتوستتیزی، سرب، کلزا

مقدمه

افزایش داده و مسائل جدی زیست‌محیطی را ایجاد می‌کند. به‌طوری‌که موجب کاهش رشد و عملکرد گیاهان شده و با ورود به زنجیره غذایی، سلامتی انسان و دیگر موجودات زنده را به مخاطره می‌اندازد (Li *et al.*, 2016; Nikolic, 2008).

آردوگی خاک به انواع فلزات سنگین می‌باشد که صنعتی شدن، کشاورزی مدرن و شهرنشینی ورود فلزات سنگین به خاک را

فلزی در گیاه در نتیجه تغییرات در فرآیندهای فیزیولوژیکی در سطح سلولی و مولکولی مانند غیرفعال کردن آنزیم یا مسدود کردن گروههای مهم متابولیکی منجر به تولید بالاتری از گونههای اکسیژن می‌شود که می‌تواند به ترکیبات ماکرومولکولی مانند پروتئینها، چربی‌ها و اسید نوکلئیک آسیب رسانده (Rascio and Navari-Izzo, 2011) و میزان نشت الکتروولیت را در اندام‌های مختلف گیاهان افزایش دهد (Viveros *et al.*, 2010). بنابراین نیاز به خارج کردن این عناصر از محیط می‌باشد.

در این میان برخی گونههای گیاهی از طریق گیاه‌پالایی می‌توانند غلاظت‌های بالایی از فلزات سنگین را بدون بروز علایم مسمومیت در بافت‌های خود ذخیره و موجب احیاء مجدد محیط‌زیست شوند (Baker *et al.*, 2000). تاکنون بیش از ۴۰۰ گونه‌ی گیاهی متعلق به ۴۵ خانواده مانند کاسنی (Brassicaceae)، شببو (Asteraceae)، میخک (Fabaceae)، بقولات (Caryophyllaceae)، نعناع (Lamiaceae) که از پتانسیل ژنتیکی جذب و تحمل مقادیر بالای عناصر سنگین در اندام هوایی خود برخوردار هستند، شناسایی شده است (Winter Sydnor and Redente, 2002). در میان بیش‌اندوزهای شناخته شده گیاهان خانواده شببو بیشترین میزان جذب و بالاترین تعداد بیش‌اندوزهای فلزات سنگین را دارا می‌باشند. در این میان، یکی از مهم‌ترین گیاهان این خانواده کلزا است که در سال‌های اخیر به دلیل کیفیت ویژه این گیاه شامل قابلیت رشد در مناطق مختلف، محظوظ، تغذیه حیوانات، کیفیت روغن به دلیل داشتن کمترین میزان اسیدهای چرب اشباع و داشتن پروتئین فراوان از اهمیت ویژه‌ای در ایران و جهان برخوردار می‌باشد (Solgi *et al.*, 2015) و از آنجایی که به عنوان گیاه بیش‌اندوز فلزات سنگین معرفی شده است (تشکری‌فرد و همکاران، ۱۳۹۶) نیاز به بررسی تغییرات پارامترهای مختلف این نوع گیاهان از جمله شناسایی سازوکارهای دفاعی که نقش مهمی در بهبود فرآیند گیاه‌پالایی دارد، احساس می‌شود. بنابراین هدف از انجام این پژوهش کمی‌سازی پاسخ رشد رویشی و صفات فیزیولوژیک و

(Sharma, and Dubey, 2005) در میان فلزات سنگین، سرب یکی از عوامل اصلی آلودگی محیط زیست می‌باشد که به دلیل تأثیر آن بر سلامتی انسان اهمیت قابل توجهی دارد (ashraf *et al.*, 2012). سرب به دلیل انباست زیاد در بخش‌های سطحی خاک به راحتی در دسترس گیاهان قرار می‌گیرد و با جذب از طریق ریشه‌ها موجب تغییر در برخی فرآیندهای متابولیکی گیاه و اختلال در رشد و نمو آن‌ها می‌شود (پارسادوست و همکاران، ۱۳۸۶). در همین زمینه گزارش شد که تنفس سرب موجب کاهش طول ریشه، ساقه و تولید زیست‌توده در گیاه ذرت گردید (Lin *et al.*, 2009). به علاوه، سرب سبب اختلال در سیستم فیزیولوژیکی گیاهان (Georgieva and Tasev, 1997)، مسمومیت گیاه، زردی برگ‌های جوان، کاهش جذب برخی عناصر ضروری، کاهش فتوسترن و فعالیت‌های داخل سلول می‌گردد (Larbi *et al.*, 2003). همچنین سرب بر فتوسترن گیاهان از طریق کاهش بیوسنتر کلروفیل ناشی از کاهش غلاظت عناصر ضروری منیزیم و آهن در برگ‌ها، ایجاد کمپلکس با پروتئین‌های فتوسترنی و افزایش فعالیت کلروفیلاز جهت تجزیه کلروفیل بر فتوسترن گیاهان اثر منفی می‌گذارد (Sharma and Dubey, 2005). در آزمایشی با افزایش سرب میزان کلروفیل *a* و کلروفیل *b* کل در کنگرفرنگی (Cynara scolymus L.) کاهش یافت (کریمی و همکاران، ۱۳۹۲). یکی از مهم‌ترین دلایل کاهش کلروفیل‌ها تخریب آن‌ها به‌وسیله گونه‌های فعل اکسیژن می‌باشد که در تنفس عناصر سنگین در گیاهان تشکیل می‌شود (Sharma *et al.*, 2004). سرب نیز به‌ویژه در غلاظت‌های بالا موجب تنفس اکسیداتیو در گیاهان می‌شود و در مقابل سلول‌های گیاهی برای از بین بردن رادیکال‌های آزاد دارای سیستم حفاظتی آنتی‌اکسیدانی شامل آنزیمهای آنتی‌اکسیدانی مانند کاتالاز و گایاکول پراکسیداز و نیز سیستم آنتی‌اکسیدانی غیر‌آنزیمی می‌باشد (Cho and Park, 2000). به‌طوری‌که در آزمایشی مشاهده شده است که با افزایش غلاظت سرب فعالیت آنزیمهای آنتی‌اکسیدانی سویا (*Oryza sativa* L.) و برنج (*Glycine max* (L). Merril) افزایش یافت (Sharma and Dubey, 2005).

کلزا تهیه و در هشت میلی‌لیتر متانول غوطه‌ور شده و به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی و در دمای اتاق قرار گرفتند. سپس میزان نور جذبی محلول در طول موج‌های ۶۵۲/۴، ۶۵۰ و ۴۷۰ نانومتر به‌وسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر Analytic jena-SPEKOL 1300 فرائت و ثبت گردید. در نهایت میزان کلروفیل *a* (*Chl_a*)، کلروفیل *b* (*Chl_b*)، کلروفیل کل (*Chl_{a+b}*)، نسبت کلروفیل *a/b* (*Chl_{a/b}*) و کاروتونئید به‌ترتیب با استفاده از روابط یک تا پنج محاسبه و بر حسب میکروگرم در میلی‌لیتر گزارش گردید (Porra, 2002). شاخص سبزینگی برگ نیز با استفاده از دستگاه SPAD-502 Minolta, Japan) SPAD-502 Minolta, Japan) و از سه نقطه برگ اندازه‌گیری و میانگین آن‌ها به عنوان عدد نهایی در محاسبه‌ها مورد استفاده قرار گرفت.

$$\text{Chl}_a (\mu\text{g/ml}) = 16.72 A_{665.2} - 9.16 A_{652.4} \quad \text{رابطه ۱}$$

$$\text{Chl}_b (\mu\text{g/ml}) = 34.09 A_{652.4} - 15.28 A_{665.2} \quad \text{رابطه ۲}$$

$$\text{Chl}_{a+b} (\mu\text{g/ml}) = \text{Chl}_a + \text{Chl}_b \quad \text{رابطه ۳}$$

$$\text{Chl}_{a/b} (\mu\text{g/ml}) = \text{Chl}_a / \text{Chl}_b \quad \text{رابطه ۴}$$

$$\text{Carotenoid} (\mu\text{g/ml}) = (1000 A_{470} - 1.63 \text{Chl}_b) / 221 \quad \text{رابطه ۵}$$

محتوای نسبی آب برگ: جهت سنجش محتوی نسبی آب برگ (RWC) از آخرین برگ توسعه یافته گیاه نمونه تهیه و بلاfacسله وزن تر آن‌ها با ترازوی دقیق اندازه‌گیری شد (FW). سپس نمونه‌های برگی به لوله آزمایش حاوی آب مقطر منتقل و به مدت ۲۴ ساعت گردید تا برگ‌ها آماس پیدا کنند. برای محاسبه وزن آماس، برگ‌ها از لوله آزمایش خارج و رطوبت اضافی با دستمال کاغذی گرفته و نمونه‌ها وزن شد (TW). سپس نمونه‌ها در آون ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت و سپس توزین انجام گردید (DW). محتوای رطوبت نسبی برگ‌ها با استفاده از رابطه شش محاسبه شد (Ritchie *et al.*, 1990).

$$\text{RWC} = (\text{Fw-Dw}) / (\text{Tw-Dw}) \times 100 \quad \text{رابطه ۶}$$

نشت الکتروولیت: به منظور اندازه‌گیری نشت الکتروولیت، نمونه‌ی برگی در لوله‌های آزمایش حاوی یک میلی‌لیتر آب مقطر قرار گرفت. پس از گذشت ۲۴ ساعت، هدایت الکترولیت،

بیوشیمیایی گیاه کلزا به غلاظت‌های مختلف سرب در خاک می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در تابستان و پاییز سال ۱۳۹۶ در آزمایشگاه تنش‌های محیطی و گلخانه تحقیقاتی و پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان واقع در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری در قالب طرح کاملاً تصادفی و در سه تکرار انجام شد. ابتدا خاک مورد استفاده در آزمایش از عمق صفر تا ۳۰ سانتی‌متری مزرعه پژوهشی برداشت و پس از عبور از الک دو میلی‌متری، به نسبت دو به یک با ماسه مخلوط گردید (جدول ۱). تیمارهای آزمایشی شامل دوازده غلاظت عنصر سرب از منبع نیترات سرب به صورت خاک کاربرد (Pb(NO₃)₂) (صفر، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰، ۲۰۰۰، ۲۵۰۰، ۳۰۰۰، ۳۵۰۰، ۴۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک) بود. نیتروژن افزوده شده به خاک توسط نمک نیترات سرب، با افزودن مقادیر محاسبه شده اوره به تیمارهای مختلف تصحیح شد. پس از گذشت چهار هفته از مخلوط کردن خاک، بذرور کلزا (رقم هایولا ۴۰۱) به مدت ده دقیقه با هیپوکلریت سدیم یک درصد ضدغفونی و سپس کشت گردید. در نهایت پس از اتمام دوره رشد رویشی و قبل از شروع مرحله گلدهی گیاه کلزا صفات رویشی، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی اندازه‌گیری شدند.

برای اندازه‌گیری صفات رویشی ابتدا تعداد برگ شمارش و سپس برای اندازه‌گیری صفاتی مانند ارتفاع بوته، قطر ساقه و سطح برگ به‌ترتیب از خط کش مدرج، کولیس دیجیتالی (مدل Digimizer) و نرم‌افزار Guanglu نمونه‌های گیاهی برای خشک شدن به مدت ۴۸ ساعت در آون با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. اندازه‌گیری وزن خشک برگ، ساقه، ریشه و بوته با استفاده از ترازوی حساس ۰/۰۰۰۱ (HR-100i) انجام شد.

سنجهش کلروفیل، کاروتونئید و شاخص سبزینگی برگ: برای اندازه‌گیری میزان کلروفیل برگ، شش عدد پانچ از برگ‌های

جدول ۱- برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک

رسی لومنی	۴۲/۶	۳۵/۲	۲۲/۲	درصد (%)	رس	سیلت	شن	نیتروژن	فسفر	پتاسیم	اسیدیته	هدایت الکتریکی (ds.m ⁻¹)
۱/۴۶	۷/۵۶	۲۷۰	۱۴/۱	۰/۲۵								

لیپیدها از اختلاف بین طول موج‌های جذبی در ضریب خاموشی ۱۵۵ میکرومول بر سانتی‌متر بدست آمد.

سنچش فعالیت آنزیم سوپراکسیدیسموتاز بر اساس روش Beauchamp و Fridovich (۱۹۷۱) انجام شد. محلول واکنش در حجم نهایی شامل ۸۳۵ میکرولیتر بافر فسفات‌سدیم ۵۰ میلی‌مولار ($pH=8$)، ۳۳ میکرولیتر نیتروبولوترازوکسیم ۰/۷۵ میلی‌مولار، ۳۳ میکرولیتر ریبوفلاوین و ۳۳ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. تغییرات جذب محلول واکنش نسبت به شاهد در طول موج ۵۶۰ نانومتر اندازه‌گیری و فعالیت آنزیم سوپراکسیدیسموتاز بر اساس واحد بر میلی‌گرم پروتئین بیان گردید.

فعالیت آنزیم کاتالاز به روش Abi (۱۹۸۴) و بر پایه تجزیه پراکسیدهیدروژن توسط آنزیم کاتالاز اندازه‌گیری شد. مخلوط واکنش شامل سه میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار، ده میکرولیتر پراکسیدهیدروژن ۱۵ میلی‌مولار و ۵۰ میکرولیتر عصاره بود. پس از اضافه کردن عصاره، کاهش جذب در طول موج ۲۴۰ نانومتر به مدت یک دقیقه با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری شد.

مخلوط واکنش آنزیم گایاکول پراکسیداز شامل یک میلی‌لیتر بافر فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار ($pH=7$)، ۲۵۰ میکرولیتر EDTA ۰/۱ میلی‌مولار، یک میلی‌لیتر گایاکول ۵ میلی‌مولار، یک میلی‌لیتر پراکسیدهیدروژن ۱۵ مولار و ۵۰ میکرولیتر از محلول آنزیمی استخراج شده بود. واکنش با اضافه کردن محلول آنزیمی شروع شده و افزایش جذب در طول موج ۷۰ نانومتر به مدت یک دقیقه ثبت شد (Tang and Newton, 2005).

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز از طریق بررسی میزان اکسیداسیون آسکوربات به روش Yoshimura و همکاران (۲۰۰۰) اندازه‌گیری شد. یک میلی‌لیتر از کمپلکس واکنش حاوی ۲۵۰ میکرولیتر بافر فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار با $pH=7$ ، ۲۵۰ میکرولیتر آسکوربات ۱ میلی‌مولار، ۲۵۰ میکرولیتر

هر نمونه با استفاده از دستگاه EC متر (CON 410) اندازه‌گیری شد (EC_1). به منظور اندازه‌گیری میزان کل نشت الکتروولیت‌ها در اثر مرگ سلول، لوله‌های آزمایش به مدت ۲۰ دقیقه در دستگاه بن ماری با دمای ۹۰ درجه قرار گرفته و مجدداً هدایت الکتریکی نمونه‌ها ثبت گردید (EC_2). سپس درصد نشت الکتروولیت‌ها با استفاده از رابطه ۷ محاسبه گردید (Lutts *et al.*, 1995).

رابطه ۷ = $EC_1 / EC_2 \times 100$ روابط پیوشریمیایی: میزان پراکسیدهیدروژن با استفاده از روش Sergive و همکاران (۱۹۹۷) و بر اساس واکنش H_2O_2 با پیدیده‌پتانسیم (KI) تعیین گردید. در این روش ۰/۵ گرم از بافت تازه برگ در پنج میلی TCA ۰/۱ درصد در حمام آب یخ ساییده شد. عصاره حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰g سانتریفیوژ گردید. سپس به ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول رویی، ۷/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات پتانسیم ۱۰ میلی‌مولار و اسیدیته ۰/۵ میلی‌لیتر ییدید پتانسیم یک مولار اضافه گردید. مخلوط واکنش به مدت یک ساعت در دمای اتاق نگهداری و سپس جذب نمونه‌ها در ۳۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

میزان پراکسیداسیون لیپیدی غشا نیز بر اساس روش Stewart و Bewley (۱۹۸۰) اندازه‌گیری شد. در حدود ۰/۵ گرم از بافت تازه برگ در ده میلی‌لیتر از محلول ۰/۱٪ تری کلرواستیک اسید هموژن و به مدت ده دقیقه در ۱۵۰۰۰xg سانتریفیوژ گردید و سپس دو میلی‌لیتر از سوپرناتانت حاصل با چهار میلی‌لیتر از محلول ۰/۲٪ تری کلرواستیک اسید محتوی ۰/۰۵٪ تیوباربیوتوریک اسید مخلوط و کمپلکس حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری و سپس به حمام آب سرد منتقل گردید. در مرحله بعد نمونه‌ها دوباره به مدت ده دقیقه در ۱۰۰۰۰xg سانتریفیوژ شد. درنهایت جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۳۳ و ۶۰۰ نانومتر ثبت شد. میزان پراکسید شدن

محاسبه شد. برای رسم منحنی استاندارد از پرولین استفاده گردید.

در نهایت آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۲ انجام گردید. همچنین برای کمی‌سازی اثر تنش سرب از تجزیه رگرسیونی و برآذش معادله خطی (رابطه ۸) و دو تکه‌ای (رابطه ۹) (*Bakhshandeh et al., 2012*) و برای رسم منحنی‌ها از نرم‌افزار Excel استفاده شد.

$$y = b_1x + a \quad (رابطه 8)$$

$$y = b_1x + a \quad \text{if } x \leq x_0 \quad (رابطه 9)$$

$$y = (b_1x_0 + a) + b_2(x - x_0) \quad \text{if } x > x_0$$

در این روابط a : عرض از مبدأ در سطح بدون تنش (غاظت صفر سرب)، b_1 و b_2 : شیب تغییرات مؤلفه بهترتیب در مرحله ۱ و ۲. x_0 : نقطه پرخاش بین دو مرحله.

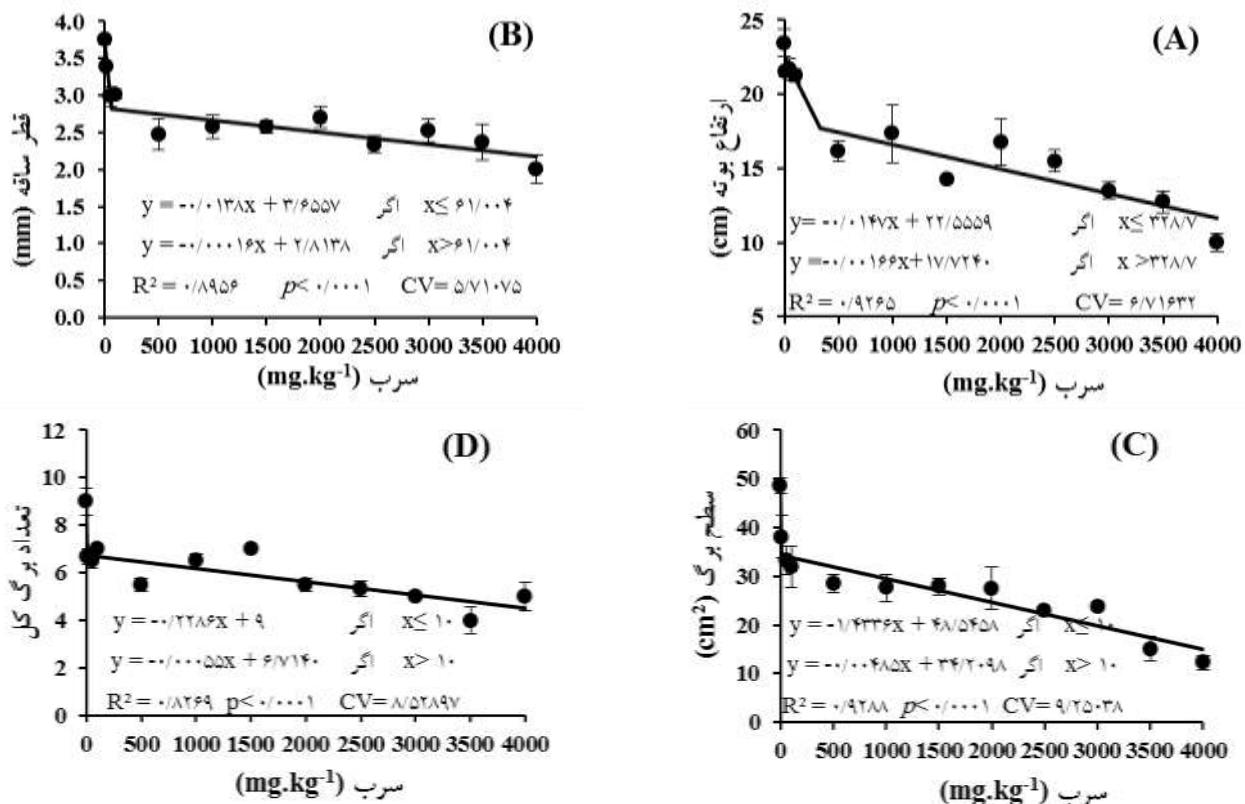
نتایج و بحث

نتایج تجزیه رگرسیونی اثر سطوح مختلف سرب بر صفات مورفولوژیک کلزا (شکل ۱-D-A) نشان داد که روند تغییرات ارتفاع بوته، قطر ساقه، سطح برگ و تعداد برگ کل به صورت مدل دو تکه‌ای کاهش یافت. با افزایش غاظت سرب از صفر به ترتیب تا حدود ۳۲۹، ۶۱، ۱۰ و ۱۰ میلی‌گرم سرب در کیلوگرم خاک با شیب ۰/۰۱۴۷، ۰/۰۱۳۸، ۰/۰۱۳۶ و ۰/۰۲۸۶ کاهش و سپس با شیب ۰/۰۰۱۶۶، ۰/۰۰۱۶ و ۰/۰۰۴۸۵ و ۰/۰۰۰۵۵ به روند کاهشی خود تا سطح ۴۰۰۰ میلی‌گرم سرب در کیلوگرم خاک ادامه داد. در بین این صفات، حساسیت سطح برگ به افزایش سرب بیشتر از بقیه صفات بود. در همین زمینه در آزمایشی روی گیاه بادرنجبویه (*Melissa officinalis* L.) نیز کاهش این صفات با افزایش غاظت کادمیم از صفر تا ۲۰۰ میلی‌گرم در گیلوگرم خاک گزارش شد (یعقوبیان و همکاران، ۱۳۹۵). همچنین مشاهده شد با افزایش غاظت عنصر سنگین سرب و مس به ترتیب ارتفاع بوته در بادرنجبویه (یوسفی‌راد و همکاران، ۱۳۹۵) و کلزا (موحدپور و همکاران، ۱۳۹۳) روند کاهشی داشت. سطح برگ در سورگوم (اماکنی فر و همکاران، ۱۳۹۱) نیز با افزایش غاظت سرب کاهش یافت. در

۱۰ میلی‌مولا، ۱۰ میکرولیتر پراکسیدهیدروژن EDTA میلی‌مولا، ۱۹۰ میکرولیتر آب دو بار تقطیر و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی استخراج شده بود. با اضافه شدن پراکسید هیدروژن فعالیت آنزیمی شروع گردید. تغییرات جذب کمپلکس واکنش در طول موج ۲۹۰ نانومتر شروع و پس از یک دقیقه یادداشت شد. سپس، با استفاده از ضریب خاموشی $2/8 \text{ cm}^{-1} \text{ mmol}^{-1}$ میزان فعالیت آنزیم محاسبه گردید.

اندازه‌گیری میزان پروتئین محلول کل نیز به روش Bradford (۱۹۷۶) صورت گرفت. بدین منظور کمپلکس واکنش شامل ۲۰۰ میکرولیتر از عصاره استخراجی نمونه با ۵۰۰ میکرولیتر معرف برdfورد و ۱۸۰۰ میکرولیتر آب دیونیزه می‌باشد. بعد از پنج دقیقه میزان جذب مخلوط در طول موج ۵۹۵ نانومتر قرائت شد و با قراردادن عدد بدست آمده در منحنی استاندارد میزان پروتئین نمونه مجهول بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر بدست آمد.

اندازه‌گیری میزان پرولین با استفاده از روش Bates و همکاران (۱۹۷۳) به دست می‌آید. ۰/۵ گرم ماده تر گیاهی را با هاون خرد کرده و درون یک تیوب ریخته شد، سپس ده میلی‌لیتر سولفوسالیسیلیک اسید سه درصد آماده شده را به آن اضافه نموده و نمونه را درون یخ قرار داده خواهد شد. تیوب را در ۱۵۰۰۰ دور به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ نموده تا مواد اضافی از محلول جدا گردد. می‌توان به جای سانتریفیوژ از قیف شیشه‌ای و کاغذ صافی برای صاف کردن نمونه‌ها استفاده کرد. مقدار دو میلی‌لیتر از عصاره صاف شده را درون تیوب جدید ریخته و دو میلی‌لیتر اسید ناین‌هیدرین و دو میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال به آن افزوده و سپس خوب مخلوط می‌شود. نمونه‌ها را در حمام آب گرم به مدت یک ساعت حرارت داده و سپس درون حمام یخ قرار داده می‌شود. مقدار چهار میلی‌لیتر تولوئن به محلول اضافه نموده و به مدت ۲۰ ثانیه با دستگاه ورتکس به هم زده می‌شود. پس از اندازه‌گیری جذب محلول‌ها در طول موج ۵۲۰ نانومتر منحنی استاندارد رسم و معادله خط تعیین شد. با قرار دادن جذب نمونه‌ها در معادله خط، محتوای پرولین

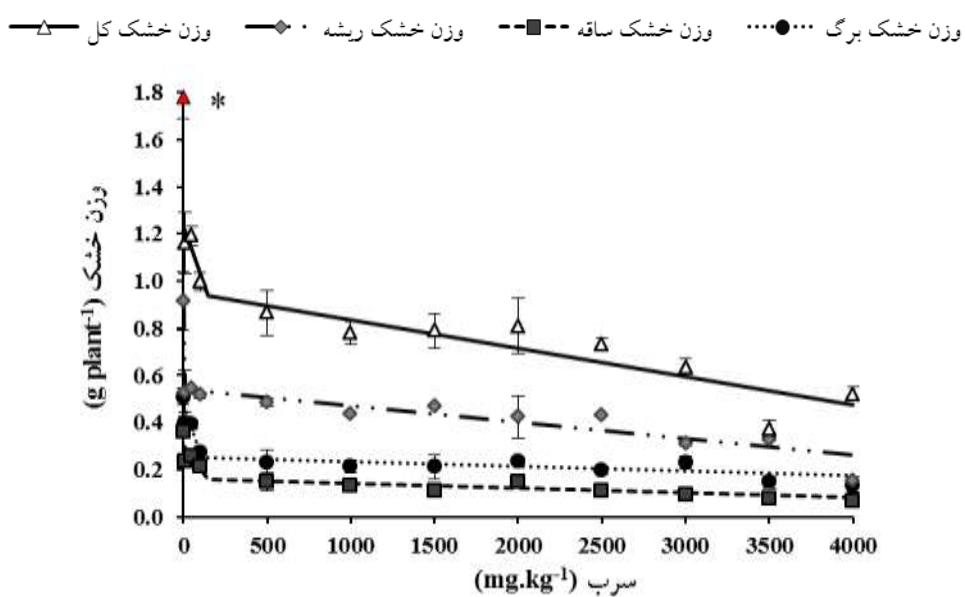


شکل ۱- روند تغییرات ارتفاع بوته (A)، قطر ساقه (B)، سطح برگ (C) و تعداد برگ (D) گیاه کلزا در پاسخ به افزایش غلظت سرب خاک با استفاده از مدل دو تکه‌ای (رابطه ۹). میله‌ها نشان دهنده خطای استاندارد (SE) است.

مشاهده گردید. این نتایج با پژوهش‌های یوسفی‌راد و همکاران (۱۳۹۵) در بادرنجبویه، نورانی‌آزاد و همکاران (۱۳۹۰) در گلنگ، کریمی‌شروعانی و همکاران (۱۳۹۳) در جو و امانی‌فر و همکاران (۱۳۹۱) در سورگوم مطابقت دارد. همچنین کاهش در وزن اندام‌های رویشی با افزایش غلظت عناصر دیگری مانند کادمیم در بادرنجبویه (یعقوبیان و همکاران، ۱۳۹۵) و سویا کادمیم در بادرنجبویه (یعقوبیان و همکاران، ۲۰۱۳) و سویا کادمیم در بادرنجبویه (Xue *et al.*, 2013) و مس و نیکل در گیاه بامیه (۱۳۹۴) مشاهده شد. در همین رابطه پژوهشگران بیان کردند روش‌های مختلفی مانع رشد گیاهان توسط فلزات سنگین می‌شود. به این صورت که فلزات با کاهش تورژسانس سلولی موجب کاهش تقسیم سلولی و مهار رشد سلولی می‌شود و از طرف دیگر با تجمع در دیواره سلولی و ورود به سیتولامس در متابولیسم طبیعی سلول اختلال ایجاد کرده و باعث کاهش رشد می‌گردد (Molassiotis *et al.*, 2005).

همین رابطه برخی محققان بیان کردند کاهش سطح برگ پاسخ عمومی گیاهان به عناصر سنگین است (Sharma and Dubey, 2005) و از آنجایی که اهمیت برگ به دلیل دریافت نور و فتوستتر برای گیاه می‌باشد، بنابراین کاهش سطح برگ در اثر سمیت سرب موجب بازدارندگی رشد گیاه می‌گردد (Shu *et al.*, 2012).

روند کاهش وزن خشک اندام‌های رویشی کلزا نسبت به افزایش غلظت سرب نیز به صورت رابطه‌ای دو تکه‌ای برازش شد. شبیه کاهش این صفات در غلظت‌های مختلف سرب متغیر بود (شکل ۲ و جدول ۲). بر اساس یافته‌ها، با افزایش غلظت سرب، وزن خشک برگ، ساقه، ریشه و بوته ابتدا به ترتیب تا سطح حدود ۱۱۲، ۱۴۴، ۱۰ و ۱۴۹ میلی‌گرم سرب در کیلوگرم خاک به میزان حدود ۴۷، ۴۱، ۲۳ درصد نسبت به شاهد با شبیه بیشتری کاهش یافت. اما پس از آن کاهش با شبیه کمتری تا سطح ۴۰۰۰ میلی‌گرم سرب در کیلوگرم خاک



شکل ۲- روند تغییرات وزن خشک برگ، ساقه، ریشه و کل گیاه کلزا در پاسخ به افزایش غلظت سرب خاک با استفاده از مدل دو تکه‌ای (رابطه‌ی ۹). میله‌ها نشان دهنده خطای استاندارد (SE) است. *در برآذش منحنی استفاده نشده است.

جدول ۲- برآورد مقادیر پارامترهای مربوط به معادلات برآذش یافته (دو تکه‌ای) بر صفات رویشی گیاه کلزا در غلظت‌های مختلف سرب خاک

Sig	CV	RMSE	R ²	x ₀ ± SE	b ₂ ± SE	b ₁ ± SE	a ± SE	صفات
<0.0001	11/40	0/02996	0/9317	111/9 ± 22/7	-0/00002 ± 0/00011	-0/00198 ± 0/00041	0/472 ± 0/025	وزن خشک برگ
<0.0001	17/57	0/02822	0/8928	143/7 ± 54/4	-0/00002 ± 0/0001	-0/001 ± 0/000424	0/302 ± 0/024	وزن خشک ساقه
<0.0001	9/39	0/04331	0/9447	10 ± 0/0	-0/00007 ± 0/00010	-0/0372 ± 0/00519	0/913 ± 0/047	وزن خشک ریشه
<0.0001	9/30	0/07484	0/9113	149/4 ± 90	-0/0012 ± 0/00027	-0/00187 ± 0/00139	1/22 ± 0/09	وزن خشک کل

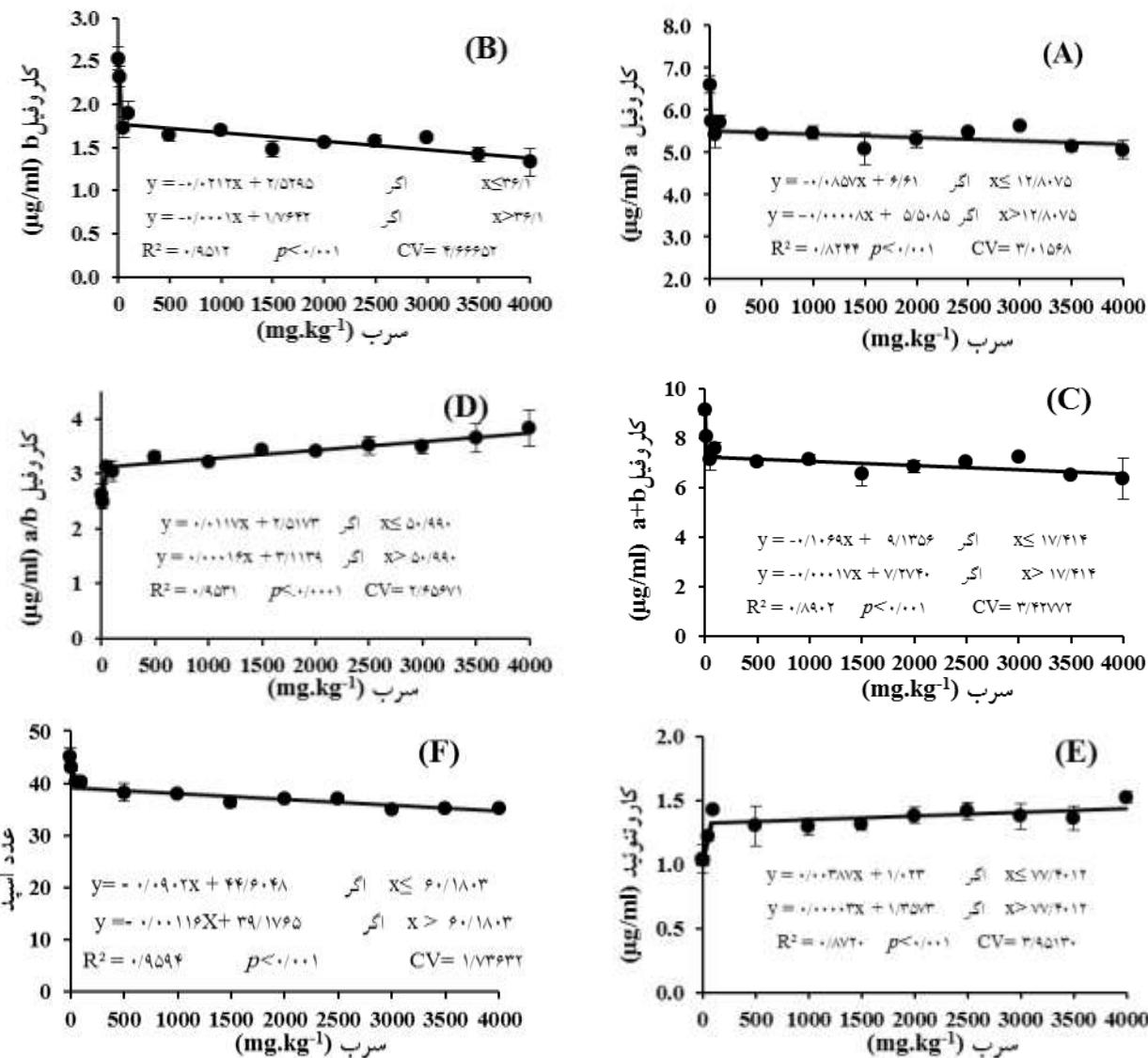
a: عرض از مبدأ در سطح بدون تنش (غلظت صفر سرب). b₁ و b₂: شیب تغییرات مؤلفه به ترتیب در مرحله ۱ و ۲. x₀: نقطه پرخشن بین دو مرحله. R²: ضریب تبیین. RMSE: جذر میانگین مربعات خطای استاندارد. CV: ضریب تغییرات. Sig: معنی داری مدل.

کلروفیل a و کلروفیل کل در گشنیز (*Coriandrum sativum* L.) (فاطمی و همکاران، ۱۳۹۶) و نوعی خردل (*Brassica juncea* L.) (Sinha and Sharivastava, 2012) با افزایش سرب گزارش شد. این کاهش در کلروفیل با افزایش فلزات دیگری مانند نیکل در گیاه جعفری (Petroselinum crispum) (خطیب و همکاران، ۱۳۸۷) و کادمیم در کلزا (سلطانی و همکاران، ۱۳۸۵) نیز مشاهده گردید. البته این افزایش در عنصر سنگین کادمیم کاهش سیزینگی برگ را در گیاه بادرنجبویه به صورت خطی در پی داشت (یعقوبیان و همکاران، ۱۳۹۵). کاهش فتوستنتز در نتیجه اختلال در ساختار کلروپلاست، ممانعت از ساخت کلروفیل،

زیست‌توده تحت تأثیر عناصر سنگین نشان‌دهنده کاهش و

اختلال در سنتز پروتئین‌ها و همچنین کاهش فعالیت دستگاه فتوستنتز می‌باشد (Manivasagaperumal et al., 2011).

همچنین بر اساس یافته‌های آزمایش حاضر، با افزایش سطوح سرب روند تغییرات رنگیزهای فتوستنتز گیاه کلزا به صورت معادله دو تکه‌ای بود (شکل ۳). با افزایش سطوح سرب از صفر به ۴۰۰۰ میلی‌گرم سرب در کیلوگرم خاک به ترتیب محتوی کلروفیل a، b و a+b و سیزینگی برگ ابتدا با شیب ۰/۰۸۶، ۰/۰۲۱، ۰/۱۰۷ و ۰/۰۹۰۲ و سپس با شیب ۰/۰۰۰۰۸، ۰/۰۰۰۱۷ و ۰/۰۰۰۱۶ روند کاهشی را نشان دادند (شکل ۳-A و F). در همین زمینه کاهش



شکل ۳- روند تغییرات محتوای کلروفیل a (A)، b (B)، کلروفیل a+b (C)، کلروفیل a/b (D)، کاروتونوئید (E) و سبزینگی برگ (F) گیاه کلزا در پاسخ به افزایش غلظت سرب خاک با استفاده از مدل دو تکه‌ای (رابطه‌ی ۹). میله‌ها نشان دهنده خطای استاندارد (SE) است.

نسبت کلروفیل a بر b (a/b) با افزایش سطوح سرب روند افزایشی را نشان داد. این نسبت با افزایش سطح سرب از صفر تا حدود ۵۱ میلی گرم سرب در کیلوگرم خاک با شیب حدود ۰/۰۱۲ و سپس با کاهش شیب به ۰/۰۰۰۱۶ بیشتر شد (شکل ۳- D). این افزایش در نسبت کلروفیل a بر b نشان دهنده حساسیت بیشتر کلروفیل b و کاهش بیشتر آن نسبت به کلروفیل a به افزایش غلظت سرب می‌باشد. در همین زمینه مشاهده شده است افزایش غلظت آنتیموان در یک نوع مینا (Tanacetum polycephalum) کاهش بیشتر کلروفیل

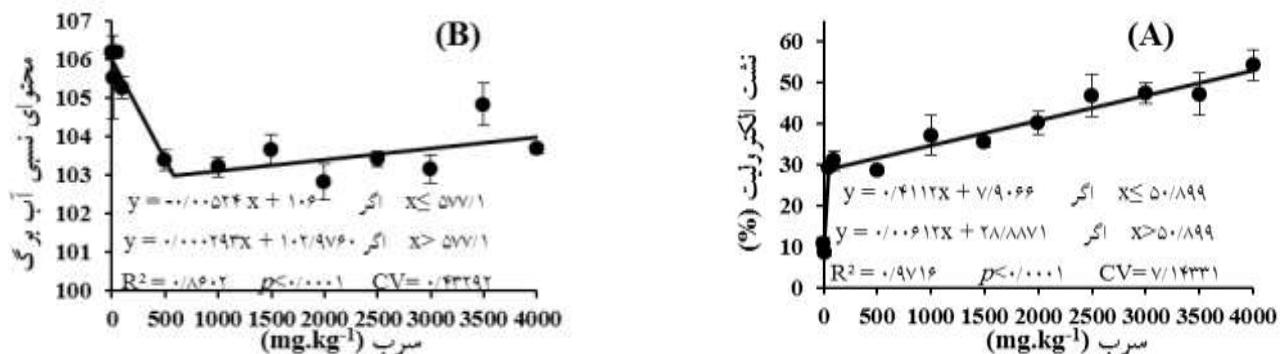
پلاستوکوئینون و کاروتونوئیدها، جلوگیری از انتقال الکترون، جلوگیری از فعالیت آنزیم‌های چرخه کالوین و کمبود دی‌اکسید کربن به دلیل بسته شدن روزنه‌ها ایجاد می‌شود (Akinci *et al.*, 2010). یکی از مهم‌ترین دلایل کاهش کلروفیل‌ها تخریب آن‌ها به‌وسیله گونه‌های فعال اکسیژن می‌باشد که در تنفس عناصر سنگین در گیاهان تشکیل می‌شود (Sharma *et al.*, 2004). عنصر سنگین سرب با افزایش فعالیت کلروفیل‌از نیز موجب تخریب کلروفیل‌ها می‌گردد (Piotrowska *et al.*, 2010).

به دیواره سلولی و در نتیجه اختلال در سرعت تعرق برگ و بروز تغییرات فراساختاری در اندامک‌های سلول، محتوای نسبی آب برگ را کاهش می‌دهد (Cenkci *et al.*, 2010).

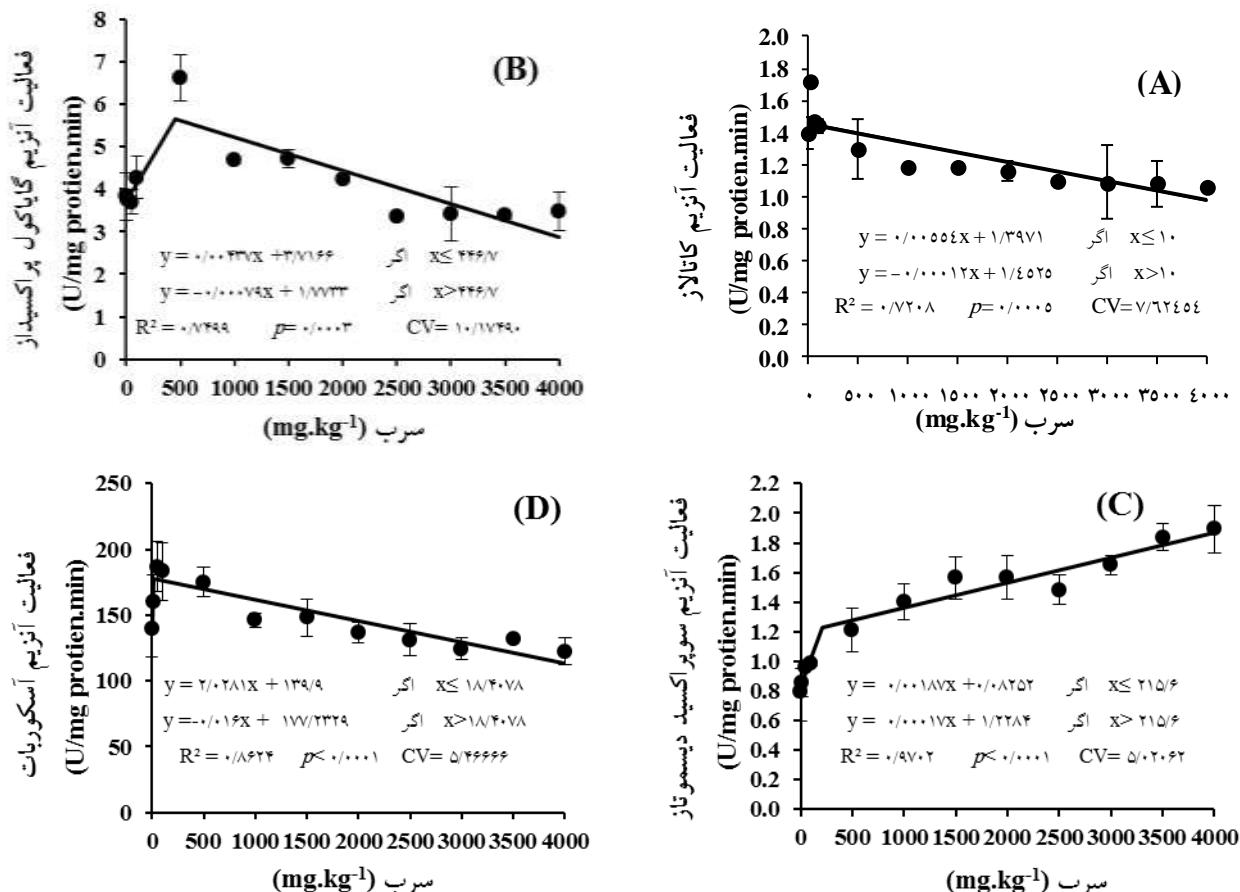
بر اساس نتایج پژوهش حاضر روند فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی گیاه کلزا در پاسخ به افزایش غلظت سرب به صورت مدل دوتکه‌ای تغییر نمود (شکل ۵). با افزایش غلظت‌های سرب از صفر به ۴۰۰۰ میلی‌گرم سرب در کیلوگرم خاک فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، گایاکول پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز به ترتیب ابتدا تا حدود سطوح ۱۰، ۴۷ و ۱۸ میلی‌گرم سرب در کیلوگرم خاک با شیب ۰/۰۰۵، ۰/۰۰۴ و ۰/۰۰۳ افزایش و سپس با شیب حدود ۰/۰۰۱، ۰/۰۰۸ و ۰/۰۰۲ روند کاهشی را نشان دادند (شکل ۵- A، B و D). بیشترین کاهش فعالیت در سطح ۴۰۰۰ میلی‌گرم سرب مربوط به آنزیم کاتالاز به میزان ۲۴ درصد بود. در همین زمینه مشاهده شد که تنفس سرب موجب کاهش آنزیم کاتالاز و افزایش آنزیم گایاکول پراکسیداز در گیاه گلرنگ شد (نورانی آزاد و همکاران، ۱۳۹۰). همچنین گزارش شد که دو شکل آیزوژایمی آنزیم کاتالاز در برگ‌های گیاهک‌های برنج تحت تیمار سرب بسیار کاهش یافت که موجب کاهش فعالیت این آنزیم شد (Verma and Dubey, 2003 and Dubey, 2003). کاهش در این آنزیم می‌تواند به دلیل کاهش سنتز این آنزیم یا تغییر در اجتماع زیر واحدهای این آنزیم در اثر سمیت سرب باشد (نورانی آزاد و همکاران، ۱۳۹۰). اما عنصر سنگین آنتیموان در مینا (جملای حاجیانی و همکاران، ۱۳۹۵) و مس و نیکل در بامیه (کارگر خرمی و جامعی، ۱۳۹۴) افزایش فعالیت کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز و همچنین کادمیم در ژنتوتیپ‌های نخود افزایش فعالیت کاتالاز، گایاکول پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز را در پی داشت (Foroozesh *et al.*, 2012). در مقایسه، روند تغییر آنزیم سوپراکسید دیسموتاز به صورت دوتکه‌ای بود (شکل ۵- C). این افزایش در سطح ۴۰۰۰ میلی‌گرم سرب در کیلوگرم خاک حدود ۲/۳ برابر نسبت به شاهد بود که می‌تواند دلیل تحمل بالای گیاه کلزا به سطوح بالای سرب باشد. در همین رابطه مشاهده شد تنفس شوری و عنصر سنگین سرب فعالیت

b نسبت به کلروفیل a در پی داشت (جملای حاجیانی و همکاران، ۱۳۹۵). همچنین این افزایش در میزان کاروتونوئید نیز مشاهده شد به طوری که ابتدا تا سطح ۷۷ میلی‌گرم سرب در کیلوگرم خاک با شیب حدود ۰/۰۰۳۹ و سپس با شیب ۰/۰۰۰۰۳ افزایش یافت (شکل ۳-E). در همین رابطه گزارش شده است با افزایش غلظت عنصر سنگین نیکل در گیاه گشنیز میزان کاروتونوئید افزایش یافت (تقریبان و همکاران، ۱۳۹۴). چون کاروتونوئیدها علاوه بر این که رنگیزه کمکی هستند، نقش‌های مهم دیگری از جمله توان آنتی‌اکسیدانی، محافظت از غشاهای تیلاکوئیدی و جلوگیری از اکسیداسیون نوری کلروفیل‌ها را بر عهده دارند (Pandey and Sharma, 2002).

همچنین بر اساس یافته‌ها، با افزایش سطوح سرب نشت الکتروولیت به صورت دوتکه‌ای افزایش یافت. به طوری که تا سطح حدود ۵۱ میلی‌گرم سرب در کیلوگرم خاک با شیب ۰/۰۱۱۲ و سپس با شیب ۰/۰۰۶۱۲ افزایش یافت. این صفت در سطح ۴۰۰۰ میلی‌گرم سرب حدود پنج برابر نسبت به شاهد بیشتر شد (شکل ۴-A). در آزمایشی مشابه نیز افزودن سرب، کادمیم، نیکل و مس موجب افزایش نشت الکتروولیت در گیاه لوبیا چیتی (*Phaseolus vulgaris L.*) شد (بلوچی و همکاران، ۱۳۹۶). چنین افزایشی در نشت الکتروولیت در تیمار سرب و کادمیم در نخود (Garg and Aggarwal, 2012) و مس در دو نوع آزو لا (Sanchez-Viveros *et al.*, 2010) نیز پیش‌تر گزارش شد. علت افزایش نشت پذیری غشاهای زیستی و آسیب به غشاهای زیستی در تنفس‌های مختلف محیطی، افزایش پراکسیداسیون لیپیدها می‌باشد (Wahid, 2007). محظوظی نسبی آب برگ با افزایش سطوح سرب روند کاهشی را نشان داد. به طوری که در سطح ۴۰۰۰ میلی‌گرم سرب به میزان حدود ۲/۳ برابر نسبت به شاهد کاهش یافت (شکل ۴-B). در دو گیاه گل گندم (*Centaurea cyanus*) (خدادردی‌لو و همکاران، ۱۳۹۲) و گشنیز (فاطمی و همکاران، ۱۳۹۶) نیز سرب موجب کاهش محظوظی نسبی آب برگ گردید. سرب در گیاه با کاهش اندازه و تعداد سلول‌های نگهبان روزنیه موجب کاهش انتقال آب به برگ‌ها و کاهش سطح برگ شده و با آسیب



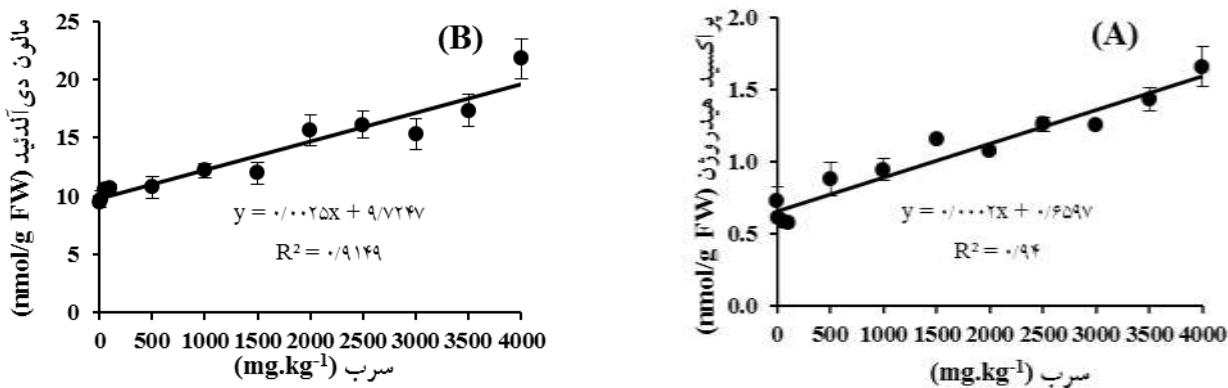
شکل ۴- روند تغییرات نشت الکترولیت (A) و محتوی نسبی آب برگ (B) گیاه کلزا در پاسخ به افزایش غلظت سرب خاک با استفاده از مدل دوتکه‌ای (رابطه‌ی ۹). میله‌ها نشان دهنده خطای استاندارد (SE) است.



شکل ۵- روند تغییرات فعالیت کاتالاز (A)، پراکسیداز (B)، سوپر اکسید دیسموتاز (C) و آسکوربات پراکسیداز (D) در گیاه کلزا در پاسخ به افزایش غلظت سرب خاک با استفاده از مدل دو تکه‌ای (رابطه‌ی ۹). میله‌ها نشان دهنده خطای استاندارد (SE) است.

گزارش شده است عنصر سرب موجب افزایش فعالیت این آنزیم در ریشه گیاه لوییا شد که دلیل آن تولید رادیکال‌های اکسیژن می‌باشد (Garnczarska and Ratajczak, 2000).

سوپر اکسید دیسموتاز، گایاکول پراکسیداز و آسکوربات را بیشتر از کاتالاز افزایش داد و این افزایش در آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز بیشتر بود (Siddiqui, 2013). در همین رابطه



شکل ۶- روند تغیرات میزان مالون دی‌آلدئید (A) و پراکسید هیدروژن (B) در گیاه کلزا در پاسخ به افزایش غلظت سرب خاک با استفاده از مدل خطی (رابطه‌ی A). میله‌ها نشان دهنده خطای استاندارد (SE) است.

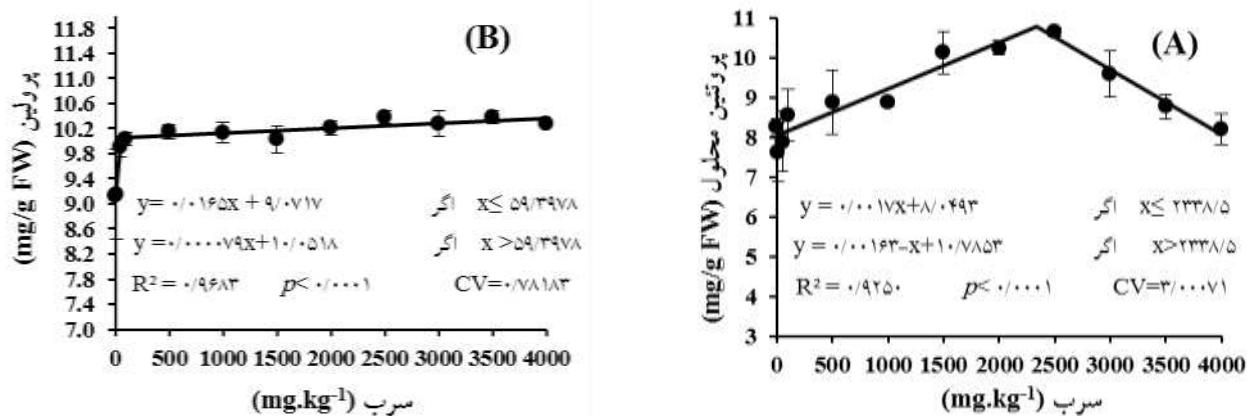
سطح ۲۳۳۸ میلی‌گرم سرب بود و پس از آن مقاومت خود را از دست داد (شکل ۷- A). بیشود آهن در گیاه برنج نیز کاهش پروتئین محلول در بخش هوایی را به دنبال داشت (مهریان و عبدالزاده، ۱۳۹۱). میزان پروولین تا سطح حدود ۵۹ میلی‌گرم سرب با شیب ۰/۰۱۶۵ و سپس با شیب ۰/۰۰۰۰۷ به صورت دو تکه‌ای افزایش یافت. این افزایش در سطح ۴۰۰۰ میلی‌گرم سرب نسبت به شاهد حدود ۱۲ درصد بود (شکل ۷- B). همچنین در گیاه گشنیز افزایش میزان پروولین با افزایش غلظت سرب تا سطح ۱۵۰۰ میلی‌گرم سرب مشاهده شد (Fاطمی و همکاران، ۱۳۹۶). نتایج مشابهی در زرشک (*Berberis*) (Hakimi et al., 2015) و پریوش (*Catharanthus integerrima*) (امیرجانی و همکاران، ۱۳۹۴)، لوبیا چیتی (بلوچی) و همکاران، (۱۳۹۶) و نخود (Faiazan et al., 2011) گزارش شد. پروولین به عنوان اسمولیت انباسته شده در شرایط تنش فعالیت می‌کند (Shah et al., 2001) و تجمع آن در شرایط تنش ممکن است به دلیل اکسیداسیون پروولین یا تحریک ستر آن از گلوتامات یا افزایش فعالیت آنزیم بروتئاز به عنوان اولین نقش محافظت‌کننده آنزیم‌های سیتوزولی (حفظ از آنزیم کربوکسیلاز) ساختار سلولی باشد (فاطمی و همکاران، ۱۳۹۶).

نتیجه‌گیری کلی

در مجموع نتایج بیانگر حساسیت بیشتر صفات رویشی به سمیت سرب بود. به طوری که بیشترین کاهش در بین این

روند افزایش مالون دی‌آلدئید و پراکسید هیدروژن نیز به صورت خطی بود. به طوری که در سطح ۴۰۰۰ میلی‌گرم سرب به میزان حدود دو برابر نسبت به شاهد بیشتر شد (شکل ۶- A و B). در همین زمینه در بررسی اثر سرب، مس و نیکل بر ظرفیت مالون دی‌آلدئید گونه‌ای از گیاه بید (Salix acmophylla Biss) پراکسیداسیون لیپید در گیاهان تحت تنش سرب بیشتر بود (Ali et al., 2003). همچنین با افزایش عناصر سنگینی مانند Hosseini and Poorakbar, (Malar et al., 2015)، روی (Jain et al., 2010)، کادمیم (کرامت و همکاران، ۱۳۹۳)، مس و نیکل (کارگر خرمی و جامعی، ۱۳۹۴) میزان پراکسید هیدروژن و مالون دی‌آلدئید در گیاهان مختلف افزایش یافت. در همین رابطه بیان شده است که فلزات سنگین به وسیله گونه‌های فعل اکسیژن موجب تنش اکسیداتیو در گیاهان می‌شوند (Behnamnia et al., 2009). از آنجایی که ماکرومولکول‌های لیپیدی، به ویژه لیپیدهای غیر اشباع نسبت به اکسیداسیون توسط انواع اکسیژن فعل حساس هستند، بنابراین افزایش مالون دی‌آلدئید به عنوان محصول پراکسیداسیون لیپیدی، نشان دهنده تنش شدید اکسیداتیو در گیاهان در نظر گرفته می‌شود.

به علاوه با افزایش سطوح سرب تغییرات پروتئین محلول به صورت دو تکه‌ای بود. پروتئین محلول تا سطح حدود ۲۳۳۸ میلی‌گرم سرب با شیب ۰/۰۰۱۷ افزایش و سپس با شیب ۰/۰۰۱۶ کاهش یافت. چنین روندی نشان دهنده مقاومت گیاه تا



شکل ۷- روند تغییرات میزان پروتئین محلول (A) و پرولین (B) در گیاه کلزا در پاسخ به افزایش غلظت سرب خاک با استفاده از مدل دو تکه‌ای (رابطه‌ی ۹). میله‌ها نشان دهنده خطای استاندارد (SE) است.

نشان دهنده کاهش حساسیت بود. این تغییرات منجر به تخریب بیشتر کلروفیل‌ها گردید که احتمالاً این کاهش در صفات رویشی و رنگیزه‌های فتوستتری می‌تواند به دلیل افزایش میزان نشت الکتروولیت، مالوندی آلدید و پراکسید هیدروژن با افزایش غلظت سرب باشد. در نهایت فعالیت بیشتر آنزیم سوپراکسید دیسموتاز نسبت به سایر آنزیم‌های مورد بررسی و پرولین نسبت به افزایش غلظت سرب می‌تواند موجب کاهش آسیب واردہ به گیاه شده باشد.

صفات در سطح برگ (۷۵ درصد) و وزن خشک ریشه (۸۳ درصد) مشاهده شد. همچنین کلروفیل b (۴۶ درصد) نسبت به کلروفیل a (۲۱ درصد) با افزایش غلظت سرب از صفر به ۴۰۰۰ میلی‌گرم سرب در کیلوگرم خاک حساسیت بیشتری نشان داد. همچنین بیشترین حساسیت در سطوح پایین سرب مشاهده شد به طوری که در اغلب صفات به طور میانگین تا حدود سطح ۱۰۰ میلی‌گرم سرب در کیلوگرم خاک شبیه تغییرات افزایش و سپس با افزایش غلظت سرب تا سطح ۴۰۰۰ میلی‌گرم سرب در کیلوگرم خاک کاهش شبیه خط

منابع

- امانی‌فر، س.، علی‌اصغرزاد، ن.، نجفی، ن.ا.، شاهین، ا. و بلند نظر، ص. (۱۳۹۱) اثر قارچ‌های میکوریز آربوسکولار بر گیاه‌پالایی سرب توسط سورگوم (*Sorghum bicolor* L.). نشریه دانش آب و خاک ۲۲: ۱۵۵-۱۷۰.
- امیرجانی، م.، آبنوسی، م.ح.، مهدیه، م. و قره‌شیخ‌لو، س. (۱۳۹۴) بررسی اثر سرب بر فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانتی، میزان پرولین و آکالالوئید کل کالوس گیاه پریوش، مجله سلول و بافت ۶: ۹-۲۱.
- بلوچی، ح. ر.، امینی، ف.، موحدی دهنی، م. و عطارزاده، م. (۱۳۹۶) تأثیر بسترهای مختلف کاشت بر صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیابی لوبیا چیتی (*Phaseolus vulgaris* L.) تحت تنش فلزات سنگین، مجله فرآیند و کارکرد گیاهی ۶: ۲۷-۳۹.
- پارسادوست، ف.، بحرینی‌نژاد، ب.، صفری سنجانی، ع. ا. و کابلی، م. م. (۱۳۸۶) گیاه‌پالایی عنصر سرب توسط گیاهان مرتعی و بومی در خاک‌های آلوده منطقه ایران کوه (اصفهان)، فصلنامه پژوهش و سازندگی ۲۰: ۵۴-۶۳.
- تشکری فرد، ا.، تقوی قاسمخیلی، ف.، پیردشتی، ه. ا.، تاجیک قبری، م. ع. و بهمنیار، م. ع. (۱۳۹۶) تأثیر همزیستی قارچ *Trichoderma atroviride* بر ویژگی‌های رشد و عملکرد دو رقم کلزا (*Brassica napus* L.) در خاک آلوده تیمار شده با نیترات مس، نشریه پژوهش‌های زراعی ایران ۱۵: ۷۴-۸۶.

- تقریبان، م.، پوزش، و. و خورشیدی، م. (۱۳۹۴) اثر نیکل بر شاخص‌های رشد، محتوی رنگیزه‌های فتوستتری، پروتئین، قندهای محلول، پرولین و میزان انباستگی نیکل در گیاه گشنیز، نشریه تحقیقات کاربردی اکوفیزیولوژی گیاهی ۲: ۵۹-۷۴.
- جمالی حاجیانی، ن.، قادریان، س.م. و کریمی، ن. (۱۳۹۵) بررسی جذب، انباستگی و مقاومت به آنتیموان در گیاه *Tanacetum polycephalum* مجله پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست‌شناسی ایران) ۲۹: ۴۹۴-۵۰۵.
- خداوردی‌لو، ح.، رسولی صدقیانی، م.ح. و کریمی، ا. (۱۳۹۲) تأثیر مایه‌زنی میکروبی یک خاک آلوده به سرب بر رشد، برخی ویژگی‌های فیزیولوژیک و جذب و انتقال سرب، آهن و روی توسط گل گندم (*Centaurea cyanus*), نشریه مدیریت خاک و تولید پایدار ۳: ۷۶-۹۳.
- خطیب، م.، راشد محصل، م.ح.، گنجعلی، ع. و لاهوتی، م. (۱۳۸۷) تأثیر غلظت‌های مختلف نیکل بر خصوصیات مورفو‌فیزیولوژیکی گیاه جعفری (*Petroselinum crispum*), مجله پژوهش‌های زراعی ایران ۶: ۲۹۵-۳۰۲.
- سلطانی، ف.، قربانی، م. و منوچهری کلاتری، خ. (۱۳۸۵) اثر کادمیم بر مقدار رنگیزه‌های فتوستتری، قندها و مالون دآلدئید در گیاه کلزا (*Brassica napus L.*), مجله زیست‌شناسی ایران ۱۹: ۱۳۶-۱۴۵.
- فاطمی، ح.، اسماعیل‌پور، ب.، اشرف سلطانی طلارود، ع. و نعمت‌اللهزاده، ع. (۱۳۹۶) تأثیر محلول‌پاشی نانو ذرات سیلیسیم بر برخی شاخص‌های مورفو‌لولوژیک و بیوشیمیایی گیاه گشنیز (*Coriandrum sativum L.*) در شرایط تنش فلز سنگین سرب، دوماهنامه علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران ۳۳: ۸۵۳-۸۷۰.
- کارگر خرمی، س. و جامعی، ر. (۱۳۹۴) تأثیر غلظت‌های مختلف مس و نیکل بر روی برخی شاخص‌های رشدی و فیزیولوژیکی در گیاه بامیه (*Hibiscus esculentus L.*), مجله فرآیند و کارکرد گیاهی ۴: ۴۴-۳۳.
- کرامت، ب.، دریابی، ف. و آروین، م.ج. (۱۳۹۳) بررسی اثرات متقابل سلنیوم و کادمیوم بر محتوای آلدئیدها، پراکسیدهیدروژن و فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاه‌چه گندم رقم کویر، مجله پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست‌شناسی ایران) ۲۷: ۴۹۰-۵۰۰.
- کریمی شروdanی، ف.، سپهری، م.، افیونی، م. و حاج عباسی، م.ع. (۱۳۹۳) اثر قارچ اندوفاکیت *Piriformospora indica* بر افزایش مقاومت گیاه جو به فلز سرب، نشریه علوم آب و خاک (علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی) ۱۹: ۳۱۱-۳۲۰.
- کریمی، ن.، خان احمدی، م. و مرادی، ب. (۱۳۹۲) اثر غلظت‌های مختلف سرب بر برخی پارامترهای فیزیولوژیکی گیاه کنگرفرنگی، مجله پژوهش‌های تولید گیاهی ۲۰: ۴۹-۶۲.
- موحدپور، ف.، دیاغ محمدی‌نسب، ع.، نجفی، ن.ا. و امینی، ر.ا. (۱۳۹۳) اثر اسید هیومیک و EDTA بر ویژگی‌های رشدی، عملکرد و اجزای عملکرد دانه کلزا تحت تنش سمیت سرب، ویژه‌نامه نشریه دانش کشاورزی و تولید پایدار ۲۴: ۱۰۳-۱۲۱.
- مهریان، پ. و عبدالزاده، ا. (۱۳۹۱) اثرات بیشبور آهن در فعالیت آنتی اکسیدانی و الگوی الکتروفورزی پروتئین‌ها در گیاه برنج رقم شفق، مجله پژوهش‌های تولید گیاهی ۱۹: ۸۵-۱۰۶.
- نورانی آزاد، ح.، حاجی باقری، م.ر.، کفیل زاده، ف. و نجفیان، م. (۱۳۹۰) مطالعه برخی ویژگی‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیائی یک رقم گلرنگ (*Carthamus tinctorius L.*) به سمیت سرب، فصلنامه علمی-پژوهشی گیاه و زیست‌بوم ۷: ۶۳-۷۴.
- یعقوبیان، ی.، سیادت، س.ع.، مرادی‌تلاوت، م.ر. و پیردشتی، ه.ا. (۱۳۹۵) کمی‌سازی پاسخ رشد رویشی و مؤلفه‌های فلورسانس کلروفیل گیاه دارویی بادرنجبویه (*Melissa officinalis L.*) به غلظت کادمیوم در خاک، نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی ۲۳: ۱۶۵-۱۸۵.
- یوسفی‌راد، م.، اصغری، م.، معصومی زواریان، ا. و فضل‌الهی، ح. (۱۳۹۵) مقایسه اثرات همزیستی دو سویه میکوریزا بر توان گیاه‌پالایی سرب بادرنجبویه (*Melissa officinalis L.*), دو فصلنامه بیوتکنولوژی و میکرو‌بیولوژی کاربردی ۵: ۱۱-۱۱.

- Abi, H. (1984) Catalase in vitro. Method of Enzymology 105: 121-126.
- Akinci, I. E., Akinci, S. and Yilmaz, K. (2010) Response of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) to lead toxicity: growth, element uptake, chlorophyll and water content. African Journal of Agriculture Research 5: 416-423.
- Ali, B. M., Vajpayee, P., Tripathi, R. D., Rai, U. N., Singht, S. N. and Singhgh, S. P. (2003) Phytoremediation of lead, nickel, and copper by salix acmophylla boiss. : role of antioxidant enzymes and antioxidant substances. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 70: 462-469.
- Ashraf, M. Y., Azhar, N., Mahmood, k., Ahmad, R. and Waraich, E. H. (2012) Oilseed *Brassica napus* and phytoremediation of lead. In: Phytotechnologies: Remediation of Environmental Contaminants (eds. Anjum, A., Pereira, N. M. E. I., Ahmad, Duarte, A. C., Umar, Sh. And Khan N. A.) Pp. 151-178. CRC Press, Boca Raton, United Stated.
- Baker, A. J. M., McGrath, S. P., Reeves, R. D. and Smith, J. A. C. (2000) Metal Hyperaccumulator plants: A review of the ecology and physiology of a biochemical resource for phytoremediation of metal polluted soil. In: Phytoremediation of Contaminated Soil and Water (eds. Terry, N. and Banuelos, G.S) Pp. 85-107. Lewis Publications, Boca Raton, United Stated.
- Bakhshandeh, E., Soltani, A., Zeinali, E. and Kallate-Arabi, M. (2012) Prediction of plant height by allometric relationships in field-grown wheat. Cereal Research Communications 40: 487-496.
- Bates, L. S., Waldren, R. P. and Teare, I. D. (1973) Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant and Soil 39: 205-207.
- Beauchamp, C. and Fridovich, I. (1971) Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. Analytical Biochemistry 44: 276-287.
- Behnamnia, M., Manouchehri Kalantari, K. and Ziae, J. (2009) Effects of brassinosteroid on the induction of biochemical changes in *Lycopersicon esculentum* under drought stress. Turkish Journal of Botany 33: 417-428.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitative titration of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.
- Cenkci, S., Cioerci, I. H., Yildiz, M., Oezay, C., Bozdao, A. and Terzi, H. (2010) Lead contamination reduces chlorophyll biosynthesis and genomic template stability in *Brassica rapa* L. Environmental Experimental Botany 67: 467-470.
- Cho, U. H. and Park, J. O. (2000) Mercury- induced oxidative stress in tomato seedlings. Plant Science 156:1-9.
- Faiazan, S., Kausar, S. and Perveen, R. (2011) Varietal differences for cadmium-induced seedling mortality, foliar toxicity symptoms, plant growth, proline and nitrate reductase activity in chickpea (*Cicer arietinum* L.). Biology and Medicine 3: 196-206.
- Foroozesh, P., Bahmani, R., Pazouki, A., asgharzadeh, A., rahimdabbagh, S. and Ahmadvand, S. (2012) Effect of cadmium stress on antioxidant enzymes activity in different bean genotypes. ARPN Journal of Agricultural and Biological Science 7: 351- 356.
- Garg, N. and Aggarwal, N. (2012) Effect of mycorrhizal inoculations on heavy metal uptake and stress alleviation of *Cajanus cajan* (L.) Millsp. genotypes grown in cadmium and lead contaminated soils. Plant Growth Regulation 661: 9-26.
- Garnczarska, M. and Ratajczak, L. (2000) Metabolic responses of *lemon minor* to lead ions, II. induction of antioxidant enzymes in roots. Acta Physiologiae Plantarum 22: 429-432.
- Georgieva, V. and Tasev, C. (1997) Growth, yield, lead, zinc and cadmium content of radish, pea, and pepper plants as influenced by level of single and multiple contamination of soil. Bulgarian Journal of Plant Physiology 23: 12-23.
- Hakimi, L., Matinizadeh, M., Shirvani, A. and Khalighi, A. (2015) Physiological and Biochemical Response of *Berberis integerrima* and *Cercis siliquastrum* to cadmium and lead stress. Advances in Bioresearch 6: 21- 24.
- Hosseini, Z. and Poorakbar, L. (2013) Zinc toxicity on antioxidative response in (*Zea mays* L.) at two different pH. Journal of Stress Physiology and Biochemistry 9: 66-73.
- Jain, R., Srivastava, S., Solomon, S., Shrivastava, A.K. and Chandra, A. (2010) Impact of excess zinc on growth parameters, cell division, nutrient accumulation, photosynthetic pigments and oxidative stress of sugarcane (*Saccharum* spp.). Acta Physiologiae Plantarum 32: 979-986.
- Larbi, A., Morales, F. and Abadia, A. (2003) Effect of Cd and Pb in sugar beet Plants grown in nutrient solution: induced Fe deficiency and growth inhibition. Functional Plant Biology 20: 1453-1464.
- Li, X., Li, W., Chu, L., White Jr, J. F., Xiong, Z. and Li, H. (2016) Diversity and heavy metal tolerance of endophytic fungi from *Dysphania ambrosioides*, a hyperaccumulator from Pb-Zn contaminated soils. Journal of Plant Interactions 11: 186-192.
- Lin, C. J., Liu, L., Liu, T., Zhu, L., Sheng, D. and Wang, D. (2009) Soil amendment application frequency contributes to phytoextraction of lead by sunflower at different nutrient levels. Environmental and Experimental Botany 65: 410- 416.
- Lutts, S., Kinet, J. M. and Bouharmont, J. (1995) Changes in plant response to NaCl during development of rice (*Oryza sativa* L.) varieties differing in salinity resistance. Journal of Experimental Botany 46: 1843-1852.
- Malar, S., Sahi, S. V., Favas, P. J. C. and Venkatachalam, P. (2015) Assessment of mercury heavy metal toxicity-

- induced physiochemical and molecular changes in *Sesbania grandiflora* L. International Journal of Environmental Science and Technology 12: 3273- 3282.
- Manivasagaperumal, R., Vijayarengan, P., Balamurugan, S. and Thiagarajan, G. (2011) Effect of copper on growth, dry matter yield and nutrient content of *Vigna Radiata* L. Journal of Phytology 3: 53-62.
- Molassiotis, A., Tanouc, G., Diamantidis, G. and Patakas, A. (2005) Effects of 4- month Fe deficiency exposure on Fe reduction mechanism. Photosynthetic gas exchange chlorophyll fluorescence and antioxidant defense in two peach rootstock different in Fe deficiency tolerance. Journal of Plant Nutrition 25: 843- 860.
- Nikolic, N., Kogic, D., Pilipovic, A., Pajivic, S., Krstic, B., Borisev, M. and Orlovic, S. (2008) Responses of hybrid poplar to cadmium stress photosynthetic characteristics, cadmium and proline accumulation and antioxidant enzyme activity. Acta Biologica Cracoviensia. Series botanica 50: 95-103.
- Pandey, N. and Sharma, C. P. (2002) Effect of heavy metals Co^{2+} , Ni^{2+} and Cd^{2+} on growth and metabolism of cabbage. Plant Science 163: 753-758.
- Piotrowska, A., Bajguz, A., Godlewska-Z-Ylkiewicz, B. and Zambrzycka, E. B. (2010) Changes in growth, biochemical components, and antioxidant activity in aquatic plant *Wolffia arrhiza* (Lamiaceae) exposed to cadmium and lead. Archives Environmental Contamination and Toxicology 58: 594-604.
- Porra, R. J. (2002) The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls *a* and *b*. Photosynthesis Research 73: 149-156.
- Rascio, N. and Navari-Izzo, F. (2011) Heavy metal hyperaccumulating plants: How and why do they do it? And what makes them so interesting? Plant Science 180: 169–181.
- Ritchie, S. W., Nguyen, H. T. and Holaday, A. S. (1990) Leaf water content and gas exchange parameters of two wheat genotypes differing in drought resistance. Crop Science 30: 105-111.
- Sanchez-Viveros, G., Gonzalez-Mendoza, D., Alarcon, A. and Ferrera-Cerrato, R. (2010) Copper Effects on Photosynthetic Activity and Membrane Leakage of *Azolla filiculoides* and *A. caroliniana*. International Journal of Agriculture and Biology 12: 365- 368.
- Sergive, I., Alexieva, V. and Karanov, E. (1997) Effect of spermine, atrazine and combination between them on some endogenous protective systems and stress markers in plants. Proceedings of the Bulgarian Academy of Sciences 51: 121-124.
- Shah, K., Kumar, R. G., Verma, S. and Dubey, R. S. (2001) Effect of cadmium on lipid peroxidation, superoxide anion generation and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. Plant Science 161: 1135–1144.
- Sharma, P. and Dubey, R.S. (2005) Lead toxicity in plants. Plant physiology 17:35-52.
- Sharma, S. S., Kaul, S., metwally, A., Goyal, K. C., Finkemeier, I. and Dietz, K. J. (2004) Cadmium toxicity to barley (*Hordeum vulgar*) as affected by varying Fe nutritional status. Plant Science 166: 1287-1295.
- Shu, X., Yin, L., Zhang, Q. and Wang, W. (2012) Effect of Pb toxicity on leaf growth, antioxidant enzyme activities, and photosynthesis in cuttings and seedlings of *Jatropha curcas* L. Environmental Science and Pollution Research 19: 893- 902.
- Siddiqui, Z. S. (2013) Effects of double stress on antioxidant enzyme activity in *Vigna radiata* (L.). Wilczek. Acta Botanica Croatica 72: 145-156.
- Sinha, j. and Sharivastava, S. (2012) Pot experiment study showed the effect of Pb and Cd in *Brassica juncea* L. by chlorophyll and ascorbic acid content estimation. Journal of Current Pharmaceutical Research 9: 33-36.
- Solgi, T., Moradyar, M., Zamani, M. R. and Motallebi, M. (2015) Transformation of canola by Chit33 gene towards improving resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. Plant Protection Science 51: 1-6.
- Stewart, R. R. C. and Bewley, J. D. (1980) Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes. Plant Physiology 65: 245–248.
- Tang, W. and Newton, J. R. (2005) Peroxidase and catalase activities are involved in direct adventitious shoot formation induced by thidiazuron in eastern white pine (*Pinus scorba* L.) zygotic embryos. Plant Physiogy Biochemistry 43: 760-769.
- Verma, S., and Dubey, R. S. (2003) Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. Plant Science 164: 645-655.
- Viveros, S., Mendoza, G., Alarkon, D. and Cerrato, R. (2010) Copper effects on photosynthetic activity and membrane leakage of *Azolla filiculoides* and *A. caroliniana*. International Journal of Agriculture and Biology 12: 365- 368.
- Wahid, A. (2007) Physiological implications of metabolites biosynthesis in net assimilation and heat stress tolerance of sugarcane (*Saccharum officinarum*) sprouts. Journal Plant Research 120: 219–228.
- Winter Sydnor, M. E. and Redente, E. F. (2002) Reclamation of high elevation, acidic mine waste with organic amendments and topsoil. Journal of Environmental Quality 31: 1528-1537.
- Xue, Z. C., Gao, H. Y., and Zhang, L. T. (2013) Effects of cadmium on growth, photosynthetic rate, and chlorophyll content in leaves of soybean seedlings. Biologia Plantarum 57: 587-590.
- Yoshimura, K., Yabuta, Y., Ishikawa, T. and Shigeoka, S. (2000) Expression of spinach ascorbate peroxidase isoenzymes in response to oxidative stresses. Plant Physiology 123: 223-234.

Quantifying the response of growth, some physiological and biochemical traits of canola (*Brassica napus L.*) plant to lead concentration in the soil

Mehranoosh Emamian Tabarestani¹, Hemmatollah Pirdashti^{2*}, Mohammad Ali Tajik Ghanbary³, Fardin Sadeghzadeh⁴

¹. Department of Agronomy, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University

². Department of Agronomy, Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University

³. Department of Plant Protection, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University

⁴. Department of Soil Science, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University

(Received: 28/09/2018, Accepted: 17/12/2018)

Abstract

In order to quantify the response of canola (*Brassica napus L.*) plant to lead different levels, an experiment was conducted in completely randomized design with three replications. Treatments were twelve lead concentrations from lead nitrate source (0, 10, 50, 100, 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000 mg/kg soil). Results showed that decrease in vegetative traits fitted with segmented model when lead concentration increased. Also, chlorophyll *a*, *b*, *a+b* contents and SPAD index value declined about 23, 47, 30 and 22%, respectively. Chlorophyll *a/b* ratio (*a/b*) and carotenoid, however, showed increasing trend by 46 and 39% in 4000 mg/kg of soil as compared to the control. In addition, the activity of catalase, peroxidase and ascorbate enzymes increased until about 10, 447 and 18 mg/kg of soil, respectively and then decreased when lead concentration was increased. Superoxide dismutase activity in 4000 mg/kg of soil was about 2.3 times greater than the control. Also, malon-di-aldehyde (MDA) and H₂O₂ concentrations in 4000 mg/kg of soil were about two times and proline concentration was about 12% greater than the control. In conclusion, up to 100 mg/kg of soil vegetative traits and photosynthetic pigments particularly showed the highest sensitivity. Among photosynthetic pigments, the sensitivity of chlorophyll *b* was higher than chlorophyll *a*. Also, the higher activity of superoxide dismutase enzyme than the other enzymes and proline can be a possible reason for ameliorating the damage of high levels of lead in canola.

Keywords: Antioxidant, proline, photosynthetic pigments, lead, canola

Corresponding author, Email: h.pirdashti@sanru.ac.ir