

کمی سازی 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 کمی سازی پاسخ گیاه کلزا (*Brassica napus* L.) به سطوح مختلف سرب، آزمایشی در سه تکرار با دوازده غلظت عنصر سرب از منبع نترات سرب (صفر، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، 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 یافتند. همچنین محتوی کلروفیل a و b و شاخص سبزی‌نگی برگ (عدد اسپد) به ترتیب حدود ۲۳، ۲۷، 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 یافتند. 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 یافتند. در مجموع، صفات رویشی و رنگی‌های فتوسنتزی در سطوح پایین سرب، تا سطح ۱۰۰ میلی‌گرم سرب در کیلوگرم خاک، بیشترین حساسیت را نشان دادند. در میان رنگی‌های فتوسنتزی 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 وارده به کلزا باشد.

کلمات کلیدی: آنتی‌اکسیدانت، پرولین، رنگی‌های فتوسنتزی، سرب، کلزا

مقدمه

افزایش داده و مسائل جدی زیست‌محیطی را ایجاد می‌کند. به طوری که 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;)

امروزه یکی از مشکلات زیست‌محیطی عمده در جوامع بشری آلودگی خاک به انواع فلزات سنگین می‌باشد که صنعتی شدن، کشاورزی مدرن و شهرنشینی ورود فلزات سنگین به خاک را

* نویسنده مسؤول، نشانی پست الکترونیکی: h.pirdashti@sanru.ac.ir

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 الکترولیت 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 غلظت‌های بالایی از فلزات سنگین را بدون بروز علائم 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 (Asteraceae)، شب‌بو (Brassicaceae)، میخک (Caryophyllaceae)، بقولات (Fabaceae)، نعنای (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، محتوا، 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 به‌عنوان 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 قابل‌توجهی دارد (ashraf *et al.*, 2012). سرب به دلیل انباشت 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 تنش سرب موجب کاهش طول ریشه، ساقه و تولید زیست‌توده در گیاه ذرت گردید (Lin *et al.*, 2009). به‌علاوه، سرب سبب اختلال در سیستم فیزیولوژیکی گیاهان (Georgieva and Tasev, 1997)، مسمویت گیاه، زردی برگ‌های جوان، کاهش جذب برخی عناصر ضروری، کاهش فتوسنتز و فعالیت‌های داخل سلول می‌گردد (Larbi *et al.*, 2003). همچنین سرب بر فتوسنتز گیاهان از طریق کاهش بیوسنتز کلروفیل ناشی از کاهش غلظت عناصر ضروری منیزیم و آهن در برگ‌ها، ایجاد کمپلکس با پروتئین‌های فتوسنتزی و افزایش فعالیت کلروفیلاز جهت تجزیه کلروفیل بر فتوسنتز گیاهان اثر منفی می‌گذارد (Sharma and Dubey, 2005). در آزمایشی با افزایش سرب میزان کلروفیل *a*، *b* و کلروفیل کل در کنگرفرنگی (*Cynara scolymus* L.) کاهش یافت (کریمی و همکاران، ۱۳۹۲). یکی از مهم‌ترین دلایل کاهش کلروفیل‌ها تخریب آن‌ها به‌وسیله گونه‌های فعال اکسیژن می‌باشد که در تنش عناصر سنگین در گیاهان تشکیل می‌شود (Sharma *et al.*, 2004). سرب نیز به‌ویژه در غلظت‌های بالا موجب تنش 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 غلظت سرب فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپا (*Glycine max* (L). Merril) و برنج (*Oryza sativa* L.) افزایش یافت (Sharma and Dubey, 2005). با ایجاد سمیت

بیوشیمیایی گیاه کلزا به غلظت‌های 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 غلظت عنصر سرب از منبع نترات سرب به صورت خاک کاربرد $(Pb(NO_3)_2)$ (صفر، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰، ۲۰۰۰، ۲۵۰۰، ۳۰۰۰، ۳۵۰۰، ۴۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک) بود. نیتروژن افزوده شده به خاک توسط نمک نترات سرب، با افزودن مقادیر محاسبه شده اوره به تیمارهای مختلف تصحیح شد. پس از گذشت چهار هفته از مخلوط کردن خاک، بذور کلزا (رقم هایولا ۴۰۱) به مدت ده دقیقه با هیپوکلریت سدیم یک درصد ضدعفونی 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 به ترتیب از خط‌کش مدرج، کولیس دیجیتالی (مدل Guanglu) و نرم‌افزار Digimizer استفاده گردید. سپس 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.

سنجش کلروفیل، کاروتنوئید و شاخص سبزیگی برگ: برای اندازه‌گیری میزان کلروفیل برگ، شش عدد پانچ از برگ‌های

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 ۶۶۵/۲، ۶۵۲/۴ و ۴۷۰ نانومتر به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر (Analytic jena- SPEKOL 1300) قرائت و ثبت گردید. در نهایت میزان کلروفیل (Chl_a) a، (Chl_b) b، کلروفیل کل (Chl_{a+b}) ، نسبت کلروفیل a/b $(Chl_{a/b})$ و کاروتنوئید به ترتیب با استفاده از روابط یک تا پنج محاسبه و بر حسب میکروگرم در میلی‌لیتر گزارش گردید (Porra, 2002). شاخص سبزیگی برگ نیز با استفاده از دستگاه SPAD (SPAD-502 Minolta, Japan) و از سه نقطه برگ اندازه‌گیری و میانگین آن‌ها به عنوان عدد نهایی در محاسبه‌ها مورد استفاده قرار گرفت.

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

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

$$Chl_{a+b} (\mu g/ml) = Chl_a + Chl_b \quad \text{رابطه ۳}$$

$$Chl_{a/b} (\mu g/ml) = Chl_a / Chl_b \quad \text{رابطه ۴}$$

رابطه ۵

$$Carotenoid (\mu g/ml) = (1000 A_{470} - 1.63 Chl_a - 104.96 Chl_b) / 221$$

محتوای نسبی آب برگ: جهت سنجش محتوی نسبی آب برگ (RWC) از آخرین برگ توسعه یافته گیاه نمونه تهیه و بلافاصله وزن تر آن‌ها با ترازوی دقیق اندازه‌گیری شد (FW). سپس نمونه‌های برگ به لوله آزمایش حاوی آب مقطر منتقل و به مدت ۲۴ ساعت نگاه‌داری 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).

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

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

جدول ۱- برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک

هدایت الکتریکی ($ds.m^{-1}$)	اسیدیته pH	پتاسیم (ppm)	فسفر (ppm)	نیتروژن	شن	سیلت درصد (%)	رس درصد (%)	بافت خاک
۱/۴۶	۷/۵۶	۲۷۰	۱۴/۱	۰/۲۵	۲۲/۲	۳۵/۲	۴۲/۶	رسی لومی

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

سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز بر اساس روش Beauchamp و Fridovich (۱۹۷۱) انجام شد. محلول واکنش در حجم نهایی شامل ۸۳۵ میکرولیتر بافر فسفات سدیم ۵۰ میلی‌مولار (pH=۸)، ۳۳ میکرولیتر نیتروبلوتترازولیوم ۰/۷۵ میلی‌مولار، ۳۳ میکرولیتر ریبولوین و ۳۳ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. تغییرات جذب محلول واکنش نسبت به شاهد در طول موج ۵۶۰ نانومتر اندازه‌گیری و فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز براساس واحد بر میلی‌گرم پروتئین بیان گردید.

فعالیت آنزیم کاتالاز به روش Abi (۱۹۸۴) و بر پایه تجزیه پراکسید هیدروژن توسط آنزیم کاتالاز اندازه‌گیری شد. مخلوط واکنش شامل سه میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار، ده میکرولیتر پراکسید هیدروژن 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 اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد.

مخلوط واکنش آنزیم گایاکول پراکسیداز شامل یک میلی‌لیتر بافر فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار (pH=۷)، ۲۵۰ میکرولیتر EDTA ۰/۱ میلی‌مولار، یک میلی‌لیتر گایاکول ۵ میلی‌مولار، یک میلی‌لیتر پراکسید هیدروژن 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 ۴۷۰ 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=۷، ۲۵۰ میکرولیتر آسکوربات ۱ میلی‌مولار، ۲۵۰ میکرولیتر

هر نمونه با استفاده از دستگاه EC متر (CON 410) اندازه‌گیری شد (EC₁). به منظور اندازه‌گیری میزان کل نشت الکترولیت‌ها 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 (EC₂). سپس درصد نشت الکترولیت‌ها با استفاده از رابطه ۷ محاسبه گردید (Lutts et al., 1995).

$$\text{رابطه ۷} \quad EC_1 / EC_2 \times 100 = \text{درصد نشت الکترولیت}$$

صفات بیوشیمیایی: میزان پراکسید هیدروژن با استفاده از روش Sergive و همکاران (۱۹۹۷) و براساس واکنش H₂O₂ با یدیدپتاسیم (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 ۱۲۰۰۰g سانتیفریوژ گردید. سپس به ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول رویی، ۰/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰ میلی‌مولار و اسیدیته ۷/۵ و یک میلی‌لیتر یدید پتاسیم یک مولار اضافه گردید. مخلوط واکنش به مدت یک ساعت در تاریکی در دمای اتاق نگهداری و سپس جذب نمونه‌ها در ۳۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

میزان پراکسیداسیون لیپیدی غشا نیز براساس 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 هموزن و به مدت ده دقیقه در ۱۵۰۰۰xg سانتیفریوژ گردید و سپس دو میلی‌لیتر از سوپرناتانت حاصل با چهار میلی‌لیتر از محلول ۲۰٪ تری کلرواستیک اسید محتوی ۰/۵٪ تیوباریتوریک 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 سانتیفریوژ شد. در نهایت 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 برازش معادله خطی (رابطه ۸) و دو تکه‌ای (رابطه ۹) (Bakshshandeh et al., 2012) و برای رسم منحنی‌ها از نرم‌افزار Excel استفاده شد.

$$y = b_1x + a \quad \text{(رابطه ۸)}$$

$$y = b_1x + a \quad \text{if } x \leq x_0 \quad \text{(رابطه ۹)}$$

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

در این روابط a: عرض از مبدأ در سطح بدون تنش (غلظت صفر سرب). b_1 و b_2 : شیب تغییرات مؤلفه به ترتیب در مرحله ۱ و ۲. x_0 : نقطه پرخش بین دو مرحله.

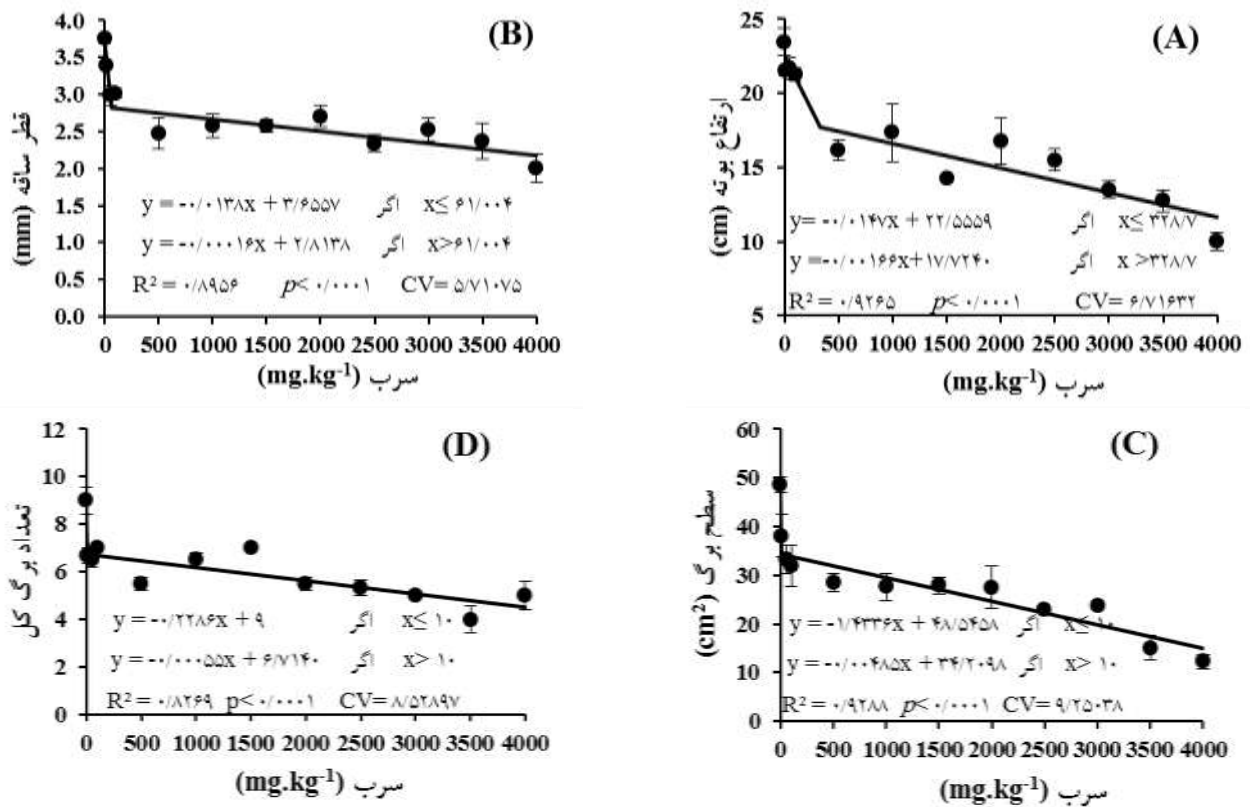
نتایج و بحث

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 غلظت سرب از صفر به ترتیب تا حدود ۳۲۹، ۶۱، ۱۰ و ۱۰ میلی‌گرم سرب در کیلوگرم خاک با شیب ۰/۰۱۴۷، ۰/۰۱۳۸، ۰/۰۳۳۶ و ۰/۲۲۸۶ و کاهش و سپس با شیب ۰/۰۰۱۶۶، ۰/۰۰۰۱۶، ۰/۰۰۰۴۸۵ 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 بادنجنویه (*Melissa officinalis* L.) نیز کاهش این صفات با افزایش غلظت کادمیم از صفر تا ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک گزارش شد (یعقوبیان و همکاران، ۱۳۹۵). همچنین مشاهده شد با افزایش غلظت عنصر سنگین سرب و مس به ترتیب ارتفاع بوته در بادنجنویه (یوسفی‌راد و همکاران، ۱۳۹۵) و کلزا (موحدپور و همکاران، ۱۳۹۳) روند کاهشی داشت. سطح برگ در سورگوم (امانی‌فر و همکاران، ۱۳۹۱) نیز با افزایش غلظت سرب کاهش یافت. در

EDTA ۰/۴ میلی‌مولار، ۱۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۱۰ میلی‌مولار، 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 بردفورد 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 سانتریفوژ نموده تا مواد اضافی از محلول جدا گردد. می‌توان به جای سانتریفوژ 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

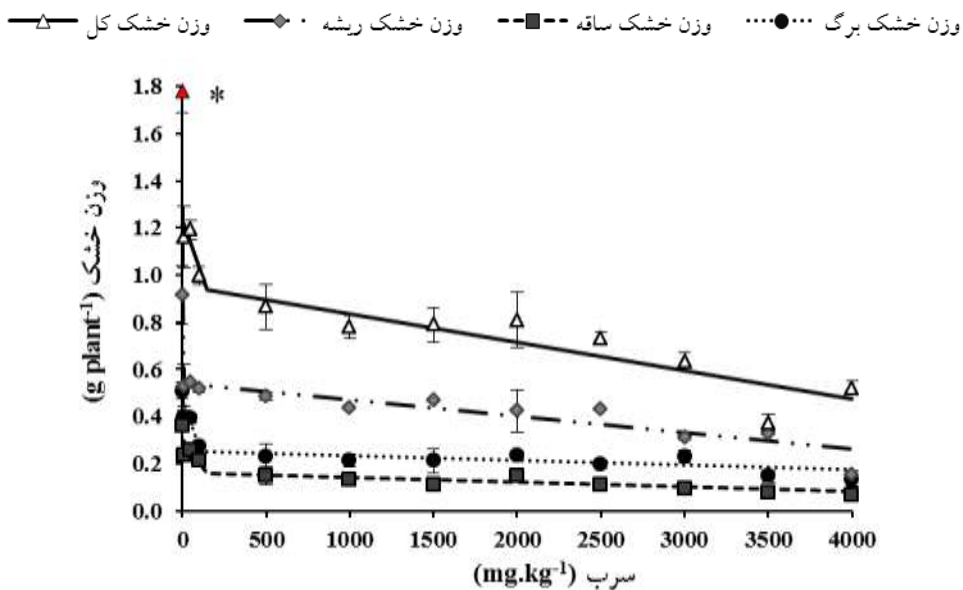


شکل ۱- روند تغییرات ارتفاع بوته (A)، قطر ساقه (B)، سطح برگ (C) و تعداد برگ (D) گیاه کلزا در پاسخ به افزایش غلظت سرب خاک با استفاده از مدل دو تکه‌ای (رابطه ۹). میله‌ها نشان دهنده خطای استاندارد (SE) است.

مشاهده گردید. این نتایج با پژوهش‌های یوسفی‌راد و همکاران (۱۳۹۵) در بادرنجبویه، نورانی‌آزاد و همکاران (۱۳۹۰) در گلرنگ، کریمی‌شرودانی 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 (Xue et al., 2013) و مس و نیکل در گیاه بامیه (*Hibiscus esculentus* L.) (کارگر خرمی و جامعی، ۱۳۹۴) مشاهده شد. در همین رابطه پژوهشگران بیان کردند روش‌های مختلفی مانع رشد گیاهان توسط فلزات سنگین می‌شود. به این‌صورت 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 سیتولاسم در متابولیسم طبیعی سلول اختلال ایجاد کرده و باعث کاهش رشد می‌گردند (Molassiotis et al., 2005). به‌علاوه کاهش

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 به‌دلیل دریافت نور و فتوسنتز 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 به‌صورت رابطه‌ی دو تکه‌ای برازش شد. شیب 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 به‌میزان حدود ۴۷، ۴۷، ۴۱، ۲۳ درصد نسبت به شاهد با شیب بیشتری کاهش یافت. اما پس از آن کاهش با شیب 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 برازش منحنی استفاده نشده است.

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

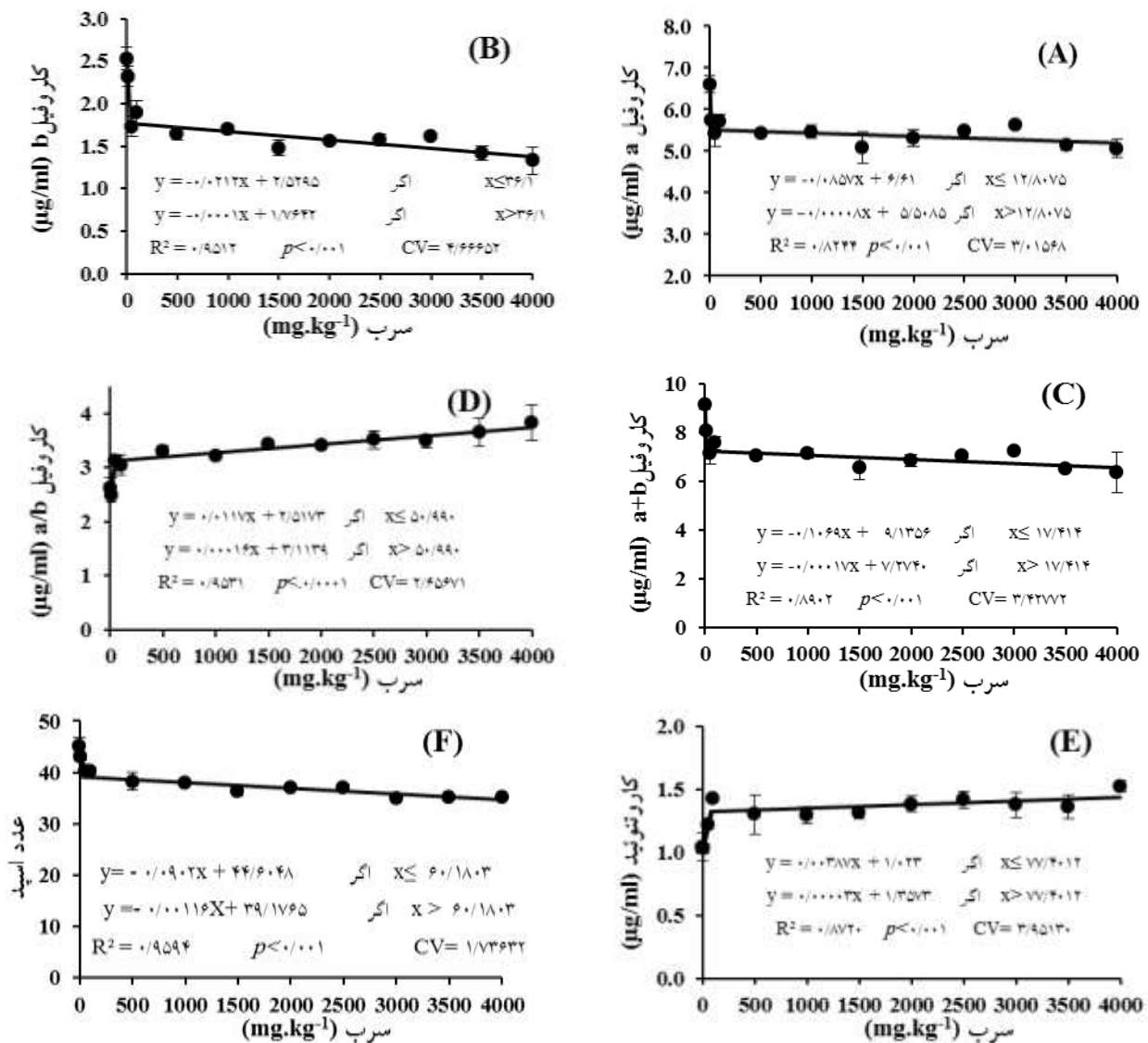
صفات	$a \pm SE$	$b_1 \pm SE$	$b_2 \pm SE$	$x_0 \pm SE$	R^2	RMSE	CV	Sig
وزن خشک برگ	$0/472 \pm 0/025$	$-0/00198 \pm 0/000441$	$-0/00002 \pm 0/000011$	$111/9 \pm 22/7$	$0/9317$	$0/02996$	$11/40$	$<0/0001$
وزن خشک ساقه	$0/302 \pm 0/024$	$-0/001 \pm 0/000424$	$-0/00002 \pm 0/00001$	$143/7 \pm 54/4$	$0/8928$	$0/02822$	$17/57$	$<0/0001$
وزن خشک ریشه	$0/913 \pm 0/047$	$-0/0372 \pm 0/00519$	$-0/00007 \pm 0/000010$	$10 \pm 0/00$	$0/9447$	$0/04331$	$9/39$	$<0/0001$
وزن خشک کل	$1/22 \pm 0/090$	$-0/00187 \pm 0/00139$	$-0/00012 \pm 0/000027$	$149/4 \pm 90$	$0/9113$	$0/07484$	$9/30$	$<0/0001$

a: عرض از مبدأ در سطح بدون تنش (غلظت صفر سرب). b_1 و b_2 : شیب تغییرات مؤلفه به ترتیب در مرحله ۱ و ۲. x_0 : نقطه پرخش بین دو مرحله. R^2 : ضریب تبیین. RMSE: جذر میانگین مربعات خطا. CV: ضریب تغییرات. Sig: معنی داری مدل. SE: خطای استاندارد.

کلروفیل a ، b 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 سبزیگی برگ را در گیاه بادرنجبویه به صورت خطی در پی داشت (یعقوبیان و همکاران، ۱۳۹۵). کاهش فتوسنتز 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 فتوسنتزی می‌باشد (Manivasagaperumal et al., 2011).

همچنین بر اساس یافته‌های آزمایش حاضر، با افزایش سطوح سرب روند تغییرات رنگی‌های فتوسنتزی گیاه کلزا به صورت معادله دوتکه‌ای 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 سبزیگی برگ ابتدا با شیب $0/086$ ، $0/021$ ، $0/107$ و $0/0902$ و سپس با شیب $0/00008$ ، $0/000017/0001$ و $0/00116$ روند کاهشی را نشان دادند (شکل ۳- C-A و F). در همین‌زمینه کاهش



شکل ۳- روند تغییرات محتوای کلروفیل a (A)، b (B)، کلروفیل a+b (C)، نسبت کلروفیل a بر b (D)، کاروتنوئید (E) و سبزیگی 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 میلی‌گرم 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 نشان‌دهنده حساسیت بیشتر کلروفیل b و کاهش بیشتر آن نسبت به کلروفیل a به افزایش غلظت سرب می‌باشد. در همین‌زمینه مشاهده شده است افزایش غلظت آنتیموان در یک نوع مینا (*Tanacetum polycephalum*) کاهش بیشتر کلروفیل

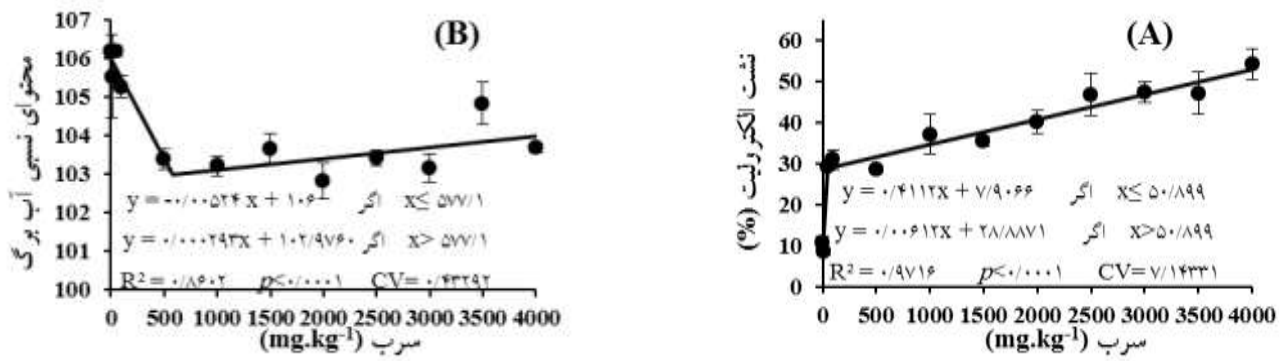
پلاستوکوئینون و کاروتنوئیدها، جلوگیری از انتقال الکترون، جلوگیری از فعالیت آنزیم‌های چرخه کالوین و کمبود دی‌اکسید کربن به دلیل بسته شدن روزنه‌ها ایجاد می‌شود (Akinci et al., 2010). یکی از مهم‌ترین دلایل کاهش کلروفیل‌ها تخریب آن‌ها به وسیله گونه‌های فعال اکسیژن می‌باشد که در تنش عناصر سنگین در گیاهان 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).

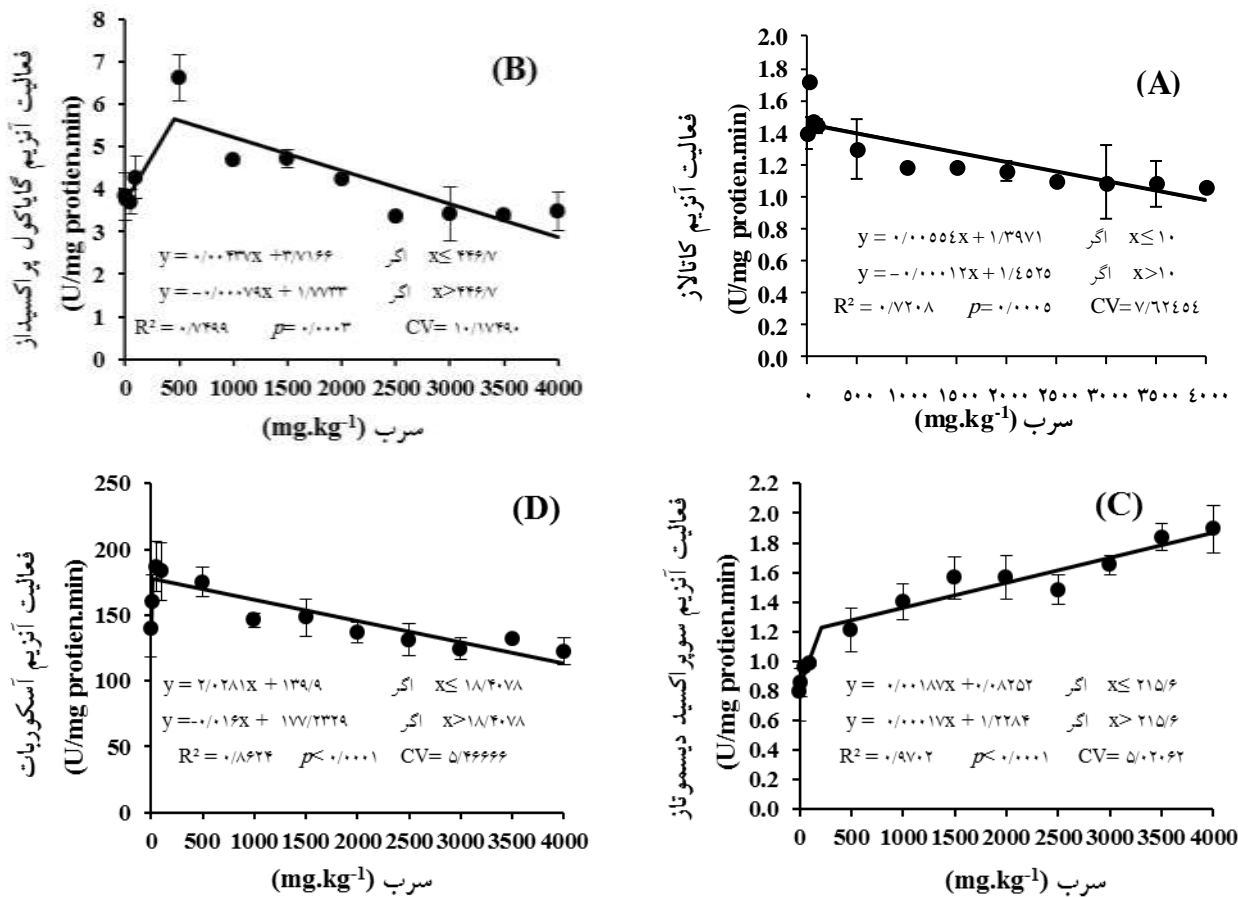
بر اساس نتایج پژوهش حاضر روند فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی گیاه کلزا در پاسخ به ازدیاد غلظت سرب به‌صورت مدل دو تکه‌ای تغییر نمود (شکل ۵). با افزایش غلظت‌های سرب از صفر به ۴۰۰۰ میلی‌گرم سرب در کیلوگرم خاک فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، گایاکول پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز به‌ترتیب ابتدا تا حدود سطوح ۱۰، ۴۷ و ۱۸ میلی‌گرم سرب در کیلوگرم خاک با شیب ۰/۰۰۵، ۰/۰۰۴ و ۲/۰۳ افزایش و سپس با شیب حدود ۰/۰۰۰۱، ۰/۰۰۰۸ 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 به‌میزان ۲۴ درصد بود. در همین زمینه مشاهده شد که تنش سرب موجب کاهش آنزیم کاتالاز و افزایش آنزیم گایاکول پراکسیداز در گیاه گل‌رنگ شد (نورانی‌آزاد و همکاران، ۱۳۹۰). همچنین گزارش شد که دو شکل آیزوایمی آنزیم کاتالاز در برگ‌های گیاهک‌های برنج تحت تیمار سرب بسیار کاهش یافت که موجب کاهش فعالیت این آنزیم شد (Verma and Dubey, 2003). کاهش در این آنزیم می‌تواند به‌دلیل کاهش سنتز این آنزیم یا تغییر در اجتماع زیر واحدهای این آنزیم در اثر سمیت سرب باشد (نورانی‌آزاد و همکاران، ۱۳۹۰). اما عنصر سنگین آنتیموان در مینا (جمالی حاجیانی و همکاران، ۱۳۹۵) و مس و نیکل در بامیه (کارگر خرمی و جمعی، ۱۳۹۴) افزایش فعالیت کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز و همچنین کادمیم در ژنوتیپ‌های نخود افزایش فعالیت کاتالاز، گایاکول پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز را در پی داشت (Foroozesh *et al.*, 2012). در مقایسه، روند تغییر آنزیم سوپراکسید دیسموتاز به‌صورت دو تکه‌ای 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 تنش شوری و عنصر سنگین سرب فعالیت

b نسبت به کلروفیل *a* در پی داشت (جمالی حاجیانی و همکاران، ۱۳۹۵). همچنین این افزایش در میزان کاروتنوئید نیز مشاهده شد به‌طوری که ابتدا تا سطح ۷۷ میلی‌گرم سرب در کیلوگرم خاک با شیب حدود ۰/۰۰۳۹ و سپس با شیب ۰/۰۰۰۳ افزایش یافت (شکل ۳ - E). در همین رابطه گزارش شده است با افزایش غلظت عنصر سنگین نیکل در گیاه گشنیز میزان کاروتنوئید افزایش یافت (تقریباً و همکاران، ۱۳۹۴). چون کاروتنوئیدها علاوه بر این‌که 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 الکترولیت به‌صورت دو تکه‌ای افزایش یافت. به‌طوری‌که تا سطح حدود ۵۱ میلی‌گرم سرب در کیلوگرم خاک با شیب ۰/۴۱۱۲ 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 الکترولیت در گیاه لوبیا چیتی (*Phaseolus vulgaris* L.) شد (بلوچی و همکاران، ۱۳۹۶). چنین افزایشی در نشت الکترولیت در تیمار سرب و کادمیم در نخود (Garg and Aggarwal, 2012) و مس در دو نوع آزولا (Sanchez-Viveros *et al.*, 2010) نیز پیش‌تر گزارش شد. علت افزایش نشت‌پذیری غشاهای زیستی و آسیب به غشاهای زیستی در تنش‌های مختلف محیطی، افزایش پراکسیداسیون لیپیدها می‌باشد (Wahid, 2007). محتوای نسبی آب برگ با افزایش سطوح سرب روند کاهشی را نشان داد. به‌طوری‌که در سطح ۴۰۰۰ میلی‌گرم سرب به میزان حدود ۲/۳ برابر نسبت به شاهد کاهش یافت (شکل ۴ - B). در دو گیاه گل‌گندم (*Centaurea cyanus*) (خداوردی‌لو و همکاران، ۱۳۹۲) و گشنیز (فاطمی و همکاران، ۱۳۹۶) نیز سرب موجب کاهش محتوای نسبی آب برگ گردید. سرب در گیاه با کاهش اندازه و تعداد سلول‌های نگهبان روزنه موجب کاهش انتقال آب به برگ‌ها و کاهش سطح برگ شده و با آسیب



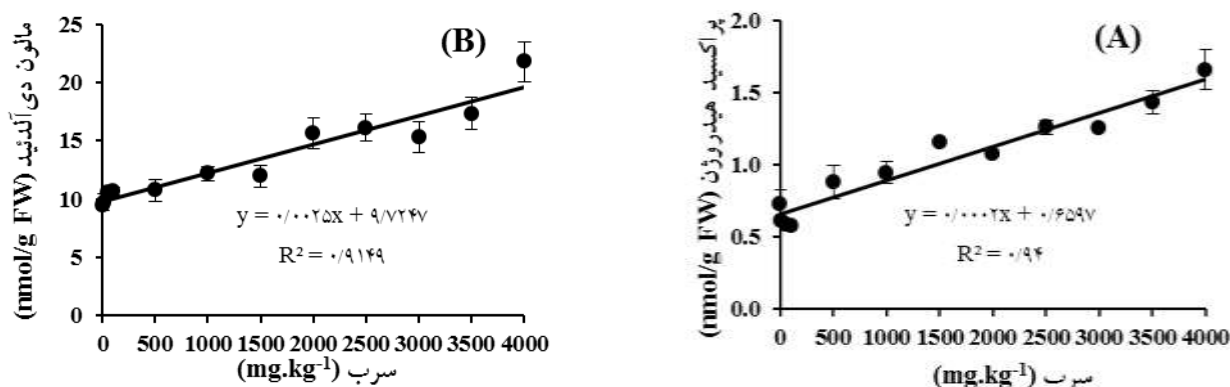
شکل ۴- روند تغییرات نشت الکترولیت (A) و محتوای نسبی آب برگ (B) گیاه کلزا در پاسخ به افزایش غلظت سرب خاک با استفاده از مدل دو تکه‌ای (رابطه‌ی ۹). میله‌ها نشان دهنده خطای استاندارد (SE) است.



شکل ۵- روند تغییرات فعالیت کاتالاز (A)، پراکسیداز (B)، سوپراکسید 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 لوبیا شد که دلیل آن تولید رادیکال‌های اسیژن می‌باشد (Garczarska and Ratajczak, 2000).

سوپراکسید 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 تغییرات میزان مالون دی‌آلدئید (A) و پراکسید هیدروژن (B) در گیاه کلزا در پاسخ به افزایش غلظت سرب خاک با استفاده از مدل خطی (رابطه‌ی ۸). میله‌ها نشان دهنده خطای استاندارد (SE) است.

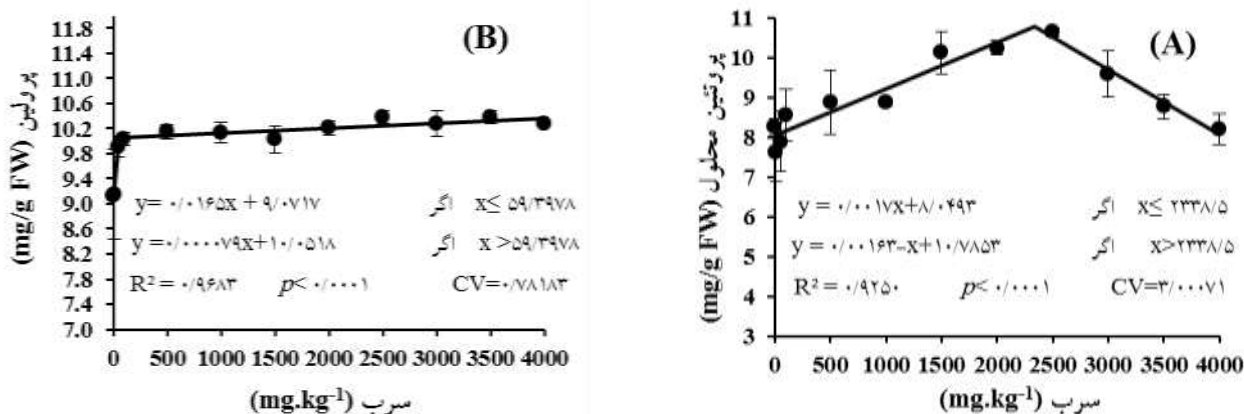
سطح ۲۳۳۸ میلی‌گرم سرب بود و پس از آن مقاومت خود را از دست داد (شکل ۷- A). بیشبود آهن در گیاه برنج نیز کاهش پروتئین محلول در بخش هوایی را به دنبال داشت (مهربان و عبدل‌زاده، ۱۳۹۱). میزان پرولین تا سطح حدود ۵۹ میلی‌گرم سرب با شیب ۰/۰۱۶۵ و سپس با شیب ۰/۰۰۰۰۷ به صورت دوتکه‌ای افزایش یافت. این افزایش در سطح ۴۰۰۰ میلی‌گرم سرب نسبت به شاهد حدود ۱۲ درصد بود (شکل ۷- B). همچنین در گیاه گشنیز افزایش میزان پرولین با افزایش غلظت سرب تا سطح ۱۵۰۰ میلی‌گرم سرب مشاهده شد (فاطمی و همکاران، ۱۳۹۶). نتایج مشابهی در زرشک (*Berberis*) (Hakimi et al., 2015) *integerrima*، پرپوش (*Catharantus roseus*) (امیرجانی و همکاران، ۱۳۹۴)، لوبیا چیتی (بلوچی و همکاران، ۱۳۹۶) و نخود (Faiazan et al., 2011) گزارش شد. پرولین به عنوان اسمولیت انباشته شده در شرایط تنش فعالیت می‌کند (Shah et al., 2001) و تجمع آن در شرایط تنش ممکن است به دلیل اکسیداسیون پرولین یا تحریک سنتز آن از گلوتامات یا افزایش فعالیت آنزیم پروتاز به عنوان اولین نقش محافظت‌کنندگی آنزیم‌های سیتوزولی (حفاظت 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* Bioss) مشاهده شد که میزان پراکسیداسیون لیپید در گیاهان تحت تنش سرب بیشتر بود (Ali et al., 2003). همچنین با افزایش عناصر سنگینی مانند جیوه (Malar et al., 2015)، روی (Hosseini and Poorakbar, 2013)، 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 فعال اکسیژن موجب تنش اکسیداتیو در گیاهان می‌شوند (Jain et al., 2010). از آنجایی که ماکرومولکول‌های لیپیدی، به ویژه لیپیدهای غیر اشباع نسبت به اکسیداسیون توسط انواع اکسیژن فعال حساس هستند، بنابراین افزایش مالون دی‌آلدئید به عنوان محصول پراکسیداسیون لیپیدی، نشان‌دهنده تنش شدید اکسیداتیو در گیاهان در نظر گرفته می‌شود (Behnamnia et al., 2009).

به علاوه با افزایش سطوح سرب تغییرات پروتئین محلول به صورت دوتکه‌ای بود. پروتئین محلول تا سطح حدود ۲۳۳۸ میلی‌گرم سرب با شیب ۰/۰۰۱۷ و سپس با شیب ۰/۰۰۱۶ کاهش یافت. چنین روندی نشان‌دهنده 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.

نشان‌دهنده کاهش حساسیت بود. این تغییرات منجر به تخریب بیشتر کلروفیل‌ها گردید که احتمالاً این کاهش در صفات رویشی و رنگیزه‌های فتوسنتزی می‌تواند به دلیل افزایش میزان نشت الکترولیت، مالون‌دی‌آلدئید 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 وارده 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 شیب تغییرات افزایش و سپس با افزایش غلظت سرب تا سطح ۴۰۰۰ میلی‌گرم سرب در کیلوگرم خاک کاهش شیب 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 قره‌شیلخو، س. (۱۳۹۴) بررسی اثر سرب بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی، میزان پرولین و آلکالوئید کل کالوس گیاه پرپوش، مجله سلول و بافت ۶: ۹-۲۱.
- بلوچی، ح. ر.، امینی، ف.، موحدی دهنوی، م. و عطارزاده، م. (۱۳۹۶) تأثیر بسترهای مختلف کاشت بر صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی لوبیا چیتی (*Phaseolus vulgaris* L.) تحت تنش فلزات سنگین، مجله فرآیند و کارکرد گیاهی ۶: ۲۷-۳۹.
- پارسادوست، ف.، بحرینی‌نژاد، ب.، صفری سنجان، ع.ا. و کابلی، 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 قنبری، 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 نترات مس، نشریه پژوهش‌های زراعی ایران ۱۵: ۷۴-۸۶.

- تقریبان، م.، پوزش، و. و خورشیدی، م. (۱۳۹۴) اثر نیکل بر شاخص های رشد، محتوی رنگیزه های فتوسنتزی، پروتئین، قندهای محلول، پرولین و میزان انباشتگی نیکل در گیاه گشنیز، نشریه تحقیقات کاربردی اکوفیزیولوژی گیاهی ۲: ۵۹-۷۴.
- جمالی حاجبانی، ن.، قادریان، س.م. و کریمی، ن. (۱۳۹۵) بررسی جذب، انباشتگی 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.، قربانلی، م. و منوچهری کلانتری، خ. (۱۳۸۵) اثر کادمیم بر مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی، قندها و مالون دآلدئید در گیاه کلزا (*Brassica napus L.*)، مجله زیست‌شناسی ایران ۱۹: ۱۳۶-۱۴۵.
- فاطمی، ح.، اسماعیل‌پور، ب.، اشرف سلطانی طولارود، ع. و نعمت‌الله‌زاده، ع. (۱۳۹۶) تأثیر محلول‌پاشی نانو ذرات سیلیسیم بر برخی شاخص‌های مورفولوژیک و بیوشیمیایی گیاه گشنیز (*Coriandrum sativum L.*) در شرایط تنش فلز سنگین سرب، دو ماهنامه 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: ۳۳-۴۴.
- کرامت، ب.، دریایی، ف. و آروین، م.ج. (۱۳۹۳) بررسی اثرات متقابل سلیسیم و کادمیوم بر محتوای آلدئیدها، پراکسید هیدروژن و فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاهچه گندم رقم کویر، مجله پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست‌شناسی ایران) ۲۷: ۴۹۰-۵۰۰.
- کریمی شروذانی، ف.، سپهری، م.، افیونی، م. و حاج عباسی، م. ع. (۱۳۹۳) اثر قارچ اندوفایت *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.، دباغ 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.
- مهربان، پ. و عبدالزاده، ا. (۱۳۹۱) اثرات بیشبود آهن در فعالیت آنتی‌اکسیدانی و الگوی الکتروفورزی پروتئین‌ها در گیاه برنج رقم شفق، مجله پژوهش‌های تولید گیاهی ۱۹: ۸۵-۱۰۶.
- نورانی‌آزاد، ح.، حاجی باقری، م. ر.، کفیل زاده، ف. و نجفیان، م. (۱۳۹۰) مطالعه برخی ویژگی‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی یک رقم گلرنگ (*Carthamus tinctorius L.*) به سمیت سرب، فصلنامه علمی-پژوهشی گیاه و زیست‌بوم ۷: ۶۳-۷۴.
- یعقوبیان، ی.، سیادت، س. ع. ا.، مرادی‌تلاوت، م. ر. و پیردشتی، ه. ا. (۱۳۹۵) کمی‌سازی پاسخ رشد ریشی 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.*)، دوفصلنامه بیوتکنولوژی و میکروبیولوژی کاربردی ۵: ۱-۱۱.

- 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 Singhg, 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 States.
- 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 States.
- 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 Ziaie, 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.
- Faizan, 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. *ARP 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* 66: 9-26.
- Garczarska, M. and Ratajczak, L. (2000) Metabolic responses of *lemna 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., Vijayarangan, P., Balamurugan, S. and Thiagarajan, G. (2011) Effect of coupper 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 fluorecence 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 Co²⁺, Ni²⁺ and Cd²⁺ 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 markes 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 vulgare*) 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 Physiology Biochemstery 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