

بررسی تیمار برونزای اسیدهای آلی کربوکسیلیک بر برخی ویژگی‌های بیوشیمیایی و میزان جذب فلزات کادمیوم و سرب در گیاهچه کلزا

حکیمه علومی*، عفت السادات احمدی موسوی^۱، ندا حسینی^۱

^۱گروه اکولوژی، مرکز بین المللی علوم، تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، کرمان، ایران

چکیده:

با توجه به ورود بی‌رویه فلزات سنگین به محیط زیست و اهمیت حذف این فلزات از محیط، در این پژوهش تاثیر برخی از اسیدهای آلی کربوکسیلیک بر میزان تجمع فلزات کادمیوم و سرب در گیاهچه یک هفته‌ای تجمع دهنده کلزا (*Brassica napus*) مورد بررسی قرار گرفت. بذرهاي کلزا به مدت یک هفته تحت تیمارهای ۱۰۰ میکرومولار کلراید کادمیوم و کلراید سرب همزمان با تیمار ۵۰ میکرومولار سیترات، ۱ میکرومولار اگزالات، ۵۰ میکرومولار فومارات و ۳۰۰ میکرومولار هیستیدین قرار گرفت. جهت بررسی نقش این اسیدها در تخفیف تنش فلزات سنگین، برخی از ویژگی‌های بیوشیمیایی و رشد گیاهچه‌های هفت روزه شامل محتوای کلروفیل کل، کاروتنوئیدها، پراکسید هیدروژن، مالون دی آلدئید و وزن خشک گیاهچه تحت تنش بررسی گردید. هرچند تیمار اسیدهای آلی مذکور بر میزان جذب فلزات کادمیوم و سرب اثر افزایشی داشت، تیمار اسیدهای آلی کربوکسیلیک منجر به افزایش معنی‌دار مقدار کلروفیل کل و کاروتنوئیدها و وزن خشک نسبت به گیاهچه‌های تحت تنش کادمیوم و سرب گردید. تنش فلزات کادمیوم و سرب موجب افزایش معنی‌دار پراکسید هیدروژن در گیاهچه‌ها گردید اما کاربرد اسیدهای آلی کربوکسیلیک در این گیاهچه‌ها مقدار پراکسید هیدروژن و پراکسیداسیون لیپیدها را کاهش داد. بر اساس نتایج، به نظر می‌رسد استفاده از برخی از انواع اسیدهای آلی کربوکسیلیک می‌تواند علاوه بر افزایش جذب فلز توسط گیاهچه کلزا، تاثیر مثبتی بر تخفیف خسارت ناشی از تنش سرب و کادمیوم در این گیاهچه‌ها داشته باشد.

کلمات کلیدی: کادمیوم، سرب، اسیدهای آلی کربوکسیلیک، کلزا

مقدمه:

ایجاد آثار سمی شدید در انسان و دیگر جانداران خسارت جدی به بار می‌آورد (Huang et al., 1997). سرب محلول و تبدالی به راحتی در اختیار جذب گیاهان قرار می‌گیرند (Schwartz and Levin, 1991). فلز کادمیوم نیز از سمی‌ترین عناصر برای گیاهان بوده که فاقد نقش زیستی می‌باشد. این فلز به طور عمده از طریق فرآیندهای صنعتی و کودهای فسفاته وارد محیط زیست و زنجیره غذایی

غلظت‌های بالای فلزات سنگین در خاک منجر به تخریب اکوسیستم‌های طبیعی می‌شوند. این فلزات اثرات تخریبی زیادی بر محصولات کشاورزی دارند. از جمله فلزات سنگین آلاینده محیط زیست سرب و کادمیوم می‌باشد. سرب با عدد اتمی ۸۲ و وزن اتمی ۲۰۷/۲ از فلزات سنگینی است که موجب آلودگی محیط زیست شده و با

می‌شود. این فلز به راحتی از ریشه گیاه جذب شده و با تشکیل کمپلکس‌های پیچیده با ترکیبات آلی مانند پروتئین‌ها از فعالیت ضروری سلول‌ها جلوگیری می‌کند. کادمیم با افزایش پراکسیداسیون لیپیدها و تولید گونه‌های فعال اکسیژن زوال غشاء را فراهم می‌کند. از آنجا که این فلز دو ظرفیتی می‌باشد با عنصری مانند منیزیم (Mg^{++}) موجود در کلروفیل و یا با یون آهن (Fe^{++}) که دو ظرفیتی‌اند رقابت کرده و جایگزین آنها می‌شود بنابراین فتوسنتز را در گیاه دچار اختلال می‌نماید (Sanita et al., 1999; Salt et al., 1995).

آلودگی عناصر موجود در خاک بوسیله شیوه‌های شیمیایی، فیزیکی و زیستی برطرف می‌شود یکی از روش‌های ترمیم زیستی خاک شیوه گیاه بالایی یعنی استفاده از گیاه جهت پاک سازی محیط آلوده می‌باشد. یکی از انواع گیاه بالایی، فیلتراسیون ریشه‌ای یا استفاده از ریشه‌های گیاه برای جذب آلاینده‌های فلزی از آب‌های سطحی یا زیرزمینی می‌باشد. این عمل برای فلزاتی چون کادمیوم، مس، کروم، سرب و روی مورد استفاده قرار گرفته است. روش دیگر با عنوان گیاه استخراجی، از گیاهان تجمع دهنده فلز برای انتقال فلزات از خاک به ریشه و سپس ساقه‌ها، برگها و انباشته نمودن آنها در گیاه استفاده می‌شود. این روش بهترین رویکرد برای برداشت مواد آلاینده از خاک و جداسازی آن بدون تخریب ساختمان و حاصلخیزی خاک می‌باشد. یکی از استراتژی‌های اصلی در این روش استفاده از کمک کلات کننده‌های مصنوعی برای افزایش تحرک و جذب مواد آلوده کننده برای ترمیم خاک می‌باشد (Salt et al., 1998).

کشت گونه‌های گیاهی که توانایی تجمع غلظت‌های بالای فلزات را دارند (بیش تجمع دهنده‌ها یا بیش انباشته‌گرها) به پیشرفت این تکنولوژی کمک می‌کند. در این شیوه گیاهان غلظت‌های بالای فلزات سنگین را توسط ریشه هایشان استخراج نموده و آن را به زیتوده انتقال می‌دهند. این فرآیند در حالی است که گیاه مقدار بالایی از زیتوده تولید می‌کند. گونه‌های گیاهی تجمع کننده فلزات می‌توانند فلز را

در بخش‌های هوایی خود در مقادیر بالاتری از آنچه که در خاک وجود دارد در خود تغلیظ کنند. این گیاهان سطوح بالای مواد آلوده کننده را جذب و آنها را در ریشه‌ها، ساقه‌ها و یا برگ‌ها تغلیظ می‌کنند. تقریباً ۴۰۰ گونه گیاهی از ۲۲ خانواده شناسایی شده که از این روش استفاده می‌کنند. خانواده شب‌بو یا Brassicacea بیشترین تعداد از این نوع گیاهان شامل ۸۷ گونه از ۱۱ جنس را دارا می‌باشد (Raskin et al., Hall, 2002; Madrid and Kirkham, 2000) (1994). یکی از گیاهان تجمع دهنده فلزات سنگین از خانواده شب‌بو گیاه دانه روغنی کلزا *Brassica napus* می‌باشد. این گیاه که از نظر تولید دانه‌های روغنی نیز از اهمیت اقتصادی ویژه‌ای برخوردار است، به عنوان گیاه تجمع دهنده فلزات شناخته شده است (Dechun et al., 2009).

کلات کننده‌های مورد استفاده در گیاه‌پالایی دارای انواع مختلفی بوده که از جمله می‌توان به اسیدهای آلی کربوکسیلیک اشاره نمود. اسیدهای کربوکسیلیک اسیدهای آلی هستند که دارای حداقل یک گروه کربوکسیل ($-COOH$) می‌باشند. این اسیدها از عمومی‌ترین انواع اسیدهای آلی بوده که دهنده پروتون می‌باشند. اسیدهای کربوکسیلیک که اسیدهای ضعیفی هستند و بر اثر حل شدن در آب تعدادی از مولکول‌های آنها پروتون اسیدی خود را به مولکول‌های آب داده و به سرعت به حالت تعادل می‌رسند، در فن‌آوری گیاه بالایی بعنوان کلات کننده فلزات مورد استفاده قرار می‌گیرند (Huang et al., Salt et al., 1998; Chaney et al., 1997) (1997). در پژوهشی Kramer و همکاران (۱۹۹۶) نقش کلاته کننده‌های نیکل (سیتریک اسید و هیستیدین) در یک گیاه انباشته‌گر (آلیسوم) را مورد بررسی قرار داده و بیان نموده که این مواد در سم‌زدایی نیکل در گیاهان نقش دارند. لازم به توضیح است که هیستیدین یکی از بیست اسید آمینه اصلی موجود در سلول‌های زنده از جمله اسیدهای مونوکربوکسیلیک می‌باشد که در تخفیف سمیت فلزات در گیاهان اهمیت دارد. این اسید آمینه که هم به صورت آزاد

صافی در ظروف پتری حاوی مقدار ۲۰ میلی‌لیتر از محلول ۱۰۰ میکرومولار کلراید کادمیوم یا کلراید سرب قرار گرفت. تیمارهای اعمال شده شامل اسید کربوکسیلیک سیترات، اگزالات، فومارات و هیستیدین، تیمار با فلز سنگین کادمیوم یا سرب و نیز تیمار هم‌زمان هریک از اسیدهای آلی با سرب یا کادمیوم بود. غلظت‌های اسیدهای کربوکسیلیک شامل ۵۰ میکرومولار سیترات، ۱ میکرومولار اگزالات، ۵۰ میکرومولار فومارات یا ۳۰۰ میکرومولار هیستیدین بود. برای هر تیمار ۳ تکرار (۳ ظرف پتری) در نظر گرفته شد. بذره‌های کاشته شده در ظروف پتری حاوی ۱۰ میلی‌لیتر از تیمارهای مذکور در مدت ۷ روز در دمای 16 ± 2 : 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد و شرایط نوری ۱۶:۸ به ترتیب تاریکی: نور قرار گرفته و سپس گیاهچه ۷ روزه جهت انجام بررسی‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی موردنظر استفاده شد.

سنجش میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی (کلروفیل و کاروتنوئیدها): مقدار ۰/۲ گرم بافت تازه برگ با ترازوی آزمایشگاهی Sartorius مدل BP211 D با دقت ۰/۰۰۱ گرم وزن شد و در هاون چینی که حاوی استون ۸۰ درصد بود خوب سائیده شد. محتوای هاون توسط کاغذ صافی واتمن شماره ۱ که در قیف شیشه‌ای قرار داشت صاف گردید. سپس ۵ میلی‌لیتر استون به آن اضافه شد و حجم محلول به ۱۵ میلی‌لیتر رسانده شد. این محلول حاوی کلروفیل a, b و کاروتنوئیدهاست. شدت جذب این محلول در طول موج‌های ۶۶۳/۲، ۶۴۶/۸ و ۴۷۰ با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر UV Visible مدل ArrayS2100 Diod خوانده شد (Lichtenthaler, 1987). غلظت این رنگیزه‌ها با استفاده از فرمولهای زیر محاسبه گردید.

$$\begin{aligned} \text{Chl.a}(\text{mg.ml}^{-1}) &= 12.5 A_{663.2} - 2.79 A_{646.8} \\ \text{Chl.b}(\text{mg.ml}^{-1}) &= 21.51 A_{646.8} - 5.1 A_{663.2} \\ \text{Chl.Total}(\text{mg.ml}^{-1}) &= \text{Chl.a} + \text{Chl.b} \\ \text{Car}(\text{mg.ml}^{-1}) &= (1000A_{470} - 1.8\text{cha} - 85.02\text{chb})/198 \end{aligned}$$

و هم در ساختمان پروتئین‌ها مشاهده می‌شود، تمایل زیاد برای باند شدن به فلزات سنگین دارد. به‌ویژه اسید آمینه آزاد، به عنوان یک لیگاند مهم و قوی در تجمع فلزات سنگینی مانند نیکل نقش دارد.

در مطالعه دیگری Ma و همکاران (۲۰۰۱) نیز نقش اسید آلی اگزالیک اسید در سم زدایی آلومینیوم در گندم را مورد بررسی قرار داده‌اند. با استفاده از اسیدهای آلی مانند مالیک اسید و سیتریک اسید از طریق اسیدی کردن خاک، تبادل کاتیونی و احیا هیدروکسیدهای فلزی محلول خاک، جذب سطحی ریشه و انتقال فلزات سنگین به قسمت هوایی تسریع یافته در نتیجه گیاهان تجمع دهنده با ظرفیت استثنایی موجب تحرک و تجمع فلزات در گیاهان و فیتواکسراکشن فلزات سنگین از خاک می‌شود (Hall, 2002).

با توجه به گزارشات متعددی که همگی نشان دهنده تجمع فلزات سنگینی مانند کادمیوم و سرب در لایه‌های فوقانی خاک و اجتناب ناپذیر بودن جذب آن توسط گیاهان می‌باشد، در این پژوهش اثرات اسیدهای کربوکسیلیک سیترات، اگزالات، فومارات و هیستیدین برونزا بر رشد و میزان تجمع فلزات سنگین کادمیوم و سرب در گیاه کلزا مورد بررسی قرار گرفته است. همچنین با بررسی برخی از ویژگی‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاهچه میزان سم زدایی و تخفیف تنش ناشی از فلزات کادمیوم و سرب توسط اسیدهای آلی در گیاهچه کلزا *Brassica napus L.* مطالعه شد.

مواد و روش‌ها:

این پژوهش در سال ۱۳۹۰ در مرکز بین‌المللی علوم، تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی انجام گرفت. بذره‌های *Brassica napus L.* رقم زرفام از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه گردید. پژوهش حاضر در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت. تعداد ۲۰ بذر روی کاغذ

در این فرمول Ch_T ، Ch_b ، Ch_a و Car به ترتیب غلظت کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کاروتنوئیدها (شامل کاروتن‌ها و گزانتوفیل‌ها) می‌باشد. غلظت بر حسب $\mu g \cdot ml^{-1}$ عصاره گیاهی تعیین گردید. نتایج حاصل از اندازه‌گیری مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی بر حسب گرم وزن تر محاسبه گردید.

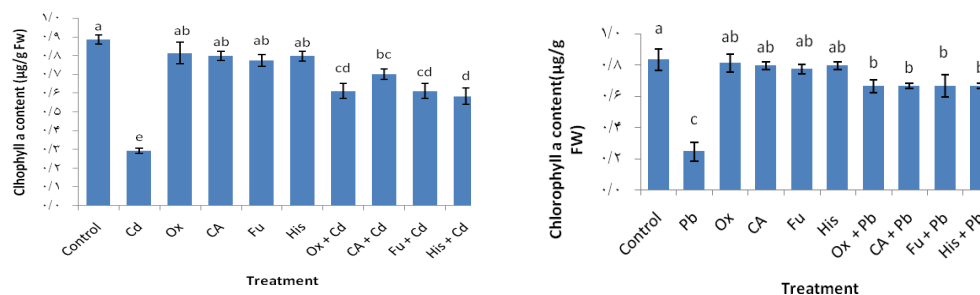
سنجش پراکسیداسیون لیپیدها: برای سنجش مقدار پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء غلظت مالون دی آلدئید و سایر آلدئیدهای حاصل از این واکنش اندازه‌گیری شد. بر این اساس مقدار 0.2 گرم از بافت تازه برگ‌گی در هاون چینی حاوی 5 میلی‌لیتر تری کلرو استیک اسید (TCA) 0.1 درصد سائیده شد. عصاره حاصل با استفاده از سانتریفیوژ مدل Napco 2028R به مدت 5 دقیقه در g 10000 سانتریفیوژ شد. به 1 میلی‌لیتر از محلول رویی، 4 میلی‌لیتر محلول TCA 20 درصد که حاوی 0.5 درصد تیو باربیتوریک اسید (TBA) بود اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت 30 دقیقه در دمای 95 درجه سانتی‌گراد حمام آب گرم حرارت داده و سپس بلافاصله در یخ سرد وارد شد. مخلوط دوباره به مدت 10 دقیقه در g 10000 سانتریفیوژ گردید. شدت جذب این محلول با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج 532 نانومتر خوانده شد. ماده مورد نظر برای جذب در این طول موج کمپلکس قرمز (MDA-TBA) است، جذب بقیه رنگیزه‌های غیر اختصاصی در 600 نانومتر تعیین و از این مقدار کسر گردید. برای محاسبه غلظت MDA از ضریب خاموشی معادل $155 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ استفاده شد (Heath and Packer, 1968). نتایج حاصل از اندازه‌گیری بر حسب وزن تر محاسبه و ارائه گردید. برای سنجش مقدار سایر آلدئیدها (پروپانال، بوتانال، هگزانال، هپتانال و پروپانال دی متیل استال) نیز شدت جذب در طول موج 455 نانومتر خوانده شد و جذب سایر رنگیزه‌های غیراختصاصی در 600 نانومتر از

این مقدار کسر گردید (Meir et al., 1992). برای محاسبه غلظت این آلدئیدها از ضریب خاموشی معادل $0.458 \times 10^5 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ استفاده شد. این ضریب خاموشی میانگین ضریب خاموشی برای پنج آلدئید مورد نظر است. نتایج حاصل از اندازه‌گیری بر حسب وزن تر محاسبه و ارائه گردیدند.

پراکسید هیدروژن (H_2O_2): سنجش پراکسید هیدروژن با استفاده از روش Velikova و همکاران (2000) انجام شد. اندام هوایی گیاه در حمام یخ با تری کلرو استیک اسید 0.1 درصد سائیده شدند. عصاره در سانتریفیوژ یخچال‌دار (Centrifuge 5804R, Eppendorf, Germany) در g 10000 برای 15 دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس 0.5 میلی‌لیتر از محلول رویی به 0.5 میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم 10 میلی‌مولار ($pH=7$) و 1 میلی‌لیتر یدید پتاسیم یک مولار اضافه گردید و جذب در طول موج 390 نانومتر خوانده شد. مقدار پراکسید هیدروژن در هر نمونه با استفاده از ضریب خاموشی $0.28 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ محاسبه و بر حسب میکرومول بر گرم وزن تر گزارش گردید.

وزن خشک: جهت سنجش وزن خشک، گیاهچه‌های هر ظرف به عنوان یک تکرار در نظر گرفته شد. گیاهچه‌ها پس از برداشت به مدت 24 ساعت در دمای 70 درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. وزن خشک نمونه‌ها با استفاده از ترازوی آزمایشگاهی Sartorius مدل BP211 D با دقت 0.0001 گرم محاسبه و نتایج بر حسب میلی‌گرم گزارش گردید.

سنجش کادمیوم و سرب: به منظور اندازه‌گیری مقدار کادمیوم و سرب گیاهچه‌ها از روش جذب اتمی (هضم اسیدی) استفاده شد. به این منظور مقدار 0.5 گرم از بافت گیاهی خشک در 10 میلی‌لیتر نیتریک اسید غلیظ به مدت 24 ساعت قرار داده شد تا نمونه گیاهی به خوبی در اسید حل شود. بعد از این مدت نمونه جهت خروج بخارات



شکل ۱- تاثیر تیمار هم‌زمان اسیدهای کربوکسیلیک و اسیدآمینه بر مقدار کلروفیل a گیاهچه‌های تحت تنش ۱۰۰ میکرومولار سرب (راست) و ۱۰۰ میکرومولار کادمیوم (چپ).

CA: سترات (۵۰ میکرومولار)، Ox: (آگزالات ۱ میکرومولار)، Fu: (فومارات ۵۰ میکرومولار)، اسیدآمینه His: (هیستیدین ۳۰۰ میکرومولار). مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن انجام گرفت و حروف غیرمشترک معرف تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد است.

سرب مقدار کلروفیل a آنها نسبت به شاهد کاهش یافت. تیمار هم‌زمان گیاهچه‌های تحت تنش فلز سنگین با اسیدهای کربوکسیلیک و اسیدآمینه موجب جلوگیری از این اثر گردید و مقدار کلروفیل a را به طور معنی‌داری نسبت به گیاهچه‌های تحت تنش فلز افزایش داد (شکل ۱).

کادمیوم و سرب موجب کاهش معنی‌دار کلروفیل b نسبت به شاهد، اسیدهای کربوکسیلیک و هیستیدین شد اما تیمار آگزالات، سترات، فومارات و یا هیستیدین با عناصر کادمیوم و سرب موجب افزایش معنی‌دار مقدار کلروفیل b نسبت به تنش فلز سنگین شد (شکل ۲). بیشترین مقدار کلروفیل کل مربوط به شاهد بود. تیمار اسیدهای کربوکسیلیک (آگزالات، سترات و فومارات) و هیستیدین نسبت به شاهد در سطح احتمال ۵٪ اختلاف معنی‌داری نشان نداد. تیمار اسیدهای کربوکسیلیک و هیستیدین همراه با فلز سنگین کادمیوم و سرب موجب افزایش معنی‌دار مقدار کلروفیل کل نسبت به کادمیوم و سرب شد (شکل ۳).

مقدار کاروتنوئیدها:

براساس نتایج کمترین مقدار کاروتنوئید مربوط به گیاهچه‌هایی بود که تحت تاثیر کادمیوم قرار گرفته بودند.

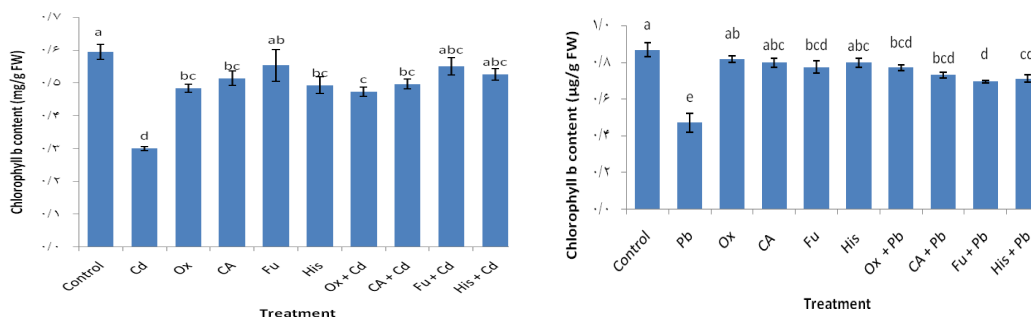
اسیدی گرم شد. سپس با استفاده از آب مقطر حجم محلول به ۵۰ میلی‌لیتر رسانده و صاف گردید (Rothery, 1988). سنجش یون محلول حاصل توسط دستگاه جذب اتمی GTA-110 Atomizer graphite tube ساخت کشور استرالیا انجام گرفت. طول موج جذب لامپ مورد استفاده مربوط به کادمیوم و سرب به ترتیب ۲۲۸/۸ و ۲۸۳/۳ نانومتر بود و از Deuterium background correction استفاده شد. جهت تعیین غلظت یونها، نمودار استاندارد مربوطه توسط نرم‌افزار دستگاه (Spectra AA) رسم شد و غلظت مجهول محلول‌ها تعیین گردید.

تجزیه و تحلیل‌های آماری: به‌منظور مقایسه میانگین داده‌ها از نرم‌افزار SPSS (v. 17)، آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و آزمون دانکن و سطح معنی‌داری ۵ درصد (ضریب اطمینان ۹۵٪) استفاده شد.

نتایج:

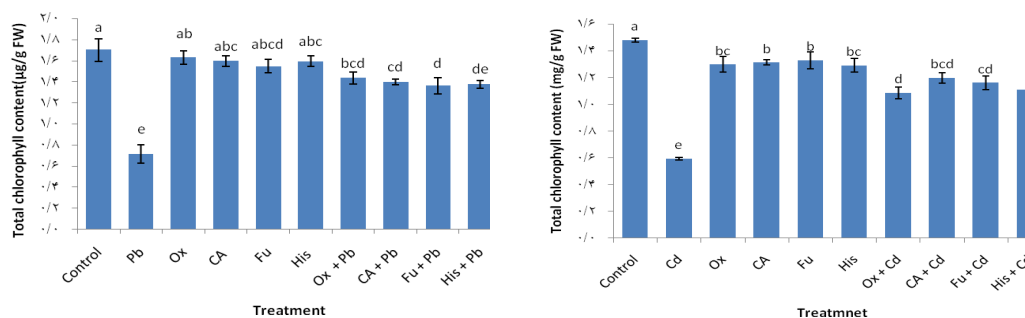
محتوای کلروفیل:

نتایج مربوط به اثر تیمار هم‌زمان اسیدهای کربوکسیلیک در گیاهچه‌های تحت تیمار کادمیوم و سرب بر میزان کلروفیل a نشان داد که گیاهچه‌های تحت تنش کادمیوم و



شکل ۲- تاثیر تیمار هم‌زمان اسیدهای کربوکسیلیک و اسیدآمینه بر مقدار کلروفیل b گیاهچه‌های تحت تنش ۱۰۰ میکرومولار سرب (راست) و ۱۰۰ میکرومولار کادمیوم (چپ).

CA: (سیترات ۵۰ میکرومولار)، Ox: (اگزالات ۱ میکرومولار)، Fu: (فورمات ۵۰ میکرومولار)، اسیدآمینه His: (هیستیدین ۳۰۰ میکرومولار). مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن انجام گرفت و حروف غیرمشترک معرف تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد است.



شکل ۳- تاثیر تیمار هم‌زمان اسیدهای کربوکسیلیک و اسیدآمینه بر مقدار کلروفیل کل گیاهچه‌های تحت تنش ۱۰۰ میکرومولار سرب (راست) و ۱۰۰ میکرومولار کادمیوم (چپ).

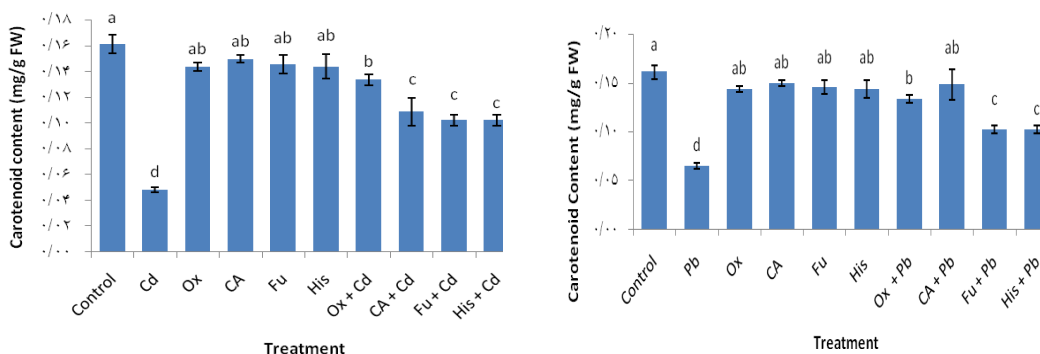
CA: (سیترات ۵۰ میکرومولار)، Ox: (اگزالات ۱ میکرومولار)، Fu: (فورمات ۵۰ میکرومولار)، اسیدآمینه His: (هیستیدین ۳۰۰ میکرومولار). مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن انجام گرفت و حروف غیرمشترک معرف تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد است.

مقدار کاروتنوئیدها:

براساس نتایج کمترین مقدار کاروتنوئید مربوط به گیاهچه‌هایی بود که تحت تاثیر کادمیوم بودند. گیاهچه‌هایی که تحت تاثیر هم‌زمان کادمیوم با یکی از اسیدهای اگزالات، سیترات، فورمات و هیستیدین قرار گرفته بودند افزایش معنی‌دار مقدار کاروتنوئیدها نسبت به کادمیوم را نشان دادند (شکل ۳). استفاده هم‌زمان از اگزالات، سیترات، فورمات و یا هیستیدین در گیاهچه‌های تحت تیمار سرب موجب افزایش معنی‌دار مقدار کاروتنوئیدها گردید (شکل ۴).

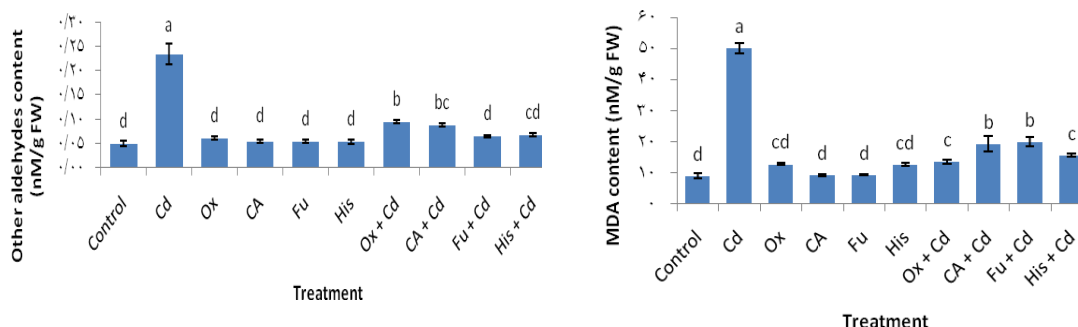
پراکسیداسیون لیپیدها:

کادمیوم و سرب موجب افزایش مقدار مالون دی آلدئید شد که این افزایش در سطح احتمال ۵٪ نسبت به شاهد معنی‌دار بود (شکل ۵). مقدار مالون دی آلدئید و سایر آلدئیدها در تیمار اسیدهای کربوکسیلیک و هیستیدین نسبت به شاهد اختلاف معنی‌دار نشان نداد. استفاده از اگزالات، سیترات، فورمات و هیستیدین هنگامی که گیاهچه‌ها تحت تنش کادمیوم و سرب قرار گرفته بودند موجب کاهش معنی‌دار پراکسیداسیون غشا نسبت به گیاهچه‌های تحت تنش کادمیوم و سرب شد ($P > 0.05$).



شکل ۴- تاثیر تیمار هم‌زمان اسیدهای کربوکسیلیک و اسیدآمینه بر مقدار کاروتنوئیدهای گیاهچه‌های تحت تنش ۱۰۰ میکرومولار سرب (راست) و ۱۰۰ میکرومولار کادمیوم (چپ).

CA: (سیترات ۵۰ میکرومولار)، Ox: (اگزالات ۱ میکرومولار)، Fu: (فورمات ۵۰ میکرومولار)، اسیدآمینه His: (هیستیدین ۳۰۰ میکرومولار). مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن انجام گرفت و حروف غیرمشترک معرف تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد است.



شکل ۵- تاثیر تیمار هم‌زمان اسیدهای کربوکسیلیک و اسیدآمینه بر مقدار مالون دی آلدئید (راست) و سایر آلدئیدهای (چپ) گیاهچه کلزا تحت تنش ۱۰۰ میکرومولار کادمیوم.

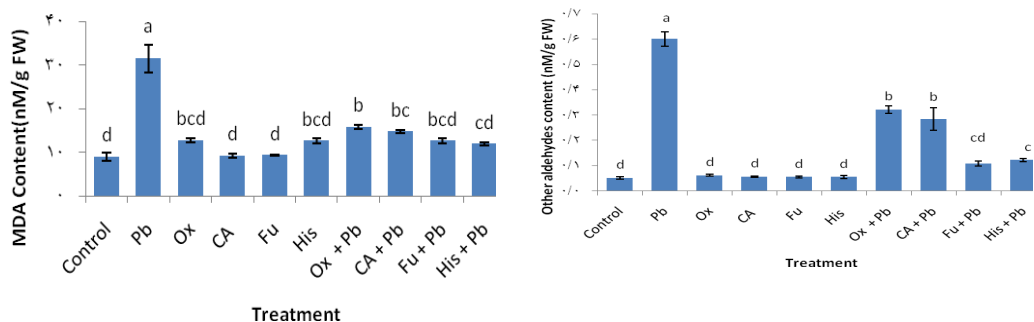
CA: (سیترات ۵۰ میکرومولار)، Ox: (اگزالات ۱ میکرومولار)، Fu: (فورمات ۵۰ میکرومولار)، اسیدآمینه His: (هیستیدین ۳۰۰ میکرومولار). مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن انجام گرفت و حروف غیرمشترک معرف تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد است.

مقدار پراکسید هیدروژن:

تیمار هم‌زمان اسیدهای کربوکسیلیک و هیستیدین در گیاهچه‌های تحت تیمار کادمیوم و سرب موجب افزایش معنی‌دار پراکسید هیدروژن نسبت به شاهد شدند (شکل ۶ و ۷). تیمار هم‌زمان اسیدهای کربوکسیلیک اگزالات، سیترات و فورمات و هیستیدین موجب کاهش معنی‌دار پراکسید هیدروژن نسبت به تیمار کادمیوم و سرب به تنهایی گردید.

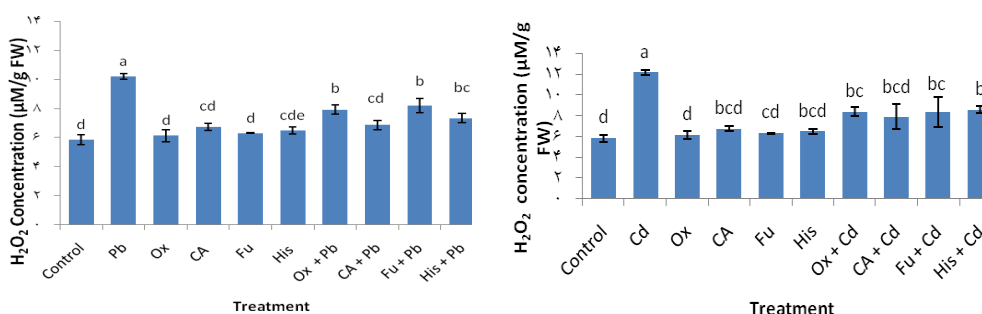
وزن خشک:

تنش کادمیوم و سرب وزن خشک را در گیاهچه‌های ۷ روزه کلزا کاهش داد. هر چند وزن خشک در گیاهچه‌ها هنگام استفاده هم‌زمان اسیدهای آلی کربوکسیلیک با تنش فلزات از نمونه شاهد کمتر بود اما این تیمار میزان وزن خشک نسبت به گیاهچه‌های تحت تنش بهبود بخشید (شکل ۸).



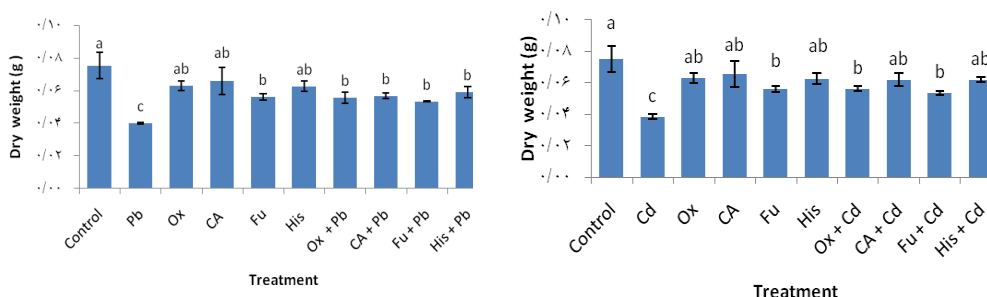
شکل ۶- تاثیر تیمار هم‌زمان اسیدهای کربوکسیلیک و اسیدآمینه بر مقدار مالون دی آلدئید (چپ) و سایر آلدئیدهای (راست) گیاهچه کلزا تحت تنش ۱۰۰ میکرومولار سرب

CA: (سیترات ۵۰ میکرومولار)، Ox: (اگزالات ۱ میکرومولار)، Fu: (فومارات ۵۰ میکرومولار)، اسیدآمینه His: (هیستیدین ۳۰۰ میکرومولار). مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن انجام گرفت و حروف غیرمشترک معرف تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد است.



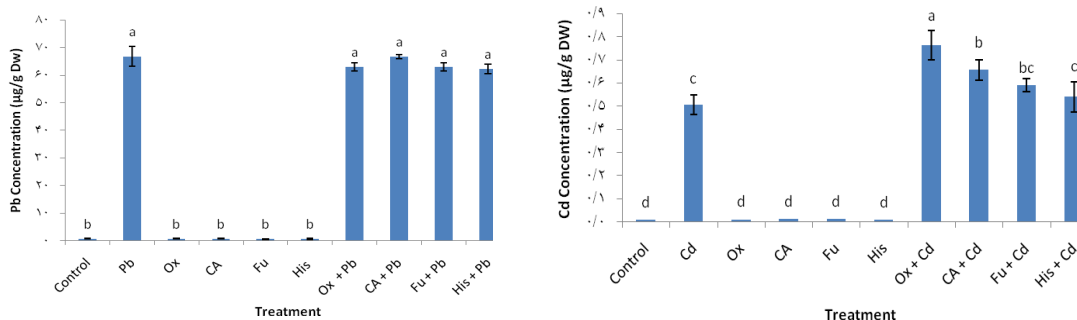
شکل ۷- تاثیر تیمار هم‌زمان اسیدهای کربوکسیلیک و اسیدآمینه بر محتوای پراکسید هیدروژن گیاهچه کلزا تحت تنش ۱۰۰ میکرومولار سرب (راست) و ۱۰۰ میکرومولار کادمیوم (چپ).

CA: (سیترات ۵۰ میکرومولار)، Ox: (اگزالات ۱ میکرومولار)، Fu: (فومارات ۵۰ میکرومولار)، اسیدآمینه His: (هیستیدین ۳۰۰ میکرومولار). مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن انجام گرفت و حروف غیرمشترک معرف تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد است.



شکل ۸- تاثیر تیمار هم‌زمان اسیدهای کربوکسیلیک و اسیدآمینه بر وزن خشک در گیاهچه کلزا تحت تنش ۱۰۰ میکرومولار سرب (راست) و ۱۰۰ میکرومولار کادمیوم (چپ).

CA: (سیترات ۵۰ میکرومولار)، Ox: (اگزالات ۱ میکرومولار)، Fu: (فومارات ۵۰ میکرومولار)، اسیدآمینه His: (هیستیدین ۳۰۰ میکرومولار). مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن انجام گرفت و حروف غیرمشترک معرف تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد است.



شکل ۹- تاثیر تیمار هم‌زمان اسیدهای کربوکسیلیک و اسیدآمینه بر محتوای کادمیوم و سرب در گیاهچه کلزا تحت تنش ۱۰۰ میکرومولار سرب (راست) و ۱۰۰ میکرومولار کادمیوم (چپ).

CA: سیترات (۵۰ میکرومولار)، Ox: (اگزالات ۱ میکرومولار)، Fu: (فومارات ۵۰ میکرومولار)، اسیدآمینه His: (هیستیدین ۳۰۰ میکرومولار). مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن انجام گرفت و حروف غیرمشترک معرف تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد است.

مقدار کادمیوم و سرب:

تیمار هم‌زمان اگزالات-کادمیوم و سیترات-کادمیوم موجب افزایش معنی‌دار محتوای کادمیوم نسبت به شاهد و حتی تیمار کادمیوم به تنهایی شد (شکل ۹). تاثیر هم‌زمان فومارات یا هیستیدین با کادمیوم موجب افزایش معنی‌دار مقدار کادمیوم نسبت به شاهد شد اما مقدار آن در سطح احتمال ۵٪ نسبت به تیمار کادمیوم به تنهایی کمتر بود (شکل ۹).

بیشترین تجمع سرب در گیاهچه‌ها مربوط به گیاهچه‌هایی بود که تحت تاثیر سرب قرار گرفته بودند ($P \leq 0.05$). تیمار هم‌زمان اسیدهای کربوکسیلیک (اگزالات، سیترات و فومارات) و اسیدآمینه هیستیدین موجب تجمع سرب درون گیاهچه‌ها شد که این مقدار در سطح احتمال ۵٪ کمتر از تیمار سرب به تنهایی اما بیشتر از شاهد بود.

بحث:

بررسی رنگی‌های فتوسنتزی نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که تیمار فلزات سنگین کادمیوم و سرب در گیاهچه‌های مورد آزمایش باعث کاهش در محتوای رنگی‌های فتوسنتزی می‌گردد. در حالی که کاربرد

اسیدهای کربوکسیلیک توانسته است تا حدودی آسیب‌های حاصله از فلز سنگین را بهبود بخشد. همچنین کاربرد فلزات سنگین کادمیوم و سرب باعث کاهش محتوای کاروتنوئیدها در گیاهچه‌های تحت تیمار گردیده است، در حالی که اسیدهای آلی در گیاهان تیمار شده با فلز سنگین باعث افزایش محتوای کاروتنوئیدها گردیده است.

تغییرات در مقدار رنگی‌ها یکی از علائم ظاهری اثر تنش محیطی بر فتوسنتز می‌باشد. گزارشات متعددی مبنی بر اثر فلزات سنگین بر محتوای کلروفیل و کاروتنوئیدهای گیاهان وجود دارد. در گیاه آفتاب‌گردان که در معرض کادمیوم قرار گرفته بود علائم نکروزگی و کلروزه شدن مشاهده شده است. محتوای کلروفیل a، b، کلروفیل کل و کاروتنوئیدهای آن نیز کاهش نشان داده است (Di cagno et al., 2001). در کلم برگ نیز گزارش شده است که سمیت کادمیوم باعث کاهش محتوای کلروفیل گردیده است. این کاهش به دلیل اثر بازدارندگی فلزات سنگین از جمله کادمیوم بر جذب آهن در گیاه ذکر شده است (Pandey and Sharma, 2002). در گیاهچه لوبیا نیز کادمیوم باعث کاهش محتوای کلروفیل گردیده است. این

ساختاری دارند موجب حفظ آب سلولها می‌شوند (Donngsen *et al.*, 1995).

تنش فلزات سنگین کادمیوم و سرب، مقدار مالون دی آلدئید و محتوی سایر آلدئیدها را در گیاهچه‌های مورد آزمایش افزایش داد. این نتایج نشان می‌دهد که تنش فلز سنگین منجر به خسارت به غشا گردیده و منجر به افزایش پراکسیداسیون لیپیدها شده است. همچنین نتایج ارائه شده در این تحقیق نشان داد که در گیاهچه‌هایی که تحت تیمار فلزات سنگین کادمیوم و سرب بوده‌اند، محتوی پراکسید هیدروژن افزایش می‌یابد، در حالی که تیمار با اسیدهای آلی کاهش معنی‌دار محتوی پراکسید هیدروژن در گیاهچه‌های تیمار شده با فلز سنگین را به همراه داشت. قبالا توسط Chen و Wong (۲۰۰۳) گزارش شده که تنش کادمیوم کلرید باعث القا سمیت و افزایش پراکسیداسیون لیپیدها در برگ‌های گیاه برنج گردیده است. این محققین نشان داده‌اند که تنش اکسیداتیو و ایجاد رادیکال‌های آزاد سبب پراکسیداسیون لیپیدها گردیده است. نتایج حاصله از این گزارشات با نتایج آزمایشات انجام شده مطابقت دارد. در پژوهش حاضر مشاهده شد که به طور عموم کاربرد اسیدهای آلی در گیاهچه‌های تحت تیمار فلز سنگین کادمیوم و سرب، باعث کاهش محصولات پراکسیداسیون لیپیدها و در نتیجه تخفیف اثرات ناشی از تنش این فلزات در گیاهچه‌های مورد آزمایش می‌گردد. پراکسید هیدروژن یکی از اشکال گونه‌های فعال اکسیژن می‌باشد (Karuppanapandian *et al.*, 2011). گزارش شده است که در گیاه نخودفرنگی که در معرض کادمیوم قرار داشتند به دنبال القا تنش اکسیداتیو، محتوی H_2O_2 در گیاه افزایش یافته و محصول ناشی از پراکسیداسیون لیپیدها نیز در سلولها تجمع می‌یابد که احتمالاً نتیجه تولید رادیکال‌های فعال اکسیژن و افزایش فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز در سلولها می‌باشد (Dixit *et al.*, 2001). در این بررسی، تیمار هم زمان اسیدهای آلی کربوکسیلیک، کاهش

کاهش ممکن است در نتیجه بازدارندگی آنزیم‌های مسئول بیوسنتز کلروفیل ایجاد شده باشد (Kirbag and Lanaras *et al.*, 1993; Munzuroglu, 2005).

کاروتنوئیدها علاوه بر این که رنگیزه‌های کمی هستند، دارای نقش آنتی‌اکسیدانی نیز می‌باشند. مطالعات انجام گرفته روی گیاهان آزولا (Dai *et al.*, 2006) و *Bacopa monnieri* (Mishra *et al.*, 2006) نشان داده است که کاربرد کادمیوم به علت اثرات شدید اکسیداتیو در این گیاهچه‌ها باعث کاهش محتوی کاروتنوئید گردیده است. در تحقیق حاضر با توجه به نقش آنتی-اکسیدانی کاروتنوئیدها، می‌توان نقش مثبت اسیدهای آلی را در جهت افزایش کاروتنوئیدها در شرایط تیمار گیاهچه‌ها با فلز سنگین حائز اهمیت دانست. نتایج به دست آمده از مقایسه وزن خشک نمونه‌ها نیز نشان داد که با استفاده از اسیدهای کربوکسیلیک می‌توان خسارت رشدی ناشی از تنش فلزات سنگین را جبران نمود. کادمیوم و سرب به تنهایی وزن خشک و بیومس گیاهچه‌های کلزا را کاهش داد در حالی که تیمار اسیدهای کربوکسیلیک میزان بیوماس را افزایش داد. شاید بتوان گفت که اسیدهای آلی در برهمکنش با تنش فلزات سنگین از طریق حفاظت از کلروفیل و حفظ غشا از پراکسیداسیون لیپیدها، از کاهش رشد و وزن گیاهان تحت تنش جلوگیری می‌کند.

در مطالعه روی لوبیا سبز، Donngsen و همکاران (۱۹۹۵) گزارش نمودند که اگزالیک اسید موجب بهبود رشد ریشه و اندام هوایی گیاه شاهد و تحت تیمار کادمیوم شد. بیان شده است نه تنها لیگاندهای آلی حالیت فلزات سنگین را افزایش می‌دهند، بلکه سمیت آن برای گیاه را نیز کاهش می‌دهند. یون‌های آزاد فلزات سنگین در مقایسه با مولکول‌های کمپلکس آلی آن، خاصیت سمیت بیشتری دارند و احتمالاً اسیدهای آلی با اثری که بر کاهش خسارت غشا و ماکرومولکول‌های

سپس کادمیوم موجود در ریزوسفر دسترسی بیشتری برای گیاه داشته و بیشتر در گیاه تجمع می‌یابد.

Salt و همکاران (۱۹۹۸) نشان دادند که عنصر روی با هیستیدین در ریشه‌های کلم به صورت کمپلکس در می‌آید. هیستیدین در تشکیل کمپلکس با فلزات سنگین نقش دارد که علت تجمع و مقاومت زیاد نسبت به فلز روی در این گونه گیاهی است. همچنین در گیاه *Alyssum murale* که یک تجمع دهنده نیکل است (Kramer et al., 1996)، گزارش شده که هیستیدین، در جریان نیکل در آوند چوبی، انتقال آن به اندام هوایی و کمپلکس کردن نیکل در داخل واکوئل نقش دارد (Eapen and Souza, 2005). اما نتایج پژوهش حاضر نشان داد که تاثیر هم‌زمان فومارات یا هیستیدین با کادمیوم موجب افزایش معنی‌دار مقدار کادمیوم تنها نسبت به گیاهان شاهد شد، در حالی که مقدار آن در سطح احتمال ۵٪ نسبت به تیمار کادمیوم به‌تنهایی معنی‌دار نبود.

تیمار هم‌زمان اسیدهای کربوکسیلیک (اگزالات، سترات و فومارات) و اسیدآمین هیستیدین روی تجمع سرب درون گیاهچه‌ها اثر معنی‌داری نداشت، اما بیشتر از شاهد می‌باشد. بیشترین تجمع سرب مربوط به گیاهچه‌هایی بود که به تنهایی تحت تاثیر سرب قرار گرفته بودند ($P \leq 0.05$). گیاهچه‌های تیمار شده توسط اسیدهای آلی، در مقایسه با کادمیوم مقدار سرب جذب شده تفاوتی با سایر تیمارها نداشت که می‌تواند به دلیل محلولیت متفاوت چنین ترکیبات فلزی در محیط باشد. جذب سرب در گیاهچه‌های کلزا نسبت به جذب کادمیوم بیشتر می‌باشد. همچنین با توجه به نتایج به دست آمده از گیاهچه‌های تحت تنش سرب تیمار شده با اسیدهای کربوکسیلیک، به نظر می‌رسد این تیمارها در غلظت‌های مورد استفاده در این پژوهش نمی‌تواند بر جذب سرب از محیط توسط گیاهچه کلزا تاثیر معنی‌داری داشته باشند.

معنی‌دار محتوی پراکسید هیدروژن در گیاهچه‌های تیمار شده با فلز سنگین را به همراه داشت.

در این بررسی مقدار کادمیوم در گیاهچه با تیمار غلظت سیتریک اسید و اگزالات اسید افزایش یافت. به نظر می‌رسد این نتایج به دلیل واکنش متقابل کادمیوم با لیگاندهای آلی است که موجب تشکیل شکل کادمیوم باند شده با مواد آلی شده که تحرک بیشتری دارد. جذب این فرم باند شده نسبت به فرم یونی کادمیوم توسط گیاه بیشتر است. گزارش شده است مواد آلی مانند سترات، ملات، اگزالات، آسکوربات و گلوتامات توانایی کلات شدن با فلزات سنگین را دارند. در مطالعات انجام گرفته توسط Peterson و Alloway (۱۹۷۹) بیان شده است که کمپلکس کادمیوم با مواد آلی نسبت به مقدار مشابه از فرم یونی آن، دارای تحرک بیشتری می‌باشد.

سیتریک اسید با فلزات باند شده و موجب تجمع آنها در اندام هوایی می‌شود. سیتریک اسید در تجمع کادمیوم در برگ‌های گیاه سیب‌زمینی نیز نقش دارد و ترشح آن از ریشه‌ها در فراهمی و جذب کادمیوم توسط گیاه درگیر است. Huang و همکاران (۱۹۹۷) بیان کردند که سیتریک اسید موجب افزایش در دسترس بودن فلزات و افزایش تجمع فلز سنگین در اندام هوایی گیاهان می‌شود. اسیدهای آلی در واکوئل‌ها تجمع می‌یابند، اتصال بین فلزات و اسیدهای آلی در واکوئل‌ها و ذخیره آنها در سم زدایی فلزات نقش دارد. بنابراین اسیدها در مقاومت و تجمع فلزات سنگین در گونه‌های تجمع دهنده نقش بسیار مهمی دارند (Boominathan and Doran, 2003). در یک پژوهش Chiang و همکاران (۲۰۰۶) بیان کردند که ورود کادمیوم از فاز جامد خاک به فاز محلول آن از طریق تشکیل کمپلکس لیگاند آلی با کادمیوم صورت می‌گیرد.

نتیجه گیری:

دهد، اما بر میزان جذب فرم استفاده شده سرب، از محیط ریشه و در محیط آزمایشگاهی تاثیر قابل توجهی ندارد. بنابراین در صورت تایید نتایج حاصل از این پژوهش با نتایج کار در شرایط محیط‌های آلوده طبیعی یا بررسی خاک آلوده در شرایط آزمایشگاهی شامل خاک اطراف کارخانه‌ها و معادن، استفاده از سیتریک اسید و اگزالیک اسید جهت پالایش مناطق آلوده به کادمیوم توصیه می‌گردد.

بر اساس نتایج بدست آمده به نظر می‌رسد استفاده از سیتریک اسید و اگزالیک اسید می‌تواند در افزایش قابلیت جذب فلز کادمیوم از محیط اطراف ریشه توسط گیاهچه کلزا در شرایط پژوهش حاضر موثر باشد که با توجه به برخی از ویژگی‌های شیمیایی مورد سنجش در این پژوهش، این تاثیرگذاری همراه با تخفیف اثرات تنش در گیاهچه کلزا می‌باشد. استفاده از این اسیدهای آلی هرچند می‌تواند شدت تنش ناشی از سرب را در گیاه کلزا کاهش

منابع:

- roots and leaves of *Pisum sativum* L. Journal of Experimental Botany 52:1101-1109.
- Donngsen, X., Harrison, R. B. and Henry, C. L. (1995). Effect of organic acid on Cadmium toxicity in tomato and bean growth. Journal of Environmental Sciences. 7:399-405
- Eapen, S. and Souza, S. F. D. (2005) Prospects of genetic engineering of plants for phytoremediation of toxic metals. Biotechnology Advances 23:97-114.
- Hall, J.L. (2002) Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. Journal of Experimental Botany 53:1-11.
- Heath, R. L. and Packer, L. (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplast. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Archive of Biochemistry and Biophysics 125: 189-190.
- Huang, J.W., Chen, J. J. Berti, W.R. and Cunningham, S.D. (1997) Phytoremediation of Lead-contaminated soils: Role of synthetic chelates in lead phytoextraction. Environmental Science and Technology 31:800-805.
- Karuppanapandian, T., Moon, J.C., Kim, C., Manoharan, K. and Kim W. (2011) Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. Australian Journal of Crop Science. 5: 709-725
- Kirbag, Z. F. and Munzuroglu, O. (2005) Effects of some heavy metals on content of chlorophyll, prolin and some antioxidant chemicals in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings. Acta Biologica Cracoviensia. Series Botanica 47: 157-164.
- Kramer, U, Cotter-Howells, J D, Charnock, J. M., Baker, A. J. M. and Smith J. A. C. (1996) Free Boominathan, R. and Doran, P.M. (2003) Organic acid complexation, heavy metal distribution and the effect of ATPase inhibition in hairy roots of hyperaccumulator plant species. Journal of Biotechnology 101:131-146.
- Chaney, R. L., Malik, M. Lim, Y. M. Brown, S. L., Brewer, E. P., Angle J. S. and Baker, A.J.M. (1997) Phytoremediation of soil metals. Current Opinion on Biotechnology 8:279-284.
- Chen, Y. X. and Wongs, M. H. (2003) Physiological mechanism of plant root exposed to cadmium. Chemosphere 50: 789-793.
- Chiang, P., M. K., Wang, C., Chiu Y. and Chou, S. (2006) Effects of cadmium amendments on low-molecular-weight organic acid exudates in rhizosphere soils of tobacco and sunflower. Environmental Toxicology 479-488.
- Dai, L.P., Xiong, Z.T., Huang, Y. and Li, M.J. (2006) Cadmium-induced changes in pigments, total phenolics, and phenylalanine ammonia-lyase activity in fronds of *Azolla imbricata*. Environmental Toxicology 21:505-12.
- Dechun, S.U., Jianping, X., Weiping, J., Woonchung, W. (2009) Cadmium uptake and speciation changes in the rhizosphere of cadmium accumulator and non-accumulator oilseed rape varieties. Journal of Environmental Sciences 21: 1125-1128
- Di cagno, R., Guidini, L. and Soldatini, G. F. (2001) Combined cadmium and ozone treatment affect photosynthesis and ascorbate-dependent defence in sunflower. New Phytologist 151:627-636.
- Dixit, V., Pandey, V. and Shyam, R. (2001) Differential antioxidative responded to Cd in

- 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.
- Peterson, P.J. and Alloway, B.J. (1979) *The Chemistry, Biochemistry and Biology of Cadmium* (M. Webb Ed.). Elsevier, North Holland Biomedical Press, Amsterdam, New York, Oxford. 2:45-92.
- Raskin, I., Kumar, P. B. N., Dushenkov, A.V and Salt, D.E. (1994) Bioconcentration of heavy metals by plants. *Current Opinions on Biotechnology* 5: 285-290.
- Rothery, E. (1988) Analytical methods for graphite tube atomizers. Varian Australia Pty Ltd. Page 102.
- Salt, D.E., Prince, R. C. Pickering, I.J. and Raskin, H. (1995) Mechanism of cadmium mobility and accumulation in Indian mustard. *Plant Physiology* 109:1427-1433.
- Salt, D. E., Smith, R. D. and Raskin, I. (1998) Phytoremediation. *Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology* 49:643-668.
- Sanita, D., Toppi, L. and Gabrielli, R. (1999) Review, Response to Cd in higher plants. *Environmental and Experimental Botany* 41:105-130.
- Schwartz, J. and Levin, R. (1991) The risk of lead toxicity in homes with Pb paint hazard, *Environmental Research* 54:1-7.
- Velikova, V., Yordanov, I. and Edreva, A. (2000) Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants - Protective role of exogenous polyamines. *Plant Science* 151: 59-66.
- histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel. *Nature* 379: 635-638.
- Lanaras, T., Moustakas, M., Symeonidis, L., Diomantoglou, S. and Karataglis, S. (1993) Plant metal content, growth responses and some photosynthetic measurements of field-cultivated wheat growing on ore bodies enriched in Cu. *Physiologia Plantarum* 88: 307-314.
- Lichtenthaler, H.K. (1987) Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology* 148:350-382.
- Ma, J. F., Ryan P. R., Delhaize, E. (2001) Aluminum tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *Trends in Plant Science* 6: 273-378.
- Madrid, F. and Kirkham, M.B. (2000) Heavy metal uptake by barely and sunflower grown in abandoned animal lagoon soil, *Plant and Soil* 195: 62-68.
- Meir, S., Philosophadas, S. and Aharoni, N. (1992) Ethylene increased accumulation of fluorescent lipid-peroxidation products detected during Parsley by a newly developed method. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 117: 128-132.
- Mishra, S., Srivastava, S., Tripathi, R.D., Govindarajan, R., Kuriakose, S.V. and Prasad, M.N.V. (2006) Phytochelatin Synthesis and response of antioxidants during cadmium stress in *Bacopa monnieri* L. *Journal of Plant Physiology and Biochemistry* 44: 25-37.

The investigation of exogenous application of organic carboxylic acids on some biochemical parameters and Cd and Pb absorption by canola seedlings

Hakimeh Oloumi^{1*}, Effat Ahmadi Mousavi¹ and Neda Hasibi

¹Department of Ecology, International Center for Science, High Technology & Environmental Sciences, Kerman, Iran

*Corresponding author: oloumi.ha@gmail.com

Abstract:

With regards to the excess entry of heavy metals to the natural resources and thus the importance of heavy metal removal from the environment, in this investigation, the effects of some organic acid treatment on cadmium and lead absorption was studied one week *Brassica napus* seedlings. Canola seeds were cultured in Petri dishes containing 10 mL of 100 μM CdCl_2 or 100 μM PbCl_2 and some organic carboxylic acids including 50 μM citrate, 1 μM oxalate, 50 μM fumarate or 300 μM histidine. To study the role of these organic acids in alleviating of heavy metal stress, some biochemical and growth parameters including the content of total chlorophyll, carotenoids, hydrogen peroxide, malondialdehyde and dry weight, were also investigated in the 7-day canola seedlings under Cd and Pb stress. Although organic carboxylic acid treatment increased Cd and Pb absorption by canola seedlings, there was also an increase in the content of total chlorophyll, carotenoids and dry weight in seedlings treated by carboxylic acids. Cadmium and lead stress caused an increase in the hydrogen peroxide but carboxylic acid application decreased the content of malondialdehyde and hydrogen peroxide in the seedlings under heavy metals stress. Based on the results, it seems that the application of some organic carboxylic acids not only improved remediation capability of Cd and Pb by canola seedlings, but also had positive effects on alleviation of Cd and Pb toxicity in canola seedlings.

Keywords: *Brassica napus*, Cadmium, Lead, Organic carboxylic acids.