مجله زارعت و اصلاح نباتات
جلد ۸، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۱
صفحات ۱۱۸-۱۱۱

بررسی تجمع سرب در قسمت‌های مختلف گیاه سیر و واکنش گیاه به تنش اکسیداتیو سرب

The investigation of lead accumulation in different parts of Garlic (Allium sativum L.) and the response of plant to lead oxidative stress

محمد موسوی*[۱]، امین باقی زاده[۲]، فیاض آقایاری[۱]، داریوش افضلی گروه[۲]، ندا محمدی[۳]

چکیده

آلودگی خاک خطرات روز افزونی برای سلامتی انسان ومحیط زیست دارد، فلزات سنگین از جمله مهم ترین آلاینده‌های محیط زیست به شمار می‌آیند که در دهه‌های اخیر به شدت مورد توجه تعداد زیادی از پژوهشگران قرار گرفته اند. گیاه پالایی یکی از روش‌های مقرون به صرفه‌ای است که می‌تواند به خروج این عناصر از خاک کمک کند، هدف از این کار، بررسی تجمع سرب در قسمت‌های مختلف گیاه سیر و عکس العمل گیاه سیر در برابر تنش اکسیداتیو بود. آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی با چهار سطح نیترات سرب (شامل ۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰و ۱۵۰۰ میلی گرم در کیلوگرم خاک) و چهار تکرار در گلخانه تحقیقاتی مرکز بین المللی علوم وتکنولوژی پیشرفته کرمان انجام شد. نتایج نشان داد که سیر در مواجهه با غلظت‌های مختلف سرب قادر است بیشترین میزان سرب را در ریشه جای دهد.اندازه گیری سطوح آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز نشان داد که میزان آنزیم کاتالاز در غلظت‌های مختلف سرب دارای تفاوت معناداری است و این در حالی است که سطوح آنزیم پراکسیداز در تیمارهای مختلف سرب تفاوت معناداری نداشت.نتایج این بررسی نشان می‌دهد که سیر از طریق فرآیند تثبیت ریشه‌ای میتواند میزان بالایی از سرب را در ریشه خود جای دهد.

واژه‌های کلیدی: گیاه پالایی، سیر، سرب، تنش اکسیداتیو، کاتالاز، پراکسیداز

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، گروه زراعت، کرج، البرز، ایران
۲- مرکز بین المللی علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی کرمان
۳- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرمان، باشگاه پژوهشگران جوان، کرمان، ایران
* نویسنده مسئول: Email: mousavim24@yahoo.com

مقدمه

آلودگی خاک خطرات روز افزونی برای سلامتی انسانها و محیط زیست دارد. عناصر سنگین از جمله مهم ترین آلاینده‌های محیط زیست یه شمار می‌آیند که در چند دهه اخیر به شدت مورد توجه تعداد زیادی از پژو هشگران قرار گرفته اند. تجمع عناصر سنگین در خاک به ویژه زمین‌های کشاورزی امری تدریجی بوده و غلظت عناصر می‌تواند به سطوحی برسد که امنیت غذایی بشر را تهدید نماید (عباسپور و همکاران ۱۳۸۴).سرب به اشکال مختلفی در منابع طبیعی سراسر دنیا وجود دارد و رایج ترین فلز سنگین آلاینده در محیط محسوب می‌شود. سرب در گیاهان باعث اختلال در میتوز، کلروز برگ ها، توقف رشد ریشه و ساقه و کاهش فتوسنتز و سنتز DNA می‌گردد و بر روی فعالیت‌های آنزیمی تاثیر گذار است. سرب نه تنها بر روی رشد گیاهان اثر گذار است، بلکه با وارد شدن به چرخه غذایی باعث ایجاد خطرات برای انسان و حیوانات می‌گردد (Liu D et al., 2009). سرب با مقدار معمول ۲تا ۳۰۰ میلی گرم در کیلوگرم خاک کم تحرک ترین عنصر سنگین در خاک محسوب میگردد. این عنصر از منابع مختلفی وارد چرخه حیات شده و باعث آلودگی محیط زیست و ایجاد اختلال در زندگی جانداران می‌شود. دامنه طبیعی غلظت سرب در گیاهان از۲ / ۰تا ۲۰ میلی گرم در کیلوگرم و حد بحرانی آن ۳۰ تا ۳۰۰ میلی گرم در کیلوگرم گزارش شده است (عباسپور و همکاران ۱۳۸۹). فلزات سنگین در محیط تجزیه نمی شوند، بنابراین نیاز یه خارج کردن آنها از محیط می‌باشد از طرفی هزینه‌های بسیار گزاف روش‌های فیزیکی و شیمیایی سبب تلاش در جهت دست یابی به روش‌های ارزان تری شده است.بر خی از گیاهان می‌توانند به‌طور کامل و یا جزیی مواد آلاینده موجود در خاک؛ لجن؛ رسوبات؛ آبهای زیر زمینی و سطحی و هوا را در خود جمع کنند که به این فرآیند گیاه پالایی گفته میشود (رضوانی و همکاران، ۱۳۸۴). گیاه پالایی روشی پایدار، طبیعی، کم هزینه، آسان، دوستدار زیست بوم و قابل کاربرد در سطوح وسیع است (داوری و همکاران ۱۳۸۹). در گیاهان مکانیسم‌های آنزیمی و غیر آنزیمی حفاظتی برای پاک سازی AOS ها و کاهش دادن اثرات مضر آنها وجود دارد. آنزیم‌های آنتی اکسیدان شامل سوپر اکسید دیسموتاز، پراکسیداز و کاتالاز هستند (Dawes 2000). سیر گونه‌ای با اهمیت اقتصادی و مقاوم به تنش‌های محیطی زنده و غیر زنده مانند فلزات سنگین؛ تنش اکسیداتیو؛ ویروس و باکتری است (Liu D et al., 2009). هدف از این تحقیق مطالعه واکنش گیاه سیر در برابر غلظت‌های مختلف سرب و جذب و تجمع آنها در این گیاه و همچنین بررسی مقابله با تنش اکسیداتیو است. با توجه به اینکه اکثر کارهای تحقیقاتی انجام شده بر روی سیر در شرایط کشت هیدرو پونیک و گیاهچه‌های سیر انجام شده، به نظر میرسد برای بررسی خاصیت بیش اندوزی گیاه سیر بایستی شرایط خاک را نیز مد نظر قرار داد تا نتایج حاصله قابل توصیه در شرایط مزرعه باشد، لذا تحقیق حاضر بر روی گیاهان سیر کشت شده در گلدان در طول یک دوره رشد این گیاه صورت گرفته است.

مواد و روش‌ها

آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی و با ۴ سطح عنصر سرب در ۴ تکرار در گلخانه تحقیقاتی مرکز بین المللی علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی کرمان صورت گرفت. برای کشت گیاهان مورد نظر از یک خاک غنی از مواد آلی با درجه هوموس بالا و بدون هیچ گونه آلودگی به عناصر سنگین استفاده شد. سطوح عنصر سرب صفر؛ ۵۰۰؛ ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ میلی گرم در کیلوگرم خاک انتخاب شده و به‌صورت ترکیب نیترات سرب قبل از کشت با خاک کاملا مخلوط شده و رطوبت ۱۰ روز در حد ظرفیت زراعی نگهداشته شد تا مخلوط عناصر و خاک به حالت همگن رسیده و شرایط حد الامکان با شرایط مزرعه شبیه تر گردد. برای کشت سیر از حبه‌های یک توده بذر محلی یکنواخت و عاری از هر گونه بیماری استفاده شد، خاک‌ها در گلدان‌های یک کیلوگرمی توزین وحبه‌ها در داخل آنها کشت گردید. آبیاری با دور ۴-۳ روز یک بار

صورت گرفته و در طول دوره رشد (حدودا ۱۰۰روز) شرایط مناسب گلخانه‌ای (دمای۲۸-۲۵ درجه رطوبت ۳۰درصد؛ طول روز ۱۴ ساعت) برای رشد فراهم گردید. گیاهان در ۲۰ دیماه سال ۱۳۸۹ کشت شدند و بعد از اتمام طول دوره رشد در تاریخ ۳۰فروردین ماه ۱۳۹۰ برداشت صورت گرفت. گیاهان برداشت شده پس از شستشوی ریشه‌ها به سه قسمت ساقه، پیاز و ریشه تقسیم شده و در پاکت‌های کاغذی در دمای ۷۵ درجه به مدت ۴۸ ساعت در درون آون قرار گرفتند تا وزن خشک نمونه‌ها محاسبه گردد. سپس نمونه‌ها آسیاب شده و هضم آنها به روش هضم تر صورت گرفت. بعد از هضم کامل نمونه‌های گیاهی توسط اسید نیتریک با استفاده از کاغذ صافی، نمونه را صاف کرده و سپس با استفاده از آب مقطر حجم را به ۵۰ میلی لیتر رسانده ونمونه‌ها در لوله‌های آزمایش ۵۰ میلی لیتری برای قرائت میزان عناصر موجود در اندام‌های گیاهی تحویل آزمایشگاه جذب اتمی گردید. مقدار سرب موجود در اندام‌های گیاهی با استفاده از دستگاه جذب اتمی مدل varian spectra ۲۲۰ استرالیا محاسبه گردید. برای نمونه گیری به منظور سنجش فعالیت آنزیمی آنزیمهای کاتالازو پر اکسید از، در پایان آزمایش از بافت تازه برگ‌های میانی گیاه، اقدام به نمونه گیری شد و نمونه مذکور بلافاصله در نیتروژن مایع منجمد و به فریزر ۸۰- منتقل گردید.

عصاره گیری جهت سنجش فعالیت آنزیمی و پروتئین

۱ گرم از بافت تر گیاهی در هاون چینی محتوی ۵ cc بافرتریس HCL 0.05 مولار با ph=7.5 ساییده شد، مخلوط حاصل در دور ۱۰۰۰۰دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شد و سپس محلول رویی به عنوان عصاره خام آنزیمی جدا شده و تا زمان سنجش فغالیت آنزیم‌ها و پروتئین‌ها در دمای ۸۰- درجه نگهداری شد.

سنجش مقدار پروتئین کل به روش برادفورد

برای سنجش غلظت پروتئین در تیمارها، به لوله‌های آزمایش حاوی ۱۰۰ میکرولیتر عصاره گیاهی؛ ۵ میلی لیتر معرف بیوره افزوده شد و سریعا ورتکس گردید، پس از ۲۵ دقیقه جذب آن با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد.

سنجش فعالیت کاتالاز

سنجش فعالیت کاتالاز به روش Dhindasa,1981 انجام شد، به این منظور به عصاره پروتئینی PVP ۱ % اضافه شد، مخلوط واکنش شامل موارد زیر بود؛

۱- ۲/۸۷ میلی لیتر بافر پتاسیم فسفات ۵۰ میلی مولار با ph=7

۲- ۳۰ میکرولیتر آب اکسیژنه ۱۵ میلی مولار را در حمام یخ مخلوط کرده و سپس ۱۰۰میکرو لیتر عصاره آنزیمی را اضافه کرده و تجزیه آب اکسیژنه با کاهش در جذب در طول موج ۲۴۰ نانومتر در یک دقیقه پیگیری شد و به ازاء هر میلی گرم پروتئین در عصاره آنزیمی بیان شد.

سنجش فعالیت پر اکسیداز

سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز به روش Kar & Mishra,1976 صورت گرفت. به این منظور از عصاره آماده شده استفاده گردید، مخلوط واکنش شامل موارد زیر بود:

۲ cc با فرتریس ۱۰۰میلی مولار با Ph=7، ۲۰۰ میکرولیتر پیروگالل با غلظت نهایی ۱۰میلی مولار و ۳۰۰ میکرولیتر آب اکسیژنه ۵ میلی مولار در حمام یخ با هم مخلوط و به آن ۵۰ میکرو لیتر عصاره آنزیمی افزوده و فعالیت محلول آنزیمی به‌صورت تغییرات واحد جذب در طول موج ۴۲۵ نانومتر در دقیقه به ازاء هر میلی گرم پروتئین بیان شد.

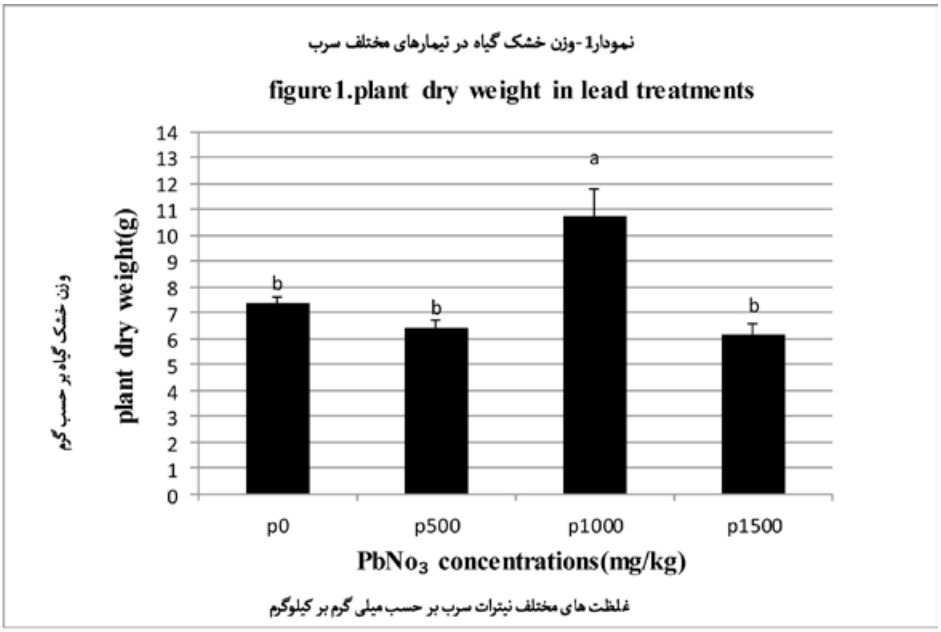
محاسبات آماری

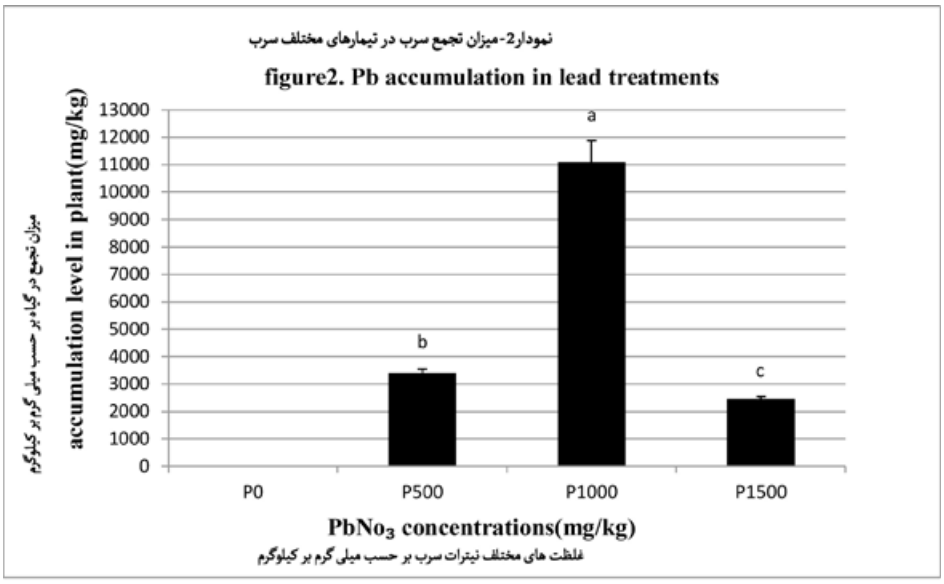
آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم افزار MSTAT-C صورت گرفت و نمودارهای مربوطه با استفاده از نرم افزار Excel طراحی شدند.

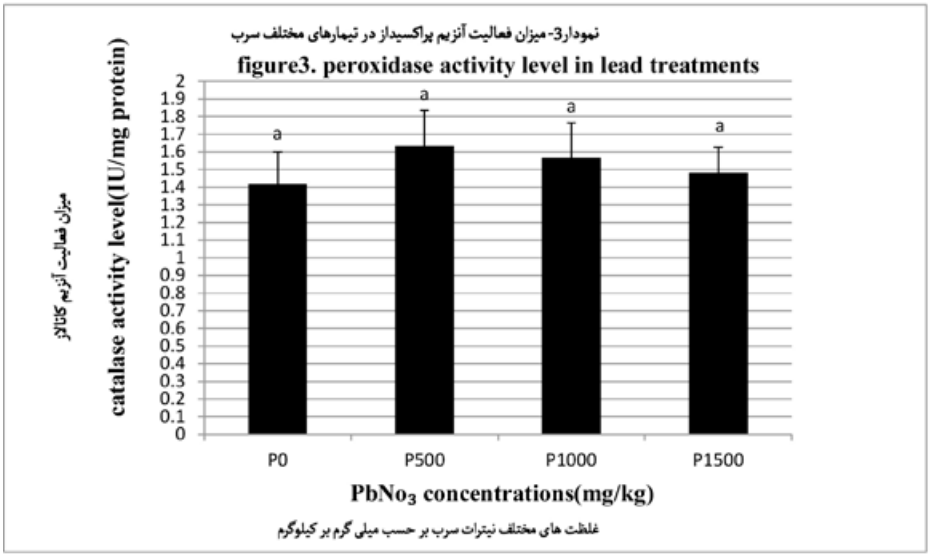
نتایج

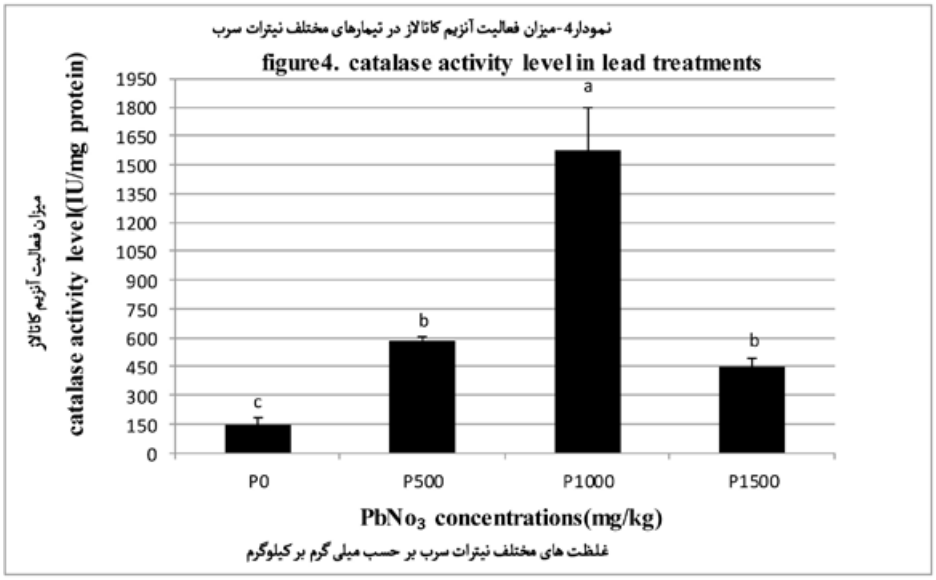
نتایج حاصل از تجزیه واریانس حاکی از اختلاف معنی دار بین وزن خشک تیمارهای مختلف سرب است، (نمودار شماره

۱وجدول شماره ۱). به‌طوری که بالاترین میزان وزن خشک مربوط به تیمار mg/kg ۱۰۰۰ سرب وبالاترین میزان جذب هم متعلق به این تیمار است، در حالیکه کمترین میزان وزن خشک متعلق به تیمار mg/kg ۱۵۰۰ بوده و کمترین میزان جذب نیز متعلق به این تیمار است. همچنین آنالیز داده‌ها نشان داد که گیاه در مواجهه با مقادیر مختلف سرب سعی می‌کند میزان بیشتری از عنصر آلاینده را در ریشه جای دهد و درصد کمی از آن وارد پیاز و اندام هوایی می‌گردد.) نمودار شماره ۲و جدول شماره ۲). محاسبه میزان فعالیت آنزیمی مشخص کرد که میزان آنزیم پراکسیداز گیاهانی که در معرض غلظت‌های مختلف سرب قرار گرفتند هیچ گونه تفاوت آماری معنی داری با تیمار کنترل ندارد. (نمودار شماره۳ وجدول شماره ۱). این در حالیست که میزان آنزیم کاتالاز در غلظت‌های ۵۰۰ تا ۱۵۰۰میلی گرم بر کیلوگرم دارای تفاوت آماری معنی داری بود به‌طوری که بیشترین فعالیت آنزیمی مربوط به تیمار mg/kg ۱۰۰۰ بود. (نمودار شماره۴ وجدول شماره ۱).









بحث

نتایج نشان دهنده مقاومت بالای سیر به تنش سرب تا غلظت ۱۰۰۰ mg/kg می‌باشد. افزایش وزن خشک در تیمار mg/kg ۱۰۰۰ نسبت به تیمار شاهد و تیمار mg/kg ۵۰۰ احتمالا به علت وجود نیترات (در ترکیب نیترات سرب) و متعاقب آن افزایش رشد رویشی بوده است. در حالی که در تیمار mg/kg ۱۵۰۰ علیرغم بالا بودن میزان نیترات، رشدگیاه افت کرده و متوقف می‌شود. این امر نشان دهنده این است که گیاه در غلظت mg/kg ۱۵۰۰ قادر به تحمل تنش ناشی از سمیت سرب نبوده و بارزترین علایم مسمومیت سرب شامل کاهش رشد ساقه و ریشه در سیر ظاهر می‌گردد، نتایج حاصل از بررسی فعالیت آنزیمی کاتالاز نیز نشان دهنده افت فعالیت این آنزیم در غلظت mg/kg ۱۵۰۰ می باشد. در مقاومت بالای سیر به تنش سرب مکانیسم‌های مختلفی دخیل است. یکی از این مکانیسم‌ها توانایی این گیاه در تجمع عناصر سنگین در قسمت ریشه و جلوگیری از ورود آن به پیاز و اندام هوایی است، و این مکانیسم یکی از دلایلی است که مقاومت بالای سیر به فلز سنگین را توجیه میکند (Liu D. et al. 2009).

مکانیسم دیگر گیاه سیر برای مقابله با تنش سرب، سیستم دفاعی آنتی اکسیدانی سیر است، مقادیر بالای کاتالاز در

تیمارهای اعمال شده سرب این امر را تائید می‌کند که این گیاه با دارا بودن سیستم آنزیمی قدرتمند و تولید کاتالاز در سطوح بالا رادیکال‌های آزاد را از بین برده وشرایط ادامه حیات را فراهم می‌کند.با توجه به اینکه کاتالاز مهمترین آنزیم در مقابله با تنش اکسیداتیو است، (Qureshi et al.2007). به نظر می‌رسد که مکانیسم اصلی گیاه برای پاک سازی رادیکال‌های آزاد باشد.عدم تفاوت سطوح آنزیم پراکسیداز برگ در بین تیمارهای مختلف سرب احتمالا به این دلیل است که چرخه آسکوربات-گلوتاتیون (که برای پاک‌سازی گونه‌های اکسیژن آزاد عمل می‌کند) در ریشه صورت می‌گیرد (Liu D et al. 2009). یکی دیگر از مکانیسم هایی که می‌تواند مقاومت بالای سیر به فلز سنگین را توجیه کند، توانایی این گیاه در تولید ترکیبات گوگردی است.

(Lancaster et al 1989 & Rennenberg et al 1982)

یکی از این ترکیبات تیوسولفانات است، که در همان مسیری سنتز می‌شودکه شلاتین‌های گیاهی ساخته می‌شوند (Cobbett & Goldsbrough 2002). شلاتین‌های گیاهی از مهمترین گروههای پروتئین‌های باند شونده به فلزات سنگین هستند (Jiang et al 2005). به نظر می‌رسد که ترکیبات گوگردی نظیر تیوسولفانات از طریق باند شدن با فلزات سنگین از ایجاد خسارت توسط آنها می‌کاهند و بدین طریق نقش دفاعی خود را ایفا می‌کنند. بر اساس یافته های Baker & Brooks واژه بیش اندوزی را در این بررسی می‌توان به گیاه سیر نسبت داد، (گیاهی که بتواند ۱۰۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عنصر سرب را در وزن خشک خود جای دهد) اما در فرایند گیاه پالایی ما نیازمند گیاهی هستیم که بتواند بیشترین مقدار فلز سنگین را در اندام هوایی خود جای دهد (Baker & Brooks 1989). بنابراین سیر در فرایند استخراج گیاهی گیاه مناسبی محسوب نمی شود، در حالیکه این گیاه قادر است مقادیر بالای سرب را از طریق فرایند تثبیت ریشه ای (بالاتر از آستانه بیش اندوزی) در ریشه خود جای دهد. با توجه به اینکه بیشترین کارهای انجام شده در دنیا در شرایط کشت در محلول و در بازه‌های زمانی کوتاه، بیش اندوزی گیاه سیر را تائید کرده است، بررسی حاضر نیز نشان می‌دهد که گیاه سیر در شرایط کشت در خاک و در طول یک دوره کامل رشد به خوبی قادر است سرب را از خاک جذب کرده و طی فرایند تثبیت ریشه‌ای در ریشه‌های خود تجمع دهد. بنابراین گیاه سیر با دارا بودن یک سیستم آنزیمی آنتی اکسیدانی قدرتمند، توانایی تولید ترکیبات گوگردی، و قدرت تجمع بالا در ریشه می‌تواند گیاه مناسبی برای مطالعات گیاه پالایی محسوب گردد. موضوعاتی از قبیل بررسی ژنتیکی گیاه سیر در مقاومت به تنش فلز سنگین، غنی سازی زیستی سیر با عناصر ضروری مورد نیاز انسان، مطالعه سیستم آنزیمی گیاه سیر و... می‌تواند از زمینه‌های تحقیقاتی آینده باشد.

جدول ۱- تجزیه واریانس شاخص‌های مربوط به آلاینده سرب (میانگین مربعات)

Table 1. Analysis of variance for lead parameters

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	وزن خشک گیاه Plant dry weight	فعالیت کاتالاز Catalase activity	فعالیت پراکسیداز Peroxidase activity	میزان تجمع سرب Lead accumulation
تیمار Treatment	3	17.733**	1534066.448**	0.035Ns	91902897.92**
خطا Error	12	2.2155	8550.636	0.02325	124154.1217
کل Total	15				

**وns: به ترتیب معنی دار در سطح احتمال یک درصد و غیرمعنی دار

. **,ns: significant at 1% level of probability and not significant, respectively

جدول۲- میزان عنصر سرب در قسمت‌های مختلف گیاه بر حسب درصد

Table 2. Lead percentage in different parts of plant

تیمار	ریشه (٪)	پیاز (٪)	اندام هوایی (٪)
500mg/kg	86.8	9.2	4
1000mg/kg	90	6.7	3.3
1500mg/kg	83	13	4

References منابع

داوری، م، م.همایی، و، ح.، خداوردی لو، ۱۳۸۹.مدلسازی گیاه پالایی خاکهای آلوده به آلاینده‌های نیکل و کادمیم بااستفاده ازتوابع ماکروسکپیک کاهش تعرق، علوم وفنون کشاورزی ومنابع طبیعی، ، دوره چهاردهم، شماره۵۲، صفحه ۸۴-۷۵

رضوانی، م.، م.نورمحمدی، ف. زعفریان،.۱۳۸۴. پاکسازی مواد آلاینده خاک، آب‌های زیر زمینی و هوا به وسیله گیاهان (phytoremediation). ویژه نامه مجله علمی پژوهشی علوم کشاورزی، سال یازدهم، شماره یکم، صفحات ۲۵-۷

عباسپور، ع.، م.کلباسی.، ش.حاج رسولیها، ا.گلچین.، ۱۳۸۴ بررسی آلودگی برخی خاکهای کشاورزی ایران به کادمیم وسرب، نهمین کنگره خاکشناسی، تهران-مرکز تحقیقات حفاظت خاک و آبخیزداری،

Baker,A.J.M.and Brooks,R.R.1989. Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metalic elements-A review of their distribution, ecology and phytochemistry. Biorecovery 1:81-126

Cobbett,Ch. and Goldsbrough,P.2002. phytochelatins and metallothioeins:Roles in heavy metal detoxification and homeostasis.Annual Review of plant Biology 53:159-182

Dawes IW (2000) Response of eukaryotic cells to oxidative stress. Agric Biol Chem 43:211-217

Degraeve N. (1981) Carcinogenic, teratogenic and mutagenic effects of cadmium. Mutat Res;86:115-35

Jiang WS, Liu DH (2001) hyperaccumulation of cadmium by roots, bulbs and shoots of Allium sativum L. Bioresour Technol 76:9-13

Lancaster,J.E. and Shaw,M.L.1989.ϒ-Glutamyl peptides in the biosynthesis of S-alk (en) yl-L-Cysteine Sulphoxides (flavor precursors) in Allium. Phytochemistry 28 (2):455-460

Liu,D.,Zou,J.,Meng,Q.,Zou,J.,Jiang,w.,2009. Uptake and accumulation and oxidative stress in garlic (Allium sativum L.) under lead phytotoxicity.Ecotoxicology.18:134-143

Qureshi MI, Abdin MZ, Qadir S. Iqbal M (2007) Lead induced oxidative stress and metabolic alterations in Cassia angustifolia Vahl. Biol plant 51:121-128

Rennenberg,H.1982. Glutathion metabolism and possible biological roles in higher plants. Phytochemistry 21 (12):2271-2781

Zhang HY, Jiang YN, He ZY, Ma M (2005 b) cadmium accumulation and oxidative burst in garlic (Allium sativum L.) J plant physiol 162:977-984