مطالعه اثر تیمار سرب بر برخی شاخص‌های مرفولوژیکی و فیزیولوژیکی گیاه اطلسی (*Petunia hybrida* L.)

عبدالکریم چهرگانی راد، سمانه فرزان و زهره شیرخانی*

همدان، دانشگاه بوعلی‌سینا، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

تاریخ دریافت: ۹۴/۲/۹ تاریخ پذیرش: ۹۴/۷/۱

چکیده

آلودگی فلزات سنگین یکی از مشکلات جدی در سراسر جهان است. در میان فلزات سنگین سرب یک آلاینده قوی است که به آسانی در خاک و رسوبات انباشته می‌گردد. این مطالعه به‌منظور بررسی اثرات سمیت سرب بر خصوصیات تکوینی و فیزیولوژیکی در اطلسی انجام شده است. بذرهای گیاه اطلسی در شرایط گلخانه‌ای کشت شدند، برای این منظور از غلظت‌های ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۲۰۰ میکرومول بر لیتر استات سرب استفاده شد. نتایج به‌دست آمده کاهش در درصد جوانه‌زنی، طول ریشه و ساقه، مساحت سطح برگ، ارتفاع گیاه، میزان کلروفیل a، b و a+b و افزایش در فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز تحت تیمار سرب را نشان داد. در مورد آنزیم پراکسیداز افزایش فعالیت آنزیم تا غلظت ۸۰۰ میکرومول بر لیتر سرب مشاهده و بعد در غلظت ۱۲۰۰ کاهش یافت. تیمار با سرب تأثیر معنی‌داری بر محتوای پروتئین کل نداشت. نتایج به دست آمده از این تحقیق نشان داد که سرب بر گیاهان اثر منفی داشته و با وجود عدم نیاز گیاهان به این عنصر سنگین، جذب گیاه شده و موجب اثرات منفی بر عملکرد گیاهان می‌شود.

واژه‌های کلیدی: سرب، اطلسی، پارامترهای مرفولوژیک، پارامترهای فیزیولوژیک

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۸۱۳۸۳۸۱۰۵۸ ، پست الکترونیکی: zohreh.shirkhani@gmail.com

مقدمه

عناصر سنگین که در نتیجه فعالیت‌های عمده شهری، صنعتی و کشاورزی تولید می‌شوند، باعث آلودگی مناطق وسیعی از جهان شده‌اند و با تجمع در زنجیره غذایی خطرات بسیاری برای انسان و جانوران بهمراه **دارند** (۱و۴۸). بر اساس گزارش‌های متعدد، سرب مهمترین فلز آلاینده در محیط‌زیست است. از جمله مهمترین منابع آلاینده سرب می‌توان به فعالیت‌های معادن، صنایع، دود حاصل از فعالیت وسایل‌نقلیه، ترکیبات حاوی سرب مانند رنگ‌ها، گازوئیل و مواد منفجره اشاره کرد (۲۲و۳۱). سرب جزء فلزات غیرضروری برای گیاهان است که عملکرد زیستی شناخته شده‌ای ندارد اما با توجه به انحلال‌پذیری این عنصر در آب به راحتی توسط ریشه جذب گیاه می‌شود. افزایش این فلز در محیط باعث اثراتی از قبیل اختلال در جوانه‌زنی دانه، اختلال در میتوز، القای کلروز و نکروز در برگ، کاهش فتوسنتز و تنفس، عدم توازن آبی و تغییر در تعادل هورمونی گیاه می‌شود. سرب همچنین منجر به توقف فعالیت‌های آنزیمی، اختلال در تغذیه معدنی و تغییر در نفوذپذیری غشا می‌گردد (۲۸، ۳۳ و۴۲).

در مطالعه‌ای که توسط Jeliazkova و همکاران (۲۰۰۳) (۲۵) انجام شد اثرات فلزات سنگین شامل مس، روی، سرب و کادمیوم بر رشد و جوانه‌زنی *Pimpinella anisum*، *Carum caravi* و *Foeniculum vulgar* مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که رشد اولیه ریشه‌ها نسبت به جوانه‌زنی، بیشتر تحت

تأثیر عناصر سنگین است. ایرانبخش و همکاران (۱۳۸۹) (۲) نشان دادند که کلرید سرب تأثیر معنی‌داری بر درصد جوانه‌زنی دانه‌رست‌های سویا (*Glycine max* L.) ندارد اما موجب افزایش سرعت جوانه‌زنی و فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز و کاهش معنی‌دار طول ریشه، اندام هوایی و طول دانه‌رست می‌گردد.

مطالعات نشان داد که نیترات سرب، تغییرات مشخصی را در ساختار کلروپلاست و ترکیب لیپیدی غشا تیلاکوئیدهای *Ceratophyllum demersum* به‌وجود آورده و روی محل-های گیرنده و دهنده الکترون در فتوسیستم‌ها و کمپلکس سیتوکروم b/f اثر گذاشته است (۲۴).

بررسی اثر فلزات سنگین شامل نیکل، سرب و روی در ذرت نشان داد که در شرایط تنش فتوسنتز کاهش یافته، به-طوری‌که در غلظت‌های بالاتر و مدت زمان بیشتر تیمار این کاهش قابل توجه‌تر بود (۲۱). تحقیقات کاهش در میزان کلروفیل در برگ‌های *Phaseolus vulgaris* تحت تیمار نیکل (۳۵) و در *Riccia* SP. تحت تیمار کادمیوم (۳۹) و همچنین کاهش در فتوسنتز برگ‌های کلم را در تیمار با نیکل (۳۴) نشان داده‌اند.

در گیاهان مکانیسم‌های حفاظتی متفاوتی برای پاک‌سازی - ROSهای حاصل از تنش و کاهش دادن اثرات مضر آنها وجود دارد. از جمله مکانیسم‌های حفاظتی، آنزیم‌های آنتی اکسیدان شامل سوپراکسیددسموتاز، پراکسیداز و کاتالاز هستند (۱۶). در گیاه برنج (۳۶) و کلزا (۴۵) افزایش در میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان گزارش شده است.

گیاه اطلسی (*Petunia hybrida*) از خانواده سولاناسه (Solanaceae) بهترین اطلسی باغچه ای شناخته شده و یک گونه زینتی است که به‌طور گسترده در اکثر نقاط زمین کشت می‌شود (۵). با گسترش شهرنشینی گیاهان زینتی یکی از مهمترین بخش تزئینات مناطق شهری هستند. اطلسی یکی از عناصر لازم در احداث پارک‌ها و فضای سبز است. با توجه به مسئله آلودگی ناشی از فلزات سنگین از جمله سرب و خطرات ناشی از آن برای گیاهان و در نتیجه انسان‌ها و از طرف دیگر اهمیت گیاه اطلسی به‌عنوان گیاه زینتی این پژوهش با هدف بررسی تأثیر سرب بر برخی پارامترهای تکوینی و فیزیولوژیک گیاه اطلسی انجام شد.

مواد و روشها

ارزیابی جوانه‌زنی بذر گیاه اطلسی در حضور سرب: بذر گیاه اطلسی از شرکت گلبرگ پامچال (کرج) تهیه شد. بذرها ابتدا به مدت ۱۰ دقیقه در محلول هیپوکلرید سدیم ۵ درصد ضدعفونی گردیدند و پس از شست‌وشو به پتری-های حاوی پنبه و کاغذ صافی انتقال یافتند. برای تیمار شاهد از آب مقطر و برای تهیه تیمارهای عنصر سرب از غلظت‌های ۴۰۰، ۸۰۰ و۱۲۰۰ میکرومول بر لیتر استات سرب استفاده شد. در هر پتری‌دیش ۳۰ عدد بذر یکنواخت قرار داده شد (با سه تکرار) و در حدود ۵ میلی‌لیتر از محلول استات سرب در غلظت‌های اشاره شده به آنها اضافه گردید. برای جوانه‌زنی، پتری ها در ۵ ساعت روشنایی و ۱۹ ساعت تاریکی در دمای ۲۷درجه در محفظه‌ای درون آزمایشگاه قرار داده شدند و به مدت ۷ روز در این شرایط نگهداری گردیدند. طی این مدت تعداد بذرهای جوانه‌زده بمنظور تعیین درصد جوانه‌زنی بررسی شد. خروج ریشه اصلی از بذر را به‌عنوان زمان شروع جوانه‌زنی در نظر گرفته (۴۱) و بعد درصد جوانه زنی بذر-ها Germination Percentage(GP) از رابطه زیر بدست آمد:

$$PG=100(N'/N)$$ (در صد)

N: تعداد کل بذرها، N' : تعداد بذرهای جوانه زده می‌باشد. هفت روز پس از شروع آزمایش طول ریشه و ساقه دانه رستها اندازه گیری و در گروه‌های تیماری با شاهد مقایسه شد.

کشت و تیمار: بذر استریل شده اطلسی بعد از شست‌وشو و حذف سموم توسط ضدعفونی‌کننده در سینی‌های مخصوص کشت حاوی کوکوپیت و پرلیت در گلخانه دانشگاه بوعلی سینا کاشته شد. بعد از جوانه‌زنی بذر و تشکیل اولین برگ‌های فتوسنتزی گیاهچه‌ها به داخل گلدان حاوی خاک زراعی و خاکبرگ منتقل شدند. یک گروه ۵ تایی از گلدان‌ها، گیاهان شاهد و بدون تیمار سرب و گروه‌های دیگر با غلظت‌های ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۲۰۰ میکرومول بر لیتر، دو هفته قبل از گلدهی، بخش هوایی گیاهان به مدت چهار هفته به روش اسپری برگی تیمار شدند. گلدان‌ها در داخل گلخانه‌ای با دمای روز و شب ۲۵ و ۱۸ درجه سانتیگراد، شدت نور ۸۵ mmol/m2.s و رطوبت نسبی ۶۵٪ قرار گرفتند. بمنظور سنجش میزان کلروفیل، محتوای پروتئین کل، فعالیت آنزیمی آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز، در پایان آزمایش از بافت تازه برگ-های میانی گیاه، اقدام به نمونه‌گیری شد. ارتفاع و مساحت سطح برگ نیز اندازه‌گیری گردید.

سنجش رنگیزه‌های فتوسنتزی: استخراج کلروفیل از برگ با کمک استون ۸۰ درصد انجام شد (۱۰). سائیدن ۰/۱ گرم برگ با ۵ میلی‌لیتر استون تا به‌دست آوردن یک محلول یکنواخت و همگن ادامه یافت. محلول حاصل به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۴۸۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ (مدل 5417R) گردید، سپس حجم محلول با استون ۸۰ درصد به ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد و جذب نوری محلول رویی در طول موج‌های ۶۴۵ و ۶۶۳ نانومتر به‌وسیله اسپکروفتومتر (مدل Biowave II ساخت کشور انگلستان) اندازه‌گیری شد. میزان کلروفیل a، b و کل در هریک از نمونه‌ها با استفاده از فرمول‌های زیر بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر محاسبه شد:

غلظت کلروفیل a = $۰/۰۱۲۷A_{۶۶۳} - ۰/۰۰۲۶۹A_{۶۴۵}$

غلظت کلروفیل b = $۰/۰۲۲۹A_{۶۴۵} - ۰/۰۰۴۶A_{۶۶۳}$

غلظت کلروفیل (a+b) = $۰/۰۲۰۲A_{۶۴۵} + ۰/۰۰۸۰۲A_{۶۶۳}$

$A_{۶۴۵}$ = میزان جذب در طول موج ۶۴۵

$A_{۶۶۳}$ = میزان جذب در طول موج ۶۶۳

عصاره‌گیری برای سنجش فعالیت آنزیمی و پروتئین: ۱ گرم از بافت تر گیاهی در هاون چینی محتوی ۵ میلی‌لیتر محلول عصاره‌گیری (مخلوط ۱/۲ گرم تریس، ۰/۱ گرم اسید آسکوربیک، ۱۷/۲ گرم ساکارز، ۰/۱ گرم سیستئین کلراید در ۲۶/۸ میلی لیتر اسیدکلریدریک ۰/۲ نرمال را با آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد با pH=7.5) سائیده شد، آنگاه مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه با شتاب ثقلی g ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ گردید. محلول رویی در دمای ۴ درجه سانتیگراد تا زمان سنجش فعالیت آنزیم‌ها و پروتئین نگهداری شد.

سنجش مقدار پروتئین کل به روش برادفورد: سنجشِ کمی پروتئین‌ها با استفاده از روش برادفورد انجام شد. بدین منظور ۰/۱ ml از عصاره‌های تهیه شده را در لوله‌های آزمایش ریخته، به آنها ۵ ml معرف برادفورد افزوده و به سرعت ورتکس گردیدند. جذب و غلظت نمونه‌ها پس از ۲۵ دقیقه در طول موج ۵۹۵ nm با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر خوانده شد. محتوای پروتئین کل بر اساس میلی‌گرم بر گرم وزن تر نمونه با استفاده از منحنی استاندارد سرم آلبومین گاوی (BSA) گزارش گردید (۱۱).

سنجش فعالیت پراکسیداز: به این منظور از عصاره آماده شده استفاده گردید. مخلوط واکنش شامل موارد زیر بود:

۲ میلی لیتر تامپون استات (۰/۲ مولار با pH= 4.8) ، ۲ میلی‌لیتر آب اکسیژنه ۳٪ و ۰/۱ میلی‌لیتر بنزیدین (۰/۰۲ مولار در متانول ۵۰ درصد) با هم مخلوط و به آن ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی افزوده و جذب نوری در طول موج ۵۳۰ نانومتر خوانده و فعالیت آنزیمی برحسب واحد جذب در دقیقه به ازای هر میلی‌گرم پروتئین در گرم وزن تر محاسبه شد (۲۹).

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز: بررسی میزان فعالیت آنزیم کاتالاز و میزان کاهش H_2O_2 با مطالعه تغییرات جذب در ۵۳۰ نانومتر انجام شد. ۰/۲ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی به ۲/۵ میلی‌لیتر تامپون فسفات با pH=۷ و ۰/۲ میلی‌لیتر آب اکسیژنه ۳٪ افزوده شد. و پس از مخلوط شدن کامل آنها تغییرات جذب در طول موج ۵۳۰ نانومتر خوانده شد و فعالیت آنزیم بر حسب واحد جذب در دقیقه به ازای هر میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد (۱۵).

نتایج

نتایج ارزیابی جوانه‌زنی بذر گیاه اطلسی در حضور سرب: جدول ۱ نتایج حاصل از تیمار سرب بر درصد جوانه‌زنی، طول ریشه و ساقه، مساحت سطح برگ و ارتفاع گیاه را نشان می‌دهد. با افزایش غلظت سرب در محیط درصد جوانه‌زنی، طول ریشه و ساقه، مساحت سطح برگ و ارتفاع گیاه کاهش یافت. از نظر آماری کاهش در درصد جوانه‌زنی، مساحت سطح برگ و ارتفاع گیاه در سطح احتمال $p\leq0.05$ و کاهش در طول ریشه و ساقه در سطح احتمال $p\leq0.01$ معنی‌دار بود. بیشترین میزان کاهش در غلظت ۱۲۰۰ میکرومول بر لیتر استات سرب مشاهده شد. درصد جوانه‌زنی از ۳۱/۱ درصد در نمونه شاهد به ۱۴/۴۴ درصد در تیمار ۸۰۰ میکرومول بر لیتر رسید، اختلاف معنی‌دار در درصد جوانه‌زنی بین غلظت‌های ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۲۰۰ مشاهده نشد. نتایج نشان داد که طول ریشه به میزان ۷/۸ میلی‌متر در تیمار ۱۲۰۰ نسبت به شاهد کاهش یافته است. نتایج حاکی از این است که میانگین طول ساقه با افزایش غلظت استات سرب از ۱۸ میلی‌متر به ۰ کاهش پیدا کرده است. نتایج حاصل از بررسی مساحت سطح برگ نشان داد که با افزایش غلظت استات سرب مساحت سطح برگ کاهش یافته است. همچنین نتایج به‌دست آمده از مقایسه میانگین ارتفاع به روش دانکن نشان داد که تیمارهای شاهد، ۴۰۰ و ۸۰۰ میکرومول بر لیتر اختلاف معنی‌دار نداشتند. در حالیکه تیمار ۱۲۰۰ باعث کاهش معنی‌دار ارتفاع گیاه نسبت به نمونه شاهد شد، به‌طوری‌که ارتفاع گیاه از ۲۸/۲ سانتی‌متر به ۱۷ سانتی‌متر رسید (شکل ۱).

نتایج سنجش رنگیزه‌های فتوسنتزی: آنالیز داده‌ها مشخص کرد که اثرات سرب در غلظت‌های مختلف بر روی میزان کلروفیل a، b و a+b از نظر آماری معنی‌دار بوده است ($p\leq0.01$).

جدول ۱- اثر غلظت‌های مختلف سرب (۰، ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۲۰۰ میکرومول بر لیتر) بر برخی شاخص‌های مرفولوژیک در گیاه اطلسی

هر ستون معرف میانگین سه تکرار ± انحراف معیار است. حروف متفاوت بیانگر اختلاف آماری معنی‌دار است ($P\leq0.05$).

تیمار	*جوانه‌زنی (٪)	**طول ریشه (mm)	**طول ساقه (mm)	*مساحت سطح برگ (cm^2)	*ارتفاع گیاه (cm)
شاهد	۳۱/۱±۶/۹۳a	۹/۸±۲/۳۵a	۱۸/۷۳±۲/۴۹a	۰/۲۹±۰/۰۶a	۲۸/۲۰±۷/۱۹a
استات سرب ۴۰۰ µmol/L	۱۹/۹۹±۳/۳۳b	۲/۸۶±۱/۱۰b	۹/۱۶±۲/۳۶b	۰/۲۰±۰/۰۳b	۲۳/۶۰±۳/۹۱ab
استات سرب ۸۰۰ µmol/L	۱۴/۴۴±۱/۹۲b	۲/۰۳±۰/۹۶c	۲/۵۳±۰/۷۳c	۰/۱۷±۰/۰۳b	۲۱/۸۰±۴/۳۲ab
استات سرب ۱۲۰۰ µmol/L	۱۸/۷۷±۶/۹۹b	۲/۰۰±۰/۸۷c	۰±۰/۰۰d	۰/۱۳±۰/۰۳b	۱۷/۰۰±۲/۷۳b

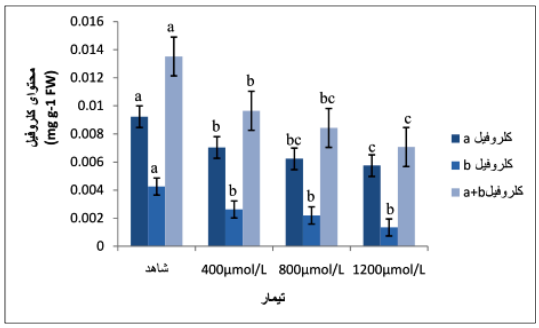
*: اختلاف معنی‌دار با گروه شاهد در سطح $P\leq0.05$

**: اختلاف معنی‌دار با گروه شاهد در سطح $P\leq0.01$

شکل ۱- اثر غلظت‌های مختلف سرب (۰، ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۲۰۰ میکرومول بر لیتر) بر ارتفاع گیاه اطلسی

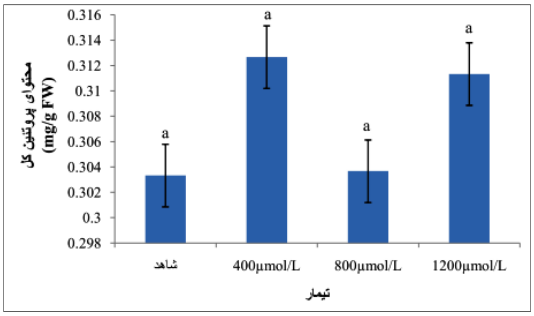
با افزایش غلظت سرب در محیط، میزان کلروفیل a، از ۰/۰۰۹ میلی‌گرم در هر گرم بافت تر گیاهی در گیاهان شاهد به ۰,۰۰۵ میلی‌گرم در هر گرم بافت تر گیاهی در محیط حاوی ۱۲۰۰ میکرومول بر لیتر استات سرب کاهش یافت. در این گیاه همزمان با افزایش غلظت سرب، میانگین کلروفیل b کاهش یافت. براساس آزمون دانکن میزان کلروفیل b در هریک از تیمارها با میزان کلروفیل b در نمونه‌های شاهد تفاوت معنی‌دار داشت ($p\leq0.01$)، به‌طوری‌که نمونه‌های با تیمار ۱۲۰۰ میکرومول بر لیتر دارای ۰/۰۰۱ میلی‌گرم بر لیتر در هر گرم بافت تازه گیاه کمترین میزان کلروفیل b و گیاهان شاهد با ۰/۰۰۴ میلی‌گرم بر لیتر در هر گرم بافت تازه گیاه بیشترین میزان کلروفیل b را داشتند. میزان کلروفیل b در نمونه‌های تحت تیمار ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۲۰۰ اختلاف آماری معنی‌داری را نشان نداد. در تیمار سرب تغییر محتوای کلروفیل کل کاهش معنی‌داری را نشان داد، بدین صورت که میزان کلروفیل کل در نمونه‌های شاهد، ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۲۰۰ میکرومول بر لیتر استات سرب به‌ترتیب ۰/۰۱۳، ۰/۰۰۹، ۰/۰۰۸ و ۰/۰۰۷ میلی‌گرم بر لیتر در هر گرم بافت تازه گیاه بود (شکل ۲).

نتایج سنجش محتوای پروتئین کل و فعالیت آنزیمی: نتایج آزمون مقایسه‌ای دانکن نشان داد که استات سرب بر محتوای پروتئین کل اثر معنی‌داری نداشته است (شکل ۳).



شکل ۲- اثر غلظت‌های مختلف سرب (۰، ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۲۰۰ میکرومول بر لیتر) بر محتوای انواع کلروفیل در گیاه اطلسی

هر ستون معرف میانگین سه تکرار ± انحراف معیار است. ستون‌های با حداقل یک حرف مشترک، فاقد اختلاف آماری معنی‌دار هستند.

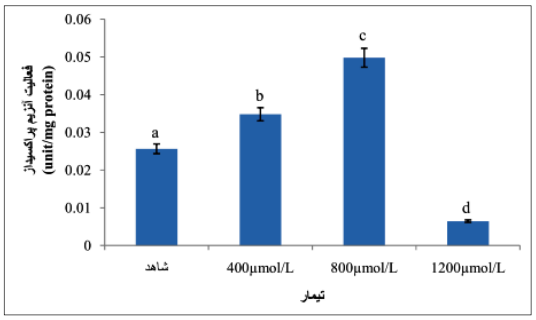


شکل ۳- اثر غلظت‌های مختلف سرب (۰، ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۲۰۰ میکرومول بر لیتر) بر محتوای پروتئین کل در گیاه اطلسی

هر ستون معرف میانگین سه تکرار ± انحراف معیار است. ستون‌های با حداقل یک حرف مشترک، فاقد اختلاف آماری معنی‌دار هستند.

محاسبه میزان فعالیت آنزیمی مشخص کرد که آنزیم پراکسیداز گیاهانی که در معرض غلظت‌های مختلف سرب قرار گرفتند دارای اختلاف معنی‌دار با گروه شاهد است ($p\leq0.01$). میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز تحت تیمار سرب در دو غلظت ۴۰۰ و ۸۰۰ میکرومول بر لیتر به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش و در غلظت ۱۲۰۰ میکرومول بر لیتر کاهش یافت. این میزان از ۰/۰۲۵ واحد جذب در دقیقه به ازای میلی‌گرم پروتئین در نمونه شاهد به ۰/۰۳۴ و ۰/۰۴۹ واحد جذب در دقیقه به ازای میلی‌گرم پروتئین به‌ترتیب در نمونه‌های تحت تیمار دو غلظت ۴۰۰ و ۸۰۰ میکرومول بر لیتر و ۰/۰۰۶ واحد جذب در دقیقه به ازای

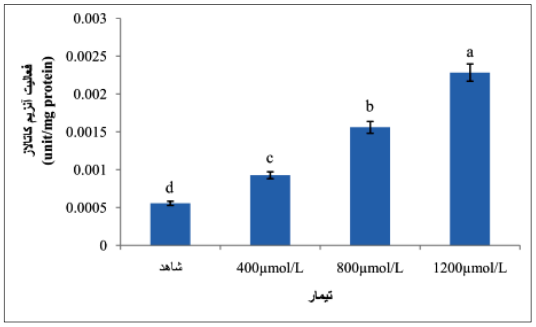
میلی‌گرم پروتئین در غلظت ۱۲۰۰ میکرومول بر لیتر سرب رسید (شکل ۴).



شکل ۴- اثر غلظت‌های مختلف سرب (۰، ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۲۰۰ میکرومول بر لیتر) بر میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در گیاه اطلسی

هر ستون معرف میانگین سه تکرار ± انحراف معیار است. ستون‌های با حداقل یک حرف مشترک، فاقد اختلاف آماری معنی‌دار هستند.

نتایج حاصل از اندازه‌گیری اثر غلظت‌های مختلف سرب بر فعالیت آنزیم کاتالاز در شکل ۵ نشان داده شده است. میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاهان تحت تیمار سرب افزایش نشان داد که این افزایش در همه غلظت‌ها معنی‌دار بود. میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاهان شاهد به میزان ۰/۰۰۰۵۵ واحد جذب در دقیقه به ازای میلی‌گرم پروتئین گزارش شد. این مقدار در گیاهان تیمار شده با غلظت‌های ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۲۰۰ میکرومول بر لیتر سرب به مقدار ۰/۰۰۰۹۲، ۰/۰۰۱۵ و ۰/۰۰۲۲ واحد جذب در دقیقه به ازای میلی‌گرم پروتئین رسید.



شکل ۵- اثر غلظت‌های مختلف سرب (۰، ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۲۰۰ میکرومول بر لیتر) بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاه اطلسی

هر ستون معرف میانگین سه تکرار ± انحراف معیار است. ستون‌های با حداقل یک حرف مشترک، فاقد اختلاف آماری معنی‌دار هستند.

بحث

سرب یکی از فلزات سنگین است که اهمیت قابل توجهی را به عنوان آلاینده بالقوه محیطی به خود جلب کرده است. از نشانه‌های سمیت سرب ممانعت سریع از رشد ریشه، دوره رشد کوتاه و کلروزیس است (۱۲). حتی زمانی‌که سرب در مقادیر کم وارد سلول‌های گیاهی می‌شود طیف وسیعی از اثرات مضر را بر فرایندهای فیزیولوژیک وارد می‌کند. سمیت سرب منجر به ممانعت از فعالیت‌های آنزیمی، اختلال در تغذیه معدنی، بر هم زدن تعادل آب، تغییر در وضعیت هورمونی و تغییر در نفوذپذیری غشا می‌شود. این اختلالات فعالیت‌های فیزیولوژیکی نرمال گیاه را به‌هم می‌زند. سرانجام در غلظت‌های بالا ممکن است سبب مرگ سلولی شود (۱۸).

نتایج این مطالعه نشان داد که مسمومیت با سرب درصد جوانه‌زنی، طول ساقه و ریشه، ارتفاع گیاه و مساحت سطح برگ گیاه اطلسی را کاهش داده است. غلظت بالای سرب (1mM) سبب کاهش درصد جوانه‌زنی و رشد دانه‌رست‌های برنج شد (۴۴). در Lupinus سرب تعداد بذرهای در حال جوانه‌زنی را کاهش داد و سبب کاهش رشد هیپوکوتیل به‌علاوه ریشه شد (۴۷). در نتایج چراتی و خانلریان (۱۳۸۷) (۴) مشخص شد که غلظت‌های سرب شامل ۲۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومول بر لیتر سبب کاهش جوانه‌زنی در کلزا شده است که با نتایج این مطالعه مطابقت دارد.

سرب جوانه‌زنی دانه را با کاهش جذب آب توسط دانه تحت تأثیر قرار نمی‌دهد، به این دلیل که پوشش دانه در مرحله اول جذب آب (زمانیکه جذب آب نسبتا شدید است) نسبت به سرب نفوذناپذیر بوده ولی در مراحل پایانی جذب آب توسط دانه (وقتی‌که جذب آب کاهش می‌یابد) پوشش دانه نفوذپذیر می‌شود و سربی که در این مراحل جذب می‌گردد به داخل رویان نفوذ و جوانه‌زنی را به تأخیر می‌اندازد (۴۶).

در دانه‌رست‌های ذرت (*Zea mays*) کاهش شدید رشد ریشه و ساقه و ناحیه انشعاب‌دهی کوتاه‌تر با ریشه‌های فرعی متراکم‌تر که ناحیه نزدیک‌تر به نوک ریشه در مقایسه با نمونه‌های شاهد را اشغال کرده است، مشاهده شد (۳۳و۳۸). همچنین توکلی و همکاران (۱۳۹۰) (۳) کاهش در شاخص‌های رشد گیاه بادمجان را در تیمار با استات سرب گزارش کردند. بنابراین به نظر می‌رسد که ممانعت از رشد ریشه تحت تیمار سرب نتیجه‌ای از ممانعت تقسیمات سلولی در رئوس ریشه است که توسط سرب القا شده است (۱۹).

نتایج به‌دست آمده از این تحقیق نشان داد که تیمار سرب محتوای کلروفیل a، b و a+b را کاهش داده است. این کاهش می‌تواند در نتیجه ممانعت آنزیم‌های مسئول در بیوسنتز کلروفیل در اثر استرس ناشی از فلزات سنگین باشد (۴۹). سرب سنتز کلروفیل را با استفاده از اختلال در جذب عناصر ضروری همانند منیزیم و آهن به‌وسیله گیاه بر هم می‌زند (۱۳). همچنین افزایش تجزیه کلروفیل در گیاهان تحت تیمار سرب به دلیل افزایش در فعالیت کلروفیلاز رخ می‌دهد (۱۷).

امینی و همکاران (۱۳۹۱) (۱) در تحقیقات خود نشان دادند که میزان کلروفیل کل در یونجه (*Medicago sativa*) تیمار شده با سرب و نیکل نسبت به گیاه شاهد به‌طور معنی‌داری کاهش یافته است. تحقیقات نشان داد که محتوای کلروفیل کل (a و b) در برگ‌های ده روزه لوبیا تحت تیمار با افزایش غلظت فلزات سنگین (سرب، مس، کادمیوم و جیوه) به‌تدریج کاهش یافت (۴۹). به‌کارگیری غلظت‌های ۵۰۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر سرب در *Ipomoea lacunose* L. محتوای کلروفیل را کاهش داد (۲۷). همچنین کریمی و همکاران (۱۳۹۲) (۷) گزارش دادند که با افزایش غلظت سرب در محلول غذایی، محتوای کلروفیل a، b و کلروفیل کل گیاه کنگرفرنگی کاهش معنی‌دار یافته است. نتایج این تحقیقات با نتایج به‌دست آمده از این پژوهش مطابقت دارد.

نتایج نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار محتوای پروتئین کل با نمونه شاهد و افزایش معنی‌دار فعالیت پراکسیداز و کاتالاز در نمونه‌های تحت تیمار بود. به‌نظر می‌رسد یکی از اثرات سمیت سرب القا استرس اکسیداتیو در گیاه به دلیل تولید ROS و در نتیجه برهم خوردن وضعیت اکسیداسیون و احیاست. اگرچه برخی از ROSها ممکن است به‌عنوان مولکول‌های مهم علامت‌دهی تغییردهنده بیان ژن و تنظیم‌کننده فعالیت پروتئین‌های دفاعی ویژه عمل کنند اما همه ROSها می‌توانند در غلظت‌های بالا برای موجودات بسیار مضر باشند. سرب تولید ROS در گیاهان را القا می‌کند و چنین تولیدی به شدت تنش، تکرار دوره‌های تنش و سن گیاه وابسته است (۱۴). باوجود اینکه فرایندهای تولیدکننده ROS تحت شرایط نرمال آرام است اما سرب این فرایندها را تسریع می‌بخشد. هنگامیکه دانه‌رست‌های برنج (*Oryza sativa*) تحت تیمار غلظت‌های ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار نیترات سرب در یک دوره ۲۰-۵ روزه قرار گرفتند افزایش ۲۱ تا ۱۷۷ درصدی در میزان فعالیت لیپید پراکسیداز مشاهده شد که نشان می‌دهد سرب تنش اکسیداتیو را در گیاهان القا کرده است. طیف وسیعی از مکانیسم‌های حفاظتی در گیاهان وجود دارد که برای حذف ROS پیش از آنکه باعث تخریب بخش‌های حساس ماشین سلولی شوند انجام وظیفه می‌کنند. کاتالاز به‌عنوان یک آنزیم آنتی‌اکسیدان H_2O_2 را به آب و اکسیژن تجزیه می‌کند (۴۴). نقش پراکسیداز نیز به‌عنوان آنزیم تنش در گیاهان به‌طور گسترده‌ای پذیرفته شده است. افزایش فعالیت پراکسیداز تحت تیمار سرب به رهاسازی پراکسیداز موجود در دیواره‌های سلولی مرتبط می‌باشد (۲۰و۴۳). به‌طوری‌که گزارش شده است که سرب فعالیت پراکسیدازی را در سویا، برنج و غیره القا کرده است (۳۰و۴۴).

در این تحقیق فعالیت آنزیم پراکسیداز در غلظت ۱۲۰۰ میکرومول بر لیتر کاهش یافت که این می‌تواند به علت اثرات مضر تولید بالای ROS سمی باشد.

فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز در لپه‌ها، هیپوکوتیل-ها و ریشه‌چه‌های *Luffa cylindrica* به‌طور معنی‌داری با افزایش غلظت سرب افزایش یافت (۲۶). در تیمار *Eichhornia crassipes* Mart. با نیترات سرب فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان همانند آسکوربات پراکسیداز و پراکسیداز به‌طور مثبتی با افزایش غلظت سرب افزایش یافت، در حالیکه در مورد سوپراکسیددسموتاز و کاتالاز با افزایش غلظت سرب تا ۸۰۰ میلی‌گرم بر لیتر فعالیت آنزیم افزایش و بعد در غلظت‌های بالاتر هم در ریشه و هم در برگ کاهش یافت (۳۲).

ایرانبخش و همکاران (۱۳۸۹) (۲) نشان دادند که میزان فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز در گیاه سویا (*Glycine max* L.) تحت تیمار با کلرید روی و کلرید سرب در همه غلظت‌های استفاده شده افزایش معنی‌دار داشته است. همچنین افزایش معنی‌دار فعالیت این دو آنزیم در تیمار *sugar beet* (۳۷) و کلزا (رنجبر و همکاران ۱۳۹۰) (۶) با سرب مشاهد شد. که با نتایج به‌دست آمده از این پژوهش همسو است. موسوی و همکاران (۱۳۹۱) (۸) گزارش کردند که سیر در مواجه با افزایش غلظت نیترات سرب تا ۱۰۰۰میلی‌گرم در کیلوگرم خاک افزایش معنی-داری در میزان آنزیم کاتالاز داشته است و بعد کاهش در فعالیت آنزیم در غلظت ۱۵۰۰ مشاهد گردید. در این آزمایش تفاوت معنی‌دار در سطوح فعالیت آنزیم پراکسیداز گزارش نشد.

نتیجه‌گیری

سرب فلزی سمی برای محیطزیست موجودات زنده است. نتایج به‌دست آمده از این پژوهش نشان داد که سطوح مختلف سرب تأثیر معنی‌داری بر خصوصیات مرفولوژیک و فیزیولوژیکی گیاه اطلسی دارد. سرب بر رشد گیاهان اثر منفی داشته که می‌تواند بر محیطزیست اثرات مخربی بر جای بگذارد.

سپاسگزاری

این پژوهش با استفاده از اعتبار پژوهشی تأمین شده توسط معاونت محترم پژوهشی دانشگاه بوعلی سینا انجام شده است. مؤلفان مراتب تقدیر و تشکر خود را از همکاران محترم معاونت پژوهشی و همچنین همکاران محترم فضای سبز و گلخانه دانشگاه اعلام می‌کنند.

منابع

۱- امینی، ف.، امیرجانی، م.ر. ۱۳۹۱. اثر تیمار نیکل و سرب بر محتوای کلروفیل و تجمع این فلزات در گیاه یونجه (*Medicago sativa*)، مجله تولید و فرآوری محصولات زراعی و باغی، سال دوم، شماره ششم، ۱۹-۱۱.

۲- ایرانبخش، ع.، مجد، ا.، نقوی، ف. ۱۳۸۹. بررسی تاثیر کلرید روی و کلریدسرب بر جوانه‌زنی و رشد دانه‌رست‌های سویا (*Glycin max* L.)، فصلنامه پژوهش‌های علوم گیاهی، شماره پیاپی۲۰، سال پنجم، شماره چهارم، ۷۳-۶۳.

۳- توکلی، م.، چهرگانی‌راد، ع.، لاری یزدی، ح.، پاکدل، ع. ۱۳۹۰. مطالعه اثر غلظت‌های مختلف سرب و سالیسیلیک اسید بر برخی شاخص‌های رشد گیاه بادمجان (*Solanum melongena* L.)، مجله زیست شناسی گیاهی، سال سوم شماره هفتم، ۴۰-۲۹.

۴- چراتی‌آرائی، ع.، خانلریان خطیری، م. ۱۳۸۷. بررسی تاثیر سرب بر جوانه‌زنی، مقدار پروتئین و پرولین و ارزش تحمل به سرب در دو رقم کلزا، مجله علوم محیطی، سال پنجم، شماره سوم، صفحه ۵۲-۴۱.

۵- خلیقی، ا.، ۱۳۸۷. پرورش گیاهان زینتی ایران . انتشارات روزبهان. تهران. ۱۴۰ صفحه.

۶- رنجبر، م.، لاری یزدی، ح. برومند جزی، ش. ۱۳۹۰. تاثیر سالیسیلیک اسید بر رنگیزه‌های فتوسنتزی، محتوای قند و آنزیم-های آنتی‌اکسیدانی در گیاه کلزا تحت تنش سرب، مجله زیست-شناسی گیاهی، سال سوم، شماره نهم، صفحه ۵۲-۳۹.

۷- کریمی، ن.، خان‌احمدی، م.، مرادی، ب. ۱۳۹۲. اثر غلظت‌های مختلف سرب بر برخی پارامترهای فیزیولوژیکی گیاه کنگر-

فرنگی، مجله پژوهش‌های تولید گیاهی، دوره بیستم، شماره اول، ۶۲-۴۹.

۸- موسوی، م.، باقی‌زاده، ا.، آقایاری، ف.، افضلی‌گروه، د.، محمدی، ن. ۱۳۹۱. بررسی تجمع سرب در قسمت‌های مختلف گیاه سرب و واکنش گیاه به تنش اکسیداتیو سرب، مجله زراعت و اصلاح نباتات، جلد هشتم، شماره دوم، صفحه ۱۱۸-۱۱۱.

9- Alloway, B. J. 1995. Heavy metals in soils: Springer Science & Business Media. 368 pages

10- Arnon, D. I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in Beta vulgaris. Plant physiology, 24(1), 1 .

11- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry, 72(1), 248-254 .

12- Burton, K., Morgan, E., & Roig, A. 1984. The influence of heavy metals upon the growth of sitka-spruce in South Wales forests. Plant and soil, 78(3), 271-282 .

13- Burzynski, M. 1987. Influence of lead and cadmium on the absorption and distribution of potassium, calcium, magnesium and iron in cucumber seedlings. Acta Physiologiae Plantarum .

14- Chaitanya, K .K., & Naithani, S. C. 1994. Role of superoxide, lipid peroxidation and superoxide dismutase in membrane perturbation during loss of viability in seeds of Shorea robusta Gaertn. f. New Phytologist, 126(4), 623-627 .

15- Chance, B., & Maehly, A. 1955. Assay of catalases and peroxidases, Method enzymiology. 11:746-775.

16- Dawes, I. W. 2000. Responses of eukaryotic cells to oxidative stress. Journal of Applied Biological Chemistry, 43(4), 211-217 .

17- Drazkiewicz, M. 1994. Chlorophyllase: occurrence, functions, mechanism of action, effects of external and internal factors (Review). Photosynthetica .30:321-331 .

18- Ernst, W. 1998. Effects of heavy metals in plants at the cellular and organismic level. Ecotoxicology. Wiley, New York, 587-620 .

19- Eun, S. O., Shik Youn, H., & Lee, Y. 2000. Lead disturbs microtubule organization in the root meristem of Zea mays. Physiologia Plantarum, 110(3), 357-365 .

20- Gaspar, T., Penel, C., Thorpe, T., & Greppin, H. 1982. Peroxidases 1970-1980. A survey of their biochemical and physiological roles in higher plants. Genève : Université de Genève, Centre de botanique, 324 pages.

21- Heckathorn, S. A., Mueller, J. K., LaGuidice, S., Zhu, B., Barrett, T., Blair, B., & Dong, Y. 2004. Chloroplast small heat-shock proteins protect photosynthesis during heavy metal stress. American Journal of Botany, 91(9), 1312-1318 .

22- Huang, J. W., Chen, J., Berti, W. R., & Cunningham, S. D. 1997. Phytoremediation of lead-contaminated soils: role of synthetic chelates in lead phytoextraction .Environmental Science & Technology, 31(3), 800-805 .

23- Islam, E., Liu, D., Li, T., Yang, X., Jin, X., Mahmood, Q., . . . Li, J. 2008. Effect of Pb toxicity on leaf growth, physiology and ultrastructure in the two ecotypes of Elsholtzia argyi. Journal of hazardous materials, 154(1), 914-926 .

24- Islam, E., Yang, X., Li, T., Liu, D., Jin, X., & Meng, F. 2007. Effect of Pb toxicity on root morphology, physiology and ultrastructure in the two ecotypes of Elsholtzia argyi. Journal of hazardous materials, 147(3):806-816.

25- Jeliazkova, E., Craker, L. E., & Xing, B. 2003. Seed germination of anise, caraway, and fennel in heavy metal contaminated solutions. Journal of herbs, spices & medicinal plants, 10(3), 83-93 .

26- Jiang, N., Luo, X., Zeng, J., Yang, Z. R., Zheng, L., & Wang, S. T. 2010. Lead toxicity induced growth and antioxidant responses in Luffa cylindrica seedlings. Int. J. Agric. Biol, 12(2), 205-210 .

27- Kambhampati, M. S., Begonia, G. B., Begonia, M. F., & Bufford, Y. 2005. Morphological and physiological responses of morning glory (Ipomoea lacunosa L.) grown in a lead-and chelate-amended soil. International journal of environmental research and public health, 2(2), 299-303 .

28- Kim, Y.-Y., Yang, Y.-Y., & Lee, Y. 2002. Pb and Cd uptake in rice roots .Physiologia Plantarum, 116(3), 368-372 .

29- Koroi, S. A. A. 1989. Gelektrophers tissue and spectral photometris chon under change Zomeinfiussdr temperature and structure Peroxidase isoenzyme. Physiology Vegetation, 20, 15-23 .

30- Lee, K., Cunningham, B., Paulsen, G., Liang, G., & Moore, R. 1976. Effects of cadmium on respiration rate and activities of several enzymes in soybean seedlings. Physiologia Plantarum, 36(1), 4-6 .

31- Li, Q., Yu, L.-j., Deng, Y., Li, W., Li, M.-t., & Cao, J.-h. 2007. Leaf epidermal characters of Lonicera japonica and Lonicera confuse and their ecology adaptation. Journal of Forestry research, 18(2), 103-108 .

32- Malar, S., Vikram, S. S., Favas, P. J., & Perumal, V. 2014. Lead heavy metal toxicity induced changes on growth and antioxidative enzymes level in water hyacinths [Eichhornia crassipes (Mart.)]. Botanical Studies, 55(1), 1-11 .

33- Małkowski, E., Kita, A., Galas, W., Karcz, W., & Kuperberg, J. M. 2002. Lead distribution in corn seedlings (Zea mays L.) and its effect on growth and the concentrations of potassium and calcium. Plant Growth Regulation, 37(1), 69-76 .

34- Molas, J. 2002. Changes of chloroplast ultrastructure and total chlorophyll concentration in cabbage leaves caused by excess of organic Ni (II) complexes. Environmental and Experimental Botany, 47(2), 115-126 .

35- Monni, S., Uhlig, C., Junttila, O., Hansen, E., & Hynynen, J. 2001. Chemical composition and ecophysiological responses of Empetrum nigrum to aboveground element application. Environmental pollution, 112(3): 417-426.

36- Murakami, M., & Ae, N. 2009. Potential for phytoextraction of copper, lead, and zinc by rice (Oryza sativa L.), soybean (Glycine max [L.] Merr.), and maize (Zea mays L.). Journal of hazardous materials, 162(2), 1185-1192 .

37- Naderi, N., Mirzamasoumzadeh, B., & Aghaei, A. 2013. Effects of different levels of Lead (Pb) on physiological characteristics of sugar beet . Intl J Agri Crop Sci., 5 (10), 1154-1157,

38- Obroucheva, N., Bystrova, E., Ivanov, V., Antipova, O., & Seregin, I. (1998). Root growth responses to lead in young maize seedlings. Plant and soil, 200(1), 55-61 .

39- Prasad, S. M., Dwivedi, R., Zeeshan, M., & Singh, R. 2004. UV-B and cadmium induced changes in pigments, photosynthetic electron transport activity, antioxidant levels and antioxidative enzyme activities of Riccia sp . Acta Physiologiae Plantarum, 26(4), 423-430 .

40- Seregin, I., & Ivanov, V. 2001. Physiological aspects of cadmium and lead toxic effects on higher plants. Russian Journal of Plant Physiology, 48(4), 523-544 .

41- Shakirova, F. M., Sakhabutdinova, A. R., Bezrukova, M. V., Fatkhutdinova, R. A., & Fatkhutdinova, D. R. 2003. Changes in the hormonal status of wheat seedlings induced by salicylic acid and salinity. Plant Science, 164(3), 317-322 .

42- Sharma, P., & Dubey, R. S. 2005. Lead toxicity in plants. Brazilian Journal of Plant Physiology, 17(1), 35-52 .

43- Subhashini, K., & Reddy, G. 1990. Effect of salt stress on enzyme activities in callus cultures of tolerant and susceptible rice cultivars. Indian Journal of Experimental Biology, 28(3), 277-279 .

44- Verma ,S., & Dubey, R. 2003. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. Plant Science, 164(4), 645-655 .

45- Wang, C., Zhang, S. H., Wang, P. F., Hou, J., Zhang, W. J., Li, W., & Lin, Z. P. 2009.The effect of excess Zn on mineral nutrition and antioxidative response in rapeseed seedlings. Chemosphere, 75(11), 1468-1476 .

46- Wierzbicka, M., & Obidzińska, J. 1998. The effect of lead on seed imbibition and germination in different plant species .Plant Science, 137(2), 155-171 .

47- Woźny, A., Zatorska, B., & Młodzianowski, F. 1982. Influence of lead on the development of lupin seedlings and ultrastructural localization of this metal in the roots. Acta Societatis Botanicorum Poloniae, 51(3-4), 345-351.

48- Yang, X., Baligar, V., Martens, D., & Clark, R. 1996. Plant tolerance to nickel toxicity: I. Influx, transport, and accumulation of nickel in four species. Journal of plant nutrition, 19(1), 73-85 .

49- Zengin, F. K., & Munzuroglu, O. 2005. Effects of some heavy metals on content of chlorophyll, proline and some antioxidant chemicals in bean (Phaseolus vulgaris L.) seedlings. Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica, 47(2), 157-164 .

Effect of lead treatment on some morphological and physiological parameters of *Petunia hybrida* L.

Chehregani Rad A.K., Farzan S. and shirkhani Z.

Biology Dept., Bu-Ali Sina University, Hamedan, I.R. of Iran

Abstract

Heavy metal pollution is one of the serious problems in the world. Among the heavy metals, lead is a strong pollutant that readily accumulates in soils and sediments. This study was designed to find out the effect of Pb toxicity on developmental and physiological particularity in *Petunia hybrida* L. For this purpose, Petunia seeds were planted in green housed condition and different concentrations of lead acetate including 400, 800 and 1200 µmol/L were spread on the plants, and control group were spread with water. Results showed that the percentage of germination, root and shoot length, leaf area, plant height, the amount of chlorophyll a, b and a+b were reduced, and an increase in the activity of catalase and peroxidase under lead treatment were observed. The peroxidase enzyme activity increased up to 800 µmol /L of lead and then slightly decreased at 1200 µmol /L. Lead treatment didn't have a significant effect on total protein content. The results of this study showed that the toxicity of Pb had detrimental effects on plants and although plants don't need to heavy metal, uptake by plants and leading to negative effects on their function.

Key words: Lead, *Petunia hybrida*, Morphological parameters, Physiological parameters.