اثرات آلودگی سرب در پارامترهای رشد، محتوای پروتئینی، قندها و ساختار تشریحی گیاه یونجه (*Medicago sativa* L.)

*سارا سعادتمند، حمید فهیمی، علیرضا علاالدینی

گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات، تهران

چکیده

در این تحقیق اثرات ناشی از ٤ غلظت مختلف نیترات سرب (۲ mM ـ ۱ ـ ۰/۵ ـ ۰/۲۵) بر پارامترهای رشد گیاه یونجه معمولی (*Medicago sativa* L.) مورد مطالعه قرار گرفته است. طول دوره تیمار ۲۰ روز بوده و در پایان دوره تیمار، پارامترهایی مثل طول ریشه و ساقه، وزن تر و خشک ریشه و اندام‌های هوایی و سطح پهنک اندازه‌گیری شده و میزان جذب سرب، تغییرات قندهای محلول و نامحلول، تغییرات پروتئین کل و الکتروفورز SDS – PAGE در ریشه‌ها و بخش‌های هوایی بررسی گردید و برش‌های میکروسکوپی نیز مورد مطالعه قرار گرفت. بررسی‌هایی آماری بوسیله نرم افزار SPSS و جدول آنالیز واریانس ANOVA و آزمون دانکن انجام شده است. آزمایشات نشان داد که طول ریشه و ساقه، وزن تر و خشک ریشه و اندام‌های هوایی و سطح پهنک برگ با افزایش غلظت سرب، کاهش پیدا می‌کند و تنش سرب موجب افزایش چوب و فیبر در گیاه می‌گردد. همچنین میزان تجمع سرب در اندام‌های گیاه با افزایش غلظت سرب در تیمارها افزایش پیدا می‌کند. از طرفی با افزایش غلظت سرب میزان قندهای محلول در ریشه‌ها و بخش‌های هوایی کاسته شده ولی میزان پروتئین‌ها افزایش می‌یابد. قندهای نامحلول در اندام‌های هوایی زیاد شده ولی در ریشه‌ها کاهش می‌یابد. بررسی پروفیل پروتئین‌ها در ژل الکتروفورز نیز حاکی از اختلاف باندهای پروتئینی بین گیاهان تیمار شده و شاهد است. این تحقیقات ثابت می‌کند که گیاه *Medicago sativa* یک گیاه مقاوم به مسمومیت سرب است و می‌تواند سرب را به مقدار نسبتاً زیاد در بافت‌های زمینی و هوایی خود انباشته کند.

واژه‌های کلیدی: آلودگی سرب، فلزات سنگین، نیترات سرب، Pb^{2+}، یونجه، *Medicago sativa* L.

مقدمه

فکر امروز بشر برای نجات محیط زیست از خطرات ناشی از فلزات سنگین بیشتر معطوف به فلز سرب است. وجود آلاینده‌های سربی در خاک بر میزان تولید محصولات کشاورزی اثرات فاحشی دارد. بیشترین میزان سرب از طریق سیستم‌های ریشه ای جذب گیاهان می‌شود و مقدار ناچیزی هم از طریق برگ مخصوصاً برگ‌های دارای کرک، جذب گیاهان می‌گردد (Kabata, 2001; Pallava, 2005).

*e.mail: s_saadatmand@yahoo.com

عواملی مثل pH خاک، اندازه ذرات، ظرفیت تبادل کاتیونی، مقدار مواد آلی در خاک، میزان رس، وجود اکسیدها و هیدروکسیدهای آهن و مواد معدنی دیگر، همچنین فاکتورهای دیگری نظیر سطح خارجی ریشه، تراوشات ریشه، قدرت مایکوریزی و شدت تعرق، عواملی هستند که در جذب سرب بوسیله گیاهان موثرند.

ورود سرب به داخل سلول‌ها موجب اختلال در فعالیت‌های آنزیمی می‌شود که این اختلال بیشتر ناشی از تداخل عمل سرب با گروه‌های سولفیدریل (SH) و همچنین جانشین شدن سرب به جای فلزات اساسی در متالوآنزیم‌ها می‌باشد (Labri, 2003).

مسمومیت سرب در گیاهان موجب کاهش رشد و میزان محصول، عدم گسترش سیستم‌های ریشه ای، زردی برگ‌های جوان، کاهش فتوسنتز و کاهش فعالیت‌های درون سلولی می‌گردد که شاید اصلی ترین دلیل این پدیده‌ها کاهش بیوسنتز کلروفیل (به دلیل ممانعت در جذب منیزیم و آهن) و تغییر فراساختار کلروپلاست و جلوگیری از فعالیت آنزیم روبیسکو باشد (Gaspar & Anton 2002; Georgieva 1997).

گرچه ممکن است در همه گیاهان آثار مسمومیت ناشی از سرب بارز نباشد ولی محتوای فلزی آن‌ها سلامتی انسان یا حیوانی که از این گیاه تغذیه می‌کند را به خطر می‌اندازد. بعضی از گیاهان به طور طبیعی مقاومت بیوشیمیایی در برابر جذب سرب دارند و حتی عده ای از آن‌ها می‌توانند به صورت انبوه فلزات سنگین را در خود انباشته کنند مانند: *Thlaspi Caerulescent*،*Allysum Corsicum* (Ahmed,1993; Eunso, 2000).

در این تحقیق اثر غلظتهای مختلف سرب بر پارامترهای رشد گیاه یونجه معمولی (*Medicago sativa* L.) مورد بررسی قرار گرفته است تا میزان مقاومت و انبوه سازی این گیاه نسبت به سرب مشخص شود و از آنجایی که این گیاه ارزش علوفه‌ای دارد، در مناطق آلوده به فلزات سنگین در مصرف آن توسط دام‌ها باید دقت بیشتری شود.

مواد و روش‌ها

شرایط کشت گیاه

بذر گیاه یونجه از موسسه اصلاح بذر کرج تهیه گردید که درصد خلوص آن ۹۸٪ و قدرت جوانه‌زنی آن ۹۶ درصد تعیین شده بود. ابتدا بذرها با آب مقطر به خوبی شستشو گردید و سپس به مدت یک دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۱٪ قرار گرفت تا ضدعفونی شود، سپس بذرها در داخل پتری دیش‌هایی که دارای کاغذ صافی جذب شده بود قرار گرفت سپس پتری دیش‌ها با ورق آلومینیومی پوشیده شد و در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد نگهداری شد که پس از ۳ روز بذرها جوانه زد، پس از آن دانه رست‌های یک اندازه به گلدان‌های حاوی مخلوط ماسه نرم و خاک رس که قبلاً به صورت مخلوط ۵۰ به ۵۰ تهیه شده بود به تعداد ۸ عدد در هر گلدان منتقل شد. سه روز اول با آب مقطرگلدان‌ها آبیاری شدند و سپس با محلول هوگلند به نسبت‌های ۱/۵، ۱/۲ و کامل تغذیه و آبیاری انجام گرفت پس از این که گیاهان به مرحله۲ برگی رسیدند، تیمار با ٤ غلظت مختلف نیترات سرب آغاز شد طول دوره ی تیمار به مدت ۲۰ روز به صورت یک روز در میان ادامه یافت و در طول آن به صورت یک روز در میان تغذیه گلدان‌ها با هوگلند انجام می‌گرفت.

نیترات سرب با غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌مولار تهیه شد و در هر بار تیمار به مقدار ۱۵ میلی‌لیتر به گلدان‌ها اضافه می‌شد. برای هر تیمار ۳ تکرار در نظر گرفته شد. در طول دوره تیمار دما بین ۲۲ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد و نور با شدت ٦۰۰۰ لوکس و رطوبت بین ۵۰ تا ٦۰ درصد معین شده بود. گیاهانی که در گلدان‌ها پس از ۵ روز از رشد بازمانده بودند از گلدان‌ها خارج شدند.

در پایان دوره ۲۰ روز تیمار گیاهان از گلدان‌ها خارج شدند و پس از شستشوی ریشه‌ها با آب مقطر برای شستن سرب سطحی ریشه‌ها را از ساقه جدا کرده و طول ریشه و ساقه، وزن تر ریشه و ساقه، سطح پهنک برگ اندازه‌گیری شد و برش گیری از ریشه و ساقه به عمل آمد، پس اندام‌های گیاهی به مدت ۲ روز در آون با حرارت ۷۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد و پس از آن وزن خشک ریشه و بخش‌های هوایی نیز اندازه‌گیری شد و از ماده خشک گیاهی برای اندازه‌گیری میزان سرب در ریشه‌ها و اندام‌های هوایی، اندازه‌گیری پروتئین کل به روش لوری (Lowry)، الکتروفورز پروتئین‌ها و سنجش قندهای محلول و نامحلول به روش کوچرت (Kochert) استفاده شد.

اندازه‌گیری میزان سرب در ریشه‌ها و اندام‌های هوایی (Slavin, 1998)

برای تعیین میزان سرب در ریشه‌ها و اندام‌های هوایی، ۰/۱ گرم از پودر خشک ریشه و بخش‌های هوایی را به طور جداگانه از هر کدام از غلظت‌های تیمار شده به مدت ۱/۵ ساعت در دمای ۱۸۰ درجه سانتی گراد با ۱۰ میلی‌لیتر اسید نیتریک هضم گردید و پس از سرد شدن در دمای آزمایشگاه مجدداً ۵ میلی‌لیتر آب اکسیژنه ۳۰٪ به آن‌ها اضافه گردید و دوباره ۲۰ دقیقه در دمای ۱۸۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت، سپس در دمای آزمایشگاه سرد شد و حجم هر نمونه با آب مقطر به ۵۰ میلی‌لیتر رسید و در نهایت میزان سرب توسط دستگاه Atomic Absorption Spectrophotometers مدل Varian 200 اندازه‌گیری شد و بر حسب میلی گرم در کیلوگرم ماده خشک مشخص گردید.

اندازه‌گیری پروتئین (Lowry, 1951)

در این روش ۰/۲ گرم از پودر خشک گیاهی (ریشه و بخش‌های هوایی به طور جداگانه) در یک هاون چینی قرار گرفته در حمام یخ ریخته شده و ٤ میلی‌لیتر بافر تریس خنک به آن افزوده گردید و به مدت ۱۵ دقیقه سائیده و هموژن شد، سپس محتویات هاون وارد لوله‌های سانتریفیوژ گردید و به مدت ۳۰ دقیقه با دور ۵۰۰۰ سانتریفیوژ شد، پس از آن ۱ میلی‌لیتر محلول رویی در لوله آزمایش ریخته شد و به آن ۱ میلی‌لیتر معرف لوری و ۳ میلی‌لیتر معرف فولین به آن افزوده گردید و در دستگاه اسپکتروفتومتر جذب آن در طول موج ۷۵۰ نانومتر خوانده شد، سپس با رسم منحنی استاندارد پروتئین میزان پروتئین در هر نمونه براساس گرم در لیتر سپس براساس گرم در کیلوگرم ماده خشک بدست آمد.

اندازه‌گیری قندها (Kochert, 1978)

در این روش ۰/۰۲ گرم از پودر خشک گیاهی (ریشه و بخش‌های هوایی) در یک بالن مخصوص مبرد ریخته شد و به آن ۱۰ میلی‌لیتر اتانول ۸۰٪ اضافه گردید و ۱۵ دقیقه در حمام آب جوش قرار گرفت، سپس محتویات بالن با کاغذ صافی واتمن ۲ صاف گردید. به محلول صاف شده ۳/۵ میلی‌لیتر سولفات روی ۵٪ و ۳/۵ میلی‌لیتر هیدروکسید باریم ۳٪ نرمال اضافه شد و ۱۰ دقیقه در سانتریفیوژ با دور ۳۰۰۰ قرار گرفت. بخشی رویی در یک بالن ژوژه با آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسید، سپس کاغذ صافی و محتویات روی آن داخل یک بشر قرار گرفت و در آون با حرارت ۱۰۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه خشک گردید سپس کاغذ صافی و محتویات خشک شده آن درون یک بشر دارای آب مقطر در حال جوش که مقدار آن کمتر از ۱۰۰ میلی‌لیتر بود منتقل گردید و به مدت ۱۰ دقیقه جوشید و محصول حاصل دوباره صاف شد. آنچه از صافی گذشت عصاره قندهای نامحلول است که با آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسید به ۲ میلی‌لیتر از هر کدام از عصاره‌های فوق ۱ میلی‌لیتر فنل ۵٪ و ۵ میلی‌لیتر اسید سولفوریک خالص اضافه شد و پس از سرد شدن آن جذب در طول موج ٤۸۵ نانومتر خوانده شد، سپس با رسم منحنی استاندارد گلوکز میزان قندهای محلول ابتدا بر حسب گرم در لیتر سپس بر حسب گرم در کیلوگرم ماده خشک بدست آمد.

الکتروفورز پروتئین‌ها

ابتدا پروتئین‌ها استخراج شد (۰/۰۲ گرم پودر خشک با ۲۵۰ میکرولیتر بافر تریس بوریک pH۸ و با ۲۵۰ میکرولیتر محلول ساکارز در هاون کاملاً له شد سپس به آن ۳ میکرولیتر مرکاپتواتانل امین و ۲ میلی گرم اسید اسکوربیک نیز اضافه گردید و محلول حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور سانتریفیوژ گردید محلول رویی حاوی پروتئین‌های استخراج شده است).

۱۶۰ میکرولیتر از محلول بدست آمده همراه با ۸۰ میکرولیتر بافر نمونه مخلوط شد و در چاهک‌های ژل الکتروفورز به مقدار ٤٠ میکرولیتر وارد شد و ژل الکتروفورز به الکتریسیته ٤٠ ولت متصل گردید. در پایان ژل برداشت شده رنگ آمیزی به تثبیت و رنگبری انجام شد و عکس از آن تهیه گردید.

تهیه مقاطع میکروسکوپی

ساقه درون مغز آقطی قرار گرفت و به کمک تیغ برش‌های نازکی از آن‌ها تهیه گردید و برش‌های مناسب به کمک اسید استیک و آب ژاول رنگبری گردید و با رنگ‌های آبی متیلن و کارمن زاجی رنگ آمیزی شد و روی لام‌ها جهت مطالعه قرار گرفت.

روش آنالیز

آنالیز داده‌ها با استفاده از واریانس ANOVA و نرم افزار SPSS و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن انجام شد و نمودارها و نمودارها با نرم افزار Excel رسم گردید و خطای معیار نیز بدست آمد.

نتایج

اثرسرب بر رشد ساقه

آنالیز داده‌های مربوط به رشد ساقه نشان داد که مسمومیت سرب موجب کاهش معنی داری در طول ساقه در غلظت‌های ۰/۵ ـ ۱ و ۲ میلی‌مولار نسبت به شاهد شده است ولی در غلظت ۰/۲۵ میلی‌مولار نسبت به شاهد تغییر طول معنی‌داری مشاهده نمی‌شود (شکل ۱).

اثر سرب بر رشد ریشه

بررسی‌ها نشان داد که اثر مسمومیت سرب در طول ریشه گیاه یونجه فقط در غلظت‌های بالا (۱ و ۲ میلی‌مولار) موجب کاهش معنی دار رشد می‌شود، به عبارت دیگر غلظت‌های ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌مولار موجب تغییرات معنی دار در طول ریشه نسبت به شاهد نمی‌شود (شکل ۲).

اثر سرب بر وزن تر اندام‌های هوایی

در مورد اثر بر وزن تر اندام‌های هوایی نیز غلظت‌های بالای سرب (۱ و ۲ میلی‌مولار) موجب کاهش معنی داری وزن تر نسبت به گیاهان شاهد شده است (شکل ۳).

اثرسرب بر وزن تر ریشه

در تمام تیمارها وزن تر ریشه نسبت به ریشه گیاهان شاهد کاهش معنی دار نشان داده است (شکل ٤).

اثر سرب بر وزن خشک اندام‌های هوایی

در مورد اثر بر وزن خشک بخش‌های هوایی تنها در تیمار با ۲ میلی‌مولار سرب نسبت به گیاهان شاهد کاهش معنی دار نشان داده است و در بقیه غلظت‌ها اثر معنی داری مشاهده نمی شود(شکل ۵).

اثر سرب بر وزن خشک ریشه

در مورد وزن خشک ریشه تنها در غلظت‌های ۱ و ۲ میلی‌مولار نسبت به گیاهان شاهد کاهش معنی دار مشاهده می‌شود (شکل ٦).

اثر سرب بر سطح پهنک برگ

در تمام تیمارها سطح پهنک برگ نسبت به گیاه شاهد کاهش معنی دار مشاهده می‌شود (شکل ۷).

میزان تجمع سرب در ریشه و اندام‌های هوایی

اندازه‌گیری سرب نشان داد که اولاً میزان جذب سرب متناسب با غلظت سرب در تیمارها افزایش می‌یابد. ثانیاً

تجمع آن در ریشه بیشتر از اندام‌های هوایی می‌باشد. ثالثاً وقتی غلظت سرب در تیمارها افزایش می‌یابد (۱ میلی‌مولار) میزان آن در ریشه‌ها زیاد اما به همان نسبت به ساقه‌ها نمی رسد در حالی که وقتی غلظت سرب از ۱ میلی‌مولار بیشتر می‌شود مقدار سرب در ریشه و ساقه تقریباً یکسان می‌شود (شکل ۸).

تغییر میزان پروتئین‌ها در بخش‌های هوایی و ریشه

به طور کلی میزان پروتئین‌ها در بخش‌های هوایی بسیار بیشتر از ریشه هاست و مقدار پروتئین‌ها در غلظت‌های مختلف سرب نسبت به گیاه شاهد افزایش نشان داده است ولی این افزایش فقط در غلظت‌های ۱ و ۲ میلی‌مولار برای اندام‌های هوایی نسبت به شاهد معنی دار بوده است و در ریشه به جز غلظت ۰/۲۵ بقیه نسبت به شاهد افزایش معنی‌دار نشان داده است.

همچنین آزمون دانکن نشان داده است که بین غلظت‌های ۰/۲۵ و شاهد، ۰/۵ و ۰/۲۵، ۱ و ۰/۲۵، ۱ و ۰/۵، ۲ و ۰/۵، ۲ و ۱ میلی‌مولار اختلاف معنی دار نیست (شکل ۹).

تغییر میزان قندهای محلول در ریشه و بخش‌های هوایی

در مورد قندهای محلول نیز مقدار آن‌ها در اندام‌های هوایی بسیار بیشتر از ریشه هاست و با افزایش میزان سرب در تیمارها مقدار قندهای محلول در ریشه‌ها و بخش‌های هوایی کاهش پیدا می‌کند. در بخش‌های هوایی و ریشه تنها در غلظت ۰/۲۵ این کاهش معنی دار نیست ولی در بقیه غلظت‌ها نسبت به شاهد کاهش معنی دار می‌باشد، همچنین در ریشه‌ها آزمون دانکن نشان داده است که بین غلظت‌های ۰/۵ و ۱، نیز اختلاف معنی‌دار مشاهده نمی‌شود (شکل ۱۰).

تغییر قندهای نامحلول در ریشه‌ها و بخش‌های هوایی

قندهای نامحلول در بخش‌های هوایی در غلظت‌های مختلف سرب نیز به شاهد افزایش یافته است و این افزایش در تمام غلظت‌ها نسبت به شاهد معنی دار است. آزمون دانکن نشان داده است که بین غلظت‌های ۰/۲۵ و ۰/۵ همچنین ۱ و ۲ میلی‌مولار اختلاف معنی دار نیست.

در حالی که میزان قندهای نامحلول در ریشه در غلظت‌های مختلف نسبت به شاهد کاهش نشان داده است و این کاهش فقط در غلظت های: ۱ و ۰/۵، ۰/۵ و ۰/۲۵، ۰/۵ و شاهد، شاهد و ۰/۲۵ نیز اختلاف معنی‌دار نیست (شکل ۱۱).

الکتروفورز پروتئین‌ها (SDS–PAGE)

بررسی پروفیل پروتئین‌ها نشان داده است که میزان پروتئین‌ها با وزنهای مولکولی کمتر(۲۵و۳۵ کیلو دالتون)در گیاه تیمار شده با غلظت ۱ و ۲ میلی‌مولار سرب نسبت به بقیه افزایش داشته است (شکل ۱۲).

بررسی تصاویر میکروسکوپی

برش‌های میکروسکوپی نشان داده است که هر چقدر غلظت سرب افزایش پیدا می‌کند، میزان ساخته شدن فیبر و بافت‌های چوبی افزایش داشته است و فشردگی در آوندهای چوبی مخصوصاً در تیمار ۱ میلی‌مولار کاملاً مشهود است همچنین دهانه آوندهای چوبی و قطر فیبرها در غلظت ۲ میلی‌مولار کاهش یافته است (شکل ۱۳).

بحث

نتایج حاصله نشان داده است که مسمومیت سرب در درجه اول بازدارنده رشد ریشه است که به دلیل تجمع زیاد سرب در ریشه و اثر سمی آن می‌باشد. چنین نتایجی بر روی گیاهان دیگر نیز انجام گرفته است و همین مشاهدات تائید شده است (Yang, 2000).

قسمت اعظم سرب جذب شده در دیواره سلولی سلول‌های ریشه نفوذ می‌کند و موجب ایجاد شکاف هایی در دیواره می‌گردد و همین امر از رشد طولی ریشه‌ها ممانعت می‌کند (Mishra, 1998).

در آزمایش هایی صورت گرفته بر روی گندم مشاهده شده است که سرب قابلیت ارتجاعی دیواره سلولی ریشه را کاهش می‌دهد و موجب کاهش رشد طولی می‌شود (Mishra, 1998)، از طرفی سرب اثرات بازدارندگی در تقسیمات سلولی دارد (Pallavi, 2005) و در غلظت‌های بیش از ۱۰ میکرومولار موجب آشفتگی در آرایش میکروتوبول‌ها می‌شود و همین امر در کاهش تقسیمات سلولی و در نتیجه کاهش رشد طولی ریشه‌ها موثر است (Pallavi, 2005; Yang, 2000). نظیر چنین پدیده هایی نیز در ساقه‌ها مخصوصاً در ناحیه مریستمی می‌توان مشاهده کرد که علاوه بر کاهش قدرت تقسیم خاصیت الاستیکی سلول‌ها و غشاء آن‌ها را نیز کاهش می‌دهد (Samardakiew, 2000; Mohanty, 1998).

آلودگی‌های سربی فرایندهای فتوسنتزی را به شدت تحت تأثیر قرار می‌دهند و موجب کاهش فتوسنتز می‌گردند. این کاهش فتوسنتز به دلایل زیر است: ۱– تخریب فراساختار کلروپلاست، ۲– جلوگیری از بیوسنتز کلروفیل، ۳– مسدود کردن مسیر انتقال الکترون، ٤– بازدارندگی آنزیم‌های چرخه کالوین (Samardakiew, 2000; Pallavi, 2005).

علت این پدیده‌ها را می‌توان این گونه توضیح داد که سرب از جذب عناصری مثل Mg و Fe و Mn که در ساختار کلروفیل و کمپلکس آزاد کننده اکسیژن در فتوسیستم II نقش دارند جلوگیری می‌کند (از طریق رقابت) و در اتصال سرب به LHC II ساختار این کمپلکس را از حالت طبیعی خارج می‌کند (Sharma, 2004; Oliver, 2003). به این ترتیب میزان قندهای محلول حاصل از فتوسنتز کاهش پیدا می‌کند و گیاه یونجه برای مقابله با شرایط تنشی بخشی از قندهای محلول موجود در ساقه خود را به صورت غیرمحلول ذخیره می‌کند زیرا یونجه. *Medicago sativa* L یک گیاه چند ساقه است و ذخیره سازی قندهای نامحلول در شرایط تنش یک حالت طبیعی به شمار می‌رود. از طرفی تیمار با سرب موجب کندی و تأخیر رشد و کاهش سطح برگ‌ها می‌شود که این پدیده موجب کاهش سطح تعرق می‌گردد، بنابراین جریان ترکیباتی که باید به سمت ساقه‌ها و اندام‌های هوایی ابتقال یابند با کاهش مواجه می‌شوند و همین امر نیز موجب کندی رشد در بخش‌های هوایی می‌شود (Pallavi, 2005).

افزایش مقدار پروتئین‌ها علیرغم کاهش رشد در گیاهان تیمار شده بیانگر افزایش پروتئین‌ها با وزن مولکولی کم می‌باشد که سنتز این نوع پروتئین‌ها در شرایط تنشی افزایش پیدا می‌کند، امروزه ثابت شده است که وقتی گیاهان در معرض سمیّت فلزات سنگین مثل سرب قرار می‌گیرند سنتز پلی پپتیدهای غنی از سیستئین مانند فیتوکلاتین و متالوتیونین‌ها افزایش پیدا می‌کند (Cobbett, 2000; Gaspar, 2002) (فیتوکلاتین یک ساختار پپتیدی است که در آن گاماگلوتامیک و سیستئین به دنبال هم تکرار شده اند و به آمینو اسید گلایسین ختم شده اند).

بررسی باندهای پروتئینی در الکتروفورز نیز افزایش پروتئین‌هایی با وزن‌های مولکولی کمتر (۱۸–۲۵ و ۳۵ کیلو دالتونی) مشهود است، همچنین افزایش مقدار پروتئین‌ها می‌تواند به دلیل سنتز بیشتر پروتئین‌هایی نظیر کاتالاز، پروکسیداز، سوپراکسیددیسموتاز و دهیدروآسکوربات ردوکتاز باشد (Pallavi, 2005; Yang, 2000).

افزایش تجمع سرب در اندام‌های گیاهی مخصوصاً ریشه‌ها با افزایش غلظت آن در تیمارها در مطالعات مشابه دیده شده است (Mishra, 1998; Kosobrukhov, 2004) اما آنچه در گیاه یونجه بسیار جالب است انتقال سرب به اندام‌های هوایی است زیرا در اغلب گیاهان که بررسی شده است نشان از کم تحرکی عنصر سرب می‌باشد (Verma, 2003) در حالی که در گیاه یونجه در تیمار با غلظت ۲

میلی‌مولار میزان تجمع سرب در ریشه و بخش‌های هوایی تقریباً برابر شده است. این نتیجه نشان می‌دهد که گیاه یونجه توانایی بالایی برای جذب سرب از خاک‌ها را دارد و آن را می‌تواند به خوبی به اندام‌های هوایی خود انتقال دهد. لذا برای پاکسازی خاک‌ها از فلزات سنگین بسیار مناسب است.

نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که هر چند مسمومیت سرب اثراتی را بر فاکتورهای فیزیولوژیکی گیاه یونجه داشته است اما یونجه به خوبی اثرات مسمومیت را تحمل کرده است زیرا مقایسه نتایج مطالعات انجام گرفته Yang در سال ۲۰۰۰ که بر روی گیاه برنج نشان می‌دهد که غلظت ۱۰ میکرومولار سرب رشد ریشه را ۸۰٪ کاهش داده است. همینطور غلظت ppm ۳۰ سرب رشد گیاهانی مثل جو، گندم، خیار و لوبیا را کاملاً متوقف می‌کند (Prasada,1999) و این در حال است که تیمار ۲ میلی‌مولار سرب به مدت ۲۰ روز بر گیاه یونجه فقط ۳۲٪ طول ساقه را نسبت به شاهد کاهش داده است.

بنابراین پیشنهاد می‌گردد که برای پاکسازی خاک‌های آلوده به فلزات سنگین از جمله سرب از گیاه یونجه استفاده شود. همچنین با توجه به این که این گیاه مقادیر قابل توجهی از سرب را جذب می‌کند و به اندام‌های هوایی خود منتقل می‌کند بدون این که آثار مسمومیت بارزی را نشان دهد، می‌توان از بیوماس آن فلزات را استخراج کرد و در صنعت از آن استفاده نمود. از طرف دیگر از آنجایی که گیاه یونجه در مناطق روستایی کشور به عنوان یک گیاه علوفه ای مناسب برای تغذیه دام‌ها مصرف می‌گردد، اگر خاک‌ها دارای فلزات سنگین باشند به عوارض ناشی از آلودگی فلزات سنگین در دام‌ها و پس از آن در انسان‌ها خطر آفرین خواهد بود لذا قبل از کشت یونجه بایستی میزان آلودگی خاک‌ها به فلزات سنگین بررسی گردد و از کشت آن در خاک‌های آلوده به فلزات سنگین به منظور تغذیه دام‌ها خودداری شود.

منابع

Ahmed,A., Tajmir – Riahi HA (1993). Intraction of toxic metal ions Cd2+ Hg^{2+} and Pb with harvesting proteins of chloroplast thylakoid membranes. An FTIR spectroscopic study. j. Inorg. Biochem.50

Cobbett,cs, (2000) , Phytochelatin biosynthesis and function in heavy metal detoxification. curr.opin.plant Bio.3

Eun,so; Youn,Hs; Lee,Y, (2000). Lead disturbs microtubule organization in the root meristem of *Zea mays*. Physiol. Plant 110:357-365

Gaspar, G.M. and Anton, A., (2002). Heavy metal uptake by two radish varieties. Hungarian congeress on plant physiology Vol. 46 (3 – 4): 113-114

Georgieva,V; 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. Bul.G.J. plant Physiol , 23(1-2),12-23

Kabata-pendias, A, (2001). Trace elements in soils and plants. Third edition , pp.413.

Kochert, J. 1978. Carbohydrates determination by the phenol-sulphuric acid methods. In:J.A. Hellubust and J.S.raigie(eds),Hand book of physiological methods. Cambrige University Press.pp.96-97.

Kosobrukhov, A; Knyazeva, I, (2004). plantago major plants responses to increase content of lead in soil: growth and photosynthesis. Plant Grow Regular. 42: 145 – 151.

Larbi, A; Morales, F, (2003). Effect of Cd and Pb in sugar beet plants grown in nutrient solution. Functional Plant Biology , 20(12),1453-1464.

Lowry,O.H.,Rosbroch,N.J.,Farr and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the folin reagent. J. Biol. Chem..193: 256-273.

Mishra, A; Choudhari, MA, (1998). Amelioration of lead and mercury effects on germination and rice seedling growth by antioxidants, Biol. Plant. 41:469-473

Mohanty, N; Vass, I; Demeter, S, (1989). Copper toxicity affects photosystem II election transport at Q_B. Plant Physiol. 90: 175-179

Ma, J.F. (2004). Role of organic acids in detoxification of Aluminum in higher plants. Plant Cell Physiologic. 41: 383-390

Oliver, D; Nadiv, R, (2003). Uptake of Cu, Pb, Cd, as and DDT by vegetables Grown in urban environments. Environmental Protection and Heritage Council (EPHC): 151-161

Pallavi, Sh; Rama, Sh, D, (2005). Lead toxicity in plants. Brazilian Journal of plant physiology. vol, 17, no 1

Prasada, M.N.V. and Strzalka, K. (1999). Impact of heavy metals on photosynthesis in heavy metal stress in plants. Prasasa, M.N.V. and Hagemeyer, J.Eds. Springer Heidelberg, 117.

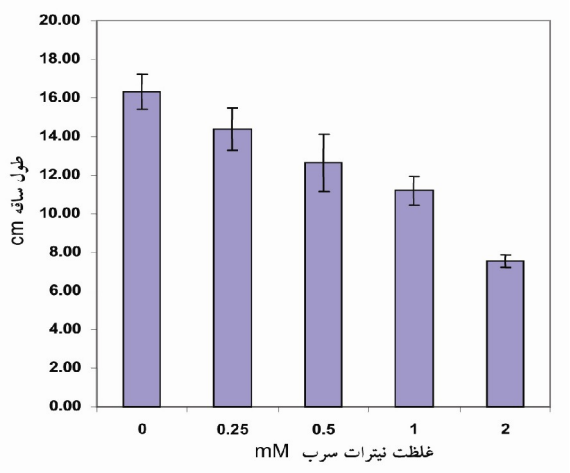
Samardakiew, S; Wozny, A, (2000). The distribution of lead in dunckweed root tip. plant soil 226: 107-111

Sharma, P; Dubey, RS, (2004). Ascorbate peroxides from rice seeding. Plant sci. 167: 541-550

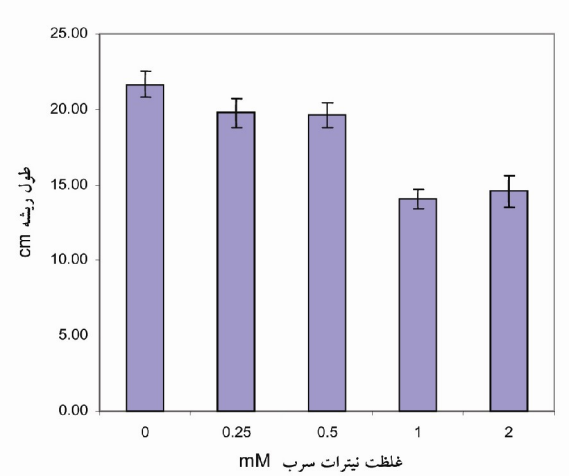
Stefanov, K et al, (1995). Effects of lead ions on the phospholipid composition in leaves of *Zea mays and Phasolous vulgaris.*J. Plant physiol. 147: 243-246

Verma, S; Dubey, RS, (2003). Lead toxicity induces lipid proxidation and alters the activity of antioxidant enzymes in growing rice plants. Plant. Sci. 164: 645-655

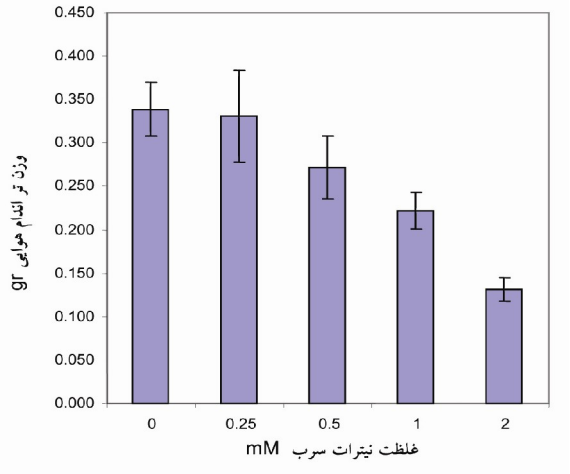
Yell Yang, et al, (2000). Identification of rice varieties with high tolerance or sensivity to lead and characterization of the mechanism of to tolerance. Plant physiol. Nov. 2000 vol, 124: 1019-1026



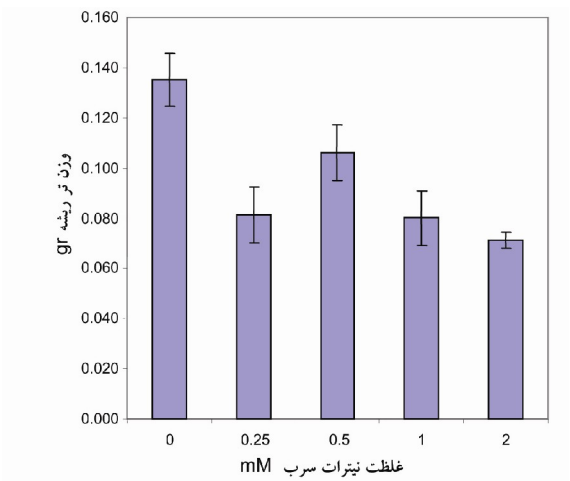
شکل ۱: تاثیر تیمار ۲۰ روز غلظت‌های مختلف نیترات سرب در طول ساقه



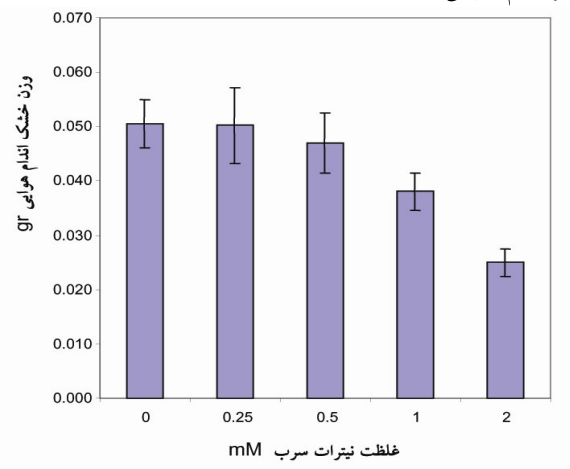
شکل ۲: تاثیر تیمار ۲۰ روز غلظت‌های مختلف نیترات سرب در طول ریشه



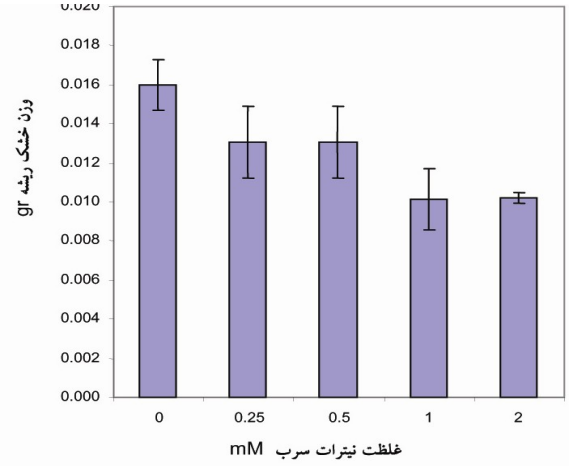
شکل ۳: تاثیر تیمار ۲۰ روز غلظت‌های مختلف نیترات سرب در وزن تر اندام هوایی



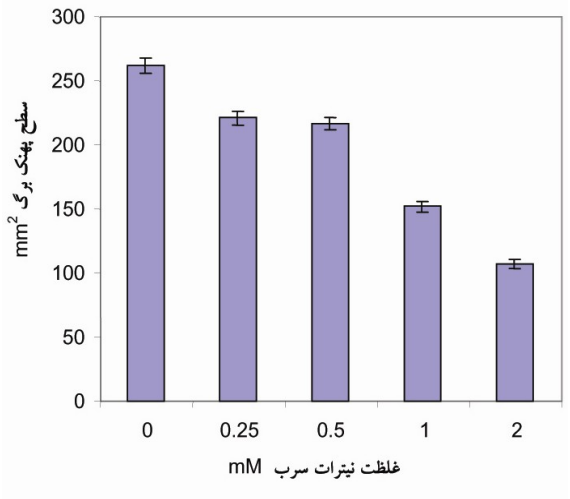
شکل ٤: تاثیر تیمار ۲۰ روز غلظت‌های مختلف نیترات سرب در وزن تر ریشه



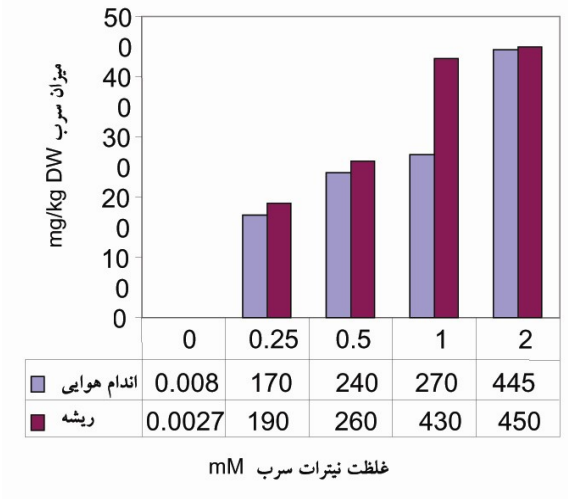
شکل ۵: تاثیر تیمار ۲۰ روز غلظت‌های مختلف نیترات سرب در وزن خشک اندام هوایی



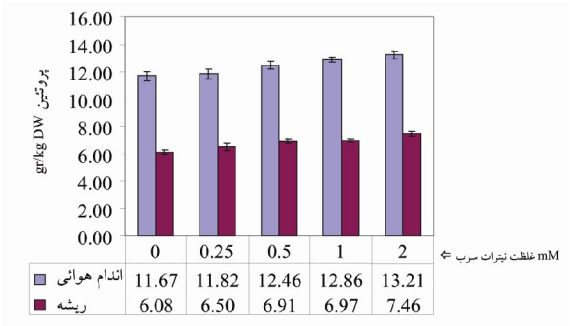
شکل ٦: تاثیر تیمار ۲۰ روز غلظت‌های مختلف نیترات سرب در وزن خشک ریشه



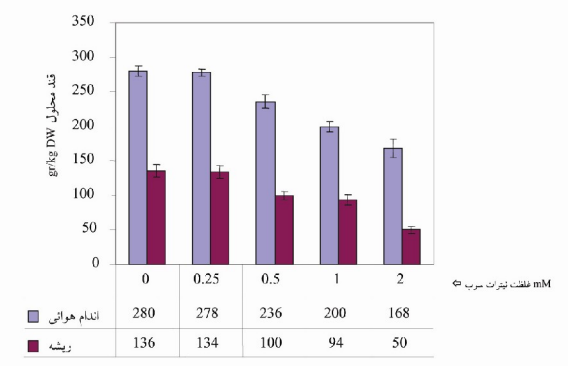
شکل ۷: تاثیر تیمار ۲۰ روز غلظت‌های مختلف نیترات سرب در سطح پهنک برگ



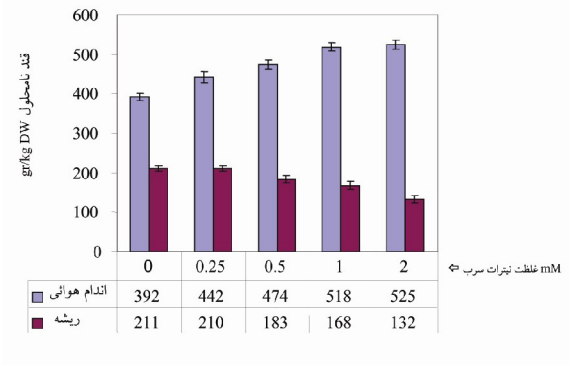
شکل ۸: میزان تجمع سرب در ریشه و اندام هوایی در تیمار ۲۰ روزه با غلظت‌های مختلف نیترات سرب



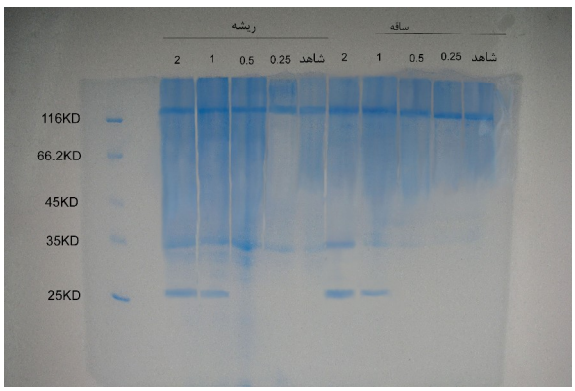
شکل ۹: تغییرات میزان پروتئین‌های محلول در ریشه و اندام هوایی در تیمار ۲۰ روزه با غلظت‌های مختلف نیترات سرب



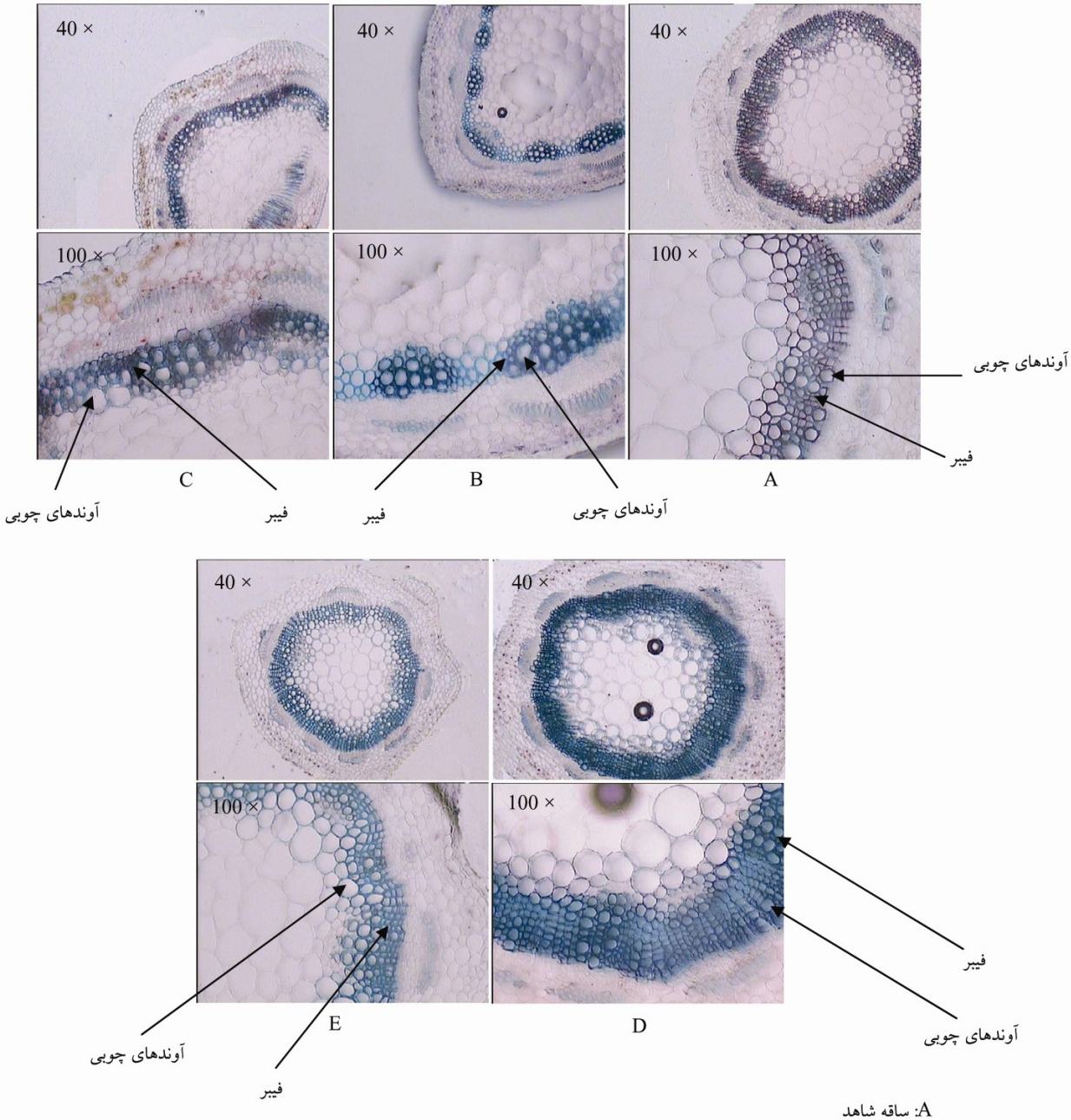
شکل ۱۰: تغییرات میزان قند محلول در ریشه و اندام هوایی در تیمار ۲۰ روزه با غلظت‌های مختلف نیترات سرب



شکل ۱۱: تغییرات میزان قند نامحلول در ریشه و اندام هوایی در تیمار ۲۰ روزه با غلظت‌های مختلف نیترات سرب



شکل ۱۲: الکتروفورز پروتئین‌ها در غلظت‌های مختلف نیترات سرب



A: ساقه شاهد

B: ساقه تیمار شده با ۰/۲۵ میلی‌مولار سرب

C: ساقه تیمار شده با ۰/۵ میلی‌مولار سرب

D: ساقه تیمار شده با ۱ میلی‌مولار سرب

E: ساقه تیمار شده با ۲ میلی‌مولار سرب

شکل ۱۳: برش‌های میکروسکوپی ساقه در غلظت‌های مختلف نیترات سرب

The effects of lead pollution on the growth parameters, protein content, sugars, and anatomical structure in *Medicago sativa* L.

Saadatmand, S., Fahimi, H., Alaeddini,AR.

Islamic Azad University, Science and Research Branch, Faculty of basic sciences, Tehran.Iran.

Abstract

In this investigation, the effects of various concentrations of Pb(NO3)2 (0.25–0.5–1–2mM) on the growth parameters in *Medicago sativa* L. were studied. The Treatment period was 20 days and the end of this period, the length, dry weight, and fresh weight of roots and shoots, leaves area, microscopically observation, accumulation of lead in roots and shoots, determination of soluble and insoluble sugars, total proteins and profile of proteins by SDS-PAGE, measured and studied. The statistical studies were carried out by SPSS software and variance analysis (ANOVA) and Duncan test. The results showed that lead toxicity decreased significantly roots and shoots length, leaves area, dry and fresh weight and in the high concentration of Pb^{+2}, lignin biosynthesis and fiber were increased. Analyzing of lead content in the roots and shoots by atomic absorption indicated that, the lead absorption excess by increasing level of lead in treatments. When the concentration of lead increased, the amount of soluble sugars in shoots and roots were decreased whereas insoluble sugars in shoots were increased but in roots were decreased. By increasing lead in treatment both in shoots and roots, the total protein increased. The profile of proteins by SDS-PAGE showed some changes as compared with control plants. This research indicated that the *Medicago sativa* L. is a heavy metal tolerant plant and absorbed high level of lead from soil and accumulated in roots and shoots tissues.

Key words: Lead toxicity, Pb(NO3)2, Pb_2^+, Heavy Metal, *Medicago sativa* L.