

اثر محلول پاشی آسکوربات بر عملکرد و برخی از ویژگی‌های فیزیولوژیک لوبیا سبز تحت شرایط جذب برگی سرب و نیکل

زهرا محمدخانی^{*}، مهدی برادران فیروزآبادی^۲، مهدیه پارسائیان^۳، هادی قربانی^۴

۱. کارشناس ارشد زراعت دانشگاه شاهرود، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شاهرود، سمنان.

۲. استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شاهرود، سمنان.

۳. استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شاهرود، سمنان.

۴. دانشیار گروه خاکشناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شاهرود، سمنان.

* مسوول مکاتبه: Zmohammadkhani85@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۱/۲۱

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۸/۲۵

چکیده

فلزات سنگین از آلاینده‌های مهم محیط زیست به شمار می‌روند که اغلب از فعالیت‌های صنعتی و کشاورزی بشر منشأ می‌گیرند. از جمله این آلاینده‌ها عناصر سرب و نیکل هستند که آثار مخربی بر موجودات زنده مانند گیاهان دارند. به همین منظور، جهت ارزیابی تاثیر این فلزات موجود در باران‌های اسیدی بر گیاه لوبیا سبز (*Phaseolus vulgaris* L.) و تاثیر آسکوربات در کاهش صدمات آن‌ها، آزمایشی به صورت فاکتوریل و در قالب طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در دانشکده کشاورزی دانشگاه شاهرود اجرا شد. تیمارهای آزمایش شامل محلول پاشی نیکل در سه سطح (صفر، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکرومولار) به عنوان فاکتور دوم و دو سطح محلول پاشی آسکوربات (صفر و ۲۰ میلی‌مولار) به عنوان فاکتور سوم بودند. نتایج این آزمایش نشان داد که غلظت بالای سرب (۴۰۰ میکرومولار) بدون آسکوربات موجب افزایش ۳ درصدی در محتوای نسبی آب برگ شد. عناصر نیکل و سرب موجب افزایش کلروفیل و کاهش کاروتنوئید، عملکرد پروتئین و عملکرد نیام شدند. محلول پاشی آسکوربات موجب افزایش معنی‌دار و ۲۳ درصدی در میزان کاروتنوئید، افزایش ۳۴ درصدی عملکرد پروتئین، افزایش شاخص سطح برگ و بهبود ۹ درصدی عملکرد نیام سبز گردید. در مجموع با توجه به نتایج به دست آمده، چنین استنباط می‌شود که محلول پاشی آسکوربات در شرایط مواجه شدن گیاه با باران اسیدی حاوی فلزات سنگین به ویژه نیکل، می‌تواند خسارت وارده به گیاه را کاهش دهد و حتی موجب دستیابی انسان به غذای سالمتر شود.

واژه‌های کلیدی: پروتئین، عملکرد نیام، فلزات سنگین، کاروتنوئید و کلروفیل

مقدمه

همکاران، (۲۰۰۶). نیکل و سرب از جمله عناصری هستند که در هوای آلوده وجود دارند، چنانچه این عناصر از طریق باران به سطح خاک برسند مشکلات زیست محیطی فراوانی را به دنبال خواهند داشت و چنانچه این عناصر وارد زنجیره غذایی انسان شوند، مشکلات فراوانی را برای انسان به وجود می‌آورند. سرب از طریق کاهش طول ریشه (لوان، ۱۹۴۵)، زردی برگ‌های جوان (گاسپار و آنتون، ۲۰۰۲)، شکستگی کروموزومی و تغییرات ژنی

باران اسیدی یکی از مشکلات جدی محیط زیست می‌باشد که امروزه بشر در اکثر نقاط جهان با آن درگیر است. طبق مطالعات انجام شده، به دلیل وجود فلزات سنگین در هوا و اثر آن بر پوشش‌های گیاهی، بسیاری از پارامترهای مربوط به رشد و نمو گیاهان تحت تاثیر قرار می‌گیرند و از فعالیت بسیاری از واکنش‌های آنزیمی و متابولیکی در گیاهان جلوگیری می‌شود (بایکو و

هان و همکاران، ۲۰۰۷) و نقصان سیستم فتوسنتزی و تنفسی (آدام و همکاران، ۲۰۰۶) بر رشد گیاهان اثر می‌گذارد. این عنصر بعد از جذب توسط گیاه برای آن مسمومیت ایجاد می‌کند، تولید گونه‌های فعال اکسیژن را در گیاه افزایش می‌دهد و منجر به ایجاد تنش اکسیداتیو در آن‌ها می‌شود، بنابراین افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی-اکسیدانتی خاصی در چنین گیاهانی دیده می‌شود (شارما و دویی، ۲۰۰۵). اگرچه بیشتر گزارش‌ها حاکی از اثر مهاری سرب بر رشد گیاهان است، در عین حال گزارش‌هایی نیز وجود دارد که نشان می‌دهد سرب سبب تحریک رشد در گیاهان می‌شود. به عنوان مثال، ایرانبخش و همکاران (۱۳۸۹) گزارش کردند که غلظت‌های مختلف کلرید سرب سبب افزایش درصد جوانه‌زنی در سویا می‌شود، به طوری که با بالاتر رفتن غلظت کلرید سرب، درصد جوانه‌زنی افزایش می‌یابد. در نتایج آن و همکاران (۲۰۰۴) نیز مشخص شد که در غلظت‌های ۱۲۸۰-۶۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم سرب در خاک، درصد جوانه‌زنی بذور ذرت خوشه‌ای به تدریج افزایش می‌یابد و در گندم نیز درصد جوانه‌زنی در حضور سرب افزایش نشان داد.

علی‌رغم این‌که امروزه نیکل یکی از عناصر مفید مورد نیاز گیاهان محسوب می‌شود (بیب و مک کلافرتی، ۲۰۰۶) و نقش آن در رشد و به ویژه فعالیت آنزیم اوره‌آز به اثبات رسیده است (ویت کلاز و همکاران، ۲۰۰۲)، ولی به عنوان یک فلز سنگین، به ویژه در غلظت‌های بالا، از طریق کاهش وزن تر و خشک برگ‌ها و ساقه (فونتس و کوکس، ۱۹۹۸)، نکروزه شدن برگ‌ها (خطیب و همکاران، ۱۳۸۷)، اثر منفی بر طول ساقه (ژو، ۲۰۰۲)، هم‌چنین کاهش میزان تولید (مرین و همکاران، ۲۰۰۴) موجب کاهش در رشد عمومی گیاهان می‌گردد. تاثیر نیکل بر گیاهان مختلف، متفاوت است. این عنصر برای برخی از گیاهان ضروری شناخته شده است، به عنوان مثال افزودن یک مولار Ni-EDTA به محلول غذایی گیاه لوبیای چشم بلبلی، موجب حذف نقاط نکروزه در برگ‌های این گیاه شد (شیمادا و همکاران، ۱۹۸۰).

اکثر گیاهانی که در مناطق صنعتی و آلوده به فلزات سنگین مورد کشت قرار می‌گیرند، تنش اکسیداتیو ناشی از فلزات سنگین را تجربه می‌کنند. صدماتی که این عناصر به گیاهان وارد می‌کنند، تاثیر منفی بر تولید محصولات کشاورزی دارد. بنابراین، یافتن راهکارهایی به منظور کاهش میزان تنش وارد به گیاه و یا افزایش تحمل گیاه به تنش فلزات سنگین ضروری به نظر می‌رسد. آثار نامطلوب ناشی از این فلزات اغلب از طریق ایجاد تنش اکسیداتیو در گیاه به وجود می‌آید. شاید بتوان از طریق کاربرد خارجی مواد آنتی اکسیدانت این اثرات را تخفیف داد. گزارش شده است که مصرف خارجی آسکوربات سبب افزایش مقاومت به تنش‌ها (شالاتا و نیومن، ۲۰۰۱)، کاهش محتوای پراکسید هیدروژن و پراکسیداسیون لیپیدها می‌شود (چاپار زاده و قدرتی، ۱۳۹۰). این ویتامین به عنوان یک فاکتور تنظیم کننده رشد معرفی می‌شود که تاثیر زیادی بر فرآیندهای بیولوژیکی دارد (هنداوی و عزالدین، ۲۰۱۰). یکی از گیاهانی که نقش مهمی در زنجیره غذایی انسان دارد و ممکن است که از این تنش‌ها آسیب ببیند، لوبیا سبز است. لوبیای زراعی و یا لوبیا سبز به عنوان دومین لگوم بعد از نخود در سراسر جهان از لحاظ تغذیه‌ای حایز اهمیت می‌باشد (اسکرپیتز، ۲۰۰۴). این گیاه به دلیل مصرف تازه‌خوری می‌تواند مسیر مناسبی برای ورود فلزات سنگین به زنجیره غذایی انسان باشد. لوبیا سبز از جمله محصولات است که می‌تواند در زمان‌های مختلف مانند کشت بهاره و تابستانه مورد کشت قرار گیرد (آملی و همکاران، ۲۰۰۵). از این رو با زیر کشت رفتن زمین در فصل بهار و بارش بهاره امکان تنش اکسیداتیو ناشی از فلزات سنگین افزایش می‌یابد. با توجه به مزایایی که برای آسکوربات ذکر شد، استنباط می‌شود که کاربرد آسکوربات می‌تواند موجب بهبود وضعیت گیاه در شرایط تنش باشد. از این رو، در این پژوهش اثر این ویتامین به عنوان یک آنتی اکسیدانت قوی در شرایط جذب برگی فلزات سنگین توسط گیاه لوبیا سبز مورد آزمون قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

آزمایش در سال ۱۳۹۱ در مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه شاهرود به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار اجرا شد. تیمارها شامل سه سطح محلول‌پاشی برگ‌ی نیکل با غلظت صفر، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکرومولار از منبع نیترات نیکل ($\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$) به عنوان فاکتور اول، سه سطح محلول‌پاشی برگ‌ی سرب با غلظت صفر، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکرومولار از منبع نیترات سرب ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$) به عنوان فاکتور دوم و دو سطح محلول‌پاشی آسکوربات صفر و ۲۰ میلی‌مولار به عنوان فاکتور سوم بودند. کاشت لویا سبز (رقم هلندی) در خرداد ماه ۱۳۹۱ انجام شد. در هر کرت آزمایشی ۴ خط کاشت به طول ۴ متر با فاصله بین خطوط ۵۰ سانتی-متر و فاصله بین بوته‌ها روی ردیف ۱۰ سانتی‌متر داشت. دو خط کناری به عنوان حاشیه و دو خط وسط جهت تعیین پارامترهای آزمایش در نظر گرفته شد. پس از استقرار کامل بوته‌ها و قبل از مرحله گل‌دهی (۷۸ روز پس از کاشت) اقدام به اعمال تیمارهای فلزات سنگین نیکل و سرب و یک هفته بعد از آن، تیمار آسکوربات گردید. صفاتی از قبیل کلروفیل a، b، کاروتنوئید، میزان عناصر نیکل و سرب در برگ و نیام، عملکرد نیام، پروتئین، محتوای نسبی آب برگ و شاخص سطح برگ مورد اندازه‌گیری قرار گرفتند. نحوه اعمال تیمارها به صورت محلول‌پاشی برگ‌ی بود تا شرایطی مشابه باران اسیدی در مناطق اسیدی ایجاد گردد و جذب برگ‌ی این فلزات مورد بررسی قرار گیرد. محلول‌پاشی در هنگام غروب و در هوای صاف و ملایم انجام شد، طوری که برگ‌های گیاه به طور کامل خیس شدند. از تریتون x100 با غلظت ۰/۰۱ درصد جهت افزایش جذب برگ‌ی تیمارها استفاده گردید.

اندازه‌گیری رنگی‌های برگ

اندازه‌گیری میزان کلروفیل و کاروتنوئید در ۸۳ روز پس از کاشت با استفاده از روش بدون لهیدگی روی برگ‌های هم‌سن از هر کرت صورت گرفت. به این طریق

که نمونه‌های برگ‌ی (۰/۵ گرم) در ۶ میلی‌لیتر از دی متیل سولفوکسید، در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۴ ساعت قرار داده شدند. میزان جذب عصاره حاصل در طول موج‌های ۶۶۵، ۶۴۵ و ۴۷۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر مدل 6320D ساخت انگلستان ثبت گردید. سپس، با استفاده از روابط موجود میزان کلروفیل a (Chl a)، کلروفیل b (Chl b) و کاروتنوئید محاسبه گردید (پروچازکا و همکاران، ۱۹۹۸):

$$\begin{aligned} \text{Chl a} &= (12.19 \text{ A}665) - (3.45 \text{ A}645) \\ \text{Chl b} &= (21.99 \text{ A}645 - 5.32 \text{ A}665) \\ \text{Carotenoid} &= (1000 \text{ A}470 - 2.14 \text{ Chl a} - 70.16 \text{ Chl b}) / 220 \end{aligned}$$

اندازه‌گیری عناصر سرب و نیکل در برگ و نیام

برای اندازه‌گیری مقدار عناصر سنگین ذخیره شده در برگ و نیام، پس از گذشت دو هفته از محلول‌پاشی عناصر سنگین سرب و نیکل، نمونه-برداری برگ و نیام برای تمام تیمارها صورت گرفت. به منظور زدودن عناصر اضافی از سطح نمونه‌ها، برگ‌ها و نیام‌ها با آب مقطر شسته و خشک شدند و برای اندازه‌گیری غلظت عناصر، هضم اسیدی شدند. به این طریق که به ۱ گرم از نمونه پودر شده گیاه، ۱۰ میلی‌لیتر اسید نیتریک رقیق شده با آب مقطر (به نسبت ۱:۱) افزوده و روی هیتر با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه حرارت داده شد (تمام این عملیات در زیر هود انجام شد). سپس، به محلول قبلی ۵ میلی‌لیتر اسید نیتریک غلیظ اضافه شد و دوباره به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. این مرحله دو بار تکرار شد. در مرحله بعد ۲ میلی‌لیتر آب مقطر دو بار تقطیر و ۳ میلی‌لیتر آب اکسیژنه ۳۰٪ به محلول اضافه شد و به مدت ۵ تا ۶ دقیقه در همان دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از گذشت زمان لازم دوباره یک میلی‌لیتر آب اکسیژنه ۳۰٪ افزوده شد و محلول به مدت ۳ تا ۴ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد

قرار گرفت. در مرحله آخر، ۵ میلی لیتر اسید کلریدریک و ۱۵ میلی لیتر آب دو بار تقطیر اضافه و بعد از گذشت ۱۵ دقیقه محلول با کاغذ صافی واتمن ۱۲ صاف گردید. آنگاه حجم محلول در بالن حجمی ۵۰ میلی لیتری، با آب دو بار تقطیر به حجم رسانیده شد. محلول آماده شده، برای قرایت با کاغذ سلولز استات ۰/۲ صاف شد. برای قرایت میزان عناصر مورد نظر از دستگاه^۱ ICP (مدل GBC integra XL sequential ساخت کشور استرالیا) استفاده گردید.

اندازه گیری عملکرد نیام و پروتئین

عملکرد نیام با استفاده از ۵ بوته در هر کرت و با در نظر گرفتن حاشیه بر حسب متر مربع محاسبه گردید. اندازه گیری پروتئین نیام سبز پس از برداشت به روش کجالدال انجام شد. برای تعیین عملکرد پروتئین نیام از حاصل ضرب عملکرد نیام در درصد پروتئین استفاده شد.

تجزیه و تحلیل داده ها

در نهایت تجزیه و تحلیل داده ها توسط نرم افزارهای MSTAT-C و SAS صورت گرفت. مقایسه میانگین ها از طریق آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

نتایج و بحث

میزان رنگیزه های برگ

در جدول ۱ اثر متقابل آسکوربات و سرب بررسی شده است. مشاهده می گردد که در غیاب آسکوربات گیاهانی که فلز سنگین سرب را دریافت کردند از کلروفیل a بیشتری برخوردار بودند، به طوری که بیشترین کلروفیل a به میزان ۰/۷۹ میلی گرم در گرم تر مربوط به تیمار سرب ۲۰۰ میکرومولار به تنهایی بود. کاربرد آسکوربات در شرایط تنش سرب نه تنها مفید نبود، بلکه موجب کاهش کلروفیل a گردید. این کاهش در غلظت ۲۰۰ میکرومولار سرب چشم گیرتر بود. در مورد کلروفیل b نیز محلول پاشی با آسکوربات تنها در سطح بالای سرب مفید

واقع شد و در دو سطح دیگر حتی موجب کاهش معنی- دار کلروفیل b موجود در برگ گردید. در اثر متقابل آسکوربات و نیکل نیز نیکل ۲۰۰ میکرومولاری اثر تحریکی بر کلروفیل b داشت، از این رو بیشترین کلروفیل b معادل ۰/۷۳ میلی گرم در گرم تر در گیاهانی ثبت شد که نیکل ۲۰۰ میکرومولار را دریافت کردند، ولی توسط آسکوربات محلول پاشی نشدند. این مقدار نسبت به شاهد ۱۴/۰۶ درصد بیش تر بود. محلول- پاشی با آسکوربات تنها کاهش به وجود آمده از کلروفیل b در غلظت ۴۰۰ میکرومولار نیکل را به طور معنی داری بهبود بخشید و به شاهد نزدیک کرد (جدول ۴).

گزارش های متعددی در مورد آثار فلزات سنگین بر کلروفیل برگ وجود دارد. کامل (۲۰۰۸) در تیمار باقلا با سرب دریافت که سرب در مقادیر پایین محتوای کلروفیل را افزایش می دهد، ولی غلظت های بالای آن سبب کاهش معنی دار کلروفیل می شود. همچنین، به کارگیری سرب و کادمیوم در دو رقم گندم کلروفیل کل را افزایش داد (آنسل و همکاران، ۲۰۰۰). به علاوه، سارواری و همکاران (۲۰۰۲) افزایش محتوای کلروفیل در مرکز فتوسیستم II و هم چنین، کمپلکس پروتئین- کلروفیل b/a جمع کننده نور فتوسیستم II را در غلظت پایین تیمار سرب مشاهده کردند.

کاربرد آسکوربات همراه با نیترات سرب، سبب افزایش معنی داری در میزان کاروتنوئید گردید، به طوری که آسکوربات به همراه سرب ۲۰۰ میکرومولار بالاترین میزان کاروتنوئید (۰/۱۶ میلی گرم در گرم تر) را به خود اختصاص داد که نسبت به شاهد نیز افزایش معنی دار و ۲۳ درصدی را نشان داد (جدول ۱). کاروتنوئیدها رنگیزه های چربی دوست موجود در غشاهای کلروپلاستی هستند و عملکردهای متعددی در متابولیسم گیاه دارند. آن ها علاوه بر جذب نور به عنوان رنگیزه های کمکی، دستگاه فتوسنتزی را از آسیب فوتون های اضافی و تنش اکسیداتیو (توسط چرخه گزانتوفیل و ممانعت از تشکیل

1-Inductively coupled plasma

به‌شمار می‌آید که حاکی از اهمیت حضور آسکوربات در سلول‌های گیاهی و نقش آن‌ها در تحمل تنش‌های محیطی است (مولرمول و همکاران، ۲۰۰۲). اسید آسکوربیک به احتمال زیاد با افزایش محتوای کاروتنوئیدها و تغییر نسبت آن‌ها شرایط اجرای چرخه گزانتوفیل را بهبود می‌بخشد.

میزان جذب سرب و نیکل برگ و نیام

همان‌طور که در جدول ۲ ملاحظه می‌گردد، افزایش غلظت محلول‌پاشی موجب بالا رفتن میزان سرب در برگ شد. با این وجود در هر دو غلظت ۲۰۰ و ۴۰۰ میکرومولار سرب، محلول‌پاشی آسکوربات به ترتیب موجب کاهش ۳۳ و ۱۶ درصدی در میزان سرب برگ گردید. محلول‌پاشی آسکوربات در میزان نیکل برگ تنها در سرب ۲۰۰ میکرومولار مفید واقع شد و سبب کاهش معنی‌دار این فلز سنگین در برگ گردید. در دو غلظت دیگر اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. شایان ذکر است که دستگاه توان قرایت غلظت سرب را در هیچ یک از نمونه‌های نیام نداشت که این مساله حاکی از پایین بودن و یا فقدان این عنصر در نیام گیاهان مورد آزمایش است، از این رو این صفت در جدول ۲ مشاهده نمی‌گردد. پایچالاک و همکاران (۲۰۰۲) مهمترین مکان تجمع سرب را در ریشه چندین گونه گیاهی گزارش کردند. میزان نیکل موجود در نیام نیز تحت تاثیر محلول پاشی آسکوربات و جذب برگی سرب قرار نگرفت و معنی‌دار نشد.

گونه‌های فعال اکسیژن) محافظت می‌کنند (الطیب و الانانی، ۲۰۰۶). شاید یکی از دلایل افزایش دور از انتظاری که در صفات مختلف بر اثر سرب مشاهده می‌گردد، افزایش میزان کاروتنوئیدها و ایفای نقش آنتی‌اکسیدانتی آن‌ها در جمع‌آوری گونه‌های فعال اکسیژن و همچنین، افزایش میزان عمل چرخه گزانتوفیل در مصرف $NADPH, H^+$ مازاد و ممانعت از بسته شدن زنجیره انتقال الکترون کلروپلاستی و تولید بیشتر گونه‌های اکسیژن فعال باشد. کاروتنوئید این قابلیت را دارد که به طور برگشت پذیر با گونه‌های آزاد اکسیژن تولید شده در شرایط تنش‌های محیطی واکنش دهد و از صدمات جبران ناپذیر آن‌ها جلوگیری کند (لاولور و کورنیک، ۲۰۰۲).

تاثیر آسکوربات بر افزایش محتوای کاروتنوئیدها در گیاهان مختلفی گزارش شده است (اسدی کاوان و همکاران، ۱۳۸۸). آسکوربات در چرخه‌های گلوکاتیون-آسکوربات، مهلر و گزانتوفیل نقش ویژه‌ای دارد و با افزایش حجم خزانه آن، ضمن جمع‌آوری مستقیم گونه‌های فعال اکسیژن، چرخه‌های یاد شده به خوبی فعالیت می‌کند و سبب تعدیل پتانسیل ردوکس سلول، کاهش تولید انواع اکسیژن فعال و کاهش بروز تنش اکسیداتیو در گیاه می‌گردد. برای مثال، آسکوربات تامین کننده هیدروژن لازم برای تبدیل ویولاگزانتین به آنتراگزانتین در چرخه گزانتوفیل توسط آنزیم ویولاگزانتین داپوکسیداز است. این چرخه در بین مکانیسم‌های دفاعی در حال اجرا در کلروپلاست، بعد از چرخه کالوین، موثرین مکانیسم دفاعی برای تعدیل پتانسیل ردوکس

جدول ۱- مقایسه میانگین کلروفیل و کاروتنوئید تحت تاثیر محلول پاشی آسکوربات و جذب برگی سرب

کاروتنوئید	کلروفیل b (میلی‌گرم در گرم وزن تر)	کلروفیل a	تیمارهای آزمایشی	
			سطح سرب (میکرو مولار)	سطح آسکوربات (میلی مولار)
۰/۱۳ d	۰/۶۸ ab	۰/۷۱ b	صفر	
۰/۱۴ c	۰/۷۱ a	۰/۷۹ a	۲۰۰	صفر
۰/۱۵ b	۰/۵۵ c	۰/۷۶ ab	۴۰۰	
۰/۱۴ c	۰/۵۴ c	۰/۷۶ ab	صفر	
۰/۱۶ a	۰/۶۴ b	۰/۷۱ b	۲۰۰	۲۰
۰/۱۵ b	۰/۶۷ ab	۰/۷۳ ab	۴۰۰	

حروف غیر مشترک در هر ستون بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار است.

جدول ۲- مقایسه میانگین سرب و نیکل برگ تحت تاثیر محلول پاشی آسکوربات و جذب برگی سرب

تیمارهای آزمایشی	سطح سرب (میلی مولار)	سطح سرب (میکرو مولار)	سرب برگ	نیکل برگ
			(میلی گرم در کیلوگرم)	(میلی گرم در کیلوگرم)
صفر	صفر	صفر	۰ e	۴/۶۸ bc
	۲۰۰	۲۰۰	۱۷/۷۶ c	۵/۶۸ a
	۴۰۰	۴۰۰	۲۹/۳۸ a	۴/۷ bc
۲۰	صفر	صفر	۰ e	۳/۹۱ c
	۲۰۰	۲۰۰	۱۳/۳ d	۴/۱۱ c
	۴۰۰	۴۰۰	۲۵/۱۳ b	۵/۲ ab

حروف غیر مشترک در هر ستون بیانگر وجود اختلاف معنی دار است.

برخی صفات فیزیولوژیک و عملکرد

(۲۰۰۰). در اثر متقابل آسکوربات و نیکل بیشترین شاخص سطح برگ معادل با ۰/۹۸ مربوط به تیمار شاهد بود. جذب برگی نیکل در عدم حضور آسکوربات در هر دو غلظت به یک اندازه شاخص سطح برگ را کاهش دادند که حدود ۲۵ درصد بود. محلول پاشی آسکوربات توانست در شرایط وجود تنش نیکل صفت شاخص سطح برگ را به طور معنی داری بهبود بخشد که این تاثیر در بالاترین سطح نیکل محسوس تر بود (جدول ۴). طبق مطالعات شارما و دویی (۲۰۰۵) کاهش سطح برگ، پاسخ عمومی گیاهان به محیط حاوی فلز سنگین است. کاهش سطح برگ و شدت تعرق، به علت زیادی عناصر سنگین در محیط کشت است که جذب و انتقال آب را کاهش می دهد (آزمات و همکاران، ۲۰۰۶).

با توجه به مقایسه میانگین اثر ترکیبات تیماری آسکوربات و سرب بر صفت شاخص سطح برگ بر خلاف انتظار، سرب ۴۰۰ میکرومولار موجب افزایش این صفت در مقایسه با شاهد گردید. از آنجایی که برای محلول پاشی سرب از منبع نیترات سرب استفاده شد، این افزایش ممکن است که ناشی از اثر تحریک کنندگی نیترات موجود در محلول مورد استفاده باشد. محلول پاشی آسکوربات در هر دو غلظت ۲۰۰ و ۴۰۰ میکرومولار سرب موجب افزایش سطح برگ گردید، به طوری که در تیمار ۴۰۰ میکرومولار سرب به حدی افزایش داشت که از شاهد نیز بالاتر بود (جدول ۳). این افزایش می تواند به دلیل افزایش در تعداد سلول های برگ ها و یا افزایش در اندازه آن ها به دلیل آسکوربات باشد (هورمنز و همکاران،

جدول ۳- مقایسه میانگین برخی صفات تحت تاثیر محلول پاشی آسکوربات و جذب برگی سرب

تیمارهای آزمایشی	شاخص سطح برگ	محتوای نسبی آب برگ (درصد)	عملکرد نیام	عملکرد پروتئین
			(کیلوگرم در هکتار)	(کیلوگرم در هکتار)
صفر	صفر	۷۳/۳۸ c	۶۸۹۱/۶۶ a	۱۶۶۴/۰۹ a
	۲۰۰	۷۳/۶۸ c	۶۹۹۳/۱۶ a	۱۲۹۹/۶۸ b
	۴۰۰	۷۶/۰۲ a	۵۶۳۱/۹۸ c	۱۲۴۰/۶۱ b
۲۰	صفر	۷۳/۳ c	۶۰۹۷/۷ bc	۱۴۴۷/۲۴ ab
	۲۰۰	۷۵/۸۷ ab	۶۷۸۶/۱ ab	۱۶۳۱/۳۱ a
	۴۰۰	۷۴/۴۱ bc	۶۶۵۸/۰۶ ab	۱۶۶۲/۸ a

حروف غیر مشترک در هر ستون بیانگر وجود اختلاف معنی دار است.

بیان کردند که افزایش رشد بر اثر کاربرد آسکوربات در گیاهان ممکن است که به دلیل افزایش تقسیم سلولی (از طریق تسریع انتقال از مرحله G_1 به مرحله S چرخه سلولی) و رشد طولی سلول (از طریق مهار پراکسیدازهای آپوپلاستی) باشد. بهبود رشد گیاه و عملکرد نیام بر اثر کاربرد آسکوربات در گیاهان تحت تنش به احتمال زیاد به دلیل افزایش توان آنتی اکسیدانسی و افزایش تقسیم و گسترش سلولی است.

به کارگیری آسکوربات همراه با تیمارهای سرب سبب افزایش عملکرد پروتئین نیام سبز نسبت به تیمارهای نیترات سرب شد. هر دو غلظت سرب در عدم حضور آسکوربات به یک اندازه و در حدود ۳۴ درصد نسبت به شاهد عملکرد پروتئین را کاهش دادند، ولی محلول‌پاشی آسکوربات آن‌ها را به اندازه‌ای بهبود بخشید که با شاهد اختلافی نداشتند. محل تجمع بیشتر پروتئین‌ها در اندام‌هایی است که تحت تاثیر مستقیم عناصر سنگین قرار می‌گیرند. گزارش شده است که اگر عناصر سنگین به صورت باران اسیدی سطح برگ گیاهان را تحت تاثیر قرار دهند، تجمع پروتئین در اندام هوایی بیش از ریشه خواهد بود. افزایش میزان پروتئین در غلظت بالای نیکل و سرب در حضور آسکوربات، می‌تواند به دلیل تشکیل کمپلکس‌های پایدار پروتئین- فلز در سیتوزول باشد. فیتوکلاتین‌ها سبب مقاومت به فلزات سنگین در گیاهان می‌شوند. پروتئین‌هایی نظیر متالوتیونین‌ها و فیتوکلاتین‌ها ممکن است که در مقاومت به نیکل و سرب نقش داشته باشد. در این آزمایش در غلظت‌های نیکل و سرب تحت تیمار آسکوربات افزایش سنتز پروتئین نسبت به تیمار شاهد مشاهده می‌گردد که این روند افزایشی ممکن است که به دلیل افزایش سنتز پروتئین یا کاهش فرآیندهای متابولیکی باشد.

در مقایسه‌ای که بین ترکیبات تیماری حاصل از آسکوربات و سرب بر محتوای نسبی آب برگ انجام شد، ملاحظه می‌گردد که غلظت بالای سرب در عدم حضور آسکوربات سبب افزایش محتوای نسبی آب برگ شد و آن را به $76/02$ درصد رساند، ولی محلول‌پاشی با آسکوربات به طور معنی‌داری آن را کاهش داد. محلول-پاشی آسکوربات تنها در تیمار 200 میکرومولار سرب سبب افزایش آب نسبی برگ شد، در حالی که این غلظت از سرب وقتی به تنهایی استفاده شد، اختلافی با شاهد نشان نداد (جدول ۳). بررسی عملکرد نیام نشان داد که تنها غلظت بالای سرب در عدم حضور آسکوربات سبب کاهش عملکرد نیام شد، به طوری که کم‌ترین عملکرد در این تیمار مشاهده گردید. نقش آسکوربات در این سطح از سرب محسوس بود و همان گونه که در جدول ۳ مشاهده می‌گردد، محلول‌پاشی آسکوربات تنها در غلظت 400 میکرومولار سرب سبب افزایش معنی‌دار در عملکرد نیام گردید و شرایط عادی را در گیاه ایجاد کرد. بررسی سطوح مختلف فلز سنگین نیکل نشان داد که اثر منفی هر دو سطح نیکل در عدم محلول‌پاشی آسکوربات بر عملکرد نیام به یک اندازه بوده است و محلول‌پاشی 20 میلی‌مولار آسکوربات این اثر منفی را کاهش داد و به حد شاهد رساند (جدول ۴).

نتایج به دست آمده از آزمایش جان و همکاران (۲۰۰۹) در کلزا، کاهش رشد و عملکرد، در نتیجه تنش سمیت سرب را تایید می‌کند. نتایج حاصل از مطالعه سانیتا دی تپی و گابریلی (۱۹۹۹) نشان داده است که میزان پراکسیداسیون لیپیدها به علت افزایش مقدار پراکسید هیدروژن در سلول در حضور فلزات سنگین افزایش می‌یابد. این وضعیت سبب بر هم خوردن تعادل آبی و تغذیه‌ای سلول می‌شود که این یکی از مهم‌ترین دلایل کاهش وزن گیاه است. آزدین و همکاران (۲۰۱۱)

جدول ۴- مقایسه میانگین برخی صفات تحت تاثیر محلول پاشی آسکوربات و جذب برگی نیکل

عملکرد پروتئین (کیلوگرم در هکتار)	عملکرد نیام (کیلوگرم در هکتار)	کلروفیل b (میلی گرم در کیلوگرم)	شاخص سطح برگ	تیمارهای آزمایشی	
				سطح نیکل (میکرو مولار)	سطح آسکوربات (میلی مولار)
۱۴۹۶/۳۲ a	۷۳۴۳/۶۱ a	۰/۶۴ b	۰/۹۸ a	صفر	
۱۵۱۱/۷۶ a	۶۲۲۰/۶۲ c	۰/۸۳ a	۰/۸۳ d	۲۰۰	صفر
۱۱۹۶/۲۷ b	۵۹۵۲/۵۸ bc	۰/۵۷ c	۰/۷ d	۴۰۰	
۱۴۱۲/۶۲ ab	۵۸۰۸/۹۱ c	۰/۶۶ b	۰/۷۸ c	صفر	
۱۶۸۷/۴۶ a	۶۶۱۶/۷۷ ab	۰/۵۶ c	۰/۷۶ c	۲۰۰	۲۰
۱۶۴۱/۲۷ a	۷۱۱۶/۱۹ a	۰/۶۳ b	۰/۹ b	۴۰۰	

حروف غیر مشترک در هر ستون بیانگر وجود اختلاف معنی دار است.

فلزات سنگین باشد. دلیل دیگر برای کاهش میزان پروتئین بر اثر تنش نیکل می‌تواند پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی و هم‌چنین، تخریب پروتئین‌ها ناشی از افزایش انواع اکسیژن فعال طی تنش فلزات سنگین باشد (دیویس و همکاران، ۱۹۸۷) یا می‌تواند به دلیل افزایش فرآیند تجزیه پروتئین و در نتیجه، افزایش فعالیت پروتئاز باشد که تحت تنش فلزات سنگین افزایش می‌یابد (پالما و همکاران، ۲۰۰۲).

نتیجه‌گیری کلی

به طور کلی، نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهد که تنش سرب و نیکل رشد و بسیاری از جنبه‌های فیزیولوژیک گیاه را تحت تاثیر قرار می‌دهد. افزایش غلظت سرب موجب بالا رفتن میزان سرب در برگ شد. با این وجود، محلول پاشی آسکوربات موجب کاهش قابل توجه اثرات منفی ناشی از سرب برگ گردید. آسکوربات سبب بهبود صفات مهمی از جمله عملکرد نیام سبز، عملکرد پروتئین و میزان کاروتنوئید شد که به احتمال زیاد با بهبود توان آنتی‌اکسیدانتی، منجر به افزایش توان سازگاری گیاهان در شرایط تنش شده است.

در اثر متقابل آسکوربات و نیکل نیز مشاهده گردید که محلول پاشی آسکوربات در غلظت ۴۰۰ میکرومولار نیکل موجب بهبود در عملکرد پروتئین گردید، به ویژه زمانی که غلظت بالای نیکل منجر به کاهش قابل توجه در عملکرد پروتئین شده بود، محلول-پاشی با آسکوربات این صفت را به طور معنی‌داری افزایش داد و به حد شاهد رساند. به جز ترکیب تیماری نیکل ۴۰۰ میکرومولار × اسید آسکوربیک صفر که کمترین مقدار را دارا بود، بین سایر ترکیب‌های تیماری اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (جدول ۴).

اینگل و همکاران (۲۰۰۵) با بررسی گیاه *Alyssum lesbiacum* L. پس از تیمار با نیکل، تغییراتی در پروتئین‌های شوک حرارتی، تعدادی از پروتئین‌های متابولیسم گوگرد که در بیوستنز سیستمین و گلوکاتایون نقش دارند و یا در پروتئین‌های مسوول محافظت در برابر گونه‌های فعال اکسیژن مشاهده کردند.

مطالعات کاستا و اسپیتز (۱۹۹۷) کاهش در میزان پروتئین را تحت تنش فلزات سنگین در *Lupinus albus* نشان داد. کاهش پروتئین می‌تواند به دلیل اختلال در متابولیسم نیتروژن در گیاهان تیمار شده با مقادیر زیاد

منابع

- اسدی کاوان، ژ.، قربانلی، م.، ساطعی، آ. ۱۳۸۸. اثر تنش خشکی و آسکوربات خارجی بر روی رنگیزه‌های فتوسنتزی، فلاونوئیدها، ترکیب‌های فنلی و میزان پراکسیداسیون لیپیدی در گیاه انیسون (*Pimpinella anisum* L.). نشریه تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران. ۶(۴): ۴۵۶-۴۶۹.

- ایرانبخش، ع.، مجد، ا.، نقوی، ف. ۱۳۸۹. بررسی تاثیر کلرید روی و کلرید سرب بر جوانه‌زنی و رشد دانه‌رست‌های سویا (*Glycine max L.*) فصلنامه پژوهش‌های گیاهی. ۲۰(۴): ۶۳-۷۳.
- چاپار زاده، ن.، قدرتی، م. ۱۳۹۰. کاهش اثرات اکسیداتیو تنش مس به وسیله آسکوربیک اسید در پیاز. اولین همایش ملی گیاه پالایی ایران. کرمان.
- خطیب، م.، راشد محصل، م.ح.، گنجعلی، ع.، لاهوتی، م. ۱۳۸۷. تاثیر غلظت‌های مختلف نیکل بر خصوصیات مورفوفیزیولوژیکی گیاه جعفری (*Petroselinum crispum*). مجله پژوهش‌های زراعی ایران. ۲۶(۲): ۲۹۵-۳۰۲.
- Adam, T., Nilesh, R., Sharma, C., Sahi, S.V., Singh, S.R., Sajwan, K.S. 2006. Effects of lead and chelators on growth, photosynthetic activity and Pb uptake in *Sesbania drummondii* grown in soil. *Environ Poll.* 144: 11-18.
- Amoli, M.M., Moosavizade, R., Larijani, B. 2005. Optimizing conditions for rat pancreatic islets isolation. *Cytotechnol.* 48:75-78.
- An, Y.J., Kim, Y.M., Kwon, T.I., Jeong, S.W. 2004. Combined effect of copper, cadmium, and lead upon *Cucumis sativus* growth and bioaccumulation. *Sci Total Environ.* 326: 85-93.
- Azmat, R., Haider, S., Askari, S. 2006. Phytotoxicity of Pb I: Effect of Pb on germination, growth, morphology and histomorphology of *Phaseolus mungo* and *Lens culinaris*. *Pak J Biol Sci.* 9: 979-984.
- Azzedine, F., Cherroucha, H., Baka, M. 2011. Improvement of salt tolerance in durum wheat by ascorbic acid application. *J Stress Physiol Biochem.* 7: 27-37.
- Baycu, G., Doganay, T., Hakan, O., Sureyya, G. 2006. Ecophysiological and seasonal variations in Cd, Pb, Zn, and Ni concentrations in the leaves of urban deciduous trees in Istanbul. *Environ Poll.* 143:545-554.
- Beebe, S., McClafferty, B. 2006. Biofortified bean. Centro Agronomic Tropical (CIAT)- Cali, Colombia. 2p. In: www.harvestplus.org/pdfs/bean.pdf.
- Costa, G., Spitz, E. 1997. Influence of cadmium on soluble carbohydrates, free amino acids, and protein content of *in vitro* cultured *Lupinus albus*. *Plant Sci.* 128: 131-140.
- Davies, C.S., Nielsen S.S., Nielsen, N.C. 1987. Flavor improvement of soybean preparations by genetic removal of lipoxygenase. *J Ame Oil Chem Soc.* 64: 1428-1433.
- El-Tayeb, M., El-Enany, A. 2006. Salicylic acid-induced adaptive response to copper stress in sunflower (*Helianthus annuus L.*). *Plant Growth Regul.* 50: 191-199.
- Fontes, R.L.S., Cox, F.R. 1998. Zinc toxicity in soybean grown at high iron concentration in nutrient solution. *Crop Sci.* 21:1723-1730.
- Gaspar, G.M., Anton, A. 2002. Heavy metal uptake by two radish varieties, Hungarian congress on Plant Physiol. 46 (34):113-114.
- Han, W.Y., Shi, Y.Z., Ma, L.F., Ruan, J.Y., Zhao, F.J. 2007. Effect of liming and seasonal variation on lead concentration of tea plant (*Camellia sinensis L.*)(O. Kuntze). *Chemosphere.* 66: 84-90.
- Hendawy, S.F., Ezz EL-Din, A.A. 2010. Growth and yield of *Foeniculum vulgare* (var azoricum) as influenced by some vitamins and amino acids. *Ozean J App Sci.* 3(1): 113-123.
- Horemans, N., Foyer, C.H., Potters, G., Asard, H. 2000. Ascorbate function and associated transport system in plants. *Plant Physiol Biochem.* 38: 531-541
- Ingle, R.A., Smith, J.A.C., Sweetlove, L.J. 2005. Responses to nickel in the proteome of the hyper accumulator plant *Alyssum lesbiacum*. *BioMetals.* 18: 627-641.
- John, R., Ahmad, P., Gadgil, K., Sharma, S. 2009. Heavy metal toxicity: Effect on plant growth, biochemical parameters and metal accumulation by *Brassica juncea L.* *J Plant Prod.* (3):1735-8043.
- Kamel, H.A. 2008. Lead accumulation and its effect on photosynthesis and free amino acids in *Vicia faba* grown hydroponically. *Aust J Basic App Sci.* 2(3): 438-446.
- Lawlor, D.W., Cornic, G. 2002. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant Cell Environ.* 25: 275-294.
- Levan, A. 1945. Cytological reaction induced by inorganic salt solutions. *Nature.* 156: 751.
- Merian, E., Anke, M., Ichnat, M., Stoepler, M. 2004. Elements and their Compounds in the Environment, 2nd ED, WILEY-VCH verlag GmbH & Co. KGaA, weinheim. 279p.
- Muller-Moule, P., Conklin, P., Niyogi, K. 2002. Ascorbate deficiency can limit Violaxanthin de-epoxidase activity in vivo. *Plant Physiol.* 128: 970-977.
- Oncel, I., Keles, Y., Ustun, A. S. 2000. Interactive effects of temperature and heavy metal stress on the growth and some biochemical compounds in wheat seedlings. *Environ Poll.* 107: 315-320.
- Palma, J.M., Sandalio, L.M., Corpas, F.J., Romero-Puertas, M.C., McCarthy, I., del Rfo. L.A. 2002. Plant proteases protein degradation and oxidative stress: Role of peroxisomes. *Plant Physiol Biochem.* 40:521-530.
- Piechalak, A., Tomaszewska, B., Baralkiewicz, D., Malecka, A. 2002. Accumulation and detoxification of lead ions in legumes. *Phytochem.* 60: 153-162.
- Prochazka, S., Machaackova, I., Kreekule, J., Sebanek, J. 1998. Plant physiology. Academia. Praha. 484 PP.
- Sanita di Toppi, L., Gabbrielli, R. 1999. Response to cadmium in higher plants. *Environ Exp Bot.* 41:105-130.

- Sarvari, E., Gaspar, L., Fodor, L., Cseh, E., Kropfl, K., Varga, A., Baron, M. 2002. Comparison of the effects of Pb treatment on thylakoid development in poplar and cucumber plants. *Acta Biologica Szeged*. 46: 163-165.
- Shalata, A., Neumann, P.B. 2001. Exogenous ascorbic acid (vitamin C) increases resistance to salt stress and reduces lipid peroxidation. *J Exp Bot*. 52:2207-2211.
- Sharma, P., Dubey, R. S. 2005. Lead toxicity in plants. *Braz J Plant Physiol*. 17: 35-52.
- Shimada, N., Ando, T., Tomiyama, M., Kaku, H. 1980. Role of nickel in plant nutrition. I. Effects of nickel on growth of tomato and soybean. *Nippon Dojo Hiriyogaku Zasshi*. 51:487-492.
- Skryptez, S. 2004. Dry pea situation and outlook. Agriculture and agri-food Canada, market analysis division. *Biweekly Bulletin*, 17:1-10.
- Witt-claus, P., Tiller-sarah, A., Talor-Mark, A., Davieshoward, V. 2002. Addition of nickel to Murashige and Skoog medium in plant tissue culture activates urease and may reduce metabolic stress. *Plant Cell Tissue Organ Cult*. 68:103-104.
- Zho, J.K. 2002. Salt and drought stress signal transduction in plant. *Ann Rev Plant Physiol*. 53:247-278.

Effect of Ascorbate Foliar Application on Yield and Some Physiological Traits of Green Bean Subjected to Lead and Nickel Foliar Absorption

Zahra Mohammad Khani¹, Mehdi Baradaran Firouzabadi², Mahdie Parsaeiyan³, Hadi Ghorbani⁴

1. M.Sc in Agronomy, Shahrood University, Semnan, Iran.
 2. Assist. Prof., Faculty of Agriculture, Shahrood University, Semnan, Iran.
 3. Assist. Prof., Faculty of Agriculture, Shahrood University, Semnan, Iran.
 4. Assoc. Prof., Faculty of Agriculture, Shahrood University, Semnan, Iran.
- *for Correspondence: Zmohammadkhani85@yahoo.com

Received: 16.11.14

Accepted: 10.02.15

Abstract

The heavy metals are as important environmental pollutants which are originated from industrial and agricultural activities. Lead and nickel are such pollutants with detrimental effects on living organisms like plants. For this purpose, a factorial field experiment was carried out based on randomized complete block design with three replications in Shahrood University to evaluate the effects of heavy metals (present in acid rain) on green beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and the reduction of injuries by ascorbate foliar application. Treatments were three levels of nickel (0, 200 and 400 mM) as the first factor, three levels of lead (0, 200 and 400 mM) as the second factor and two levels of ascorbate foliar application (0 and 20 mM) as the third factor. Results showed that high lead concentration (400 mM) without ascorbate increased 3% in the leaf relative water content. Nickel and lead caused to increase in chlorophylls and decrease in carotenoid content, protein and pod yield. Ascorbate foliar application improved 23% in carotenoids, 34% in protein yield, leaf area index and improved 9% in pod yield. Generally, according to the results, it can be inferred that foliar application of ascorbate in plants exposed to acid rain containing heavy metals especially nickel, can reduce the damages to plants and even causes to produce more healthier food.

Key words: Carotenoid, chlorophyll, heavy metals, pod yield, protein.