University of Birjand

Journal homepage:
https://escs.birjand.ac.ir

تنشهای محیطی در علوم زراعی
Environmental Stresses In Crop Sciences

Vol. 17, No. 2, pp. 303-318 (Summer 2024)

https://dx.doi.org/10.22077/ESCS.2023.5770.2174

Original article

The effect of EDTA on the growth and phytoremediation capacity of nickel in pot marigold (*Calendula tripterocarpa* Rupr.)

R. Amooaghaie[1, 2*], J. Heidari[1], Sh. Kiani[3]

1. Plant Biology Department, Faculty of Science, Shahrekord University, Shahrekord, Iran
2. Biotechnology Research Institute, Shahrekord University, Shahrekord, Iran
3. Soil Science and Engineering Department, Faculty of Agriculture, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

Received 10 November 2022; Accepted 20 December 2022

Extended abstract

Introduction

Nickel (Ni) is an essential micronutrient required for optimal plant growth and development, but excessive Ni is toxic and threatens plant growth and productivity as well as human health. The removal of Ni from soil through phytoextraction is an ecofriendly technique for heavy metal remediation. But low bioavailability of metals in soil is often a limiting factor in phytoextraction. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) is recognized as a highly effective chelate that can increase soil mobility and uptake and translocation of heavy metals in plants. However, its long soil persistence time and its resistance to breakdown by soil microorganisms limits its efficiency for phytoremediation. The objective of this study was the evaluation of the effects of various concentrations of EDTA on the bioavailability of Ni in soil and the phytoremediation capacity of Ni in *Calendula tripterocarpa* plant.

Materials and methods

In this study, the effect of different concentrations of EDTA (0, 0.5, 1, 2 g kg^{-1} soil) was investigated on Calendula tripterocarpa exposed to various concentrations of nickel (0, 100, 150 mg/kg). The experiment was conducted in a completely randomized design with factorial arrangement with three replications in greenhouse. To stabilize Ni in soil, repeated cycles of saturation with distilled water was performed for 20 days. Then, EDTA was added to soil 15 days before cultivation. Seeds were sown in pots and plants grown in pots without EDTA and nickel was considered as control. After, 45 days, plants were harvested and fresh and dry weights of shoot and roots, the content of chlorophyll *a*, *b* (Chl *a*, Chl *b*), malondialdehyde (MDA) content, Ni concentration in shoot and roots, and available nickel of soil was measured and bioaccumulation factor (BAF), translocation factor and total Ni removal per pot were computed for All treatments.

Results and discussion

The results revealed that with increasing nickel concentration, the growth parameters and content of Chl *a*, Chl *b* significantly reduced but the content of MDA in roots increased in comparison to the control. In non-stress condition, applying concentration of 1 and 2 g kg^{-1} EDTA reduced the growth parameters and content of Chl *a*, Chl *b* while increased MDA content in roots. These results indicate the toxicity of higher dose of EDTA for Calendula tripterocarpa plants. Under 100 and 150 mg kg^{-1} Ni in soil, applying 0.5 g kg^{-1} EDTA, increased nickel concentration in the aerial parts (65 and 60.35%) and roots (35 and

* Corresponding author: Rayhaneh Amooaghaie; E-Mail: rayhanehamooaghaie@yahoo.com

© 2024, The Author(s). Published by University of Birjand. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0).

29.44%), translocation factor (22.5 and 25.20%) and total Ni removal per pot (27.66 and 23.44%). Interestingly, the application of 1 and 2 g kg^{-1} EDTA, decreased available nickel concentration in soil as well as nickel concentration in roots and shoots and translocation factor in plants. In addition, these concentrations of EDTA considerably decreased the biomass of plants and consequently reduced total Ni removal per pot.

Conclusion

It can be concluded that application of 0.5 g kg^{-1} EDTA enhanced phytoremediation capacity of Calendula tripterocarpa. In contrast, higher concentrations of EDTA decreased available nickel concentration in soil and due to decreasing biomass and Ni concentration in roots and shoots, reduced total Ni removal per pot and impaired phytoextraction efficiency of Calendula tripterocarpa.

Keywords: Available nickel of soil, Bioaccumulation factor, Chlorophyll, Total Ni removal, Translocation factor

تنش‌های محیطی در علوم زراعی
Environmental Stresses in Crop Sciences
جلد هفدهم، شماره دوم، تابستان ۱۴۰۳

https://dx.doi.org/10.22077/ESCS.2023.5770.2174

مقاله پژوهشی

اثر اتیلن دی‌آمین ترا استیک اسید (EDTA) بر رشد و ظرفیت گیاه‌پالایی نیکل در گیاه همیشه-بهار (*Calendula tripterocarpa* Rupr.)

ریحانه عموآقایی[۲،۱*]، جواد حیدری[۱]، شهرام کیانی[۳]

۱. استاد تمام فیزیولوژی گیاهی، عضو پژوهشکده بیوتکنولوژی و گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم، دانشگاه شهرکرد
۲. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد فیزیولوژی گیاهی، گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم، دانشگاه شهرکرد
۳. گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد

مشخصات مقاله

واژه‌های کلیدی:
برداشت کل نیکل
فاکتور انتقال
فاکتور تجمع زیستی
کلروفیل
نیکل قابل‌جذب خاک

تاریخ دریافت:
۱۴۰۱/۰۸/۱۹

تاریخ پذیرش:
۱۴۰۱/۰۹/۲۹

تاریخ انتشار:
تابستان ۱۴۰۳

۳۱۸-۳۰۳ : ۱۷(۲)

چکیده

کاربرد کلات‌هایی مانند اتیلن دی‌آمین ترا استیک اسید (EDTA) ممکن است به افزایش برداشت فلز از خاک به‌وسیله گیاه‌پالایی کمک کند. در این مطالعه، اثر سطوح مختلف EDTA (۰، ۰/۵، ۱، ۲ گرم بر کیلوگرم خاک) و نیکل (۰، ۱۰۰، ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک) بر گیاهان همیشه‌بهار در یک آزمایش فاکتوریل با طرح کاملاً تصادفی بررسی شد. نتایج نشان داد که تحت شرایط بدون تنش نیکل، کاربرد غلظت‌های ۱ و ۲ گرم در کیلوگرم EDTA، پارامترهای رشد و محتوای کلروفیل a و b را کاهش و محتوای مالون‌دی‌آلدئید ریشه را افزایش داد که نشانه سمیت EDTA بود. در سطوح ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نیکل، افزودن ۰/۵ گرم در کیلوگرم EDTA، اثر معنی‌داری بر فاکتور تجمع زیستی نیکل در بخش هوایی و ریشه نداشت اما غلظت نیکل در بخش هوایی (۶۵ و ۶۰/۳۵ درصد) و ریشه (۳۵ و ۲۹/۴۴ درصد)، فاکتور انتقال نیکل (۲۲/۵ و ۲۵/۲۰ درصد) و میزان برداشت کل نیکل در هر گلدان (۲۷/۶۶ و ۲۳/۴۴ درصد) را افزایش داد. در مقابل در غلظت‌های بالاتر EDTA، محتوای نیکل قابل‌جذب خاک و در نتیجه جذب نیکل در گیاه کاهش یافت. به‌طوری‌که در سطوح ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نیکل، با کاربرد غلظت ۲ گرم در کیلوگرم EDTA، غلظت نیکل در بخش هوایی و ریشه گیاه تفاوت معنی‌داری با شاهد این گروه‌ها نداشت و با توجه به این‌که زیست‌توده کل (وزن خشک ریشه+ بخش هوایی) هم در این غلظت EDTA تقریباً نصف شد، میزان برداشت کل نیکل در هر گلدان در این تیمارها به ترتیب ۲/۶۳ و ۲/۷۲ برابر نسبت به شاهد این گروه‌ها کاهش یافت؛ بنابراین غلظت ۰/۵ گرم در کیلوگرم EDTA ظرفیت گیاه‌پالایی گیاه را به‌طور معنی‌داری افزایش داد اما کاربرد غلظت‌های ۱ و ۲ گرم در کیلوگرم EDTA، برای بهبود توان حذف نیکل از خاک توسط گیاه همیشه‌بهار مفید نبود.

مقدمه

زندگی مدرن شهری، کاربرد کودها و مواد شیمیایی در کشاورزی و فعالیت‌های صنعتی، موجب آلودگی محیط‌زیست به فلزات سنگین شده است. آلودگی خاک‌های کشاورزی به فلزات سنگین نه‌تنها رشد و عملکرد گیاهان را کاهش می‌دهد بلکه از طریق زنجیره غذایی سلامت انسان و حیات‌وحش را نیز به مخاطره می‌اندازد (Mahar et al., 2016). خاک‌های برخی نقاط ایران از نوع خاک‌های سرپنتینی حاصل از سنگ-های اولترامافیک است که معمولاً دارای سطوح بالایی از نیکل (معمولاً در محدوده ۳ - ۰/۱ درصد) می‌باشند و میزان زیاد نیکل در این خاک‌ها یک عامل زیست‌محیطی بازدارنده رشد گیاهان است (Mohammadpour et al., 2016). علاوه بر این، نیکل از طریق دخالت انسان مانند استفاده از کودها، پساب‌ها و آفت‌کش‌ها، زباله کارخانه‌های متالورژی، تولید سیمان و سوزاندن سوخت‌های مایع و جامد به خاک بسیاری از مناطق وارد می‌شود. به همین دلیل افزایش تجمع نیکل در خاک و اثرات مضر آن بر سلامتی گیاهان، جانوران و

* نگارنده پاسخگو: ریحانه عموآقایی. پست الکترونیک: rayhanehamooaghaie@yahoo.com

انسان‌ها به یک معضل جهانی تبدیل شده است (Hassan et al., 2019).

اگرچه نیکل در برخی فعالیت‌های متابولیکی نقش دارد و در مقادیر کم برای گیاهان موردنیاز است، ولی میزان زیاد آن، اثرات مضر بر فیزیولوژی گیاهان داشته و عوارض سمیت مانند کاهش رشد، زردبرگی و بافت‌مردگی در گیاه ایجاد می‌کند (Hassan et al., 2019; Valivand and Amooaghaie, 2021). به‌طورکلی، سطح سمیت بحرانی نیکل برای گیاهان در گونه‌های حساس، گونه‌های با تحمل متوسط و در گیاهان بیش‌اندوز[1] نیکل، به ترتیب بیش از ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن خشک گزارش شده است (Vischetti et al., 2022).

با توجه به سمیت فلزات سنگین برای موجودات زنده، تاکنون روش‌های شیمیایی مختلفی برای حذف آن‌ها از خاک بکار برده شده است؛ اما چون این شیوه‌ها پرهزینه بوده و به آلودگی ثانویه خاک منجر می‌شوند، در سال‌های اخیر، «گیاه‌پالایی» به‌عنوان یکی از روش‌های بهینه و سازگار با محیط‌زیست مورد توجه قرار گرفته است. در گیاه‌پالایی، گیاهان بیش‌اندوز فلزات سنگین در نواحی آلوده کشت می‌شوند و با برداشت این گیاهان، فلزات انباشته در بخش هوایی آن‌ها از خاک‌های کشاورزی حذف می‌شود (Mahar et al., 2016). شرط لازم برای اینکه یک گونه گیاهی به‌عنوان یک گونه بیش‌اندوز نیکل در نظر گرفته شود آن است که میزان انباشت نیکل در بخش هوایی فراتر از ۱۰۰۰ میکروگرم نیکل در گرم وزن خشک گیاه باشد (Vischetti et al., 2022). همچنین برای شناسایی گیاهان بیش‌اندوز فلزات سنگین از دو کمیت فاکتور تجمع زیستی و فاکتور انتقال استفاده می‌شود. فاکتور تجمع زیستی بیانگر توان جذب فلز از خاک و ورود آن به ریشه گیاه است و فاکتور انتقال معرف نسبت انتقال فلز از ریشه به بخش هوایی گیاه است. گیاهانی که دارای فاکتور انتقال و فاکتور تجمع زیستی بیشتر از ۱ باشند به‌عنوان گیاهان انباشتگر فلزات سنگین شناخته می‌شوند (Ali et al., 2013). به‌هرحال تعداد گیاهان بیش‌اندوز محدود بوده و اغلب به دلیل رشد کند و زیست‌توده[2] کم، تأثیر چشمگیری در کاهش آلودگی فلزات خاک در کوتاه‌مدت ندارند. لذا برخی محققان سعی می‌کنند با استفاده از شیوه‌های مختلف، ظرفیت تجمع فلز در گیاهان سریع‌الرشدی که زیست‌توده خوبی تولید می‌کنند و تحمل نسبتاً خوبی به فلزات سنگین دارند را افزایش بدهند تا بتوان از آن‌ها در برنامه‌های گیاه‌پالایی سود برد (Bian et al., 2018).

به دلیل اتصال قوی فلزات سنگین با اجزای مختلف خاک، حتی در خاک‌های آلوده تنها میزان محدودی از این فلزات در دسترس گیاه هستند. بنابراین، کاربرد برخی از ترکیبات کلات‌کننده مصنوعی، مانند EDTA، DTPA و EGTA برای افزایش آزاد شدن فلزات سنگین از ذرات خاک و تقویت جذب آن‌ها به‌وسیله گیاهان پیشنهاد شده است (Shahid et al., 2014). یکی از کلات‌های متداول از گروه کربوکسیلیک اسیدها، اتیلن دی‌آمین تترا استیک اسید (EDTA) است که دارای دو عامل آمین و چهار گروه کربوکسیلات بوده و قادر به تشکیل کمپلکس قوی با فلزات است. ازآنجاکه پیوندهای بین فلز و اکسیژن در ساختار مواد معدنی ضعیف‌تر از پیوند بین فلزات و EDTA است، پیشنهاد شده است که یون‌های فلزی به سهولت از ذرات خاک آزاد و جذب EDTA می‌شوند؛ بنابراین، EDTA در افزایش تحرک و دسترسی فلزات سنگین در خاک تأثیر زیادی دارد و به همین دلیل کاربرد این ماده در برنامه‌های گیاه‌پالایی موردتوجه قرار گرفته است (Bian et al., 2018). برای مثال توحیدی و همکاران (Tohidi et al., 2019) گزارش کردند کاربرد ۱ گرم EDTA در کیلوگرم خاک، تجمع سرب در گیاه ذرت را در حد چشمگیر و معنی‌داری افزایش داد. تحقیقات دیگر هم نشان داد افزودن EDTA به خاک، موجب حلالیت و رهایی بیشتر فلزات سنگین در محلول خاک شده و تجمع نیکل در خردل هندی (Kaur et al., 2019)، محتوای سرب در نوعی گیاه علفی (Hart et al., 2022) و میزان کادمیوم، مس، روی و سرب در مزوبامبو (Zhang et al., 2018) را افزایش داد.

میزان اثر EDTA بر تحرک و حلالیت فلزات در خاک و تجمع آن‌ها در گیاه، به عوامل مختلفی مانند نوع فلز، غلظت فلز، گونه‌های گیاهی، بافت خاک، شرایط بیولوژیک و میکروبی خاک و غلظت و شیوه استفاده از EDTA بستگی دارد (Shahid et al., 2014). برای مثال تریک و اشرف (Tariq and Ashraf, 2016) با بررسی اثر EDTA بر توان گیاه‌پالایی فلزات سنگین در چندین گیاه گزارش کردند کاربرد EDTA تقریباً هیچ اثری روی تجمع زیستی نیکل در نخودفرنگی نداشت امّا به‌طور فوق‌العاده تجمع زیستی کروم

[1] Hyperaccumulator

[2] Biomass

در این گیاه را افزایش داد. این محققان همچنین دریافتند که کاربرد EDTA فاکتور تجمع زیستی برای عناصر Cd، Co، Ni و Cr را در گیاه *Brassica campestris* L. و تجمع زیستی همه فلزات مورد آزمایش را در گیاه ذرت افزایش داد اما در آفتابگردان موجب کاهش فاکتور تجمع زیستی Pb، Ni و Cr شد. غلظت EDTA استفاده‌شده نیز بر میزان تجمع فلزات در گیاه تأثیر دارد. سطوح بالای EDTA ممکن است باعث جذب بیش‌ازحد فلزات سنگین توسط گیاه و ایجاد آثار سمیت فلز در گیاه شوند (Bian et al., 2018). برای مثال یک مطالعه نشان داد که کاربرد EDTA جذب و تجمع نیکل، سرب و کادمیوم در گیاهان زراعی گندم، ذرت، جو، باقلا، پنبه و آفتابگردان را افزایش داد ولی چون EDTA به‌شدت اثر منفی بر رشد بخش هوایی و ریشه داشت، درنهایت میزان کل برداشت فلز توسط این گیاهان را کاهش داد (Eissa et al., 2014). علی و چادهوری (Ali and Chaudhury, 2016) هم گزارش کردند که کاربرد EDTA تحرک کادمیوم، روی، مس و سرب را در خاک و تجمع این فلزات سنگین در گیاه گل‌جعفری[1] افزایش داد و بیشترین مقادیر فاکتور انتقال و فاکتور تجمع زیستی این فلزات سنگین در گیاه مذکور با مصرف ۱۵ میلی‌مول EDTA در کیلوگرم خاک حاصل شد اما در این سطح EDTA، زیست‌توده و در نتیجه میزان برداشت کل فلز به‌طور چشمگیری کاهش یافت. بنابراین، محققان مذکور استفاده از غلظت ۵ میلی‌مول EDTA در کیلوگرم خاک را برای بهبود گیاه‌پالایی توصیه کردند. چون در این غلظت با حفظ زیست‌توده، برداشت فلز بیشتری از خاک انجام می‌شد. از سوی دیگر، سطوح بالای EDTA می‌تواند باعث تغییر خواص فیزیکی و ویژگی‌های شیمیایی خاک، آسیب به جمعیت میکربی و افزایش میزان آبشویی فلزات خاک و آلودگی آب‌های زیرزمینی شود (Bian et al., 2018; Bareen et al., 2019; Krujatz et al., 2012).

گیاه همیشه‌بهار یک گیاه زینتی است که گونه‌های مختلف آن تند رشد بوده و دارای زیست‌توده نسبتاً مطلوبی هستند و توان خوبی در تحمل فلزات سنگین دارند. برای مثال صفاری و صفاری (Saffari and Saffari, 2020) در بررسی ظرفیت گیاه‌پالایی کادمیوم در همیشه‌بهار (گونه *Calendula officinalis* L.) دریافتند که فاکتور تجمع و انتقال کادمیوم در این گیاه همواره بالاتر از ۱ بوده که نشان داد این گیاه یک انباشتگر کادمیوم است. بر اساس اطلاعات فوق، فرض شد که گونه‌های دیگر همیشه‌بهار نیز برای گیاه‌پالایی مفید باشند و کاربرد EDTA بتواند توان انباشتگری فلزات سنگین در این گیاه را تحت تأثیر قرار دهد. لذا در پژوهش حاضر تأثیر EDTA بر رشد و ظرفیت گیاه‌پالایی نیکل در گونه *Calendula tripterocarpa* Rupr. موردبررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

برای بررسی اثر EDTA بر رشد و ظرفیت گیاه‌پالایی نیکل یک گونه همیشه‌بهار، یک آزمایش گلدانی در سال ۱۳۹۵ در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه شهرکرد انجام شد. برای این منظور ابتدا خاک از یک منطقه بکر و غیرآلوده به فلز از سودجان در استان چهارمحال و بختیاری تهیه و برخی ویژگی‌های آن تعیین شد. بافت خاک به روش هیدرومتر (Gee and Bauder, 1986)، درصد کربن آلی به روش اکسایش تر (Nelson and Sommers, 1996)، نیتروژن کل به روش کلدال (Mulvaney, 1996)، pH و قابلیت هدایت الکتریکی در عصاره گل اشباع با استفاده از دستگاه pH متر (Thomas, 1996) و هدایت‌سنج الکتریکی (Rhodes, 1996) اندازه‌گیری شد. فسفر قابل‌جذب خاک با عصاره‌گیر بی‌کربنات سدیم ۰/۵ مولار (Olsen and Sommers, 1982)، پتاسیم قابل‌جذب با عصاره‌گیر استات آمونیوم یک مولار (Knudsen et al., 1982) و آهن، مس، روی و نیکل قابل‌جذب با عصاره‌گیر DTPA-TEA (Lindsay and Norvell, 1978) استخراج و اندازه‌گیری شدند.

نتایج نشان داد این خاک دارای بافت لوم‌رسی و مشخصات شیمیایی آن به شرح جدول ۱ بود.

گلدان‌ها با خاک مذکور و شن به نسبت ۴ به ۱ پر شد. سپس با افزودن محلول نمک نیترات نیکل ($Ni(NO_3)_2$, 6 H_2O, Merck)، مقدارهای مختلف نیکل (صفر، ۱۰۰، ۱۵۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم خاک) به خاک گلدان‌ها اضافه شد و گلدان‌ها به مدت‌زمان ۲۰ روز در گلخانه تحت دوره‌های متناوب خشکی و رطوبت نگهداری شدند تا نیکل در خاک تثبیت شود. سپس طبق طرح آماری به خاک گلدان‌ها، مقادیر صفر، ۰/۵، ۱، ۲ و ۴ گرم در هر کیلوگرم خاک نمک اتیلن دی‌آمین ترا استیک اسید دی‌سدیم (EDTA-Na_2,

[1] Tagetes Spp.

Sigma-Aldrich) افزوده شد و تثبیت کلات EDTA در خاک نیز به مدت‌زمان ۱۵ روز انجام شد. لازم به ذکر است که چون با کاربرد ۴ گرم EDTA در کیلوگرم خاک گیاهان در همان مراحل اولیه از بین رفتند، این غلظت در آنالیزهای آماری برای صفات گیاهی حذف شد. اما آبیاری گلدان‌های بدون گیاه نیز مشابه سایر گلدان‌ها برای بررسی اثرات EDTA در خاک بدون گیاه تا پایان آزمایش ادامه یافت.

جدول ۱. مشخصات خاک مورد استفاده در این آزمایش قبل از اعمال تیمارها

Table 1. Characteristics of applied soil in this experiment before applying treatments.

Ni	B ava.	Cu ava.	Fe ava.	Zn ava.	K ava.	P ava.	Total N	O.C	pH	E.C
	----------mg.kg^{-1}----------						------%------			ds.m^{-2}
0.99	2.91	1.77	9.65	0.96	>1000	66.1	0.124	0.956	7.81	0.586

بذرهای گونه *Calendula tripterocarpa* Rupr. از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شد و با هیپوکلریت سدیم ۵٪ ضدعفونی شده و سپس با آب مقطر ۲ بار شسته و در داخل گلدان‌ها کاشته شدند. آبیاری با فواصل دو روزه و در حدی که مقداری آب از زهکش گلدان‌ها خارج می‌شد، انجام شد. گیاهان در گلخانه با میانگین دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، دوره نوری ۱۰/۱۴ و رطوبت نسبی ۵۰-۶۰ درصد رشد کردند. در پایان گیاهان ۴۵ روزه برداشت و وزن تر ریشه و بخش هوایی گیاهان به‌طور جداگانه تعیین شد. سپس نمونه‌ها خشک شدند و محتوای نیکل ریشه و بخش هوایی در گیاه مطابق روش‌های زیر اندازه‌گیری شد.

برای اندازه‌گیری مقادیر نیکل، ریشه و بخش هوایی گیاهان به قطعات کوچک تقسیم شده و دو مرتبه با آب دیونیزه شسته شدند، سپس نمونه‌ها در کاغذ آلومینیومی پیچیده شد و به مدت ۲۴ ساعت در آون خشک شدند. از هر نمونه ۱/۲ گرم با اسید نیتریک ۶۵ درصد مخلوط شد و حرارت داده شد تا زمانی که محتوای مایع، بخار شد. سپس برای تکمیل هضم پراکسید هیدروژن ۳۰ درصد به رسوب باقیمانده در ارلن‌ها اضافه گردید و مجدداً تا بخار شدن مایع حرارت داده شد. سپس با آب دیونیزه مخلوط و به حجم رسانده شد و مقدار عنصر نیکل در ریشه و بخش هوایی گیاه با دستگاه جذب اتمی Perkin-Elmer مدل AAA400 (ساخت آمریکا) آنالیز گردید (Sekabira et al., 2010). سپس فاکتور تجمع زیستی (BAF) بخش هوایی و ریشه، فاکتور انتقال (TF) و میزان برداشت کل نیکل طبق رابطه‌های زیر محاسبه شد (Heidari et al., 2020).

فاکتور تجمع زیستی ریشه یا شاخساره= غلظت نیکل ریشه یا شاخساره ÷ غلظت نیکل خاک [۱]

فاکتور انتقال= غلظت نیکل در شاخساره ÷ غلظت نیکل در ریشه [۲]

میزان کل برداشت فلز در هر گلدان = غلظت فلز در گیاه × کل زیست‌توده حاصل در هر گلدان [۳]

لازم به ذکر است که چون غلظت نیکل در ریشه و بخش هوایی متفاوت بود، فرمول ۳ برای این دو بخش جداگانه محاسبه و بعد نتایج برای برآورد میزان کل برداشت با هم جمع شده است.

در نمونه‌های برگ تازه، کلروفیل به کمک استون ۸۰٪ استخراج و جذب عصاره حاصل در طول‌موج‌های ۶۴۵ و ۶۶۳ نانومتر خوانش شد. میزان کلروفیل a و b برگ با استفاده از رابطه‌های ۴ و ۵ تعیین شد (Lichtenthaler, 1987).

$$Chlorophyll\ a = ([(12.7 \times D663)-(2.69 \times D654)] \times V)/(1000 \times W) \quad [۴]$$

$$Chlorophyll\ b = ([(22.9 \times D654)-(4.93 \times D663)] \times V)/(1000 \times W) \quad [۵]$$

در این رابطه‌ها V حجم نهایی عصاره برحسب میلی‌لیتر، D جذب نوری و W وزن بافت برحسب گرم است.

برای سنجش پراکسیداسیون لیپیدی غشا، غلظت مالون‌دی‌آلدئید (MDA) در نمونه‌های تازه ریشه، مالون دی-آلدئید با تیوباربیتوریک (TBA) واکنش داد و جذب نوری کمپلکس قرمزرنگ (MDA-TBA) در طول‌موج ۵۳۲ نانومتر به‌وسیله اسپکتروفتومتر (مدل JENWAY 6300) خوانده شد و جذب بقیه رنگیزه‌های غیراختصاصی در ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. درنهایت غلظت MDA با استفاده از تفاضل جذب نوری در دو طول‌موج فوق و ضریب خاموشی

معادل 155 $mM\ cm^{-1}$ محاسبه شد (Heath and Packer 1968).

طرح و آنالیز آماری

این آزمایش به‌صورت فاکتوریل با طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا شد. فاکتورها شامل سه سطح نیکل (صفر، ۱۰۰، ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک) و ۴ سطح EDTA (صفر، ۰/۵، ۱ و ۲ گرم در کیلوگرم خاک) بود. آنالیز آماری داده‌ها با نرم‌افزار SAS و تعیین معنی‌داری اختلاف بین میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

نتایج و بحث

اثر سطوح مختلف نیکل و EDTA بر رشد، محتوای کلروفیل و محتوای مالون دی‌آلدئید

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر مستقل نیکل و EDTA بر وزن تر و خشک ریشه و بخش هوایی، محتوای کلروفیل *a* و *b* برگ و محتوای مالون‌دی‌آلدئید ریشه همیشه‌بهار در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود. اثر متقابل این فاکتورها بر وزن تر بخش هوایی و محتوای کلروفیل *a* در برگ غیرمعنی‌دار بود و بر وزن تر ریشه در سطح احتمال ۵ درصد و بر وزن خشک ریشه و بخش هوایی، محتوای کلروفیل *b* و محتوای مالون‌دی‌آلدئید ریشه در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ۲).

جدول ۲. تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف نیکل و EDTA بر وزن تر و خشک ریشه و بخش هوایی، محتوای کلروفیل *a* و*b* برگ و محتوای مالون‌دی‌آلدئید ریشه همیشه‌بهار

Table 2. The analysis of variance related to the effect of different concentrations of nickel and EDTA on fresh and dry weight of shoots and roots, content of chlorophyll *a*, *b* in leaf and malondealdehyde (MDA) content in roots of pot marigold

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	وزن تر بخش هوایی Shoot dry weight	وزن خشک بخش هوایی Shoot dry weigh	وزن تر ریشه Root dry weigh	وزن خشک ریشه Root dry weigh	کلروفیل *a* Chl. *a* content	کلروفیل *b* Chl. *b* content	مالون‌دی‌آلدئید ریشه MDA content
غلظت نیکل Ni concentration	2	246.31**	5.26**	169.19**	4.64**	46.12**	17.41**	2548.52**
غلظت EDTA EDTA concentration	3	119.16**	4.28**	96.08**	3.17**	10.22**	6.51**	399.42**
EDTA × نیکل EDTA ×Nickel	6	1.77 ns	5.39**	139*	0.28**	ns0.24	7.54**	24.89**
خطا Error	24	0.71	0.03	0.5	0.02	0.18	0.15	2.34

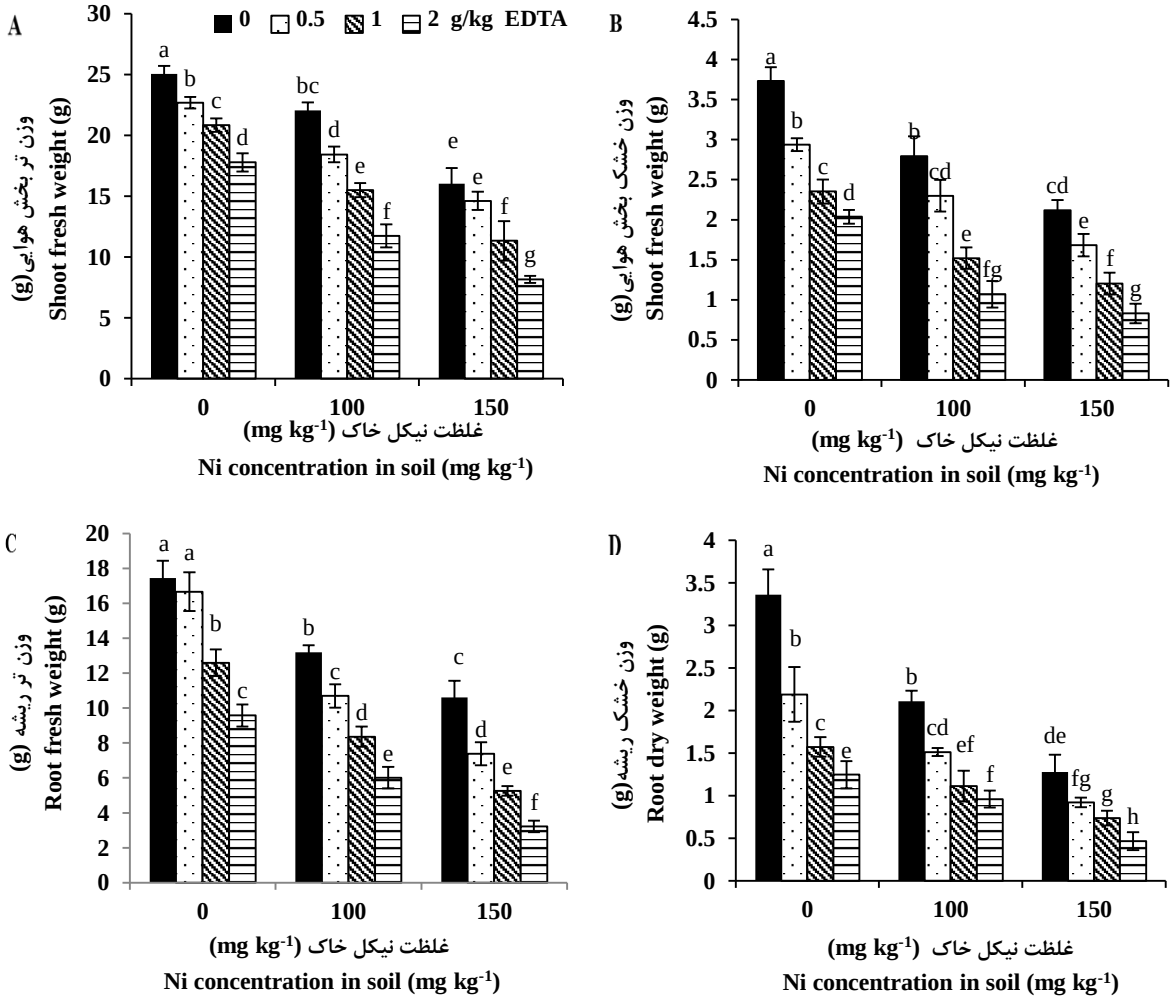
ns، * و ** به‌ترتیب عدم معنی‌داری و معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد

ns, * and, ** show non-significant and significant differences at 5 and 1% probability level, respectively

در تحقیق حاضر با افزودن ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نیکل در خاک، وزن تر و خشک ریشه و بخش هوایی (شکل ۱) و محتوای کلروفیل *a* و *b* برگ (شکل ۲) در حد معنی‌داری کاهش یافت. اگرچه نیکل در مقادیر کم برای رشد گیاهان مفید است اما مقادیر زیاد آن تنش اکسیداتیو و سمیت ایجاد می‌کند که موجب کاهش در وزن خشک و زردبرگی در گیاهان می‌شود (Vischetti et al., 2022; Valivand and Amooaghaie, 2021). علاوه بر این، غلظت‌های سمی نیکل از طریق تحریک چوبی شدن و کاهش انعطاف‌پذیری دیواره‌های سلولی، کاهش سطح جذب‌کننده آب و تغییر در ساختار غشای سلول‌های ریشه، بی‌نظمی در متابولیسم و تقسیم سلولی و تأثیر منفی بر فرآیندهای فیزیولوژیک نظیر تنفس، تعرق و فتوسنتز، رشد گیاه را کاهش می‌دهد (Hassan et al., 2018).

در این مطالعه در شرایط بدون تنش نیکل، با افزایش غلظت EDTA در خاک، وزن تر و خشک بخش هوایی و ریشه همیشه‌بهار نسبت به شاهد هر گروه به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (به‌استثنای اثر غلظت ۰/۵ گرم EDTA بر وزن تر ریشه که معنی‌دار نبود) که مبین اثر سمی سطوح بالای EDTA برای رشد گیاه است (شکل ۱). در سطوح ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نیکل خاک نیز افزودن ۰/۵، ۱ و ۲ گرم بر کیلوگرم EDTA به خاک، رشد بخش هوایی و

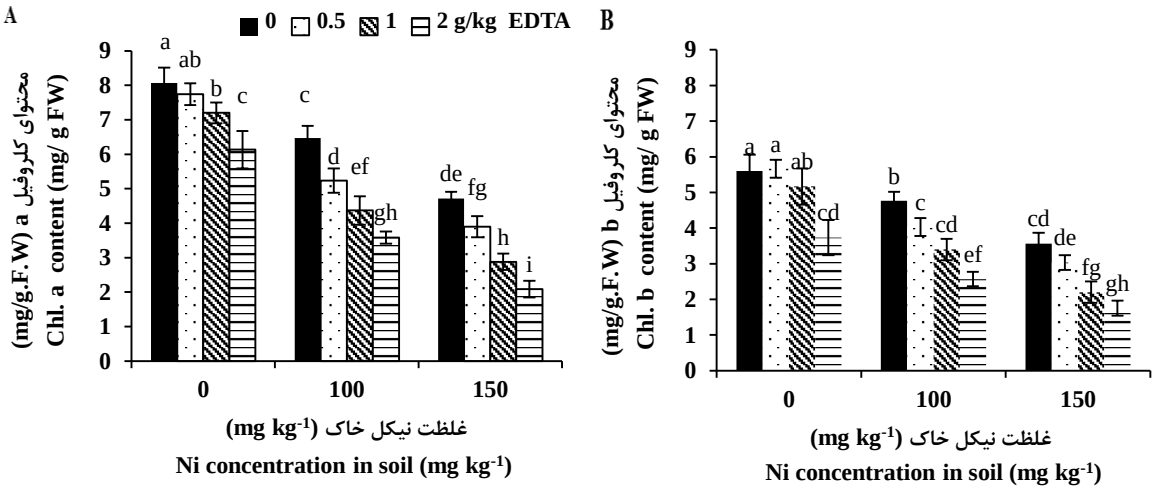
ریشه همیشه‌بهار را نسبت به شاهد هر گروه به‌طور معنی‌داری کاهش داد. برای مثال در حضور غلظت ۲ گرم EDTA بر کیلوگرم خاک، وزن تر و خشک ریشه به ترتیب ۶۹/۷۱ و ۶۴/۰۶ درصد و وزن تر و خشک بخش هوایی گیاه به ترتیب به میزان ۴۹/۰۶ و ۶۰/۶۶ درصد تحت تنش ۱۵۰ میلی‌گرم نیکل خاک کاهش یافت.



شکل ۱. اثر غلظت‌های مختلف نیکل (صفر، ۱۰۰، ۱۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک) و EDTA (صفر، ۰/۵، ۱، ۲ گرم در کیلوگرم خاک) بر وزن تر و خشک بخش هوایی (A, B) و ریشه (C, D) گیاه همیشه‌بهار. حروف یکسان مبین عدم تفاوت معنی‌دار بین تیمارها بر طبق آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد است.

Fig. 1. The effect of different concentrations of nickel (0, 100, 150 mg kg^{-1}) and EDTA (0, 0.5, 1, 2 g kg^{-1}) of soil on fresh and dry weight of shoot (A,B) and root (C,D) of pot marigold. The data are means of 3 replications ± SE and same letters indicate non-significant differences between treatments according to Duncan's multiple range tests.

همچنین با توجه به نتایج شکل ۲ در شرایط بدون تنش نیکل، اثر غلظت ۰/۵ گرم بر کیلوگرم EDTA بر محتوای کلروفیل a و b نسبت به شاهد این گروه غیرمعنی‌دار بود؛ اما تحت تنش ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نیکل خاک، کاربرد همه غلظت‌های EDTA به‌طور معنی‌داری محتوای کلروفیل a و b را نسبت به شاهد این گروه‌ها کاهش داد (شکل ۲).



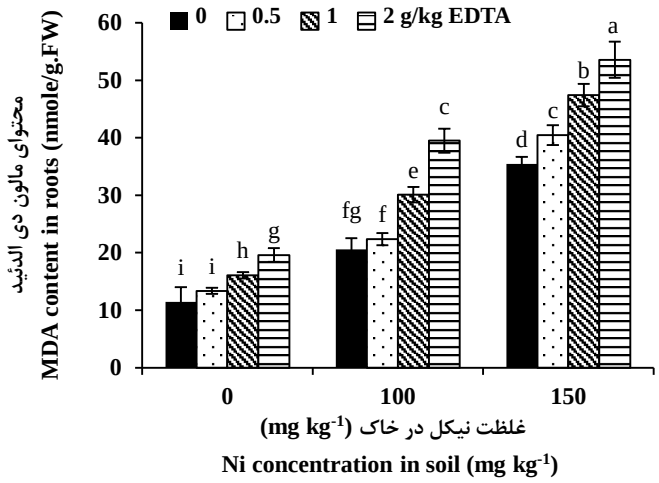
شکل ۲. اثر غلظت‌های مختلف نیکل (۰، ۱۰۰، ۱۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک) و EDTA (۰، ۰/۵، ۱، ۲ گرم در کیلوگرم خاک) بر محتوای کلروفیل(A) a ، کلروفیل (B) b در برگ گیاه همیشه‌بهار. حروف یکسان مبین عدم تفاوت معنی‌دار بین تیمارها بر طبق آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد است.

Fig. 2. The effect of different concentrations of nickel (0, 100, 150 mg kg^{-1}) and EDTA (0, 0.5, 1, 2 g kg^{-1}) of soil on content of chlorophyll a, b in leaves of pot marigold. The data are means of 3 replications ± SE and same letters indicate non-significant differences between treatments according to Duncan's multiple range tests.

پیشنهاد شده است که EDTA با رهاسازی فلزات از ذرات خاک، فراهمی فلز در بخش محلول خاک را افزایش داده و در نتیجه موجب جذب و تجمع بیشتر فلز در گیاه می‌شود و سمیت فلز در گیاه منجر به کاهش رشد و ایجاد زردبرگی می‌شود (Shahid et al., 2014). در این مطالعه هم کاربرد غلظت ۰/۵ گرم EDTA در کیلوگرم خاک، غلظت نیکل را در ریشه و بخش هوایی افزایش داد (جدول ۴) و احتمالاً همین غلظت بیشتر فلز موجب کاهش رشد ریشه و بخش هوایی (شکل ۱) و محتوای کلروفیل *a* و *b* برگ (شکل ۲) گیاه همیشه‌بهار شد. معمولاً تجمع فلزات سنگین از طریق ایجاد تنش اکسیداتیو و تسریع تجزیه کلروفیل و یا به دلیل رقابت و اثر منفی برای جذب فلزات موردنیاز برای بیوسنتز کلروفیل (مثل Fe و Mg)، محتوای کلروفیل در گیاه را کاهش می‌دهند (Amooaghaie et al., 2017; Nabaei and Amooaghaie, 2019; Valivand and Amooaghaie, 2021). مشابه با نتایج ما، مطالعه تشکری‌زاده و علیزاده (Tashakori zadeh and Alizadeh, 2019) هم نشان داد که کاربرد EDTA در خاک آلوده با نیکل، به دلیل بالا بردن تجمع نیکل در گیاه، رشد خردل هندی را کاهش داد. همچنین در مطالعه دیگری کاربرد غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی‌مول EDTA در کیلوگرم خاک، با افزایش جذب کروم و نیکل باعث اثرات فیتوتوکسی شدید و پژمردگی، زرد شدن برگ‌ها و درنهایت مرگ گیاه داتوره شد (Jean et al., 2008).

به‌هرحال در تحقیق حاضر علی‌رغم این‌که با کاربرد غلظت‌های ۱ و ۲ گرم EDTA در کیلوگرم خاک، محتوای نیکل در ریشه و بخش هوایی در حد معنی‌داری کاهش یافت (جدول ۴)، ولی رشد ریشه و بخش هوایی گیاهان و کلروفیل *a* و *b* برگ (شکل‌های ۱ و ۲) در این غلظت‌ها بیشتر نزول کرد. از سوی دیگر کاربرد غلظت ۰/۵ گرم EDTA بر کیلوگرم خاک در شرایط بدون تنش و در سطح ۱۰۰ میلی‌گرم نیکل خاک تأثیر معنی‌داری بر محتوای مالون‌دی‌آلدئید ریشه نداشت اما کاربرد غلظت‌های ۱ و ۲ گرم EDTA بر کیلوگرم خاک در همه سطوح نیکل باعث افزایش معنی‌دار محتوای مالون‌دی‌آلدئید ریشه نسبت به شاهد هر گروه شد (شکل ۳). این نتایج نشان می‌دهد که بخشی از کاهش پارامترهای رشد در این تیمارها ناشی از سمیت خود EDTA است. عدم رشد گیاه در غلظت ۴ گرم EDTA بر کیلوگرم خاک، کاهش پارامترهای رشد و محتوای کلروفیل a و b (شکل‌های ۱ و ۲) و افزایش میزان پراکسیداسیون لیپیدی (شکل ۳) در ریشه در سطوح ۱ و ۲ گرم EDTA بر کیلوگرم خاک حتی در شرایط بدون تنش نیکل، نیز بیشتر این فرضیه را تائید کرد که غلظت‌های بالای EDTA برای گیاه سمی است. به‌طور مشابهی سمیت EDTA و اثر این ماده بر افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن و نشت الکترولیتی در گیاه برنج تحت شرایط بدون تنش هم گزارش شده است (Nazmul Huda

et al., 2021). تاکنون مکانیسم سمیت و اثرات اکسیداتیو سطوح بالای EDTA روشن نشده است؛ اما می‌توان احتمال داد که در عدم حضور فلزات سنگین، سطوح بالای EDTA موجب جذب فراتر از حد نیاز بسیاری از عناصر فلزی مانند آهن، مس، روی و سایر فلزات ضروری در گیاه می‌شود و مقادیر بالای این فلزات هم موجب اختلال در وضعیت اکسید و احیای سلول و تولید ROS می‌گردد. سپس این گونه‌های فعال اکسیژن موجب پراکسیداسیون چربی‌های غشا و در نتیجه افزایش تولید مالون‌دی‌آلدئید می‌شود. در شرایط تنش نیکل هم افزایش جذب و تجمع نیکل در ریشه، تنش اکسیداتیو و تخریب غشای سلول‌ها را تشدید می‌کند.



شکل ۳. اثر غلظت‌های مختلف نیکل (صفر، ۱۰۰، ۱۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک) و EDTA (صفر، ۰/۵، ۱، ۲ گرم در کیلوگرم خاک) بر محتوای مالون‌دی‌آلدئید ریشه گیاه همیشه‌بهار. حروف یکسان مبین عدم تفاوت معنی‌دار بین تیمارها بر طبق آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد است.

Fig. 3. The effect of different concentrations of nickel (0, 100, 150 mg kg^{-1}) and EDTA (0, 0.5, 1, 2 g kg^{-1}) of soil on malondealdehyde (MDA) content in root of pot marigold. The data are means of 3 replications ± SE and same letters indicate non-significant differences between treatments according to Duncan's multiple range tests.

تأثیر نیکل و EDTA بر غلظت نیکل بخش هوایی و ریشه و شاخص‌های گیاه‌پالایی

با توجه به نتایج آنالیز واریانس (جدول ۳) اثر مستقل و متقابل نیکل و EDTA بر غلظت نیکل و فاکتور تجمع زیستی بخش هوایی و ریشه گیاه و فاکتور انتقال نیکل در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد معنی‌دار بوده است.

همان‌طور که مورد انتظار بود با افزودن ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم نیکل در کیلوگرم خاک، غلظت نیکل در بخش هوایی و ریشه افزایش یافت. در همه تیمارها (حتی شاهد) غلظت نیکل در بخش هوایی بیشتر از ریشه بود و در نتیجه فاکتور انتقال نیکل در این گیاه همواره بیشتر از ۱ بود (جدول ۴). اگرچه تجمع بیشتر نیکل در بخش هوایی یک مزیت برای استفاده از گیاهان در برنامه‌های گیاه‌پالایی محسوب می‌شود اما با توجه به معیارهای تعریف‌شده برای گیاهان بیش‌اندوز (Ali et al., 2013)، این گونه همیشه‌بهار یک گیاه بیش‌اندوز نیکل نیست چون همواره غلظت نیکل در بخش هوایی کمتر از ۱۰۰۰ میلی‌گرم نیکل در کیلوگرم وزن خشک گیاه و فاکتور تجمع زیستی آن در ریشه و بخش هوایی کمتر از ۱ بود (جدول ۴). این نتایج با یافته‌های مطالعه قبلی ما روی این گیاه مطابقت داشت (Heidari et al., 2020). با توجه به نتایج جدول ۴ در شرایط بدون تنش، افزایش غلظت EDTA تأثیر معنی‌داری بر میزان نیکل گیاه نداشت اما در سطوح ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نیکل خاک، با کاربرد ۰/۵ گرم EDTA در هر کیلوگرم خاک، غلظت نیکل در بخش هوایی و ریشه نسبت به شاهد این گروه‌ها (یعنی تیمار بدون EDTA) افزایش یافت. کاربرد کلات‌هایی مثل EDTA می‌تواند با افزایش رهاسازی فلزات در بخش محلول خاک باعث تسهیل جذب و تجمع فلز در ریشه و بخش هوایی گیاه شود (Shahid et al., 2014).

در این تحقیق اگرچه کاربرد غلظت ۰/۵ گرم EDTA بر کیلوگرم خاک، فاکتور تجمع زیستی نیکل در ریشه و بخش هوایی گیاهان رشد یافته در خاک آلوده به ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم نیکل را زیاد کرد اما این افزایش از نظر آماری معنی‌دار نبود. درحالی‌که این تیمار به‌طور معنی‌داری میزان فاکتور انتقال را افزایش داد (جدول ۴). مطالعات دیگر هم نشان داد که کاربرد EDTA فاکتور تحرک کادمیوم در خاک و تجمع آن در گیاه همیشه‌بهار (Saffari and Saffari, 2020) و میزان تجمع و فاکتور انتقال نیکل در گیاه داتوره (Jean et al., 2008) و ذرت (Tipu et al., 2021) را افزایش داد. معلوم شده است که در عدم حضور EDTA، فلزات

سنگین از طریق مسیر سیمپلاستی از بین سیتوپلاسم سلول-های پوست ریشه به آوند چوبی منتقل و از آنجا به اندام هوایی ارسال می‌شوند؛ اما کمپلکس فلز EDTA می‌تواند به‌آسانی از طریق مسیر اپوپلاستی به استوانه آوندی ریشه منتقل و سپس در آوند چوبی بارگذاری شود. احتمالاً کاهش اتصال کاتیون‌های فلزی به مناطق تبادل کاتیونی در دیواره‌های سلولی، موجب می‌شود که انتقال از طریق مسیر آپوپلاستی سریع‌تر از مسیر سیمپلاستی باشد و بنابراین، افزایش انتقال و تجمع بیشتر فلز در بخش هوایی با کاربرد EDTA مورد انتظار است (Hernandez-Allica et al., 2007).

جدول ۳. تجزیه واریانس داده‌های حاصل از اثر غلظت‌های مختلف نیکل و EDTA بر غلظت **و فاکتور تجمع زیستی نیکل در بخش هوایی و ریشه و فاکتور انتقال نیکل در همیشه‌بهار**

Table 3. The analysis of variance related to the effect of different concentrations of nickel and EDTA on Ni concentration and biological accumulation factor (BAF) in shoots and roots and translocation factor (TF) in pot marigold

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	نیکل بخش هوایی Shoot Ni concentration	نیکل ریشه Root Ni concentration	فاکتور تجمع زیستی شاخساره BAF in shoot	فاکتور تجمع زیستی ریشه BAF in root	فاکتور انتقال نیکل translocation factor
غلظت نیکل Ni concentration	2	86.48**	48.83**	2.89**	1.1**	0.57**
غلظت EDTA EDTA concentration	3	8.81**	3.81**	0.03*	0.04**	0.23*
EDTA × نیکل EDTA ×Nickel	6	1.75**	0.53*	0.02*	0.03**	0.11*
خطا Error	24	0.1	0.07	0.005	0.002	0.04

* و ** به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد

* and ** show significant differences at 5 and 1% probability level, respectively

جدول ۴. اثر غلظت‌های مختلف نیکل (صفر، ۱۰۰، ۱۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک) و EDTA (صفر، ۰/۵، ۱، ۲ گرم در کیلوگرم خاک) بر غلظت و فاکتور تجمع زیستی نیکل در بخش هوایی و ریشه و فاکتور انتقال در همیشه‌بهار و میزان برداشت کل نیکل در هر گلدان

Table 4. The effect of different concentrations of nickel and EDTA on Ni concentration and biological accumulation factor (BAF) in shoots and roots and translocation factor (TF) in pot marigold and Ni concentration in soil

غلظت نیکل Ni concentration mg kg^{-1}	سطوح EDTA EDTA level (g kg^{-1})	نیکل ریشه Root Ni concentration mg kg^{-1}	نیکل بخش هوایی Shoot Ni concentration mg/kg	فاکتور تجمع زیستی بخش هوایی BAF in shoot	فاکتور تجمع زیستی ریشه BAF in root	فاکتور انتقال نیکل translocation factor	برداشت کل نیکل در هر گلدان Total Ni removal mg/pot
0	0	0.55 ^{f}	0.86 ^{h}	0.88 ^{b}	0.56 ^{b}	1.56 ^{bc}	5.20 ^{ef}
	0.5	0.67 ^{f}	0.9 ^{h}	1.12 ^{a}	0.83 ^{a}	1.35 ^{bc}	4.16 ^{ef}
	1	0.38 ^{f}	0.62 ^{h}	0.84 ^{b}	0.51 ^{b}	1.69 ^{b}	2.14 ^{fg}
	2	0.23 ^{f}	0.50 ^{h}	0.77 ^{b}	0.35 ^{c}	2.15 ^{a}	1.33 ^{g}
100	0	3.57 ^{d}	3.95 ^{fg}	0.04 ^{c}	0.04 ^{d}	1.11 ^{d}	18.98 ^{bc}
	0.5	4.82 ^{b}	6.52 ^{b}	0.08 ^{c}	0.06 ^{d}	1.36 ^{bc}	24.23 ^{a}
	1	3.54 ^{d}	4.43 ^{ef}	0.05 ^{c}	0.04 ^{d}	1.25 ^{cd}	11.45 ^{d}
	2	2.72 ^{e}	3.55 ^{g}	0.05 ^{c}	0.04 ^{d}	1.3 ^{bc}	7.21 ^{e}
150	0	4.11 ^{c}	5.07 ^{cd}	0.03 ^{c}	0.03 ^{d}	1.23 ^{cd}	16.41 ^{c}
	0.5	5.32 ^{a}	8.13 ^{a}	0.06 ^{c}	0.04 ^{d}	1.54 ^{b}	20.33 ^{b}
	1	4.21 ^{c}	5.42 ^{c}	0.04 ^{c}	0.03 ^{d}	1.3 ^{bc}	10.60 ^{d}
	2	3.08 ^{e}	4.86 ^{de}	0.04 ^{c}	0.03 ^{d}	1.58 ^{b}	6.02 ^{e}

در هر ستون حروف یکسان مبین عدم وجود تفاوت معنی‌دار بین تیمارها بر طبق آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد است.

The same letters per each column indicate non-significant differences between treatments according to Duncan's multiple range tests.

در سطوح ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نیکل خاک، کاربرد ۰/۵ گرم EDTA در کیلوگرم خاک، غلظت نیکل را در بخش هوایی ۶۵ و ۶۰/۳۵ درصد و در ریشه ۳۵ و ۲۹/۴۴ درصد نسبت به شاهد این گروه‌ها (تیمار بدون EDTA) افزایش داد (جدول ۴). با توجه به این‌که کاهش زیست‌توده ریشه و بخش هوایی در این غلظت EDTA چندان زیاد نبود (شکل ۱)، در این تیمارها میزان برداشت کل نیکل در هر گلدان هم ۲۷/۶۶ و ۲۳/۴۴ درصد افزایش یافت. این نتیجه بیانگر آن است که کاربرد غلظت ۰/۵ گرم EDTA در کیلوگرم خاک برای بهبود توان انباشتگری و افزایش ظرفیت گیاه‌پالایی این گونه در سطوح ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نیکل خاک مفید بود. در مقابل، با کاربرد ۱ و ۲ گرم بر کیلوگرم EDTA، غلظت نیکل بخش هوایی و ریشه نسبت به شاهد هر گروه یا در حد معنی‌داری تغییر نکرد و یا به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (جدول ۴) و چون وزن خشک ریشه و بخش هوایی هم در این تیمارها به‌شدت افت کرد، میزان برداشت کل نیکل در هر گلدان در این تیمارها در حد چشمگیری نسبت به شاهد این گروه‌ها کاهش یافت (جدول ۴). به‌طور مشابهی، یک مطالعه نشان داد که در حضور غلظت کم EDTA (۰/۱ گرم بر کیلوگرم) میزان کل جذب نیکل، کروم و کادمیوم در گیاه آفتابگردان معادل ۰/۷۳ میلی‌گرم بود اما با افزایش سطح EDTA به ۰/۳ گرم در کیلوگرم خاک، میزان جذب کل فلزات به ۰/۴۰ میلی‌گرم تقلیل یافت (Turaut et al., 2004). البته باید توجه داشت که احتمالاً غلظت بهینه EDTA برای تجمع فلز در گونه‌های مختلف و بر اساس شرایط خاک متفاوت است؛ مثلاً درحالی‌که غلظت ۱ گرم EDTA در کیلوگرم خاک در این مطالعه تجمع نیکل در ریشه و بخش هوایی این گونه همیشه‌بهار را کاهش داد اما همین غلظت تجمع نیکل در دو گونه *Brassica juncea* و *B. carinata* را در حد چشمگیری افزایش داد (Panwar et al., 2002). چن و کاترایت (Chen and Cutrright, 2001) هم گزارش کردند که کاربرد غلظت ۰/۵ گرم EDTA در کیلوگرم خاک، غلظت نیکل و کادمیوم را در شاخساره آفتابگردان افزایش داد؛ اما چون باعث کاهش زیست‌توده گیاه شد، میزان کل برداشت فلز (که از حاصل‌ضرب زیست‌توده گیاه در غلظت فلز در هر گرم ماده خشک محاسبه می‌شود) در گیاه آفتابگردان را کاهش داد. درحالی‌که در مطالعه حاضر این غلظت EDTA، میزان کل برداشت نیکل در همیشه‌بهار را افزایش داد.

به‌طور جالبی نتایج این پژوهش نشان داد که در غلظت‌های ۱ و ۲ گرم EDTA بر کیلوگرم خاک، غلظت نیکل قابل‌جذب در خاک زیر کشت گیاهان همیشه‌بهار در حد چشمگیری کاهش یافته است. حتی در غلظت ۴ گرم EDTA بر کیلوگرم خاک که هیچ گیاهی رشد نکرد اما آبیاری ادامه یافت، غلظت نیکل قابل‌جذب در خاک به‌طور چشمگیری کاهش یافت (جدول ۵).

جدول ۵. اثر غلظت‌های مختلف نیکل (صفر، ۱۰۰، ۱۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک) و EDTA (صفر، ۰/۵، ۱، ۲ گرم در کیلوگرم خاک) بر غلظت نیکل قابل‌جذب در خاک

Table 5. The effect of different concentrations of nickel and EDTA on available Ni concentration in soil

غلظت نیکل افزوده به خاک Inserted Ni to soil mg kg^{-1}	EDTA level (g kg^{-1}) سطوح EDTA				
	0	0.5	1	2	4
0	0.99 ^{h}	0.81 ^{h}	0.74 ^{h}	0.66 ^{h}	0.52 ^{h}
100	81.41 ^{d}	86.24 ^{de}	75.73 ^{e}	64.91 ^{f}	48.86 ^{g}
150	130.39 ^{a}	136.3 ^{a}	120.97 ^{b}	103.09 ^{c}	67.5 ^{f}

حروف یکسان مبین عدم وجود تفاوت معنی‌دار بین تیمارها بر طبق آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد است.

The same letters indicate non-significant differences between treatments according to Duncan's multiple range tests.

یک احتمال آن است که در این غلظت‌ها، EDTA موجب جدا شدن نیکل از ذرات خاک شده و یون‌های نیکل در معرض آبشویی قرار گرفته و از خاک و در نتیجه از دسترس گیاه خارج شده است و به همین دلیل میزان غلظت و تجمع این عنصر در گیاه در غلظت‌های ۱ و ۲ گرم EDTA کاهش یافته است (جدول ۴). البته احتمال دیگر آن است که کاهش مقدار نیکل قابل‌جذب، ممکن است نتیجه اثر تثبیت زیستی یا شیمیایی ناشی از حضور کلات باشد و کل نیکل خاک کاهش نیافته باشد؛ بنابراین، چون در این تحقیق میزان نیکل و EDTA در زه‌آب و میزان نیکل کل در خاک گلدان و توزیع

نیکل در بخش‌های مختلف خاک اندازه‌گیری نشده است، نمی‌توان قاطعانه درباره افزایش آبشویی نظر داد؛ اما تحقیقات دیگر تأثیر EDTA بر افزایش آبشویی فلزات سنگین را اثبات کرده است. نتایج مطالعه ابراهیمی و شاهسوند (Ebrahimi and Shahsavand 2014) هم معرفی کرد که اثر EDTA بر میزان آبشویی سرب در خاک یا تجمع این فلز در گیاه بوریا (*Seripus maritimus* L.) به شیوه کاربرد EDTA هم بستگی دارد. به‌طوری‌که استفاده یک مرحله‌ای EDTA (مشابه روشی که در این تحقیق به‌کار برده شده است) منجر به افزایش آبشویی فلز سنگین شد اما کاربرد EDTA به‌صورت تقسیم‌شده در چند مرتبه در طول دوره رشد، موجب رهایی مدیریت‌شده سرب در خاک و بهبود جذب و تجمع آن در گیاه بوریا گردید؛ بنابراین، بر اساس نتایج این تحقیق، کاربرد سطوح بالای EDTA به‌صورت یک مرحله‌ای برای افزایش ظرفیت گیاه‌پالایی گیاه همیشه‌بهار توصیه نمی‌شود.

نتیجه‌گیری نهایی

درمجموع نتایج این تحقیق نشان داد که این گونه همیشه‌بهار بیش‌اندوز نیکل نیست اما با کاربرد غلظت ۰/۵ گرم EDTA در کیلوگرم خاک می‌توان ظرفیت گیاه‌پالایی این گونه را تقویت کرد و از آن برای پالایش سبز خاک‌های آلوده به نیکل استفاده کرد؛ اما با توجه به تأثیر منفی غلظت‌های ۱ و ۲ گرم EDTA در کیلوگرم خاک، بر جذب نیکل و زیست‌توده گیاه، باید از کاربرد سطوح بالای EDTA در برنامه‌های گیاه‌پالایی اجتناب شود. پیشنهاد می‌شود در مطالعات بعدی، اثر سطوح کمتر از ۰/۵ گرم EDTA در کیلوگرم خاک و تقسیط آن در چند مرحله در طول دوره رشد گیاه بر ظرفیت گیاه‌پالایی این گونه همیشه‌بهار بررسی شود و اثر EDTA بر توزیع فلزات سنگین در فراکشن‌های مختلف خاک و میزان آبشویی آن‌ها بیشتر تجزیه‌وتحلیل شود.

تقدیر و تشکر

بدین‌وسیله از دانشگاه شهرکرد برای پشتیبانی مالی و در اختیار گذاشتن گلخانه و سایر تجهیزات برای اجرای عملیات آزمایشگاهی تقدیر می‌شود.

منابع

Ali, S.Y., Chaudhury, S., 2016. EDTA-enhanced phytoremediation by *Tagetes spp.* and effect on bioconcentration and translocation of heavy metals. Environmental Processes. 3, 735-746. https://doi.org/10.1007/s40710-016-0180-0

Ali, H., Khan, E., Sajad, M.A., 2013. Phytoremediation of heavy metals—Concepts and applications. Chemosphere. 91, 869-881. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.01.075

Amooaghaie, R., Zangene-madar, F., Enteshari, Sh., 2017. Role of two-sided crosstalk between NO and H2S on improvement of mineral homeostasis and antioxidative defense in *Sesamum indicum* under lead stress. Ecotoxicology and Environmental Safety. 139, 210-218. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.01.037

Bareen, F., Rafiq, K., Shafiq, M., Nazir, A., 2019. Uptake and leaching of Cu, Cd, and Cr after EDTA application in sand columns using sorghum and pearl millet. Polish Journal of Environmental Study. 28, 2065–2077 https://doi.org/10.15244/pjoes/84834

Bian, X., Cui, J., Tang, B., Yang, L. 2018 Chelant-induced phytoextraction of heavy metals from contaminated soils: A review. Polish Journal of Environmental Study. 27, 2417–2424. https://doi.org/10.15244/pjoes/81207

Chen, H., Cutrright, T., 2001. EDTA and HEDTA effects on Cd^{2+}, Cr^{2+} and Ni^{2+} uptake by *Helianthus annus*. Chemosphere. 45, 21-28. https://doi.org/10.1016/s0045-6535(01)00031-5

Ebrahimi, M., Shahsavand, F., 2014. EDTA Enhanced phytoextraction capacity of *Scirpus maritimus* L. grown on Pb-Cr contaminated soil and associated potential leaching risks. International Journal of Scientific Research in Environmental Sciences. 2, 379-388. https://doi.org/10.1016/S0045-6535(01)00031-5

Eissa, M. A., Ghoneim. M. F., El- Gharably, G. A., El-Razek, M., 2014. Phytoextraction of nickel, lead and cadmium from metals

contaminated soils using different field crops and EDTA. World Applied Sciences Journal. 32, 1045-1052 https://doi.org/10.5829/idosi.wasj.2014.32.06.912

Gee, G.W., Bauder J.W., 1986. Partical size analysis. In: A. Klute (ed.), Methods of Soil Analysis. Part 1. ASA and SSSA, Madison, WI. p. 383-411.

Hart, G., Koether, M., McElroy, T, Greipsson, S., 2022. Evaluation of chelating agents used in phytoextraction by switchgrass of lead contaminated soil. Plants. 11, 1012. https://doi.org/10.3390/plants11081012

Hassan, M.U., Chattha, M.U., Khan, I. Chattha, M.B., Aamer, M., Nawaz, M., Ali, A. Khan, M. A. U., Khan, T. A., 2019. Nickel toxicity in plants: reasons, toxic effects, tolerance mechanisms, and remediation possibilities—a review. Environmental Science and Pollution Research. 26, 12673–12688. https://doi.org/10.1007/s11356-019-04892-x

Heath, R.L., Packer, L., 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid and peroxidation. Archive of Biochemistry and Biophysics. 125, 189–198. https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90654-1

Heidari, J., Amooaghaie, R., Kiani, S., 2020. Impact of chitosan on nickel bioavailability in soil, the accumulation and tolerance of nickel in *Calendula tripterocarpa*. International Journal of Phytoremediation 22, 1175–1184 https://doi.org/10.1080/15226514.2020.1748564

Hernández-Allica, J., Garbisu, C., Barrutia, O., Becerril, J. M., 2007. EDTA-induced heavy metal accumulation and phytotoxicity in cardoon plants. Environmental and Experimental Botany. 60, 26–32. https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2006.06.006

Jean, L., Bordas, F., Gautier-Moussard, C., Verhay, P. Hitmi, A., Bollinger, J. C., 2008. Effect of citric acid and EDTA on chromium and nickel uptake and translocation by *Dature innoxia*. Environmental Pollution. 15, 555-563. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.09.013

Krujatz, F., 2012. Assessing the toxic effects of nickel, cadmium and EDTA on growth of the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas brassicacearum*. Water, Air and Soil Pollution. 223, 1281–1293. https://doi.org/10.1007/s11270-011-0944-0

Knudsen, D., Peterson, G.A., Partt, P.F., 1982. Lithium, sodium, and potassium. In: A.L. Page A.L. Page, P.A. Helmke, R.H. Loeppert, P. N. Soltanpour, M. A. Tabatabai, C. T. Johnston, M. E. Sumner (eds.) Methods of Soil Analysis. Part 2. ASA and SSSA, Madison, WI. p. 225–246. https://doi.org/10.2134/agronmonogr9.2.2ed.c13

Kaur, L., Sharma, S., Gadgil, K., 2019. Response of Indian mustard (*Brassica juncea* arawali) plants under nickel stress with special reference to nickel phytoextraction potential. EQA - International Journal of Environmental Quality. 34, 17–33. https://doi.org/10.6092/issn.2281-4485/8528

Lichtenthaler, H.K., 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. Methods in Enzymology 148, 350–382. https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1

Lindsay, W.L., Norvell, W.A. 1978. Development of a DTPA soil test for zinc, iron, manganese, and copper. Soil Science Society of America Journal 42, 421–428. https://doi.org/10.2136/sssaj1978.03615995004200030009x

Mahar, A., Wang, P., Ali, A., Awasthi, M.K., Lahori, A.H., Wang, Q., Li, R., Zhang, Z., 2016. Challenges and opportunities in the phytoremediation of heavy metals contaminated soils: a review. Ecotoxicology and Environmental Safety. 126, 111–121. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.12.023

Mohammadpour, G.H., Karbassi, A., Baghvand, A., 2016. Pollution intensity of nickel in agricultural soil of Hamedan region. Caspian Journal of Environment Science 14, 15.24

Mulvaney, R.L., 1996. Nitrogen–inorganic forms. In: D.L. Sparks, A.L. Page, P.A. Helmke, R.H. Loeppert, P. N. Soltanpour, M. A. Tabatabai, C. T. Johnston, M. E. Sumner (eds.) Methods of Soil Analysis. Part 3. SSSA and ASA, Madison, WI. p. 1123–1184. https://doi.org/10.2134/agronmonogr9.2.2ed.c13

Nabaei, M., Amooaghaie, R., 2020. Melatonin and nitric oxide enhance cadmium tolerance and phytoremediation efficiency in *Catharanthus roseus* L. G. Don. Environmental Science and Pollution Research. 27, 6981–

6994. https://doi.org/10.1007/s11356-019-07283-4

Nazmul Huda, A. K. M., Hossain, M., Mukta, R.H., Khatun, M. R., Haque, Md. A., 2021. EDTA-enhanced Cr detoxification and its potential toxicity in rice (*Oryza sativa* L.). Plant Stress. 2, 100014 https://doi.org/10.1016/j.stress.2021.100014

Nelson, D.W., Sommers L.E., 1996. Total carbon, organic carbon, and organic matter. In: D.L. Sparks A.L. Page, P.A. Helmke, R.H. Loeppert, P. N. Soltanpour, M. A. Tabatabai, C. T. Johnston, M. E. Sumner (eds.) Methods of Soil Analysis. Part 3. SSSA and ASA, Madison, WI. p. 961–1010. https://doi.org/10.2134/agronmonogr9.2.2ed.c13

Olsen, S.R., Sommers, L.E., 1982. Phosphorus. In: A.L. Page A.L. Page, P.A. Helmke, R.H. Loeppert, P. N. Soltanpour, M. A. Tabatabai, C. T. Johnston, M. E. Sumner (eds.) Methods of Soil Analysis. Part 2. ASA and SSSA, Madison, WI. p. 403–430. https://doi.org/10.2134/agronmonogr9.2.2ed.c13

Panwar, B. S., Ahmed, K. S., Miltal, S. B., 2002. Phytoremediation of nickel- contaminated soils by Brassica species. Environment, Development and Sustainability. 4, 1-6. https://doi.org/10.1023/A:1016337132370

Rhodes, J.D., 1996. Salinity: electrical conductivity and total dissolved solids. In: D.L. Sparks A.L. Page, P.A. Helmke, R.H. Loeppert, P. N. Soltanpour, M. A. Tabatabai, C. T. Johnston, M. E. Sumner (eds.) Methods of Soil Analysis. Part 3. SSSA and ASA, Madison, WI. p. 417-435. https://doi.org/10.2134/agronmonogr9.2.2ed.c13

Saffari, V.R., Saffari, M., 2020. Effects of EDTA, citric acid, and tartaric acid application on growth, phytoremediation potential, and antioxidant response of Calendula officinalis L. in a cadmium-spiked calcareous soil, International Journal of Phytoremediation, https://doi.org/10.1080/15226514.2020.1754758

Sekabira, K., Oryem-Origa, H., Basamba, T.A., Mutumba, G., Kakudidi, E., 2010. Assessment of heavy metal pollution in the urban stream sediments and its tributaries. International Journal of Environmental Science and Technology. 7, 435–446. https://doi.org/10.1007/BF03326153

Shahid, M., Austruy, A., Echevarria, G., Arshad, M., Sanaullah, M., Aslam, M., Nadeem, M., Nasim, W. Dumat, C., 2014. EDTA-enhanced phytoremediation of heavy metals: a review. Soil and Sediment Contamination 23, 389–416. https://doi.org/10.1080/15320383.2014.831029

Tariq, S. R., Ashraf, A., 2016. Comparative evaluation of phytoremediation of metal contaminated soil of firing range by four different plant species. Arabian Journal of Chemistry. 9, 806-814. https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.09.024

Tashakori zadeh, M., Alizadeh, M., 2019. Effect of ethylene diamine tetra acetic acids on morphological characteristics and phytoremediation capacity of Indian mustard (*Brassica juncea* L) in nickel contaminated soil. Human and Environment. 17, 15-24 [In Persian]. https://dorl.net/dor/20.1001.1.15625532.1398.17.3.2.4

Tipu, M.I., Ashraf, M.Y., Sarwar, N., Akhtar, M., Shaheen, M.R., Ali, S., Damalas, C.A., 2021. Growth and Physiology of Maize (*Zea mays* L.) in a nickel-contaminated soil and phytoremediation efficiency using EDTA. Journal of Plant Growth Regulation 40, 774-786. https://doi.org/10.1007/s00344-020-10132-1

Thomas, G.W., 1996. Soil pH and soil acidity. In: D.L. Sparks, A.L. Page, P.A. Helmke, R.H. Loeppert, P. N. Soltanpour, M. A. Tabatabai, C. T. Johnston, M. E. Sumner (eds.) Methods of Soil Analysis. Part 3. SSSA and ASA, Madison, WI. p. 475-490. https://doi.org/10.2134/agronmonogr9.2.2ed.c13

Tohidi, Sh., Gholamalizadeh, A., Asgharipour, M., Naghavi, H., 2019. The effect of EDTA and ammonium molybdate on increasing bioavailability efficiency and decreasing lead tension by corn. Environmental Stresses in Crop Science. [In Persian]. https://doi.org/10.22077/escs.2019.1421.1310

Turaut, C., Katie, P., Cutright, T. J., 2004. The effect of EDTA and cytric acid on phytoremediation of cd, Cr and Ni from soil using *Helianthus annuus*. Environmental Pollution. 13, 147-154 https://doi.org/10.1016/j.envpol.2004.01.017

Valivand, M., Amooaghaie, R., 2021. Foliar spray with sodium hydrosulfide and calcium chloride advances dynamic of critical elements and efficiency of nitrogen metabolism in *Cucurbita pepo* L. under nickel stress. Scientia Horticulturea (Amsterdam) 283,110052 https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110052

Vischetti, C., Marini, E., Casucci, C., De Bernardi, A., 2022. Nickel in the environment: Bioremediation techniques for soils with low or moderate contamination in European Union. Environments 9, 133. https://doi.org/10.3390/environments9100133

Zhang, X., Zhong, B., Shafi , M., Guo, J., Liu, C., Guo, H., Peng, D., Wang, Y., Liu, D., 2018. Effect of EDTA and citric acid on absorption of heavy metals and growth of Moso bamboo. Environmental Science and Pollution Research. 25, 18846-18852. https://doi.org/10.1007/s11356-018-2040-0