Archive of SID

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی سلول و بافت
جلد ۲، شماره ۱، بهار ۱۳۹۰، ۶۶-۵۷

# بررسی اثرات سمی ذرات خروجی خودروهای دیزل بر برخی از فاکتورهای رشد و پاسخهای سلولی (تولید پروتئین) در بذر و دانه گرده گیاه لوبیا

عبدالکریم چهرگانی Ph.D. [1*]، فریبا محسن زاده Ph.D.[1]، شیوا حسینی روزبهانی M.Sc.[2]

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه بوعلی سینا، همدان
۲- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد
* پست الکترونیک نویسنده مسئول: chehregani@basu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۲/۱۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۵/۲۶

## چکیده

**هدف:** آلودگی هوا یکی از معضلات جهانی است که اثرات سوء بر موجودات زنده دارد. هدف از این پژوهش بررسی اثر بخش محلول در آب ذرات خروجی خودروهای دیزل(DEP) بر برخی از فاکتورهای رشد و الگوی پروتئینی لوبیا بود.

**مواد و روش‌ها:** گیاهان لوبیا در شرایط آزمایشگاهی کشت و روزانه با ۳۰ میلی لیتر از غلظت‌های مختلف DEP (۰/۱، ۰/۳ و ۰/۶ گرم بر لیتر) تیمار و گیاهان شاهد با آب مقطر اسپری شدند. عوامل رشد از قبیل وزن خشک بخش هوایی، وزن تر بخش هوایی، طول نیام، وزن خشک نیام، درصد جوانه زنی و سطح برگی اندازه‌گیری و در گیاهان تحت تیمار و شاهد با استفاده از نرم افزار SPSS و آنالیز واریانس مقایسه گردید. پروتئین‌های بذر و دانه گرده با روش الکتروفورز مطالعه شد.

**نتایج:** تیمار با DEP سبب کاهش وزن تر شد ($p\leq ۰/۰۵$)، اما در سایر فاکتورها (طول نیام، وزن خشک نیام و بخش هوایی و همچنین درصد جوانه زنی بذر و سطح برگی) فقط در گروه تیمار شده با محلول ۰/۶ گرم بر لیتر DEP کاهش معنی دار مشاهده گردید. الگوی باندهای پروتئینی بذر آنها مشابه بود اما در نمونه‌های تحت تیمار با غلظت ۰/۶ گرم بر لیتر افزایش تراکم در باند با وزن مولکولی ۶۲ کیلو دالتون دیده شد. در نیمرخ پروتئینی دانه‌های گرده گیاهان تحت تیمار با ۰/۶ گرم بر لیتر، یک باند با وزن ۵۵ کیلو دالتون ناپدید شد و باند جدیدی با وزن ۸۰ kDa پدیدار شده گشت.

**نتیجه گیری:** با توجه به اثرات سوء گزارش شده برای DEP، به نظر می‌رسد گیاهان از مقاومت نسبی برخوردار هستند که می‌تواند مربوط به تغییرات در الگوی پروتئینی و مکانیسم‌های سلولی مرتبط با مقابله با اثرات سمی ذرات DEP و سم زدایی آنها باشد.

**واژگان کلیدی:** آلودگی هوا، فاکتورهای رشد، پروتئین، لوبیا


www.SID.ir

Archive of SID



## مقدمه

یکی از مسائلی که امروزه بسیار مورد توجه قرار گرفته بحث آلاینده‌های زیست محیطی می‌باشد. بر اساس گزارش کمیسیون آلودگی آکادمی ملی علوم ایالت متحده آمریکا در سال ۱۹۶۶، آلودگی دگرگونی نامطلوب در خصوصیات فیزیکی، شیمیایی و زیستی هوا، آب و خاک است که می‌تواند آثار زیان بخشی بر زندگی انسان، گیاهان و حیوانات، وضع زندگی و میراث فرهنگی داشته باشد (۱). امروزه آلاینده‌های هوا به خصوص ذرات خروجی خودروهای دیزل نگرانی بزرگی به حساب می‌آیند و این ذرات یکی از مهمترین عوامل آلاینده هوا می‌باشند. ذرات خروجی خودروهای دیزل Diesel Exhaust Particles (DEP) شامل گازها، بخارات، فلزات و ترکیبات شیمیایی مختلفی می‌باشد. آلاینده‌های موجود در این ذرات شامل هیدروکربن‌های آروماتیک از جمله فنانترن، نفتالن، بنزن و پیرن، گازهایی چون دی اکسید کربن، منوکسید کربن، اکسید نیتروژن، دی اکسید نیتروژن و دی اکسید گوگرد و فلزاتی چون نیکل، سرب، کادمیوم، جیوه و آرسنیک می‌باشد. اندازه ذرات خروجی خودروهای دیزل ۰/۰۱ میکرون تا ۱۰ میکرون می‌باشد. این ذرات بسیار ریز بوده و دارای هسته کربنی هستند و سایر ترکیبات تشکیل دهنده دور این هسته کربنی تجمع یافته‌اند (۲).

تحقیقات نشان داده است که ذرات خروجی از خودروهای دیزل دارای اثراتی چون آلرژی زایی، التهاب مجاری تنفسی، سرطان زایی و جهش زایی می‌باشند (۳). براساس مطالعات صورت گرفته، ذرات خروجی از خودروهای دیزل در بیماری‌های تنفسی و آلرژی نقش داشته و یا موجب تشدید آلرژی‌زایی دانه‌های گرده گیاهان می‌شوند (۴، ۵). ذرات خروجی خودروهای دیزل می‌توانند دانه‌های گرده در حال نمو را از طریق ایجاد تنش در روی خود گیاه و یا پس از انتشار در هوا تحت تاثیر قرار دهند (۶). برخی پژوهش‌ها نشان داده که آلودگی هوا می‌تواند موجب القای شکستن پروتئین‌های گرده‌ای و یا موجب ساخت پروتئین‌های جدید شود که نقش سم زدایی دارند (۹-۷، ۵). افزایش مقدار پروتئین در گیاهان مناطق آلوده نیز گزارش شده است (۱۱، ۱۰). احتمال می‌رود ترکیبات موجود در DEP از قبیل کینون و ساختارهای نیتروآروماتیک بتوانند از طریق تولید سوپراکسید و کاهش چرخه احیا، موجب شکست در DNA نیز شوند (۲).

گزارش‌های متعددی در مورد اثر آلاینده‌های مختلف هوا از جمله DEP و محتویات آن بر فاکتورهای رشد و جوانه زنی گیاهانی نظیر *Trifolium pretense L.*، *Lolium perenne L.* و *Brassica alba (L.) Boiss.* (۱۲)، گل جعفری و *Spartium junceum L.* (۱۳) در دسترس است. کاهش رشد ریشه گیاهان تیمار شده با بنزو آلفا پیرون به عنوان یکی از اجزای DEP در کاهو گزارش شده است (۱۴). کاهش برخی از شاخصه‌های رشد و اختلال در میکرواسپورزایی در *Spartium junceum L.* از تیره Fabaceae نیز گزارش شده است (۱۵).

مطالعات مرجع شناختی ما نشان داد که گزارشی در مورد اثرات بخش محلول در آب ذرات DEP به ویژه بر شاخصه‌های رشد و الگوی پروتئینی در دسترس نیست. هدف این پژوهش بررسی اثر سمی بخش محلول در آب ذرات DEP بر برخی از فاکتورهای رشد و الگوی پروتئینی در گیاهان است تا علاوه بر شناخت بیشتر اثرات سمی بخش محلول در آب ذرات DEP که پس از بارندگی در مناطق آلوده شهری و صنعتی، گیاهان را تحت تاثیر قرار می‌دهد، برخی از مکانیسم‌های احتمالی مقاومت به مسمومیت در گیاهان نیز شناسایی شوند.

## مواد و روش‌ها

***گیاه مورد مطالعه و تیمارها:*** گیاه مورد مطالعه در این پژوهش گیاه لوبیای زراعی *Phaseolus vulgaris L.* ، واریته تلاش به عنوان یک مدل بود. انتخاب گیاه فوق به دلیل سهولت کاشت و رشد، وسعت زیاد کشت و استفاده غذایی از آن است. بذر گیاه مورد استفاده در این پژوهش از موسسه تحقیقات جهاد کشاورزی همدان خریداری و در قطعات زمین مشابه و در گروه‌های مختلف (تیمار و شاهد) کاشته شد. خصوصیات خاک مورد استفاده ۶۰ درصد رس، ۳۰ درصد ماسه و ۱۰ درصد کود حیوانی انتخاب گردید (۱۶). به منظور بررسی اثر ذرات خروجی خودروهای دیزل بر فاکتورهای رشد و الگوی پروتینی لوبیا سه غلظت ۰/۱، ۰/۳ و ۰/۶ گرم بر لیتر از این ذرات در نظر گرفته شد. ذرات خروجی از خودروهای دیزل از سه دستگاه اتوبوس مرسدس بنز ۳۰۲ واحد نقلیه دانشگاه، به صورت مخلوط جمع آوری گردید. ذرات در مقادیر غلظت‌های ذکر شد در آب دو بار استریل مخلوط شده به مدت ۲۰ دقیقه در دستگاه اولتراسوند با قدرت ۲۰۰ وات قرار داده شدند تا مخلوط همگن به دست آید و



www.SID.ir

Archive of SID



تا حد امکان ذرات خرد و حل شوند. مخلوط‌های تهیه شده به مدت ۲۴ ساعت در شرایط آزمایشگاهی قرار داده شدند و سپس با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره ۴ صاف شده و بخش محلول در آب پس از صاف کردن، برای استفاده در تیمار به کار رفت. در هفته سوم رویشی و در واقع ۲۰ روز قبل از گل‌دهی، تا شروع گل‌دهی نمونه‌ها تحت تیمارهای مختلف قرار گرفتند. نمونه‌های شاهد با آب مقطر و نمونه‌های تیمار با غلظت‌های مختلف ۰/۱ ، ۰/۳ و ۰/۶ گرم بر لیتر از ذرات خروجی خودروهای دیزل، روزانه دو بار (صبح و عصر) اسپری شدند. در هر بار تیمار هر گیاه به طور تقریبی و متوسط ۳۰ میلی لیتر از محلول را دریافت کرد. به این منظور تعداد گیاهان هر قطعه کشت، شمارش شده و حجم محلول تیماری از رابطه تعداد نمونه × ۳۰ میلی‌لیتر تهیه و سعی شد به طور یکنواخت بر روی گیاهان تیماری اسپری شد (۱۷). تیمار نمونه‌ها تا مرحله شروع گل‌دهی ادامه یافت و دو بار در هر روز، گیاهان با محلول‌های فوق اسپری شدند. گیاهان شاهد و تیمار تا مرحله رشد کامل میوه و دانه تحت مراقبت بوده و پس از اتمام دوره گل‌دهی و تکمیل رشد، در سنجش برخی از فاکتورهای رشد مورد استفاده قرار گرفتند (۱۶).

***اندازه گیری فاکتورهای رشد:***

***اندازه گیری تغییرات رشد:*** برای بررسی تغییرات رشد، به طور تصادفی از هر گروه تیمار و شاهد، ده نمونه انتخاب و طول نیام (سانتی‌متر)، وزن خشک نیام (گرم) و همچنین وزن خشک بخش هوایی (بیوماس یا زی‌توده) (گرم)، وزن تر بخش هوایی (گرم) و سطح برگ‌ها بر حسب سانتی‌متر مربع در گیاهان شاهد و تحت تیمار بعد از ۲۰ روز اسپری کردن مقایسه گردید. برای اندازه‌گیری وزن خشک، بخش‌های هوایی گیاه را در آون ۷۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده و سپس نمونه‌ها توزین شده و گروه‌های تیماری و شاهد مورد بررسی مقایسه‌ای قرار گرفت (۱۵) .

***آزمون جوانه‌زنی:*** به منظور بررسی اثر ذرات خروجی خودروهای دیزل بر میزان جوانه زنی گیاهان تحت تیمار به صورت زیر عمل شد. تعداد ۲۰ بذر لوبیای تهیه شده از گیاهان شاهد و تحت تیمار قبل از کشت به مدت ۲ دقیقه در آب ژاول ۱۰درصد استریل گشتند. جهت کشت از ظروف پتری شیشه‌ای استریل شده استفاده شد. سپس یک قطعه کاغذ صافی در هر ظرف پتری قرار داده شده و روی هر یک از آن‌ها ۵ عدد بذر سالم و حتی الامکان یکنواخت قرار گرفت. به منظور مطالعات آماری برای هر گروه تیماری و شاهد ۵ تکرار در نظر گرفته شد. در کلیه گروه‌ها، ظرف‌ها در ابتدا از آب مقطر پر شدند به طوری که سطح بذرها کاملا مرطوب شود. پس از تبخیر این میزان از آب، مجددا به صورت روزانه آب اسپری شد. میزان جوانه زنی در هر یک از گیاهان تیمار شده با گروه شاهد طی ۸ روز مورد مقایسه قرار گرفت. معیار جوانه زنی، بیرون آمدن نوک ریشچه از پوسته دانه و رشد آن است، به طوری که طول آن معادل نصف طول بذر باشد (۱۵).

***بررسی‌های آماری:*** در تمام موارد فوق، میانگین داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS محاسبه شد و آنالیز واریانس داده‌ها با روش ANOVA تجزیه و تحلیل شده و در نهایت نتیجه داده‌ها به صورت جدول ارائه گردید (۵).

***مطالعه پروتئین ها به روش الکتروفورز:*** برای استخراج پروتئین از بذرهای گیاهان شاهد و تحت تیمار، یک گرم از دانه گیاهان تحت تیمار و شاهد خوب خرد شد تا پودر یکنواختی به دست آید. پودر بذر به دست آمده از هر گروه تیماری به صورت جداگانه با نسبت یک به شش با بافر فسفات سدیم (pH=۷) مخلوط گشت. به منظور جلوگیری از فعالیت آنزیم فنل اکسیداز و اثرات سوء آن در سنجش پروتئین و در نتیجه پایدار کردن پروتئین‌ها، از مقدار کمی پلی وینیل پیرولیدن (PVP) استفاده شد. سپس مخلوط حاصل به مدت ۲۴ ساعت در یخچال قرار گرفت تا انحلال و آزاد سازی پروتئین‌ها صورت گیرد. مخلوط‌های فوق در سانتریفوژ یخچال‌دار به مدت ۲۵ دقیقه با ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ شد (۵، ۱۸). با پایان یافتن عمل سانتریفوژ، محلول شفاف رویی را جدا کرده و در ویال‌های کوچک استریل در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری کردیم تا در مطالعه الکتروفورزی مورد استفاده قرار گیرد. عصاره پروتئینی استخراج شده به نسبت مساوی یک به یک با بافر نمونه مخلوط گردید. مخلوط حاصله در حمام آب گرم (۹۵ درجه سانتی‌گراد) به مدت ۳ دقیقه حرارت داده شد. ژل اکریل آمید ۱۲ درصد تهیه شد و مقدار ۱۰ میکرولیتر از هر نمونه در چاهک‌ها و در یکی از چاهک‌ها، مارکر



www.SID.ir

Archive of SID



پروتئینی تزریق شد. برای انجام الکتروفورز از دستگاه الکتروفورز مینی ژل کمپانی Bio-Rad (USA) استفاده شد. الکتروفورز با ولتاژ ثابت ۷۰ ولت انجام گرفت. پس از اتمام الکتروفورز با مخلوط اسید استیک و اتانول تثبیت گردید. پس از تثبیت پروتئین‌ها، ژل با آب مقطر شسته شده و به محلول رنگ منتقل شده و رنگ آمیزی با رنگ کوماسی بلو بریلیانت R250 انجام گرفت (۱۸). پس از چند مرحله رنگ بری ژل، با استفاده از اسکنر از آن عکس تهیه و تغییرات باندها مورد مطالعه و مقایسه قرار گرفت.

الکتروفورز پروتئین دانه‌های گرده، به روش مشابه انجام گرفت، با این تفاوت که به دلیل مقدار کم دانه‌های گرده، از هر گروه تیماری و شاهد مقدار ۰/۱ گرم دانه گرده انتخاب و با ۰/۶ گرم بافر استخراج در میکروتیوب مخلوط گردید. میکروتیوب‌ها به مدت ۲۴ ساعت در یخچال نگهداری شدند و در این مدت چند بار با شیکر مخصوص لوله‌ها، هم زده شدند. بعد از آن بقیه مراحل مطابق با روش فوق (مورد بذر) انجام گرفت (۵، ۱۵).

## نتایج

### *نتایج حاصل از آنالیز رشد*

برخی از فاکتورهای رشد از قبیل وزن خشک بخش هوایی، وزن-تر بخش هوایی، وزن خشک نیام و طول نیام در گروه‌های شاهد وتحت تیمار با ذرات خروجی از خودروهای دیزل مورد مطالعه مقایسه‌ای قرار گرفتند. بررسی‌های به عمل آمده نشان داد که تیمار با ذرات خروجی از خودروهای دیزل در غلظت‌های (۰/۱، ۰/۳ و ۰/۶ گرم در لیتر) موجب کاهش وزن تر گیاهان تحت تیمار شده است (جدول ۱). در گیاهان گروه شاهد میانگین وزن تر ۳۴ گرم به ازای هر بوته، در زمان اندازه گیری به دست آمد، در حالی که بیشترین کاهش در گروه تحت تیمار با ۰/۶ گرم بر لیتر با میانگین وزنی ۲۳ گرم به ازای هر بوته گیاه مشاهده گردید. اختلاف بین گروه های شاهد و تیماری از نظر آماری در سطح احتمال $P \leq ۰/۰۵$ معنی‌دار بود.

اندازه گیری وزن خشک نمونه‌های مورد مطالعه نتایج دیگری در بر داشت. در گروه شاهد میانگین وزن خشک ۴/۵ گرم به دست آمد، در گروه‌های تیماری کاهش وزن خشک مشاهده گردید (جدول ۱). بیشترین کاهش وزن خشک مربوط به گیاهان گروه تیمار شده با ۰/۶ گرم بر لیتر DEP بود که میانگین ۳/۴ گرم برای وزن هر بوته گیاه اندازه‌گیری گردید. بررسی نشان داد که اختلاف بین گروه شاهد و گروه تیماری با ۰/۶ گرم بر لیتر DEP از نظر آماری در سطح احتمال $P \leq ۰/۰۵$ معنی‌دار ولی با سایر گروه‌های تیماری معنی‌دار نبود.

بررسی طول نیام نشان داد که در گروه شاهد میانگین طول نیام ۱۳ سانتی‌متر بود، در گروه‌های تیماری کاهش نسبی میانگین طول نیام مشاهده گردید (جدول ۱). بیشترین کاهش میانگین طول نیام مربوط به گیاهان گروه تیمار شده با ۰/۶ گرم بر لیتر DEP بود که ۱۰ سانتی‌متر اندازه‌گیری گردید. بررسی نشان داد که اختلاف میانگین طول نیام بین گروه‌های شاهد و دو گروه اول تیماری از نظر آماری در سطح احتمال $P \leq ۰/۰۵$ معنی‌دار نیست و فقط در گروه تیمار شده با محلول ۰/۶ گرم بر لیتر DEP تغییر معنی‌دار مشاهده شد.

بررسی وزن خشک نیام نشان داد که در گروه شاهد میانگین طول نیام ۲/۴ گرم بود، در گروه‌های تیماری کاهش نسبی وزن خشک نیام مشاهده گردید (جدول ۱). بیشترین کاهش وزن خشک نیام مربوط به گیاهان گروه تیمار شده با ۰/۶ گرم بر لیتر DEP بود که ۲/۰۵ گرم اندازه‌گیری گردید. بررسی نشان داد که اختلاف میانگین وزن خشک نیام بین گروه‌های شاهد و تیماری از نظر آماری در سطح احتمال $P \leq ۰/۰۵$ معنی‌دار نبود و فقط در گروه تیمار شده با محلول ۰/۶ گرم بر لیتر DEP تغییر معنی‌دار مشاهده شد.

اندازه‌گیری سطح برگی نیز نتایج مشابهی را نشان داد. بررسی سطح برگ در گروه‌های تحت تیمار با ذرات خروجی از خودروهای دیزل و شاهد نشان داد که در گروه شاهد میانگین سطح برگی ۲/۵ سانتی‌متر مربع بود، در گروه‌های تیماری، کاهش نسبی سطح برگ مشاهده گردید (جدول ۱). بیشترین کاهش سطح برگ مربوط به گیاهان گروه تیمار شده با ۰/۶ گرم بر لیتر DEP بود که ۱/۸ سانتی‌متر مربع اندازه‌گیری گردید. بررسی نشان داد که اختلاف میانگین سطح برگ بین گروه‌های شاهد و تیماری از نظر آماری در سطح احتمال $P \leq ۰/۰۵$ معنی‌دار نبود و فقط در گروه تیمار شده با محلول ۰/۶ گرم بر لیتر DEP تغییر معنی‌دار مشاهده شد.

بررسی درصد جوانه زنی دانه‌ها در گروه‌های تحت تیمار با مقادیر مختلف ذرات خروجی خودروهای دیزل و شاهد نشان داد که در بذرهای گروه شاهد میانگین در صد جوانه زنی ۸۸ درصد بود، در بذرهای تهیه شده از گروه‌های تیماری کاهش درصد جوانه‌زنی مشاهده گردید (جدول ۱). بیشترین کاهش درصد جوانه‌زنی



www.SID.ir

Archive of SID



مربوط به گیاهان گروه تیمار شده با ۰/۶ گرم بر لیتر DEP بود که ۵۸ درصد اندازه‌گیری گردید. بررسی نشان داد که اختلاف میانگین درصد جوانه زنی بین گروه تیمار شده با غلظت ۰/۶ گرم بر لیتر DEP با گروه شاهد از نظر آماری معنی‌دار است ($P\leq0.01$).

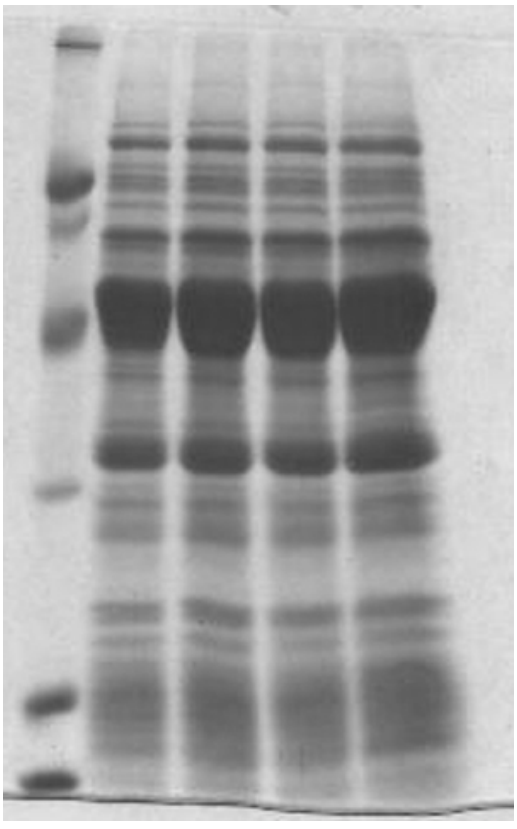
*جدول ۱: جدول آنالیز واریانس اثر غلظت‌های مختلف بخش محلول در آب ذرات خروجی خودروهای دیزل (۰/۱، ۰/۳ و ۰/۶ گرم بر لیتر) بر وزن تر و خشک بخش هوایی (گرم در هر بوته گیاه)، طول نیام (cm)، وزن خشک نیام (گرم در هر نیام)، سطح برگ ($cm^2$) و در صد جوانه‌زنی در لوبیای ۶۰ روزه.*

| گروه‌های تیماری | وزن بخش هوایی (گرم) | | نیام | | سطح برگ ($cm^2$) | درصد جوانه زنی |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | تر | خشک | طول (cm) | وزن خشک (گرم) | | |
| شاهد | ۳۴±۳/۵ | ۴/۵ ± ۰/۵ | ۱۳±۰/۸ | ۲/۴ ± ۰/۲ | ۲/۵ ± ۰/۲ | ۸۸ ± ۶ |
| تیمار ۰/۱ | $^{*}$ ۲۷± ۲/۲ | $^{ns}$ ۴/۳ ± ۰/۴ | $^{ns}$۱۲ ± ۰/۸ | $^{ns}$ ۲/۳ ± ۰/۲ | $^{ns}$۲/۴ ± ۰/۳ | $^{ns}$۸۲ ± ۴ |
| تیمار ۰/۳ | $^{*}$۲۵ ± ۲/۴ | $^{ns}$ ۴/۲ ± ۰/۶ | $^{ns}$۱۳±۰/۶ | $^{ns}$۲/۲ ± ۰/۴ | $^{ns}$۲/۳ ± ۰/۲ | $^{ns}$۷۹ ± ۴ |
| تیمار ۰/۶ | $^{*}$۲۳±۱/۸ | $^{*}$۳/۴ ± ۰/۳ | $^{*}$۱۰ ± ۰/۵ | $^{*}$۲ /۰۵ ± ۰/۱ | $^{*}$۱ /۸ ± ۰/۱ | $^{**}$۵۸ ± ۳ |

### نتایج مطالعه الگوی پروتئینی بذر و دانه گرده

بذرهای تولید شده توسط گیاهان شاهد و تحت تیمار با غلظت‌های مختلف ذرات خروجی خودروهای دیزل، از نظر الگوی باندهای پروتئینی مورد بررسی قرار گرفتند. پس از تهیه عصاره پروتئینی بذرهای گیاهان شاهد وتحت تیمار، الکتروفورز به روش SDS -PAGE انجام شد. نتایج نشان داد الگوی باندهای پروتئینی بذرها قابل رویت شده، و تعداد آن در کلیه گروه‌های تیماری و شاهد شبیه هم بود. تنها تفاوت قابل مشاهده در نمونه‌های تحت تیمار، افزایش تراکم در یکی از باندهای پروتئینی با وزن مولکولی ۶۲ کیلو دالتون بود. (شکل ۱).

نیمرخ پروتئینی دانه‌های گرده گیاهان تحت تیمار با ذرات خروجی خودروهای دیزل و گیاهان شاهد مورد مطالعه و مقایسه قرار گرفت. نتایج نشان داد که در دو گروه تیماری که تحت تاثیر ذرات خروجی خودروهای دیزل با غلظت ۰/۱ و ۰/۳ گرم بر لیتر قرار داشتند، نیمرخ پروتئینی تفاوت محسوسی نداشت. اما در گیاهانی که با غلظت ۰/۶ گرم بر لیتر ذرات خروجی خودروهای دیزل تحت تیمار قرار داشتند، تفاوت شاخصی ملاحظه گردید. در این گروه تیماری یک باند پروتئینی با وزن ملکولی ۵۵ کیلو دالتون ناپدید و در عوض باند جدیدی با وزن ملکولی ۸۰ کیلو دالتون پدیدار گردید (شکل ۲) .



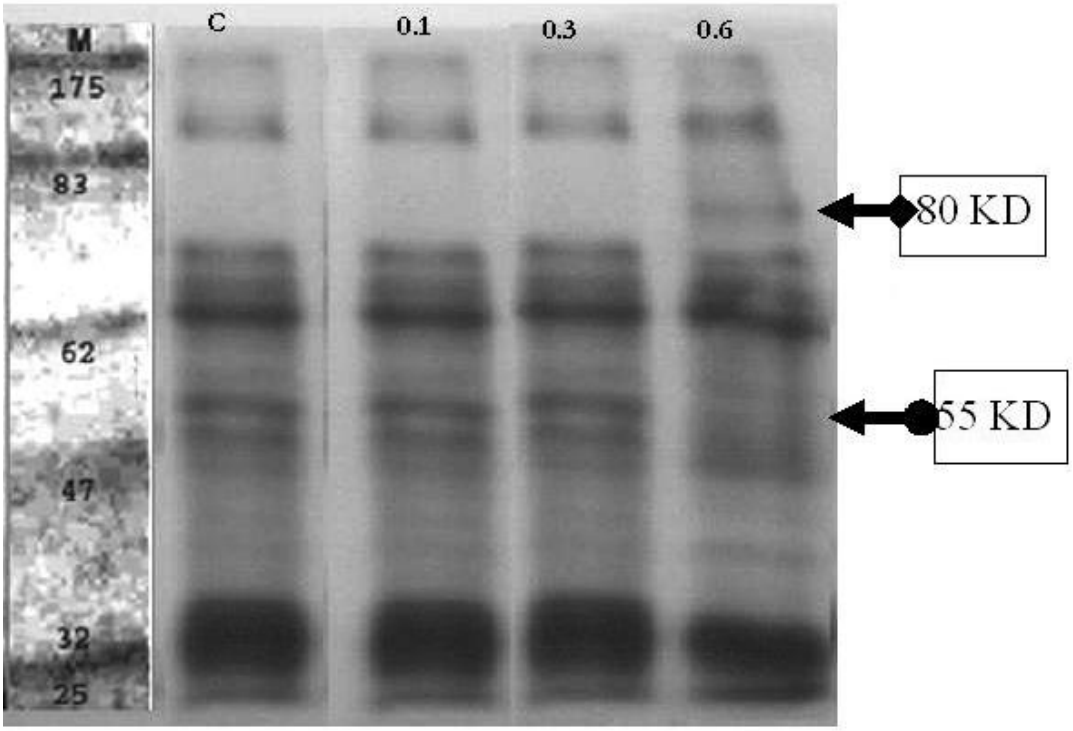
*شکل۱: نیمرخ پروتئین‌های بذر گیاه لوبیا در گروه‌های تیماری و شاهد: M مارکر پروتئینی ۱- گروه شاهد، ۲-گروه گیاهان تیمار شده با غلظت ۰/۱ گرم در لیتر، ۳- گروه گیاهان تیمار شده با غلظت ۰/۳ گرم در لیتر، ۴- گروه گیاهان تیمار شده با غلظت ۰/۶ گرم در لیتر ذرات خروجی خودروهای دیزل. افزایش تراکم و کمیت باند ۶۲ کیلودالتون از اثرات تیماری است.*



www.SID.ir

Archive of SID






*شکل ۲: نیمرخ پروتئینی دانه‌های گرده در گیاهان شاهد و تحت تیمار ذرات خروجی خودروهای دیزل. M مارکر پروتئینی، C گروه شاهد، ۰/۱، ۰/۳ و ۰/۶ گروه‌های تیماری با غلظت‌های مختلف DEP. ناپدید شدن باند ۵۵ کیلو دالتون و تشکیل باند جدید ۸۰ کیلو دالتونی از اثرات تیمار با DEP است.*

## بحث

در حال حاضر آلودگی هوا به یک معضل جهانی تبدیل شده است. ذرات خروجی از خودروهای دیزل یکی از عمده ترین آلاینده‌های هوا هستند که مشکل عمده‌ای در بسیاری از کشورها به ویژه کشورهای در حال توسعه محسوب می‌شود (۵، ۱۰، ۱۹). آلودگی هوا با ذرات خروجی خودروهای دیزل موجب آسیب به موجودات زنده، انسان و اندام‌های گیاهی می‌شود (۱۴-۱۲). هدف پژوهش حاضر یافتن برخی اثرات DEP بر ویژگی‌های رشدی گیاهان و پاسخ‌های احتمالی سلولی است.

در پژوهش حاضر، پس از ۲۰ روز تیمار گیاهان با محلول‌های حاوی غلظت‌های مختلف ذرات خروجی خودروهای دیزل، وزن خشک بخش هوایی (زی توده) و وزن تر بخش هوایی در گیاهان شاهد و تحت تیمار مورد مقایسه قرار گرفت و نتایج نشان داد که تیمار با ذرات خروجی خودروهای دیزل موجب کاهش وزن تر بخش هوایی در کلیه تیمارها و کاهش وزن خشک هوایی در گروه تیماری با غلظت ۰/۶ گرم بر لیتر DEP می‌شود که این کاهش و اختلاف بین گروه‌های تیماری و شاهد از نظر آماری معنی‌دار ($P \leq ۰/۰۵$)می‌باشد ( جدول ۱). مفهوم این نتایج این است که ذرات DEP در اغلب غلظت‌های مورد استفاده موجب کاهش محتوای آب گیاه شده و به همین دلیل وزن تر کاهش معنی‌داری را نشان می‌دهد، ولی فقط غلظت ۰/۶ گرم بر لیتر DEP است که مانع از رشد طبیعی و کامل گیاهان تحت تیمار بوده، برای آنها مسمومیت ایجاد نموده و موجب کاهش معنی دار وزن خشک نیز شده است که با برخی گزارش‌های پیشین در مورد تاثیر ذرات DEP برشاخصه‌های رشد همسو است (۱۲،۱۳،۱۴، ۵، ۲۱، ۲۰). همچنین گزارش‌های مشابهی در مورد تاثیر آلودگی هوا (۱۳، ۲۲) و باران اسیدی (۲۳) بر وزن خشک گیاهان در دسترس است. از آنجاییکه مشخص شده گیاهان تحت تنش از استراتژی تمایز زودرس و سریعتر استفاده می‌کنند (۲۳)، می‌توان نتایج فوق را این گونه تفسیر کرد که تمایز سریعتر در تیمار با آلاینده موجب تسریع در تمایز توام با ماده سازی سریعتر شده است و بنابر این با وجود تفاوت در وزن تر تفاوت در وزن خشک گروه‌های تیماری و شاهد به جز در یک مورد معنی‌دار نیست و در مورد اخیر (۰/۶ گرم در لیتر) شدت تیمار به حدی بوده که مسمومیت ایجاد کرده و مانع ماده سازی شده است.

یافته‌های ما نشان داد تیمار با اغلب غلظت‌های مورد استفاده ذرات خروجی خودروهای دیزل بر سایر ویژگی‌های رویشی و


www.SID.ir

Archive of SID



زایشی شامل وزن خشک نیام، اندازه نیام و سطح برگی تاثیر مشهودی نداشت به طوری که در گروههای تحت تیمار با غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۳ گرم بر لیتر DEP، در مقایسه با گروه شاهد کاهش معنی‌داری در ویژگی های فوق الذکر مشاهده نگردید ($P \leq ۰/۰۵$) ( جدول ۱) و فقط در گروه تیمار شده با غلظت ۰/۶ گرم بر لیتر DEP تفاوت معنی‌دار مشاهده گردید. می‌توان نتیجه گرفت که آلاینده مورد مطالعه در غلظت‌های کمتر از ۰/۶ گرم بر لیتر در حد آستانه مسمومیت برای گیاه لوبیا قرار ندارد. از آنجائی‌که گزارش شده غلظت‌های کمتری از آلاینده‌ها نیز موجب اثرات سوء در گیاهان از قبیل مهار متابولیسم (۲۴)، مهار کلروپلاست (۱۴) و عملکرد گیاهان مختلف (۱۲) شده است، می‌توان نتیجه گرفت که گیاه لوبیا و واریته مورد مطالعه نسبت به آلودگی هوا و به ویژه ذرات DEP از مقاومت نسبی بالایی برخوردار است و فقط تیمار سنگین (۰/۶ گرم در لیتر) می‌تواند منجر به مسمومیت در آن گردد.

اندازه‌گیری درصد جوانه‌زنی بذر تهیه شده از گروههای تیماری و شاهد نشان داد که ذرات خروجی خودروهای دیزل موجب افت چشمگیر درصد جوانه زنی بذر در گروه تیمار شده با غلظت ۰/۶ گرم بر لیتر DEP شده است. به نظر می‌رسد رویش بذر و تکوین رویان درون آن از حساسیت بیشتری نسبت به آلودگی با ذرات DEP برخوردار است و به همین دلیل کاهش جوانه‌زنی در تیمار فوق چشمگیر تر و از نظر آماری معنی‌دار است ($p \leq 0.01$). مطالعات و پژوهش‌های قبلی نیز وجود دارد که نشان داده تکوین تخمک و رویان یک مرحله بحرانی از زندگی گیاه بوده و نسبت به آلاینده‌های زیست محیطی حساسیت بیشتری دارد و اگر چه تشکیل دانه‌ها را از نظر تعداد و اندازه تحت تاثیر قرار نمی‌دهد ولی موجب تشکیل دانه‌های ناهنجار و با قدرت رویش پایین می‌گردد (۲۵، ۲۶). یافته‌های قبلی ما(۲۷) نیز نشان داده تکوین کیسه رویانی و تخمک در گیاه لوبیا از حساسیت بالایی نسبت به ذرات خروجی خودروهای دیزل برخوردار است که فقط با مطالعات میکروسکپی قابل مطالعه و آشکارسازی است، اما در همین مورد نیز تیمار ۰/۶ گرم در لیتر از آستانه مسمومیت فراتر می‌رود.

بررسی الگوی باندهای پروتئینی بذر در گیاهان تحت تیمار با غلظت‌های مختلف ذرات خروجی خودروهای دیزل و گیاهان شاهد نشان داد، که الگوی باندهای پروتئینی بذر در کلیه گروه‌ها (اعم از تیماری و شاهد) شبیه هم بودند و تفاوت محسوسی در تعداد و الگوی باندها مشاهده نگردید. تنها تفاوت مشاهده شده این است که در گروه تحت تیمار با غلظت ۰/۶ گرم در لیتر، افزایش تراکم در یکی از باندها با وزن مولکولی ۶۲ کیلو دالتون دیده شد (شکل ۱). این اثر در کلیه تکرارهای آزمایش مشاهده گردید. یافته مشابهی در مورد اثر تیمارهای مشابه با باران اسیدی بر پروتئین‌های بذر لوبیا گزارش شده است (۲۵). به نظر می‌رسد که پروتئین فوق در حفظ سلامت دانه در برابر اثرات سمی ذرات خروجی از خودروهای دیزل نقش مهمی دارد (۵).

در گیاهان تحت تیمار با ذرات خروجی خودروهای دیزل و شاهد الگوی پروتئینی دانه‌های گرده نیز مورد مطالعه و مقایسه قرار گرفت. نتایج نشان داد که در دو گروه تیماری که تحت تاثیر ذرات خروجی خودروهای دیزل با غلظت ۰/۱ و ۰/۳ گرم بر لیتر قرار داشتند، نیمرخ پروتئینی تفاوت محسوسی نداشت. اما در گیاهان گروه تیماری که با غلظت ۰/۶ گرم بر لیتر ذرات خروجی خودروهای دیزل قرار داشتند، تفاوت شاخصی ملاحظه گردید. به این ترتیب که در این گروه تیماری، یک باند پروتئینی با وزن ملکولی ۵۵ کیلو دالتون ناپدید و در عوض باند جدیدی با وزن ملکولی ۸۰ کیلو دالتون پدیدار شد (شکل ۲). به نظر می‌رسد در دو غلظت کمتر (۰/۱ و ۰/۳ گرم بر لیتر) ذرات خروجی خودروهای دیزل، اثر القایی ذرات فوق بر بیان ژن‌ها و تشکیل پروتئین‌های جدید کافی و موثر نیست، اما غلظت ۰/۶ گرم در لیتر توانسته اثر القایی خود را بر ژنوم اعمال و موجب تشکیل پروتئین جدیدی در دانه‌های گرده گردد. این یافته ما با برخی گزارشات قبلی در مورد اثرات ذرات DEP بر پروتئین های دانه گرده همسویی دارد (۵)، ولی در تناقض با برخی از گزارش‌ها در مورد دانه‌های گرده سایر گیاهان است (۲۷). احتمالا این اختلاف مربوط به تفاوت در درجه حساسیت گونه‌های مختلف گیاهی نسبت به آلودگی است. از آنجائیکه بر اساس نتایج پژوهش حاضر می‌توان نتیجه گرفت که گیاه لوبیا، گیاه به نسبت مقاومی نسبت به آلاینده DEP است، می‌توان استنباط کرد که تغییرات پروتئینی مورد اشاره فقط در گونه‌های گیاهی مقاوم صورت می‌گیرد.

همانطور که در نتایج اثرات ذرات DEP بر فاکتورهای رشد دیده شد، ذرات DEP در تمام غلظت‌ها، فقط بر وزن تر اثر سوء نسبی داشته و آن را به طور معنی‌داری کاهش داده است. در مورد سایر فاکتورها (وزن خشک بخش هوایی، وزن خشک نیام، اندازه نیام، درصد جوانه‌زنی بذر و سطح برگی) اثر تیمار با کلیه غلظت‌های ذرات DEP محسوس و معنی‌دار نیست و فقط تیمار با ۰/۶ گرم بر لیتر اثر معنی دار دارد. با توجه به اثرات سوء متعدد گزارش



www.SID.ir

Archive of SID



شده برای DEP در انسان و جانوران (۹-۳) و با در نظر گرفتن تغییرات پروتئینی صورت گرفته در الگوی پروتئینی گیاهان تحت تیمار، به نظر می‌رسد که تشکیل پروتئین (پروتئین‌های) جدید و افزایش مقداری پروتئین‌ها به دلیل نقش ضد سمی این پروتئین‌ها است که باعث کاهش اثرات سوء و سمی ذرات DEP بر گیاهان تحت تیمار شده است. به عبارت دیگر گیاهان نسبت به جانوران از مقاومت بیشتری در برابر ذرات DEP از خود نشان می‌دهند. تغییر در الگوی کیفی پروتئینی و تشکیل باندهای جدید در گیاهان تحت تاثیر آلاینده‌های جوی در برخی پژوهش‌ها گزارش شده است (۵، ۷، ۸، ۲۸، ۲۹)، و نشان داده شده که این پروتئین‌های جدید در پاسخ به اثرات تنشی آلاینده‌ها تولید می‌شوند و آنها دارای اثرات ضد سمی و مسمومیت زدایی هستند (۲۶، ۳۰). تیمار با دی بنزو α پیرون که یکی از اجزای تشکیل دهنده ذرات خروجی خودروهای دیزل است، نیز در دانه‌های گرده آفتاب گردان اثر مشابهی را دارد (۱۷).

## نتیجه‌گیری

همانطور که در نتایج اثرات ذرات DEP بر فاکتورهای رشد دیده شد، ذرات DEP در تمام غلظت‌ها، فقط بر وزن تر اثر سوء نسبی داشته و آن را به طور معنی‌داری کاهش داده است. در مورد سایر فاکتورها (وزن خشک بخش هوایی، وزن خشک نیام، اندازه نیام، درصد جوانه‌زنی بذر و سطح برگی) اثر تیمار با کلیه غلظت‌های ذرات DEP محسوس و معنی‌دار نیست و فقط تیمار با ۰/۶ گرم بر لیتر اثر معنی‌دار دارد. با توجه به اثرات سوء متعدد گزارش شده برای DEP در انسان و جانوران (۹-۳) و با در نظر گرفتن تغییرات پروتئینی صورت گرفته در الگوی پروتئینی گیاهان تحت تیمار، به نظر می‌رسد که تشکیل پروتئین (پروتئین‌های) جدید و افزایش مقداری پروتئین‌ها به دلیل نقش ضد سمی این پروتئین‌ها است که باعث کاهش اثرات سوء و سمی ذرات DEP بر گیاهان تحت تیمار شده است. به عبارت دیگر موجب می‌شود گیاهان (به ویژه گیاه مورد مطالعه) نسبت به جانوران از مقاومت بیشتری در برابر ذرات DEP از خود نشان دهند.

## تشکر و قدردانی

مقاله حاضر بر اساس بخشی از نتایج پایان نامه کارشناسی ارشد (شیوا حسینی) در رشته علوم گیاهی گرایش سلولی- تکوینی نگارش شده است و انجام این پژوهش در دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد و با حمایت مالی آن انجام بوده است. مولفین مراتب تقدیر و تشکر خود را از معاونت و مدیر محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد برای تامین امکانات پژوهش حاضر اعلام می‌دارند.

## منابع

1. Mirsa K. C. Plant Ecology. Oxford and Ibh, UK. 1974.

2. Kumagai Y, Koide S, Taguchi K, Endo A, et al. Oxidation of proximal protein sulfhydryls by phenanthraquinone, a component of diesel exhaust particles. Chem Res Toxicol. 2002; 15: 483- 489.

3. Behrendt H, Becker WM. Localization and release from pollen by air pollutants. J Int Arch Allergy Immunol. 2001;113: 69-474.

4. Pandya RJ, Solomon G, Kinner A, Balmes JR. Diesel exhausts particles and asthma: hypotheses and molecular mechanisms of action. Environ Health Perspect Suppl. 2002; 110: 103-112.

5. Chehregani A, Kouhkan F. Diesel Exhaust Particles and allergenicity of pollen grain of Lilium martagon. Ecotoxicology and Environmental Safety. 2008; 69: 568-573.

6. Emberlin J. The effect of air pollution on allergic pollen. J Eur Respir Rev. 1998; 53: 164-167.

7. Chakraborty P, Gupta-Bhattacharya S, Chanda S. Comparative aerobiology, allergenicity and biochemistry of three palm pollen grains in Calcutta, Indian J. Aerobiology. 1996; 12: 47-50.

8. Chehregani A, Majde A, Gholami M, Shariatzadeh M, et al. Effect of air pollution on some cytogenetic characteristics, structure, viability and proteins of Zinnia elegans pollen grains. Pakistan J. Biological Science. 2004a; 7: 118-122.

9. Ruffin J, Williams D, Banerjee U, Pinnix K. The effect of some environmental gaseous pollutants on pollen-wall proteins of certain airborne pollen grains. J Grana. 1983; 22: 171-175.

10. Behrendt H, Becker WM, Friedrich KH, Ring J. Air pollution and allergy: experimental studies on modulation of allergen release from pollen by air pollutants. J Int Arch Allergy and Immunology. 1997; 113: 69-74.

11. Chehregani A, Majde A, Moin M, Gholami M, et al. Increasing allergy potency of Zinnia pollen grains in polluted areas. Ecotoxicology and Environmental Safety. 2004b; 58: 267-272.

12. Sverdrup EL, Hagen BS, Krogh PH, et al. Benzo (α) pyrene shows low toxicity to three species of terrestrial plants, two soil invertebrates, and soil-nitrifying bacteria. Ecotoxicology and Environmental safety. 2007; 66: 362-368.



www.SID.ir

Archive of SID



13. Majd A, Rezanejad F, Moin M, Aminzadeh M, et al. Air pollution effects on microsporogenesis, pollen development and pollen soluble in Spartium junceum L. (Fabaceae). Pajouhesh and Sazandeghi. 2004; 62: 10-17.

14. Kummerov M, Slovak L, Holoubek I. Phytotoxicity studies of Benzo (α) pyrene with Lactuca sativa. Toxicology and environmental chemistry.1995; 51: 197-203.

15. Rezanejad F. The effect of air pollution on microsporogenesis pollen development and soluble pollen proteins in Spartium junceum L. (Fabaceae). Turkish J. of Botany. 2007; 31: 183-191.

16. Rezaie A, Kamkar-Haghighi AA. Effect of water stress on Phaseolus vulgaris plants in different growth stages. Journal of Soil Research. 2009; 23: 117-124.

17. Baghali Z, Majd A, Chehregani A, Pourpak Z, et al. Cytotoxic effect of Benzo (α) pyrene on development and protein pattern of sunflower pollen grains. Toxicol. Environ. Chem. 2011; 93: 665-677.

18. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage $T_4$ . J Nature.1970; 227: 680-685.

19. Helander M.L, Savolainen J, Ahlholm J. Effects of air pollution and other environmental factors on birch pollen allergens. J Allergy. 1997; 52: 1207-1214.

20. Hwang BF, Lee YL, Lin YC, Jaakola JJ, et al. Traffic related air pollution as a determinant of asthma among Taiwanese school children. Thorax. 2005; 60: 467-473.

21. Knox RB, Suphioglu C. Environmental and molecular biology of pollen allergens. Trends Plant Sci. 1996; 1: 156-164.

22. Majd A, Chehregani A. Studies on Developmental processes in Ovules of Soja Glycine max L. Plants and effects of certain toxins and Environmental Pollutants, Acta Horticulture. 1992; 319: 431-436.

23. Chehregani A, Kavianpour F. Effects of acid rain on the developmental stages of ovules and seed proteins in Bean plants (Phaseolus vulgaris L.). American J Plant Physiology. 2006; 2: 367-372.

24. Kaiser WM, Hofler M, Heber U. Can plants exposed to SO2 excrete sulfuric acid through the roots? Physiol. Plant. 1993; 87: 61-67.

25. Chehregani A, Malayeri BE, Kavianpour F, Yazdi L. H. Effect of acid rain on the development, structure and viability of pollen grains in bean plants. Pakistan J. Biological Science. 2006; 9: 1033-1036.

26. Yousefi N, Chehregani A, Malayeri B, Lorestani B, et al. Effect of the heavy metals on the developmental stages of ovule and seed proteins in Chenopodium botrys L. (Chenopodiaceae). Biol Trace Elem Res. 2009. (In Press).

27. Chehregani A, Lari Yazdi H, Hoseini S, Majd A. Toxic effect of diesel exhaust particles on the ovule and embryonic sac development in Phaseolus vulgaris. Middle Eastern and Russian J Plant Science and Biotechnology. 2007; 1: 54-56.

28. Behrendt H, Becker WM, Friedrich KH, Ring J. Air pollution and allergy: experimental studies on modulation of allergen release from pollen by air pollutants. J. Int. Arch. Allergy Immunol. 1997;113: 69-74.

29. Clemens S. Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. Planta. 2001; 212: 475-486.

30. Cobbett C, Goldsbrough P. Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. Annual Review of Plant Biology. 2002; 53: 159-182.



www.SID.ir

Archive of SID

Journal of Cell & Tissue (JCT) *Research Article*
Spring 2011; 2(1): 57-66

# Study on toxic effects of diesel exhaust particles, on some growth factors and cellular responses (protein production) in the bean plant seeds and pollen

Chehregani A, Ph.D.[1*],Mohsenzadeh F, Ph.D.[1],Hosseini SH, M.Sc.[2]

1- Department of Biology, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran

2- M.Sc. Student, Department of Biology, Islamic Azad University, Broujerd Branch, Broujerd, Iran

* Email corresponding author: chehregani @basu.ac.ir

Received: 3 May. 2011 Accepted: 17 Aug. 2011

**Abstract**

**Aim:** Air pollution is a global problem that has negative effects on living organisms. The aim of this study was to investigate the effect of water soluble fraction of diesel exhaust particles (DEP) on some growth factors and scale of bean's protein.

**Material and methods:** Bean plants were cultivated in experimental condition and sprayed with 30 ml of different concentrations of DEP (0.1, 0.3, 0.6 g/L) and control plants were sprayed with distilled water. Growth factors such as wet and dry weights, length of legume, legume dry weight, seed germination and leaf area in DEP-treated and the control groups were compared with SPSS software and variance analysis. Pollen and seed proteins were studied with electrophoresis method.

**Results:** DEP treatments caused to decrease wet weights of the all DEP-treated plants ($P \leq 0.05$), but the other factors (pod length, dry pod weight, pod weight, seed germination and leaf surface) only in the treated group with a 0.6 g/L DEP was significantly reduced. Seed protein profiles were similar in the experimental and control samples, but an increase in the density of a band with molecular mass of 62 kDa was observed in the group treated with 0.6 g/L of DEP. In protein profile of pollen, a band with molecular mass of 55 kDa was disappeared and a new band with molecular mass of 80 kDa was formed.

**Conclusion:** With the consideration of reported detrimental effects for DEP, it seems that the bean plants are resistant that can be related to changes in protein banding profiles and cellular mechanisms of DEP detoxification.

**Key words**: Air Pollution, Growth factors, Protein, Beans


www.SID.ir