دوماهنامه علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۳۰، شمارهٔ ۱، صفحهٔ ۸۳-۶۸ (۱۳۹۳)

اثرات غلظت‌های مختلف سرب و مس بر مقدار مالون‌دآلدهید، پرولین و فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز در گیاه دارویی خرفه (*Portulaca oleracea* L.)

مه‌لقا قربانلی[1*] و عادله کیاپور[2]

۱*- نویسنده مسئول، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرگان، پست الکترونیک: mghorbanli@goganiau.ir
۲- کارشناس ارشد علوم گیاهی، دانشگاه پیام‌نور، مرکز تهران

تاریخ دریافت: شهریور ۱۳۸۹ تاریخ اصلاح نهایی: اردیبهشت ۱۳۹۱ تاریخ پذیرش: خرداد ۱۳۹۱

چکیده

گیاه خرفه (*Portulaca oleracea* L.) متعلق به تیره Portulacaceae، عموماً به‌عنوان علف هرز شناخته شده و از نقطه نظر فیزیولوژیکی دارای قابلیت تحمل‌پذیری بسیار بالا در محیط‌های شور یا آلوده به فلزات سنگین بوده و گیاه مناسبی جهت کاشت و پالایش محیط و خاک از این گونه تنش‌ها به‌شمار می‌رود. به‌منظور نشان دادن اثرات دو فلز سنگین سرب و مس بر مالون‌دآلدهید، پرولین و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان آزمایشهایی در طرحی کاملاً تصادفی اجرا شد. بدین منظور پس از کاشت گیاهان با شرایط یکسان در بستر استریل لیکا و تغذیه آنها با محلول غذایی هوگلند، تیمارهایی با غلظت‌های متفاوت (۰، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰ میکرومولار) از نمک دو فلز سنگین سرب ($Pb(NO_3)_2$) و مس ($CuSO_4.5H_2O$) به‌صورت جداگانه و همگی در سه تکرار به گیاهان اعمال گردید. پس از ده روز اعمال تیمار گیاهان جهت انجام آزمایشها برداشت شدند. نتایج نشان داد که جذب فلزات سرب و مس در تیمارهای دارای غلظت بالا در مقایسه با نمونه شاهد افزایش دارد. میزان جذب اتمی این عناصر در نمونه‌های ریشه بیشتر از اندام هوایی بود. میزان مالون‌دآلدهید در اندام هوایی و ریشه هر دو تنش سرب و مس از نمونه شاهد به سمت غلظت‌های بالا به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. میزان اسید آمینه پرولین در هر دو تنش سرب و مس و هر دو قسمت اندام هوایی و ریشه به‌طور معنی‌دار روند افزایشی داشت. فعالیت آنزیم پراکسیداز در هر دو تنش سرب و مس و هر دو قسمت اندام هوایی و ریشه روند افزایشی و آنزیم کاتالاز روند کاهشی را به‌طور معنی‌دار نشان داد. به‌طور کلی میزان مالون‌دآلدهید، پرولین و فعالیت آنزیم پراکسیداز در نمونه‌های ریشه بیشتر از اندام هوایی بود و این نتیجه نشان داد که ریشه در گیاه خرفه جمع‌کننده عمده فلزات سنگین سرب و مس است. کمتر بودن فعالیت آنزیم کاتالاز در ریشه نسبت به اندام هوایی، حساسیت این آنزیم را نسبت به تجمع زیاد سرب و مس در ریشه اثبات نمود.

واژه‌های کلیدی: خرفه (*Portulaca oleracea* L.)، فلزات سنگین، سرب، مس، پالایش گیاهی.

مقدمه

امروزه به‌دلیل گسترش صنایع، حفر معادن، استخراج فلزات، تخلیه فاضلاب‌ها و انهدام زباله‌ها، استفاده از کودهای شیمیایی، آفت‌کش‌ها و حشره‌کش‌ها در کشاورزی، پساب‌های صنعتی و لجن فاضلاب‌ها شاهد رهاسازی فلزات سنگین به محیط زیست هستیم. فلزات سنگین مشکلات جدی برای محیط زیست بوجود آورده‌است. سرب و مس دو گونه از این فلزات هستند که

Archive of SID
www.SID.ir

علاوه‌بر آلودگی محیط زیست، درون بافت‌های گیاهی تجمع می‌یابند و باعث سمّیت گیاهی می‌شوند. به تکنولوژی استفاده از گیاهان انباشت کننده فلزات برای جذب فلزات از خاک و انتقال آنها به شاخه‌های قابل برداشت گیاهان، پالایش گیاهی گویند (Tiwari *et al*., 2008؛ Deepa *et al*., 2006؛ Mohanapriya, 2006).

گیاه خرفه (*Portulaca oleracea*) متعلق به زیر رده Caryophyllidae، که عموماً به‌عنوان علف هرز شناخته می‌شود، در بیشتر اقلیم‌ها به‌خصوص آب و هوای گرم و خشک یا استپی قادر به رویش است. این گیاه دارای بوته‌های علفی، خوابیده و گوشتی با ساقه‌های بدون کرک، گوشتی و اغلب قرمز رنگ می‌باشد. به‌دلیل تجمع زیاد آب در برگ‌ها برای رفع گرمازدگی، التهاب، آفتاب‌سوختگی و یا دردهای سوختگی مورد استفاده دارد. در برخی از منابع خواص درمانی دیگری ازجمله درمان کوفتگی، رفع میخچه و خواص تب‌بری را برای آن ذکر کرده‌اند و این خواص ضدالتهابی را به اسیدهای چرب امگا-۳ و امگا-۶ در آن نسبت داده‌اند (Teixeirats *et al*., 2010).

آزمایش‌های فیتوشیمیایی عصاره‌ی خرفه نشان داد که این گیاه یک منبع غنی از اسیدهای چرب امگا-۳ و امگا-۶، موسیلاژ، ویتامین‌های آ، ب، ث، آلفا-توکوفرول، اسکوربیک اسید، بتا-کاروتن، گلوتاتیون، آلفا-لینولئیک اسید، پروتئین، ساکارید، پکتین، موسیلاژ، نورآدرنالین، دوپامین، مواد معدنی شامل کلسیم، پتاسیم، آهن، فسفر، منگنز، مس و اسیدهای آلی شامل سینامیک اسید، کافئیک اسید، مالیک اسید، اگزالیک اسید، سیتریک اسید و نیز شامل کومارین‌ها، فلاوونوئیدها و گلیکوزیدهای آنتراکینونی می‌باشد (Chan *et al*., 2000). خاصیت التیام بخشیدن به زخم توسط عصاره‌ی خرفه نیز گزارش شده‌است. قابل‌ذکر است که هیچ نشانه سمّی قابل‌توجهی هنوز در ارتباط با این گیاه گزارش نشده‌است (Okwuasaba *et al*., 1987b؛ Okwuasaba *et al*., 1986؛ Okwuasaba *et al*., 1987a). در مطالعه‌ای برای فلاوونوئیدها اثر ضددردی و ضدالتهابی گزارش شده‌است. عصاره‌ی الکلی و آبی این گیاه دارای اثرات مختلفی بر روی سیستم عصبی است که شامل کاهش فعالیت حرکتی، اثرات ضدتشنجی، مهار انقباضات عصبی عضلانی به‌دنبال تحریک الکتریکی و فعالیت شل‌کنندگی عضلانی در رت‌های هوشیار می‌باشد. این گیاه به‌عنوان آنتی‌سپتیک، ضد اسکوربوت، ضد اسپاسمودیک، ضد دیورتیک، ضد کرم روده‌ای، ضدتب، شل‌کننده‌ی عضلانی، آنتی‌اکسیدان، تصفیه‌کننده‌ی خون و در جلوگیری از حمله قلبی و تقویت سیستم ایمنی کاربرد درمانی دارد (Chan *et al*., 2000؛ Okwuasaba *et al*., 1987c؛ Rashed *et al*., 2003).

خرفه گیاهیست که مردم چین از آن به‌عنوان داروی ضددیابت استفاده می‌کنند (Meng & Wu, 2008). پلی‌ساکاریدهای این گیاه POP (*Portulaca oleracea* Polysaccharides) نام دارند که اخیراً از آنها فعالیت‌های فیزیولوژیکی و فارماکولوژیکی زیادی شناخته‌اند. Li و همکاران (۲۰۰۹) با بررسی پلی‌ساکاریدهای گیاه خرفه دریافتند که این ماده ضد افزایش گلوکز خون است. دوز ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم POP بیشترین اثر را در پایین آوردن قند خون در موش‌های آزمایشگاهی دیابتیک نشان داد. علاوه‌بر این دوز ۲۰۰ تا ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم این ماده توانست سطح انسولین سرمی موش‌های آزمایشگاهی دیابتیک را تا حد قابل‌توجهی بالا ببرد. همان‌طور که می‌دانیم بیماران مبتلا به دیابت علاوه‌بر هایپرگلایسمی دچار هایپرلیپیدمی هم هستند. زیرا کاهش سطح لیپولیز (تجزیه چربی) نیز تحت تأثیر انسولین است

Archive of SID

www.SID.ir

(Sharma *et al*., 2003). استفاده از مکمل خوراکی POP در موش‌های آزمایشگاهی دیابتیک باعث کاهش قابل‌توجهی در سطح چربی سرمی نسبت به گروه شاهد شد که ضد هایپرلیپیدمی بودن POP را اثبات می‌کند. POP با بستن کانال‌های K^+-ATP، دپلاریزاسیون غشاء سلولی و تحریک انتشار به درون یون Ca^{2+} ترشح انسولین را القا می‌نمایند (Ryle *et al*., 1984).

اثر سمّی فلزات سنگین ازجمله مس و سرب مربوط به تنش‌های اکسیداتیو ثانویه است که به افزایش تولید گونه‌های مضر و فعال اکسیژن (ROS) منجر می‌گردد (Nasim & Dhir, 2010 ؛Pandey *et al*., 2009). این گونه‌های مضر و فعال شامل رادیکال‌های هیدروکسیل ($OH^{\cdot}$)، فنوکسی($RO^{\cdot}$)، پراکسی ($ROO^{\cdot}$)، سوپراکسید ($O_2^{\cdot-}$)، هیدروژن پراکسید (H_2O_2)، و اکسیژن یکتایی ($^1O_2^{\cdot}$) است. مس فلزی ردوکس- فعال است که از طریق واکنش فنتون تولید رادیکال هیدروکسیل را تسریع می‌نماید. به‌علاوه فلزاتی چون روی و سرب ردوکس- غیرفعال یا غیرردوکس هستند که منابع آنتی‌اکسیدان سلولی را غیرفعال کرده و به تعادل متابولیکی صدمه وارد می‌کنند. در نتیجه هر دو فلز سرب و مس باعث افزایش تولید ROS می‌شوند (Choudhary *et al*., 2007). تولید رادیکال‌های آزاد نتیجه انواع مختلفی از شرایط استرس‌زاست (Apel & Hirt, 2004). گونه‌های فعال اکسیژن به غشاء پلاسمایی صدمات اکسیداتیو می‌زنند. در نهایت، به‌دلیل فعالیت پراکسیدی تجزیه اسیدهای چرب غیراشباع صورت گرفته و یون‌های پراکسید و مالون‌دآلدهید آزاد می‌شود که در نهایت باعث مرگ سلول می‌گردد (Choudhary *et al*., 2007 ؛Hall, 2002). اسیدآمینه پرولین به مقدار زیاد در گیاهان تحت شرایط تنش تولید شده و باعث محافظت از گیاه در مقابل صدمات می‌گردد (Posmyk *et al*., 2008؛ Wang *et al*., 2009). کاتالاز و پراکسیداز نیز متالوآنزیم‌هایی هستند که اثر تخریب یون‌های سوپراکسید را دفع می‌کنند. این آنزیم‌ها سیستم دفاعی را جهت بقاء موجودات هوازی فراهم می‌آورند (Pandey *et al*., 2009؛ Posmyk *et al*., 2008؛ Srivastava *et al*., 2006).

در رابطه با تحقیقات گذشته در مورد گیاه خرفه می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

بیان ژن آنزیم امگا-۳ فتی اسید دساچوراز در بافت‌های مختلف گیاه خرفه و در پاسخ به تنش‌های سرما و خوردگی بررسی گردید (Teixeirats *et al*., 2010) و خاصیت ضددیابتی پلی‌ساکاریدهای گیاه خرفه شناسایی شد (Li *et al*., 2009). قابلیت پالایش گیاهی در دو گونه متفاوت از گیاه خرفه (*Portulaca tuberosa* rox) و (*Portulaca oleracea* L.) مطالعه شد و تغییرات رشد طبیعی آنها در اماکن صنعتی هندوستان مورد بررسی قرارگرفت (Tiwari *et al*., 2008). میزان تجمع فلز سنگین مس در گیاه خرفه و دو نوع خاک مورد بررسی قرار گرفت و قابلیت قلمه‌های ساقه به‌عنوان جمع‌کننده این فلز اثبات گردید (Deepa *et al*., 2006). تأثیر نمک‌های سولفات مس و نیترات مس در محیط آبی و به‌طور مقایسه‌ای بر قابلیت تجمع فلز مس مورد مطالعه قرار گرفت و خرفه به‌عنوان گیاهی دارویی معرفی شد (Mohanapriya *et al*., 2006).

به دلیل فراوانی بذر و انتشار آسان گیاه خرفه، همچنین تحمل بالا به خشکی، شوری و فلزات سنگین (Deepa *et al*., 2006 ؛Tiwari *et al*., 2008) بررسی این علف هرز به‌عنوان گیاه انباشت‌کننده فلزات سنگین

Archive of SID

www.SID.ir

و استفاده از آن در تکنولوژی موسوم به پالایش گیاهی (Phytoremediation) جالب به نظر می‌رسد. همچنین بررسی نحوه واکنش آن نسبت به غلظت‌های افزایش‌یافته سرب و مس در ارتباط با مکانیسم‌های دفاعی این گیاه از اهداف این پژوهش است.

مواد و روشها

این پژوهش براساس طرحی کاملاً تصادفی با سه تکرار در شرایط گلخانه‌ای انجام شد که در آن گیاهان در معرض تنش فلز سنگین سرب و مس قرار گرفتند. بذرهای مورد استفاده گیاه خرفه از مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج در بهار ۱۳۸۸تهیه گردید.

ابتدا بذرها توسط محلول ۵٪ هیپوکلریت سدیم به مدت ۵ دقیقه ضدعفونی و سپس سه مرتبه توسط آب مقطر شستشو داده شدند. بذرها بعد از سترون‌سازی به‌منظور تولید دانه‌رست در ظروف محتوی لیکا (دانه‌های رس سبک منبسط شده) کاشته شدند و تا زمان تولید دانه رست‌هایی به طول ۸ سانتی‌متر با آب مقطر آبیاری و پس از آن جهت رشد با محلول غذایی هوگلند، (Hogland & Arnon, 1950)، تغذیه گردیدند.

در مرحله بعد تیمارهایی با غلظت‌های متفاوت ۰، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰ میکرومولار از نمک دو فلز سنگین سرب ($Pb(NO_3)_2$) و مس ($CuSO_4.5H_2O$) به‌صورت جداگانه تولید شده و تیماردهی به مدت ده روز انجام گرفت. گیاهان جمع‌آوری و به خوبی با آب مقطر شستشو داده شدند. پس از خشک شدن، اندام هوایی و ریشه از محل یقه جدا و از آنها جهت انجام آنالیزهای مختلف استفاده شد. این آنالیزها شامل اندازه‌گیری دو فلز سنگین، سنجش مقدار مالون‌دآلدهید، سنجش مقدار پرولین، استخراج عصاره پروتئینی و اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی بود که در اندازه‌گیری دو فلز سنگین از وزن خشک اندام هوایی و ریشه و در بقیه سنجش‌ها از وزن تر اندام هوایی و ریشه گیاه استفاده شد.

اندازه‌گیری میزان عناصر

نمونه‌های خشک گیاهی تهیه شده از اندام هوایی و ریشه دو تیمار شاهد و ۱۵۰۰ میکرومولار، جهت سنجش دقیق عناصر و مقایسه میزان جذب توسط مخلوطی از $HCl:HNO_3$ به مدت یک ساعت در بن‌ماری ۹۵ درجه سانتی‌گراد هضم شدند. بعد از طی زمان لازم، نمونه‌ها خنک و صاف شدند. غلظت عناصر با استفاده از دستگاه جذب اتمی مدل Spectra An-200 اندازه گرفته و بر حسب ppm بیان شد (Allen *et al*., 1986؛ Morghan, 1993).

اندازه‌گیری مقدار مالون‌دآلدهید

طبق این روش (Heath & Packer, 1969)، ۰/۲ گرم از بافت تازه برگ یا ریشه را توزین و در هاون چینی حاوی ۵ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید (TCA) ۰/۱٪ ساییده شد. عصاره حاصل با استفاده از دستگاه سانتریفوژ به مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰g سانتریفوژ گردید. به ۱ میلی‌لیتر از محلول رویی حاصل، ٤/۵ میلی‌لیتر از محلول TCA که حاوی ۰/۵٪ تیوباربیتوریک اسید (TBA) بود، اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد حمام آب گرم حرارت داده شد. سپس بلافاصله در یخ سرد و دوباره مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰g سانتریفوژ گردید. جذب این محلول با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۳۲ نانومتر خوانده شد. غلظت کمپلکس MDA-TBA با استفاده از معادله $A= \varepsilon BC$ محاسبه شد، که در آن A: جذب خوانده شده در دستگاه اسپکتروفتومتر، ε: ضریب خاموشی معادل

Archive of SID

www.SID.ir

$cm^{-1}mM^{-1}$ ۱۵۵، B: عرض کووت برابر ۱ سانتی‌متر و C: غلظت کمپلکس بر حسب $\mu molg^{-1}FW$ می‌باشد.

اندازه‌گیری مقدار پرولین

طبق روش Bates و همکاران (۱۹۷۳) ۰/۵ گرم از بافت تر گیاهی توزین و در هاون چینی حاوی ۱۰ میلی‌لیتر سولفوسالیسیلیک اسید ساییده شد. مخلوط همگن بدست آمده با استفاده از کاغذ واتمن شماره ۲ صاف گردید. از هر کدام از محلول‌های حاصل ۲ میلی‌لیتر برداشته شد و در لوله‌های آزمایش ریخته شد و سپس به هر یک ۲ میلی‌لیتر معرف نین‌هیدرین و ۲ میلی‌لیتر استیک اسید خالص افزوده شد. لوله‌ها به مدت یک ساعت در بن‌ماری ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد و سپس در حمام یخ قرار گرفت. به هر کدام از لوله‌ها ۲ میلی‌لیتر تولوئن افزوده و به شدت تکان داده شدند. آنگاه ۲۰ ثانیه در حال سکون نگه داشته شد تا دو فاز کاملاً مجزا تشکیل گردید. مقدار معینی از لایه رنگی فوقانی جهت سنجش غلظت پرولین در دستگاه اسپکتروفتومتر قرار گرفت و جذب آن در طول موج ۵۳۲ نانومتر خوانده شد. با استفاده از منحنی استاندارد پرولین مقدار این ماده بر حسب $\mu molg^{-1}FW$ محاسبه شد.

استخراج عصاره پروتئینی

مقدار یک گرم از اندام هوایی و ریشه به‌صورت جداگانه در هاون چینی محتوی ۵ میلی‌لیتر بافر تریس HCl ۰/۰۵ مولار با ۷/۵pH به مدت ۳۰ دقیقه در حمام یخ کاملاً ساییده شد. همگنای حاصل پس از ۱۰ دقیقه سکون، مدت ۲۰ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور و دمای ٤ درجه سانتی‌گراد با استفاده از دستگاه سانتریفوژ یخچال‌دار، سانتریفوژ گردید. در پایان لوله‌ها به آرامی از دستگاه خارج و محلول رویی از چند لایه صافی عبور داده شد (Sudhakar *et al.*, 2001). عصاره‌های پروتئینی حاصل برای بررسی میزان فعالیت آنزیم‌ها مورد استفاده قرار گرفت.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز

پس از استخراج عصاره پروتئینی، مقدار ۲ میلی‌لیتر بافر تریس ۱۰۰ میلی‌مولار با ۷pH، ۰/۳ میلی‌لیتر آب اکسیژنه ۵ میلی‌مولار و ۰/۲ میلی‌لیتر پیروگالل ۱۰ میلی‌مولار، در حمام یخ با ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی مخلوط و پس از ۲ دقیقه تغییرات جذب در طول موج ٤۲۵ نانومتر خوانده شد و بر حسب $\mu mol\ (H_2O_2)\ mg^{-1}\ (protein)\ min^{-1}$ بیان گشت (Kar & Mishra 1976).

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز

پس از استخراج عصاره پروتئینی، مقدار ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با pH برابر ۷ و ۰/۳ میلی‌لیتر آب اکسیژنه ۳٪ را در حمام یخ با ۰/۲ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی مخلوط و پس از ۲ دقیقه تغییرات جذب در طول موج ۵۳۰ نانومتر خوانده شد و بر حسب $\mu mol\ (H_2O_2)\ mg^{-1}\ (protein)\ min^{-1}$ بیان گشت (Aebi, 1984).

نتایج

پس از انجام محاسبات با استفاده از برنامه آماری spss، نتایج زیر بدست آمد. مقایسه جذب اتمی نمونه‌های شاهد و ۱۵۰۰ میکرومولار دو فلز سنگین سرب و مس در دو بافت اندام هوایی و ریشه نشان داد که در نمونه‌های شاهد اندام هوایی غلظت فلز مس ٤۸۷/٦۷ و بیشتر از غلظت فلز سرب ۱۱۰/۰ است. در نمونه‌های شاهد ریشه غلظت فلز مس ۵۲۲/٦۷ و بیشتر از غلظت فلز سرب

Archive of SID

www.SID.ir

۱۵٦/۰ است. در نمونه‌های تیمار ۱۵۰۰ میکرومولار غلظت فلز سرب در ریشه گیاه برابر ٤۹۲۵/۰ و تقریباً سه برابر اندام هوایی با غلظت برابر ۱۲۷۵/٦۷ است. غلظت فلز مس در ریشه گیاه برابر ۳۸۰۵/٦۷ و نسبت به اندام هوایی با غلظت برابر ۲۲۰۷/٦۷ تقریباً ۳ به ۲ است (جدول ۱). افزایش معنی‌دار غلظت مالون‌دآلدهید در بیشتر تیمارها نسبت به نمونه شاهد دیده شد. غلظت مالون‌دآلدهید در نمونه‌های شاهد اندام هوایی و ریشه تیمار دیده با محلول نمک فلز مس به‌ترتیب برابر ۰/۰۲٤ و ۰/۰۲۸ بدست آمد که به ۰/۰۲۹ و ۰/۰۳۳ در نمونه‌های تیمار دیده با غلظت ۱۵۰۰ میکرومولار افزایش یافت. غلظت این ماده در نمونه‌های شاهد اندام هوایی و ریشه تیمار دیده با محلول نمک فلز سرب به‌ترتیب برابر ۰/۰۲۳ و ۰/۰۲۷ بدست آمد که به ۰/۰۲۸ و ۰/۰۳۲ در نمونه‌های تیمار دیده با غلظت ۱۵۰۰ میکرومولار افزایش یافت. بنابراین غلظت مالون‌دآلدهید در تنش مس اندکی بیشتر از سرب و در ریشه بیشتر از اندام هوایی بدست آمد (جدول ۲). افزایش کاملاً معنی‌دار غلظت پرولین در همه تیمارها نسبت به نمونه شاهد، هم در اندام هوایی و هم در ریشه و هر دو تنش سرب و مس دیده شد. غلظت پرولین در نمونه‌های شاهد اندام هوایی و ریشه تیمار دیده با محلول نمک فلز مس به‌ترتیب برابر ۰/۰۰۰۱ و ۰/۰۰۰۲ بدست آمد که بتدریج افزایش یافت و به ۰/۰۰۹۸ و ۰/۰۱٤٤ در نمونه‌های تیمار دیده با غلظت ۱۵۰۰ میکرومولار رسید. غلظت این ماده در نمونه‌های شاهد اندام هوایی و ریشه تیمار دیده با محلول نمک فلز سرب به‌ترتیب برابر ۰/۰۰۰۰۸ و ۰/۰۰۰۱ بدست آمد که بتدریج افزایش یافت و به ۰/۰۰٤۳ و ۰/۰۰۷۲ در نمونه‌های تیمار دیده با غلظت ۱۵۰۰ میکرومولار رسید. به این معنا که غلظت پرولین در تنش مس بیشتر از سرب و در ریشه بیشتر از اندام هوایی بدست آمد (جدول ۳). افزایش کاملاً معنی‌دار فعالیت آنزیم پراکسیداز در همه تیمارها نسبت به نمونه شاهد، هم در اندام هوایی و هم در ریشه و هر دو تنش سرب و مس دیده شد. فعالیت پراکسیداز در نمونه‌های شاهد اندام هوایی و ریشه تیمار دیده با محلول نمک فلز مس به‌ترتیب برابر ۰/۷۷۱ و ۰/۷۹۸ بدست آمد که به ۰/۸۰۸ و ۰/۸۳۵ در نمونه‌های تیمار دیده با غلظت ۱۵۰۰ میکرومولار افزایش یافت. غلظت این ماده در نمونه‌های شاهد اندام هوایی و ریشه تیمار دیده با محلول نمک فلز سرب به‌ترتیب برابر ۰/۷۱۰ و ۰/۷۲۲ بدست آمد که به ۰/۷۳۳ و ۰/۷٤۰ در نمونه‌های تیمار دیده با غلظت ۱۵۰۰ میکرومولار افزایش یافت. یعنی میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در تنش مس بیشتر از سرب و در ریشه بیشتر از اندام هوایی است (جدول ٤). کاهش کاملاً معنی‌دار فعالیت آنزیم کاتالاز در همه تیمارها نسبت به نمونه شاهد، هم در اندام هوایی و هم در ریشه و هر دو تنش سرب و مس دیده شد. فعالیت کاتالاز در نمونه‌های شاهد اندام هوایی و ریشه تیمار دیده با محلول نمک فلز مس به‌ترتیب برابر ۰/۳٦۷ و ۰/۳۵۷ بدست آمد که بتدریج کاهش یافت و به ۰/۲۸۸ و ۰/۲٤۰ در نمونه‌های تیمار دیده با غلظت ۱۵۰۰ میکرومولار رسید. غلظت این ماده در نمونه‌های شاهد اندام هوایی و ریشه تیمار دیده با محلول نمک فلز سرب به‌ترتیب برابر ۰/۳۹۲ و ۰/۳٦۵ بدست آمد که بتدریج کاهش یافت و به ۰/۳۵۷ و ۰/۳۳٤ در نمونه‌های تیمار دیده با غلظت ۱۵۰۰ میکرومولار رسید. بنابراین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در تنش مس کمتر از سرب و در ریشه کمتر از اندام هوایی بدست آمد (جدول ۵).

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱- تغییرات جذب عناصر در اندام هوایی و ریشه بر حسب ppm نسبت به افزایش غلظت سرب و مس در محلول غذایی

تیمارها	اندام هوایی		ریشه	
	سرب	مس	سرب	مس
شاهد	۱۱۰/۰۰ ± ۱/۱۵۵	٤۸۷/٦۷ ± ۱/٤۵۳	۱۵٦/۰۰ ± ۲/۸۸۷	۵۲۲/٦۷ ± ٤/۲۵٦
۱۵۰۰µM	۱۲۷۵/٦۷ ± ۳/۱۸۰	۲۲۰۷/٦۷ ± ۳/۹۳۰	٤۹۲۵/۰۰ ± ۲/٦٤٦	۳۸۰۵/٦۷ ± ۲/٦۰۳

مقایسه میانگین‌ها (میانگین سه تکرار ± انحراف معیار) براساس آزمون دانکن $p \leq$ ۰/۰۵

جدول ۲- تغییرات مالون‌دآلدهید در اندام هوایی و ریشه بر حسب $\mu molg^{-1}FW$ نسبت به افزایش غلظت سرب و مس در محلول غذایی

تیمارها	اندام هوایی		ریشه	
	سرب	مس	سرب	مس
شاهد	۰/۰۲۳ d ± ۰/۰۰۰	b ۰/۰۲٤ ± ۰/۰۰۱	۰/۰۲۷ c ± ۰/۰۰۰	۰/۰۲۸ d ± ۰/۰۰۱
۱۰µM	۰/۰۲۳ d ± ۰/۰۰۰	b ۰/۰۲۵ ± ۰/۰۰۰	۰/۰۲۸ c ± ۰/۰۰۰	۰/۰۲۹ d ± ۰/۰۰۰
۵۰µM	۰/۰۲٤ c,d ± ۰/۰۰۰	b ۰/۰۲٦ ± ۰/۰۰۰	۰/۰۲۸ c ± ۰/۰۰۰	۰/۰۳۰ c,d ± ۰/۰۰۰
۱۰۰µM	۰/۰۲۵ c,d ± ۰/۰۰۰	۰/۰۲٦ b ± ۰/۰۰۱	۰/۰۲۹ c ± ۰/۰۰۰	۰/۰۳۱ b,c ± ۰/۰۰۰
۵۰۰µM	۰/۰۲٦ b,c ± ۰/۰۰۰	۰/۰۲۸ a ± ۰/۰۰۰	۰/۰۳۰ b,c ± ۰/۰۰۰	۰/۰۳۲ a,b ± ۰/۰۰۰
۱۰۰۰µM	۰/۰۲۷ a,b ± ۰/۰۰۰	۰/۰۲۹ a ± ۰/۰۰۰	۰/۰۳۱ a,b ± ۰/۰۰۰	۰/۰۳۳ a ± ۰/۰۰۰
۱۵۰۰µM	۰/۰۲۸ a ± ۰/۰۰۰	۰/۰۲۹ a ± ۰/۰۰۰	۰/۰۳۲ a ± ۰/۰۰۰	۰/۰۳۳ a ± ۰/۰۰۰

مقایسه میانگین‌ها (میانگین سه تکرار ± انحراف معیار) براساس آزمون دانکن $p \leq$ ۰/۰۵

حروف غیرمشترک معرف تفاوت معنی‌دار در سطح ۵٪ است.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۳- تغییرات پرولین در اندام هوایی و ریشه برحسب $\mu molg^{-1}FW$ نسبت به افزایش غلظت سرب و مس در محلول غذایی

	اندام هوایی		ریشه	
تیمارها	سرب	مس	سرب	مس
شاهد	۰/۰۰۰۰۸ g ± ۰/۰۰۰	۰/۰۰۰۱ e ± ۰/۰۰۰	۰/۰۰۰۱ f ± ۰/۰۰۰	۰/۰۰۰۲ e ± ۰/۰۰۰
۱۰µM	۰/۰۰۰٤ f ± ۰/۰۰۰	۰/۰۰۰٦ e ± ۰/۰۰۰	۰/۰۰۱۸ e ± ۰/۰۰۰	۰/۰۰۵۲ d ± ۰/۰۰۰
۵۰µM	۰/۰۰۰۷ e ± ۰/۰۰۰	۰/۰۰۲۲ d ± ۰/۰۰۰	۰/۰۰۲۳ d,e ± ۰/۰۰۰	۰/۰۰۶۲ d ± ۰/۰۰۰
۱۰۰µM	۰/۰۰۱۱ d ± ۰/۰۰۰	۰/۰۰۳۹ c ± ۰/۰۰۰	۰/۰۰۳۱ c,d ± ۰/۰۰۰	۰/۰۰۶۷ d ± ۰/۰۰۰
۵۰۰µM	۰/۰۰۱۸ c ± ۰/۰۰۰	۰/۰۰٤٦ c ± ۰/۰۰۰	۰/۰۰۳۲ c ± ۰/۰۰۰	۰/۰۰۸۳ c ± ۰/۰۰۰
۱۰۰۰µM	۰/۰۰۳۵ b ± ۰/۰۰۰	۰/۰۰۷۵ b ± ۰/۰۰۰	۰/۰۰٤٦ b ± ۰/۰۰۰	۰/۰۱۲۷ b ± ۰/۰۰۰
۱۵۰۰µM	۰/۰۰٤۳ a ± ۰/۰۰۰	۰/۰۰۹۸ a ± ۰/۰۰۰	۰/۰۰۷۲ a ± ۰/۰۰۰	۰/۰۱٤٤ a ± ۰/۰۰۰

مقایسه میانگین‌ها (میانگین سه تکرار ± انحراف معیار) براساس آزمون دانکن $p \leq$ ۰/۰۵
حروف غیرمشترک معرف تفاوت معنی‌دار در سطح ۵٪ است.

جدول ٤- تغییرات فعالیت آنزیم پراکسیداز در اندام هوایی و ریشه برحسب $mol\ (H_2O_2)\ mg^{-1}\ (protein)\ min^{-1}$ نسبت به افزایش غلظت سرب و مس در محلول غذایی

	اندام هوایی		ریشه	
تیمارها	سرب	مس	سرب	مس
شاهد	۰/۷۱۰ d ± ۰/۰۰۱	۰/۷۷۱ e ± ۰/۰۰۱	۰/۷۲۲ e ± ۰/۰۰۱	۰/۷۹۸ e ± ۰/۰۰۱
۱۰µM	۰/۷۱۳ c,d ± ۰/۰۰۰	۰/۷۷٤ d,e ± ۰/۰۰۱	۰/۷۲٦ d ± ۰/۰۰۰	۰/۸۰۷ d ± ۰/۰۰۰
۵۰µM	۰/۷۱٤ c,d ± ۰/۰۰۰	۰/۷۷۷ d ± ۰/۰۰۰	۰/۷۲۹ c ± ۰/۰۰۰	۰/۸۰۹ c,d ± ۰/۰۰۱
۱۰۰µM	۰/۷۱٦ b,c ± ۰/۰۰۰	۰/۷۸۲ c ± ۰/۰۰۱	۰/۷۳۰ b,c ± ۰/۰۰۰	۰/۸۱۰ c,d ± ۰/۰۰۰
۵۰۰µM	۰/۷۱۹ b ± ۰/۰۰۰	۰/۷۸۳ c ± ۰/۰۰۱	۰/۷۳۱ b,c ± ۰/۰۰۰	۰/۸۱۱ c ± ۰/۰۰۰
۱۰۰۰µM	۰/۷۲۰ b ± ۰/۰۰۰	۰/۷۹۵ b ± ۰/۰۰۱	۰/۷۳۲ b ± ۰/۰۰۰	۰/۸۱۸ b ± ۰/۰۰۰
۱۵۰۰µM	۰/۷۳۳ a ± ۰/۰۰۲	۰/۸۰۸ a ± ۰/۰۰۲	۰/۷٤۰ a ± ۰/۰۰۱	۰/۸۳۵ a ± ۰/۰۰۲

مقایسه میانگین‌ها (میانگین سه تکرار ± انحراف معیار) براساس آزمون دانکن $p \leq$ ۰/۰۵
حروف غیرمشترک معرف تفاوت معنی‌دار در سطح ۵٪ است.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۵- تغییرات فعالیت آنزیم کاتالاز در اندام هوایی و ریشه برحسب $\mu mol\ (H_2O_2)\ mg^{-1}\ (protein)\ min^{-1}$ نسبت به افزایش غلظت سرب و مس در محلول غذایی

	اندام هوایی		ریشه	
تیمارها	سرب	مس	سرب	مس
شاهد	۰/۳۹۲ a ± ۰/۰۰۱	۰/۳٦۷ a ± ۰/۰۰۷	۰/۳٦٥ a ± ۰/۰۰۰	۰/۳٥۷ a ± ۰/۰۰۰
۱۰µM	۰/۳۸٦ b ± ۰/۰۰۱	۰/۳٥۰ b ± ۰/۰۰٦	۰/۳٦٤ a,b ± ۰/۰۰۰	۰/۲۸۷ b ± ۰/۰۰۰
٥۰µM	۰/۳۸۲ c ± ۰/۰۰۱	۰/۳٤۲ b,c ± ۰/۰۰٦	۰/۳٦۱ b,c ± ۰/۰۰۱	۰/۲۸۳ b ± ۰/۰۰۱
۱۰۰µM	۰/۳۷۹ c,d ± ۰/۰۰۰	۰/۳۳۲ c,d ± ۰/۰۰٤	۰/۳٥۹ c,d ± ۰/۰۰۱	۰/۲۸۱ b ± ۰/۰۰۱
٥۰۰µM	۰/۳۷۸ d ± ۰/۰۰۰	۰/۳۲۱ d ± ۰/۰۰٤	۰/۳٥۷ d ± ۰/۰۰۱	۰/۲۷۷ b,c ± ۰/۰۰۱
۱۰۰۰µM	۰/۳٦۳ e ± ۰/۰۰۱	۰/۳۰٥ e ± ۰/۰۰۲	۰/۳٤۸ e ± ۰/۰۰۱	۰/۲٦۸ c ± ۰/۰۰۱
۱٥۰۰µM	۰/۳٥۷ f ± ۰/۰۰۱	۰/۲۸۸ f ± ۰/۰۰۲	۰/۳۳٤ f ± ۰/۰۰۲	۰/۲٤۰ d ± ۰/۰۰۲

مقایسه میانگین‌ها (میانگین سه تکرار ± انحراف معیار) براساس آزمون دانکن $p \leq$ ۰/۰۵

حروف غیرمشترک معرف تفاوت معنی‌دار در سطح ۵٪ است.

بحث

اثرات سمّی فلزات سنگین به‌دلیل تولید رادیکال‌های آزاد است. در گیاهان عالی فلزات سنگین ازجمله سرب و مس باعث القای تولید رادیکال سوپراکسید، هیدروژن پراکسید، هیدروکسیل و اکسیژن یکتایی می‌گردد (Tiwari *et al*., 2008). ROS به سرعت می‌تواند تمام انواع ملکول‌های زیستی مانند اسیدهای نوکلئیک، پروتئین‌ها، اسیدهای آمینه و لیپیدها را هدف حمله قرار بدهد که به نقص عملکرد متابولیکی غیرقابل بازگشت و نهایتاً مرگ سلولی منجر می‌گردد (Wang *et al*., 2009؛ Pandey *et al*., 2009). پراکسیداسیون لیپیدها نشانه ایجاد و توسعه صدمات اکسیداتیو است و معمولاً به‌عنوان معیاری برای استرس اکسیداتیو شناخته می‌شود (Sun *et al*., 2010؛ Nasim & Dhir, 2010). پراکسیداسیون لیپیدها وابسته به تولید رادیکال سوپراکسید ($O_2^{-\circ}$) است و در نتیجه تخریب غشاهای زیستی ماده‌ای به نام مالون‌دآلدهید در سلول‌ها افزایش می‌یابد. از طرفی اسید آمینه پرولین که از گلوتامات بوجود می‌آید نقشی کلیدی در تنظیم اسمزی (Ahmad & Hellebust, 1988؛ Laliberte & Hellebust, 1989)، حفاظت آنزیمی (Nikolopoulos & Manetas, 1991؛ Paleg *et al*., 1984)، پایداری و بقاء ماشین سنتز پروتئین (Kadpal & Rao, 1985)، تنظیم اسیدیته سلول

Archive of SID

www.SID.ir

(Venekemp, 1989) و جمع‌آوری رادیکال‌های آزاد (Smirnoff & Cumbes, 1989) ایفا می‌کند. همچنین این ماده به‌طور مؤثری اثرات مضر اکسیژن یکتایی را تعدیل می‌نماید (Mohanty & Matysik, 2001)، بنابراین افزایش این ماده در تنش‌ها انتظار می‌رود. به‌علاوه تخریب سوپراکسید و هیدروژن پراکسید نیاز به فعالیت مؤثر تعداد زیادی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان دارد. سوپراکسید به سرعت با فعالیت SOD به H_2O_2 تبدیل می‌شود (Bowler *et al.*, 1992). کاتالازها H_2O_2 را در پراکسیزوم‌ها به آب و اکسیژن ملکولی تبدیل می‌نمایند (Noctor & Foyer, 1998). روش دیگر از بین رفتن H_2O_2 توسط پراکسیدازهاست. پراکسیدازها که سرتاسر سلول یافت می‌شوند میل ترکیبی بیشتری با H_2O_2 نسبت به کاتالاز دارند (Jimenez *et al.*, 1997). آنزیم‌هایی که در چرخه آسکوربات-گلوتاتیون هستند، یعنی چرخه‌ای که در آن H_2O_2 جاروب می‌شود، بسیار فعالند. در این چرخه آسکوربات پراکسیداز به‌واسطه آسکوربات، فرایند احیاء H_2O_2 را به آب تسریع می‌کند و دهیدروآسکوربات بوجودآمده مجدداً به کمک GR (گلوتاتیون ردوکتاز) به آسکوربات تبدیل می‌شود (Iturbe-ormaetxe *et al.*, 2001). پراکسیداز و کاتالاز دو نمونه از آنزیم‌هایی هستند که تغییر فعالیتشان در تنش‌ها به‌طور گسترده‌ای مورد بررسی قرار گرفته و گزارش شده‌است.

در این تحقیق مقایسه گیاهان گروه شاهد نشان داد که غلظت مس در گیاهان شاهد بسیار بیشتر از میزان سرب در این دسته از گیاهان است. این نتیجه ضرورت و ریزمغذی بودن فلز مس و غیرضروری بودن فلز سرب را اثبات می‌کند. چون مس به‌طور عادی در گیاهان وجود دارد. این فلز جزء جدایی‌ناپذیر آنزیم‌های متعدد چرخه انتقال الکترون و دیگر آنزیم‌های چرخه‌های بی‌شمار زیستی است. برخلاف آن سرب جزء فلزات تشکیل‌دهنده پیکره گیاه نبوده و تنها ممکن است به‌دلیل آلودگی هوا و سرب ناشی از آلاینده‌های محیط و یا آلودگی محیط‌های آزمایشگاهی وارد گیاه شود. از طرفی ذکر نکته مهمی حائز اهمیت است و آن اینکه علاوه بر مطلب فوق، باید توجه داشته باشیم که محلول غذایی هوگلند دارای مس و بدون سرب است. نمونه‌های اندام هوایی و ریشه در هر دو فلز سرب و مس تا حد زیادی مشابه بودند که شاهد بودن و تیمار نشدن این دو اندام را با فلز سنگین به خوبی گواهی می‌دهد. از سویی دیگر مقایسه گیاهان گروه تیمار دیده با غلظت ۱۵۰۰ میکرومولار از این دو فلز نشان داد که به‌دلیل ضروری بودن مس جذب آن بیشتر صورت گرفته و بالعکس گیاه سعی بر ممانعت از ورود سرب به خود داشته‌است. همچنین بیشتر بودن غلظت فلز در ریشه نسبت به اندام هوایی بیانگر بیشتر انجام گرفتن عمل جذب در این اندام است. تفاوت قابل‌توجهی میان غلظت فلز در اندام‌های هوایی گیاهان تیمار دیده با فلزات سرب و مس وجود دارد. بدین معنا که غلظت فلز مس در اندام هوایی به‌طور مشخصی بیشتر از غلظت فلز سرب است و این نتیجه کم تحرکی سرب و متحرک‌تر بودن مس را به اثبات می‌رساند. همین پدیده عامل اصلی صدمه دیدن بیشتر گیاه از غلظت‌های افزایش یافته فلز مس نسبت به سرب است. زیرا در چرخه فتوسنتز و انتقال الکترون اختلال ایجاد کرده و رادیکال‌های آزادی که از واکنش فنتون بوجود می‌آید، موجب سمّیت بیشتر گیاه می‌شود. نتایج ما مشابه MacFarlane و Burchett (۲۰۰۱) بود. در گیاه حرا (*Aviccenia marina*) جذب مس در بافت برگ به سرعت و تا غلظت معینی (۴۰۰µg/g DW) به‌طور

Archive of SID

www.SID.ir

افزایشی جذب می‌شود و از آن به بعد تقریباً ثابت می‌ماند. حال آنکه الگوی تجمع و جذب سرب در بافت برگ تا دامنه وسیعی از غلظت‌ها کم و تدریجی است به‌طوری که بعد از غلظت ٤٠٠µg/g DW نیز همین‌طور آرام، تدریجی و افزایشی جذب می‌گردد و مانند مس در این غلظت تقریباً ثابت نمی‌گردد. بعد از این مرحله سدّ دفاعی گیاه نسبت به سرب از بین رفته و جلوگیری از انتقال صورت نمی‌گیرد و از این غلظت به بعد انتقال بی‌رویه فلز سرب به اندام هوایی شروع می‌شود. همین جذب کم و بسیار تدریجی فلز سرب در اندام هوایی گیاه مانگرو نشان‌دهنده حلّالیت کم و بی‌تحرکی فلز سرب است (MacFarlane & Burchett, 2001). فلز مس نیز ابتدا از راه ریشه گیاه جذب شده و نسبت به نوع گیاه تا حد معینی غلظت آن در ریشه افزایش می‌یابد، اما از آنجایی که عنصری متحرک، ریزمغذی و ضروری برای گیاهان است و نیز چون آهن و روی فلزی ناقل ردوکس شناخته می‌شود، انتقال بیشتری را نسبت به فلز سرب به سمت اندام هوایی خصوصاً برگ‌ها (محل انجام واکنش‌های فتوسنتزی) از خود نشان می‌دهد. جذب بیشتر این فلز به این دلیل اتفاق می‌افتد که هم متحرک است و هم گیاه مس را برای فعالیت‌های متابولیکی، به‌خصوص فرایندهای فتوسنتزی نیاز دارد. وقتی جذب بالاتر از نیاز متابولیکی باشد آثار سمّیت آشکار می‌گردد. هر چند مس عنصری متحرک در گیاه است، به‌دلیل وجود نوار کاسپاری جابجایی محدودی را به سمت اندام هوایی انجام می‌دهد (MacFarlane & Burchett, 2001؛ Liu *et al*., 2001).

در این تحقیق افزایش معنی‌دار و تدریجی مالون‌دآلدهید در هر دو تنش سرب و مس و هر دو اندام ریشه و بخش هوایی دیده شد (جدول ۲). غلظت مالون‌دآلدهید در ریشه‌های تنش دیده با هر دو فلز نسبت به اندام هوایی بیشتر بود. از طرفی بررسی‌های آماری بیانگر بیشتر بودن غلظت مالون‌دآلدهید در هر دو بخش اندام هوایی و ریشه تنش مس نسبت به تنش سرب است. همچنین افزایش تولید رادیکال‌های آزاد در شرایط تنش فلزات سنگین از طریق افزایش غلظت مالون‌دآلدهید اثبات شد که مطابق با کارهای Posmyk و همکاران (۲۰۰۸) بر روی کلم قرمز است. انجام آزمایش روی نخودفرنگی (Chaoui *et al*., 1997) و گیاه *Limonium bicolor* (Li, 2008) نشان داد که پراکسیداسیون چربی‌ها و تجمع هیدروژن پراکسید در سلول‌ها باعث تخریب فسفولیپیدهای غشاء و افزایش غلظت مالون‌دآلدهید می‌گردد.

افزایش غلظت مالون‌دآلدهید و پرولین نسبت به افزایش غلظت فلزات سنگین نشان‌دهنده ارتباط بین تولید رادیکال‌های آزاد و تجمع پرولین است. در تحقیق ما افزایش معنی‌دار پرولین در هر دو تنش سرب و مس و هر دو اندام بخش هوایی و ریشه دیده شد (جدول ۳). غلظت پرولین در ریشه هر دو فلز نسبت به اندام هوایی بیشتر بود. از طرفی بررسی‌های آماری بیانگر بیشتر بودن غلظت این ماده در هر دو بخش اندام هوایی و ریشه تنش مس نسبت به تنش سرب است. در گزارش ارائه شده توسط Choudhary و همکاران (۲۰۰۷) بر روی نوعی سیانوباکتری (*Cyanobacterium spirulina platensis*) تحت تنش فلزات سنگین افزایش غلظت پروتئین کل دیده شد که نشان‌دهنده افزایش اسید آمینه پرولین به‌طور خاص بود. ضمن اینکه سنجش این اسید آمینه به تنهایی نیز افزایش مقدار را نشان می‌داد. افزایش پرولین به‌دلیل قابلیت کلات شدن این اسید آمینه با یون‌های فلزی و

Archive of SID

www.SID.ir

افزودن بر مکانیزم دفاعی جهت بقای بیشتر است (Choudhary *et al*., 2007). در تحقیق انجام شده بر *Chlamydomonas reinhardtii* نیز افزایش فلز سنگین مس سبب افزایش پرولین شد (Zhang *et al*., 2008). تحقیقی بر روی گیاه برنج (Wang *et al*., 2009) حاکی از افزایش اسید آمینه پرولین نسبت به تنش فلز سنگین جیوه بود. همچنین تأثیر تعدادی از فلزات سنگین بر میزان کلروفیل، پرولین ومواد آنتی‌اکسیدان گیاه لوبیا بررسی شد و همین نتیجه بدست آمد (Zengin & Munzuroglu, 2005).

با افزایش سطح ROS در سلول‌ها، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان افزایش می‌یابد و متعاقب با آن تغییری در فعالیت آنزیم‌هایی چون پراکسیداز، سوپراکسیددیسموتاز و کاتالاز دیده می‌شود. در تحقیق ما افزایش معنی‌دار فعالیت پراکسیداز در هر دو تنش سرب و مس و هر دو اندام بخش هوایی و ریشه دیده شد (جدول ٤). فعالیت پراکسیداز در ریشه هر دو فلز نسبت به اندام هوایی بیشتر بود. از طرفی بررسی‌های آماری بیانگر بیشتر بودن فعالیت این ماده در هر دو بخش اندام هوایی و ریشه تنش مس نسبت به تنش سرب است. تحقیق در مورد کلم قرمز، به‌عنوان گیاهی سرشار از آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی و آنزیمی، افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم‌هایی چون پراکسیداز و سوپراکسیددیسموتاز را در تنش فلزات سنگین نشان داد (Posmyk *et al*., 2008). در تحقیقی دیگر نیز همین افزایش فعالیت در گیاه اسفناج اثبات گردید (Pandey *et al*., 2009). در بسیاری از گونه‌های گیاهی جذب افزایش‌یافته فلزات سنگین چون مس، سرب، نیکل و کادمیوم افزایش بسیار زیاد فعالیت پراکسیداز را القاء می‌کند و باعث تغییرات کیفیتی در ایزوآنزیم‌های آن می‌شود (Posmyk *et al*., 2008؛ Baccouch *et al*., 2001). از طرفی افزایش فعالیت پراکسیداز به‌عنوان آنزیم اصلی و کلیدی در تنش‌های مربوط به فلز سنگین به اثبات رسیده‌است، تا جایی‌که این آنزیم را به‌عنوان مارکرهای استرس در تنش فلزات سنگین می‌شناسند (Choudhary *et al*., 2007).

در این تحقیق کاهش معنی‌دار فعالیت کاتالاز در هر دو تنش سرب و مس و هر دو اندام بخش هوایی و ریشه دیده شد (جدول ٥). فعالیت کاتالاز در اندام هوایی گیاهان تنش دیده با هر دو فلز نسبت به ریشه بیشتر بود. از طرفی بررسی‌های آماری بیانگر بیشتر بودن فعالیت این ماده در هر دو بخش اندام هوایی و ریشه در تنش مس نسبت به تنش سرب است. کاهش فعالیت این آنزیم در تنش مس مشهودتر است. نتایج ما همانند نتایجی بود که Wang و همکاران (۲۰۰٤) بدست آوردند. آنها در آزمایشهای خود بر روی دانه‌رست‌های نوعی کلم (*Brassica junica*) تیمار شده با غلظت‌های مختلف فلز سنگین مس افزایش فعالیت پراکسیداز، سوپراکسیددیسموتاز، آسکوربات‌پراکسیداز و کاهش کاتالاز را گزارش کردند. از سوی دیگر با آزمایش بر روی *Thlaspi caerulescens* تحت تنش روی و کادمیوم کاهش فعالیت این آنزیم گزارش شد و آن را نسبت به این فلزات حساس معرفی نمودند (Wójcik *et al*., 2006). تحقیق بر روی گیاهان میکوریزدار نیز به همین نتیجه منجر شد (Azcón *et al*., 2009).

نتیجه‌گیری

افزایش مالون‌دآلدهید، پرولین و تغییر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نسبت به بالا رفتن غلظت فلزات

Archive of SID

www.SID.ir

سنگین، گواهی بر ارتباط بین تولید رادیکال‌های آزاد و افزایش تجمع مواد فوق است. میزان مالون‌دآلدهید، پرولین و فعالیت آنزیم پراکسیداز در نمونه‌های ریشه بیشتر از اندام هوایی بدست آمد که به‌دلیل نقش اصلی ریشه گیاه خرفه در تجمع فلزات سنگین است. پایین‌تر بودن فعالیت آنزیم کاتالاز در ریشه‌های تیمار دیده با سرب و مس گواهی بر تجمع بیشتر این فلزات در ریشه و نشان‌دهنده حساس بودن کاتالاز به دوز زیاد فلزات سنگین است. همچنین بررسی نتایج آماری نشان داد که تأثیرات مخرب مس بیشتر از سرب است. در نهایت این تحقیق نشان داد که گیاه خرفه به‌دلیل اینکه جمع‌کننده فلزات سنگین است و این تجمع را بیشتر در ناحیه ریشه انجام می‌دهد، می‌توان از آن جهت پالایش خاک‌های آلوده استفاده نمود.

منابع مورد استفاده

- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. Methods in Enzymology, 105: 121-126.
- Ahmad, I. and Hellebust, J.A., 1988. The relationship between inorganic nitrogen metabolism and proline accumulation in osmoregulatory responses of two euryhaline microalgae. Plant Physiology, 88: 348-354.
- Allen, S.E., Grimshaw, H.M. and Rowland, A.P., 1986. Chemical analysis: 285-344. In: Moore, P.D. and Chapman, S.B., (Eds.) Methods in Plant Ecology. Blackwell Scientific Publication, Oxford, London, 604p.
- Apel, K. and Hirt, H., 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. Annual review of plant biology, 55: 373-399.
- Azcón, R., Perálvarez, M.C., Biró, B., Roldán, A. and Ruíz-Lozano, J.M., 2009. Antioxidant activities and metal acquisition in mycorrhizal plants growing in a heavy-metal multicontaminated soil amended with treated lignocellulosic agrowaste. Applied Soil Ecology, 41(2): 168-177.
- Bates, L.S., Waldern, R.P. and Teare, I.D., 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant and Soil, 39: 205-207.
- Baccouch, S., Chaoui, A. and El Feriani, E., 2001. Nickel toxicity induces oxidative damage in *Zea mays* roots. Journal of Plant Nutrition, 24(7): 1085-1097.
- Bowler, C., Vanmontagu, M.V. and Inze, D., 1992. Superoxide dismutase and stress tolerance. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 43: 83-116.
- Chan, K., Islam, M.W., Kamil, M., Radhakrishnan, R., Zakaria, M.N., Habibullah, M. and Attas, A., 2000. The analgestic and anti-inflammatory effects of *Portulaca oleracea* L. sub sp. *Sativa* (Haw.) Celak. Journal of Ethnopharmacology, 73(3): 445-451.
- Chaoui, A., Mazhoudi, S., Ghorbal, M.H. and Ferjani, E.E., 1997. Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Plant Science, 127(2): 139-147.
- Choudhary, M., Jetley, U.K., Khan, M.A., Zutshi, S. and Fatma, T., 2007. Effect of heavy metal stress on proline, malondialdehyde, and superoxide dismutase activity in the cyanobacterium *Spirulina platensis*-S5. Ecotoxicology and Environmental Safety, 66(2): 204-209.
- Deepa, R., Senthilkumar, P., Sivakumar, S., Duraisamy, P. and Raam, C.V., 2006. Copper availability and accumulation by *Portulaca oleracea* L. Environmental Monitoring and Assessment, 116(1-3): 185-195.
- Hall, J.L., 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. Journal of Experimental Botany, 53(366): 1-11.
- Heath, R.L. and Packer, L., 1969. Photoperoxidation in isolated chloroplast. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Archives of Biochemistry and Biophysics, 125: 189-198.
- Hogland, D.R. and Arnon, D., 1950. The Water Culture Method for Growing Plants without Soil. California College of Agriculture, University of California, 500p.
- Iturbe-Ormaetxe, I., Matamoros, M.A., Rubio, M.C., Dalton, D.A. and Becana, M., 2001. The antioxidants of legume nodule mitochondria. Molecular Plant-Microbe Interactions, 14(10): 1189-1196.
- Jiménez, A., Hernández, J.A., del Rio, L.A. and Sevilla, F., 1997. Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. Plant Physiology, 114: 275-284.
- Kadpal, R.P. and Rao, N.A., 1985. Alteration in the biosynthesis of proteins and nucleic acid in finger millet (*Eleucine coracana*) seedling during water stress and the effect of proline on protein biosynthesis. Plant Science, 40(2): 73-79.
- Kar, M. and Mishra, D., 1976. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. Plant Physiology, 57: 315-319.
- Laliberte, G. and Hellebust, J.A., 1989. Regulation of proline content of *Chlorella autopica* in response to

Archive of SID

www.SID.ir

- Okwuasaba, F., Ejike, C. and Parry, O., 1987c. Comparison of skeletal muscle relaxant properties of *Portulaca oleracea* extracts with dantrolene sodium and methoxyverapamil. Journal of Ethnopharmacology, 20(2): 85-106.
- Paleg, L.G., Steward, G.R. and Bradbeer, J.W., 1984. Proline and glycine betaine influence Protein solvation. Plant Physiology, 75(4): 974-978.
- Pandey, N., Pathak, G.C., Pandey, D.K. and Pandey, R., 2009. Heavy metals, Co, Ni, Cu, Zn and Cd produce oxidative damage and evoke differential antioxidant responses in spinach. Brazilian Journal of Plant Physiology, 21(2): 103-111.
- Posmyk, M.M., Kontek, R. and Janas, K.M., 2008. Antioxidant Enzymes activity and phenolic compounds content in red cabbage seedlings exposed to copper stress. Ecotoxicology and Environmental Safety, 72(2): 596-602.
- Rashed, A.N., Afifi, F.U. and Dishi, A.M., 2003. Simple evaluation of the wound healing activity of a crude extract of *Portulaca oleracea* L. (growing in Jordan) in mouse Muscle JVI-1. Journal of Ethnopharmacology, 88(2-3): 131-136.
- Ryle, P.R., Barker, J., Gaines, P.A. and Chakraborty, J., 1984. Alloxan-induced diabetes in the rat-protective action of (-) epicatechin. Life Sciences, 34(6): 591-595.
- Sharma, S.B., Nasir, A., Prabhu, K.M., Murthy, P.S. and Dev, G., 2003. Hypoglycaemic and hypolipidemic effect of ethanolic extract of seeds of *Eugenia jambolana* in alloxan-induced diabetic rabbits. Journal of Ethnopharmacology, 85(2-3): 201-206.
- Smirnoff, N. and Cumbes, Q.J., 1989. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solute. Phytochemistry, 28(4): 1057-1060.
- Srivastava, S., Mishra, S., Tripathi, R.D., Dwivedi, S. and Gupta, D.K., 2006. Copper induced stress and responses of antioxidants and phytochelatins in *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle. Aquatic Toxicology, 80(4): 405-415.
- Sudhakar, C., Lakshmi, A. and Giridarakumar, S., 2001. Changes in the antioxidant enzyme efficacy in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) under NaCl salinity. Plant Science, 161(3): 613-619.
- Sun, S.Q., He, M., Wang, G.X. and Cao, T., 2010. Heavy metal-induced physiological alterations and oxidative stress in the moss *Brachythecium piligerum*. Environmental Toxicology, 26(5): 453-458.
- Teixeirats, M.C., Carvalhots, I.S. and Brodelius, M., 2010. Omega-3 fatty acid desaturase gene isolated from Purslane (*Portulaca oleracea*) expression in different tissues and response to cold and wound stress. Journal Agricultural Food Chemistry, 58(3): 1870-1877.
- Tiwari, K.K., Deviwedi, S., Mishra, S., Srivastava, S., Tripathy, R.D., Singh, N.K. and Chakraborty, S., 2008. Phytoremediation efficiency of *Portulaca tuberosa* rox and *Portulaca oleracea* L. naturally growing in an change in salinity. Canadian Journal of Botany, 67: 1959-1965.
- Li, Y., 2008. Kinetics of the antioxidant response to salinity in the halophyte *Limonium bicolor*. Plant, Soil and Environment, 54(11): 493-497.
- Li, F., Li, Q., Gao, D., Peng, Y. and Feng, C., 2009. Preparation and antidiabetic activity of polysaccharide from *Portulaca oleracea* L. African Journal of Biotechnology, 8(4): 569-573.
- Liu, D., Jiang, W. and Hou, W., 2001. Uptake and accumulation of copper by roots and shoots of maize. Journal of Environmental Sciences, 13: 228-232.
- MacFarlane, G.R. and Burchett, M.D., 2001. Photosynthetic pigments and peroxidase activity as indicators of heavy metal stress in the gray mangrove, *Avicennia marina* (Forsk) Vierh. Marine Pollution Bulletin, 42(3): 233-240.
- Meng, F.B. and Wu, R.G., 2008. Appraisal on medicinal values of *Portulaca oleracea* L. Forest Investigations Design, 1: 77-78.
- Mohanapriya, S., Senthilkumar, P., Sivakumar, S., Dineshkumar, M. and Raam, C.V., 2006. Effects of copper sulfate and copper nitrate in aquatic medium on the restoration potential and accumulation of copper in stem cuttings of the terrestrial medicinal plant, *Portulaca oleracea* Linn. Environmental Monitoring and Assessment, 121(1-3): 231-242.
- Mohanty, A.P. and Matysik, J., 2001. Effect of proline on the production of singlet oxygen. Amino Acid, 21(2): 195-200.
- Morghan, J.T., 1993. Accumulation of cadmium and selected elements in flax seed grown on calcareous soil. Plant and Soil, 150: 61-68.
- Nasim, S.A. and Dhir, B., 2010. Heavy metals alter the potency of Medicinal Plants. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, 203: 139-149.
- Nikolopoulos, D. and Manetas, Y., 1991. Compatible solutes and in vitro stability of *Salsola soda* enzyme: proline incompatibility. Phytochemistry, 30(2): 411-413.
- Noctor, G. and Foyer, C.H., 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 49: 249-279.
- Okwuasaba, F., Ejike, C. and Parry, O., 1986. Skeletal muscle relaxant properties of the aqueous extract of *Portulaca oleracea*. Journal of Ethnopharmacology, 17(2): 139-160.
- Okwuasaba, F., Parry, O. and Ejike, C., 1987a. Investigation into the mechanism of action of extracts of *Portulaca oleracea*. Journal of Ethnopharmacology, 21: 91-97.
- Okwuasaba, F., Ejike, C. and Parry, O., 1987b. Effects of extracts of *Portulaca oleracea* on skeletal muscle in vitro. Journal of Ethnopharmacology, 21: 55-63.

Archive of SID

www.SID.ir

- Wójcik, M., Skórzyńska-Polit, E. and Tukiendorf, A., 2006. Organic acids accumulation and antioxidant enzyme activities in Thlaspi caerulescens under Zn and Cd stress. Plant Growth Regulation, 48(2): 145-155.
- Zengin, F.K. and Munzuroglu, O., 2005. Effects of some heavy metal s on content of chlorophyll, proline and some antioxidant chemicals in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings. Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica, 47: 157-164.
- Zhang, L.P., Mehta, S.K., Liu, Z.P. and Yang, Z.M., 2008. Copper-induced proline synthesis is associated with nitric oxide generation in *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant and Cell Physiology, 49(3): 411-419.
industrial effluent irrigated area in Vadodra, Gujrat, India. Environmental Monitoring and Assessment, 147(1-3): 15-22.
- Venekemp, J.H., 1989. Regulation of cytosolic acidity in plants under condition of drought. Physiologia Plantarum, 76: 112-117.
- Wang, S.H., Yang, Z.M., Yang, H., Lu, B., Li, S.Q. and Lu, Y.P., 2004. Copper-induced stress and antioxidative responses in roots of *Brassica juncea* L. Botanical Bulletin of Academia Sinica, 45: 203-212.
- Wang, F., Zeng, B., Sun, Z. and Zhu, C., 2009. Relationship between proline and Hg^{2+}-induced oxidative stress in a tolerant rice mutant. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 56(4): 723-731.

Archive of SID

www.SID.ir

Lead and copper-induced changes on malondialdehyde, proline, peroxidase and catalase enzymes activity in *Portulaca oleracea* L.

M. Ghorbanli[1*] and A. Kiapour[2]

1*- Corresponding author, Department od Biology, Faculty od Science, Islamic Azad University, Gorgan Unit, Iran
E-mail: mghorbanli@goganiau.ir
2- Payam-e-Noor University, Tehran Center, Iran

Received: September 2010 Revised: April 2012 Accepted: June 2012

Abstract

Portulaca oleracea L. belongs to Portulacaceae order. From the physiological point of view, *P. oleracea* L., generally known as ragwed, has a very high tolerance and compatibility to the environments polluted with salts or heavy metals. It is considered as a suitable species in planting as well as in refining soil and environment from these kinds of stresses. According to these contexts and in order to show the effects of two heavy metals, lead and copper, on malondialdehyde, proline and antioxidant enzymes activity some experiments were performed in a completely randomized design. For this purpose, plants were planted in sterile bed, leca, irrigated with Hogland nutrient solotion. Treatments included different concentrations of Pb $(NO_3)_2$ and $CuSO_4.5H_2O$ (0, 10,50,100,500,1000 and 1500 µM) with three replications. After ten days of treatment, plants were harvested for experiments. According to the results, an increased absorption of lead and copper was recoreded at high concentrations compared to the control treatment. The amount of atomic absorption of these two elements in roots was more than that of shoots. Stress increased significantly at high concentrations compared to the control. The amount of proline showed a significant upward trend in both lead and copper stress as well as in both roots and shoots. Peroxidase activity showed a significant upward trend in both lead and copper stress as well as in both shoots and roots while a significant downward trend was recorded for catalase activity. In general, a higher amount of malondialdehyde, proline and peroxidase activity was obtained in root samples comperd to shoot samples, indicating the role of root as the main accumulator of heavy metals, lead and copper. The lower catalase activity in roots compared to shoots proved enzyme sensitivity towards high Pb and Cu accumulation in roots.

Key words: *Portulaca oleracea* L., heavy metals, lead, copper, phytoremediation.

Archive of SID

www.SID.ir