Archive of SID

مطالعه سمیت کلرید جیوه بر رشد و برخی ویژگی‌های بیوشیمیایی گیاه شوید (*Anethum graveolens* L.)

*حمید نورانی آزاد[۱]، محمدرضا حاجی باقری[۲]، داریوش چوبینه[۱]، عبدالکریم اجرائی[۱]

۱. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم

۲. کارشناس ارشد دانشگاه آزاد اسلامی واحد استهبان

دریافت: ۱۳۸۸/۱۱/۲۷ ـ پذیرش: ۱۳۸۹/۳/۲۰

چکیده

جیوه یکی از فلزات سنگین و سمی است که سبب آلودگی زمین‌های زراعی می‌شود. تجمع جیوه در گیاهان، بسیاری از اعمال سلولی را مختل و رشد و نمو را متوقف می‌سازد. هدف از این تحقیق مطالعه سمیت کلرید جیوه بر رشد و برخی ویژگی‌های بیوشیمیایی گیاه شوید بود. آزمایش‌ها در شرایط هیدروپونیک انجام شد. تیمارهای صفر (شاهد)، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میکرومولار کلرید جیوه با چهار تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی بر روی گیاهان اعمال شد. تحت تنش ناشی از سمیت جیوه، مقادیر وزن خشک ریشه و اندام‌های هوائی، کلروفیل کل برگ‌ها، میزان مالون دی آلدهید (MDA) برگ‌ها، تجمع جیوه در ریشه و اندام‌های هوایی و فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز برگ‌ها اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که با افزایش میزان کلرید جیوه در محیط رشد، وزن خشک اندام‌های هوایی و ریشه، به جز در تیمار ۵ میکرومولار در مقایسه با شاهد کاهش معنی‌دار یافت. کاهش کلروفیل کل برگ‌ها همراه با افزایش تنش جیوه در مقایسه با شاهد معنی‌دار بود. میزان مالون دی آلدهید (MDA) برگ‌ها در اثر افزایش جیوه، افزایش معنی‌داری نشان داد. جذب جیوه با افزایش غلظت آن در محیط رشد افزایش یافت و تجمع آن در ریشه‌ها بیشتر از اندام‌های هوایی بود. افزایش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز برگ‌ها همراه با آفزایش کلرید جیوه در مقایسه با شاهد معنی‌دار بود. افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز برگ‌ها به جز در تیمار ۵ میکرو مولار کلرید جیوه در مقایسه با شاهد معنی‌دار بود. کاهش کلروفیل و رشد اندام‌ها و افزایش مالون دی آلدهید برگ‌ها نشان دهنده آسیب‌های اکسیداتیو می‌باشد. تجمع جیوه در ریشه‌ها، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان در برگ‌ها و فعال شدن دفاع ضد اکسیدانی می‌تواند از ساز و کارهای تحمل به سمیت جیوه باشد.

کلمات کلیدی: آنزیم ها، تنش اکسیداتیو، رشد، سمیت جیوه، شوید

مقدمه

فلزات سنگین از جمله منابع آلوده کننده محیط هستند که در صورت تجمع در خاک و جذب به وسیله گیاه به زنجیره غذایی وارد می‌شوند و مسمومیت‌هایی را در گیاهان و یا افراد تغذیه کننده از آن‌ها به وجود می‌آورند (Basta et al., 2001). وجود عناصر غذایی کم‌مصرف و نیز عناصر سمی مانند سرب، جیوه، نیکل و کادیوم، استفاده بی‌رویه از کودها را در زمین‌های کشاورزی محدود می‌سازد، زیرا کاربرد زیاد کودهای شیمیایی و لجن ناشی از فاضلاب‌ها منجر به انباشت بیش از حد این عناصر در خاک می‌گردد (Chang et al., 1982).

*email:hnooraniazad@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

در اثر فعالیت‌های انسانی نظیر استخراج معدن و ذوب فلزات، استفاده از کودها، لجن فاضلاب و قارچ کش‌های حاوی جیوه به خاک، ورود سالانه جیوه به زمین‌های زراعی و دیگر اکوسیستم‌ها به شدت در حال افزایش است. گزارش شده است که در سال ۲۰۰۰ میلادی متوسط میزان جیوه در سراسر جهان در زمین‌های زراعی حدود ۳۹ کیلوگرم در هر کیلومتر مربع بوده است (Han et al., 2002). جیوه به شکل‌های مختلف نظیر HgS، Hg^{2+} و Hg– متیل دیده می‌شود. اما در خاک‌های کشاورزی به میزان زیادی به شکل یونی آن یعنی Hg^{2+} وجود دارد. این فلز پس از آزاد شدن در خاک در فاز جامد باقی مانده و جذب سولفیدها، ذرات رس و مواد آلی می‌شود (Han et al., 2006). جیوه فلزی است که در مقادیر ناچیز اثر چندانی بر رشد گیاه ندارد، اما در مقادیر زیاد برای گیاه به شدت سمی بوده و سبب اختلال در فعالیت‌های فیزیولوژیک گیاه می‌گردد. این عنصر سمی می‌تواند به پروتئین‌های کانالی آب متصل شده و سبب بسته شدن روزنه‌های موجود در برگ شده که جریان آب را در گیاه متوقف می‌سازد. همچنین گزارش شده است که Hg^{2+} فعالیت میتوکندری‌ها را متوقف می‌سازد (Zhou et al., 2007). یون‌های جیوه سبب تنش اکسیداتیو شده که به دنبال آن گونه‌های اکسیژن واکنش‌گر مانند رادیکال سوپراکسید (O_2^-), H_2O_2 و رادیکال هیدروکسیل (OH) را در گیاهان تولید می‌کنند. این فرآیند سبب آسیب در ساختار لیپیدهای غشایی زیستی شده و متابولیسم سلولی را دچار اختلال می‌کند (Cargnelutti et al., 2006) تنش‌های اکسیداتیو ناشی از یون جیوه، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان نظیر سوپر اکسید دیسموتاز، پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز و کاتالاز را به دنبال دارد که تولید آن‌ها میزان تنش اکسیداتیو را نشان می‌دهد (Zhou et al., 2007). پراکسیداز همراه با کاتالاز در پراکسی‌زوم‌ها و سایر نقاط سلولی قرار دارند و ماده سمی آب اکسیژنه را که معمولاً در بیشتر واکنش‌های بیولوژیک گیاهان تولید می‌شود، تجزیه و از محیط حذف می‌کند. تشکیل انواع رادیکال‌های آزاد ممکن است مستقیم یا غیرمستقیم با فلزات آغاز شود که می‌تواند آسیب جدی به ترکیبات مختلف سلولی وارد آورد (Van & Clijsters, 1994). سمیت جیوه در اثر افزایش این عنصر به محیط رشد گیاه شامل کاهش پتانسیل آبی، اختلال در تغذیه گیاه، تغییر در تراوایی غشای سلولی، توقف رشد ریشه و ساقه و کاهش در تولید پروتئین و جوانه‌زنی می‌باشد (Zhao et al., 2008). کاربرد زیاد لجن فاضلاب باعث انباشت زیاد عناصر سمی مانند جیوه و سرب در خاک و انتقال آن‌ها به گیاه می‌شود (Chang et al., 1982). استفاده از لجن فاضلاب به عنوان یک کود ارزان قیمت و غنی از عناصر غذایی در مناطقی از کشور از جمله برخی از نقاط فارس رواج یافته است. اما کاربرد این نوع کود در مقادیر زیاد، انباشته شدن عناصر سنگین از جمله جیوه را به دنبال دارد که می‌تواند منجر به آلودگی خاک و انتقال این آلودگی به زنجیره‌های غذایی شده و سلامتی انسان را با خطر مواجه کند. تحقیق جاری با هدف اثر سمیت فلز جیوه بر رشد و برخی ویژگی‌های بیوشیمیایی در گیاه شوید که در کشور ما مصرف غذایی و دارویی گسترده دارد.

مواد و روش‌ها

۱. کشت گیاه

برای این منظور از بذرهای سالم گیاه شوید (*Anethum graveolens* L.) رقم ورامین (تهیه شده ازمرکز تحقیقات کشاورزی فارس) استفاده شد. پس از سترون سازی بذرها با محلول سدیم هیپوکلریت ۲۰ درصد به مدت ۵ دقیقه شتشوی آن‌ها به کمک آب مقطر سترون در چند مرحله صورت گرفت. بذرهای ضد عفونی شده جهت کشت جوانه‌زنی به محیط ماسه کاملا سترون منتقل گردید. آبیاری دانه‌های کشت شده به کمک آب مقطر به مدت یک هفته انجام شد. از هفته دوم به بعد آبیاری آنها به کمک محلول غذائی هوگلند ۰/۵ درجه سترون به صورت دو هفته صورت گرفت. سپس دانه رست‌های جوان و مشابه از محیط ماسه جدا و به ظروف دارای محلول غذائی هوگلند منتقل شد. در هر ظرف یک لیتر محلول و ۵ گیاه قرار داده شد.

www.SID.ir

Archive of SID

۲. تیمارهای جیوه

تیمارهای جیوه با افـزودن کلریـد جیـوه در مقـادیر صـفر (شاهد)، ۵،۱۰،۱۵و۲۰ میکرو مولار به محلول غذایی هوگلنـد ۰/۵ درجه اعمال گردید. برای هر تیمار ٤ تکرار در نظر گرفته شد. pH محلول غذائی بـر روی ۷-٦/۵ تنظـیم گردیـد. تمـام مطالعات انجام شده در شرایط اتاق رشد بـا دمـای روز ٢٤ و دمای شب ١٦ درجه سـانتی گـراد، رطوبـت ٦٥-٦٠ درصـد، دوره روشنایی ۱۷ و تـاریکی ۷ سـاعت و شـدت نـور ٦٥٠٠ لوکس انجام شد. هوا دهی گیاهک‌ها روزانه به مدت ۵ ساعت و تبخیر روزانه آب محیط با افزودن آب مقطر به محیط کشت جبران گردید. پس از گذشـت ۱۰ روز از اعمـال دوره تـنش، گیاهک‌ها از محلول غذایی خارج و بررسی‌های لازم بـر روی آنها صورت گرفت. ریشه و اندام‌های هوایی کلیه نمونـه‌هـا از یکدیگر جدا و با آب مقطر شـسته شـدند. نمونـه‌هـای مـورد استفاده برای تعیین وزن خشک در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤٨ ساعت قرار گرفته و وزن خشک آنهـا بـه کمـک ترازوی دیجیتال Sartarius مدل BP315 اندازه گیری شـد. از مواد تازه گیاهی جهت اندازه گیری فعالیت آنـزیم‌هـا پـس از قرار گرفتن در نیتروژن مایع در۷۰- درجه سانتی‌گراد اسـتفاده شد.

۳. استخراج و سنجش آنزیمی

۱ گرم از برگ‌های تازه گیاه در ۱/۵ میلی لیتر بافر فسفات پتاسـیم (۵۰mM، pH 7) دارای ۰/۲mM EDTA،۱ درصـد (w/v) پلی وینیل پیرولیدون و ۰/۱ درصد تریتـون بـا افـزایش ۵mM آسکوربیک اسید همگن گردید و سـپس در ۱۰۰۰۰g و دمای ٤ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ دقیقه سـانتریفوژ شـد. سنجشهای آنزیمی در مایع رویی به کمک اسپکتروفتومتر و در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد صـورت گرفـت. مقـدار پـروتئین نمونه‌ها با روش برادفورد (Bradford, 1976) اندازه‌گیری شد. برای سنجش فعالیت آنـزیم کاتـالاز از طریـق کـاهش مقـدار پراکسید هیدروژن استفاده شد. مخلوطی شـامل بـافر فـسفات پتاسیم (۱۰۰mM، pH7/5) و ۲۵mM پراکسید هیدروژن تهیـه شد. سپس با اضافه کردن مقـدار مناسـب عـصاره آنزیمـی در حجم نهائی ۳ میلی لیتر فرآیند شروع گردید (Pereira et al., 2002). برای سنجش آنزیم پراکسیداز، فعالیت آنزیم گایـاکول پراکسیداز اندازه‌گیری شد. محیط واکـنش آنـزیم شـامل بـافر فسفات پتاسیم (۵mM، pH7)، ۰/۱mM Na_2 EDTA و ۵mM پراکسید هیدروژن و ۳۰mM گایاکول بود. تغییرات جـذب در طول موج ٤٧٠ نـانومتر ثبـت شـد (Fieling & Hall, 1978). بـرای انـدازه‌گیـری فعالیـت آسـکوربات پراکـسیداز از روش Nakano و همکارش (۱۹۸۱) استفاده شد. تغییرات جذب در طول موج ۲۹۰ نانومتر ثبت گردید.

۴. اندازه‌گیری مالون دی آلدهیـد (MDA) و کلروفیـل کـل برگ‌ها

میزان پراکسیداسیون لیپیـدها بـا تعیـین مقـدار مـالون دی آلدوهید برگ‌ها به وسیله تست TBA و با اسـتفاده از ضـریب تصحیح $155\ mM^{-1}cm^{-1}$ صـورت گرفـت (Chaparzadeh et al., 2004). اندازه‌گیری کلروفیل کل برگ‌ها نیز پس از واکنش بافـت تـازه برگـی بـا اسـتون۸۰ درصـد و بـه روش اسپکتروفتومتری در طول موج های٦٣٤،٦٤٥ نانومتر انجام شد (Strain & Svec, 1966).

۵. اندازه‌گیری میزان جیوه در اندام‌های هوایی و ریشه

برای سنجش میزان جیوه در اندام‌های هـوایی و ریـشه از روش جذب اتمی استفاده شد. میزان جیوه محلول بـه کمـک دستگاه جذب اتمی واریان مدل Spectr AA 220 اندازه‌گیـری شد. جهت تعیین غلظت یون، محلول استاندارد قبل از سنجش نمونه به دستگاه تزریق شد و نمودار استاندارد آن رسم گردید و غلظت مجهول محلول به کمک نرم‌افـزار دسـتگاه (Spectr AA) تعیین شد (Woodies et al., 1977).

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری داده‌هـای حاصـل از آزمـایش بـه کمک نرم افزارSAS صورت گرفت (سلطانی، ١٣٨٦). میانگین شاخص‌های اندازه‌گیری شده با اسـتفاده از آزمـون دانکـن در سطح احتمال خطای یک درصد انجام شد. نمودارها در محیط نرم‌افزاری Excel ترسم شد.

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج

در گیاهک‌های تحت تیمار کلرید جیوه علائم سمیت به صورت کلروز و سوختگی شدید در نوک و حاشیه‌ی برگ‌ها به ویژه در تیمارهای ۱۵ و۲۰ میکرومولار، دیده شد. وزن خشک اندام‌های هوایی و ریشه گیاهک‌ها، همراه با افزایش میزان کلرید جیوه در محیط رشد کاهش نشان داد (جدول ۲). براساس تجربه واریانس در سطح احتمال یک درصد این کاهش معنی‌دار بود. آزمون دانکن متوسط کاهش وزن خشک اندام‌های هوایی و ریشه را به جز در تیمار ۵ میکرو مولار کلرید جیوه بین شاهد و کلیه تیمارها در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار نشان داد (جدول ۱و۲). کلروفیل کل برگ‌ها همراه با افزایش میزان کلرید جیوه در محیط کاهش یافت. تجزیه واریانس در سطح احتمال یک درصد این کاهش را معنی‌دار نشان داد. میانگین کاهش کلروفیل کل برگ بین شاهد و کلیه تیمارها در سطح احتمال یک درصد آزمون دانکن معنی‌دار بود (جدول ۱و۲). میزان مالون دی‌آلدهید برگ‌ها همراه با افزایش تیمارهای جیوه، افزایش معنی‌داری یافت(جدول۲). فعالیت آنزیم‌ها در برگ همراه با افزایش کلرید جیوه در محیط رشد افزایش یافت. افزایش فعالیت آنزیم پر اکسیداز برگ‌ها براساس تجزیه واریانس در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. فعالیت آنزیم کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز در برگ‌ها همراه با افزایش میزان تیمارهای جیوه افزایش یافت که براساس تجزیه واریانس در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. (جدول ۱ و۲). افزایش تجمع جیوه در ریشه و اندام‌های هوایی همراه با افزایش کلرید جیوه در محیط رشد دیده شد و تجمع آن در ریشه‌ها بیشتر از اندام‌های هوایی گیاه بود. براساس تجزیه واریانس تجمع جیوه در اندام‌های گیاه در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۱ و۲).

جدول ۱: درجه آزادی و میانگین مربعات صفات اندازه گیری شده

منابع تغییر	درجه آزادی	وزن خشک ریشه	وزن خشک اندام‌های هوائی	کلرفیل کل برگ	مالون دی آلدهید	پراکسیداز	کاتالاز	اسکوربات پراکسیداز	جیوه ریشه	جیوه اندام‌های هوائی
تیمار	٤	١٤/٥٠**	٢٠/٢٤**	٠/٠٢١**	٥/٥٢**	٢/٥١**	١/١٩**	٢/٧٧**	٢٠١١/٤٠**	١٨٧/٧٠**
خطا	١٥	٠/٨١	١/١٨	/٠٠٣	٠/٣٢	٠ /٠٥	/٠٢	٠/٠٦	٢٢/٤١	١٠/٢١

** معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد بر اساس آزمون F

جدول ۲: میانگین‌های صفات اندازه گیری شده در سطوح تیمارهای مختلف جیوه

تیمارهای مختلف کلرید جیوه (میکرو مولار) / صفات اندازه گیری شده	صفر (شاهد)	٥	١٠	١٥	٢٠
وزن خشک اندام‌های هوایی (میلی گرم در بوته)	١٧/١ a	١٤/٢ ab	١١/٨c	٨/٤d	٤/٧e
وزن خشک ریشه (میلی گرم در بوته)	٩/٧ a	٨/٣ a	٦/١ b	٣/٧ c	٢/٢d
کلروفیل کل برگ‌ها (میلی گرم در میلی لیتر)	٠/٤٤ a	٠/٤٠b	٠/٣٢ c	٠/٢٢ d	٠/١٤ e
مالون دی آلدهید برگ‌ها (نانومول برگرم وزن تر)	٥/٣ a	٧/١b	١٠/٤ c	١٤/٧ d	١٧/٣ e
پراکسیداز برگ‌ها (واحد میلی گرم پروتیین)	٤/١٢ a	٤/٣٩ ab	٥/٢١ c	٦/٣٨ d	٧/٠١ e
کاتالاز برگ‌ها (واحد میلی گرم پروتیین)	٠/٢٧ a	٠/٣٥b	٠/٣٩ c	٠/٤٨ d	٠/٥٩ e
اسکوربات پراکسیداز برگ‌ها (واحد میلی گرم پروتیین)	١/٨١ a	٢/٣٤b	٢/٨٩ c	٣/٤٦ d	٣/٩٧de
جیوه در ریشه‌ها (میکروگرم در گرم وزن خشک)	١٥٢/٤٠ a	١٩٨/١٢b	٢٠١/٧٥ c	٢٦٩/٩٠d	٣١٤/١٣ e
جیوه در اندام‌های هوایی (میکروگرم در گرم وزن خشک)	٧٣/٥٠ a	٨١/١٧b	٨٨/٣٩ bc	٩٧/٩٠c	١٣٤/٦٥d

اعداد دارای حروف غیر مشابه هر ردیف بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی‌دار دارند.

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که همراه با افزایش میزان کلرید جیوه در محیط رشد، علایم مسمومیت به صورت کلروز و سوختگی شدید در برگ‌ها و کاهش شدید رشد به ویژه در غلظت‌های بالا دیده می‌شود(جدول۲). گزارش شده است که فلزات سنگین به روش‌های مختلف مانع از رشد گیاهان می‌شوند. این فلزات با کاهش فتوسنتز و انتقال مواد فتوسنتزی و کاهش تقسیم سلولی، رشد را مهار می‌کنند. علاوه بر این فلزاتی نظیر جیوه با تجمع در دیواره سلولی و ورود به سیتوپلاسم در سوخت و ساز طبیعی سلول اختلال ایجاد نموده و کاهش رشد را باعث می‌شوند (Molassiotis et al., 2005). یون جیوه (Hg^{+2}) به ویژه در مقادیر بالا به شدت برای سلول‌های گیاه سمی بوده و می‌تواند آسیب‌های شدید و اختلالات فیزیولوژیک از جمله کاهش شدید رشد را به دنبال داشته باشد (Zhou et al., 2007). فلزات سنگین با القای تولید انواع مختلف اکسیژن واکنش گر آسیب‌های شدید به سلول وارد می‌کنند. که این اشکال مختلف اکسیژن، معمولاً با ایجاد آسیب‌های غشایی فرآیندهای مختلف سلول را دچار اختلال می‌کنند. که در نهایت منجر به کاهش رشد گیاه نیز می‌گردد (Pereira et al., 2002). کاهش شدید میزان کلروفیل کل برگ‌ها در گیاه تحت تیمار کلرید جیوه نشان دهنده وسعت آسیب‌های اکسیداتیو می‌باشند. این کاهش می‌تواند به دلیل باز دارندگی مراحل مختلف بیوسنتز کلروفیل باشد. فلزات سنگین با باز دارندگی بیوسنتز پروتئین‌های کمپلکس جمع کننده نوری در سطح رونویسی تشکیل این کمپلکس را مختل می‌سازند. تجزیه زیستی کلروفیل نیز در حضور فلزات سنگین از عوامل مهم کاهش کلروفیل محسوب می‌شود (Hegedus et al., 2001). در این مطالعه افزایش مالوندی آلدهید برگ همراه با افزایش تنش ناشی از کلرید جیوه مشاهده گردید. تولید این ماده نشان دهنده پراکسیداسیون لیپیدهای غشا است و تنش اکسیداتیو ناشی از فلز سمی جیوه را در گیاه مورد مطالعه تایید می‌کند. گزارش شده است که از اولین آثار سمی فلزات سنگین در گیاه، پراکسیده شدن لیپیدهای غشایی است که این موضوع با تغییر ساختمان غشای سلولی همراه است یکی از علایم پراکسیده شدن لیپیدهای غشایی تشکیل مالوندی آلدهید (MDA) می‌باشد که از فرآورده‌های حاصل از تجزیه اسیدهای چرب اشباع نشده محسوب می‌شود (Molassiotis et al., 2005). در برگ‌های یونجه تحت تیمار Hg^{+2} نشان داده شده است که سمیت جیوه سبب آسیب‌های اکسیداتیو به لیپیدهای غشای پلاسمایی شده و افزایش میزان ماده تیوباربیتوریک اسید (TBARS) در برگ‌ها این موضوع را تایید می‌کند (Zhao et al., 2008). تجمع جیوه در ریشه و اندام‌های هوایی گیاه مورد مطالعه نیز دیده شد. تجمع جیوه در ریشه گیاه تحت تیمار با افزایش غلظت آن در محیط رشد افزایش یافته و در ریشه بیشتر از اندام‌های هوایی است. این موضوع می‌تواند نشان دهنده تحرک ناچیز این فلز بوده و انتقال کمتر آن را به اندامهای هوایی باعث شده است. برخی گزارش‌ها نشان داده است که انباشتگی فلزات سنگین در ریشه یکی از ساز و کارهای تحمل نسبی برخی گونه‌ها محسوب می‌شود. در این گیاهان بخش زیادی از فلز جذب شده متصل به دیواره سلولی باقی می‌ماند (Zimhal, 1975). در مطالعه حاضر همراه با افزایش غلظت کلرید جیوه در محیط رشد فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز برگ‌ها افزایش یافت. نشان داده شده است که جیوه می‌تواند باعث تنش اکسیداتیو در گیاهان شود (Zhao et al., 2008). سلول‌های گیاهی برای حفاظت در مقابل آسیب‌های اکسیداتیو مجهز به یک سیستم جاروب کننده رادیکال‌های آزاد می‌باشند. بخشی از این سیستم شامل آنزیم‌های آنتی اکسیدان مانند کاتالاز و گایاکول پراکسیداز و همچنین اسکوربات پراکسیداز است (Cho & Park, 2000) در گیاه یونجه حضور و افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان همراه با افزایش تنش جیوه در محیط رشد، به عنوان تعدیل کننده یا کاهش دهنده حضور Hg^{+2} در محیط گزارش شده است (Zhao et al., 2008). گونه‌های مختلف اکسیژن واکنشگر نظیر O_2^- و H_2O_2 یا OH به طور دایم به عنوان یک محصول فرعی از طریق واکنش‌های اکسیژن در کلروپلاست، میتوکندری و پراکسی زوم‌ها تولید می‌شوند (Del Rio et al., 2006). در شرایط طبیعی، تجمع و تولید گونه‌های مختلف اکسیژن

www.SID.ir

Archive of SID

واکنش‌گر به وسیله آنزیم‌های آنتی اکسیدان موجود در این اندامک‌ها کنترل می‌گردد. در شرایط تنش آسیب سلولی ناشی از تولید گونه‌های مختلف اکسیژن واکنش‌گر که به مقدار زیاد تولید می‌گردند به شدت افزایش می‌یابد. گزارش شده است O_2^- و H_2O_2 به دو طریق تاثیر خود را در شرایط تنش نشان می‌دهند. به عنوان مولکول‌های محرک بر بیان برخی از ژن‌ها اثر خود را می‌گذارند و یا اینکه از طریق آسیب به نوکلئیک اسیدها و اکسیداسیون پروتئین‌ها و پراکسیداسیون لیپیدها اثر خود را ظاهر می‌سازند (Mittler et al., 2004). به نظر می‌رسد سمیت جیوه با تاثیر بر کاهش پروتئین‌ها از طریق اکسیداسیون آنها باعث کاهش شدید رشد می‌گردد. همچنین با پراکسیداسیون لیپیدهای غشا تراوائی و نفوذ پذیری غشای سلولی را تغییر می‌دهد. در مطالعه حاضر، همراه با افزایش میزان جیوه در محیط فعالیت کاتالاز برگ‌ها به طور معنی‌دار افزایش یافته است. این آنزیم سبب تجزیه H_2O_2 به آب و اکسیژن شده از اثر سمیت آن می‌کاهند. گزارش شده است که در برگ‌های گوجه‌فرنگی تحت تیمار Hg^{2+} میزان این آنزیم به شدت افزایش یافته است (Cho & Park, 2000) که با نتایج این مطالعه هم‌خوانی دارد. جهت جلوگیری از تجمع عناصر سمی در اثر تنش‌های اکسیداتیو، بافت‌های گیاهی باسنتز آنتی اکسیدان‌های آنزیمی از جمله پراکسیدازها به مبارزه با این مواد سمی می‌پردازند. پراکسیدازها به عنوان آنزیم مطالعات زیستی واکنش‌های هیدروژناسیون را با انتقال هیدروژن از یک دهنده آنتی‌اکسیدان به پراکسید هیدروژن کاتالیز می‌کنند متقابلاً زمانی که در معرض فلزات سنگین‌تر قرار می‌گیرند فعالیت آنزیم پراکسیداز همبستگی نزدیکی با تغییرات فعالیت‌های فیزیولوژیک مانند تنفس، تعرق و فتوسنتز و رشد دارد و توانایی آن را دارد تا به صورت یک شاخصی حساس عمل کند (Vierling & Nguyen, 1992). افزایش فعالیت پراکسیداز در برگ‌های گیاه مورد مطالعه نشان می‌دهد که یون‌های جیوه فعالیت این آنزیم را در ارتباط با تولید و تجمع عناصر سمی مانند پراکسید هیدروژن و رادیکال سوپراکسید افزایش داده است. گزارش شده است که پراکسیداز می‌تواند به عنوان یک آنزیم تجزیه کننده H_2O_2 عمل نموده که این موضوع به سختی دیواره سلولی کمک کرده و بدنبال آن رشد گیاه را محدود می‌کند (Kamal et al., 2004). نتایج این مطالعه نشان داد که همراه با افزایش تنش کلرید جیوه در محیط میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز به طور معنی‌داری افزایش یافت. از جمله آنزیم هایی که در چرخه اسکوربات- گلوتاتیون موجود در کلروپلاست‌ها، سیتوپلاسم، میتو کندری و همچنین پراکسی زوم‌ها عمل می‌کند آسکوربات پراکسیداز است. گزارش شده است که در گیاهان تیمار شده با فلز کادمیوم، پراکسی زوم‌ها از طریق فراهم نمودن و افزایش ظرفیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان موثر در چرخه آسکوربات- گلوتاتیون به سمیت این فلز پاسخ داده اند (Palma et al., 2002). افزایش H_2O_2 در محیط به عنوان یک محرک سیستمیک برای القاء تولید اسکوربات پراکسیداز عمل می‌کند. در کشت جنینی گیاه برنج H_2O_2 به طور ناپایدار سبب القاء mRNA برای تولید آسکوربات پراکسیداز سیتوزولی شده است (Morita et al., 1999). افزایش فعالیت آنزیم اسکوربات و پراکسیداز در برگ‌های گیاه مورد مطالعه می‌تواند عاملی برای کاهش یا حذف H_2O_2 اضافی باشد.

نتیجه‌گیری نهائی

نتایج این مطالعه نشان داد که سمیت جیوه با ایجاد تنش اکسیداتیو سبب کاهش رشد و تغییرات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی شد. افزایش مالون دی آلدهید در برگ‌ها نشان دهنده پراکسیداسیون لیپیدهای غشائی و آسیب ناشی از تنش جیوه در سطح سلولی می‌باشد. کاهش شدید کلروفیل برگ‌ها و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان نشان دهنده سمیت شدید جیوه و فعال شدن دفاع ضد اکسیدانی در گیاه مورد مطالعه است. تجمع بیشتر این فلز سمی در ریشه‌ها و انتقال کمتر آن به اندام‌های هوایی گیاه نشان از تحمل نسبی گیاه شوید و نیز به عنوان یک نکته مثبت تلقی می‌شود، زیرا این امر احتمالاً مانعی برای انتقال و ذخیره کمتر به بخش‌های خوراکی این گیاه است.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

سلطانی، ا. (۱۳۸۶). کاربرد نرم افزار SAS در تجزیه‌های آماری. انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد، چاپ اول، ویرایش دوم. ۱۸۲ صفحه

Basta, N.T., Gradwohl, K.L., Schroder, L.J. (2001). Chemical immobilization of lead, zinc and cadmium in smelter- contaminated soils using biosolids and rock phosphate. J. Environ. Qual. 30:1222-1230

Bradford, M.M. (1976). A rapid sensitive method for the quantition of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Analyt. Biochem. 72: 248-254.

Cargnelutti, D., Tabaldi, L.A., Spanevello, R.M., Jucoski, G.O., Battisti, V. (2006). Mercury toxicity induces oxidative stress in growing cucumber seedlings. Chemosphere, 65: 999 – 1006.

Chang, A.C., Page, A.L., Johnson, B. (1982). Effect of sludge application on the Cd, Pb, Zn levels of selected veg. plants. Hilgardi. 50: 1-14.

Chaparzadeh, N., Amico, M.L., Khavari-nejad, R.A. (2004). Antioxidative responses of *Calendula officinalis* under saline conditions. Plant physiol and biochem. 42: 895- 701.

Cho, V.H., Park, J.O. (2000). Mercury- induced oxidative stress in tomato seedling. Plant sci. 126: 1-9

Del Rio, L.A., Sandalio, L.M., Corpas, F., Palma, J.M., Barroso, J.B. (2006). Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in proxisomes. Peroduction in maize coleoptiles analyzed with a tetrazolium based assay. Planta. 212: 175-183.

Fieling, J.L., Hall, J. (1978). A biochemical study of peroxidase activity in roots of *Pisum sativum*. J. of experimental Bot. 29: 981-989.

Han, F.X., Banin, A., monts, D.L., Triplett, G.B. (2002). Industrial age anthropogenic inputs of heavy metals into the pedosphere. Naturwissensch of ten. 89: 497504.

Han, F.X., Monts, D.L., Waggoner, A.C., Pledinec J.M. (2006). Binding, distribution, and plant ustake of Hg in a soil from oak Ridge, Tennessee, USA. Sci. Total Environ. 368: 753-768.

Hegedus, A., Eradel, S., Horvath, G. (2001). Comparative studies of H2O2 detoxification enzymes in green and greening barely seedling under lead stress. Plant Sci. 160: 1085-1096.

Kamal, M., Ghaly, A.E., Mahmoud, N., Corte, R. (2004). Phytoaccumulation of heavy metals by aquatic plants. Environ. Int. 29: 1029-1039.

Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., Van, F. (2004). Reactive oxygen gene network of Plants. Trend Plant Sci. 9: 490-498.

Molassiotis, A., Tanoug G., Patakas, A. (2005). Effects of 4- month Fe deficiency exposure on Fe reduction mechanism, photosynthetic gas exchange chlorophyll fluorescence and antioxidant defense in two peach rootstocks differing in Fe deficiency tolerance. J of plant nut. 25: 843-860.

Morita, S., Kaminaka, H., Masumura, T., Tanaka, K. (1999). Induction of rice cytosolic ascorbate peroxidase mRNA by oxidative stress signaling. Plant cell physiol. 40: 417-422.

Nakano, Y., Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate- specific peroxidase in spinach chloroplastic. Plant cell physiol. 22: 867-880.

Palma, J.M., Sandalio, L.M., Corpas, F.J., Del Rio, L.A. (2002). plant protease protein degradation and oxidative stress: role of peroxisomes. Plant physiol. Biochem. 40: 521-530.

Pereira, J.G., Molina, S.M., Azevedo, R.A. (2002). Activity of antioxidant enzymes in response to Cd in *Clotalaria juncea*. Plant and soil. 239: 123-122.

Strain, H.H., Svec, W.A. (1966). Extraction, Separation, stimulation and isolation of chloroplast. In: L.P. Vernon and G.R. seely, (eds), the chlorophylls Academic press. New York. PP. 199-244.

Van, A.F., Clijsters, J.H. (1994). Effects of metals on enzyme activity in plants, plant cell Environ. 13: 195-206.

Vierling, R.A., Nguyen, H.T. (1992). Use of RAPD markers to determine the genetic diversity, of diploid wheat genotype. TheorAPPl. Genel. 84: 835-838.

www.SID.ir

Archive of SID

Woodies, T.C., Hunter, G.B., Johnson, F. (1977). Statical studies of matrix effects on the determination of Cu and Pb in fertilizer and material and plant tissue by flame atomic absorption spectrophotometry, Analyt chem Acta. 90: 127-130.

Zhao, S.Z., Shao, J.W., Zhi, M.Y. (2008). Biological detection analysis of mercury toxicity to alfalfa plants. Chemosphere, 70: 1500-1509.

Zhou, Z.S., Huang, S.Q., Gouk-Mehta, S.K. (2007). Metabolic adaptations to Hg- induced oxidative stress in roots of alfalfa. J. Inorg. Biochem. 101: 1-9.

Zimhal, R.L, (1975). Entry and movement in vegetation of lead derived from air and soil sources, paper, presented at 68th Annu. Meeting of air.

www.SID.ir

Archive of SID

The study of $HgCl_2$ toxicity on the growth and some biochemical traits in Dill (*Anethum graveolens* L.) Crop

[*]Nooraniazad, H[1]., Hajibagheri, M.R[2]., Chobineh, D[1]., Ejraee, A.K[1].
1. Department of Biology, Islamic Azad University Jahrom Branch
2. Islamic Azad University Estahban Branch

Abstract

Mercury is a heavy metal and toxic, that causes pollution in agricultural lands. Accumulation of Hg by plants may disrupt many cellular functions and block growth and development. This study investigated the effects of Hg toxicity on growth and some biochemical traits in Dill (*Anethum graveolens* L.) plants. The experiment was carried out under hydroponic conditions with 5 treatments (0, 5, 10, 15 and 20μM $HgCl_2$) and 4 replicates. Under Hg toxicity dry weight of root and shoot, total chlorophyll and MDA in leaves, Hg accumulation in root and shoot and enzymes activity of peroxidase, catalase and ascorbate peroxidase in leaves were measured. The Results showed that the maximum accumulation of Hg occurred in roots followed by shoots. Dry weight of shoot and root, except in treatment of 5μM, significantly decreased in comparison to control. The reduction of total chlorophyll in leaves was significantly, with increasing Hg toxicity. MDA content in leaves significantly incerased with increasing of Hg toxicity in comparison to control. The activity of catalase and ascorbate proxidase in leaves increased significantly in comparison to control.The Increase of enzyme of peroxidase activity, except for treatment of 5μM was significant. reduction of growth and total chlorophyll and increase of MDA in leaves is associated with oxidative damage. Hg tolerance associated with the Hg accumulation in roots, increase of enzymes and activation of antioxidant defense system.

Key Words: Dill, Enzymes, Growth, Mercury toxicity, Oxidative stress

*email:hnooraniazad@yahoo.com

www.SID.ir