Archive of SID

علوم زراعی، سال دوم، شماره‌های سوم و چهارم، پاییز و زمستان ۱۳۸۹

بررسی فعالیت آنزیمی کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز تحت سمیت سرب و مس در گونه خلر (*Lathyrus sativus*)

سیده مهتاب بلادی*
عضو باشگاه پژوهشگران جوان دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، ایران

علی کاشانی
دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، گروه زراعت و اصلاح نباتات، کرج، ایران

داوودحبیبی
دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، گروه زراعت و اصلاح نباتات، کرج، ایران

فرزاد پاک‌نژاد
دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، گروه زراعت و اصلاح نباتات، کرج، ایران

ایمان نادعلی
عضو باشگاه پژوهشگران جوان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۵/٦ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۱۱/۲۳

چکیده

برخی گیاهان قادر به جذب و تجمع مقادیر کافی از بعضی فلزات سنگین و سمی هستند. اگرچه فلزات سنگین در ایجاد تنش اکسیدی در گیاهان مشارکت دارند، اما گیاهان دارای مکانیسم‌های تدافعی مختلفی در برابر سمیت این عناصر هستند. یکی از این مکانیسم‌ها فعال‌سازی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان به‌منظور محافظت در مقابل آسیب‌های اکسیدی ناشی از فلزات سنگین است. هدف از مطالعه حاضر شناخت تغییرات آنزیمی کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز در گونه گیاهی خلر (Lathyrus sativus)، تحت سمیت عناصر سنگین سرب و مس بود. به علاوه اندازه‌گیری توانایی تجمع عناصر سنگین سرب، مس و اثرات این عناصر بر پروتئین و هسته سلول گیاهی از دیگر اهداف آزمایش بود. این آزمایش در پاییز ۱۳۸۷درگلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی کرج به‌صورت آزمایش فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. در این راستا از چهار سطح سرب (Pb(NO3)2 ۰،۲۰۰،۴۰۰،۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک) و چهار سطح مس (Cu(SO4)2 ۰،۱۵۰،۳۰۰،۴۰۰ میلیگرم بر کیلوگرم خاک) استفاده شد. نتایج آزمایش حاکی از افزایش معنی‌دار تجمع سرب و مس تحت سطوح متفاوت این عناصر بود ($p<0/01$)، به علاوه اندازه‌گیری ظرفیت دی تیروزین و دی هیدروکسی گوانوزین که به‌ترتیب هریک طی پراکسیداسیون پروتئین و هسته سلول گیاهی تحت سمیت عناصر افزایش می‌یابند، معنی‌دار شد ($p<0/01$). بیشترین اثرات سمی این عناصر در غلظت‌های ۸۰۰ و ۴۵۰ میلی‌گرم سرب و مس مشاهده شد. افزایش معنی‌دار دو آنزیم کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز در واکنش به سمیت این عناصر به موازات افزایش سطوح متفاوت سرب و مس قابل توجه بود ($p<0/01$)، به طوری که افزایش چشمگیر در فعالیت این دو آنزیم در بیشترین غلظت از سرب(۸۰۰ mg/kg) و مس (۴۵۰ mg/kg) خاک مشاهده شد.

واژه‌های کلیدی: دی تیروزین، دی هیدروکسی گوانوزین، پروتئین، هسته سلول، تنش اکسیدی.

* نویسنده مسوول مکاتبات، s_mahtab_beladi@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

طی چند دهه گذشته غلظت فلزات سمی (کادمیوم، نیکل، سرب، جیوه، مس و غیره) در اکوسیستم‌های خشکی و آبی تا چند برابر افزایش‌یافته است. این فلزات به شدت سمی بوده و در غلظت‌های زیاد رشد و سایر فعالیت‌های سلولی را کاهش می‌دهند(Ali *et al.*, 2003). فلزات می‌توانند غشاءهای سلولی را دچار آسیب نمایند و در نتیجه غلظت‌های زیاد سرب و یا فلزاتی مثل کادمیوم ممکن است به تنهایی سبب تجمع بیش از حد این فلزات در گیاهان شوند (Nascimento & Xing, 2006).

سرب مهمترین آلاینده‌ای است که در نتیجه فعالیت‌های بشری ایجاد شده و از زمان انقلاب صنعتی وارد محیط گردیده است (Lopez *et al.*, 2005). مس نیز اگرچه یک عنصر کم مصرف و ضروری است که به میزان کم در سلول‌ها و بافت‌های مختلف یافت می‌شود، به طور طبیعی با پروتئین‌ها پیوند دارد، اما ممکن است آزاد شده و به‌عنوان کاتالیزوری در ایجاد رادیکال‌های بسیار فعال هیدروکسیل عمل نماید (Gaetke & Chow, 2003). البته گفته می‌شود که غلظت اضافی مس به‌دلیل افزایش گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) در بخش‌های زیرسلولی موجب تنش اکسیدی می‌شود. ROS شامل رادیکال‌های سوپراکسید (O^{o-}_2)، پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و رادیکال هیدروکسیل (OH^o) است که تمام آنها بر لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک اثر می‌گذارند (Khatun *et al.*, 2008).

از آنجایی که واسطه‌های سمی و ROS طول عمر کوتاهی داشته و اندازه‌گیری آنها مشکل است، روش دیگری برای کنترل تنش اکسیدی پیشنهاد شده که محصولات پایدار نهایی واکنش‌های اکسیداتیو را با ماکرومولکول‌ها تعیین می‌کنند. دی تیروزین به‌عنوان یک ماده نشان‌دارکننده زیستی (بیومارکر) برای پراکسیداسیون پروتئین همبستگی نزدیکی با میزان تنش اکسیدی دارد (Boojar & Goodarzi 2007). یکی از روش‌های مناسب برای از بین بردن فلزات سنگین از مکان‌های آلوده استفاده از موجودات مقاوم نسبت به این فلزات است، به طوری که از توانایی تجمع و جذب بالا برخوردار باشند (Mendoza-Cozatl & Moreno-Sanchez, 2006).

برخی از گونه‌های فوق مقاوم از توانایی تجمع غلظت‌های زیادی از فلزات در بافت‌های خود برخوردارند. بنابراین خاک‌ها و مواد شیمیایی، منابع فلزات سنگین هستند که برای جذب توسط گیاهان قابل دسترس می‌باشند. واکنش گیاه نسبت به فلزات به نوع گونه گیاهی، غلظت کل فلز در خاک و قابلیت دسترسی زیستی فلز بستگی دارد، قابلیت دسترسی به فلزات نیز به ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی خاک‌ها متکی است (Boularbah *et al.*, 2006). در نتیجه افزایش غلظت فلزات سنگین می‌تواند قابلیت دسترسی به آنها را افزایش دهد که قابلیت دسترسی به فلزات سنگین به معنای عبور این عناصر از غشاء سلول زنده می‌باشد (Gardea-Torresdey *et al.*, 2005). بنابراین گیاهان دارای سیستم‌های گردشی پیوسته‌تری بوده و از طریق رشد و نمو نسبت به شرایط تنش واکنش نشان می‌دهند. واکنش یک گیاه نسبت به فلز به طور وسیعی مورد مطالعه قرار گرفته و به تولید گونه‌های فعالی مثل OH^o، O^{o-}_2 و H_2O_2 می‌انجامند. به علاوه گیاهان

www.SID.ir

Archive of SID

قادر به تجمع یون‌ها از طریق انتقال فعال هستند، این نوع انتقال در نتیجه عملکرد ناقلان و در غشاءها روی می‌دهد (Lopez *et al.*, 2005) و یا اینکه این گونه گیاهان جهت مقابله با آسیب‌های اکسیدی که ناشی از عملکرد یون‌های فلزی (فلزات سنگین) است سیستم‌های حفاظتی خاصی دارند که از آنزیم‌ها و مواد آنتی‌اکسیدانی تشکیل شده‌اند (Ali *et al.*, 2003)، به طوری که آنها را در مقابل آسیب‌های اکسیدی محافظت می‌کند (Garnczarska & Ratajczak, 2000). اهمیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان به توانایی آنها در از بین بردن ROS و در نهایت جلوگیری در بروز آسیب‌های اکسیدی می‌باشد (Khatun *et al.*, 2008).

در تحقیق Wong *et al.* (2006) که ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی ۲۵ گیاه گرمسیری تحت سمیت مس مورد آزمایش قرار گرفت، مشخص شد که کمترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی مربوط به گیاه کربس (*Local celery*) و بیشترین فعالیت در برگ‌های گیاه اولماراجا می‌باشد. این فعالیت در برگ‌های گیاهان دیگر از جمله تاج خروس قرمز، نعناع، لاسکا، تاپیوکا، دون سلام، سیب زمینی شیرین، کاری و بتل نیز نسبتاً زیاد بود.

از آنجایی که گونه گیاهی خلر *(Lathyrus sativus)* یک گونه از لگوم‌های یک‌ساله است که از قابلیت مقاومت در برابر شرایط نامطلوب رشد برخوردار بوده و به‌عنوان یکی از منابع ژنی قابل توجه محسوب می‌شود و به طور کلی نسبت به تنش‌های غیرزنده و حتی زنده مقاومت می‌نماید (Brunet *et al.*, 2008)، در این تحقیق فرض کردیم که این گونه گیاهی به‌دلیل برخورداری از مقاومت قادر به مقابله با تنش فلزات سنگین در سطح سلولی در خاک‌های آلوده به این گونه عناصر باشد، بنابراین به بررسی میزان فعالیت دوآنزیم آنتی‌اکسیدان و اثرات سمی عناصر سنگین سرب و مس بر پروتئین و هسته سلول گیاهی پرداخته، ضمن اینکه توانایی تجمع این عناصر در بیومس گیاهی را نیز مورد توجه قرار داده شد.

مواد و روش‌ها

تحقیق حاضر به صورت یک آزمایش گلخانه‌ای در پاییز ۱۳۸۷ در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی کرج انجام پذیرفت. میزان رطوبت نسبی گلخانه ٦٠درصد و حداقل وحداکثر درجه حرات به‌ترتیب برابر با ١٦ و ٣٢ درجه سانتی‌گراد بود. در این تحقیق گونه خلر *(Lathyrus sativus)* به صورت آزمایش فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با استفاده از چهار سطح سرب $Pb(NO_3)_2$ ٠،٢٠٠،٤٠٠،٨٠٠ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک) و چهار سطح مس $(Cu(SO_4)_2)$ ٠،١٥٠،٣٠٠،٤٠٠ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک) مورد آزمایش قرار گرفت. خاک‌برداری از عمق ٣٠-٠ سانتی‌متری خاک صورت گرفت و سپس به‌منظور تعیین خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک مورد نظر و همچنین وضعیت حاصلخیزی و عوامل محدودکننده، به‌خصوص عناصر سنگین سرب و مس آزمایش خاک انجام شد. بافت خاک مورد آزمایش لومی- شنی بوده و میزان شوری خاک برابر ٥/٩١ ds/m pH خاک برابر ٧/٧ درصد نیتروژن کل ٠/٥٤ درصد میزان مواد آلی٠/٠٦٠ درصد همچنین میزان فسفر خاک بالا بوده، به طوری که این میزان برابر

www.SID.ir

Archive of SID

ppm ۳۵/٤ بود. میزان سرب ۵/۵ و مس ۰/۸۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم به‌دست آمد. پس از اطمینان از عدم سمیت خاک به‌منظور عملیات آماده‌سازی کلوخه‌های خاک مورد نظر خرد و سپس از الک ٤ میلی‌متری عبور داده شد و سپس خاک با غلظت‌هایی بیشتر از حد مجاز آلوده شد. همچنین به‌منظور کلاته شدن بیشتر این عناصر با کلوئیدهای خاک و فراهم شدن آلودگی با عناصر، گلدان‌های تیمار شده به مدت ۳۰ روز در این وضعیت قرار گرفتند و بعد از این مدت به کاشت گیاه مورد نظر اقدام شد.

به‌منظور بررسی و تجزیه و تحلیل اثر تیمارهای آزمایشی بر گیاه مورد نظر نمونه‌برداری در اوایل گلدهی یعنی ٦۰ روز بعد در شرایط گلخانه صورت پذیرفت و به آزمایشگاه منتقل گردید. برای تجزیه گیاهی و برآورد عناصر سنگین مورد مطالعه در اندام‌های مختلف، کل گیاه پس از برداشت به صورت کامل توسط آب دیونیزه شده شستشو شد و در آون ۷۰ درجه سانتی‌گراد خشک قرار داده شد و پس از آسیاب نمودن نمونه‌ها، به ۱ گرم از آن ۵ میلی‌لیتر اسید دوتایی (پرکلریک اسید $HCLO_4$ و اسید نیتریک HNO_3) با نسبت‌های ۳:۲ در دمای ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۸ ساعت، هضم شد، سپس با اضافه کردن آب مقطر حجم آن به ۵۰ میلی‌لیتر رسانده شده و این محلول از کاغذ صافی واتمن عبور داده شد و سپس میزان عناصر نمونه‌ها توسط اسپکتروفتومتر جذب اتمی[1] خوانده شدند.

پس از به‌دست آمدن مقدار فلزات سنگین در اندام‌های هوایی فاکتور ضریب تجمع گیاهی[2] از رابطه زیر برای هر یک از عناصر سرب و مس به‌صورت جداگانه به‌دست آمد (Zu *et al.*, 2005).

AF: [Element in shoot]/[Normal level in plant]

به‌منظور اندازه‌گیری بیومارکرها و فعالیت آنزیمی نمونه‌گیری از برگ‌های جوان و توسعه‌یافته در اوایل گلدهی یعنی ٦۰ روز بعد در شرایط گلخانه صورت پذیرفت. در ابتدا برگ‌های منتقل شده به آزمایشگاه با آب مقطر شستشو داده شد و بلافاصله در بافر تریپس ۰/۱٦ مولار با pH= ۷/۵ وارد شده و سپس خرد و هموژن شدند. آنگاه اجازه داده شد در حضور حجم مشابهی از همان بافر حاوی دیجیتونین و آنزیم هضم‌کننده دیواره، فرایند هضم غشاء و دیواره سلول انجام شود. در پایان مقدار ۰/۵ میلی لیتر از محلول هموژن برای سنجش پروتئین برداشته شد و سپس مقدار پروتئین آن بر حسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تعیین گردید، به طوری که مقدار فعالیت دو آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز و کاتالاز بر اساس روش (Paglia & valentine 1987) به‌دست آمد. همچنین سنجش دی هیدروکسی گوانوزین (8–OH-2-DG) بر اساس روش Bogdanov *et al.* (1999) انجام شد. اندازه‌گیری بیومارکر دی تیروزین بر اساس روش Orhanl *et al.* (2004) و روش Amado (1984) تعیین شد.

با توجه به کمی بودن هر دو عامل مورد آزمایش (غلظت‌های سرب و مس) برای تجزیه داده‌ها از تجزیه سطح پاسخ[3] استفاده شد.

[1] Atomic Absorption Spectrophotometer
[2] Accumulation Factor
[3] Response Surface Analysis

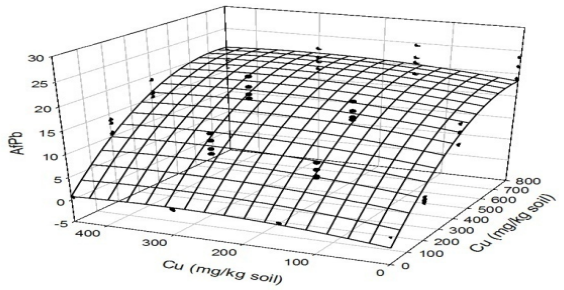
www.SID.ir

Archive of SID

نتایج

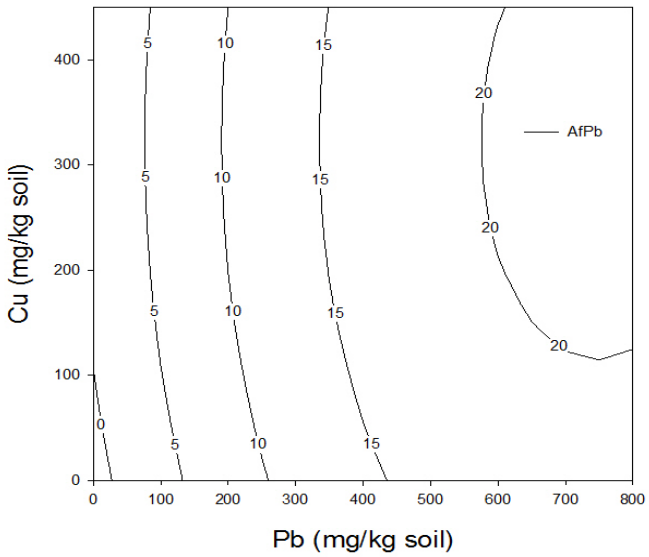
فاکتور تجمع سرب در اندام گیاهی خلر (AF Pb)

زمانی که غلظت‌های متفاوت سرب و مس در محیط رشد افزوده شد، پس از دوره‌ای از رشد (۶۰ روز بعد) فاکتورتجمع سرب (AF Pb) در اندام گیاهی این گونه افزایش معنی‌داری یافت ($p<0/01$). شکل ۱ تغییرات میزان تجمع سرب در بیومس گیاهی خلر در سطوح متفاوت سرب و مس را به خوبی نشان می‌دهد.



شکل ۱- روند تغییرات تجمع مس (AF Pb) در بیومس خلر

همان‌گونه که مشاهده می‌شود با افزایش غلظت سرب در خاک، میزان تجمع سرب در بیومس گیاهی خلر افزایش چشم‌گیری داشته است که این تغییرات برای عامل سرب از نوع درجهٔ دوم و برای مس این تغییرات شیب بسیار ملایم‌تری را نشان می‌دهد. رسم خطوط تراز حاصل از مقادیر پیش‌بینی شده مقادیر متناظر سرب و مس برای یک مقدار مشخص از صفت مورد مطالعه را به خوبی نشان می‌دهد (شکل ۲).



شکل ۲- خطوط تراز حاصل از مقادیر پیش بینی شده بر صفت مورد مطالعه

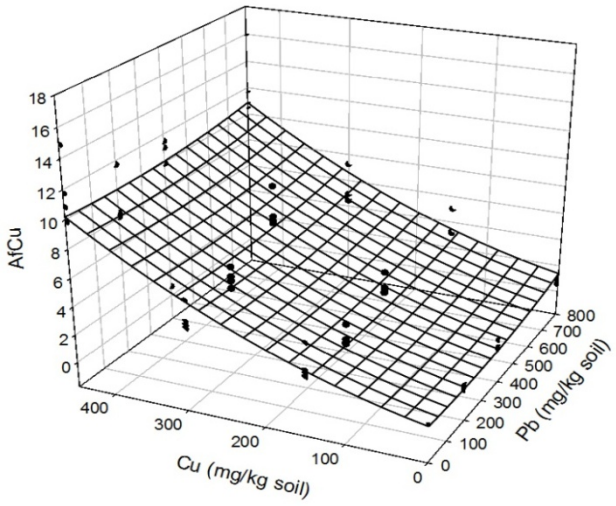
www.SID.ir

Archive of SID

افزایش مقدار تجمع سرب در اندام گیاهی خلر بیشترین وابستگی را به مقادیر سرب داشته است و در یک سطح ثابت مس، میزان تجمع سرب با افزایش غلظت مس در خاک تغییر اندکی یافته است. مقادیر تجمع ۵ میلی‌گرم سرب یا کمتر از آن در غلظت‌های کمتر از ۲۰۰ میلی‌گرم سرب در خاک رخ داد و این مقدار با افزایش غلظت سرب افزایش یافت، به طوری که در ۸۰۰ میلی‌گرم سرب در خاک این مقدار به حدود ۲۰ میلی گرم وزن خشک رسید. البته استعمال ٤٥٠ میلی‌گرم مس در خاک مانعی برای تجمع بیشتر سرب در بیومس گیاهی بود، به طوری که با استعمال ٤٥٠ میلی‌گرم مس در خاک بین استعمال مقادیر ۸۰۰-٦۰۰ میلی‌گرم سرب در محیط رشد تفاوتی از نظر تجمع سرب در اندام گیاهی خلر مشاهده نشد.

فاکتور تجمع مس در اندام گیاهی خلر (AF Cu)

نتایج تجزیه سطح پاسخ حاکی از شدت معنی‌داری عامل مس ($p<۰/۰۱$) بر تجمع این عنصر در بیومس گونه خلر بود. اثر غلظت‌های متفاوت سرب بر تجمع مس در اندام گیاهی خلر معنی‌دار نبود. به طور کلی میزان فاکتور تجمع مس در سطوح مختلف سرب و مس نشان داد که با افزایش غلظت مس استعمال شده در خاک صفت مورد مطالعه افزایش یافته که این افزایش از یک معادله درجه دوم پیروی می‌کند (شکل ۳).

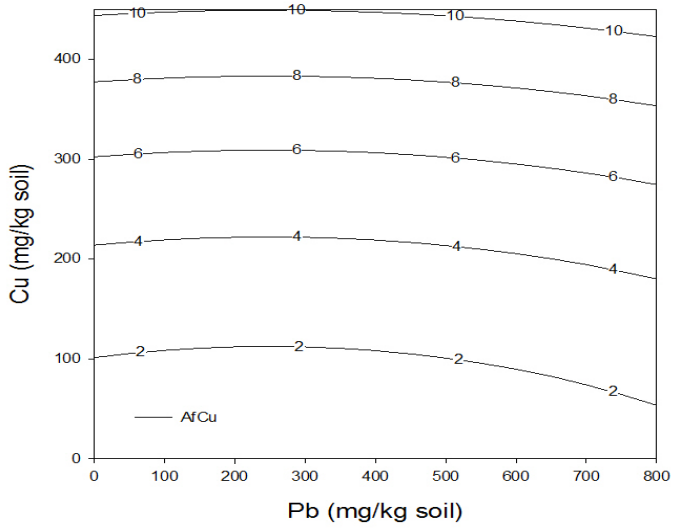


شکل ۳- روند تغییرات تجمع مس(AF Cu) در بیومس خلر

مقادیر متناظر سرب و مس برای یک مقدار مشخص از تجمع مس در بیومس گیاهی به خوبی نشان‌دهنده این است که افزایش مقدار تجمع مس بیشترین وابستگی را به مقادیر مس در خاک داشته است، به طوری که با افزایش غلظت مس در خاک این فاکتور افزایش یافته است. مقادیر تجمع ۲ میلی‌گرم مس در بیومس گیاهی در مقادیر ۱۰۰ میلی‌گرم مس در خاک رخ داد و همچنان با افزایش غلظت مس این مقدار افزایش یافت (شکل ٤).

www.SID.ir

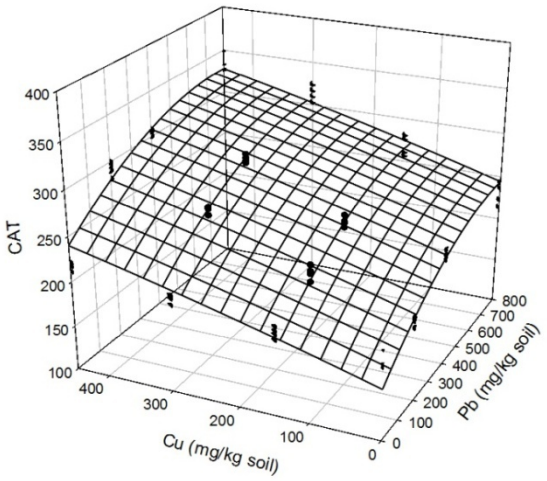
Archive of SID



شکل ۴- خطوط تراز حاصل از مقادیر پیش‌بینی شده بر صفت مورد مطالعه

اثر سرب و مس بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) در گونه خلر

فعالیت آنزیم کاتالاز در پاسخ به سمیت ناشی از سطوح متفاوت سرب و مس افزایش معنی‌داری یافت ($p<۰/۰۱$). شکل ۵ که از تغییرات آنزیم CAT در سطوح مختلف سرب و مس ناشی می‌شود، بیانگر این است که با افزایش غلظت سرب و مس در خاک میزان فعالیت این آنزیم رو به افزایش است که این تغییرات برای عامل سرب و مس از یک منحنی درجه دوم پیروی می‌کند.

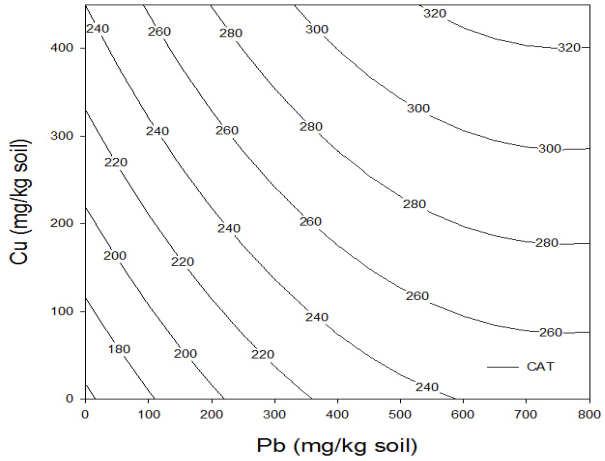


شکل ۵- روند تغییرات آنزیم کاتالاز (CAT) تحت سمیت سرب و مس

www.SID.ir

Archive of SID

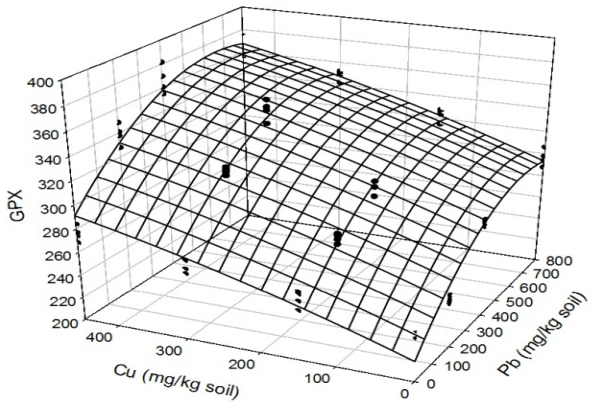
همچنین شکل ٦ نشان می‌دهد که افزایش فعالیت این آنزیم تحت غلظت‌های مختلف سرب و مس به شدت در حال افزایش است و بیشترین افزایش در فعالیت این آنزیم برای مقادیر حداکثر سطح از سرب و مس استعمال شده در خاک بود.



شکل ۶- خطوط تراز حاصل از مقادیر پیش بینی شده بر صفت مورد مطالعه

اثر سرب و مس بر میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز (GPX) در گونه خلر

آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز نیز به‌منظور حفاظت بیشتر گیاه تحت سمیت حاصل از سرب و مس افزایش معنی‌دار یافت ($p<۰/۰۱$). افزایش غلظت هر دو عامل سرب و مس فعالیت آنزیم مربوطه را افزایش داده است که این افزایش برای هر دو عامل سرب و مس از یک منحنی درجه دوم پیروی می‌کند (شکل ۷).

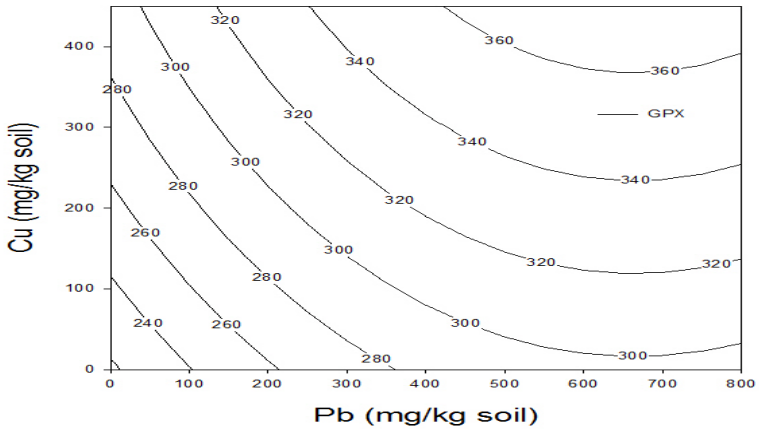


شکل ۷- روند فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز (GPX) تحت سمیت سرب و مس

www.SID.ir

Archive of SID

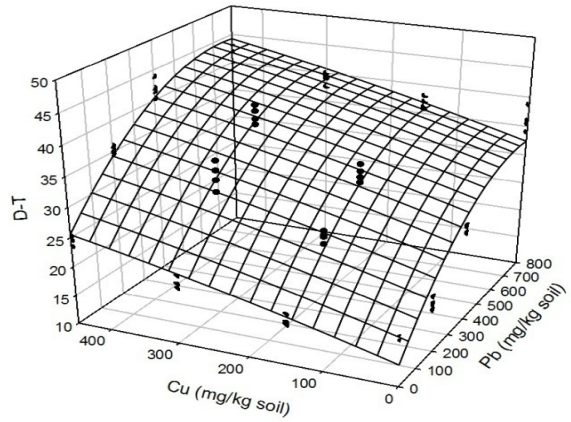
مقادیر متناظر سرب و مس به شدت بر آنزیم GPX موثر بوده و آن را افزایش داده است که این افزایش به هر دو مقادیر سرب و مس تقریباً به یک میزان وابسته بود (شکل ۸).



شکل ۸- خطوط تراز حاصل از مقادیر پیش‌بینی شده بر صفت مورد مطالعه

اثر سرب و مس بر ظرفیت دی تیروزین (D-T) در گونه خلر

نتایج تجزیه سطح پاسخ حاکی از شدت معنی‌داری هر دو عامل سرب و مس بر تاثیر ظرفیت دی تیروزین در گونه خلر بود ($p<۰/۰۱$). شکل ۹ که از تغییرات پروتئین گیاهی در سطوح مختلف سرب و مس ناشی می‌شود، بیان می‌دارد که با افزایش غلظت سرب و مس اگر چه هر دو عامل سرب و مس بر ظرفیت دی تیروزین افزوده‌اند، اما این تغییرات برای عامل سرب از نوع درجه دوم و برای مس به شکل خطی با شیب ملایم‌تر است.

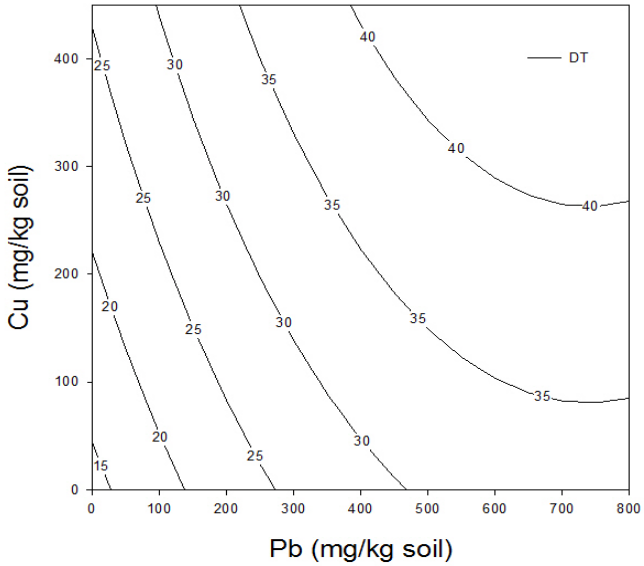


شکل ۹- روند تغییرات میزان ظرفیت دی تیروزین در سطوح مختلف سرب و مس

www.SID.ir

Archive of SID

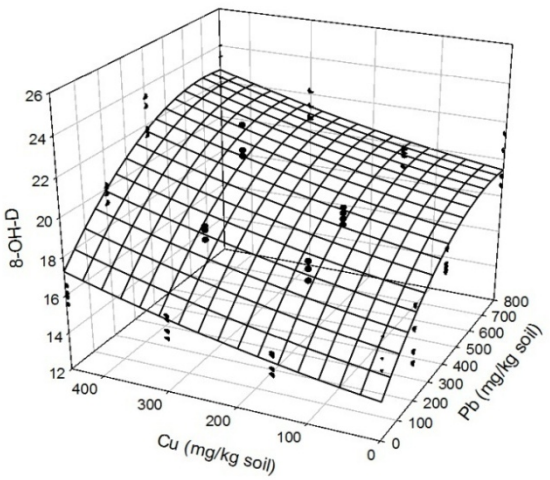
شکل ۱۰ خطوط تراز حاصل از مقادیر پیش‌بینی شده بر صفت مورد مطالعه بیان می‌دارد که افزایش هر دو غلظت سرب و مس با یکدیگر ظرفیت دی تیروزین را بیشتر کرده است، به طوری که بیشترین میزان از ظرفیت دی تیروزین در بیشترین سطح از دو عنصر سرب و مس به‌دست آمد.



شکل ۱۰- خطوط تراز حاصل از مقادیر پیش‌بینی شده بر صفت مورد مطالعه

اثر سرب و مس بر ظرفیت دی هیدروکسی گوانوزین (8-OH-2-DG) در گونه خلر

ظرفیت دی هیدروکسی گوانوزین تحت سمیت سرب و مس افزایش معنی‌دار یافت ($p<۰/۰۵$). شکل ۱۱ تغییرات میزان ظرفیت دی هیدروکسی گوانوزین را در سطوح مختلف سرب و مس نشان می‌دهد. همان گونه که مشاهده می‌شود با افزایش غلظت سرب و مس در خاک میزان ظرفیت دی هیدروکسی گوانوزین افزایش یافته است، که این تغییرات برای عامل سرب از نوع درجهٔ دوم و برای مس به شکل خطی با شیب ملایم‌تر می‌باشد.

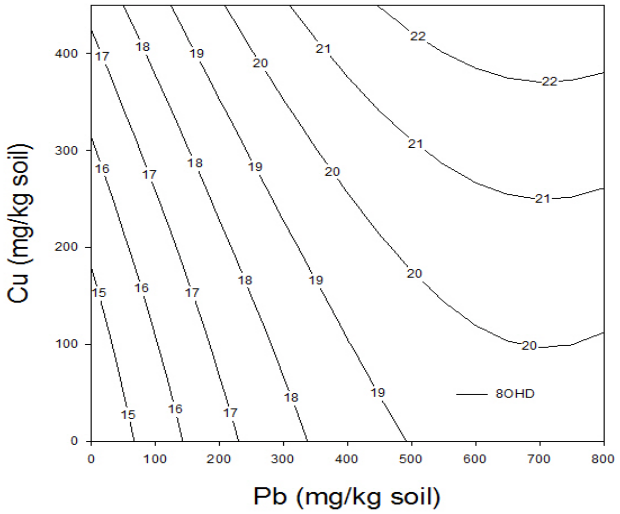


www.SID.ir

Archive of SID

شکل ۱۱- روند تغییرات میزان ظرفیت دی هیدروکسی گوانوزین در سطوح مختلف سرب و مس

رسم خطوط تراز حاصل از مقادیر پیش‌بینی شده برای مقادیر متناظر سرب و مس نیز بر صفت مورد مطالعه حاکی از تأثیر بیشتر سرب بر تخریب هستهٔ سلولی در گونهٔ گیاهی خلر است. به طوری که ۱۲۰ میلی‌گرم سرب به‌تنهایی بر تغییرات هستهٔ سلولی موثر بوده است و ظرفیت 8-0H-2-DG را به ۱۶ نانومول در میلی گرم پروتئین رسانده است و این در حالی است که همین مقدار از ظرفیت در غلظت ۳۱۰ میلی‌گرم مس به تنهایی در خاک به‌دست آمد. از طرفی عامل مس بر تخریب بیشتر هسته به سرب کمک کرده است به طوری که در غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم سرب به تنهایی ظرفیت این صفت به ۱۹ نانومول رسید. اگر خاک به ٤٥٠ میلی‌گرم مس آلوده شود همین مقدار از تغییرات هسته سلولی در غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم سرب بدست خواهد آمد. به عبارت دیگر ٤٥٠ میلی گرم مس به اندازهٔ ۳۵۰ میلی گرم سرب بر تخریب هستهٔ سلولی مؤثر می‌باشد. در حداکثر غلظت استعمالی سرب در خاک ظرفیت دی هیدروکسی گوانوزین به ۲۰ نانومول رسید که با وجود ٤٥٠ میلی‌گرم مس در خاک تنها ۳۰۰ میلی‌گرم سرب در خاک برای تحت تاثیر قرار دادن همین مقدار از تخریب هستهٔ سلولی (۲۰ نانومول) کفایت کرده است (شکل ۱۲).



شکل ۱۲- خطوط تراز حاصل از مقادیر پیش‌بینی شده بر صفت مورد مطالعه

بحث

در این تحقیق از گونه گیاهی خلر استفاده شد تا توانایی این گیاه در تجمع سرب و مس و برخی تغییرات فیزیولوژیکی آن مشخص گردد. درصد تجمع سرب در این گونه گیاهی بیش از تجمع مس در اندام گیاهی این گونه بود. مقایسه توانایی تجمع و ذخیره سرب در گونه‌های مختلف گیاهی آسان نیست، زیرا شرایط آزمایشی به طور قابل ملاحظه‌ای با یکدیگر تفاوت دارد (Brunet *et al.*, 2008)، حلالیت و قابلیت دسترسی به فلز به ویژگی‌های خاک بستگی داشته و به شدت تحت تاثیر pH و میزان ایجاد ترکیب با

www.SID.ir

Archive of SID

لیگاندهای محلول قرار دارند (Nascimento & Xing, 2006). تمایل یون‌های سرب برای اتصال به مکان‌های پیوندی در ساختارهای بیولوژیک زیاد است، به طوری که با یون‌های دیگر به رقابت پرداخته و جایگزین آنها می‌شود (Brunet *et al*., 2008)، در نتیجه اثرات مخرب سرب بر این گونه گیاهی منطقی بود. غلظت اضافی مس نیز به‌دلیل افزایش گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) در بخش‌های زیرسلولی موجب افزایش تنش اکسیدی می‌شود (Khatun *et al*., 2008). بر اساس نتایج به‌دست آمده از اندازه‌گیری دو بیومارکر دی تیروزین و دی هیدروکسی گوانوزین چنین استنباط کردیم که غلظت‌های متفاوت سرب و مس با یکدیگر پراکسیداسیون پروتئین و هسته را در گونه خلر تحریک نمود، زیرا همان طور که اشاره شد دی تیروزین به‌عنوان یک ماده نشان‌دارکننده زیستی (بیومارکر) برای پراکسیداسیون پروتئین همبستگی نزدیکی با میزان تنش اکسیدی دارد (Boojar & Goodarzi, 2007). دی هیدروکسی گوانوزین نیز در هسته و میتوکندری یکی از اشکال غالب از رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌باشد به طوری که این بیومارکر نقش محوری برای اندازه‌گیری اثر آسیب اکسیداتیو به DNA می‌باشد (Valavanidis *et al*., 2009). بیشترین اثرات سمیت عناصر سنگین سرب و مس در غلظت‌های ۸۰۰ و ٤٥٠ میلی‌گرم بر پروتئین و هسته سلولی قابل توجه بود، به طوری که در این غلظت‌ها که حداکثر سطح از استعمال این عناصر بود سمیت این عناصر بر هسته سلولی و پروتئین به ترتیب ۱/۵ و بیش از ۲/۵ برابر تیمار شاهد بود. البته گیاه خلر قادر به افزایش فعالیت دو آنزیم آنتی اکسیدان کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز در محیط آلوده به سرب و مس بود. بدیهی است که تولید ROS اولین علامت فعال شدن آنزیم‌های مربوطه باشد. H2O2 یک ROS بسیار سمی است که باید در نتیجه فعالیت کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز جدا گردد (Khatun *et al*., 2008). گلوتاتیون پراکسیداز از غشاء لیپید در معرض آسیب‌های اکسیدی محافظت کرده و از پراکسیدازهای آلی سمیت‌زدایی می‌کند. این ماده همچنین بر روی هیدروپراکسیدازهای آلی نیز عمل می‌کند (Boojar & Goodarzi, 2007). کاتالاز آنزیم مهم دیگری است که در شرایط تنش اکسیدی فعال می‌شود این آنزیم قادر به هضم و حذف H2O2 است (Khatun *et al*., 2008) و گفته شده است که پراکسیداز هیدروژن را کاملاً از بین می‌برد (Garnczrska & Ratajczak, 2000). در تحقیق با شدیدتر شدن تنش اکسیدی فعالیت آنزیم‌های مورد مطالعه افزایش یافت. این داده‌ها حاکی از آن است که ممکن است خلر به طور مستقیم بر روی خاک‌هایی که دچار آلودگی به چنین عناصری هستند، رشد نماید. چراکه فعالیت آنتی‌اکسیدان کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز در هیچ یک از سطوح سرب و مس متوقف نشد، به علاوه رابطه تجمع بین سرب و مس در بیومس گیاه با فعالیت آنزیم‌های مربوطه در بخش هوایی به خوبی نشان‌دهنده ارتباط مستقیم این آنزیم‌ها در واکنش به سمیت ناشی از عناصر سنگین سرب و مس در گیاه بوده است، بدین معنی که تجمع بیشتر سرب و مس در بخش هوایی فعالیت آنزیمی مورد مطالعه را در پاسخ به بروز تنش اکسیدی ناشی از سرب و مس در گونه خلر با توجه به افزایش سطح ROS بر پروتئین و هسته سلول که به‌ترتیب با تعیین میزان ظرفیت دی تیروزین و دی هیدروکسی گوانوزین مشخص می‌شوند، بیشتر افزایش داد. علاوه بر این

www.SID.ir

Archive of SID

بین تجمع سرب و مس در بیومس گیاه با ظرفیت دی تیروزین و دی هیدروکسی گوانوزین و فعالیت آنزیم‌های مورد مطالعه در این گونه گیاهی ارتباط منفی یافت شد، ممکن است این ارتباط حاکی از این فرضیه باشد که تجمع سرب و مس در گیاه و بروز آسیب‌های ناشی از رادیکال‌های آزاد تولید شده ناشی از سرب و مس موجب تحریک فعالیت آنزیمی در گیاه شده باشد و از طرفی افزایش فعالیت آنزیمی سبب کاهش ظرفیت دی تیروزین و دی هیدروکسی گوانوزین در گیاه شده باشد و یا این احتمال نیز وجود دارد که استراتژی این گونه گیاهی جذب بیشتر سرب و مس در گیاه را در واکنش به افزایش ظرفیت این دو بیومارکر کاهش داده باشد. از طرفی ارتباط منفی بین ظرفیت تولید این بیومارکرها با فعالیت دو آنزیم مورد مطالعه به خوبی نقش آنزیم‌های کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز را در ممانعت از آسیب‌های اکسیدی به بخش‌های سلولی پررنگ تر می‌سازد. انتظار می‌رود که آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان تنش‌های اکسیدی وارده بر گیاه مورد مطالعه را در مناطق آلوده به عناصر سنگین سرب و مس کاهش دهد، زیرا در این مطالعه با افزایش سطح سمیت دو عنصر سرب و مس فعالیت آنزیمی نیز افزایش یافت و به نظر می‌رسد که موجبات هضم بیشتر اکسیژن‌های رادیکال آزاد تولیدی را فراهم کرده باشد در واقع گیاهانی که فعالیت آنتی اکسیدانی آنها زیاد است نسبت به تنش اکسیدی مقاومت بیشتری دارند(Khatun *et al*., 2008). در تحقیق Ali *et al*. (2003) فعالیت زیاد آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گونه گیاهی Salix acmophylla نتیجه استراتژی‌های مختلفی بود که گیاه برای بقاء خود تحت تنش فلزاتی مثل مس نیکل و سرب به‌کار برد. Brunet *et al*. (2008) در تحقیقات خود گزارش کردند که مقاومت گونه گیاهی خلر نسبت به یون‌های سرب زیاد است. در این تحقیق همچنین نتیجه گرفته شد که گونه گیاهی خلر از توانایی بیشتری در تجمع سرب به بیومس گیاهی در مقایسه با تجمع مس برخوردار است، به علاوه این گونه گیاهی برای مقابله با سمیت ناشی از عناصر سنگین سرب و مس قادر به فعال کردن آنزیم‌های آنتی اکسیدان CAT و GPX است و به نظر می‌رسد که توانایی زیادی نسبت به کاهش اثرات سمی این فلزات از طریق فعال کردن سیستم آنتی اکسیدانی داشته باشد که البته ممکن است این گیاه از مکانیسم‌های دیگری نیز برای کاهش اثرات سمیت استفاده نماید که نیاز به مطالعات جامع‌تری دارد.

جدول ۱- ضرایب همبستگی بین صفات اندازه‌گیری شده

صفات	AF Pb	AF Cu	CAT	GPX	Dityrosine	8-OH-2-DG
AF Pb	۱					
AF Cu	۰/۹۶۶۹۸**	۱				
CAT	۰/۸۹۴۲۵**	۰/۹۴۷۶۰**	۱			
GPX	۰/۸۴۲۱۰**	۰/۸۹۳۰۰**	۰/۹۴۱۶۹**	۱		
Dityrosine	-۰/۴۶۶۰**	-۰/۴۳۱۸۲*	-۰/۴۲۰۷۴*	-۰/۳۹۳۷۴*	۱	
8-OH-2-DG	-۰/۷۸۵۷**	-۰/۷۲۶۶**	-۰/۷۱۲۶**	-۰/۶۳۰۴**	۰/۵۷۲۲۰**	۱

ns، *و** به‌ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۵ و ۰/۰۱

www.SID.ir

Archive of SID

منابع و مآخذ

1. Ali, B. M., Vajpayee, P., Tripathi, R. D., Rai, U. N., Singht, S. N., Singhgh, S. P., 2003. Phytoremediation of lead, nickel, and copper by salix acmophylla boiss: Role of antioxidant enzymes and antixidant substances. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 70: 462-469.
2. Amado, R., Aeschbach, R., Neukom, H., 1984. Dityrosine: In vitro production and characterization. Methods Enzymol., 107: 377-388.
3. Bogdanov, M. B., Beal, M. F., Meccabe, D. R., Griffin, R. M., and Matson, W. R., 1999. A carbon column based LCEC approach to routine 8-hydroxy-2-deoxyguanosine measurements in urine and other biological matrices. Free Rad Biol Med., 27: 647-666.
4. Boojar, M. A., and Goodarzi, F., 2007. The Copper tolerance strategies and the role of antioxidative enzymes in three plant species grown on copper mine. Chemosphere, 67: 2138-2147.
5. Boularbah, A., Schwartz, C., Bitton, G., Aboudrar, W., ouhammou, A., Morel, J. L., 2006. Heavy metal contamination from mining sites in south Morocco: 2. Assessment of metal accumulation and toxicity in plants. Chemosphere, 63: 811-817.
6. Brunet J., Repellin, A., Varrault, G., Terrync, N., Zuily-fodil, Y., 2008. Lead accumulation in the roots of Grass pea (*lathyrus sativus*): Anovel plant for phytoremediation systems. C.R Biologies, 331: 859-864.
7. Gaetke, L. M., and Chow, C. K., 2003. Copper toxicity oxidative stress and antioxidant nutrients. Toxicology, 189: 197-163.
8. Gardea–Torresdey, J. L., Peraha–Videa, J. R., Rosa, G. D. L., Parsons, J. G., 2005. Phytoremediation of heavy metals and study of the metal coordination by x-ray absorption spectroscopy. Coordination Chemistry Reviews, 24: 1979- 1810.
9. Garnczarska, M., and Ratajczak, L., 2000. Metabolic responses of lemna-minor to lead ions, II. Induction of antioxidant enzymes in roots. Acta physiologiae plantarum, 22: 429-432.
10. Khatun, S., Ali, M. B., Hahn, E. J., Paek, K. Y., 2008. Cooper toxicity in withania somnifera: Growth and antioxidant enzymes responses of in vitro grown plants. Environmental and Experimental Botany, 64: 279-285.
11. Lopez, M. L., Peralta-Videa, J. R., Benitez, T., Gardea–Torresdey, J. L., 2005. Enhancement of lead uptake by Alfafa (*Medicago sativa*) using EDTA and a plant growth promoter. Chemosphere, 61: 595-598.
12. Mendoza–Cozatl, D. G., and Moreno–Sanchez, R. 2006. Control of glutathione and phytochelatin synthesis under cadmium stress. Pathway modeling for plants. Journal of Theoretical Biology, 238: 919-936.
13. Nascimento, C. W. A. D., and Xing, B., 2006. Phytoextraction: A review on enhanced metal availability and plant accumulation. Sci. Agric. (Piraci caba, Braz), 63: 299-311.
14. Orhanl, H., Vermeulen, N. P. E., Tump, C., Zappey, H., Meerman, J. H. N., 2004. Simultaneous determination of tyrosine, phenylalanine and deoxy guanosine oxcidation products by liguid chromatography – tandem mass spectrometry as non-invasive biomarkers for oxidative damage. Journal of Chromatography B., 799: 245-254.

www.SID.ir

Archive of SID

15. Paglia, D. E., and Valentine, W. N., 1987. Studies on the quantitative and qualitative characterization of glutation proxidase. J. Lab. Med., 70: 158-165.
16. Valavanidis, A., Vlachogianni, T., Fiotakis, C., 2009. 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogensis. Journal of Environmental Science and Healt part, C, 27: 120-139.
17. Wong, S. P., Leong, L. P., Koh, J. H. W., 2006. Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. Food Chemistry, 99: 775-783.
18. Zu, Y., Li, Y., Chen, J. J., Chen, H. Y., Qin, L., Schvartz, C., 2005. Hyperaccumulation of Pb, Zn and Cd in herbaceous grown on Lead-Zinc.

www.SID.ir