زیست‌شناسی گیاهی، سال پنجم، شماره شانزدهم، تابستان ۱۳۹۲، صفحه ۱-۱۲
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۰۳/۳۰
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۱/۰۶/۰۷
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۱/۰۸/۰۶
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۱/۰۹/۰۱

بررسی میان‌کنش روی و اسیدهای آلی مالیک و سیتریک بر پاسخ‌های آنتی‌اکسیدانی در گیاه ذرت (*Zea mays* L.)

زهرا حسینی و لطیفه پوراکبر *
گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

چکیده

آلودگی‌های خاک با فلزات سنگین یکی از مشکلات جدی برای محیط و همچنین، یکی از تنش‌های محیطی مهم برای گیاهان محسوب می‌شود. روی، به عنوان عنصری ضروری برای رشد و نمو گیاهان نقش ساختاری و عملکردی فراوانی در بسیاری از فرآیندهای ساخت و ساز گیاهان بر عهده دارد، ولی مقدار اضافی آن به ویژه در خاک‌های اسیدی عامل محدود کننده رشد محسوب می‌شود. در این بررسی، دانه‌رُست‌های ۵ روزه ذرت به مدت ۱۰ روز در شرایط هیدروپونیک، با سولفات روی صفر، ۴۰۰ و ۶۰۰ میکرومولار و همچنین، مالیک اسید و سیتریک اسید (۰/۳۲ میلی‌مولار) به همراه غلظت‌های روی تیمار شدند. پس از برداشت، وزن خشک، طول ریشه و اندام هوایی، میزان مالون‌دی‌آلدئید، پراکسید هیدروژن و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز، گلوتاتیون ردوکتاز و گایاکول پراکسیداز) اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که وزن خشک، طول ریشه و اندام هوایی با افزایش روی کاهش یافت، در حالی که میزان مالون‌دی آلدئید، پراکسید هیدروژن و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی با افزایش غلظت روی افزایش پیدا کرد. همچنین، در حضور اسیدهای آلی (مالیک اسید و سیتریک اسید) آثار سمیّت در گیاه کاهش یافت. به طور کلی، فلز روی در غلظت بالا باعث ایجاد آثار سمّی در گیاه ذرت شد، در حالی که حضور اسیدهای آلی باعث تعدیل آثار سمیّت در این گیاه شد.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، اسید آلی، پراکسید هیدروژن، سمیّت روی، مالون‌دی‌آلدئید

مقدمه

آلودگی خاک با فلزات سنگین مشکل محیطی مهمی در سرتاسر جهان است. از آغاز انقلاب صنعتی، آلودگی محیط با فلزات سمّی سرعت یافت (Nriagu, 1996). این نوع آلودگی همچنین، یکی از تنش‌های محیطی برای گیاهان است. زمین‌های کشاورزی، در نتیجه صنعتی شدن، شهری شدن و فعالیت‌های کشاورزی با فلزات سنگین آلوده شده‌اند (Kabata-

*نویسنده مسؤول: نشانی پست الکترونیک: l.pourakbar@urmia.ac.ir، شماره تماس: ۰۴۴۱۲۷۵۲۷۴۲

(Pendias and Pendias, 1986). تجمع فلزات سنگین در خاک موجب کاهش فعالیت میکروبی خاک، تنوع زیستی و حاصلخیزی خاک شده، حتی می‌تواند به سلامتی جانوران و انسان در زنجیره غذایی آسیب رساند (Mathys, 1977). در بسیاری از خاک‌های اسیدی سراسر دنیا و حدود نیمی از زمین‌های زراعی که پتانسیل تولید غذا و مواد غذایی را دارند، فلزات سنگین عامل اصلی محدودیت رشد گیاهان هستند (کافی و مهدوی دامغانی، ۱۳۷۹). روی، عنصر کم مصرف ضروری برای رشد و نمو طبیعی گیاهان محسوب می‌شود و در بسیاری از فرآیندهای متابولیسمی آنها شرکت می‌کند، با وجود این، مقادیر خیلی کم یا زیاد آن باعث اختلال در فرآیندهای مهم متابولیسمی و در نتیجه توقف یا کاهش رشد آنها می‌شود (Broadley *et al*., 2007). روی در فعالیت آنزیم‌ها، بیوسنتز کلروفیل، اکسین، پروتئین و کربوهیدرات و همچنین، متابولیسم لیپید، اسید نوکلئیک و استحکام غشا شرکت دارد (MadhavaRao and Srestry, 2000).

برخی از محققان معتقدند که فلز روی از طریق محافظت پروتئین‌ها و لیپیدهای غشایی در برابر رادیکال‌های آزاد و سایر محصولات حاصل از واکنش‌های احیایی درون سلولی، باعث حفاظت تمامیت غشای سلول‌ها می‌شود، همچنین، این فلز به همراه مس بخش اصلی آنزیم سوپراکسید دیسموتاز را به عنوان جاروب‌کننده رادیکال‌های آزاد تشکیل می‌دهد (Alloway, 2008). مانند سایر فلزات سنگین هنگامی که فلز روی در خاک و در نهایت، در بافت‌های گیاهی تجمع می‌یابد، بسته به گونه گیاه باعث تغییر در برخی فرآیندهای متابولیکی گیاه شده، از این طریق در رشد و نمو گیاهان اختلال ایجاد می‌کند (Stoyanova and Doncheva, 2002). علایم سمیّت روی در گیاهان شامل: کاهش تولید محصول، توقف رشد، زردی برگ‌ها در اثر کمبود آهن، کاهش سنتز کلروفیل، تجزیه کلروپلاست و اختلال در جذب فسفر، منیزیم و منگنز است (Chaney, 1993). اطلاعات جمع‌آوری شده نشان می‌دهد که روی زیاد باعث تنش اکسیداتیو توسط افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و پراکسیداسیون لیپیدی می‌شود (Marschner, 1995). توانایی گیاه برای رشد و بقا در محیط آلوده شده به فلز سنگین که معمولاً مقاومت نامیده می‌شود، می‌تواند از طریق مکانیسم‌های مختلف کسب شود که عبارتند از اجتناب و یا تحمل (Millaleo *et al*., 2010).

عمده مکانیسم تحمل فلز سنگین، جداسازی آنها توسط ترکیبات آلی، در سلول‌ها و یا اندامک‌هایی است که فعالیت متابولیکی اندکی دارند. واکوئل بزرگترین و مهم‌ترین اندامک در این زمینه است، زیرا واکوئل می‌تواند بسیاری از ترکیبات سمّی را انبار کند (Pittman, 2005). این ترکیبات می‌توانند آسیب به سلول را از طریق شلاته کردن فلز سنگین، انتقال آن به داخل واکوئل و محافظت پروتوپلاسم از یون فلز کاهش دهند (Davis *et al*., 2001). جداسازی در واکوئل‌ها برای مقاومت به فلز روی در ساقه گیاه تجمع‌دهنده *Thlaspi caerulescens* گزارش شده است (Lasat *et al*., 1998). چندین مکانیسم برای

توضیح غیر فعال شدن فلز روی در واکوئل بیان شده است که شامل رسوب به عنوان فیتات روی (Qiu *et al*., 2008) و اتصال به اسیدهای آلی با وزن مولکولی پایین است (Dou *et al*., 2008).

برای کاهش سمیّت فلز در گیاهان، سیستم‌های آنتی‌اکسیدان به عنوان مکانیسم تحمل بررسی می‌شوند (Millaleo *et al*., 2010). سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی شامل آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مانند سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، فنل پراکسیداز (POX)، آسکوربات پراکسیداز (APX)، گایاکول پراکسیداز (GPX) و مولکول‌های آنتی‌اکسیدان غیر آنزیمی مانند آسکوربات، آلفا توکوفرول، کاروتنوئیدها، فلاونوئیدها و گلوتاتیون هستند (Apel and Hirt, 2004).

گونه‌های مختلف گیاهی واکنش‌های متفاوتی را در واکنش به آلودگی خاک نشان می‌دهند. از آنجا که گیاه ذرت، محصول مهم کشاورزی بوده، در سطح وسیعی کشت می شود، هدف از این مطالعه، بررسی اثر سمیّت روی به همراه برخی اسیدهای آلی در گیاه ذرت از طریق بررسی برخی پاسخ‌های فیزیولوژیک و بیوشیمایی به ویژه شاخص‌های رشد و پاسخ‌های آنتی‌اکسیدانی بوده است.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در گروه زیست‌شناسی دانشگاه ارومیه در سال ۱۳۹۰ انجام شد. ابتدا بذرهای ذرت به مدت ۱۵ دقیقه در محلول هیپوکلریت ۱۰ درصد سدیم استریل شد. سپس، چندین بار با آب مقطر شستشو داده شد و برای آبگیری، بذرها به مدت ۲۴ ساعت در آب مقطر خیسانده شدند. بذرها برای جوانه‌زنی به پتری‌دیش‌هایی به قطر ۱۵ سانتی‌متر که حاوی دو لایه کاغذ صافی مرطوب بودند، منتقل شدند. پتری‌دیش‌های حاوی بذر به آون با دمای ۲۷ درجه سانتیگراد منتقل شد. پس از ۵ روز، دانه‌رُست‌های همسان ذرت درون گلدان‌های پلاستیکی حاوی ماسه قرار داده شد و با محلول هوگلند حاوی غلظت‌های صفر، ۴۰۰ و ۶۰۰ میکرومول سولفات روی و همچنین، سیتریک اسید و مالیک اسید ۰/۳۲ میکرومولار (Inaba and Takenaka, 2005) به همراه غلظت‌های روی (تیمارها شامل غلظت‌های صفر، ۴۰۰، ۶۰۰ میکرومولار روی، ۴۰۰ میکرومولار روی + سیتریک اسید، ۴۰۰ میکرومولار روی + مالیک اسید، ۶۰۰ میکرومولار روی + سیتریک اسید و ۶۰۰ میکرومولار روی + مالیک اسید) و از هر کدام ۶ تکرار تیمار شد. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. دوره تیمار (۱۰ روز) در اتاقک‌های کشت با شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و درجه حرارت ۲۲/۲۷ درجه سانتیگراد (روز/شب) انجام شد. سپس، گیاهان برای ارزیابی شاخص‌های مورد نظر برداشت شدند. پس از اندازه‌گیری طول ریشه با یک خط‌کش، ۳ تکرار از هر تیمار برای خشک کردن نمونه‌ها برای تعیین وزن خشک ریشه‌ها و اندام هوایی پس از شستشو با آب مقطر در پاکت‌های مجزا قرار داده شد و در آون ۸۰ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت قرار گرفت. وزن خشک با ترازویی با حساسیت ۰/۰۰۱ گرم اندازه گرفته شد. ۳ تکرار دیگر از هر تیمار پس از برداشت و جدا کردن اندام هوایی از ریشه‌ها

برای انجام آزمایشاتی که نیاز به بافت تازه داشتند در فریزر ۸۰- درجه سانتیگراد قرار داده شد.

اندازه‌گیری میزان پراکسید هیدروژن

میزان پراکسید هیدروژن با روش Jana و Choudhuri (۱۹۸۱) اندازه‌گیری شد. ۰/۵ گرم بافت برگ در ۳ میلی‌لیتر بافر فسفات با اسیدیته ۶/۸ همگن شد. عصاره حاصل به مدت ۲۵ دقیقه با نیروی g ۶۰۰۰ سانتریفیوژ شد. برای تعیین میزان پراکسید هیدروژن ۳ میلی‌لیتر از عصاره حاصله برداشته، روی آن ۱ میلی‌لیتر تیتانیوم کلرید ۰/۱ درصد در سولفوریک اسید ۲۰ درصد (V/V) اضافه شد و محلول فوق به مدت ۱۵ دقیقه با نیروی g ۶۰۰۰ سانتریفیوژ شد. جذب محلول زرد رنگ حاصل توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۱۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (ضریب خاموشی= $0/28\ mM^{-1}cm^{-1}$).

اندازه‌گیری مالون‌دی‌آلدئید

برای اندازه‌گیری میزان مالون‌دی‌آلدئید به عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی از روش Heath و Packer (۱۹۶۸) استفاده شد. یک گرم بافت تر اندام هوایی و ریشه توزین و توسط ۲/۵ میلی‌لیتر محلول تری‌کلرواستیک اسید ۱۰ درصد ساییده شد. سپس، محلول حاصل به مدت ۲۰ دقیقه در داخل سانتریفیوژ با نیروی g ۱۵۰۰۰ گذاشته شد. پس از عمل سانتریفیوژ، حجم مساوی از عصاره رویی و تیوباربیوتیک اسید ۰/۵ درصد در تری کلرو استیک اسید ۲۰ درصد به داخل لوله آزمایش منتقل شد و به مدت ۳۰ دقیقه در داخل انکوباتور ۹۶ درجه سانتیگراد قرار داده شد. در پایان، لوله‌ها به مدت ۵ دقیقه وارد آب یخ شد و پس از آن، به مدت ۵ دقیقه با نیروی g ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ شد. جذب محلول حاصل توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج‌های ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (ضریب خاموشی= $155\ mM^{-1}\ cm^{-1}$).

سنجش فعالیت آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز و گایاکول پراکسیداز و کاتالاز و گلوتاتیون ردوکتاز

برای استخراج عصاره گیاهی از روش Kang و Saltiveit (۲۰۰۲) با اندکی تغییر استفاده شد. ۰/۵ گرم از بافت تر ریشه و اندام هوایی به همراه ۳ میلی‌لیتر بافر استخراج تریس- کلریدریک اسید ۵۰ میلی‌مولار (اسیدیته ۷) محتوی ۳ میلی‌مولار $MgCl_2$ و ۱ میلی‌مولار EDTA در هاون سرد ساییده شد. بافر استخراج برای آنزیم آسکوربات پراکسیداز محتوی ۰/۲ میلی‌مولار آسکوربات نیز بود. همگنای حاصل به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد با سرعت ۵۰۰۰ دور سانتریفیوژ شد. محلول رویی برای سنجش فعالیت آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز، گایاکول پراکسیداز و کاتالاز استفاده شد.

سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز

سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX) با روش Nakano و Asada (۱۹۸۱) انجام شد. مخلوط واکنش شامل ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار (اسیدیته ۷) محتوی EDTA ۰/۱ میلی‌مولار، آسکوربات سدیم یک میلی‌مولار، ۰/۲ میلی‌لیتر H_2O_2 یک درصد و ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره استخراجی بود. فعالیت APX به صورت کاهش در جذب H_2O_2 طی یک دقیقه در طول موج ۲۴۰ نانومتر محاسبه شد (ضریب خاموشی= $2/8\ mM^{-1}\ cm^{-1}$).

سنجش فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز

سنجش فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز (GPX) با روش Upadhyaya و همکاران (۱۹۸۵) انجام شد. مخلوط واکنش شامل ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار (اسیدیته ۷) محتوی یک میلی‌لیتر گایاکول یک درصد، یک میلی‌لیتر H_2O_2 یک درصد و ۰/۱ میلی‌لیترعصاره استخراجی بود. فعالیت GPX به صورت افزایش در جذب گایاگول اکسید شده طی یک دقیقه در طول موج ۴۲۰ نانومتر محاسبه شد (ضریب خاموشی= ۲۶/۶ $mM^{-1}\ cm^{-1}$).

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) با روش Aebi (۱۹۸۴) انجام شد. مخلوط واکنش شامل ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار (اسیدیته ۷) محتوی ۰/۲ میلی‌لیتر H_2O_2 یک درصد و ۰/۳ میلی‌لیتر عصاره استخراجی بود. فعالیت آنزیم کاتالاز به صورت کاهشی در جذب طی یک دقیقه در طول موج ۲۴۰ نانومتر محاسبه شد (ضریب خاموشی = ۰/۰۴۳۶ $mM^{-1}\ cm^{-1}$).

سنجش فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز

سنجش فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز (GR) با روش Foyer و Halliwell (۱۹۷۶) با اندکی تغییر انجام شد. اساس سنجش کاهش جذب نمونه‌ها طی یک دقیقه در طول موج ۳۴۰ نانومتر به علت اکسیداسیون NADPH بود. مخلوط واکنش شامل بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار، کلرید منیزیم ۲/۵ میلی‌مولار، NADPH ۰/۲ میلی‌مولار، GSSG ۰/۵ میلی‌مولار و ۰/۳ میلی‌لیتر عصاره استخراجی بود (ضریب خاموشی= ۶/۲ $mM^{-1}\ cm^{-1}$).

تحلیل داده‌ها

میانگین و انحراف استاندارد نمونه‌ها با آنالیز واریانس در نرم‌افزارهای SPSS نسخه ۱۶/۰ و Excel محاسبه شد. میزان معنی‌داری تغییرات در گروه تجربی در مقایسه با شاهد بر اساس آنالیز واریانس ANOVA و آزمون‌های توکی و دانکن در سطح ۰/۰۵ است.

نتایج

مطالعه علایم ظاهری در گیاهان ذرت شاهد و تیمار شده با روی نشان داد که افزایش غلظت روی باعث نکروزه شدن حاشیه برگ‌ها شده است. نتایج حاصل از تأثیر روی بر طول ریشه، اندام هوایی و وزن خشک در جدول ۱ آورده شده است. نتایج حاصل از بررسی‌ها بر طول ریشه و اندام هوایی در گیاهان تیمار دیده نشانگر آن است که با افزایش روی، طول ریشه و اندام هوایی و وزن خشک آن کاهش یافته است. این کاهش رشد و وزن خشک در اندام هوایی در هر دو غلظت ۴۰۰ و ۶۰۰ میکرومول و در ریشه تنها در غلظت ۶۰۰ میکرومول نسبت به شاهد معنی‌دار است، اما با افزودن اسیدهای آلی روند کاهش تعدیل یافته است.

میزان مالون‌دی‌آلدئید به عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی با افزایش غلظت روی افزایش پیدا کرد. این افزایش در غلظت غلظت ۶۰۰ میکرومولار روی به بیشینه رسید، ولی تفاوت معنی‌داری بین غلظت ۴۰۰ و ۶۰۰ میکرومولار مشاهده نشد. همچنین، افزودن مالیک اسید و سیتریک اسید باعث کاهش میزان مالون‌دی‌آلدئید هم در اندام هوایی و هم در ریشه نسبت به تیمار روی به تنهایی شد و بیشینه

کاهش در تیمار مالیک اسید مشاهده شد. با وجود این، تفاوت معنی‌داری بین اعمال سیتریک اسید و مالیک اسید مشاهده نشد (شکل ۱).

نتایج حاصل از بررسی میزان H_2O_2 نشان داد که با افزایش غلظت روی تولید H_2O_2 هم در ریشه و هم در اندام هوایی نسبت به شاهد افزایش پیدا کرد و این افزایش فقط در غلظت ۶۰۰ میکرومول معنی‌دار بود. با افزودن مالیک اسید و سیتریک اسید روند افزایش پراکسید هیدروژن کمتر شد (شکل ۲). نتایج حاصل از اندازه‌گیری آنزیم آسکوربات پراکسیداز نشان داد که با افزایش غلظت روی میزان فعالیت این آنزیم هم در اندام هوایی وهم در ریشه افزایش می یابد. این افزایش در تمام تیمارها نسبت به شاهد معنی‌دار بود. همچنین، با افزودن مالیک اسید و سیتریک اسید اثر سمّیت روی کاهش پیدا کرد و روند افزایش فعالیت آنزیم کمتر شد (شکل ۳).

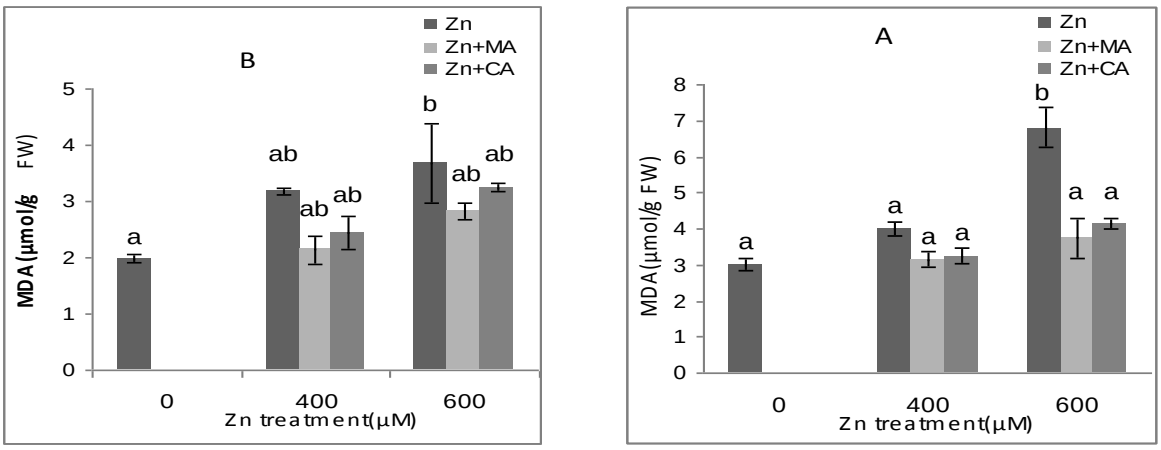
میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در تیمار با روی افزایش یافت و این میزان در غلظت ۶۰۰ میکرومول در اندام هوایی نسبت به شاهد درخور توجه و معنی‌دار است و در ریشه افزایش فعالیت آنزیم تحت تیمار روی نسبت به شاهد معنی‌دار نیست. همچنین، افزودن مالیک اسید و سیتریک اسید باعث کاهش میزان فعالیت آنزیم کاتالاز هم در ریشه و هم در اندام هوایی نسبت به اعمال به تنهایی روی شد (شکل ۴).

فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز تحت تنش روی در شکل ۵ نشان داده شده است. با افزایش غلظت روی میزان فعالیت آنزیم افزایش پیدا کرد و این افزایش هم در اندام هوایی و هم در ریشه نسبت به شاهد معنی‌دار است. افزودن مالیک اسید و سیتریک اسید باعث کاهش فعالیت آنزیم در اندام هوایی و ریشه نسبت به اعمال به تنهایی روی شد. بیشینه کاهش در اعمال سیتریک اسید مشاهده شد.

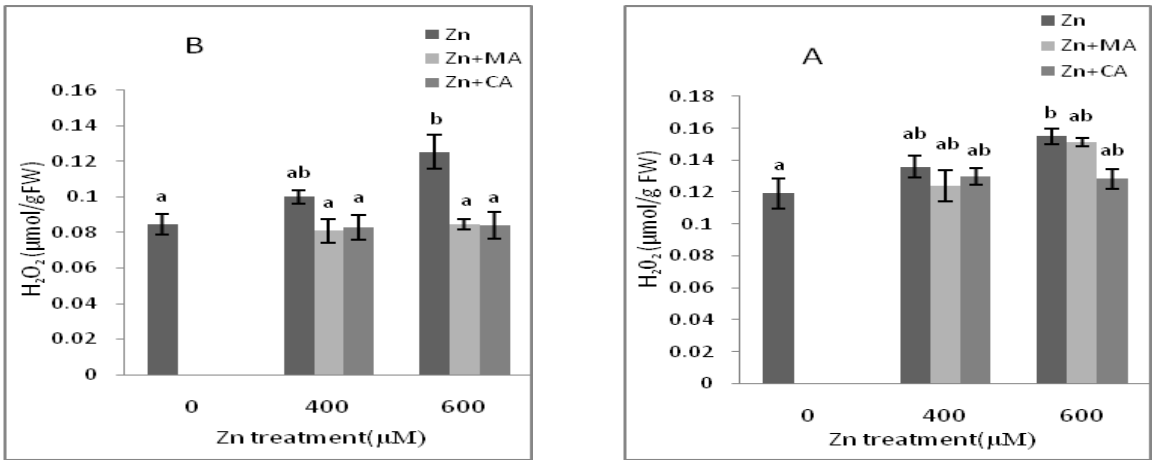
میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز تحت تیمار Zn در هر دو اندام هوایی و ریشه افزایش یافت و این افزایش فقط در غلظت ۶۰۰ میکرومول نسبت به شاهد معنی‌دار است. همچنین، اسیدهای آلی مالیک و سیتریک باعث کاهش آثار سمّیت فلز روی و کاهش فعالیت آنزیم GR شدند (شکل ۶).

جدول ۱- طول و وزن خشک ریشه و اندام هوایی گیاه ذرت تحت تأثیر غلظت‌های مختلف روی و بر همکنش روی با مالیک اسید و سیتریک اسید. مقادیر میانگین سه تکرار ± انحراف معیار است. *: وجود اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح $P<0.05$ است.

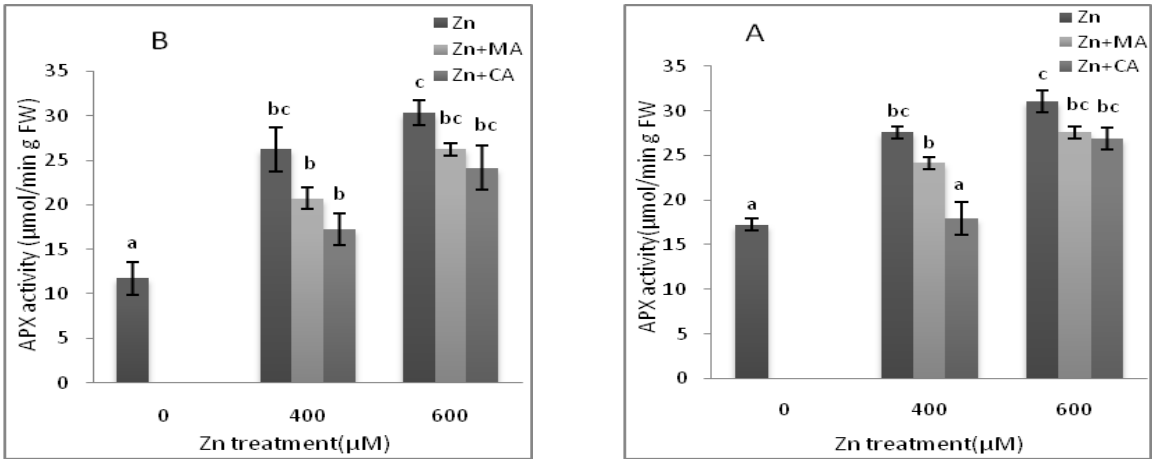
تیمارها	طول ریشه (cm)	طول اندام هوایی (cm)	وزن خشک ریشه (g)	وزن خشک اندام هوایی (g)
شاهد (۰ µmol)	۲۲/۶±۰/۳۸	۴۸/۹±۱/۵۵	۰/۱۰۲±۰/۰۰۲	۰/۲۰۱±۰/۰۰۴
روی (۴۰۰ µmol)	۲۱/۴±۰/۹۸	۳۹/۴±۰/۸۷*	۰/۰۰۸۶±۰/۰۰۷	۰/۱۰۲±۰/۰۰۱*
روی (۴۰۰ µ mol) + مالیک اسید	۲۲/۷±۰/۵۱	۴۴±۱/۲۷	۰/۰۹۵±۰/۰۰۱	۰/۱۴۹±۰/۰۰۱*
روی (۴۰۰ µmol) + سیتریک اسید	۲۲/۵±۲/۲	۴۳/۹±۱/۳	۰/۱۰۳±۰/۰۰۲	۰/۱۸۲±۰/۰۰۲*
روی (۶۰۰ µmol)	۱۸/۲±۰/۲۹*	۳۸/۳±۰/۶۹*	۰/۰۷۵±۰/۰۰۴*	۰/۰۸۵±۰/۰۰۲*
روی (۶۰۰ µmol) + مالیک اسید	۲۲/۳±۰/۸۳	۴۲/۹±۰/۸*	۰/۰۹۴±۰/۰۰۱	۰/۱۵۳±۰/۰۰۲*
روی (۶۰۰ µmol) + سیتریک اسید	۲۲/۸±۰/۹۲	۴۲/۹±۰/۷۵*	۰/۱۰۳±۰/۰۰۱	۰/۱۷۷±۰/۰۰۲*



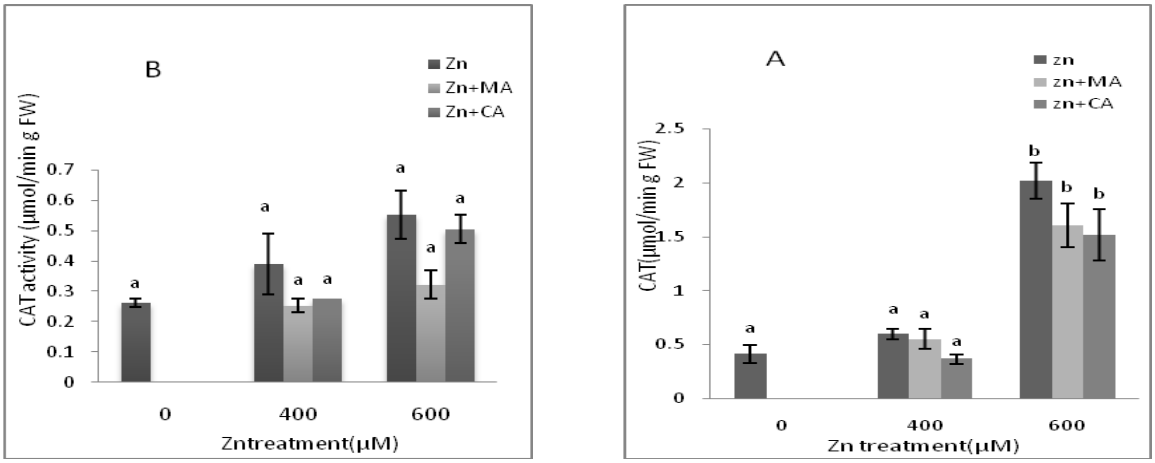
شکل ۱- اثر غلظت‌های مختلف روی و بر همکنش آن با مالیک اسید (MA) و سیتریک اسید (CA) بر میزان مالون‌دی‌آلدئید اندام هوایی (A) و ریشه (B). مقادیر میانگین سه تکرار ± انحراف معیار است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۰/۰۵ است.



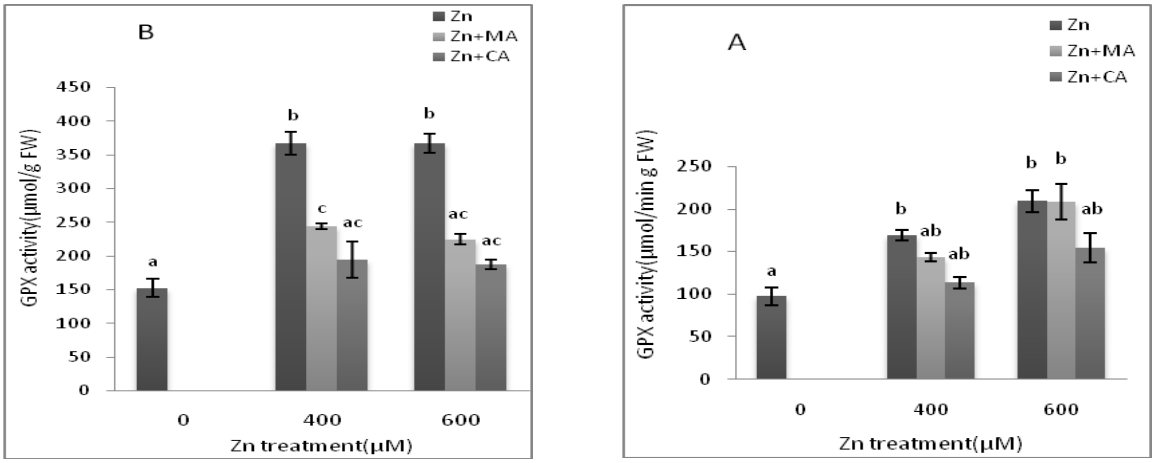
شکل ۲- اثر غلظت‌های مختلف روی و بر همکنش آن با مالیک اسید (MA) و سیتریک اسید (CA) بر میزان H_2O_2 اندام هوایی (A) و ریشه (B). مقادیر میانگین سه تکرار ± انحراف معیار است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۰/۰۵ است.



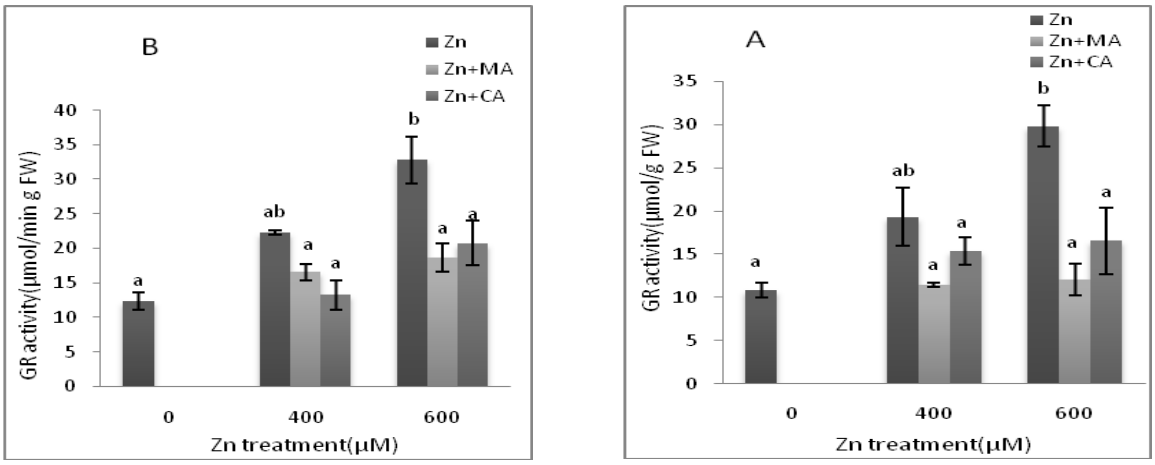
شکل ۳- اثر غلظت‌های مختلف روی و بر همکنش آن با مالیک اسید (MA) و سیتریک اسید (CA) بر میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز اندام هوایی (A) و ریشه (B). مقادیر میانگین سه تکرار ± انحراف معیار است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۰/۰۵ است.



شکل ۴- اثر غلظت های مختلف روی و بر همکنش آن با مالیک اسید (MA) و سیتریک اسید (CA) بر میزان فعالیت کاتالاز اندام هوایی (A) و ریشه (B). مقادیر میانگین سه تکرار ± انحراف معیار است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۰/۰۵ است.



شکل ۵- غلظت‌های مختلف روی و بر همکنش آن با مالیک اسید (MA) و سیتریک اسید (CA) بر میزان فعالیت گایاکول پراکسیداز اندام هوایی (A) و ریشه (B). مقادیر میانگین سه تکرار ± انحراف معیار است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۰/۰۵ است.



شکل ۶- اثر غلظت‌های مختلف روی و بر همکنش آن با مالیک اسید (MA) و سیتریک اسید (CA) بر میزان فعالیت گلوتاتیون ردوکتاز اندام هوایی (A) و ریشه (B). مقادیر میانگین سه تکرار ± انحراف معیار است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۰/۰۵ است.

بحث

علیرغم نقش بسیار مهم روی در ساختار و راه‌اندازی بسیاری از فرآیندهای متابولیکی گیاه، مقدار بالای این فلز در گیاه باعث بروز برخی علایم ناشی از تنش و عدم رشد طبیعی گیاهان می‌شود. در این تحقیق، مقدار بالای روی باعث کاهش رشد طولی و وزن خشک ریشه و اندام هوایی شد. برخی از پژوهشگران معتقدند که مهار رشد گیاهان در اثر غلظت‌های بالای فلز روی ممکن است به علت رقابت این فلز با فسفر در گیاه باشد (Rout and Das, 2003). تجمع بالای فلز روی در سیتوزول سلول‌های گیاهی در اثر غلظت بالای روی در گیاه نیز از طریق اختلال در عملکرد طبیعی سلول‌ها و مهار فرآیند تنفس و واکنش‌های انرژی‌خواه مرتبط با رشد سلول می‌تواند باعث کاهش رشد و نمو ایده‌آل گیاهان شود (Candan and Tarhan, 2003).

یکی ازاختلالات ناشی از القای تنش اکسیداتیو در گیاهان، اثر بر لیپیدهای غشایی و تغییر وضعیت تمامیت غشاهای سلولی است. رادیکال‌های آزاد اکسیژن با اثر بر پیوندهای دوگانه اسیدهای چرب غیراشباع در غشا، واکنش‌های زنجیره‌ای پراکسیداسیون را تحریک و به تخریب اسیدهای چرب منجر می‌شوند (Savoure *et al.*, 1999). مقدار مالوندی‌آلدئید (MAD) که در شرایط تنش در بافت‌ها به وجود می‌آید به عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدها شناخته شده است. نتایج آزمایش حاضر نشان داد که با افزایش غلظت روی میزان مالوندی‌آلدئید در گیاه افزایش پیدا می کند. برخی مطالعات هم نشان داده‌اند که میزان بالای روی باعث افزایش میزان پراکسیداسیون لیپیدی می‌شود (Wang *et al.*, 2009). پاسخ مشابه در گیاهان تیمار شده با دیگر فلزات سنگین نیز مشاهده شده است (Nakano and Asada, 1981).

پراکسید هیدروژن در بسیاری از تنش‌های محیطی در گیاهان تولید می‌شود. افزایش در ROSهایی مانند OH^-، O_2^- و H_2O_2 که به ایجاد تنش اکسیداتیو منجر می‌شوند، تحت تنش فلزات سنگین مشاهده شده است. در این پژوهش، محتوای H_2O_2 در گیاهان تیمار شده با روی افزایش یافت. به طور مشابه، افزایش در محتوای H_2O_2 در *Vigna mungo* گزاش شده است (Gupta *et al.*, 2011). همچنین، مشابه با نتایج این تحقیق، افزایش در میزان MDA و H_2O_2 در غلظت‌های بالای روی در نیشکر گزارش شده است (Jain *et al.*, 2010). سمّیت روی باعث القای تنش اکسیداتیو از طریق تولید رادیکال‌های آزاد و گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) می‌شود (Weckx and Clijsters, 1997). مقدار بالای ROS در شرایط تنش شدید ایجاد می‌شود و تولید زیاد این ROSها مانند سوپر اکسید، H_2O_2 و OH^- در گیاهان تحت تنش فلز ایجاد می‌شود (Galligo *et al.*, 1999). آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در سلول‌های گیاهی ممکن است H_2O_2 را به H_2O تبدیل کنند و اثر سمّیت H_2O_2 را خنثی کنند (Rezai and Farboodnia, 2008). در گیاهان تعدادی از آنزیم‌ها مقادیر H_2O_2 درون سلولی را تنظیم می کنند، اما به نظر می‌رسد آنزیم‌های CAT، APX و GPX اهمیت بیشتری دارند (McKersie and Leshem, 1994). آنزیم آسکوربات پراکسیداز مهم‌ترین پراکسیداز در رفع سمّیت H_2O_2 هم در سیتوزول و هم در کلروپلاست‌هاست (Mittova *et al.*, 2000). نتایج حاصل نشان می‌دهد که افزایش سطوح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی القا شده توسط روی ممکن

است به عنوان مکانیسم دفاعی ثانویه در قبال تنش اکسیداتیو باشد. همچنین، نتایج آزمایش نشان داد که در حضور مالیک اسید و سیتریک اسید آثار سمّیت فلز روی کمتر شد و این نتایج ممکن است به علت تغییر ساختمان شیمیایی فلز و تغییر از حالت با سمّیت زیاد به شکلی که سمّیت کمتری در گیاه دارد، باشد. عمده مکانیسم تحمل فلز سنگین، جداسازی آنها توسط ترکیبات آلی در سلول‌ها و یا اندامک‌هایی با فعالیت متابولیکی کمتر است. واکوئل به عنوان بزرگترین و مهم‌ترین اندامک در این زمینه است، زیرا واکوئل می‌تواند بسیاری از ترکیبات سمّی را انبار نماید (Pittman, 2005). این ترکیبات می‌توانند آسیب به سلول را از طریق شلاته کردن فلز سنگین، انتقال آن به داخل واکوئل و محافظت پروتوپلاسم از یون فلز، کاهش دهند (Davis *et al*., 2001). نقش کلیدی مشابه اخیراً برای اگزالیک اسید در جداسازی منگنز داخل سلول توسط شلاته کردن منگنز مازاد در واکوئل های گیاهان تجمع‌دهنده منگنز نشان داده شده است (Dou *et al*., 2008). اسیدهای کربوکسیلیکی مانند سیتریک اسید و مالیک اسید دارای خاصیت باند شدن با فلزات سنگین هستند و می‌توانند نقش اساسی در تحمل و سمّیت‌زدایی فلزات سنگین داشته باشند (Clemens, 2001). سیتریک اسید می‌تواند در بیان پروتئین‌های مخصوص و یا آنزیم‌های مرتبط با دفاع آنتی‌اکسیدانی نقش داشته باشد (Gao *et al*., 2012). Mora و همکاران (۲۰۰۹) گزارش کرده‌اند که تراوش اگزالات و سیترات توسط ریشه می‌تواند منگنز فراهم در ریزوسفر را کاهش داده، تحمل به این فلز را در گیاه تلخه (ryegrass) افزایش دهد.

به طور کلی، می‌توان بیان نمود که افزایش غلظت روی باعث بیشتر شدن سمّیت در گیاه ذرت شده که این افزایش در ارتباط با القا تنش‌های اکسیداتیو توسط فلز روی در گیاه ذرت بود. احتمال داده می‌شود به کار بردن اسیدهای آلی مانند سیتریک اسید و مالیک اسید باعث کاهش سمّیت ناشی از فلز روی با جداسازی این فلز از پروتوپلاسم و انتقال به صورت شلاته شده به داخل واکوئل، در ذرت با افزایش رشد گیاه و کاهش پراکسیداسیون غشا همراه باشد. احتمالاً این اسیدهای آلی از طریق پیوند یافتن با فلز سنگین مانع حضور مقادیر زیاد این فلز در سیتوزول شده، از این طریق از آسیب‌رسانی این فلز در غلظت بالا به مولکول‌های زیستی این بخش جلوگیری نموده است. در نتیجه، با کاهش فلز در بخش سیتوزولی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در گیاهان تیمار دیده نیز در سطح گیاهان شاهد باقی مانده است.

منابع

کافی، م. و مهدوی دامغانی، ع. م. (۱۳۷۹) مکانیسم‌های مقاومت گیاهان به تنش‌های محیطی. انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد.

Aebi, H. (1984) Catalase *in vitro*. Methods in Enzymology 105: 121-126.

Apel, K. and Hirt, H. (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. Annual Review of Plant Biology 55: 373-379.

Broadley, M. R., White, P. J., Hammond, J. P. and Zlko, I. V. (2007) Zinc in plants. New

Phytologist 173: 677-702.

Candan, N. and Tarhan, L. (2003) Change in chlorophyll-carotenoid contents, antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation levels in Zn-stressed *Mentha pulegium*. Turk Journal Chemistry 27: 21-30.

Chaney, R. L. (1993) Zinc phytotoxicity. In: Zinc in soils and plants (Ed. Robenson, A. D.) 135-150. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Clemens, S. (2001) Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. Planta 212: 475-486.

Davis, M. A., Pritchard, S. G., Boyd, R. S. and Prior, S. A. (2001) Developmental and induced responses of nickel-based and organic defenses of the nickel-hyper accumulating shrub, *Psychotriadouarrei*. New Phytologist 150: 49-58.

Dou, C., Fu, X., Chen., X, Shi, J. and Chen, Y. (2008) Accumulation and detoxification of manganese in hyperaccumulator *Phytolacca americana*. Plant Biology 11: 664-670.

Foyer, C. H. and Halliwell, B. (1976) The fresence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. Planta 133: 21-25.

Galligo, S. M., Benavides, M. P. and Tomoro, M. L. (1999) Effect of Cd ions on antioxidant defense system in sunflower cotyledons. Plant Biology 42: 49-55.

Gao, Y., Miao, C., Xia, J., Luo, Ch., Mao, L., Zhou, P. and Shi, W. (2012) Effect of citric acid on phytoextraction and antioxidative defense in *Solanum nigrum* L. as a hyper accumulator under Cd and Pb combined pollution. Enviromental and Earth Science 65(7): 1923-1932.

Gupta, B., Pathak, G. C. and Pandey, N. (2011) Induction of oxidative stress and antioxidant responses in *Vigna mungo* by zinc Stress. Russian Journal of Plant Physiology 58: 85-91.

Heath, R. L. and Packer, L. (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. kinetics and stoichiometery of fatty acid peroxidation. Archives of Biochemistry and Biophysics 125: 189-198.

Jain, R., Srivastava, S., Solomon, S., Shrivastava, A. K. and Chandra, A. (2010) Impact of excess zinc on growth parameters, cell division, nutrient accumulation, photosynthetic pigments and oxidative stress of sugarcane (*Saccharum* spp.). Acta Physiologiae Plantarum 32: 979-986.

Jana, S. and Choudhuri, M. A. (1981) Glycolate metabolism of three submerged aquatic anagiosperms during aging. Aquatic Botany 12: 345-354.

Kabata-Pendias, A. and Pendias, H. (1986) Trace Elements in Soils and Plants, CRC Press, Boca Raton.

Kang, H. M. and Saltiveit, M. E. (2002) Chilling tolerance of maize, cucumber and rice seedling (leaves and roots) and differentially affected by salicylic acid. Physiologia Plantarum 115: 577-576.

Lasat, M. M., Baker, A. J. M. and Kochian, L. V. (1998) Altered Zn compartmentation in the root symplasm and stimulated Zn absorption in to the leaf as mechanisms involved in Zn hyper accumulation in *Thlaspi caerulescens*. Plant Physiology 118: 875-883.

MadhavaRao, K. V. and Srestry, T. V. S. (2000) Antioxidative parameters in the seedlings of pigeon pea (*Cacanuscajan millspaugh* L.) in response to Zn and Ni stresses. Plant Science 157: 113-128.

Marschner, H. (1995) Mineral nutrition of higher plants, 2nd edition, Academic Press, London.

Mathys, W. (1977) The role of malate, oxalate, and mustard oil glucosides in the evolution of zinc resistance in herbage plants. Plant Physiology 40: 130-136.

McKersie, B. D. and Leshem, Y. (1994) Stress and stress coping in cultivated plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Millaleo, R., Reyes-Diaz, M., Ivanov, A. G., Mora, M. L. and Alberdi, M. (2010) Manganese as essential and toxic element

for plants: Transport, accumulation and resistance mechanisms. Journal of Soil Science and Plant Nutrition 10: 476-494.

Mittova, V., Volokita, M., Guy, M. and Tal, M. (2000) Activities of SOD and the ascorbate-glutathione cycle enzymes in subcellular compartments in leaves and roots of the cultivated tomato and its wild salt tolerant relative *Lycopersi conpennellii*. Physiology Plant 110: 45-51.

Mora, M., Rosas, A., Ribera, A. and Rengel, R. (2009) Differential tolerance to Mn toxicity in perennial ryegrass genotypes: involvement of antioxidative enzymes and root exudation of carboxylates. Plant Soil 320: 79-89.

Nakano, Y. and Asada, K. (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant Cell Physiology 22: 867-880.

Nriagu, J. O. (1996) A history of global metal pollution. Nature 272: 223-224.

Pittman, J. (2005) Managing the manganese: molecular mechanisms of manganese transport and homeostasis. New Phytologist 167: 733-742.

Qiu, R. L., Zhao, X., Tang, Y. T., Yu, F. M. and Hu, P. J. (2008) Antioxidative response to Cd in a newly discovered cadmium hyper accumulator in *Arabis paniculata* F. Chemosphere 74: 6-12.

Rezai, K. and Farboodnia, T. (2008) Manganese toxicity effects on chlorophyll content antioxidant enzymes in pea plant (*Pisum sativum* L. cv. Qazvin). Agricultural Journal 3: 454-445.

Alloway, B. J. (2008) Zinc in soils and crop nutrition. 2nd edition, Publishers: Zinc Association (IZA) and International Fertilizer Industry Association (IFA). Brussels, Belgium and Paris.

Rout, G. R. and Das, P. (2003) Effect of metal toxicity on plant growth and metabolism; zinc. Agronomy and soil science 23: 3-11.

Savoure, A., Thorin, D., Darey, M., Hau, X., Mauro, S., Montagu, V., Inze, D. and Vebruggen, M. (1999) NaCl and $CuSO_4$ treatment trigger distinct oxidative defence mechanisms in *Nicotiana plumbaginifolia* L. Plant Cell and Environment 22: 382-396

Stoyanova, Z. and Doncheva, S. (2002) The effect of zinc supply and succinate treatment on plant growth and mineral uptake in pea plant. Plant physiology 14(2): 111-116.

Upadhyaya, A., Sankhla, D., Davis, T. D., Sankhla, N. and Smidth, B. N. (1985) Effect of paclobutrazol on the activies of some enzymes of activated oxygen metabolism and lipid peroxidation in senescing soybean leaves. Plant Physiology 121: 453-461.

Wang, C., Zhang, S. H., Wang, P. F., Hou, J., Zhang, W. J., Li, W. and Lin, Z. P. (2009) The effect of excess Zn on mineral nutrition and antioxidative response in rapeseed seedling. Chemosphere 75(11): 1468-1476.

Weckx, J. E. J. and Clijsters, H. (1997) Zn phytotoxicity induces oxidative stress in primary leaves of *Phaseolus vulgaris*. Plant Physiology and Biochemistry 35: 405-410.

Inaba, S. and Takenaka, C. (2005) Effects of dissolved organic matter on toxicity and bioavailability of copper for lettuce seedlings. Environment International 31: 603-608.

Investigation of interaction between zinc and organic acid (malic acid, citric acid) on antioxidant responses in *Zea mays* L.

Zahra Hosseini and Latifeh Pourakbar *

Department of Biology, Faculty of Sciences, Urmia University, Urmia, Iran

Abstract

Soil pollution by toxic metals is a serious problem for the environment and is also one of the environmental stresses for higher plants. Zinc as a heavy metal plays an important role in many biochemical functions of plants. However, excess amount of zinc is one of the most important growth limiting factors in acid soils. In this investigation five day seedlings of *Zea mays* L. for 12 days, under hydroponic conditions were treated with concentrations of 0, 400 and 600 of zinc sulfate also malic acid and citric acid 0.32 mM together with zinc concentrations. Then, plants were harvested and dry weight, root and shoot length, Malondialdehyde (MDA), H_2O_2 content and antioxidant enzyme activity (CAT, APX, GR and GPX) was measured. The results showed that by increasing Zn concentration from 400 to 600 µM, root and shoot dry weight and length were decreased, while MDA, H_2O_2 content, antioxidant enzyme activity were increased. Also, the present of citric and malic acids decreased toxicity effects. Generally, it was concluded that zinc at high concentration induced toxicity effects in *Zea mays* L. but presece of malic and citric acid decreased toxicity effects in this plant.

Key word: Antioxidant enzymes, Organic acid, H_2O_2, Zinc toxicity, Malondealdyde

* Corresponding Author: l.pourakbar@urmia.ac.ir