DOI: http://dx.doi.org/10.22092/ijmapr.2012.3036

فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۲۸، شمارهٔ ۲، صفحهٔ ۲۴۷-۲۳۵ (۱۳۹۱)

بررسی اثر غلظت‌های مختلف مس بر رنگیزه‌ها و فعالیت سیستم‌های دفاعی غیرآنزیمی و آنزیمی در گیاه خرفه (*Portulaca oleracea* L.)

مه‌لقا قربانلی[1*] و عادله کیاپور[2]

۱*- نویسنده مسئول، استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان
پست الکترونیک: Ghorbanli@yahoo.com
۲- کارشناس ارشد، دانشگاه پیام نور، مرکز تهران

تاریخ دریافت: شهریور ۱۳۸۹ تاریخ اصلاح نهایی: اردیبهشت ۱۳۹۰ تاریخ پذیرش: تیر ۱۳۹۰

چکیده

سیستم‌های دفاعی متعددی در فائق آمدن گیاهان به شرایط تنش‌زا با یکدیگر همکاری می‌نمایند. یکی از این تنش‌ها آلودگی محیط رویش گیاهان به فلزات سنگین است. در این پژوهش به بررسی اثر غلظت‌های مختلف مس بر رنگیزه‌های فتوسنتزی و غیرفتوسنتزی و فعالیت سیستم‌های دفاعی غیرآنزیمی و آنزیمی در گیاه خرفه (*Portulaca oleracea* L.) پرداخته شده‌است. به‌منظور نشان دادن اثرهای فلز سنگین مس بر رنگیزه‌ها، آنتوسیانین‌ها، فلاونوئیدها، ترکیب‌های فنلی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان آزمایشها در قالب طرحی کاملاً تصادفی اجرا شد. پس از کاشت گیاهان با شرایط یکسان در بستر استریل لیکا و تغذیه آنها با محیط مایع هوگلند، تیمارهایی با غلظت‌های متفاوت (۰، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰ میکرومولار) از فلز سنگین مس به‌صورت $CuSO_4.5H_2O$، همراه با گروه شاهد و همگی در سه تکرار بر روی گیاهان اعمال گردید. پس از ده روز اعمال تیمار گیاهان برای انجام آزمایشها برداشت شدند. سپس انجام محاسبات و تجزیه و تحلیل آماری در سطح $p\leq ۰/۰۵$ با استفاده از نرم‌افزار spss انجام شد. نتایج نشان داد که میزان کلروفیل‌های a و b کاهش و میزان کاروتنوئیدها، آنتوسیانین‌ها، فلاونوئیدها و ترکیب‌های فنلی به‌طور معنی‌دار روند افزایشی داشت. فعالیت آنزیم پراکسیداز روند افزایشی و آنزیم کاتالاز روند کاهشی را به‌طور معنی‌داری نشان داد.

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

مقدمه

مس عنصری ریزمغذی و ضروری در گیاهانست که جزو لاینفک آنزیم‌های متعدد انتقال الکترون بوده و در تسریع واکنش‌های ردوکس درون میتوکندری و کلروپلاست شرکت می‌کند (Geatke & Chow, 2003). با این وجود این مس در غلظت‌های بالاتر از حد معمول باعث سمّیت در بافت‌های گیاهی می‌گردد (Hall, 2002). تجمع زیاد مس در برگ‌ها می‌تواند تغییراتی نسبی را در فرایندهای فتوسنتز و تنفس، فعالیت آنزیم‌ها، یکپارچگی غشاء و تمامیت DNA باعث شود که همه این موارد به محدودیت در رشد می‌انجامد (Posmyk *et al.*, 2009؛ Schutzendubel & Polle, 2002).

عارضه مهم سمّیت مس تولید استرس اکسیداتیو است. مس مازاد می‌تواند تولید گونه‌های فعال و مضر اکسیژن (ROS) را تسریع کند که از میان آن می‌توان به رادیکال‌های هیدروکسیل (OH)، فنوکسی (RO)، پراکسی (ROO)، سوپراکسید (O_2^-)، هیدروژن پراکسید (H_2O_2)، و اکسیژن یکتایی ($^1O_2$) اشاره کرد. ثابت شده که تولید رادیکال‌های آزاد اولین فرایندی است که در نتیجه انواع مختلفی از شرایط استرس‌زا رخ می‌دهد. تولید ROS وابسته به شدت استرس و شرایط فیزیکوشیمیایی درون سلول (به‌طور مثال شرایط آنتی‌اکسیدان، حالت ردوکس و pH) است. اکسیژن فعال عامل زیان‌بخشی است که باعث پراکسیداسیون تدریجی ساختارهای لیپیدی (Baryla *et al.*, 2000)، غیرفعال‌سازی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان (Teisseire & Guy, 2000) و صدمه اکسیداتیو DNA (Skorzynska-Polit *et al.*, 2004) می‌گردد. با وجود این طی سال‌های اخیر شواهد زیادی از دخالت ROS و محصولات اکسیژنه آن در واکنش‌های آبشاری سیگنال ترانسداکشن بدست آمده‌است (Neill *et al.*, 2002). بافت‌های گیاهان از آنزیم‌های جاروکننده ROS (SOD (سوپراکسید دیسموتاز)، CAT (کاتالاز)، POX (پراکسیداز)، APX (آسکوربات پراکسیداز) و GPX (گلوتاتیون پراکسیداز)) و شبکه‌ای از آنتی‌اکسیدان‌ها با وزن مولکولی کم (آسکوربات، گلوتاتیون، ترکیب‌های فنلی، توکوفرول‌ها، کاروتنوئیدها) تشکیل شده‌اند که به‌ترتیب سیستم‌های دفاعی آنزیمی و غیرآنزیمی گیاه را تشکیل می‌دهند. به‌علاوه آرایش کاملی از آنزیم‌ها (MDAR (مونودهیدروآسکوربات ردوکتاز)، DHAR (دهیدروآسکوربات ردوکتاز) و GR (گلوتاتیون ردوکتاز)) جهت بازسازی و احیاء فرم‌های فعال آنتی‌اکسیدان نیز لازم است.

به‌منظور بقا در طول تکامل موجودات هوازی مکانیزم‌های دفاعی آنزیمی و غیرآنزیمی را در مقابل استرس‌های اکسیداتیو کامل کرده‌اند تا بتوانند سطوح ROS را کنترل کرده و سلول‌ها را در مقابل شرایط استرس محافظت کنند (Wang *et al.*, 1997؛ Fabre *et al.*, 2000؛ Apel & Hirt, 2004).

گیاه خرفه (*Portulaca oleracea*) متعلق به تیره Portulacacea، که عموماً به‌عنوان علف هرز شناخته می‌شود، در بیشتر اقلیم‌ها به‌خصوص آب و هوای گرم و خشک یا استپی قادر به رویش است. در رابطه با تحقیقات گذشته می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

بیان ژن آنزیم امگا-۳ فتی‌اسید دساچوراز بافت‌های مختلف گیاه خرفه در پاسخ به تنش‌های سرما و زخمی شدن بررسی گردید (Teixeirats *et al.*, 2010). 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 به‌طور مقایسه‌ای در محیط آبی بر قابلیت تجمع فلز مس مورد مطالعه قرار گرفت و خرفه به‌عنوان گیاهی دارویی معرفی شد (Mohanapriya *et al.*, 2006). تأثیر آلومینیوم بر قابلیت

برگ‌زایی اندام هوایی گیاه خرفه مورد مطالعه قرار گرفت و از آن به‌عنوان شاخصی جهت نشان دادن میزان آلودگی آب‌های جاری استفاده شد (Anandi *et al.*, 2002).

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 و استفاده از آن در تکنولوژی موسوم به پالایش گیاهی (Phytoremediation)، جالب به نظر می‌رسد.

این تحقیق به بررسی اثر یون فلز سنگین مس (Cu^{2+}) بر رنگیزه‌ها، فلاوونوئیدها، آنتوسیانین‌ها، ترکیب‌های فنلی و سیستم‌های آنزیمی آنتی‌اکسیدان به‌خصوص دو آنزیم پراکسیداز و کاتالاز پرداخته است. امید است که نتایج بدست‌آمده در این مقاله بتواند به توصیف نقش آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی (فلاوونوئیدها، آنتوسیانین‌ها و ترکیب‌های فنلی) و آنزیمی و ارتباط بین آنها در جلوگیری و محدودسازی صدمات ناشی از فلزات سنگین کمک نماید.

مواد و روشها

این پژوهش براساس طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در شرایط گلخانه‌ای انجام شد که در آن پس از ایجاد دانه‌رست، گیاهان در معرض تنش فلز سنگین مس قرار گرفتند. کشت گیاهان و مراحل مختلف پژوهش و آزمایشهای مربوط به آنها در مجتمع آزمایشگاهی پیام نور واحد تهران انجام شد. بذرهای مورد استفاده گیاه خرفه (*Portulaca oleracea* L.) از مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج در بهار ۱۳۸۸ تهیه گردید.

ابتدا بذرها توسط محلول ۵٪ هیپوکلریت سدیم به مدت ۵ دقیقه ضدعفونی شده و بعد سه مرتبه توسط آب مقطر شسته گردید. بذرها بعد از سترون‌سازی، به منظور تولید دانه‌رست در ظروف محتوی لیکا (دانه‌های رس سبک منبسط شده) کاشته شدند و تا زمان تولید دانه‌رست‌هایی به طول ۸ سانتی‌متر با آب مقطر آبیاری و پس از آن جهت رشد با محیط پایه هوگلند (Hoagland & Arnon, 1950)، تغذیه شدند.

در مرحله بعد تیمارهایی با غلظت‌های متفاوت ۰، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ میکرومولار از نمک فلز سنگین مس به‌صورت $CuSO_4.5H_2O$، همراه با گروه شاهد و همگی در سه تکرار تولید شده و تیماردهی به مدت ده روز انجام شد. گیاهان جمع‌آوری و از آنها جهت انجام آنالیزهای مختلف استفاده شد. این آنالیزها شامل اندازه‌گیری میزان کلروفیل a و b و کاروتنوئید، اندازه‌گیری میزان آنتوسیانین، اندازه‌گیری میزان فلاونوئید، اندازه‌گیری مقدار ترکیب‌های فنلی، استخراج عصاره پروتئینی جهت سنجش آنزیمی و اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی دو آنزیم پراکسیداز و کاتالاز بود که در همگی آنها از وزن تر اندام هوایی و در مورد فعالیت آنزیمی از وزن تر ریشه گیاه نیز استفاده شد.

سنجش میزان کلروفیل

دیسک‌های برگی تهیه شده از برگ‌های تازه گیاه به وزن ۰/۰۵ گرم در هاون چینی محتوی استون ۸۰٪ ساییده شده و پس از صاف کردن با کاغذ واتمن شماره ۲، جذب عصاره بدست آمده با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج‌های ٦٤٥، ٦٦٣ نانومتر خوانده شد و با قرار دادن در فرمول‌های زیر مقادیر هر یک از کلروفیل‌های a

و b را بدست آورده و بر حسب $\mu gml^{-1}g^{-1}Fw$ بیان نمودیم (Arnon, 1949) (جدول ۱).

$$Chla = \frac{12.3 \times A663 - 0.86 \times A645}{a \times 1000 \times W}$$

$$Chlb = \frac{19.3 \times A645 - 3.6 \times A663}{a \times 1000 \times W}$$

A_{663}: میزان جذب خوانده شده در طول موج ٦٦٣ نانومتر

A_{645}: میزان جذب خوانده شده در طول موج ٦٤٥ نانومتر

W: وزن تر نمونه برداشت‌شده به میلی‌گرم

a: طول مسیر عبور نور که معمولاً ۱ سانتی‌متر در نظر گرفته می‌شود.

سنجش میزان کاروتنوئید

ابتدا ۰/۰۵ گرم از اندام هوایی هر یک از گیاهان تحت تیمار را به دقت توزین نموده و داخل یک هاون چینی قرار می‌دهیم. سپس حدود ۱۰ میلی‌لیتر استون ۸۰٪ (حجمی/ حجمی) به آن افزوده و خوب می‌ساییم. پس از صاف کردن جذب آن با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ٤٨٠ نانومتر خوانده شد. جهت تنظیم دستگاه، استون ۸۰٪ مورد استفاده قرار گرفت. غلظت رنگیزه با استفاده از فرمول زیر محاسبه و بر حسب $\mu g\ g^{-1}\ FW$ بیان گردید (Lichtenthaler, 1987) (جدول ۱).

$$\text{کاروتنوئید} = \frac{[1000 \times \text{جذب نوری} - (1.8\ \text{کلروفیل a} - 85.02 \times \text{کلروفیل b})]}{198}$$

سنجش میزان آنتوسیانین‌ها

دیسک‌های برگی تهیه شده از گیاه به وزن ۰/۵ گرم در هاون چینی و با مقداری متانول اسیدی به نسبت حجمی cc ۱:۹۹ (متانول خالص (۹۹) و اسید کلریدریک خالص (۱)) کاملاً ساییده و عصاره در لوله‌های سر پیچ‌دار ریخته شد و به مدت ٢٤ ساعت در تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ٤٠٠٠ دور در دقیقه سانتریفوژ و جذب روشناور در طول موج ٥٥٠ نانومتر اندازه‌گیری گردید (Wagner, 1979). برای محاسبه غلظت از فرمول $A = \varepsilon BC$ استفاده کردیم که در آن ε یا ضریب خاموشی ۳۳۰۰۰ سانتی‌متر بر مول در نظر گرفته شد. B، عرض کووت برابر ۱ سانتی‌متر و C، غلظت کمپلکس بر حسب $\mu g\ g^{-1}\ FW$ می‌باشد (جدول ۱).

$$A = \varepsilon BC$$

سنجش میزان فلاونوئیدها

دیسک‌های برگی تهیه شده از گیاه به وزن ۰/۵ گرم در هاون چینی و با مقداری اتانول اسیدی به نسبت حجمی cc ۱:۹۹ (الکل اتیلیک (۹۹) و اسید استیک گلاسیال (۱)) کاملاً ساییده و پس از سانتریفوژ به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ٤٠٠٠ دور در دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. شدت جذب در طول موج ۳۰۰ نانومتر خوانده شد و با استفاده از فرمول زیر محاسبه و بر حسب درصد جذب (absorbance٪) بیان گردید (Krizek *et al.*, 1998) (جدول ۱).

$$Fla = ABS(300nm).\ 100\frac{V}{700}$$

V: حجم عصاره

اندازه‌گیری مقدار ترکیب‌های فنلی

۰/۱ گرم از بافت تازه برگ را در ۵ میلی‌لیتر اتانول ۹۵٪ ساییده و به مدت ٢٤ تا ٧٢ ساعت در تاریکی نگهداری شد. سپس به ۱ میلی‌لیتر از محلول رویی،

۱ میلی‌لیتر اتانول ۹۵٪ اضافه گردید و با آب مقطر دو بار تقطیر حجم محلول به ۵ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر معرف فولین ۵۰٪ و ۱ میلی‌لیتر کربنات‌سدیم ۵٪ به آن اضافه گردید و مخلوط حاصل به مدت ۱ ساعت در تاریکی نگهداری و بعد درصد جذب هر نمونه در طول موج ۷۲۵ نانومتر خوانده شد (Seevers & Daly, 1970). سپس با استفاده از منحنی استاندارد اسید گالیک مقدار این ماده بر حسب $\mu g\ g^{-1}$ FW اعلام گردید (جدول ۱).

استخراج عصاره پروتئینی

مقدار یک گرم بافت تر در یک هاون چینی محتوی ۵ میلی‌لیتر بافر تریس HCL ۰/۰۵ مولار با pH برابر ۷/۵ 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 مرحله لوله‌ها به آرامی از دستگاه خارج و محلول رویی از چند لایه پارچه عبور داده شد (Sudhakar *et al.*, 2001). آنگاه 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 pH= ۷، ۰/۳ میلی‌لیتر آب اکسیژنه ۵ میلی‌مولار و ۰/۲ میلی‌لیتر پیروگالل ۱۰ میلی‌مولار را در حمام یخ با ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی مخلوط و پس از ۲ دقیقه منحنی تغییرات جذب را با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ٤۲۵ نانومتر خوانده و بر حسب $\mu mol(H_2O_2)mg^{-1}(protein)min^{-1}$ بیان نمودیم (Kar & Mishra, 1976) (جدول ۲).

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز

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

نتایج

مقایسه آماری نتایج نشان داد که میزان کلروفیل‌های a و b کاهش یافت (جدول ۱). میزان کاروتنوئیدها، آنتوسیانین‌ها، فلاونوئیدها و ترکیب های فنلی به‌طور معنی‌دار روند افزایشی داشت (جدول ۱). در مورد آنتوسیانین‌ها و فلاونوئیدها به دنبال افزایش تا غلظتی معین، روند ثابتی مشاهده شد. این تثبیت در آنتوسیانین‌ها از غلظت بالاتری (۱۰۰۰ میکرومولار Cu^{2+}) نسبت به فلاونوئیدها (۵۰۰ میکرومولار Cu^{2+}) شروع شد. ترکیب‌های فنلی در غلظت‌های بالا نیز روند افزایشی خود را به‌طور معنی‌دار حفظ نمودند (جدول ۱). آنزیم پراکسیداز نسبت به افزایش دوز مس، فعالیت چشمگیری را از خود نشان داد، همچنین فعالیت پراکسیداز در ریشه بیشتر از اندام هوایی بود (جدول ۲). فعالیت آنزیم کاتالاز پایین و کاهشی بود و این روند در غلظت‌های بالای مس کمتر نیز می‌شد. به علاوه اینکه در ریشه فعالیت کمتری از این آنزیم نسبت به اندام هوایی دیده شد (جدول ۲).

جدول ۱- تغییرات میزان کلروفیل‌ها، کاروتنویید، آنتوسیانین، فلاونویید و ترکیب‌های فنلی نسبت به افزایش غلظت مس در اندام هوایی

	شاهد	۱۰ µM	۵۰ µM	۱۰۰ µM	۵۰۰ µM	۱۰۰۰ µM	۱۵۰۰ µM
کلروفیل a	۳/۵۷ a ± ۰/۰۵۰	۳/۰۳ a,b ± ۰/٤۱۸	۲/۹۱ a,b,c ± ۰/۳٦۷	۲/٤٦ b,c,d ± ۰/۵۸٦	۲/۲۲ b,c,d ± ۰/۵۰۸	۲/۱۷ c,d ± ۰/۵۲۵	۱/۷٦ d ± ۰/٦۳۱
کلروفیل b	۳/٤٤ a ± ۰/۱٤۰	۲/۹۸ b ± ۰/۰۹۷	۲/۸۷ b ± ۰/۰٦۵	۲/٦۷ c ± ۰/۰۹۱	۲/٤۰ d ± ۰/۰۷۵	۱/۹۹ e ± ۰/۱۰۱	۱/۵۲ f ± ۰/۰۷۷
کاروتنویید	۰/۰۳ g ± ۰/۰۰٤	۰/۰٦ f ± ۰/۰۰۹	۰/۱۱ e ± ۰/۰۰٤	۰/۱۵ d ± ۰/۰۰٤	۰/۱۷ c ± ۰/۰۰۲	۰/۲۰ b ± ۰/۰۰۳	۰/۲۲ a ± ۰/۰۰٤
آنتوسیانین	۰/۰۹ d ± ۰/۰۱٦	۰/۱۳ c ± ۰/۰٤۱	۰/۱٤ b,c ± ۰/۰٤۱	۰/۱٦ a,b,c ± ۰/۰۳٦	۰/۱۷ a,b ± ۰/۰۳٦	۰/۲۰ a ± ۰/۰۳۳	۰/۲۰ a ± ۰/۰۳۳
فلاونویید	۱/۲۰ d ± ۰/۲۰۰	۱/۵۸ c ± ۰/۲۹۷	۲/۱۳ b ± ۰/۲٤٦	۲/۲۹ b ± ۰/۲۷۸	۲/۵۵ a ± ۰/۲۵٦	۲/۵٦ a ± ۰/۲۵۸	۲/۵٦ a ± ۰/۲۵۸
ترکیب‌های فنلی	۰/۰٤۰۲۰ f ± ۰/۰۰۰	۰/۰٤۰۲۳ e ± ۰/۰۰۰	۰/۰٤۰۲٤ e ± ۰/۰۰۰	۰/۰٤۰۲۷ d ± ۰/۰۰۰	c ۰/۰٤۰۳۱ ± ۰/۰۰۰	۰/۰٤۰۳۳ b ± ۰/۰۰۰	۰/۰٤۰۳٦ 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 ۲- تغییرات میزان آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز نسبت به افزایش غلظت مس در اندام هوایی و ریشه

	اندام هوایی		ریشه	
	کاتالاز	پراکسیداز	کاتالاز	پراکسیداز
شاهد	۰/۳٦۷ a ± ۰/۰۰۷	۰/۷۷۱ e ± ۰/۰۰۱	۰/۳۵۷ a ± ۰/۰۰۰	۰/۷۹۸ e ۰/۰۰۱
۱۰ µM	۰/۳۵۰ b ± ۰/۰۰٦	۰/۷۷٤ d,e ± ۰/۰۰۱	۰/۲۸۷ b ± ۰/۰۰۰	۰/۸۰۷ d ± ۰/۰۰۰
۵۰ µM	۰/۳٤۲ b,c ± ۰/۰۰٦	۰/۷۷۷ d ± ۰/۰۰۰	۰/۲۸۳ b ± ۰/۰۰۱	۰/۸۰۹ c,d ± ۰/۰۰۱
۱۰۰ µM	۰/۳۳۲ c,d ± ۰/۰۰٤	۰/۷۸۲ c ± ۰/۰۰۱	۰/۲۸۱ b ± ۰/۰۰۱	۰/۸۱۰ c,d ± ۰/۰۰۰
۵۰۰ µM	۰/۳۲۱ d ± ۰/۰۰٤	۰/۷۸۳ c ± ۰/۰۰۱	۰/۲۷۷ b,c ± ۰/۰۰۱	۰/۸۱۱ c ± ۰/۰۰۰
۱۰۰۰ µM	۰/۳۰۵ e ± ۰/۰۰۲	۰/۷۹۵ b ± ۰/۰۰۱	۰/۲٦۸ c ± ۰/۰۰۱	۰/۸۱۸ b ± ۰/۰۰۰
۱۵۰۰ µM	۰/۲۸۸ f ± ۰/۰۰۲	۰/۸۰۸ a ± ۰/۰۰۲	۰/۲٤۰ d ± ۰/۰۰۲	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.

بحث

به‌طور کلی Cu^{2+} می‌تواند با تولید رادیکال‌های آزاد وقایع زیر را در سلول گیاهان القا نماید: (i) به گروههای سولفیدریل پروتئین‌های غشاء و یا آنزیم‌ها متصل گردد (Jouili & El Feriani, 2003)؛ (ii) سرعت پراکسیداسیون لیپیدها را افزایش دهد (Teisseire & Guy, 2000)؛ (iii) جذب سایر عناصر ضروری را دچار اختلال کند (Xiong *et al.*, 2006)؛ (iv) بر سنتز کلروفیل‌ها و چرخه انتقال الکترون ضربه وارد کند و به دنبال آن اثرهای سمّی برای واکنش‌های اولیه فتوسنتز دربر داشته باشد (Yruela, 2005) و قبل از همه چیز (v) به‌عنوان فلز جابجاشونده در واکنش‌های ردوکس می‌تواند تولید رادیکال‌های آزاد و ROS را از طریق واکنش‌های هابر- ویس و فنتون تسریع نماید (Schutzendubel & Polle, 2002). اثر ثانویه بوجود آمده از استرس‌های اکسیداتیو متعاقباً مسئول صدمه به پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک (Lombardii & Sebastiani, 2005) و همین‌طور نقص عملکرد در فرایند سیگنال‌دهی و سایر صدمات متابولیکی (Yruela, 2005) هستند. تجمع غلظت‌های افزایش‌یافته فلز مس جرقه تولید ROS را می‌زند. ROS بوجود آورنده صدمات اکسیداتیو به غشاء پلاسمایی است. در نهایت، تجزیه اسیدهای چرب چندتایی غیراشباع به دلیل فعالیت پراکسیدی صورت گرفته و یون‌های پراکسید و مالون‌دآلدهید آزاد می‌شود که باعث سختی غشاء و در نهایت مرگ سلول می‌گردد (Choudhary *et al.*, 2007). در شرایط تنش تخریب مولکول کلروفیل امری بدیهی است (Wo´jcik *et al.*, 2006؛ دولت‌آبادیان، ۱۳۸۶). بدنبال تخریب رنگیزه سبز (کلروفیل) گیاه رنگی به نظر می‌رسد که دلیل آن افزایش و قابل رؤیت شدن رنگیزه‌های محافظ مانند کاروتنوئیدها (کاروتن، گزانتوفیل و لیکوپن) و آنتوسیانین‌ها است. فلاونوئیدها و ترکیب‌های فنلی متابولیت‌های ثانویه بوده و دارای نقش محافظتی و آنتی‌اکسیدانی هستند (Posmyk *et al.*, 2007؛ Skorzynska-Polit *et al.*, 2004). از میان سیستم‌های غیرآنزیمی دفاع، ترکیب‌های فنلی و به‌خصوص آنتوسیانین‌ها در گیاهانی که در معرض غلظت‌های زیاد فلزات سنگین هستند، بسیار فعال بوده و باعث حفظ گیاه در مقابل سمّیت می‌شوند (Posmyk *et al.*, 2005؛ Dai *et al.*, 2006). همچنین گزارش شده که در گیاهان کاشته شده تحت غلظت‌های بالای فلزات سنگین فلاونوئیدها، آنتوسیانین‌ها، ترکیب‌های فنلی و حتی کاروتنوئیدها فعال شده و از گیاه محافظت می‌کنند (Posmyk *et al.*, 2007؛ Posmyk *et al.*, 2009). فلاونول‌ها به‌عنوان رنگیزه همراه با آنتوسیانین در گل‌ها و میوه‌ها، دارای نقش حمایتی به‌عنوان یک سد در مقابل UV هستند (Jaakola *et al.*, 2002). فلاونول‌ها در هر دو فاز آبی و چربی سلول‌های گیاهی وجود دارند. اثبات شده‌است که فلاونول‌های موجود در واکوئول‌ها می‌توانند در سیستم پاک‌سازی فلاونول- پراکسیداز شرکت کرده و گونه‌های فعال اکسیژن به‌خصوص پراکسید هیدروژن را جارو نمایند (Yamasaki, 1997). فعالیت چنین سیستم‌هایی در گیاه ضروری به نظر می‌رسد، زیرا شرایط بهینه را جهت رشد گیاه فراهم می‌آورد. علاوه بر این نشان داده شده‌است که فلاونول‌ها در کنار توکوفرول‌ها، آسکوربیک‌اسید، گلوتاتیون و کاروتنوئیدها می‌توانند به خوبی نقش دفاع آنتی‌اکسیدان غیرآنزیمی را بازی کنند. حضور حلقه‌های آروماتیک و اجزا متنوع دیگر در ساختارشان از آنها جاروکنندگان رادیکالی مناسبی ساخته‌است. تولید

فلاونوئید محدود به بافت‌های خاص است و در مراحل خاصی از تکامل گیاه انجام می‌شود (Jaakola *et al.*, 2002؛ Sudhakar *et al.*, 2001). محیط آلوده به فلزات سنگین باعث رنگی و متمایل به قرمز شدن اندام هوایی گیاهان در زمان رشد می‌شود که نتیجه افزایش تجمع فلاونوئیدهاست. افزایش در مقدار آنها می‌تواند از شدت تنش اکسیداتیو بوجود آمده بکاهد. نحوه پاسخ سیستم‌های دفاع آنزیمی، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، به فلزات سنگین بحث‌انگیز باقیمانده است و می‌تواند از گونه‌ای به گونه دیگر یا از بافتی به بافت دیگر بسیار متنوع باشد (Mazhoudi *et al.*, 1997). بسیاری از تحقیقات افزایش فعالیت در SOD، POX و CAT را وابسته به افزایش غلظت فلزات سنگین گزارش کرده‌اند (Weckx & clijsters, 1996؛ Rama Devi & Prasad, 1998؛ Van assche & Clijsters, 1990؛ Chongpraditnum *et al.*, 1992) و به‌عکس گزارشهای دیگر حکایت از محدود شدن فعالیت این سه آنزیم و کاهش آنها در معرض فلزات سنگین مازاد دارند (Luna *et al*, 1994؛ Palma *et al.*, 1987). افزایش غلظت‌های مس درون سلول باعث تولید رادیکال هیدروکسیل و H_2O_2 از طریق واکنش تسریع‌شده با فلز به نام هابر- ویس می‌گردد (Palma *et al.*, 1987). مکانیزم‌های حمایتی در مقابل گونه‌های فعال اکسیژن بوجود آمده به علت غلظت‌های بالای فلزات سنگین، می‌تواند افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مانند سوپراکسید دیسموتاز و پراکسیداز باشد (Bueno & Piqueras, 2002). انهدام مؤثر 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 مولکولی تبدیل می‌نمایند (Noctor & Foyer., 1998). روش دیگر از بین رفتن H_2O_2 توسط پراکسیدازهاست. این آنزیم‌ها که سراسر سلول یافت می‌شوند میل ترکیبی بیشتری با H_2O_2 نسبت به کاتالاز دارند (Jimenez *et al.*, 1997). 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 کاهش تولید رنگیزه‌های سبز، کلروفیل‌های a و b مشاهده شد که بیانگر افزایش میزان تنش اکسیداتیو است. کاهش میزان کلروفیل را می‌توان به پراکسیداسیون غشاء کلروپلاست‌ها توسط فلزات سنگین مربوط دانست (Parasad *et al.*, 2001). در گیاه بادام زمینی میزان کلروفیل a وb و کلروفیل کل در نمونه‌های قرار گرفته تحت تنش مس به میزان چشمگیری کاهش یافت و این کاهش بسیار بیشتر از نمونه‌های آلوده به روی بود که نشان‌دهنده سمّیت بیشتر مس نسبت به روی برای برگ‌های بادام‌زمینی است. فتوسیستم II در برگ‌های بادام‌زمینی نسبت به غلظت‌های بالای مس حساس است. اما این اثر در مورد روی دیده نشد (Shi & Cai, 2009). میزان کلروفیل در گیاه *Triticum aestivum cv. Vergina* که تحت تنش خاک آلوده به مس قرار داشت کاهش یافت (Lanaras *et al.*, 1993) و همین نتیجه برای گیاه *Brassica oleracea* var. *Botrytis* cv. *Maghi* که تحت تنش مس، کادمیوم و کروم قرار داشت بدست آمد (Chatterjee & Chatterjee, 2000). قرارگیری گیاه لوبیا *Phaseolus vulgaris* L. در معرض غلظت‌های فلزات سنگین سرب، مس، کادمیوم و جیوه نشان داد که مقدار

کلروفیل کل کاهش می‌یابد (Zengin & Munzuroglu, 2005).

با قرارگیری گیاه خرفه در مقابل غلظت‌های رو به افزایش مس، افزایشی در میزان کاروتنوئیدها، آنتوسیانین‌ها، فلاونوئیدها و ترکیب‌های فنلی، اجزاء تشکیل‌دهنده سیستم دفاعی غیرآنزیمی، دیده شد. افزایش کاروتنوئیدها ابتدا آرام و تدریجی بود و بعد در غلظت ۱۰۰۰ میکرومولار ثابت ماند. آنتوسیانین‌ها بیشترین فعالیت خود را در غلظت ۱۰۰۰ میکرومولار و فلاونوئیدها بیشترین فعالیت خود را در غلظت ۵۰۰ میکرومولار بروز داده و از آن پس با ثباتی در تغییر میزان مواجه شدند. ترکیب‌های فنلی همچنان به روند صعودی خود تا غلظت ۱۵۰۰ میکرومولار ادامه دادند. با توجه به نتایج بدست آمده در گیاه خرفه می‌توان این نتیجه را گرفت که در تنش فلز سنگین مس، ترکیب‌های فنلی در سیستم دفاعی غیرآنزیمی در درجه اول اهمیت و پس از آنها به‌ترتیب آنتوسیانین‌ها و کاروتنوئیدها در درجه دوم و فلاونوئیدها در درجه سوم اهمیت قرار می‌گیرند. این نتایج در تأیید کارهای انجام شده بر آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی گیاه کلم قرمز تحت تنش مس است (Posmyk *et al*., 2009). در این گزارش آمده‌است که ترکیب‌های فنلی قابلیت شلاته شدن با فلزات سنگین را دارا هستند. به‌طور مثال گزارش شده که گروههای هیدروکسیل و کربوکسیل ترکیب‌های فنلی می‌توانند قویاً به Cu و Fe متصل شوند. همچنین ذکر شده که ترکیب‌های فنلی و آنتوسیانین‌ها عمدتاً گزینه‌ای اصلی جهت مقابله با رادیکال‌های آزاد در تنش‌های مرتبط با فلزات سنگین هستند (Posmyk *et al*., 2009) که در تأیید کار ماست. به‌علاوه اثبات شده‌است که فلاونول‌های موجود در واکوئل‌ها می‌توانند در سیستم پاک‌سازی فلاونول-پراکسیداز شرکت کرده و گونه‌های فعال اکسیژن به‌خصوص پراکسید هیدروژن را جارو نمایند (Yamasaki, 1997).

با افزایش سطح ROS در سلول‌ها، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان افزایش می‌یابد و متعاقب با آن تغییری در فعالیت آنزیم‌هایی مانند پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز دیده می‌شود. در تحقیق ما افزایش معنی‌دار فعالیت پراکسیداز در هر دو اندام بخش هوایی و ریشه دیده شد. میزان پراکسیداز در ریشه نسبت به اندام هوایی بیشتر بود. کار بر روی کلم قرمز، به‌عنوان گیاهی سرشار از آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی و آنزیمی، افزایش معنی‌دار آنزیم‌هایی مانند پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز را در تنش فلزات سنگین اثبات کرد (Posmyk *et al*., 2009). در تحقیقی دیگر نیز همین افزایش فعالیت در گیاه اسفناج اثبات گردید (Pandey *et al*., 2009). در گیاه گوجه‌فرنگی غلظت‌های افزایش‌یافته آرسنیک سبب افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم پراکسیداز شد که بیانگر مقابله با اثرهای سوء تنش اکسیداتیو است (Miteva *et al*., 2005). در گیاه حرا ارتباط خطی و مستحکمی بین افزایش میزان جذب فلزات سنگین و افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز، حتی قبل از هرگونه شروع علائم سمّیت گیاهی، وجود داشت. با توجه به نتایج فوق به نظر می‌رسد که در این گیاه سیستم دفاع غیرآنزیمی به خصوص ترکیب‌های فنلی و آنتوسیانین‌ها به‌طور توأم با سیستم دفاع آنزیمی همکاری می‌نمایند تا بتوانند اثر مخرب تنش را خنثی نمایند. هنگام ایجاد هر گونه تثبیت، تضعیف یا اُفت در سیستم دفاع غیرآنزیمی، سیستم دفاع آنزیمی وظیفه پاکسازی رادیکال‌های آزاد را بر عهده

می‌گیرد. البته توانایی گیاهان جهت افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان برای مقابله با اثرهای تنش محدود به نظر می‌رسد. در مطالعاتی نشان داده شده که غلظت‌های افزایش‌یافته فلزات سنگین در نهایت به کاهش همه آنزیم‌های اکسیداتیو منجر می‌شود (Schutzendubel & Polle, 2002). در نتیجه فعالیت آنزیم‌ها در غلظت کم فلزات زیاد و با افزایش غلظت آنها، بعد از گذشت از آستانه‌ای (با توجه به نوع گیاه)، بتدریج رو به کاهش می‌گذارد (Cao *et al.*, 2004). تأثیر طولانی مدت فلزات سنگین ابتدا سبب القاء و افزایش فعالیت آنزیم‌ها به‌خصوص پراکسیدازها و بعد از آن سبب کاهش فعالیت می‌گردد (Qadir *et al.*, 2004).

در این تحقیق کاهش معنی‌دار فعالیت کاتالاز در هر دو اندام بخش هوایی و ریشه دیده شد، به‌طوری که میزان کاتالاز در اندام هوایی نسبت به ریشه بیشتر بود. نتایج ما همانند آنچه 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، سوپراکسید دیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز و کاهش کاتالاز را گزارش کردند. از سوی دیگر تحقیق بر روی *Thlaspi caerulescens* تحت تنش روی و کادمیوم کاهش فعالیت این آنزیم را نشان داد و آن را نسبت به این فلزات حساس معرفی نمود (Wo´jcik *et al.*, 2006). بررسی گیاهان میکوریزدار نیز همین نتیجه را تأیید کرد (Azcon *et al.*, 2009). فلزات سنگین به‌خصوص غلظت‌های بالای آن باعث جلوگیری از فعالیت آنزیم کاتالاز شده و با افزایش غلظت فلز فعالیت آن رو به کاهش می‌گذارد (Choudhary *et al.*, 2007؛ Posmyk *et al.*, 2009).

نتیجه‌گیری

کاهش رنگیزه‌های سبز و افزایش فلاونوئیدها، آنتوسیانین‌ها، ترکیب‌های فنلی، کاروتنوئیدها و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نسبت به بالا رفتن غلظت فلزات سنگین، گواهی بر ارتباط بین تولید رادیکال‌های آزاد و افزایش تجمع این مواد است. بنابراین هنگام تضعیف سیستم دفاعی غیرآنزیمی، سیستم دفاعی آنزیمی فعال شده و با حذف رادیکال‌های آزاد و اثر مخربشان به کمک گیاه می‌شتابند.

منابع مورد استفاده

- دولت‌آبادیان، آ.، ۱۳۸٦. اثر محلول‌پاشی ویتامین ث بر صفات مرفولوژیک فیزیو لوژیک ذرت دانه‌ای در شرایط تنش کم‌آبی. پایان‌نامه دانشگاه تربیت مدرس، تهران.
- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. Methods in Enzymology, 105: 121-126.
- Anandi, S., Thangavel, P. and Subburam, V., 2002. Influence of aluminium on the restoration potential of the terrestrial vascular plant, *Portulaca oleracea* L. as a biomonitoring tool of fresh water aquatic environments. Environmental Monitoring and Assessment, 78: 19-29.
- Apel, K. and Hirt, H., 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. Annual Reviews of Plant Biology, 55: 373-399.
- Arnon, D.I., 1949. Copper enzymes in isolated Chloroplast polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiology, 24: 1-15.
- Azcon, R., Peralvarez, M., Biro, B., Roldan, A. and RuizLozano, J., 2009. Antioxidant activities and metal acquisition in mycorrhizal plant growing in a heavy-metal multicontaminated soil amended with treated lignocellulosic agrowaste. Applied soil ecology, 41(2): 168-177.
- Baryla, A., Laborde, C., Montillet, J.L., Triantaphylides, C. and Chagvardieff, P., 2000. Evaluation of lipid peroxidation as a toxicity bioassay for plant exposed to copper. Environmental Pollution, 109: 131-135.

- Bowler, C., Vanmontagu, M. and Inze, D., 1992. Superoxidedismutase and stress tolerance. Annual Reviews of Plant Biology and Plant Molecular Biology, 43: 83-116.
- Bueno, P. and Piqueras, A., 2002. Effect of transition metals on stress, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in tobacco cell cultures. Plant Growth Regulation, 36(2): 161-167.
- Cao, X., Ma, L.Q. and Tu, C., 2004. Antioxidative responses to arsenic in the arsenic-hyperaccumulator Chinese brake fern (*Pteris vittata* L.). Environmental Pollution, 128: 317-325
- Chatterjee, J. and Chatterjee, C., 2000. Phototoxicity of cobalt, chromium and copper in cauliflower. Environmental Pollution, 109: 69-74.
- Chongpraditnun P., Mori, S. and Chino, M., 1992. Excess copper induces a cytosolic Cu, Zn-superoxide dismutase in soybean root. Plant and Cell Physiology, 33(3): 239-244.
- 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.
- Dai, L.P., Xiong, Z.T., Huang, Y. and Li, M.J., 2006. Cadmium-induced changes in pigments, total phenolics, and phenylalanine ammonialyase activity in fronds of *Azolla imbricate*. Environmental Toxicology, 21(5): 505-512.
- Deepa, R., Senthilkumar, P., Sivakumar, S., Duraisamy, P. and Subbhuraam, C.V., 2006. Copper availability and accumulation by *Portulaca oleracea* L. Environmental Monitoring and Assessment, 116: 185-195.
- Fabre, N., Urizzi, P., Souchard, J.P., Ferchard, A., Claparols, C., Fouraste, I. and Moulis, C., 2000. An antioxidant sinapic acid ester isolated from *Iberis amara*. Fitoterapia, 71(4): 425-428.
- Gaetke, L.M. and Chow, C.K., 2003. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. Toxicology, 189: 147-163.
- Hall, J.L., 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. Journal of Experimental Botany, 53: 1-11.
- Hoagland, D.R. and Arnon, D., 1950. The Water Culture Method for Growing Plants Without Soil. Berkeley, Calif, College of Agriculture, University of California, 500p.
- Jaakola, L., Maatta, K., Pirttila, A.M., Torronen, R., Karenlampi, S. and Hohtola, A., 2002. Expression of genes involved in anthocyanin biosynthesis in relation to anthocyanin, proanthocyanidin, and flavonol levels during bilberry fruit development. Plant Physiology, 130(2): 729-739.
- Jimenez, A., Hernandez, 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.
- Jouili, H. and El Feriani, E., 2003. Changes in antioxidant and lignifying enzyme activities in sunflower roots (*Helianthus annuus* L.) stressed with copper excess. Comptes Rendus Biologies, 326(7): 639-644.
- Kar, M. and Mishra, D., 1976. Catalase, Peroxidase, and Polyphenoloxidase activities during Rice Leaf Senescence. Plant Physiology, 57: 315-319.
- Krizek, D.T., Britz, S.J. and Mirecki, R.M., 1998. Inhibitory effects of ambient levels of solar UV-A and UV-B radiation on growth of cv. new red fire lettuce. Physiologia Plantarum, 103: 1-7.
- Lanaras, T., Moustakas, M., Symeonidis, L., Diomantoglou, S. and Karataglis, S., 1993. Plant metal content, growth responses and some photosynthetic measurements of field-cultivated wheat growing on ore bodies enriched in Cu. Physiologia Plantarum, 88(2): 307-314.
- 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.
- Lichtenthaler, H.K., 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. Methods In Enzymology, 148: 350-382.
- Lombardii, L. and Sebastiani, L., 2005. Copper toxicity in *Prunus cerasifera*: growth and antioxidant enzymes responses of in vitro grown plant. Plant Science, 168(3): 797-802.
- Luna, C.M., Gonzalez, C.A. and Trippi, V.S., 1994. Oxidative damage caused by an excess of copper in oat leaves. Plant and Cell Physiology, 35(1): 11-15.
- Mazhoudi, S., Chaoui, A. Ghorbal, M.H. and ElFerjani, E., 1997. Response of antioxidant enzymes to excess copper in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Plant Science, 127(2): 129-137.
- Miteva E., Hristova, D., Nenova, V. and Maneva, S., 2005. Arsenic as a factor affecting virus infection in tomato plants: changes in plant growth, peroxidase activity and chloroplast pigments. Scientia Horticulturae, 105(3): 343-358.
- Mohanapriya S., Senthilkumar, P., Sivakumar, S., Dineshkumar, M. and Subbhuraam, 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: 233-244.
- Neill, S.J., Desikan, R., Clarke, A., Hurst, R.D. and Hancock, J.T., 2002. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. Journal of Experimental Botany, 53(372): 1237-1247.
- Noctor, G. and Foyer, C.H., 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control.

- 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.
- Teisseire, H. and Guy, V., 2000. Copper-induced changes in antioxidant enzymes activities in fronds of duckweed (*Lemna minor*). Plant Science, 153: 65-72.
- Teixeirats, M.C., Carvalhots, I.S. and Brodelius, M., 2010. ω-3 fatty acid desaturase gene isolated from Purslane (*Portulaca oleracea*) expression in different tissues and response to cold and wound stress. Journal of Agricultural and 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 industrial effluent irrigated area in Vadodra, Gujrat, India. Environmental Monitoring and Assessment, 147(1-3): 15-22.
- Van Assche F. and Clijsters, H., 1990. Effects of metals on enzyme-activity in plants. Plant Cell and Environment, 13(3): 195-206.
- Wagner, G.J., 1979. Content and vacuole/extravacuole distribution of neutral sugars, free amino acids, and anthocyanins in protoplast. Plant Physiology, 64: 88-93
- Wang, H., Cao, G. and Prior, R.L., 1997. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45(2): 302-309.
- 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.
- Weckx, J.E.J. and Clijsters, H.M.M., 1996. Oxidative damage and defense mechanisms in primary leaves of *Phaseolus vulgaris* as a result of root assimilation of toxic amounts of copper. Physiologia Plantarum, 96(3): 506-512.
- Wo´jcik 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.
- Xiong, Z.T., Liu, C. and Geng, B., 2006. Phytotoxic effects of copper on nitrogen metabolism and plant growth in *Brasica pekinensis* Rupr. Ecotoxicology and Environmental Safety, 64(3): 273-280.
- Yamasaki, H., 1997. A function of color. Trends in Plant Science, 2: 7-8.
- Yruela, I., 2005. Copper in plants. Brazilian Journal of Plant Physiology, 17: 145-156.
- Zengin, F.K. and Munzuroglu, O., 2005. Effects of some heavy metals on content of chlorophyll, proline and some antioxidant chemicals in Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings. Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica, 47(2): 157-164.
Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 49: 249-279.
- Palma, J.M., Gómez, M., Yáñez, J. and del Río, L.A., 1987. Increased levels of peroxisomal active oxygen-related enzymes in coppertolerant pea plants. Plant Physiology, 85(2): 570-574.
- 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., Dobranowska, A. and Janas, K.M., 2005. Role of anthocyanins in red cabbage seedlings response to copper stress. Ecological Chemistry and Engineering 12(10): 1107-1112.
- Posmyk, M.M., Kontek, R. and Janas, K.M., 2007. Effect of anthocyanin-rich red cabbage extract on cytological injury induced by copper stress in plant and animal tissues. Environmental Protection of Natural Soures, 33: 50-56.
- Posmyk, M.M., Kontek, R. and Janas, K.M., 2009. Antioxidant Enzymes activity and phenolic compounds content in red cabbage seedlings exposed to copper stress. Ecotoxicology and Environmental safety, 72(2): 596-602.
- Prasad, M.N.V., Malec, P., Waloszek, A., Bojko, M. and Strzałka, K., 2001. Physiological responses of *Lemna trisulca* L. (duckweed) to cadmium and copper bioaccumulation. Plant Science, 161(5): 881-889.
- Qadir, S., Qureshi, M.I., Javed, S. and Abdin, M.Z., 2004. Genotypic variation in phytoremediation potential of *Brassica juncea* cultivars exposed to Cd stress. Plant Science, 167(5): 1171-1181.
- Rama Devi, S. and Prasad, M.N.V., 1998. Copper toxicity in *Ceratophyllum demersum* L. (Coontail), a free floating macrophyte: response of antioxidant enzymes and antioxidants. Plant Science, 138(2): 157-165.
- Schutzendubel, A. and Polle, A., 2002. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal induced oxidative stress and protection by mycorrhization. Journal of Experimental Botany, 53(372): 1351-1365.
- Seevers, P.M. and Daly, J.M., 1970. Studies on wheat stem rust resistance control at sr6 locus. 1- The role of phenolic of stem rust and wheat containing resistance genes Sr5, Sr6, Sr8, Sr22. Canadian Journal of Botany, 57: 324-331.
- Shi, G. and Cai, Q., 2009. Leaf plasticity in peanut (*Arachis hypogaea* L.) in response to heavy metal stress. Environmental and Experimental Botany, 67: 112-117.
- Skorzynska-Polit, E., Drazkiewicz, M., Wianowska, D., Maksymiec, W., Dawidowicz, A.L. and Tukiendorf, A., 2004. The influence of heavy metal stress on the level of some flavonols in the primary leaves of *Phaseolus coccineus*. Acta Physiologiae Plantarum, 26(3): 247-253.

Copper-induced changes on pigments and activity of non-enzimatic and enzymatic defence systems in *Portulaca oleracea* L.

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

1*- Corresponding author, Biology Department, Faculty of Sciences, Gorgan Unit, Islamic Azad University, Gorgan, Iran
E-mail: Ghorbanli@yahoo.com
2- Payam-e-Noor University, Tehran, Iran

Received: September 2010 Revised: May 2011 Accepted: July 2011

Abstract

Several defense systems are cooperating together in plants to cope with stressful situations. One of these stresses is heavy metals pollution of the plant's growing environment. In This article, the effect of different concentrations of copper was studied on photosynthetic and non-photosynthetic pigments, non-enzymatic and enzymatic defence systems in *Portulaca oleracea* L. In order to show the effect of so-called heavy metal, copper, on pigments, anthocyanines, flavonoides, phenolic compounds and the activity of antioxidant enzymes some experiments were performed in a completely randomized design and statistical differences were applied at the $p \leq 0.05$ level. After planting the plants with the same conditions in the sterile bed, they were nourished with Hoagland's liquid medium. The bed was then amended with graded concentrations (0, 10, 50, 100, 500, 1000 and 1500 μM) of copper salt, in the form of $CuSO_4.5H_2O$, separately as treatments and with the control group. Three replicates were maintained for each treatment and also for control groups. After ten days of applying the treatments, the plants were harvested for performing the experiments. After measuring and applying the statistical differences at the 0.05 level via SPSS software, these results were obtained: The amount of chlorophyll a and b was decreased. Amounts of carotenoides, anthocyanines, flavonoides and phenolic compounds were significantly increased. Peroxidase activity was increased and catalase activity was decreased in both shoots and roots.

Key words: *Portulaca oleracea* L., heavy metals, copper, pigments, phytoremediation, defence systems.