



## بررسی اثر سرب و سالیسیلیک اسید بر فعالیت آنزیمهای کاتالاز و پراکسیداز در دو رقم

### گیاه لوبیا (*Phaseolus vulgaris*)

حسین لاری یزدی، حمزه امیری، عاطفه قشنگ زاده

۱- استادیار گروه زیست شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد ۲- استادیار گروه زیست شناسی دانشگاه لرستان، ۳- دانشجوی

کارشناسی ارشد زیست شناسی

دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد . Ghashangzade@gmail.com

#### چکیده

از آنجایی که حبوبات جزء منابع غنی از پروتئین می باشند و از این میان با توجه به اهمیت گیاه لوبیا و همچنین افزایش روز افزون سرب ناشی از مصرف مواد مختلف و آثار مخرب آن از طریق منابع مختلف بر روی گیاهان تاثیر میگذارد. بر آن شدیم تا در این بررسی این دو فاکتور را مورد استفاده قرار دهیم و بعلاوه تاثیر اسید سالیسیلیک به عنوان هورمون تنظیم کننده گیاهی را نیز بررسی کردیم.

تحقیق به منظور بررسی تأثیر غلظت های

این

سرب (۰/۷۵، ۰/۱۵، ۰/۲۵) میلی مولار از

مختلف

منبع  $Pb(NO_3)_2$  و سالیسیلیک اسید (با غلظت ۱۰ میکرو مولار) بر فعالیت آنزیمهای کاتالاز و پراکسیداز در ریشه و اندام هوایی ۲ رقم لوبیا (گلی و صیاد) در محیط کشت به روش هیدروپونیک با استفاده از محلول غذایی هوگلند انجام گرفت. سنجنش آنزیم پراکسیداز با روش **Koroi (1989)** و سنجنش آنزیم کاتالاز به روش **Chance (1995)** انجام شد. آنالیز آماری داده ها با تجزیه واریانس و آزمون دانکن توسط نرم افزار SPSS در سطح احتمال ۱٪ و ۳ تکرار انجام شد. بنابر نتایج حاصل از این پژوهش، همزمان با افزایش غلظت سرب، شاهد افزایش معنی دار ( $P < 0/01$ ) آنزیمهای کاتالاز و پراکسیداز در ریشه و برگ گیاهان ۷ روزه هر دو رقم گلی و صیاد بودیم که این افزایش در رقم گلی بیشتر از صیاد بود. در هر دو رقم میزان فعالیت آنزیمهای کاتالاز و پراکسیداز در ریشه نسبت به برگ بیشتر بود، همچنین اسید سالیسیلیک موجب تعدیل تنش حاصل از سرب گردید و فعالیت آنزیمهای مذکور را افزایش داد.

واژگان کلیدی: سرب، اسید سالیسیلیک، کاتالاز، پراکسیداز، لوبیا

#### مقدمه

حبوبات یکی از مهمترین منابع غذایی انسان به شمار می روند و لوبیا با سطح کشت وسیعی که دارا می باشد در معرض تنش های گوناگون قرار دارد. سرب به عنوان مهمترین فلز آلاینده محیط زیست معرفی شده است (Yang et al., 2000) که از طرق مختلف در بافت های گیاهی توزیع می شود (Jeffrey et al., 1997). تنش موجب فعال شدن آنزیمهای آنتی اکسیدانی می شود که استفاده از تیمار با اسید سالیسیلیک می توان اثرات سمی بر آنزیمهای آنتی اکسیدانی را کاهش داد (Krantereva & Popova, 2008). هدف از این پژوهش مطالعه اثر سرب و سالیسیلیک اسید بر میزان فعالیت آنزیمهای کاتالاز و پراکسیداز در دو رقم گیاه لوبیا می باشد.

## مواد و روش ها

ابتدا بذره‌های سالم و یکنواخت به منظور ضد عفونی سطحی به مدت ۱۰ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۲۰٪ قرار داده شدند، سپس بذرها بعد از شستشو با آب مقطر به مدت ۲۴ ساعت در آب قرار داده شدند تا به مرحله آماس رسیدند سپس در تعدادی سبدها به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی قرار داده شدند و بعد از اتمام این مدت زمان به روشنایی منتقل گردیدند و سپس گیاهچه های ۵ روزه از سبدها به ظرف های تیره حاوی ۳۵۰ میلی لیتر محلول هوگلند نیم قدرت (محیط هیدروپونیک) انتقال یافتند. بعد از ۲۴ ساعت، ظروف حاوی گیاهان تحت تیمارهای ۱- سرب با غلظت ۰/۲۵mM، ۲- سرب با غلظت ۰/۵mM، ۳- سرب با غلظت ۰/۷۵mM و به تعدادی دیگر از گیاهان (۱-۲-۳) سالیسیلیک اسید ۱۰  $\mu\text{M}$  نیز افزودیم، ۳ در این آزمایش دو نمونه به عنوان شاهد تعیین شد که در یکی از آنها فقط از محلول هوگلند استفاده شد و عنصر دیگری اضافه نگردید و به دیگری فقط اسید سالیسیلیک با غلظت ۱۰  $\mu\text{M}$  اضافه شد. برای جلوگیری از خفگی ریشه ها، محیط هیدروپونیک حامل گیاهان مورد مطالعه، هر روز به مدت ۲ ساعت هوادهی میشدند. گیاهان در اتاقی با شرایط نوری مناسب در زیر لامپ فلورسنت ۲۰ وات و ۲ عدد لامپ حبابی بزرگ آفتابی در دما و رطوبت آزمایشگاه رشد کردند pH در محلول غذایی هوگلند در حد ۶/۵ تنظیم گردید. بعد از گذشت ۷ روز برای سنجش فعالیت های آنزیمهای کاتالاز و پراکسیداز به روش زیر عمل می کنیم.

-سنجش آنزیم پراکسیداز (Koroi, 1989)

(الف) تهیه محلول عصاره گیری: مخلوط ۱/۲ گرم تریس، ۰/۱ گرم اسید آسکوربیک، ۱۷/۲ گرم ساکارز، ۰/۱ گرم سیستئین کلراید و ۲۶/۸ میلی لیتر اسید کلرید یک ۰/۲ نرمال را با آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی لیتر با pH=7/5 رساندیم. ب) استخراج عصاره آنزیمی: یک گرم از بافت تر گیاهی (برگ یا ریشه هر کدام جداگانه) را وزن نموده با ۵ میلی لیتر محلول عصاره گیری سائیده سپس آن را به مدت ۱۰ دقیقه در حالت سکون قرار داده و سپس به مدت نیم ساعت با قدرت ۱۰۰۰۰g سانتریفوژ شدند، سپس محلول رویی در دمای ۴ درجه نگهداری گردید. ج) سنجش فعالیت آنزیم: از محلول های زیر استفاده گردید:

۲(۱) میلی لیتر تامپون استات ۰/۲ مولار با pH=۴/۸، ۰/۲ میلی لیتر آب اکسیژنه ۳٪، ۰/۱ میلی لیتر بنزیدین (۰/۰۲M) محلول در متانول (۵۰٪) محلول های فوق را به همراه ۰/۱ میلی لیتر از محلول عصاره گیری (حاوی آنزیم پراکسیداز) را با هم مخلوط نمودیم و در دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۳۰ نانومتر، میزان جذب آن را خواندیم. مقدار فعالیت آنزیم بر حسب واحد جذب در دقیقه به ازاء هر میلی گرم پروتئین در گرم وزن تر محاسبه گردید.

- سنجش آنزیم کاتالاز (Chance, 1999):

۲/۵(۱) میلی لیتر تامپون فسفات با pH=7، ۰/۳(۲) میلی لیتر آب اکسیژنه ۳٪

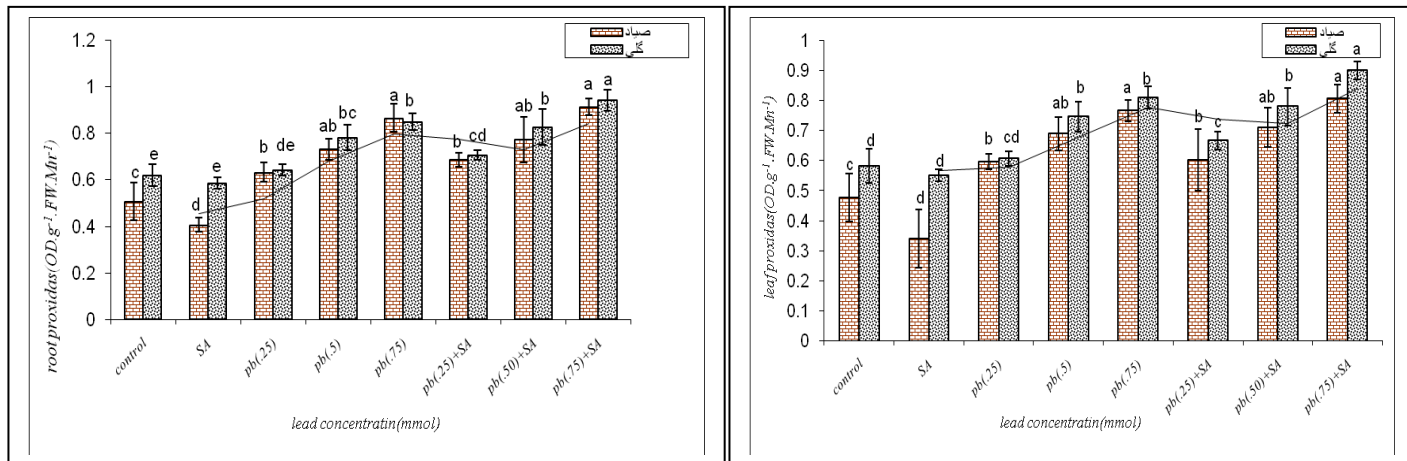
محلول های فوق را به همراه ۰/۲ میلی لیتر از محلول عصاره گیاهی را با هم مخلوط می نمایم و در دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۳۰ نانومتر، میزان جذب آن را می خوانیم.

## نتایج و بحث

با توجه به نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر، همزمان با افزایش غلظت سرب، افزایش معنی دار ( $P < 0/01$ ) آنزیمهای کاتالاز و پراکسیداز در ریشه و برگ گیاهان ۷ روزه هر دو رقم گلی و صیاد مشاهده شد و در هر دو رقم هم در برگ و هم در ریشه، طبق آزمون مقایسه ای دانکن، بیشترین مقدار این آنزیمها در تیمار Pb4+SA مشاهده شد. در هر دو رقم میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در

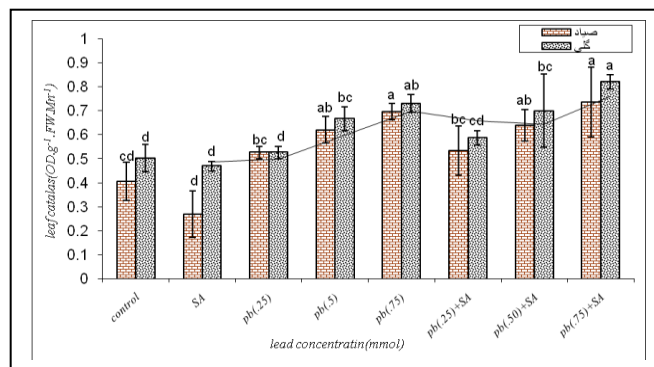
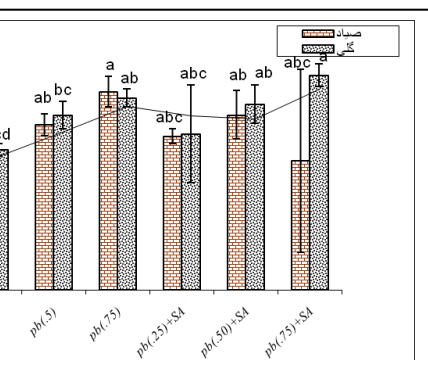
## ۱۳۹۰ و ۱۳۹۱ اسفندماه دانشگاه آزاد اسلامی خراسان و اسفندماه کشاورزی

برگ و ریشه افزایش شدیدتری نسبت به آنزیم کاتالاز نشان داد و این افزایش در ریشه گیاهان بیشتر از برگ آنها مشاهده شد، از طرفی این افزایش در رقم گلی، شدیدتر از رقم صیاد بود که نشان دهنده مقاومت بیشتر رقم گلی نسبت به رقم صیاد است.



نمودار ۲- مقایسه پراکسیداز ریشه در دو رقم گلی و صیاد ۷ روزه تحت تاثیر غلظت های مختلف PbNO<sub>3</sub> و برهم کنش با SA

نمودار ۱- مقایسه پراکسیداز برگ در دو رقم گلی و صیاد ۷ روزه تحت تاثیر غلظت های مختلف PbNO<sub>3</sub> و برهم کنش با SA



نمودار ۴- مقایسه کاتالاز ریشه دو رقم گلی و صیاد ۷ روزه تحت تاثیر غلظت های مختلف PbNO<sub>3</sub> و برهم کنش با SA

نمودار ۳- مقایسه کاتالاز برگ در دو رقم گلی و صیاد ۷ روزه تحت تاثیر غلظت های مختلف PbNO<sub>3</sub> و برهم کنش با SA

Shalini در سال ۲۰۰۳ بیان کرد که کاتالازها و اکسیدازها از جمله آنزیم هایی به شمار می روند که نقش بسیار مهمی در پاسخ به تنش های غیر زیستی مثل تنش سرب دارند. در پژوهش حاضر کاربرد اسید سالیسیلیک باعث افزایش معنی دار (P < 0/01) فعالیت آنزیم های کاتالاز و پراکسیداز گردید که با نتایج Choudhari و Mishra در سال ۱۹۹۸ که با افزودن اسید سالیسیلیک به محیط حاوی سرب توانستند اثرات تنش سرب را کاهش دهند، مطابقت دارد. همچنین افزایش فعالیت آنزیم های کاتالاز و پراکسیداز با نتایج بدست آمده مبنی بر افزایش غلظت فلزات سنگین و تولید H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> که منجر به تنش اکسیداتیو می شود و القای سنتز کاتالاز به عنوان یکی از مکانیسم های عمومی گیاه در برابر عناصر صورت می گیرد.

نتیجه گیری کلی

سرب از فراوان ترین و خطرناک ترین آلاینده های زیستی است که موجب ایجاد تنش در گیاه لوبیا می شود. یکی از مکانیسم های دفاعی این گیاه در رویارویی با این تنش، افزایش فعالیت آنزیم های کاتالاز و پراکسیداز است که اسید سالیسیلیک نیز به کمک این سیستم آنزیمی آمده و در هنگام تنش باعث افزایش فعالیت این آنزیم ها می شود تا بتواند با این تنش مبارزه کرده و تنش را تعدیل نماید.

#### منابع

۱. پوراسماعیل م. قربانلی م. خاوری نژاد ر. ۱۳۸۴. اثر شوری روی جوانه زنی، وزن تر و خشک، محتوای یونی، پرولین، قند محلول و نشاسته گیاه *Suaeda fruticosa*. مجله ی بیابان، جلد دهم، شماره ی دوم، صفحه ۲۶۷-۲۵۷.
۲. فرودنیا ط. ۱۳۸۴. بررسی اثرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی ناشی از آلودگی سرب بر دانه رست های ذرت (*Zea mays*) اثر pH و EDTA بر تجمع سرب و مکانیسم های مقاوم ذرت در برابر آلودگی سرب. پایان نامه دکترای زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه.

3.Hayat Q,Hayat SH,Irfan M,Ahmad A.2010.Effect of exogenous salicylic acid under chenging environment:Areview.Environmental and Experimental Botany68(2010)14-25.

4.Sharma P,Dubey R.2005.Lead toxicity in plants.Braz.J.Plant Physiol.,17(1):35-52.

## The effects of lead & salicylic acid on activity of katalas and proxidas enzymes in two cultivars *phasaеolous vulgaris*(Goli-Sayad)

1-Hosein Iari Yazdy 2-Hamze Amiri 3-atefe Ghashangzade

1-Islamic azad univercity borojerd branch,2-Lurestan univercity,3-M.Sc. student univercity

Ghashangzade@gmail.com

### Abstract

Grains are good sources of protein and due to the importance of bean and increasing the environmental leads as a chemical which results from different material used in society, the hazardous effects of this chemical can affect the plants. The aim of this study was to evaluate the interaction between these two factors along with the salicylic acid effects as a regulatory hormone in plants growths.

This research has been conducted in order to study the effect of lead at different concentrations 0/25,0/5,0/75 mM Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> and salicylic acid (SA:10 μM) on activity of katalas and proxidas enzymes in root and shoot of two cultivars *phasaеolous vulgaris*(Goli & Sayad) in hydroponic culture by Hogland nutrient. Determining of proxidas enzyme by Koroï method (1989) and determining of katalas enzyme by Chance method (1995). analysis have been done by use of variance procedure and Duncan test and by SPSS software in probability 0/01 and 3 repeats. In result of this research, increased katalas and proxidas enzymes with increase lead concentration in root and shoot of 7 days Goli and Sayad plants. This increasing in Goli was more than Sayad. In both of cultivar, activity of katalas and proxidas in root was more than shoot in addition salicylic acid regulated stress of lead and increased activity these enzymes.



ششمین جایز ملی ایده های نو در کشاورزی



همایش ملی  
ایده های نو در کشاورزی

۱۱ و ۱۲ اسفندماه ۱۳۹۰ دانشگاه آزاد اسلامی خراسان دانشکده کشاورزی

**Keywords:** lead, salicylic acid, katalas, peroxidase, *phasaecolous vulgaris*