

## اثر $Cr^{3+}$ بر لیپید پراکسیداسیون غشا و فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان آسکوربات پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز، و پلی فنل اکسیداز در گیاه ریحان (*Ocimum basilicum* L.)

رویا بیشه کلایی<sup>\*۱</sup> - حمید فهیمی<sup>۲</sup> - سارا سعادت‌مند<sup>۳</sup> - طاهر نژادستاری<sup>۴</sup>

تاریخ دریافت: ۹۰/۶/۲۱

تاریخ پذیرش: ۹۰/۱۱/۲۴

### چکیده

اثر تیمارهای مختلف  $Cr^{3+}$  در غلظت های ۰، ۱، ۲، ۴، ۶ و ۸ میلی گرم بر لیتر بر پراکسیداسیون لیپیدی غشاهای سلولی و تولیدمالون دی آلدئید (MDA) و نیز فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان در ریشه و برگ نشاهای گیاه ریحان (*Ocimum basilicum* L.) در طی ۶ هفته تیمار در محیط کشت هیدروپونیک مورد بررسی قرار گرفت. با افزایش غلظت  $Cr^{3+}$  در محیط کشت، در غلظت های  $4\text{mg L}^{-1}$  و بالاتر از آن، فعالیت سوپراکسید دیسموتاز (SOD) در ریشه و برگ در مقایسه با شاهد بطور معنی داری افزایش یافت ( $P \leq 0/01$ ). همچنین فعالیت آسکوربات پراکسیداز (APOX) و پلی فنل اکسیداز (PPOX) بافت های ریشه و برگ نیز در تیمارهای تنشی یون  $Cr^{3+}$  ( $4\text{mg L}^{-1}$ ) و بالاتر) در مقایسه با شاهد و غلظت های پایین تر کروم بطور معنی داری افزایش یافت ( $P \leq 0/01$ ) که بیانگر تاثیر اکسیداتیو تنشی ناشی از تیمار  $Cr^{3+}$  می باشد. سطح MDA با افزایش غلظت  $Cr^{3+}$   $4\text{mg L}^{-1}$  و بالاتر، در مقایسه با نمونه شاهد در ریشه و برگ افزایش یافت ( $P \leq 0/01$ ) و آسیب اکسیداتیو ناشی از اثر غلظت های تنشی یون  $Cr^{3+}$  بر غشا را نشان داد.

واژه های کلیدی: *Ocimum basilicum* L.،  $Cr^{3+}$ ، آنزیم های آنتی اکسیدان، لیپید پراکسیداسیون، کشت هیدروپونیک

### مقدمه

درحالیکه غلظت های زیاد آن اثرات سمی به جا می گذارد (۱۵ و ۴۱). کروم برای جانوران و انسانها می تواند هم سودمند و هم سمی باشد و مفید یا مضر بودن آن در سیستم های جانوری و گیاهی به حالت اکسیداسیون و غلظت این عنصر بستگی دارد (۳۳).  $Cr^{3+}$  در غلظت های پایین برای سلامت انسان و حیوان ضروری است در حالیکه Cr (III) و Cr (VI) در غلظت های زیاد سرطانزا و به شدت سمی هستند (۳۳). فلزات سنگین مانند کروم آسیب های برگشت ناپذیری را در بسیاری از اجزای تشکیل دهنده متابولیسم حیاتی و بیوملکول های مهم ایجاد می کنند و لذا موجب آسیب های برگشت ناپذیر در سلول های گیاهی و غشاهای سلولی می گردند (۱۸). سمیت کروم در غلظت های نسبتا زیاد به گونه ای است که ممکن است با وظایف بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی گیاهان شدیداً تداخل نماید (۲۹). یک پاسخ مهم به تنش Cr توسط سلول های گیاهی، تولید گونه های اکسیژن واکنشگر (ROS) مانند رادیکال سوپراکسید ( $O_2^{\bullet-}$ )، هیدروژن پراکسید ( $H_2O_2$ )، رادیکال هیدروکسیل ( $OH^{\bullet}$ ) و اکسیژن یکتایی ( $^1O_2$ ) می باشد که سمی هستند (۶). ROS های تولید شده در سلول های گیاهی بوسیله سیستم های آنتی اکسیدان آنزیمی و غیر آنزیمی کنترل می شوند (۴۴). کنترل سطح آنتی اکسیدان ها بوسیله

در گیاهان مطالعات اندکی بر روی تاثیر زیست انباشتگی کروم بر بازدارندگی رویش دانه، کاهش رشد رویشی، کلروز برگ، پژمردگی بخش های هوایی و کاهش بیومس انجام یافته است (۱۷). کروم در صنایع فلزی از اهمیت ویژه ای برخوردار است و نمک های کروم در تولید استیل، آبدی فلزات، رنگرزی، نساجی و صنایع وابسته کاربردهای وسیعی دارد، بنابراین مقادیر زیادی از این عنصر در فاضلاب های شهری و پساب های صنعتی وجود دارد (۴ و ۴۳) بطوریکه دومین فلز سنگین متداول آلوده کننده در محیط زیست (آب و خاک) به شمار می آید (۱۶ و ۳۸)، بنابراین نمک های کروم که کم و بیش در خاک و آب محلولند در غلظت های بالا می توانند محیطهای سمی را برای رشد گیاهان ایجاد کنند (۳۸). غلظت های کم کروم سبب تحریک و افزایش رشد طبیعی گیاهان می گردد (۱۳)

۱-استادیار گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قائم شهر

(Email:rbishe@gmail.com)

(\*- نویسنده مسئول:

۲،۳ و ۴- به ترتیب استادیاران و دانشیار گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران

### سنجش مالون دی آلدئید (MDA)

برای سنجش مالون دی آلدئید به عنوان شاخص لیپید پراکسیداسیون غشای سلولی از روش هیث و پیکر (۱۴) استفاده شد. بدین منظور ۰/۲ گرم بافت گیاهی با ۵ میلی لیتر تری کلرواستیک اسید (TCA) ۰/۱ درصد بصورت همگن درآمد. سپس همگنای حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در  $10000 \times g$  سانتریفوژ شد. پس از سانتریفوژ ۱ میلی لیتر از محلول روشنار با ۴ میلی لیتر TCA ۲۰ درصد (W/V) محتوی ۰/۵ درصد (W/V) -۲ تیوباریتوریک اسید (TBA) مخلوط گردیده و محلول حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم ۹۵ درجه سانتیگراد قرار گرفت. نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در حمام آب یخ سرد شدند و مجدداً به مدت ۱۰ دقیقه در  $10000 \times g$  سانتریفوژ شد. از محلول روشنار برای سنجش میزان مالون دی آلدئید استفاده شد. بدین منظور جذب محلول روشنار در دو طول موج ۶۰۰ و ۵۳۲ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد و میزان جذب غیر ویژه در ۶۰۰ نانومتر از میزان جذب ماکزیمم در ۵۳۲ نانومتر کسر شد. برای محاسبه MDA از ضریب خاموشی  $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  استفاده شد.

### استخراج عصاره های آنزیمی

۰/۵ گرم از بافت تازه گیاهی در هاون چینی حاوی ۵ میلی لیتر بافر استخراج که حاوی بافر فسفات پتاسیم (M)  $1/5, 0/1$  (pH) و اتیلن دی آمین تتراستیک اسید (EDTA, ۰/۵ mM) بود ساییده شد تا نمونه‌ها کاملاً همگن شدند. تمام مراحل استخراج در دمای ۴- تا ۰- درجه سانتیگراد انجام شد. همگنای حاصل به مدت ۲۰ دقیقه و با سرعت  $15000$  دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد با استفاده از سانتریفوژ سرمایشی مدل Beckman (LE 80 K) سانتریفوژ شد. پس از پایان سانتریفوژ، محلول روشنار در لوله‌های اپندورف سترون توزیع و در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند. این نمونه‌ها برای تعیین فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیداتیو مورد استفاده قرار گرفتند.

### سنجش فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)

برای سنجش فعالیت این آنزیم از روش گیانوپولیتز و رایس (۱۲) استفاده شد. در این روش بازدارندگی این آنزیم از احیای نوری نیتروبلوترازولیوم (NBT) در طول موج ۵۶۰ نانومتر، اساس اندازه گیری فعالیت آنزیم SOD است. بدین منظور ابتدا محلول بافر فسفات پتاسیم  $50 \text{ mM}$  با  $1/5$  pH آماده شد. سپس برای تهیه مخلوط واکنش ترکیبات زیر به ترتیب  $75 \mu\text{M}$  NBT، میتونین  $13 \mu\text{M}$ ، ریوفلاوین  $4 \mu\text{M}$  و EDTA  $1 \text{ mM}$  به بافر فسفات پتاسیم افزوده شد، باید توجه داشت که قبل از اضافه کردن این ترکیبات به

سیستم‌های آنتی اکسیدانی حاصل می‌شود که شامل متابولیت‌هایی چون گلوتاتیون، آسکوربات، آلفاتوکوفرول، هیدروکوئینون‌ها، بتاکاروتن، فلاونوئیدها و آنزیم‌های روبندگی اکسیژن واکنشگر مانند سوپراکسید دیسموتاز، پراکسیداز و کاتالاز می‌باشد (۴۲). در صورتیکه سمیت زدایی از ROSها صورت نپذیرد آسیب جدی به کلروفیل‌ها، پروتئین‌ها، لیپیدهای غشایی و اسیدهای هسته ای وارد می‌شود (۱). غیر فعال شدن زنجیره انتقال الکترون میتوکندری در گیاهان عالی که تحت تنش کروم بوده اند نیز گزارش شده است (۱۳). غلظت‌های بالای گونه‌های اکسیژن واکنشگر در مقیاس سلولی منجر به ایجاد آسیب اکسیداتیو می‌گردد (۱۸). ROSها ممکن است دو نقش متفاوت ایفا کنند: آسیب‌های اکسیداتیو شدید و یا فعال سازی ژن‌های دفاعی در برابر تنش‌های اکسیداتیو (۱۷). فعالیت همزمان آنزیم‌های آنتی اکسیدانی مانند کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز با آنزیم‌های تحت تنظیم تیول چرخه آسکوربات-گلوتاتیون یک مکانیزم مهم روبندگی ROS در شرایط تنش فلزات سنگین محسوب می‌شود (۱۷ و ۲۷). هدف از پژوهش حاضر، بررسی اثر تنشی  $Cr^{3+}$  بر سیستم آنتی اکسیدان گیاه *Ocimum basilicum* L. با سنجش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان سوپراکسید دیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز و تخمین میزان لیپید پراکسیداسیون غشاهای سلولی با سنجش محتوای مالون دی آلدئید و ارزیابی تاثیر اکسیداتیو تنش ناشی از تیمار فلز سنگین Cr در نشاهای گیاهی مورد مطالعه می‌باشد.

### مواد و روش‌ها

بذرهای گیاه ریحان (*Ocimum basilicum* L. cv. Qarakhale) از مرکز تحقیقات کشاورزی ساری تهیه شد و پس از آبکشی کامل با آب مقطر برای جوانه زنی در ژرمیناتور آزمایشگاهی در دمای ۲۱ درجه سانتیگراد قرار گرفت. نشاهای همسان پس از ۷ روز به ظروف پلی اتیلن ۳ لیتری واحد محلول غذایی هوگلند تعدیل شده (۲۲) در فیتوترون با دمای  $1 \pm 24$  درجه سانتیگراد و دوره روشنایی ۱۶ ساعت و رطوبت نسبی ۷۰ درصد منتقل شدند. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی در ۳ تکرار و جمعیت گیاهی ۹ گیاه در هر تیمار انجام شد. یک هفته پس از انتقال نشاها به محیط کشت هیدروپونیک یون  $Cr^{3+}$  بصورت نیترات کروم در غلظت‌های صفر، ۱، ۲، ۴، ۶ و ۸ میلی گرم بر لیتر به محلول غذایی اضافه شد. تعویض محلول هفته‌ای دوبار انجام شد. گیاهان پس از ۶ هفته تیمار برداشت شدند. ریشه‌ها و برگ‌ها جدا شده و با آب مقطر دیونیزه کاملاً آبکشی شدند. برای سنجش‌های بیوشیمیایی، بافت‌های تازه ریشه و برگ در نیتروژن مایع و در دمای ۷۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

(۳۱) انجام شد و ابتدا درون لوله آزمایش ۲/۵ میلی لیتر بافر فسفات (pH=۶/۸) افزوده شد و سپس به آن ۰/۲ میلی لیتر پیروگال (M) (۰/۰۲) اضافه شد و در حمام آب ۴۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت و اجازه داده شد تا دمای لوله به ۴۰ درجه سانتی گراد برسد آزمایش در سه تکرار انجام شد. سپس به هر یک از لوله‌ها ۰/۲ میلی لیتر عصاره آنزیمی افزوده شد و تغییرات جذب در طول موج ۴۳۰ نانومتر در فاصله زمانی ۴ دقیقه ثبت گردید. میزان فعالیت آنزیم بر اساس تغییرات جذب در ۴۳۰ نانومتر در دقیقه در گرم وزن تر بافت بیان گردید.

### تحلیل آماری

نتایج آزمایش‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS (version 17) مورد تحلیل آماری قرار گرفت، مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح آماری  $P < 0.05$  انجام شد. نمودارها با استفاده از نرم‌افزار SPSS ترسیم شد.

### نتایج و بحث

نتایج حاصل از اثر سطوح مختلف  $Cr^{3+}$  بر میزان مالون دی آلدئید بافت ریشه و برگ نشاهای گیاه *O. basilicum* L. پس از ۶ هفته تیمار در سطح  $P \leq 0.01$  معنی دار بوده است و تغییرات مذکور از یک روند افزایشی متناسب با افزایش غلظت های تیماری  $Cr^{3+}$  در محیط پیروی کرد به گونه ای که افزایش محتوای MDA بافت ریشه و برگ در غلظتهای ۴، ۶ و ۸ میلی گرم بر لیتر  $Cr^{3+}$  در مقایسه با شاهد اختلاف معنی داری نشان داد و بیشترین میزان MDA در تیمار ۸ میلی گرم بر لیتر  $Cr^{3+}$  مشاهده شد (شکل ۱). همچنین فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان شامل سوپر اکسید دیسموتاز (شکل ۲)، آسکوربات پراکسیداز (شکل ۳)، و پلی فنل اکسیداز (شکل ۴) بافت ریشه و برگ گیاهان مورد تیمار در غلظت های بیشتر از ۴ میلی گرم بر لیتر  $Cr^{3+}$  در مقایسه با شاهد افزایش معنی داری نشان داد ( $P \leq 0.01$ ).

تنش های ناشی از فلزات سنگین به عنوان القاکننده ی تنش های اکسیداتیو در گیاهان شناخته می شوند (۳۴ و ۳۵). تنش های اکسیداتیو با تشکیل رادیکال های آزاد و گونه های واکنشگر اکسیژن (ROS) ایجاد می شوند (۳۷) و سبب آسیب به غشاهای سلول های گیاهی و تغییرات فراساختمانی در اندامکها و اختلال در فعالیت های متابولیکی (۲۷ و ۳۷) و نیز اختلال در بیوسنتز ملکول های حیاتی یاخته های گیاهی می شوند (۳۴). تنش اکسیداتیو حاصل از غلظت های سمی کروم منجر به پراکسیداسیون لیپیدی غشاهای زیستی می گردد. ROS نیز بعنوان محصول تنش های زیستی و غیرزیستی در نتیجه سمیت Cr تشکیل می شود (۹ و ۲۷). در بسیاری از گیاهان زراعی مانند برنج، گندم، نخود و همچنین در گیاهان پست، همراه با افزایش تولید ROS، افزایش در پراکسیداسیون لیپیدی غشاهای زیستی

بافر فسفات پتاسیم بایستی ظرف حاوی مخلوط واکنش را با فویل آلومینیوم پوشاند تا به هیچ وجه نور نیفتد. سپس از هر نمونه عصاره آنزیمی ۲۰۰ میکرولیتر در هر لوله آزمایش ریخته و ۳ میلی لیتر از مخلوط واکنش به آن افزوده شد و با قرار دادن آنها در روشنایی لامپ فلورسنت ۴۰W با تابش  $75 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  بلافاصله واکنش آغاز شد. پس از گذشت ۸ دقیقه نور قطع شده و بلافاصله جذب نمونه ها در طول موج ۵۶۰ نانومتر خوانده شد. به عنوان شاهد، از ۳ میلی لیتر از محلول فوق که فاقد عصاره آنزیمی بود استفاده شد. برای سنجش فعالیت این آنزیم علاوه بر این شاهد، نیاز به شاهد روشنایی نیز هست که شامل ۳ میلی لیتر از محلول واکنش (فاقد عصاره آنزیمی) است که در مقابل نور فلورسنت قرار می گیرد. میزان فعالیت آنزیم SOD در نمونه ها در مقایسه با شاهد روشنایی سنجیده می شود. به دلیل عدم وجود آنزیم در شاهد روشنایی، احیای NBT در حضور نور به طور ۱۰۰ درصد انجام گرفته و تمام نیتروبولوتترازولیوم موجود در مخلوط واکنش به فورمازون تبدیل می شود. میزان جذب این شاهد در ۵۶۰ نانومتر نشان دهنده ۱۰۰ درصد احیای نوری NBT است و نیمی از آن معادل یک واحد آنزیمی است. بنابراین یک واحد آنزیمی سوپراکسید دیسموتاز مقدار آنزیمی است که موجب ۵۰ درصد ممانعت از احیای نوری NBT می شود. اختلاف جذب نمونه ها و شاهد روشنایی در ۵۶۰ نانومتر نشان دهنده مهار احیای نوری NBT در حضور آنزیم SOD موجود در نمونه می باشد. با استفاده از این اختلاف جذب، واحد آنزیمی نمونه ها محاسبه و فعالیت آنزیمی بر حسب واحد آنزیم در گرم بافت تر بیان شد.

### سنجش فعالیت آسکوربات پراکسیداز (APOX)

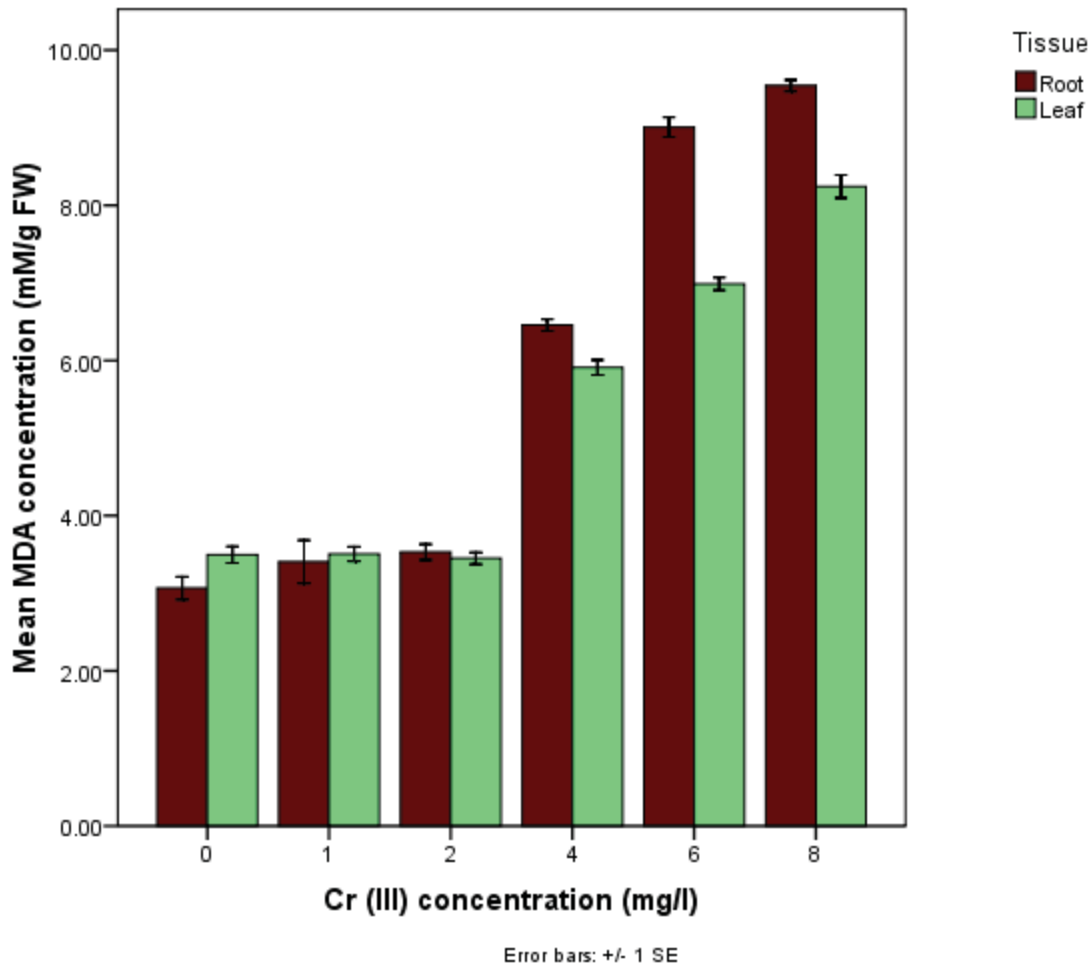
فعالیت این آنزیم به روش آسادا (۲) با اندکی تغییرات مورد سنجش قرار گرفت. عصاره آنزیم استخراجی که برای فعالیت آسکوربات پراکسیداز استفاده می شود، حاوی ۰/۲ میلی مولار آسکوربات نیز می باشد که هنگام استخراج قبل از سانتریفوژ کردن به عصاره افزوده گردید. به مخلوط واکنش که ۲/۵ میلی لیتر بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی مولار با pH=۷ (شامل EDTA ۰/۱ میلی مولار، آسکوربات ۰/۵ میلی مولار)، ۰/۲ میلی لیتر  $\text{H}_2\text{O}_2$  ۱٪ (V/V) و ۰/۱ میلی لیتر عصاره آنزیم استخراجی افزوده شد. سنجش فعالیت آنزیم از طریق اندازه گیری اکسید شدن آسکوربات توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۴۰ نانومتر انجام شد که با کاهش جذب در طی یک دقیقه همراه باشد. ضریب خاموشی آسکوربات  $2/8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  می باشد. یک واحد آنزیمی، مقدار آنزیم لازم برای تجزیه ۱ میکرومول  $\text{H}_2\text{O}_2$  در یک دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد است.

### سنجش فعالیت پلی فنل اکسیداز (PPOX)

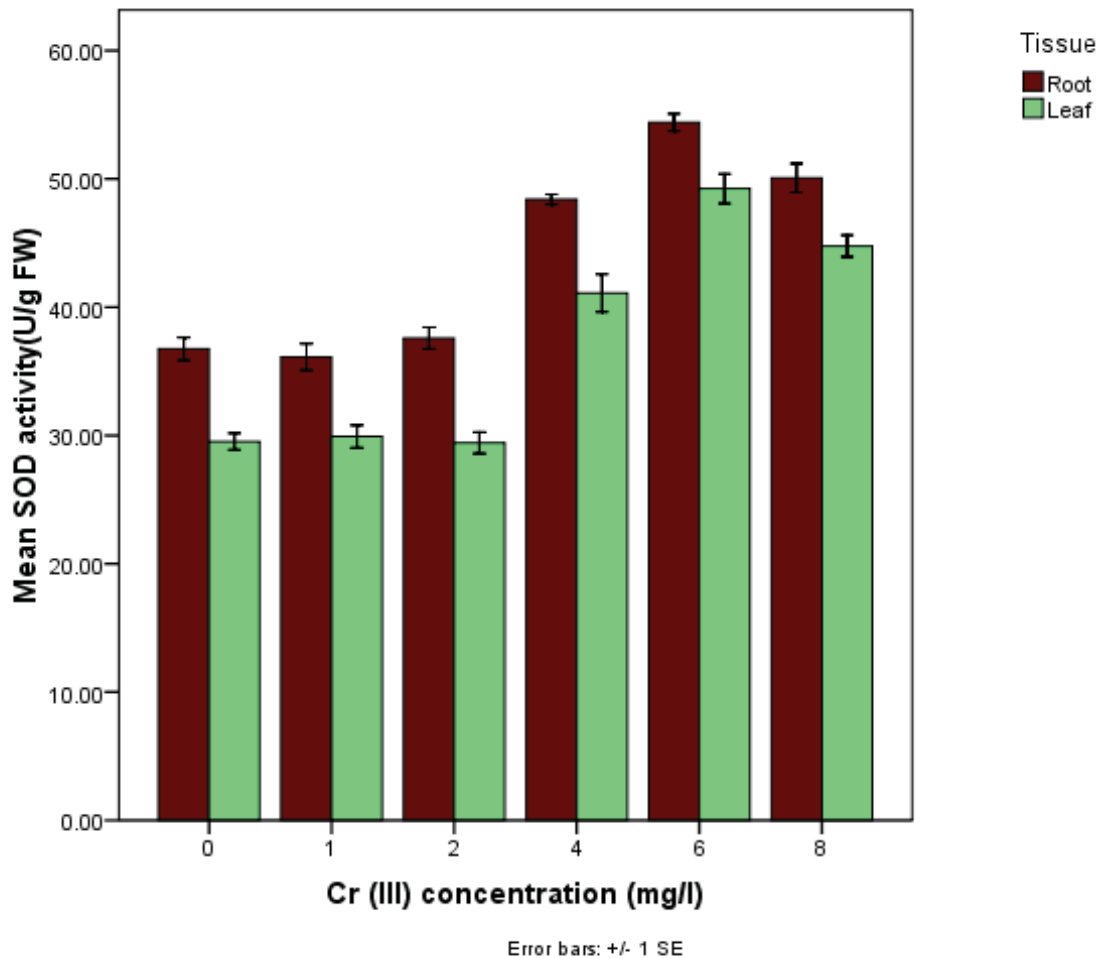
سنجش فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز به روش ریموند و همکاران

برحسب غلظت MDA، آسیب تنشی القا شده توسط  $Cr^{3+}$  را در غلظت‌های تنشی  $Cr^{3+}$   $8 \mu\text{M}$ ،  $16 \mu\text{M}$ ،  $40 \mu\text{M}$  در نشاهای *O. basilicum* نشان داد. افزایش در پراکسیداسیون لیپیدی بر حسب تشکیل MDA بر روی نشاهای *Sorghum bicolor* تحت تیمارهای تنشی  $Cr^{3+}$   $100 \mu\text{M}$ ،  $50 \mu\text{M}$  گزارش شده است (۳۲). همچنین در تحقیق دیگری میزان MDA در نشاهای *Triticum aestivum* در غلظت‌های  $100 \mu\text{M}$ ،  $10 \mu\text{M}$ ،  $1 \mu\text{M}$  کروم با افزایش غلظت کروم و با گذشت زمان افزایش یافت (۲۶). مقدار MDA همچنین در خزّه‌های *Taxithelium nepalense* و *Polytrichum commune* تحت تنش Cr از طریق تولید رادیکال آزاد افزایش یافت (۲۷).

نیز مشاهده شده است (۱۷، ۲۳، ۲۴، ۲۵ و ۲۷). تشکیل مالون دی آلدئید در گیاهانی که در معرض تنش قرار می‌گیرند بیانگر تشکیل رادیکال آزاد در بافت‌های گیاهی مربوطه می‌باشد و عموماً معرف پراکسیداسیون لیپیدی غشاهای زیستی است (۵ و ۸). در پژوهش حاضر پراکسیداسیون لیپیدی غشا بر حسب میزان MDA با افزایش غلظت  $Cr^{3+}$  در ریشه و برگ نشاهای *O. basilicum* افزایش یافت، بطوریکه در تیمار  $Cr^{3+}$   $8 \text{ mg L}^{-1}$  MDA در ریشه به  $0.13 \pm 0.09$  در هر گرم وزن تر بافت ریشه و در برگ به  $0.26 \pm 0.08$  در هر گرم وزن تر بافت برگ رسید. در این تحقیق افزایش پراکسیداسیون لیپیدی وابسته به غلظت  $Cr^{3+}$



شکل ۱- اثر غلظت‌های مختلف  $Cr^{3+}$  بر غلظت مالون دی آلدئید در بافت ریشه و برگ نشاهای گیاه ریحان (*O. basilicum*) پس از ۶ هفته تیمار ( $P < 0.05$ )



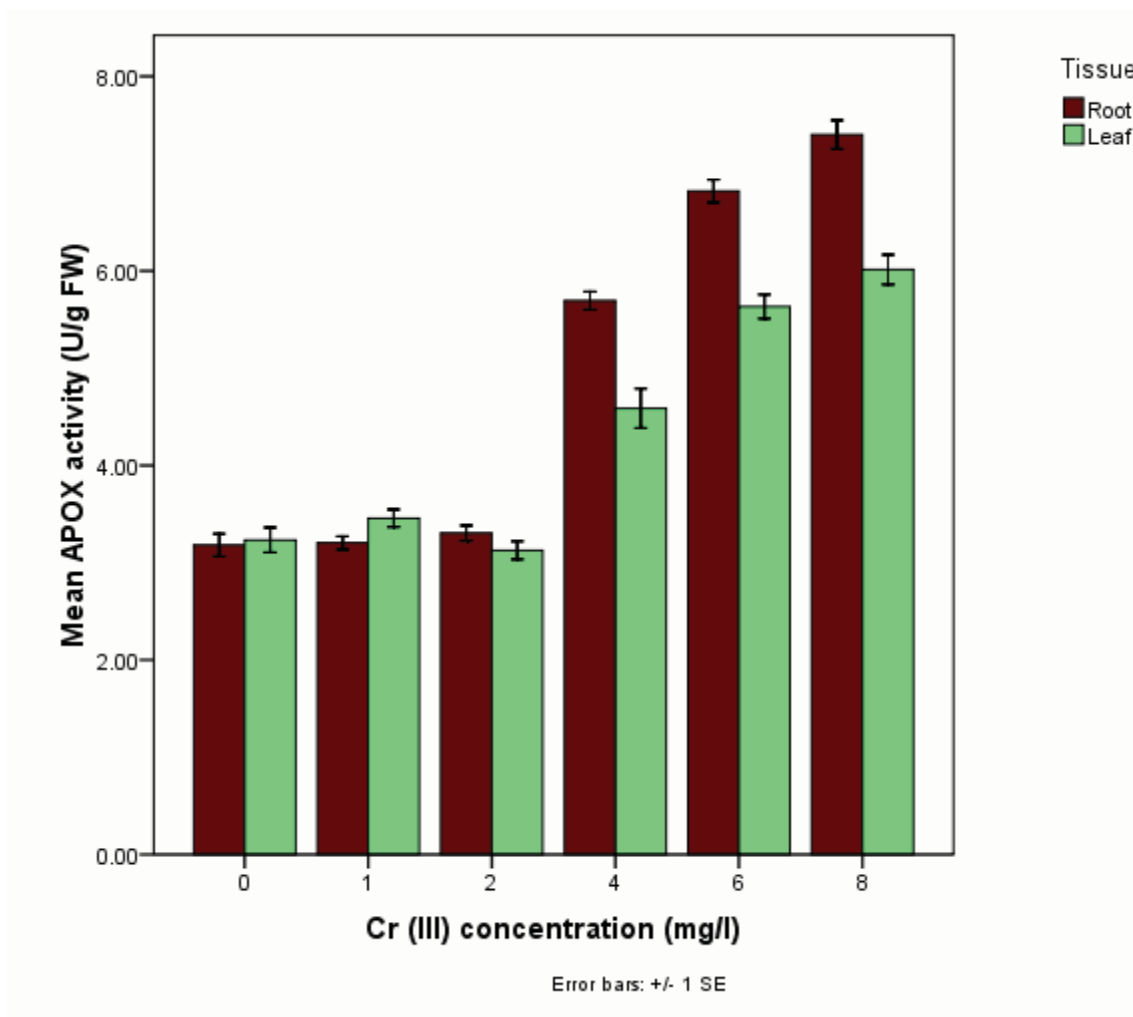
شکل ۲- اثر غلظت‌های مختلف  $Cr^{3+}$  بر فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز در بافت ریشه و برگ نشاهای گیاه ریحان (*O. basilicum*) پس از ۶ هفته تیمار ( $P < 0.05$ )

رادیکال‌های آزاد و گونه‌های اکسیژن واکنشگر از رشد گیاه ممانعت می‌کنند که به صورت آسیب اکسیداتیو بر ساختارهای سلولی از طریق اختلال در عملکرد و ساختار اجزای سلولی جلوه‌گر می‌گردد (۲۸ و ۳۰). بطور کلی ماکرومولکول‌های لیپیدی، بویژه لیپیدهای غیراشباع نسبت به اکسیداسیون توسط ROS حساس هستند، بنابراین، حضور سطوح افزایش یافته MDA بعنوان محصول پراکسیداسیون لیپیدی، معرف تنش شدید اکسیداتیو در نظر گرفته می‌شود (۴، ۷، ۱۷ و ۴۰). سیستم دفاعی گیاه برای حذف یا کاهش اثرات زیان‌آور تنش‌های اکسیداتیو ناشی از فلزات سنگین مانند آسیب غشاهای سلولی و تغییرات فراساختمانی در اندامکها و اختلال در فعالیت‌های متابولیکی (۳۷) با مکانیزم‌های آنزیمی و غیر آنزیمی، رادیکال‌های آزاد تولید شده را می‌روید (۱۱). آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان شامل سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، آسکوربات پراکسیداز (APOX)، گایاکول پراکسیداز (GPOX)، پلی‌فنل اکسیداز (PPOX)، کاتالاز (CAT) و گلوتاتیون روکتاز (GR) هستند (۴۴). کروم یک فلز سنگین است و

میزان MDA در گیاه *Brassica juncea* تحت تنش فلزسنگین  $Cd^{2+}$  افزایش یافت بطوریکه در غلظت  $200 \mu mol L^{-1} Cd^{2+}$  افزایش معنی‌دار ۳۴٪ درصد نسبت به شاهد نشان داد (۷). افزایش میزان MDA در دو گونه سیب‌زمینی *S. stoloniferum*، *S. bulbosum* نیز با افزایش تنش شوری  $NaCl$  ۱۲۰، ۸۰، ۴۰ mM گزارش شد (۸). در مطالعه تأثیر کروم بر گیاه *Pistia stratiotes* نیز میزان MDA در تنش  $1 \mu M Cr^{6+}$ ، ۱۶۰، ۸۰، ۴۰، ۱۰ افزایش یافت (۳۷). همچنین نتایج پژوهش حاضر در نشاهای گیاه *O. basilicum* نشان داد که سطوح پراکسیداسیون لیپیدی بر حسب غلظت MDA در بافت ریشه نسبت به برگ بیشتر بود که می‌توان علت آنرا، سمیت بیشتر فلز سنگین کروم در غلظت‌های تنشی برای بافت ریشه گیاه بیان نمود. همچنین میزان (MDA) مالون دی‌آلدئید در تیمارهای  $1 mg L^{-1} Cr^{3+}$  و  $2 mg L^{-1} Cr^{3+}$  برای نشاهای گیاه *O. basilicum* نسبت به شاهد یکسان بود، بنابراین، غلظت‌های  $1 mg L^{-1} Cr^{3+}$  و  $2 mg L^{-1} Cr^{3+}$  برای نشاهای گیاهی مذکور اثر تنشی نداشته‌اند. فلزات سنگین از طریق ایجاد

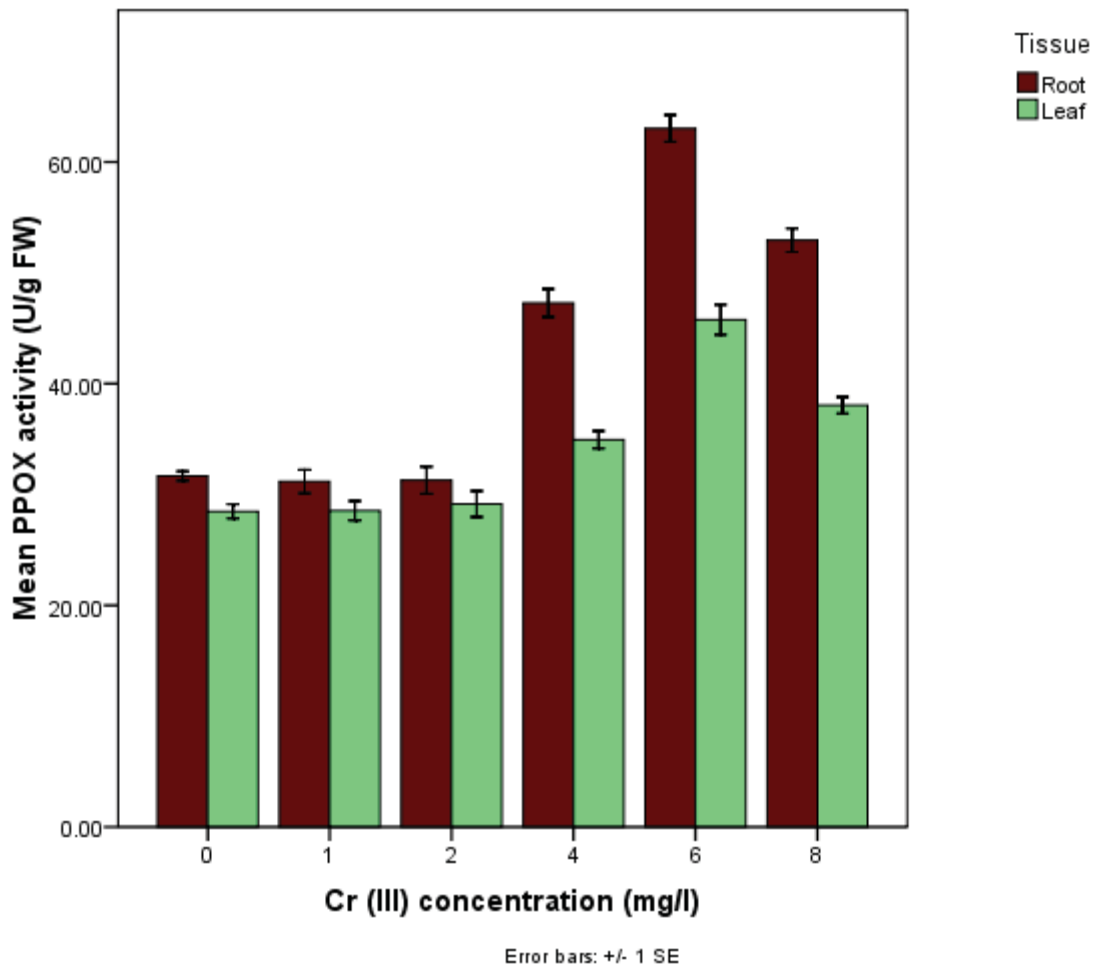
را بروبند و سلولها را از آسیبهای اکسیداتیو محافظت نمایند. ماهیت و گسترش دامنه تولید ROS توسط یک عنصر فلزی خاص اساساً به ویژگی ردوکس یا غیرردوکس فلز مربوطه بستگی دارد. فلزات ردوکس مانند Cu و Fe از طریق واکنشهای فنتون، ROS سمی تولید می کنند. تحقیقات، مشارکت Cr در واکنشهای فنتون یا ردوکس را نیز نشان داده است (۳۹). پاسخ آنزیمهای آنتی اکسیدان نسبت به تنشهای فلزی در گونههای مختلف گیاهی متفاوت است و بستگی به ماهیت و ویژگی شیمیایی فلز مربوطه دارد (۲۱). توانایی گیاهان در متابولیزه کردن ROSها و کاهش سمیت آنها تا حد زیادی بستگی به القای فعالیت آنتی اکسیداتیو آنزیمهای SOD، APOX و PPOX دارد.

غلظت های تنشی آن می تواند سبب تولید گونههای واکنشگر اکسیژن مانند  $H_2O_2$ ،  $O_2^{\cdot-}$ ،  $OH^{\cdot}$  شود که موجب آسیب اکسیداتیو در باخته های گیاهان می گردد (۲۳، ۲۵ و ۲۷). ROSها بعنوان محصولات حدواسط بسیاری از واکنشهای متابولیکی در اندامکهای مختلف سلولی گیاهان مانند کلروپلاستها، میتوکندریها، میکروبادیها، شبکه اندوپلاسمی و غشاء پلاسمایی در شرایط تنش اکسیداتیو ایجاد می شوند. سطوح تنش اکسیداتیو در سلولها توسط مقادیر رادیکالهای  $O_2^{\cdot-}$  و  $OH^{\cdot}$  و نیز  $H_2O_2$  تعیین می شود (۱۱). در اغلب موجودات هوازی ضرورت حذف ROS ایجاد شده در تنشهای محیطی از جمله تنشهای فلزی وجود دارد و یاخته های گیاهی سیستمهای دفاعی آنتی اکسیدان را تجهیز می کنند تا ROSها



شکل ۳- اثر غلظت های مختلف  $Cr^{3+}$  بر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در بافت ریشه و برگ نشاهای گیاه ریحان (*O. basilicum*) پس از ۶ هفته تیمار ( $P < 0.05$ )





شکل ۴- اثر غلظت‌های مختلف  $Cr^{3+}$  بر فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در بافت ریشه و برگ نشاهای گیاه ریحان (*O. basilicum*) پس از ۶ هفته تیمار ( $P < 0/05$ )

بوسیله  $H_2O_2$  تولیدشده در کده‌های مختلف سلولی توسط دیسموتاسیون رادیکال‌های سوپراکسید توجیه می‌شود (۴۵). با افزایش غلظت کروم ( $Cr^{6+}$  ۱۰۰، ۸۰، ۴۰ و ۱۰  $\mu M$ ) فعالیت آنزیم SOD در نشاهای *Pistia stratiotes* نیز افزایش یافت و در بالاترین غلظت کروم از فعالیت آنزیم مذکور کاسته شد (۳۶). همچنین پژوهشی دیگر بر روی نشاهای *Brassica chinensis* تیمارهای  $Cd^{2+}$  ۲۵، ۵  $\mu M$  سبب افزایش معنی‌داری در فعالیت آنزیم SOD گردید و در تیمارهای تنش  $Cd^{2+}$  ۱۰۰، ۵۰  $\mu M$  از فعالیت آنزیم مذکور کاسته شد (۷). در مطالعه‌ای که بر روی نشاهای ۷ روزه *Vigna mungo* انجام شد، فعالیت آنزیم SOD در تیمار  $Cr^{3+}$  ۱۰۰  $\mu M$  نسبت به شاهد با گذشت زمان بطور معنی‌داری افزایش یافت (۱۷). در بررسی اثر تنش شوری بر سه گونه سیب‌زمینی وحشی، فعالیت آنزیم SOD در هر سه گونه بطور معنی‌داری افزایش یافت (۸). افزایش فعالیت آنزیم SOD در ژنوتیپ‌های *Zea mays* تحت تنش شوری (۳) و افزایش فعالیت SOD در شرایط تنش شوری و سمیت

در پژوهش حاضر نیز جهت بررسی نقش آنتی‌اکسیداتیو و مکانیزم‌های مربوطه در گیاه *O. basilicum* تحت تنش  $Cr$  فعالیت آنزیم‌های SOD، APOX و PPOX مورد ارزیابی قرار گرفت. افزایش فعالیت آنزیم SOD بعنوان اولین مکانیزم دفاعی آنتی‌اکسیدان در سلول گیاهی در نظر گرفته می‌شود که دیسموتاسیون رادیکال  $O_2^{\cdot-}$  به  $H_2O_2$  و  $O_2$  را بعهده دارد (۱). در تحقیق حاضر افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم SOD در نشاهای *O. basilicum* در معرض تیمارهای  $Cr^{3+}$  ۴۶ و ۸  $mg L^{-1}$  نسبت به شاهد مشاهده شد ( $P \leq 0/01$ ). افزایش فعالیت آنزیم SOD در نشاهای خردل *juncea* *Brassica* در غلظت‌های ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۰  $\mu M$  کروم گزارش شد، البته در برخی از ژنوتیپ‌های *Brassica juncea* در بالاترین غلظت یعنی ۱۰۰  $\mu M$   $Cr$  از فعالیت آنزیم SOD نسبت به تیمار ۵۰  $\mu M$  کاسته شد (۹) و فعالیت پایین آنزیم SOD در بالاترین غلظت  $Cr$  در برخی ژنوتیپ‌های گیاه خردل بعنوان غیرفعال‌سازی آنزیم SOD

در تیمارهای  $Cd^{2+}$   $5$  و  $25$   $\mu mol L^{-1}$  و در برخی ژنوتیپ‌های گیاه *Brassica juncea* در تیمارهای  $100$   $\mu M Cr^{6+}$ ،  $50$ ،  $25$ ،  $10$  (۹) همچنین افزایش فعالیت APOX در وارپته‌ای از سرخس *Azolla* تحت تنش شوری (۲۰)، افزایش فعالیت آنزیم APOX و GPOX در نشاهای *Lycopersicon esculentum* تحت تنش خشکی (۴) و افزایش فعالیت PPOX در گیاه فلفل *Capsicum annum* تحت تنش UV-A و UV-B و UV-C نیز (۱۹) گزارش شده است. افزایش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز بعنوان بخشی از پاسخ آنتی‌اکسیدانی سلول های گیاهی در مقابل  $H_2O_2$  می‌باشد، همچنین این آنزیم پراکسیداز مهم‌ترین روبنده  $H_2O_2$  به شمار می‌رود که هم در سیتوسل و هم در کلروپلاست‌ها وجود دارد (۱ و ۱۱). به عنوان نتیجه نهایی؛ افزایش میزان MDA و فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان (APOX، SOD، PPOX) اثر تنشی  $Cr^{3+}$  در غلظت های بیش از ۴ میلی گرم بر لیتر و واکنش سم زدایی سلول های گیاهی در تیمار تنشی مذکور را نشان داد.

بور در گیاه *Spinacia oleacea* (۱۰) و نیز در تنش خشکی در نشاهای گوجه فرنگی *Lycopersicon esculentum* (۴) نیز گزارش شده است. افزایش فعالیت آنزیم SOD ممکن است بعلت سنتز ملکولی پروتئین‌های آنزیمی باشد (۹). محصول فعالیت آنزیم SOD، پراکسید هیدروژن است که برای یاخته‌های گیاهی یک ماده سمی است و توسط آنزیم کاتالاز بی‌اثر می‌شود، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان دیگر شامل آسکوربات پراکسیداز و پلی‌فنل اکسیداز نیز  $H_2O_2$  را به آب و اکسیژن ملکولی کاتالیز می‌کنند (۳). در پژوهش حاضر، نتایج حاصل از آنالیز داده‌ها افزایش معنی دار فعالیت APOX و PPOX در تیمارهای  $Cr^{3+}$   $8$ ،  $6$ ،  $4$  را در ریشه و برگ نشاهای گیاه *Ocimum basilicum* نشان داد ( $P \leq 0.01$ ) و در تأیید آن، یافته‌های سایر پژوهش‌ها قابل بررسی است، از جمله افزایش فعالیت آسکوربات پراکسیداز در نشاهای گیاه *Pistia stratiotes* در تیمارهای  $Cr^{6+}$   $160$ ،  $80$ ،  $40$  و  $10$  (۳۶)، در نشاهای *Vigna mungo* در تیمار  $Cr^{3+}$   $100$  (۱۷)، در نشاهای گیاه *Brassica*

## منابع

- 1- Alscher R.G., Erturk N., and Heath L.S. 2002. Role of superoxide dismutase (SOD) in controlling oxidative stress in plants. J. Exp. Bot.,53: 1331-1341.
- 2- Asada K. 1997. Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses, ed. JG Scandalios, New York: Cold spring Harbor Lab. Press.
- 3- Azevedo Neto A.D., Prisco J.T., Eneas Filho J., De Abreu C.E.B., and Gomes Filho E. 2006. Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt tolerant and salt-sensitive maize genotypes. Environ. Exp. Bot.,56: 87-94.
- 4- Behnamnia M., Manouchehri Kalantari K., and Ziaie J. 2009. Effects of brassinosteroid on the induction of biochemical changes in *Lycopersicon esculentum* under drought stress. Turk. J.Bot.,33: 417-428.
- 5- Borsanio O., Valpuesta V., and Botella M.A. 2001. Evidence for a role of salicylic acid in the oxidative damage generated by NaCl and osmotic stress in Arabidopsis seedlings. Plant Physiol., 26: 1024-1030.
- 6- Breusegem F.V., James F., Dat D., and Inze D. 2001. The role of active oxygen species in plant signal transduction. Plant Sci.,161: 423-431.
- 7- Chen L.Q., Guo Y.F., Yang L.M., and Wang Q.Q. 2008. Synergistic defensive mechanism of Phytochelatin and antioxidative enzymes in *Brassica chinensis* L. against Cd stress. Chinese Science Bulletin, 53:1503-1511.
- 8- Daneshmand F., Arvin M.J., and Manouchehri Kalantari K. 2010. Physiological response to NaCl stress in three wild species of potato in vitro. Acta Physiol. Plant.,32:91-101.
- 9- Diwan H., Ahmad A., and Iqbal M. 2008. Genotypic variation in the phytoremediation potential of Indian mustard for chromium. Environmental Management,41: 734-741.
- 10- Eraslan F., Ina A.L., Pilbeam D.J., and Gunes A. 2008. Interactive effect of salicylic acid and silicon on oxidative damage and antioxidant activity in spinach (*Spinacia oleacea* L.) grown under boron toxicity and salinity. Plant Growth Regul.,55: 207-219.
- 11- Foyer C.H., and Nocter G. 2003. Redox sensing and signaling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. Physiol. Plant.,119:355-364.
- 12- Giannopolitis C.N., and Ries S.K.1977. Superoxide dismutase. 1. Occurrence in higher plants. Plant Physiol.,59: 309-314.
- 13- Han F.X., Maruthi Sridhar B.B., Monts D.L., and Su Y. 2004. Phytoavailability and toxicity of trivalent and hexavalent chromium to *Brassica juncea*. New phytologist, 162: 489-499.
- 14- Heath R.L., and Packer L. 1969. Photoperoxidation in isolated chloroplast, 1. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Arch Bioche.Biophys.,125: 189-198.
- 15- Juarez A.B., Barsanti L., Passarelli V., Evangelista V., Vesentini N., Conforti V., and Gualtieri P. 2008. In vivo microspectroscopy monitoring of chromium effects on the photosynthetic and photoreceptive apparatus of *Eudorinaunicocca* and *Chlorella kessleri*. J. Environ.Monitor.,10: 1313-1318.
- 16- Jun R., Ling T., and Guanghuz Z. 2009. Effects of chromium on seed germination, root elongation and coleoptiles growth in six pulses. Int. J.Enviro. Sci. Tech.,6: 571-578.



- 17- Karuppanapandian T., and Manoharan K. 2008. Uptake and translocation of tri- and hexa- valent chromium and their effects on black gram (*Vigna mungo* L.) roots. Journal of Plant Biology, 51: 192-201.
- 18- Karuppanapandian T., Pritam B.S., Kamarul Haniya A., and Manoharan K. 2009. Chromium-induced accumulation of peroxidase content, stimulation of antioxidative enzymes and lipid peroxidation in green gram (*Vigna radiate* L. cv. Wilczek) leaves. Afr. J. Biotechnol., 8: 475-479.
- 19- Mahdavian K., Ghorbanli M., and Manouchehri Kalantari K. 2008. The effects of ultraviolet radiation on the contents of chlorophyll, flavonoid, anthocyanin and prolin in *Capsicom annum*. Turk. J. Bot., 32: 25-33.
- 20- Masood A., Shab N.A., Zeeshan M., and Abraham G. 2006. Differential response of antioxidant enzyme to salinity stress in two varieties of Azolla (*Azolla pinnata* and *Azolla filiculcides*). Environ. Exp. Bot., 58: 216-222.
- 21- Mazhoudi S., Chaoui A., Ghorbal M.H., and Ferjani E.E. 1997. Response of antioxidant enzymes to excess copper in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). Plant Sci., 127: 129-137.
- 22- Mei B., Puryear J.D., and Newton R.J. 2002. Assessment of Cr tolerance and accumulation in selected plant species. Plant and Soil, 247: 223-231.
- 23- Panda S.K. and Patra H.K. 1997. Physiology of chromium toxicity in plants. A review. Plant Physiol. Biochem., 24: 10-17.
- 24- Panda S.K., and Patra H.K. 1998. Alteration of nitrate reductase activity by chromium ions in excised wheat leaves. Int. J. Agric. Biochem., 2: 56-57.
- 25- Panda S.K. and Patra H.K. 2000. Does Cr (III) produce oxidative damage in excised wheat leaves? J. Plant Biol., 27: 105-110.
- 26- Panda S.K., Chaudhury I., and Khan M.H. 2003. Heavy metals induce lipid peroxidation and affects antioxidants in wheat leaves. Biol. Plant., 46: 289-294.
- 27- Panda S.K., and Choudhury S. 2005. Chromium stress in plants. Braz. J. Plant Physiol., 17: 95-102.
- 28- Pandey V., Dixit V., and Shyam R. 2005. Antioxidative responses in relation to growth of mustard (*Brassica juncea*) plants exposed to hexavalent chromium. Chemosphere, 61: 40-47.
- 29- Parmer N.G., and Chanda S.V. 2005. Effects of mercury and chromium on peroxidase and IAA oxidase enzymes in the seedlings of *Phaseolus vulgaris*. Turk. J. Biol., 29: 15-21. .
- 30- Quershi M.I., Israr M., Abdin M.Z., and Iqbal M. 2005. Responses of *Artemisia annua* L. to lead and salt induced oxidative stress. Environmental and Experimental Botany, 53: 185-193.
- 31- Raymond M., Poulin E., Boirox V., Dupont E., and Pasteur N. 1993. Stability of insecticide resistance due to amplification of esterase genes in *Cluex pipiens*. Heredity, 70: 301-307.
- 32- Shanker A.K., and Pathmanabhan G. 2004. Speciation dependant antioxidative response in roots and leaves of *Sorghum bicolor* L. under Cr (III) and Cr (VI) stress. Plant Soil, 265: 141-151.
- 33- Shanker A.K., Djanaguiraman M., and Venkateswarlu B. 2009. Chromium interactions in plants: current status and future strategies. Metallomics, 1: 375-383.
- 34- Singh S., Saxena R., Pandey K., and Sinha S. 2004 a. Translocation of metals and effects in the plant of tomato grown on various amendments of tannery wastes: evidence for involvement of antioxidants. Chemosphere, 57: 91-99.
- 35- Singh S., Saxena R., Pandey K., Bhatt K., and Sinha S. 2004 b. Response of antioxidants in *Helianthus annuus* L. grown different amendments of tannery sludge: Its metal accumulation potential. Chemosphere, 57: 1663-1673.
- 36- Sinha S., Saxena R., and Singh S. 2005. Chromium induced lipid peroxidation in the plants of *Pistia stratiotes* L.: role of antioxidants and antioxidant enzymes. Chemosphere, 58: 595-604.
- 37- Sinha S., Basant A., Malik A., and Singh K. 2009. Multivariate modeling of chromium- induced oxidative stress and biochemical changes in plants of *Pistia stratiotes* L. Ecotoxicology, 18: 555-556.
- 38- Srivastava S., and Thakur I.S. 2006. Evaluation of bioremediation and detoxification potentiality of *Aspergillus niger* for removal of hexavalent chromium in soil microcosm. Soil Biol. Biochem., 38: 1904-1911.
- 39- Strile M., Kolar J., Selih V.S., Kocar D., and Pihlar B. 2003. A Comparative study of several transition metals in Fenton like reaction system at circumneutral PH. Acta Chin. Slov., 50: 619-632.
- 40- Terzi R., Saglam A., Kutlu N., Nar H., and Kadioglu A. 2010. Impact of soil drought stress on photochemical efficiency of photosystem and antioxidant enzyme activities of *Phaseolus vulgaris* cultivars. Turk. J. Bot., 34: 1-10.
- 41- Subrahmanyam D. 2008. Effects of chromium toxicity on leaf photosynthetic characteristics and oxidative changes in wheat (*Triticum eastivum* L.). Photosynthetica, 46: 339-345.
- 42- Vangronsveld J., and Clijsters H. 1994. Toxic effects of metals. In: Plants and the Chemical Elements: Biochemistry, Uptake, Tolerance and Toxicity. Edited by M.E. Farago, Wienheim.
- 43- Venkateswaran P., Vellaichamy S., and Palanivelu K. 2007. Speciation of heavy metals in electroplating industry sludge and wastewater residue using inductively coupled plasma. Int. J. Environ. Sci. Tech., 4: 497-504.
- 44- Vranova E., Inze D., and Breusegem V.F. 2002. Signal transduction during oxidative stress. J. Exp. Bot., 53: 1227-1236.
- 45- Yordanova R.Y., Christov K.N., and Popova L.P. 2004. Antioxidative enzyme in barley plants subjected to soil flooding. Environ. Exp. Bot., 51: 93-101.