١١٠٧٣٢

۸۷/۱/۱۰۶۷/۸۰
۸۷_۱۲۲۶

بررسی اثرات فیزیولـوژیکی و بیوشیمیـایی سمیت مس بر دانه رست های ذرت (Zea mays)

لطیفـه پوراکبـر

دانشـکده علـوم

گروه زیست شناسی

۱۳۸٦

پایان نامه برای دریافت درجه دکترا

۱۳۸۷ /۱۲/ ۲۱

اساتید راهنما:

دکتر مسعود خیامی

دکتر جلیل خارا

و

دکتر طیبه فربودنیا

۱۱۰۷۳۲

پایان نامه خانم لطیفه پوراکبر به تاریخ ۱۳۸٦/۱۲/۸ به شماره ۳۳-۱ مورد پذیرش هیات محترم داوران با رتبه عالی و نمره ۱۹/۵ قرار گرفت.

۱- استاد راهنما و رئیس هیئت داوران: آقای دکتر مسعود خیامی

۲- استاد راهنمای دوم: آقای دکتر جلیل خارا

۳- استاد راهنمای سوم: خانم دکتر طیبه فربودنیا

٤- داور خارجی: آقای دکتر مهدی تاجبخش

خانم دکترمه لقا قربانلی

۵- داور داخلی: آقای دکتر رضا حیدری

آقای دکتر احمد محمودزاده

٦- نماینده تحصیلات تکمیلی: آقای دکتر لطفعلی ناصری

تقدیم به:

پدر و مادر عزیزم

آنهایی که نگاه شان بی همتاترین است در عشق ورزیدن

و

بی شائبه ترین محبت ها را نثارم کرده اند.

تقدیم به:

برادران و خواهران عزیزم

که وجودشان شادی بخش و صفایشان مایه آرامش من است.

تقدیم به:

همسر عزیزم

که با صبر و فداکاری بی دریغش، سختی های این مرحله را بر من آسان گرداند.

تقدیم به:

پسر عزیزم پوریا

که بهار و طراوت زندگی من از اوست.

سپاس و تشکر

شکر بیکران یگانه هستی بخش را که هر چه هست از اوست و بی لطف و یاری او هیچ تلاشی را آغاز و پایانی نیست.

اکنون که به یاری خداوند منان توفیق تحقیق و تنظیم این پایان نامه را یافته ام بر خود لازم می دانم که از رهنمودهای صمیمانه اساتید راهنمای محترم آقای دکتر خیامی، آقای دکتر خارا و خانم دکتر فربودنیا سپاسگزاری و قدر دانی نمایم.

در نهایت مراتب سپاس بی پایان خود را به حضور خانواده گرامیم بالاخص پدر، مادر، همسر و فرزند عزیزم که در تمام طول زندگی لحظه ای از محبت و کمک خود در حق من دریغ ننموده اند تقدیم می نمایم.

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
فصل اول : کلیات	۱-۱۶
فلزات سنگین	۱
فلزات کمیاب در گیاهان	۲
جذب	۳
انتقال	٤
مسمومیت ناشی از فلزات سنگین در گیاه	٦
مس	۷
کمبود مس در گیاهان	۸
سمیت مس در گیاهان	۹
اختصاری از مکانیسم های مقاومت به مس	۱۲
مکانیسم های سلولی برای سمیت زدایی و تحمل فلزات سنگین	۱٤
فصل ۲ : روشها	۱۷-۳۲
اصول اولیه آزمایشات	۱۷
اندازه گیری سطح برگ	۱۸
اندازه گیری حجم ریشه	۱۸
تعیین پرولین در دانه رستهای ذرت	۱۸
اندازه گیری پروتئین محلول	۱۸
روش اندازه گیری پروتئین محلول با روش فولن ـ لوری	۱۸

عنوان	صفحه
اندازه گیری پروتئین کل	۲۰
اندازه گیری قندهای محلول	۲۰
اندازه گیری فعالیت آلفا آمیلاز	۲۰
اندازه گیری فعالیت آنزیم اکسین اکسیداز	۲۱
اثر متقابل مس و هورمون اکسین بر روی گیاهچه های ذرت	۲۲
اثر مسمومیت مس بر پایداری غشاءسلولی	۲۲
اندازه گیری میزان K^+ نشت یافته به محیط کشت	۲۲
اندازه گیری قندهای نشت یافته به محیط کشت	۲۲
اندازه گیری مرگ سلولی	۲۳
اندازه گیری میزان H_2O_2 در گیاهان تحت تیمار مس	۲۳
اندازه گیری میزان پراکسیداسیون چربی ها	۲٤
طرز تهیه عصاره گیاهی جهت تعیین میزان فعالیت آنزیم ها	۲٤
اندازه گیری فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز(APX)	۲۵
اندازه گیری فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز(GPX)	۲۵
اندازه گیری فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT)	۲۵
اندازه گیری فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز(GR)	۲٦
اندازه گیری میزان رنگیزه ها	۲٦
اندازه گیری واکنش هیل	۲۷
اندازه گیری محتوای آمینو اسید های آزاد	۲۷
اندازه گیری تیول های غیر پروتئینی (NPT)	۲۸
اندازه گیری محتوای نتیرات	۲۸
اندازه گیری فعالیت آنزیم نتیرات ردوکتاز	۲۹

عنوان	صفحه
بررسی اثر مس بر روی ساختار ریشه ذرت به وسیله میکروسکوپ نوری	۲۹
بررسی اثر مس بر تقسیم میتوز ریشه ذرت	۳۰
بررسی اثر متقابل مس و EDTA بر ذرت	۳۰
بررسی اثر متقابل مس و کلرید کلسیم بر ذرت	۳۰
بررسی اثر متقابل مس و دو نسبت متفاوت Ca/Mg بر ذرت	۳۱
بررسی اثر متقابل مس و سیتریک اسید بر ذرت	۳۱
بررسی اثر متقابل مس و مالیک اسید بر ذرت	۳۱
اندازه گیری عناصر	۳۲
برنامه های رایانه ای مورد استفاده	۳۲
فصل سوم: بررسی نتایج	۳۳
۱-۳- نتایج اثر غلظت های مختلف مس بر سطح برگ، حجم ریشه،طول و وزن خشک	۳۳
۲-۳- نتایج اثر غلظت های مختلف مس بر پروتئین محلول و کل	۳۷
۳-۳- نتایج اثر غلظت های مختلف مس بر قندهای محلول	۳۹
٤-۳- نتایج تاثیر مس برمیزان نشت یون K^+	٤۰
٥-۳- نتایج تاثیر مس بر میزان قندهای محلول نشت یافته به محیط کشت	٤۱
٦-۳- نتایج اثر غلظت های مختلف مس بر روی میزان مرگ سلولی	٤۲
۷-۲- نتایج اثر غلظت های مختلف مس بر فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز	٤۳
۸-۳- نتایج تاثیر مس بر فعالیت آنزیم اکسین اکسیداز	٤٤
۹-۳- نتایج تاثیر متقابل مس و هورمون اکسین(IAA)	٤٥
۱۰-۳- نتایج اثر غلظت های مختلف مس بر میزان H_2O_2	٤٦

عنوان	صفحه
۱۱-۳- نتایج اثر غلظت های مختلف مس بر میزان پراکسیداسیون چربی ها	٤٧
۱۲-۳- نتایج اثر غلظت های مختلف مس بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز	٤٨
۱۳-۳- نتایج اثر غلظت های مختلف مس بر میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز	٤٩
۱٤-۳- نتایج اثر غلظت های مختلف مس بر میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز	٥٠
۱٥-۳-نتایج اثر غلظت های مختلف مس بر میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز	٥١
۱٦-۳- نتایج اثر غلظت های مختلف مس بر میزان آمینو اسیدهای آزاد	٥٢
۱۷-۳- نتایج اثر غلظت های مختلف مس بر میزان تیول های غیر پروتئینی	٥٢
۱۸-۳- نتایج اثر غلظت های مختلف مس بر محتوای نیترات	٥٣
۱۹-۳- نتایج اثر غلظت های مختلف مس بر فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز	٥٤
۲۰-۳- نتایج اثر غلظتهای مختلف مس بر محتوای رنگیزه	٥٥-٥٦
۱-۲۰-۳- نتایج اثر غلظت های مختلف مس بر میزان کلروفیل	٥٥
۲-۲۰-۳- نتایج اثر غلظت های مختلف مس بر میزان کاروتنوئید کل	٥٦
۲۱-۳- نتایج اثر مس بر واکنش هیل	٥٧
۲۲-۳- نتایج اثر مس برساختار ریشه به وسیله میکروسکوپ نوری	٥٨-٦١
۲۳-۳- نتایج تاثیر مس بر تقسیم میتوز سلول های ریشه	٦٢
۲٤-۳- نتایج اثر مس بر میزان عناصر	٦٤
۲٥-۳- نتایج اثر متقابل مس وEDTA	٦٥
۲٦-۳- نتایج اثر متقابل مس وسیتریک اسید	٧٠
۲۷-۳- نتایج اثر متقابل مس ومالیک اسید	٧٤
۲۸-۳- نتایج اثر متقابل مس و کلرید کلسیم	٧٨
۲۹-۳- نتایج اثر متقابل مس و Ca/Mg=٤	٨٣
۳۰-۳- نتایج اثر متقابل مس و Ca/Mg=٣	٨٧

عـــنـــوان	صفحه
فصل چهارم: بحث و نتیجه گیری	۹۲-۱۰۵
فصل پنجم: ضمایم	۱۰۶-۱۱۵
فهرست منابع	۱۱۶-۱۲۶

فهرست اشکال، نمودارها و جدول ها

شماره اشکال	موضوع	صفحه
۱-۱	مکانیسم های ملکولی که در انتقال و تجمع فلزات	۵
۱-۲	فا کتورهای محیطی که تولید اکسیژن فعال	٦
۱-۳	محل های سمی مس در فتوسیتم II گیاهان	۱۰
۱-٤	تولید ROS بوسیله فلزات سنگین	۱۱
۱-۵	مکانیسم های مقاومت به سمیت مس	۱۵
۱-٦	مکانیسم های دخیل در حذف سمیت رادیکال های آزاد اکسیژن در طی تنش های زیستی و غیر زیستی	۱٦
۳-۱	تاثیر غلظت های مختلف مس بر ظاهر برگ ذرت	۳٦
۳-۲	تاثیر غلظت های مختلف مس بر طول ریشه ذرت	۳٦
۳-۳	تاثیر غلظت های مختلف مس بر ظاهر برگ ذرت	۳۷
۳-٤	ساختار ریشه در نمونه شاهد	۵۹
۳-۵	ساختار استیل ریشه در نمونه شاهد	۵۹
۳-٦	ساختار ریشه در نمونه تحت تیمار مس	٦۰

شماره اشکال	موضوع	صفحه
۳-۷	ساختار استیل ریشه در نمونه تحت تیمار مس	٦٠
۳-۸	نحوه ایجاد ریشه فرعی در گیاهان تحت تیمار مس	٦١
۳-۹	تقسیم میتوز در گیاهان شاهد و تحت تیمار مس	٦٣

شماره نمودار	موضوع	صفحه
۳-۱	تغییرات سطح برگ در غلظت های مختلف Cu	٣٤
۳-۲	تغییرات حجم ریشه در غلظت های مختلف Cu	٣٤
۳-۳	تغییرات طول ریشه و اندام هوایی	٣٥
۳-٤	تغییرات وزن خشک ریشه و اندام هوایی	٣٤
۳-٥	تغییرات پروتئین محلول ریشه و اندام هوایی	٣٨
۳-٦	تغییرات پروتئین کل ریشه و اندام هوایی	٣٨
۳-۷	تغییرات قندهای محلول ریشه و اندام هوایی	٣٩
۳-۸	تغییرات K^+ نشت یافته به محیط کشت	٤٠
۳-۹	تغییرات قندهای محلول نشت یافته به محیط کشت	٤١
۳-۱۰	تغییرات مرگ سلولی	٤٢
۳-۱۱	تغییرات فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز	٤٣
۳-۱۲	تغییرات فعالیت آنزیم اکسین اکسیداز	٤٤
۳-۱۳	تاثیر متقابل غلضت های مختلف مس و اکسین بر رشد طولی ریشه	٤٥
۳-۱٤	تغییرات میزان H_2O_2	٤٦
۳-۱٥	تغییرات میزان MDA	٤٧
۳-۱٦	تغییرات میزان فعالیت آنزیم کاتالاز	٤٨
۳-۱۷	تغییرات میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز	٤٩

شماره نمودار	موضوع	صفحه
۳-۱۸	تغییرات میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز	۵۰
۳-۱۹	تغییرات میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز	۵۱
۳-۲۰	تغییرات میزان آمینو اسید های آزاد	۵۲
۳-۲۱	تغییرات میزان تیول های غیر پروتئینی	۵۳
۳-۲۲	تغییرات میزان محتوای نیترات	۵٤
۳-۲۳	تغییرات میزان فعالیت انزیم نیترات ردوکتاز	۵۵
۳-۲٤	تغییرات میزان کلروفیل a و b	۵٦
۳-۲۵	تغییرات میزان کاروتنوئید کل	۵۷
۳-۲٦	تغییرات واکنش هیل	۵۸
۳-۲۷	تغییرات تعداد سلول های در حال تقسیم میتوز	٦۲
۳-۲۸	اثر توام مس و EDTA بر وزن خشک ریشه	٦۳
۳-۲۹	اثر توام مس و EDTA بر رشد طولی ریشه	٦٤
۳-۳۰	اثر توام مس و EDTA بر نشت یون پتاسیم	٦٤
۳-۳۱	اثر توام مس و سیتریک اسید بر وزن خشک ریشه	۷۲
۳-۳۲	اثر توام مس و سیتریک اسید بر رشد طولی ریشه	۷۲
۳-۳۳	اثر توام مس و سیتریک اسید بر نشت یون پتاسیم	۷۳
۳-۳٤	اثر توام مس و مالیک اسید بر وزن خشک ریشه	۷٦
۳-۳۵	اثر توام مس و مالیک اسید بر رشد طولی ریشه	۷٦
۳-۳٦	اثر توام مس و مالیک اسید بر نشت یون پتاسیم	۷۷
۳-۳۷	اثر توام مس و کلرید کلسیم بر وزن خشک ریشه	۸۰
۳-۲۸	اثر توام مس و کلرید کلسیم بر رشد طولی ریشه	۸۱
۳-۲۹	اثر توام مس و کلرید کلسیم بر نشت یون پتاسیم	۸۱

شماره نمودار	موضوع	صفحه
۳-۳۰	اثر توام مس و Ca/Mg=٤ بر وزن خشک ریشه	۸۵
۳-۳۱	اثر توام مس و Ca/Mg=٤ بر رشد طولی ریشه	۸۵
۳-۳۲	اثر توام مس و Ca/Mg=٤ بر نشت پتاسیم	۸٦
۳-۳۳	اثر توام مس و Ca/Mg=۳ بر وزن خشک ریشه	۸۹
۳-۳٤	اثر توام مس و Ca/Mg=۳ بر رشد طولی ریشه	۹۰
۳-۳۵	اثر توام مس و Ca/Mg=۳ بر نشت یون پتاسیم	۹۰
۵-۱	منحنی استاندارد پتاسیم	۱۰٦
۵-۲	منحنی استاندارد پرولین	۱۰۷
۵-۳	منحنی استاندارد پروتئین	۱۰۸
۵-٤	منحنی استاندارد قند	۱۰۹
۵-۵	منحنی استاندارد نشاسته	۱۱۰
۵-٦	منحنی استاندارد مس	۱۱۱
۵-۷	منحنی استاندارد آهن	۱۱۲
۵-۸	منحنی استاندارد منیزیم	۱۱۳
۵-۹	منحنی استاندارد کلسیم	۱۱٤
۵-۱۰	منحنی استاندارد نیترات	۱۱۵

جداول

شماره جدول	عنوان	صفحه
۳-۱	اثر مس بر عناصر اندام هوایی	٦٤
۳-۲	اثر مس بر عناصر در ریشه	٦٥
۳-۳	اثر متقابل مس و EDTA بر عناصر در اندام هوایی	٦٩
۳-٤	اثر متقابل مس و EDTA بر عناصر در ریشه	٦٩
۳-٥	اثر متقابل مس و سیتریک اسید بر میزان عناصر در اندام هوایی	٧٣
۳-٦	اثر متقابل مس و سیتریک اسید بر میزان عناصر در ریشه	٧٤
۳-۷	اثر متقابل مس و مالیک اسید بر میزان عناصر در اندام هوایی	٧٧
۳-۸	اثر متقابل مس و مالیک اسید بر میزان عناصر در ریشه	٧٨
۳-۹	اثر متقابل مس و کلرید کلسیم بر میزان عناصر در اندام هوایی	٨٢
۳-۱۰	اثر متقابل مس و کلرید کلسیم بر میزان عناصر در ریشه	٨٢
۳-۱۱	اثر متقابل مس و Ca/Mg=٤ بر میزان عناصر دراندام هوایی	٨٦
۳-۱۲	اثر متقابل مس و Ca/Mg=٤ بر میزان عناصر در ریشه	٨٧
۳-۱۳	اثر متقابل مس و Ca/Mg=۳ بر میزان عناصر در اندام هوایی	٩١
۳-۱٤	اثر متقابل مس و Ca/Mg=۳ بر میزان عناصر در ریشه	٩١

چکیده:

مس یک عنصر ریز مغذی ضروری در گیاهان است که در بسیاری از فرایند های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی دارای نقش اساسی است. در ضمن این که مس مازاد در بافت گیاهان تجمع می یابد که می تواند برای گیاه سمی باشد و در بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و رشد اثر بگذارد. به علت اهمیت شناسایی اثرات ناشی از مسمومیت فلزات سنگین از جمله مس در گیاهان در این تحقیق اثر غلظت های مختلف ۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میکرو مولار سولفات مس بر روی دانه رست های سه روزه ذرت در شرایط کنترل شده به مدت ۱۵ روز مورد مطالعه قرار گرفت. درپایان آزمایش ریشه و اندام هوایی دانه رست ها به طور جداگانه برداشت شد. نتایج حاصل از مطالعات نشان داد که با افزایش غلظت مس از ۲۵ به ۱۰۰ میکرو مولار طول ریشه، سطح برگ، حجم ریشه، تقسیم میتوز، وزن خشک، پروتئین محلول و کل، قند های محلول، محتوای رنگیزه ای (کلروفیل a، b و کاراتنوئیدهای کل) ، احیاء دی کلرو فنل ایندوفنل، محتوای نیترات، فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز و آلفا آمیلاز کاهش می یابد. میزان اسید آمینه های آزاد، میزان تیول های غیر پروتئینی، مرگ سلولی، آب اکسیژنه آندوژنی، مالون دی آلدئید به عنوان شاخص پراکسیداسیون چربی ها و فعالیت آنزیم اکسین اکسیداز افزایش می یابد.

همچنین مطالعات حاصل از اثر مس بر پایداری غشاء سلولی نشان داد که مس به عنوان یک فلز سنگین موجب کاهش پایداری غشاء سلولی شده و در این راستا موجب افزایش نشت K^+ و قند های محلول به محیط کشت می گردد.

فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانت که نقش به سزایی در سمیت زدایی گونه های فعال اکسیژن در سلول ها دارد در ریشه و اندام هوایی گیاه ذرت تحت تیمار مس اندازه گیری شد. فعالیت گایاگول پراکسیداز، گلوتاتیون ردوکتاز، آسکوربات پراکسیداز و کاتالاز هم در اندام هوایی و هم در ریشه ها ی گیاهان ذرت تحت تیمار مس افزایش نشان داد. بررسی ساختار ریشه به وسیله میکروسکوپ نوری نشان داد که تعداد دستجات چوب و آبکش در گیاهان تحت تیمار مس نسبت به شاهد افزایش داشت که این امر در ریشه ها موجب افزایش ریشه زایی فرعی در گیاهان تحت تیمار مس نسبت به شاهد شده بود.

نتایج حاصل از بررسی اثر مس بر میزان عناصر مس، منیزیم، آهن، کلسیم و پتاسیم در اندام هوایی و ریشه ها نشان داد که در گیاه شاهد تجمع مس و آهن در ریشه نسبت به اندام هوایی بیشتر است ولی میزان کلسیم، منیزیم و پتاسیم در ریشه نسبت به اندام هوایی کمتر است. همچنین بررسی ها نشان داد که با افزایش غلظت مس تجمع مس در گیاهان تیمار دیده نسبت گیاهان شاهد هم در اندام هوایی و هم در ریشه ها افزایش می یابد ولی میزان عناصر منیزیم، کلسیم، آهن و پتاسیم در هر دو اندام گیاهان تیمار دیده نسبت به شاهد کاهش می یابد.

اثر توام EDTA به عنوان یک شلاته کننده مصنوعی، بعضی مواد شیمیایی (کلرید کلسیم و دو نسبت مختلف کلسیم و منیزیم) و همچنین اسید های آلی سیتریک و مالیک اسید با مس بر گیاهچه های ۱۵ روزه ذرت مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج حاصل از اعمال توام مس و EDTA نشان می دهد که این ماده می تواند اثر سمیت مس را کاهش داده و میزان نشت یون پتاسیم به محیط، به عنوان شاخص آسیب غشاء، در طی اعمال فلز سنگین را کاهش و رشد طولی ریشه و وزن خشک آن را افزایش دهد. همچنین EDTA موجب تجمع بیشتر مس در ریشه گردیده و از انتقال بیشتر آن به اندام هوایی جلوگیری نموده و جذب آهن را بهبود داد.

نتایج حاصل از اعمال توام مس و اسیدهای آلی نشان می دهد که این مواد می تواند اثر سمیت مس را کاهش داده و میزان نشت یون پتاسیم به محیط، به عنوان شاخص آسیب غشاء، در طی اعمال فلز سنگین را کاهش و رشد طولی و وزن خشک ریشه را هم افزایش دهد. این اسیدها تجمع مس در اندام هوایی وریشه را افزایش می دهند ولی با کده بندی مناسب آنزیم های اساسی و بیو مولکولهای سیتوپلاسمی را از آسیب فلز سنگین مس در امان نگه می دارند و موجب بهبود جذب کلسیم (در مورد سیتریک اسید)، آهن ، منیزیم و پتاسیم می گردند. از دو اسید آلی به کار رفته سیتریک اسید اثر بیشتری در کاهش نشت یون پتاسیم، افزایش طول و وزن خشک ریشه نمایان ساخت.

نتایج حاصل از اعمال توام مس و کلرید کلسیم نشان می دهد که این ماده می تواند اثر سمیت مس را کاهش داده و میزان نشت یون پتاسیم به محیط، به عنوان شاخص آسیب غشاء، در طی اعمال فلز سنگین را کاهش و رشد طولی و وزن خشک ریشه را هم افزایش دهد.

نتایج حاصل از اعمال توام مس و دو نسبت متفاوت Ca/Mg نشان می دهد که نسبت بالای Ca/Mg می تواند اثر سمیت مس را بیشتر از نسبت پایین Ca/Mg کاهش دهد و میزان نشت یون پتاسیم به محیط، به عنوان شاخص آسیب غشاء، در طی اعمال فلز سنگین را کاهش و رشد طولی و وزن خشک ریشه بالاخص در غلظت های بالای ۵۰ میکرو مولار مس، را هم افزایش دهد.

بین سه ماده شیمیایی حاوی کلسیم، Ca/Mg = ٤ بیشترین اثر از لحاظ نشت یون پتاسیم، طول ریشه و وزن خشک را در کاهش سمیت مس نشان داد.