

تأثیر فقدان منیزیم در کاهش کارایی سازوکارهای دفاعی سلول و بروز تنش اکسیداتیو

امین عباسی*، واقف عنایتی

دانشگاه مراغه

چکیده

به منظور بررسی اثرات فقدان منیزیم، روی فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان و مرگ سلولی، رقم PGS گندم دوروم به روش هیدروپونیک در سال ۱۳۸۸ در اتاقک رشد گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه مراغه بر پایه طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار کشت شد. تیمارهای مورد مطالعه در این آزمایش شامل گیاهچه‌های شاهد $(Ca(NO_3)_2)$ ، KNO_3 ، $MgSO_4$ ، KH_2PO_4 ، $FeSO_4$ ، H_3BO_3 ، $MnSO_4$ ، $ZnSO_4$ ، $CuSO_4$ و H_2MoO_4 و فقدان منیزیم (حذف $MgSO_4$ از ترکیب غذایی از ابتدای کشت) بودند. نتایج حاصل نشان داد که فقدان عنصر منیزیم سبب افزایش تولید انواع اکسیژن فعال می‌شود. بطوریکه افزایش میزان پراکسید هیدروژن نیز بیانگر این امر می‌باشد. بعلاوه در شرایط کمبود منیزیم فعالیت آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز و گایاکول پراکسیداز و میزان کلروفیل کل نسبت به شاهد کاهش معنی‌داری نشان داد. اما فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز در شرایط عدم منیزیم افزایش معنی‌داری داشت. برآیند تغییرات مذکور احتمالاً سبب بروز تنش اکسیداتیو در داخل سلول‌های گیاهی شده و در نتیجه منجر به افزایش میزان آسیب‌های وارده به مولکول زیستی شده است. افزایش پراکسیداسیون لیپیدی و میزان مرگ سلولی این نظر را تایید کرد. همچنین نتایج این بررسی نشان داد که کاهش کارایی چرخه مهلر و گزانتوفیل و کاهش فعالیت آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز و گایاکول پراکسیداز سبب افزایش آسیب به مولکول‌های زیستی شده است. کاهش فعالیت آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز و گایاکول پراکسیداز سبب افزایش آسیب به مولکول‌های زیستی شده است. بنابراین می‌توان بیان داشت که بین فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان و پراکسیداسیون لیپیدی و مرگ سلولی یک ارتباط منفی وجود دارد.

واژه‌های کلیدی: تنش اکسیداتیو، فقدان منیزیم، سازوکارهای دفاعی سلول

مقدمه

منیزیم از جمله عناصر غذایی پر مصرف می‌باشد که نقش ویژه‌ای در فعال کردن آنزیم‌های بسیار مهمی نظیر ATP-آز، ریبولوز بی فسفات کربوکسیلاز، RNA-پلی‌مراز و پروتئین کیناز دارد (Breusegem *et al.*, 2001). آنزیم ATP-آز انرژی لازم برای بارگیری ساکارز را تامین می‌کند. امروزه مشخص شده‌است که فرم Mg-ATP کمپلکس اصلی بکارگیری ATP در سیستم‌های بیولوژیک از جمله آنزیم ATP-آز می‌باشد (Calmak and Marschner, 1992). بنابراین در اثر کمبود منیزیم عمل بارگیری و انتقال ساکارز از منبع کاهش قابل ملاحظه‌ای یافته و در نتیجه تسهیم مواد فتوسنتزی بین ریشه و اندام‌های هوایی مختل می‌شود. چاکماک و کیری (Cakmak and Kirkby, 2008) گزارش می‌کنند که تجمع ساکارز ضمن کاهش فعالیت چرخه کالوین باعث توقف بیان ژن Cab2 مسئول کد کردن پروتئین کلروفیل a و b می‌شود.

کمبود منیزیم هدایت روزنه‌ای را نیز کاهش می‌دهد (Terry and Ulrich, 1974). بعلاوه منیزیم نقش بسیار مهمی در انتقال الکترون در بین فتوسیستم‌های I و II دارد (Laing *et al.*, 2000). در طول انتقال الکترون، پروتون‌ها از استروما به فضای لومن تیلاکوئید انتقال می‌یابد که در نتیجه فضای لومن اسیدی می‌گردد. در پی این عمل شیب الکتروشیمیایی لازم جهت سنتز ATP بوجود می‌آید. امروزه مشخص شده‌است که همزمان با انتقال پروتون‌ها به لومن، منیزیم در جهت خلاف به ناحیه استروما منتقل می‌شود (Marschner, 1995- Shaul, 2002). انتقال منیزیم از لومن به استروما ضمن ایجاد

شرایط مناسب برای تولید ATP شرایط مطلوب برای فعالیت آنزیم ریبولوز بی فسفات کربوکسیلاز را فراهم می‌کند (Calmak and Marschner, 1992). کمبود منیزیم از طریق کاهش هدایت روزنه‌ای و تولید فتوآسمیلات‌ها، باعث کاهش فعالیت آنزیم رویسکو در چرخه کالوین می‌شود که برآیند آن کاهش نسبت $NADP^+/NADPH, H^+$ می‌باشد (Ort, 2001). این امر ناشی از عدم مصرف $NADPH, H^+$ در چرخه کالوین می‌باشد. به همین دلیل ناقل‌های مسیر انتقال الکترون نیز به فرم احیا در می‌آیند و نشت الکترون‌ها از زنجیره انتقال الکترون سبب احیای ناقص اکسیژن شده و افزایش تولید گونه‌های سمی اکسیژن را در پی دارد (Beak and Skinner, 2003).

منیزیم کلاتاز، آنزیمی است که در وارد نمودن منیزیم به ساختار پروتوپورفیرین IX و تبدیل آن به کلروفیل نقش دارد (Velikova *et al.*, 2000). با توجه به نقش این آنزیم و نیاز به انرژی در طی عمل آن، فرم Mg-ATP در طی این واکنش مصرف می‌گردد. کمبود منیزیم سبب کاهش فعالیت آنزیم منیزیم کلاتاز می‌شود که در طی آن پروتوپورفیرین IX در سلول‌های برگ تجمع می‌یابد. پروتوپورفیرین IX یک متابولیت سمی برای سلول‌های گیاهی است و تجمع آن سبب کلروزه شدن برگ بویژه در شدت نور بالا خواهد شد (Calmak and Marschner, 2008- Cakmak and Kirkby, 1992).

انواع اکسیژن فعال از جمله محصولات اجتناب ناپذیر متابولیسم به شمار می‌آید که با آسیب به مولکول‌های زیستی اختلالات متابولیسمی را در پی دارد (Mittler, 2002). اما سلول‌های گیاهی دارای

دانشکده کشاورزی دانشگاه مراغه بر پایه طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار کشت شد. تیمار مورد مطالعه شامل گیاهچه‌های شاهد (ترکیب عناصر غذایی کامل) و فقدان منیزیم (حذف $MgSO_4$ از ترکیب غذایی از ابتدای کشت) بود. ترکیب عناصر غذایی مورد استفاده در طول دوره رشد شامل عناصر پرمصرف ($MgSO_4$ ، KNO_3 ، $Ca(NO_3)_2$ ، KH_2PO_4) که به ترتیب در مقادیر ۲/۵، ۳، ۱/۵ و ۰/۱۷ میلی مولار و کم مصرف ($FeSO_4$ ، H_3BO_3 ، $MnSO_4$ ، $ZnSO_4$ ، $CuSO_4$ و H_2MoO_4) که به ترتیب در مقادیر ۵۰، ۲۳، ۵، ۰/۴، ۰/۲ و ۰/۱ میکرومولار بود (Grieve and Garttan, 1983).

گیاهچه‌های گندم تا مرحله ۲-۳ برگی با محلول ۵۰٪ و بعد از آن با محلول غذایی کامل تغذیه شدند. به منظور حفظ تعادل عناصر غذایی، محلول‌ها هر هفته ۲ بار عوض می‌شدند. بعلاوه pH محلول‌ها در محدوده ۵/۵ - ۵/۲ نگهداری شد. در طول دوره رشد دمای محیط 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد، طول دوره روشنایی ۱۶ ساعت و شدت نور ۲۵۰۰ لوکس بود عمل هوادهی نیز از طریق پمپ‌های آکواریوم صورت گرفت. گیاهچه‌ها به مدت ۲ ماه در این شرایط نگهداری شدند. سپس از برگ‌های جوان و کاملاً بالغ نمونه تهیه و بلافاصله در نیتروژن مایع غوطه‌ور گشتند. نمونه‌ها تا زمان اندازه‌گیری پارامترهای مورد نظر در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

استخراج آنزیمی

جهت استخراج سوپراکسید دیسموتازکل (SOD) و آیزوزیم‌های آن، کاتالاز (CAT) و

یکسری سازوکارهای دفاعی هستند که قادرند از تولید انواع اکسیژن فعال ممانعت کرده و یا با احیای کامل آنها از اثرات مضر آنها پیشگیری نمایند. از مهمترین این سازوکارها می‌توان به چرخه آسکوربات-گلوتاتیون، چرخه مهلر، چرخه زانتوفیل، مسیر تنفس نوری و سازوکارهای ترمیمی اشاره نمود (Asada, 2000). در این مسیرها آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و آنتی‌اکسیدان‌ها نقش بسیار موثری دارند. افزایش فعالیت این سازوکارهای دفاعی سبب می‌گردد تا سلول شرایط دشوار محیطی را راحت‌تر تحمل کرده و در شرایط مطلوب‌تری قرار گیرد. امروزه مشخص شده‌است که افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانها سبب کاهش آسیب به سلول می‌گردد (Halliwell and Gutteridge, 2007- Kalir et al, 2002- Sairam et al, 2010- Niki, 1981).

با توجه به اهمیت درک الگوی رفتاری گیاه نسبت به تنش‌های محیطی نظیر کمبود عناصر غذایی، ضرورت انجام آزمایش‌های فیزیولوژیک الزامی به نظر می‌رسد بنابراین در این راستا با توجه به نقش مهم عنصر منیزیم در فعال کردن آنزیم‌های مهمی نظیر ریبولوز بی فسفات کربوکسیلاز، ATP-آز، منیزیم کلاتاز و تسهیم مواد فتوسنتزی بین اندام‌های هوایی و ریشه این عنصر انتخاب شد تا اثرات کمبود آن بر روی متابولیسم گیاه با استفاده از برخی پارامترهای فیزیولوژیک مورد مطالعه قرار گیرد.

مواد و روشها

به منظور ارزیابی اثرات کمبود منیزیم، روی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و مرگ سلولی، رقم PGS گندم دوروم به روش هیدروپونیک در سال ۱۳۸۸ در اتاقک رشد گروه زراعت و اصلاح نباتات

1- Superoxide dismutases (SOD)

2- Catalase (CAT)

مطلق واکنش آنزیمی متوقف گردید. از کمپلکس واکنشی بدون آنزیم که به مدت ۱۵ دقیقه در نور قرار گرفته بود برای ارزیابی توان تولید کمپلکس سوپراکسید نیتروبلوتترازولیوم (NBT)^۲ و معیار سنجش فعالیت آنزیمی استفاده شد. همچنین از کمپلکس واکنشی کامل دیگری که از ابتدا در تاریکی مطلق قرار گرفته بود، به عنوان مرجع استفاده گردید. پس از توقف واکنش میزان جذب نمونه‌ها در ۵۶۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (UV-2100-vis) قرائت شد (Sairam et al, 2003).

کاتالاز

فعالیت این آنزیم طبق روش ابی (Aebi, 1984) اندازه‌گیری شد. کمپلکس واکنشی شامل ۱/۵ میلی‌لیتر از بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار (pH=۷)، ۰/۵ میلی‌لیتر از پراکسید هیدروژن ۷/۵ میلی‌مولار و ۵۰ میکرولیتر از محلول آنزیمی می‌باشد که حجم نمونه‌ها با اضافه کردن آب مقطر به ۳ میلی‌لیتر رسانده شد. جذب کمپلکس واکنشی در طول موج ۲۹۰ نانومتر قرائت و با استفاده از ضریب خاموشی $36/6 \text{ mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ میزان فعالیت آنزیم محاسبه شد (Aebi, 1984).

اندازه‌گیری فعالیت آسکوربات پراکسیداز

کمپلکس واکنشی (یک میلی‌لیتر) شامل ۲۵۰ میکرولیتر از محلول بافر فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار (pH=۷)، ۲۵۰ میکرولیتر از آسکوربات یک میلی‌مولار، ۲۵۰ میکرولیتر از EDTA ۰/۴ میلی‌مولار، ۱۹۰ میکرولیتر آب دو بار تقطیر، ۱۰ میکرولیتر از پراکسید هیدروژن ۱۰ میلی‌مولار و ۵۰

گایاکول پراکسیداز (GPX)^۱، ۰/۵ گرم از نمونه برگ با استفاده از هاون چینی کاملاً سرد و نیتروژن مایع هموزن شده و سپس به آن ۵ میلی‌لیتر از بافر فسفات پتاسیم سرد (pH=۷.۵) محتوی EDTA ۰/۵ میلی‌مولار اضافه شد. هموزن‌ها پس از انتقال به لوله‌های آزمایش در $15000 \times \text{g}$ و دمای 4°C به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردیدند. جهت پیشگیری از اثرات مضر انجماد و ذوب متوالی نمونه‌ها روش‌ناور حاصل، به سه قسمت تقسیم و تا زمان اندازه‌گیری آنزیم‌های فوق در دمای 20°C - نگهداری شد (Esfandiari et al, 2009).

استخراج آنزیم آسکوربات پراکسیداز نیز به روش فوق صورت گرفت و فقط به بافر استخراج آنزیم، پلی وینیل پیرولیدین (۵٪ وزنی-حجمی) و آسکوربیک اسید ۲ میلی‌مولار اضافه شد (Esfandiari et al, 2009).

سوپر اکسید دیسموتاز و آیزوزیم‌های آن

کمپلکس واکنشی (۳ میلی‌لیتر) محتوی ۰/۱ میلی‌لیتر از کربنات سدیم ۱/۵ مولار، ۰/۲ میلی‌لیتر از متیونین ۰/۲ مولار، ۰/۱ میلی‌لیتر از EDTA ۳ میلی‌مولار، ۱/۵ میلی‌لیتر از بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار و ۱ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۰۵ میلی‌لیتر از آنزیم استخراجی بود. واکنش با اضافه کردن ۰/۱ میلی‌لیتر از ریبولوین ۶۰ میکرومولار و قرار دادن لوله‌های آزمایش در زیر لامپ‌های فلورسنت (در حدود ۳۰ وات) شروع به فعالیت می‌کند. لوله‌های آزمایش به مدت ۱۵ دقیقه در زیر نور نگهداری و پس از اتمام زمان ذکر شده، با خاموش کردن لامپ‌ها و قرار دادن لوله‌های آزمایش در تاریکی

2- nitroblue tetrazolium (NBT)

1- Guaiacol peroxidase (GPX)

۹۵ °C نگهداری و سپس به حمام آب سرد منتقل گردید. نمونه‌ها مجدداً به مدت ۱۰ دقیقه در $\times g$ ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ شدند. جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (UV-2100-vis) ثبت گردید. میزان مالون دی آلدئید از اختلاف بین موج‌های جذبی و ضریب خاموشی $155 \text{ mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ بدست آمد (Stewart and Bewley, 1980).

اندازه گیری میزان پراکسید هیدروژن (H_2O_2)

در ابتدا ۰/۵ گرم نمونه برگی را هموژن کرده و به آنها ۵ میلی لیتر از محلول ۰/۱٪ تری کلرواستیک اسید (وزنی-حجمی) اضافه شد و در دور g ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. سپس کمپلکس واکنش حاوی ۰/۵ میلی لیتر از سوپرناتانت، ۰/۵ میلی لیتر بافر فسفات ۱۰ میلی مولار (pH=۷) و یک میلی لیتر KI یک مولار تهیه شده و میزان جذب آنها در طول موج ۳۹۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (UV-2100-vis) قرائت شد (Velikova et al., 2000).

اندازه گیری کلروفیل و کارتنوئید

نمونه های برگی به مدت چهار ساعت در دمای 65°C در ۴ میلی لیتر از دی متیل سولفوکسید غوطه‌ور گردید (Niki, 2010). سپس میزان جذب آنها در طول موج های ۶۶۵، ۶۴۹ و ۴۸۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (UV-2100-vis) ثبت شد. مقادیر کلروفیل a، b و کاروتنوئید بر اساس

میکرولیتر از محلول آنزیمی استخراج شده بود. جذب کمپلکس واکنشی در طول موج ۲۹۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (UV-2100-vis) قرائت شد و با استفاده از ضریب خاموشی $2/8 \text{ mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ میزان فعالیت آنزیم محاسبه شد (Sairam et al., 2002).

گایاکول پراکسیداز

کمپلکس واکنشی (دو میلی لیتر) شامل یک میلی لیتر بافر فسفات ۱۰۰ میلی مولار (pH=۷)، ۲۵۰ میکرولیتر از EDTA ۰/۱ میلی مولار، یک میلی لیتر گایاکول ۵ میلی مولار، یک میلی لیتر پراکسید هیدروژن ۱۵ میلی مولار و ۵۰ میکرولیتر از محلول آنزیمی استخراج شده است. افزایش جذب در طول موج ۴۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (UV-2100-vis) به مدت یک دقیقه ثبت شد و با استفاده از ضریب خاموشی $26/6 \text{ m}\mu^{-1} \text{ cm}^{-1}$ بدست آمد (Yoshimura, 2000).

تخمین میزان مالون دی آلدئید

این شاخص بر اساس روش استوارت و بولی (Stewart and Bewley, 1980) اندازه گیری شد. در حدود ۰/۵ گرم از برگهای گندم در ۱۰ میلی لیتر از محلول ۰/۱٪ تری کلرواستیک اسید (TCA)^۱ هموژن و به مدت ۱۰ دقیقه در $\times g$ ۱۵۰۰۰ سانتریفوژ گردید. ۲ میلی لیتر از روشناور حاصل با ۴ میلی لیتر از محلول ۲۰٪ تری کلرواستیک اسید (TCA) محتوی ۰/۵٪ تیوباربیتوریک اسید (TBA)^۲ مخلوط شد. کمپلکس حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای

1- trichloroacetic acid (TCA)

2- thiobarbituric acid (TBA)

معادلات ولبورن^۱ (۱۹۹۴) و کلروفیل کل طبق معادله آرنون^۲ (۱۹۴۹) محاسبه گردید.

اندازه‌گیری مرگ سلولی

نمونه‌های برگ‌گی به مدت ۳۵ دقیقه در ۴ سی‌سی محلول ایوانز غوطه‌ور گردید بعد از هضم نمونه‌ها میزان جذب آنها در طول موج ۶۰۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (UV-2100-vis) ثبت شد (Baker et al, 1994).

داده‌های آزمایشی حاصل با استفاده از نرم افزار آماری SPSS و MSTAT-C تجزیه شد. مقایسه میانگین با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که میزان پراکسید هیدروژن، پراکسیداسیون لیپیدی، مرگ سلولی، میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز در شرایط کمبود منیزیم نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری ($P < 0/05$) یافته است (شکل ۷، ۹-۸، شکل ۲، ۱)، در حالی که فعالیت آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز و گایاکول پراکسیداز به همراه میزان کلروفیل و کارتنوئید کل در شرایط کمبود منیزیم نسبت به شاهد کاهش قابل ملاحظه‌ای ($P < 0/5$) داشته است (شکل ۳، ۴ - شکل ۵، ۶).

منیزیم در نقاط بسیار مهمی از متابولیسم نظیر بارگیری ساکارز، فعال شدن آنزیم‌های روبیسکو و بیوسنتز کلروفیل ایفای نقش می‌کند. کمبود این عنصر افزایش تولید انواع اکسیژن فعال را در پی دارد

(Cakmak and Kirkby, 2008). افزایش میزان پراکسید هیدروژن در این پژوهش گواه بر این موضوع است. پراکسید هیدروژن یک متابولیت سمی برای سلول می‌باشد که باعث آسیب به مولکول زیستی می‌شود. این ماده توسط آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیدازها به آب تبدیل می‌گردد. آنزیم آسکوربات پراکسیداز در چرخه‌های گلوکوتایون-آسکوربات، مه‌لر و گزانتوفیل که در کلروپلاست فعال هستند، ایفای نقش می‌کند. کاهش فعالیت این آنزیم سبب تجمع پراکسید هیدروژن در این اندامک می‌گردد که با نتایج حاصل از این پژوهش مطابقت دارد. گایاکول پراکسیداز نیز در سیتوسول فعالیت می‌کند (Baker, 1994 - Mittler, 2002). بنابراین کاهش فعالیت این آنزیم در شرایط کمبود منیزیم نیز منجر به تجمع پراکسید هیدروژن در سلول شده است (شکل ۷).

در بین اندامک‌ها کمبود منیزیم بیشترین تاثیر را بر کلروپلاست می‌گذارد (Terry and Ulrich, 1974). این اندامک از مکان‌های اصلی تولید انواع اکسیژن فعال بویژه رادیکال سوپراکسید به‌شمار می‌آید (Mittler, 2002 - Edreva, 2005). این رادیکال توانایی رسانیدن آسیب به نقاط کلیدی متابولیسم را دارد، بطوریکه رادیکال مذکور، سبب اکسیده شدن اسیدهای آمینه تریپتوفان، متیونین و هیستیدین می‌گردد (Breusegem, 2001). بعلاوه رادیکال سوپراکسید سبب غیر فعال شدن آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیدازها که از مهمترین آنزیم‌های جمع‌آوری کننده پراکسید هیدروژن می‌باشند، خواهند شد (Fridivich, 1989).

1- Wellburn

2- Arnon

جدول ۱- میانگین مربعات

میانگین مربعات															
منابع تغییرات	درجه آزادی	کاتالاز	یسمو تاز	سوپراکسیداز	پراکسیداز	آسکوربات	پراکسیداز	گیاکول	کلروفیل	کارتوئید	آلدید	ملون دی	روژن	پراکسیداز	مرگ سلولی
تیمار	۱	۵۶۱	۰/۵۳	۰/۲۲۱	۰/۲۲۱	۰/۲۲۱	۰/۲۲۱	۳۲۴۰/۱	۵۵/۱۳	۱۹۸۰/۱	۰/۰۹۹	۵۰	۵۴۹۴۶/۱		
خطا	۶	۱/۲۹	۰/۰۰۱	۰/۰۳	۰/۰۳	۰/۰۳	۰/۰۳	۷/۴۵۸	۰/۴۵۸	۵/۸۳۳	۰	۰/۳۳۳	۶۲/۲۹۷		
ضریب تغییرات (%)	-	۲/۱۴	۰/۶	۷/۶۷	۳/۹۵	۲/۹۹	۰/۵۲	۲/۱۱	۲/۸۹	۴/۲۷					

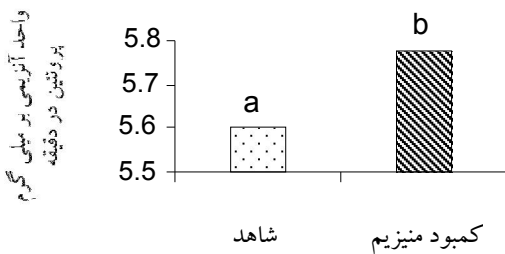
بعنوان یک مسیر جایگزین برای مصرف الکترون و هیدروژن حاصل از واکنش‌های نوری فتوسنتز به شمار می‌آید. لذا به تعدیل نسبت $NADP^+/NADPH, H^+$ کمک شایانی می‌کند. برآیند آن سبب باز نگه داشتن مسیر انتقال الکترون کلروپلاستی شده و از تولید انواع اکسیژن فعال پیشگیری می‌کند (Asada, 2000). بعلاوه اجرای این چرخه شرایط لازم برای تجزیه آب توسط کمپلکس تجزیه کننده آب در فتوسیستم II و انتقال پروتون به ناحیه لومن را فراهم می‌کند. اجرای این چرخه سبب اسیدی تر شدن ناحیه لومن تیلاکوئیدی می‌شود (Asada, 2000). که شرط لازم برای فعال شدن مکانیسم‌های دفاعی چرخه گزانتوفیل و تغییر حالت تیلاکوئیدی است. بنابراین همانطور که اشاره شد کاهش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در این پژوهش نشان می‌دهد چرخه‌های فوق از کارایی لازم برخوردار نیستند. برآیند این عوامل سبب آسیب به نقاط کلیدی متابولیسم و مختل شدن آن می‌انجامد.

آنزیم سوپراکسید دیسموتاز از جمله مهمترین آنزیم‌های آنتی اکسیدان می‌باشد که رادیکال سوپراکسید را به پراکسید هیدروژن تبدیل می‌کند. نتایج حاصل نشان داد که که فعالیت این آنزیم در شرایط فقدان منیزیم نسبت به شاهد افزایش معنی داری یافته ($P < 0.05$) است که در واقع نتیجه آن تولید بیشتر پراکسید هیدروژن در کلروپلاست است و از سوی دیگر کاهش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در این اندامک منجر به تجمع پراکسید هیدروژن گردیده است، در واقع این موضوع نشان می‌دهد که چرخه مهلر و گزانتوفیل از کارایی لازم برخوردار نیست. چون چرخه مهلر از مهمترین مکانیسم‌های محافظتی گیاه به شمار می‌رود که در کلروپلاست اجرا می‌گردد. در این چرخه رادیکال سوپراکسید حاصل توسط آنزیم سوپراکسید دیسموتاز به پراکسید هیدروژن تبدیل می‌شود که توسط آسکوربات پراکسیداز، به آب تبدیل می‌گردد (Asada, 2000). به عبارتی اجرای موثر این چرخه

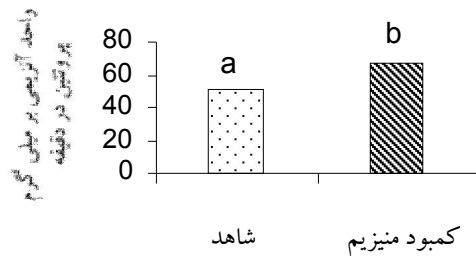
به کلروفیل و کاروتنوئید می‌شود که نتایج نیز کاهش کلروفیل و کاروتنوئید را نشان داد (شکل ۵، ۶).

بطور کلی نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که کاهش کارایی چرخه مهلر و گزانتوفیل و کاهش فعالیت آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز و گایاکول پراکسیداز سبب افزایش آسیب به مولکول‌های زیستی شده است. لذا می‌توان اشاره نمود که بین فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان و پراکسیداسیون لیپیدی و مرگ سلولی یک ارتباط منفی وجود دارد.

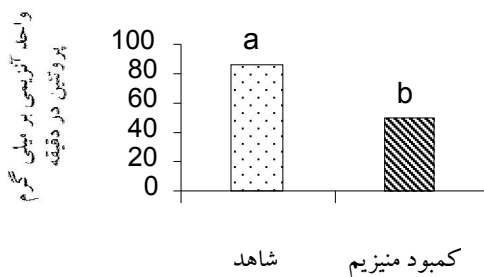
افزایش میزان بیومارکر مالون دی‌آلدئید (بعنوان معیاری برای سنجش پراکسیداسیون لیپیدی) در این پژوهش بیانگر این موضوع است (شکل ۸). افزایش شدت اختلالات متابولیسمی در نهایت سلول را وادار به اجرای مرگ برنامه ریزی شده می‌نماید. بطوری که نتایج نیز نشان داد که کمبود منیزیم سبب افزایش میزان مرگ سلولی می‌گردد (شکل ۹). همانطور که اشاره شد کمبود منیزیم سبب تجمع پروتوپورفیرین IX می‌شود. پروتوپورفیرین IX یک متابولیت سمی برای سلول‌های گیاهی است و تجمع آن سبب آسیب



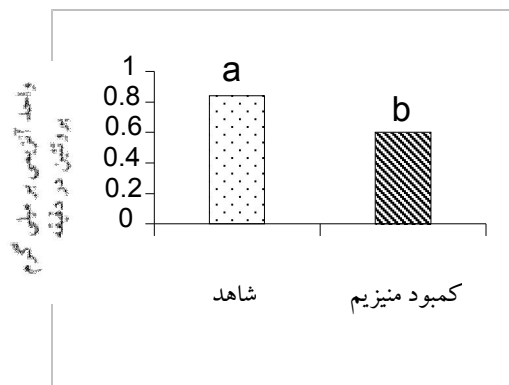
شکل ۲- اثر فقدان منیزیم بر میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (واحد آنزیمی بر میلی گرم پروتئین)



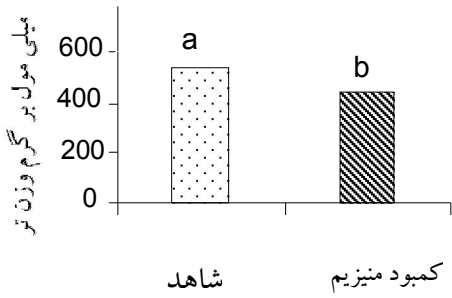
شکل ۱- اثر فقدان منیزیم بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز (واحد آنزیمی بر میلی گرم پروتئین در دقیقه)



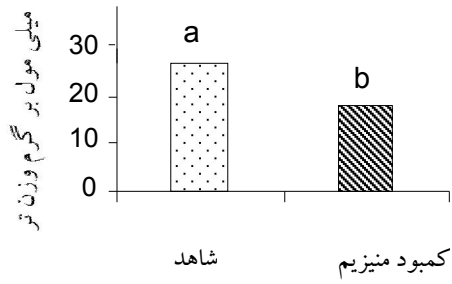
شکل ۴- اثر فقدان منیزیم بر میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز (واحد آنزیمی بر میلی گرم پروتئین در دقیقه)



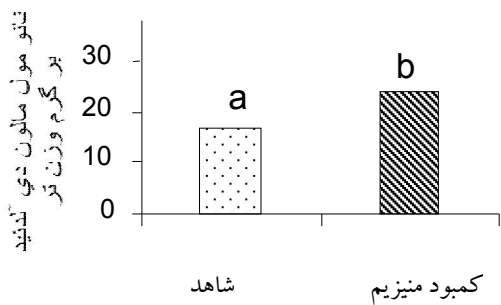
شکل ۳- اثر فقدان منیزیم بر میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (واحد آنزیمی بر میلی گرم پروتئین در دقیقه)



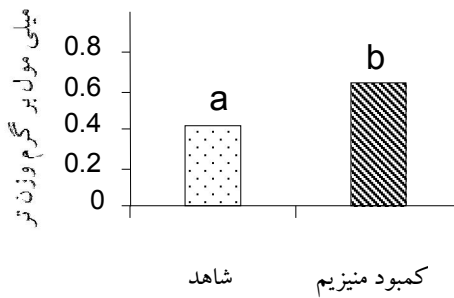
شکل ۶- اثر فقدان منیزیم بر میزان کاراتنوئید کل (میلی مول بر گرم وزن تر)



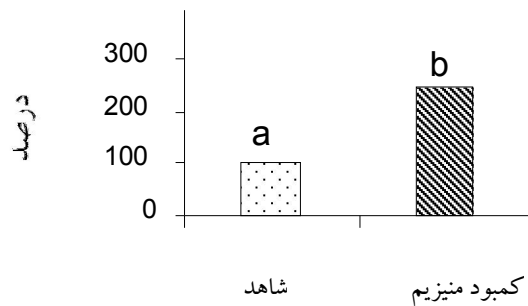
شکل ۵- اثر فقدان منیزیم بر میزان کلروفیل کل (میلی مول بر گرم وزن تر)



شکل ۸- اثر فقدان منیزیم بر میزان مالون دی آلدئید (نانو مول بر گرم وزن تر)



شکل ۷- اثر فقدان منیزیم بر میزان پراکسید هیدروژن (میلی مول بر گرم وزن تر)



شکل ۹- اثر فقدان منیزیم بر میزان مرگ سلولی

فهرست منابع

- Aebi, H. 1984. Catalase in vitro. *Method of Enzymology*, 105:121-126.
- Asada, K. 2000. The water-water cycle as alternative photon and electron sinks. *Phill. Trans. R. Soc. Lond. B*, 355:1419-1431.
- Baker, C.J. and N.M. Mock. 1994. An improved method for monitoring cell death in cell suspension and leaf disk assay using Evans blue. *Plant Cell Tissue Organ Culture*. 39: 7-12.
- Beak, K.H. and D.Z. Skinner .2003. Alteration of antioxidant enzyme gene expression during cold acclimation of near-isogenic wheat lines. *Plant Science* 165:1221-1227.
- Breusegem, F. V., E. Vranova , J. F. Dat and D. Inze. 2001. The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Science*. 161:405-414.
- Cakmak, I. and E. Kirkby. 2008. Role of magnesium in carbon partitioning and alleviating photooxidative damage. *Physiologia Plantarum*. 133: 692-704.
- Calmak, I. and H. Marschner. 1992. Magnesium deficiency and high light intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, and glutathione reductase in bean leaves. *Plant Physiology*. 98: 1222-1227.
- Edreva, A. 2005. Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: A submolecular approach. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 106: 119-133.
- Esfandiari E, SS. Alavi-Kia, A. Bahmani and MA. Aazami, 2009. The effect of light on ROS-scavenging systems and lipid peroxidation under cold conditions in saffron (*Crocus sativus L.*). *African Journal of Agricultural Research* 4: 378-382.
- Esfandiari, E. A., M. R. Shakiba , S. A. Mahboob , H. Alyari , and M. Toorchi. 2007. Water stress, antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in wheat seedling. *Journal of Food, Agriculture & Environment*. 5: 48-53.
- Fridovich, I. 1989. Superoxide dismutases: An adaptation to a paramagnetic gas. *The Journal of Biological Chemistry*. 264: 7761-7764.
- Grieve, C. and R. Garttan. 1983. Rapid assay for determination of water soluble quaternary ammonium compounds. *Plant and soil*, 70, 303-307.
- Halliwell, B.; J.M.C. Gutteridge. 2007. Free radicals in biology and medicine. *Fourth ed. Clarendon, Oxford, UK*.
- Hermans, C. and N. Verbruggen. 2005. Physiological characterization of mg deficiency in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of experimental botany*. 56: 2153-2161.
- Kalir, A. And A.Poljakoff-Mayber. 1981. Changes in activity of malate dehydrogenase, catalase, peroxidase and superoxide dimutase in the leaves of *Halimione portulacoides (L.)*. Allen exposed to high sodium chloride concentrations, *Ann. Bot.* 47 (1981) 75/85.
- Laing W, D. Greer, O. Sun, P. Beets, A. Lowe, T. Payn. 2000. Physiological impacts of Mg deficiency in *Pinus radiata*: growth and photosynthesis. *New Phytol* 146:47-57
- Mahbob, S. 1987. Structural biochemistry (enzymes and co-enzymes). University of Tabriz (In Farsi).
- Marschner H .1995. Mineral Nutrition of Higher Plants, 2nd Edn. Academic Press, San Diego,
- CAMilone, M. Sgherri, C., Clijsters, H., and Navari-Izzo, F. 2003. Antioxidative responses of wheat treated with realistic concentration of cadmium. *Environmental and Experimental Botany*. 50: 265-276.
- Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*. 7: 405-410.
- Niki Etsuo. 2010. Assessment of Antioxidant Capacity in vitro and in vivo. *Free Radical Biology & Medicine*-10183; No of pages: 13;4c:26
- Ort, D. 2001. When there is too much light? *Plant Physiology*, 125: 29-32.

- Sairam, R. K., K. V. Rao, and G. C. Srivastava. 2002. Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. *Plant Science*. 163:1037-1046.
- Sen Gupta, A., R. P. Webb, A. S. Holaday and R. D. Allen. 1993. Overexpression of superoxide dismutase protects plants from oxidative stress. *Plant Physiology*. 103: 1067-1073.
- Shaul O. 2002. Magnesium transport and function in plants: the tip of the iceberg. *Biometals* 15: 309–323
- Stewart, R. R. C. and J. D. Bewley. 1980. Lipid peroxidation associated aging of soybean axes. *Plant Physiology*. 65: 245-248.
- Terry, N. and A. Ulrich. 1974. Effects of magnesium deficiency on the photosynthesis and respiration of leaves of *sugar beet*. *Plant Physiol.*, 54: 379-381.
- Velikova, V., I. Yordanov and A. Edreva. 2000. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants. Protective role of exogenous polyamins. *Plant Science*. 151: 59-66.
- Walker CJ, JD. Weinstein. 1991. Further characterization of the magnesium chelatase in isolated developing cucumber chloroplasts. *Plant Physiol* 95: 1189–1196
- Yoshimura, K., Y. Yabute, T. Ishikawa, and S. Shigeoka. 2000. Expression of spinach ascorbate peroxidase isoenzymes in response to oxidative stresses. *Plant Physiology*. 123: 223-233.

Decrease of cell defense mechanisms efficiency and oxidative stress accruing in lake of Mg condition

Amin Abbasi*, Vagef Enayati

Maragheh University

Abstract

A hydroponic experiment was conducted to investigate the effect of magnesium (Mg) deficiency on plant cell metabolism in PGS durum wheat cultivar. The experiment was conducted in 4 replications as a completely randomized design in 2010. Result showed that magnesium deficiency increased reactive oxygen species (ROS) production such as hydrogen peroxide (H_2O_2). Furthermore, Mg deficiency declined significantly the activity of ascorbate peroxidase (APX) and glutathione peroxidase (GPX) as well as total chlorophyll content. But catalase and superoxide dismutase (SOD) activities were significantly increased under Mg deficiency. Outcome of these changes caused oxidative stress in plant cells and thus lead to increase damage of biological molecules. The increased of lipid peroxidation and cell death confirmed this opinion. The results showed there is a negative relationship between the antioxidant enzymes activity and cell membrane damage and ultimately cell death.

Key words: oxidative stress, magnesium deficiency, Cell defense mechanisms

* Corresponding author: a.abbasi25@yahoo.com Received: 2012/7/14 Accepted: 2014/2/26