مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد ٦، شماره ١، بهار ١٣٩٤ ، ٢١-٩

بررسی اثر سرب بر فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانتی، میزان پرولین و آلکالوئید کل کالوس گیاه پریوش

محمدرضا امیرجانی .Ph.D[1*]، محمدحسین آبنوسی .Ph.D[1]، مجید مهدیه .Ph.D[1]، ساراقره‌شیخ‌لو .M.Sc[2]

۱- دانشگاه اراک، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، کدپستی ۸۳۴۹-۸-۳۸۱۵۶
۲- دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی گیاهی، دانشگاه اراک، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی، اراک، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: m-amirjani@araku.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۰/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۲/۲۹

چکیده

هدف: هدف از پژوهش حاضر، بررسی اثر تنش اکسیداتیو ناشی از حضور غلظت‌های مختلف فلز سرب در محیط کشت MS بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی، میزان پرولین و آلکالوئیدکل کالوس گیاه پریوش بود.

مواد و روش‌ها: بذر گیاه پریوش در گلدان حاوی پرلیت کشت و به‌منظور القای کالوس، برگ‌ها در شرایط استریل بر روی محیط کشت جامد MS قرار داده شدند. کالوس‌ها بعد از سه هفته واکشت شدند و کالوس‌های واکشت دوم با غلظت‌های مختلف نیترات سرب (۰، ۱۰ و ۵۰ میکرومولار) به‌مدت ۵ روز تیمارگردیدند و پس از گذشت پنج روز از زمان تیمار، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی، میزان پرولین و آلکالوئید اندازه‌گیری شد. آنالیز آماری داده‌ها در سطح ($p<0/05$) با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام شد.

نتایج: نتایج آزمایشات نشان دادکه فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی مانند سوپراکسیددیسموتاز (SOD)، پراکسیداز (POX) و آنزیم کاتالاز (CAT)، میزان پرولین و آلکالوئید و پراکسیداسیون لیپید در نتیجه تیمار با سرب به‌طور معنی‌دار افزایش یافت.

نتیجه گیری: سرب به‌دلیل القای تنش اکسیداتیو و افزایش تولید رادیکال آزاد سبب افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی و محتوی پرولین و آلکالوئید و پراکسیداسیون لیپید در کالوس گیاه پریوش شد.

واژگان کلیدی: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی، آلکالوئید، تنش اکسیداتیو، پراکسیداسیون لیپید، سرب

مقدمه

پریوش با نام علمی Catharantus roseus یک گیاه دارویی و متعلق به خانواده Apocynaceae است. این گیاه مجموعه متنوعی از متابولیت‌های ثانویه را در اندام‌های مختلف خود سنتز می‌کند. برگ‌ها و ساقه‌های گیاه پریوش منابع مهم آلکالوئیدهای دیمریک وین‌بلاستین و وین‌کریستین هستند که جزو داروهای ضدسرطان می باشند (۱). علاوه بر این در ریشه‌های گیاه آلکالوئیدهای سرپنتین و آجمالیسین که داروهای ضد فشار خون هستند، نیز تجمع می‌یابند (۲ و ۳). به‌دلیل قیمت بالای این ترکیبات و محتوای اندک آلکالوئیدی گیاه پریوش محققین از روش کشت بافت برای افزایش تولید آلکالوئیدهای گیاه پریوش بهره می‌برند (۴).

فلزات سنگین به‌طور طبیعی در محیط وجود دارند. مقدار فلزات سنگین در خاک تحت تاثیر عوامل مختلفی همچون سنگ مادر، حضور منابع آلوده کننده، کاربرد کودهای آلی و شیمیایی در کشاورزی و استفاده از پساب‌های صنعتی و شهری در آبیاری است (۵). فلزات سنگین به فلزاتی که دارای چگالی بالاتر از ۵ گرم بر سانتی‌متر مکعب باشند اطلاق می‌شود. در بین فلزات سنگین عناصری نظیر Mn, Zn, Ni, Cu, Co, Fe و Mo وجود دارند که به‌عنوان عناصر ریزمغذی یا عناصر کمیاب برای متابولیسم گیاهی ضروری هستند؛ علاوه بر این عناصر دیگری نظیر Pb, Ni, As, Hg, Ag, Cd و Cu وجود دارند که وقتی مقدار آن‌ها در محیط رشد گیاه بیش از میزان طبیعی باشد برای گیاهان مسمومیت ایجاد می‌کنند (۶). سرب با عدد اتمی ۸۲ و وزن اتمی ۲۰۷/۲ یکی از فلزات سنگینی است که موجب آلودگی محیط زیست شده (۷) و از مهم‌ترین آلاینده‌های محیط زیست به‌حساب می‌آید (۸). عناصری مانند سرب و کادمیوم در فرآیندهای فیزیوژیک گیاهان هیچ نقشی ندارند اما به‌علت شباهت ساختاری با عناصر ضروری امکان جذب این عناصر برای گیاه وجود دارد (۹). حضور سرب در بافت گیاه به‌دلیل اختلال در هومئوستازی سلول تولید گونه‌های اکسیژن واکنش‌گر (ROS) را در گیاهان افزایش می‌دهد؛ لذا موجب القای تنش اکسیداتیو در گیاه می‌گردد در نتیجه سبب پراکسیداسیون لیپیدها، اکسید شدن پروتئین‌ها و آسیب به اسیدهای نوکلئیک، بازدارندگی آنزیمی و فعال شدن مسیرهای مرگ‌برنامه‌ریزی شده و سرانجام سبب مرگ سلولی می‌شود (۱۰). اکسیژن‌سینگلت، سوپراکسید و پراکسیدهیدروژن از شایع‌ترین انواع گونه‌های اکسیژن واکنش‌گر یا ROS (Reactive oxygen species) می‌باشند (۱۱) بنابراین وقتی گیاه در معرض سرب قرار می‌گیرد به‌منظور حفظ فعالیت متابولیسمی، فعالیت ترکیبات آنتی‌اکسیدانتی از جمله آنزیم‌ها و متابولیت‌های ثانویه در گیاه افزایش می‌یابد. سیستم آنتی‌اکسیدانتی در گیاهان به‌عنوان یک عامل کلیدی در مکانیسم‌های دفاعی در تنش اکسیداتیو مطرح است (۱۲) و به سلول کمک می‌کند تا بتواند شرایط تنش را تحمل کند (۱۳). گیاهان دارای مجموعه‌ای از سیستم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانتی متشکل از اجزای آنزیمی و غیر آنزیمی هستند. اجزای آنزیمی سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانتی شامل چند آنتی‌اکسیدانت آنزیمی مانند سوپراکسیددیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و گایاکول‌پراکسیداز (GPX) هستند. درگیاهان SOD نقش اصلی را در دفاع در مقابل تنش اکسیداتیو دارد این آنزیم متعلق به متالوآنزیم‌ها است که سبب تبدیل رادیکال سوپراکسید به اکسیژن و پراکسید هیدروژن می‌شود. گایاکول پراکسیداز نیز یک پروتئین حاوی هم است که ترجیحا ترکیبات آروماتیک دهنده الکترون را به‌ازای مصرف پراکسید هیدروژن اکسید می‌کند (۱۴). با توجه به مزایایی متعدد کشت بافت و اهمیت دارویی گیاه پریوش و با توجه به اینکه اثر فلز سرب بر روی کالوس بسیار کم مطالعه شده در تحقیق حاضر از کالوس گیاه پریوش بهره گرفته شد و بررسی اثر سرب بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کالوس گیاه پریوش مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

القای کالوس و شروع تیمار: بذر گیاه پریوش در گلدان حاوی پرلیت کشت شد و پس از گذشت دو ماه به منظور القای کالوس، برگ‌های جوان از قسمت راسی گیاه پریوش کشت شده در گلدان جدا شدند و مورد استفاده قرار گرفتند. قطعات گیاهی مورد نظر به‌منظور ضدعفونی شدن به‌مدت ۱۵ دقیقه درهیپوکلریت سدیم ۵ درصد قرار داده شدند سپس سه مرتبه با آب مقطر اتوکلاو شده شستشو و به‌مدت ۱۰ دقیقه در اتانول ۷۰ درصد قرار گرفته شدند و مجددا سه مرتبه با آب مقطر اتوکلاو شده شستشو شدند (۱۵). پس از آن، برگ را به قطعات حدود یک سانتی‌متر برش زده و روی محیط کشت MS که با ۳۰ گرم در لیتر ساکارز، ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر توفوردی، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر کینتین و ۸ گرم بر لیتر آگار مخلوط شده بود انتقال

داده شدند و شیشه‌های حاوی جداکشت‌ها به اتاق کشت با دمای ۲۵±۲ درجه سانتی‌گراد منتقل گردیدند (۱۶). کالوس‌ها بعد از سه هفته واکشت و به محیط کشت جدید منتقل شدند و از کالوس‌های واکشت دوم برای تیمار دهی استفاده شد.

پس از تهیه محیط‌های کشت تیمار با غلظت‌های مختلف نیترات سرب شامل ۰، ۱۰ و ۵۰ میکرومولار قطعات کالوس به وزن تقریبی ۱ گرم روی محیط‌های کشت حاوی مقادیر مختلف نیترات سرب انتقال داده شدند و پس از گذشت پنج روز، کالوس‌ها برای آزمایش‌های بعدی در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. به‌منظور انجام آزمایش‌های بیوشیمیایی از کالوس عصاره تهیه شده و عصاره‌ها در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند (۱۷).

تهیه عصاره آنزیمی: به ۰/۵ گرم بافت کالوس در درون لوله اپندورف نیتروژن مایع اضافه و سائیده شد. سپس ۵۰۰ میکرولیتر بافر فسفات‌پتاسیم ۱۰۰میلی‌مولار (pH= ۷) به آن اضافه و به‌مدت نیم ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با تکان‌های ملایم استخراج شد (۱۸). ترکیب حاصل در دمای ۴ درجه‌سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه با سرعت rpm ۱۲۰۰۰سانتریفوژ (مدل: EDISON, NJ U6A Labnet international, Inc. RATING. QUANTITY) و از محلول شفاف‌رویی برای انجام آزمایش‌های بیوشیمیائی استفاده گردید.

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT): فعالیت آنزیم CAT با استفاده از روش Cakmak و Marschner (۱۹) مطابق روش زیر اندازه‌گیری شد. مقدار ۲۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی به‌همراه ۴۰۰ میکرولیتر از محلول بافر فسفات سدیم ۲۵ میلی‌مولار و ۳۰۰ میکرولیتر H_2O_2 مخلوط و در طول موج ۲۴۰ نانومتر سرعت حذف H_2O_2 به‌مدت ۲ دقیقه اندازه‌گیری شد (لازم به ذکر است قبلا میزان جذب H_2O_2 در بافر فسفات ۰/۴ تنظیم گردید که نقطه شروع برای اندازه‌گیری کینتیک سرعت بود). در این آزمایش ۲ میلی‌لیتر از بافر حاوی H_2O_2 فاقد عصاره آنزیمی به‌عنوان نمونه شاهد به منظور صفر کردن دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل +T80 ساخت شرکتPG instrument کشور انگلستان) استفاده شد. میزان فعالیت آنزیم با استفاده از ضریب خاموشی $mM^{-1}\ cm^{-1}$ ۳۹/۴ با استفاده از فرمول زیر بر اساس سرعت مصرف هیدروژن‌پراکسید در دقیقه محاسبه گردید. فعالیت آنزیم کاتالاز مساوی است با اختلاف جذب تقسیم بر عدد ۳۹/۵ ضربدر عدد ۱۰۰.

سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز (POX): فعالیت آنزیم POX با استفاده از روش Polle و همکاران (۲۰) اندازه‌گیری شد. مخلوط واکنش حاوی ۲۴۰۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار، ۱۰۰ میکرولیتر گایاکول ۱۸ میلی‌مولار، ۱۰۰ میکرولیتر از H_2O_2 و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی در لوله آزمایش ریخته شد. جذب نمونه بر اساس اکسیداسیون گایاکول با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل +T80 ساخت شرکتPG instrument کشور انگلستان) به‌مدت ۲ دقیقه در طول موج ۴۳۶ نانومتر خوانده شد. از محلول واکنش بدون عصاره جهت صفر کردن دستگاه استفاده شد. همچنین از فرمول زیر به‌منظور اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز استفاده گردید. فعالیت آنزیم پراکسیداز مساوی است با جذب خوانده شده تقسیم بر عدد ۲۶/۶.

در فرمول فوق الذکر، جذب خوانده شده معادل میزان تتراگایاکول تولید شده در یک دقیقه و ۲۶/۶ ضریب خاموشی آنزیم پروکسیداز بر حسب $mM^{-1}\ cm^{-1}$ در نظر گرفته شد.

سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD): فعالیت آنزیم SOD بر اساس روش Giannopolitis و همکاران (۲۱) اندازه‌گیری شد. اساس اندازه‌گیری فعالیت سوپراکسیددیسموتاز، اثر بازدارندگی این آنزیم با احیای نوری نیتروبلوتترازولیوم (NBT) است. مقدار ۲۰ میکرولیتر از نمونه‌های تیمار شده و ۱ میلی‌لیتر محلول واکنش در لوله‌های آزمایش ریخته شد و به‌منظور تهیه نمونه شاهد ۲۰ میکرولیتر آب مقطر و ۱ میلی‌لیتر محلول واکنش در لوله‌های مربوطه ریخته و لوله‌های آزمایش حاوی نمونه‌های تیماری و کنترل به‌مدت ۱۰ دقیقه در روشنائی حاصل از نور مصنوعی در یک اتاقک قرار گرفته شدند. سپس در طول موج ۵۶۰ نانومتر با کمک دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل +T80 ساخت شرکت PG instrument کشور انگلستان) جذب نمونه‌ها قرائت و با استفاده از فرمول زیر میزان درصد فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز برای هر نمونه محاسبه شد. برای صفر کردن دستگاه اسپکتروفتومتر از محلول بلانک که فاقد رنگ بود استفاده شد. فعالیت سوپراکسیددیسموتاز مساوی است با OD نمونه منهای OD کنترل تقسیم بر OD کنترل ضربدر عدد۱۰۰.

تعیین میزان پراکسیداسیون لیپید: میزان پراکسیداسیون لیپید از روش اصلاح شده، Heath and Packer (۲۲) انجام شد. در این روش سنجش مالون‌دی‌آلدئید به‌عنوان شاخص

پراکسیداسیون در نظر گرفته شده است. مراحل اندازه‌گیری میزان مالون‌دی‌آلدئید به‌ترتیب زیر انجام شد. ۰/۵ گرم از بافت کالوس با ۱ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید۰/۱ درصد در هاون چینی سائیده شد و عصاره به‌دست آمده به‌مدت ۳۰ دقیقه در ۴۰۰۰rpm سانتریفوژ گردید. به ۱ میلی‌لیتر از محلول شفاف رویی، ۱ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک‌اسید ۲۰ درصد حاوی تیوباربیتوریک اسید ۰/۵ در صد افزوده شد. مخلوط به‌دست آمده به‌مدت ۳۰ دقیقه در حرارت ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد در حمام آب گرم قرار داده شد و بلافاصله لوله‌ها به‌مدت ۱۵ دقیقه در یخ خرد شده قرار گرفت و بعد سانتریفوژ شد. سپس جذب محلول در طول موج ۵۳۲ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل T80+ ساخت شرکت PG instrument کشور انگلستان) خوانده شد. از آنجایی‌که بعضی از ترکیبات، به‌عنوان ترکیبات مزاحم در طول موج ۵۳۲ نانومتر جذب دارند، جذب محلول در طول موج ۶۰۰ نانومتر نیز خوانده و از جذب خوانده شده در طول موج ۵۳۲ نانومتر کم شد. از محلول تری‌کلرواستیک اسید ۲۰ درصد حاوی تیوباربیتوریک اسید ۰/۵ در صد برای صفر کردن دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۳۲ نانومتر استفاده شد. غلظت کمپلکس تیوباربیتوریک- مالون‌دی‌آلدئید با استفاده از ضریب خاموشی $\varepsilon = 155\ cm^{-1}\ mmo$ و فرمول زیر محاسبه شد:

$$A = \varepsilon bc$$

در این فرمول A: جذب خوانده شده، ε: ضریب خاموشی، b: عرض کووت (۱ سانتی‌متر)، c: غلظت کمپلکس مالون‌دی‌آلدئید

اندازه‌گیری میزان اسید آمینه پرولین مقدار پرولین با استفاده از روشBates و همکاران (۲۳) اندازه‌گیری شد. بر اساس این روش اسید آمینه آزاد پرولین با معرف نین‌هیدرین در شرایط اسیدی و دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد واکنش داده و تولید ماده رنگی به‌نام دی‌کتوهیدرین‌دی‌لیدین می‌کند، ترکیب رنگی فوق به‌کمک حلال آلی غیرقطبی تولوئن تشکیل دو فاز رنگی متفاوت می‌دهد که می‌توان با استفاده از منحنی استاندارد میزان پرولین را محاسبه‌کرد. در این روش ۰/۳ گرم از بافت کالوس از هر نمونه گیاهی با اسید سولفوسالیسیلیک ۳ در صد سائیده شد، تا مخلوط یکنواختی حاصل شود و سپس به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. محلول حاصل به‌مدت یک شب در دمای آزمایشگاه نگه‌داری شد و سپس به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد. سپس ۲ میلی لیتر از محلول رویی، به اضافه ۲ میلی‌لیتر اسید استیک‌گلاسیال و ۲ میلی‌لیتر معرف نین‌هیدرین به‌مدت یک ساعت در حمام آب گرم در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. بعد از گذشت یک ساعت زمانی‌که محلول سرد شد ۴ میلی لیتر تولوئن به محلول اضافه و در حدود ۲۰ ثانیه با استفاده از دستگاه میکسر هم‌زده شد. سپس لوله‌های آزمایش را برای مدتی ثابت نگه داشته تا دو فاز کاملا از هم جدا گردد. فاز آلی به‌رنگ صورتی در بالا قرار گرفت و فاز آبی بی‌رنگ و شفاف در زیر فاز آلی تشکیل گشت. از فاز آلی جهت رنگ سنجی استفاده شد. برای این منظور ابتدا دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل T80+ ساخت شرکت PG instrument کشور انگلستان) به‌وسیله تولوئن در طول موج ۵۲۰ نانومتر روی عدد صفر تنظیم گردید و سپس محلول رنگی مربوط به‌هر نمونه در دستگاه قرارگرفت و میزان جذب خوانده شد. میزان پرولین بافت مورد نظر با توجه به منحنی استاندارد پرولین و فرمول خطی y=۰/۰۱۲۳x+۰/۳۰۴ با R2=۰/۹۹۵۵ تعیین شد.

اندازه‌گیری آلکالوئید کل: میزان آلکالوئید کل با استفاده از روش اسپکتروفتومتریک و معرف دراژندروف برای شناسایی آلکالوئیدها مطابق روش زیر محاسبه شد (۲۴). ۳ گرم بافت تازه کالوس را با ۱۰ میلی‌لیتر متانول ۹۶ درصد در حضور نیتروژن مایع سائیده شد سپس نمونه‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت به انکوباتور شیکردار با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند بعد از سپری شدن مدت زمان معین نمونه‌ها با دورrpm ۱۲۰۰۰ به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند سپس محلول رویی را به آون ۸۰ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۱ تا ۲ ساعت انتقال داده شد تا حجم نهایی محلول به ۱ میلی‌لیتر تبخیر شود به عصاره باقیمانده ۱۰ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۰/۵ نرمال اضافه گردید. با استفاده از سود ۱۰N، pH محلول روی ۱۰ تا ۱۲ تنظیم شد و به محلول فوق ۱۰ میلی‌لیتر کلروفرم اضافه و سپس به دکانتور منتقل گردید. در این مرحله دو فاز تشکیل می‌شود فاز اسیدی در بالا و فاز کلروفرمیک حاوی عصاره در پایین، فاز کلروفورمیک جدا شد. حجم محلول کلروفرمیک با اتانول ۹۶ درصد به ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد به ۵ میلی‌لیتر از محلول فوق HCl رقیق اضافه شد تا pH آن بین ۲ تا ۲/۵ تنظیم شود. سپس به محلول حاصل به‌منظور آشکارسازی موقعیت آلکالوئیدها از معرف دراژندروف به‌میزان ۱ میلی‌لیتر اضافه و این ترکیب به‌مدت ۵دقیقه در دور rpm ۱۲۰۰۰ سانتریوفوژ شد. محلول رویی را دور ریخته و رسوب باقیمانده با اتانول ۹۶ در صد شستشو داده

و مجددا سانتریفوژ شد. پس از دور ریختن محلول رویی به رسوب ۱ میلی‌لیتر دی‌سدیم سولفید ۱ درصد اضافه و پس از تکان دادن محلول به‌مدت ۵ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰rpmسانتریفوژ شد. در این مرحله پس از حذف محلول روئی به رسوب قهوه‌ای تشکیل شده ۲ میلی‌لیتر دی سدیم‌سولفید ۱ درصد اضافه و مجددا به‌مدت ۵ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰rpm سانتریفوژ شد. پس از دور ریختن محلول رویی ۲ میلی‌لیتر اسید نیتریک غلیظ به رسوب اضافه و با آب مقطر دو بار تقطیر حجم محلول را به ۵ میلی‌لیتر رسانیده شد. از محلول فوق ۱ میلی‌لیتر برداشته، به آن ۲/۵ میلی‌لیتر محلول تیوره ۳ درصد اضافه و با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر (مدل InstruentUV/Vis.Spectrometer T80+PG) جذب نمونه‌های تیمار شده در طول موج ۴۳۵ نانومتر قرائت شد. دستگاه اسپکتروفتومتر با محلول تیوره ۳ درصد صفر شد. برای رسم منحنی استاندارد از غلظت‌های مختلف بیسموت (شرکت سیگما کشور آمریکا) استفاده شد و غلظت آلکالوئید کل مربوط به نمونه‌های تیمار شده با استفاده از منحنی استاندارد و فرمول خطیy=0/0291x-0/0302 با R2=0/9986 محاسبه گردید.

آنالیز آماری: آزمایشات انجام شده برای هر تیمار در سه تکرار انجام شد. داده‌های به‌دست آمده با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۱۶و با استفاده از روش ANOVA و آزمون Duncan آنالیز شد. در هر اندازه‌گیری ارتباط بین گروه‌ها بررسی و وجود تفاوت معنی‌دار در سطح p<۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

تاثیر نیترات سرب بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی

اثر نیترات سرب بر فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT): در کالوس‌های تیمار شده با غلظت‌های ۱۰ و ۵۰ میکرومولار سرب، فعالیت آنزیم کاتالاز در مقایسه با کنترل افزایش نشان داد (p<۰/۰۵). که این افزایش نسبت به شاهد به‌ترتیب ۳۵ و ۲۴ در صد بود؛ ولی تفاوت معنی‌دار بین کالوس‌های تیمار شده با غلظت‌های ۵۰ و ۱۰ میکرومولار وجود نداشت (جدول۱).

جدول ۱: مقایسه میانگین فعالیت آنزیم‌های کاتالاز (U min-1 mg-1protein)، پراکسیداز (U min-1 mg-1protein) و سوپراکسیددیسموتاز (Umin-1 mg-1protein) کالوس گیاه پریوش با گروه کنترل پنج روز پس از تیمار با غلظت‌های مختلف نیترات سرب (۱۰ و ۵۰ میکرومولار).

شاخص / غلظت(µM)	کاتالاز (U min-1 mg-1protein)	پراکسیداز (Umin-1mg-1protein)	سوپراکسیددیسموتاز (Umin-1 mg-1protein)
۰	۰/۴۱۳ b ±۰/۰۴	۰/۰۵۱c±۰/۰۰۲	۱۸/۹۳۵c ± ۱/۷۹
۱۰	۰/۵۵۸ a ±۰/۰۲	۰/۰۸۱b ± ۰/۰۰۷	۴۵/۵۷۷b ± ۴/۰۳
۵۰	۰/۵۱۶a ±۰/۰۳	۰/۱۰۷ a± ۰/۰۰۲	۶۰/۶۵۶a ± ۲/۰۵

مقادیر به‌صورت میانگین ±انحراف استاندارد می‌باشد. میانگین‌ها با کد حروف متفاوت در یک ستون دارای تفاوت معنی‌دار می‌باشند.

اثر سرب بر فعالیت آنزیم پراکسیداز(POX): داده‌های حاصل از اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در کالوس گیاه پریوش تیمار شده در مقایسه با کنترل نشان داد که اثر سرب بر فعالیت این آنزیم معنی‌دار (P<۰/۰۵) است (جدول۱). فعالیت آنزیم پراکسیداز در غلظت‌های تیمار شده ۱۰ و ۵۰ میکرومولار نسبت به کنترل افزایش نشان داد، بیشترین فعالیت آنزیم در گروه تیمار شده با غلظت۵۰ میکرومولار بود که این افزایش نسبت به شاهد ۱۰۹ درصد بود و در غلظت ۱۰ میکرومولار این افزایش نسبت به نمونه شاهد ۷۲ درصد بود.

اثر نیترات سرب بر فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD): آنالیز آماری داده‌های حاصل از اندازه‌گیری فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز با استفاده از روش ANOVA یک‌طرفه نشان داد که فعالیت آنزیم در کالوس گیاه پریوش تیمار شده با نیترات سرب در مقایسه با کنترل معنی‌دار (p<۰/۰۵) است. مقایسه میانگین فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز نشان داد که تیمار با غلظت‌های ۱۰ و ۵۰ میکرومولار نیترات سرب موجب افزایش فعالیت این آنزیم نسبت به کنترل شده است. بیشترین فعالیت آنزیم سوپراکسید در غلظت ۵۰

میکرومولار بود و نسبت به نمونه شاهد ۲۲۰ درصد افزایش داشت (جدول ۱).

اثر نیترات سرب بر تغییرات بیوشیمیایی

تاثیر نیترات سرب بر مقدار مالون‌دی‌آلدئید کالوس گیاه پریوش: آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از روش ANOVA یک‌طرفه نشان داد که مقدار مالون‌دی‌آلدئید (MDA) در کالوس‌های تیمار شده با نیترات سرب در مقایسه با کنترل معنی‌دار ($p<۰/۰۵$) است. تیمار با غلظت‌های ۱۰ و ۵۰ میکرومولار نیترات سرب موجب افزایش محتوی مالون‌دی‌آلدئید نسبت به گروه کنترل شد. این افزایش وابسته به غلظت بود، به‌طوری‌که مقدار مالون‌دی‌آلدئید در غلظت ۵۰ میکرومولار به بالاترین مقدار خود رسید. این افزایش نسبت به شاهد ۳۱ درصد بود (جدول۲).

اثر سرب بر محتوی پرولین کالوس گیاه پریوش: آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از روش ANOVA یک‌طرفه نشان داد که محتوی پرولین در کالوس‌های گیاه پریوش تیمار شده با نیترات‌سرب در مقایسه با کنترل معنی‌دار است ($p<۰/۰۵$). تیمار با غلظت‌های ۱۰ و ۵۰ میکرومولار نیترات سرب موجب افزایش محتوی پرولین نسبت به گروه کنترل شد. این افزایش وابسته به غلظت بود به‌طوری‌که محتوی پرولین در غلظت ۵۰ میکرومولار به بالاترین مقدار خود رسید که این افزایش نسبت به شاهد ۳۵درصد بود (جدول۲).

اثر سرب بر آلکالوئید کل کالوس گیاه پریوش

مقایسه میانگین آلکالوئید کل نشان داد که تیمار با غلظت‌های ۱۰ و ۵۰ میکرومولار نیترات سرب باعث افزایش معنی‌دار $P<۰/۰۵$ محتوی آلکالوئید کل نسبت به کنترل شده است. مقدار آلکالوئید کل در کالوس‌های تیمار شده با غلظت ۵۰ میکرومولار نسبت به کنترل افزایش قابل توجه ۸۳ درصد داشت و همچنین در غلظت ۱۰ میکرومولار محتوی آلکالوئید ۴۵ درصد نسبت به کنترل افزایش داشت (جدول ۲).

جدول ۲: مقایسه میانگین محتوی مالون‌دی‌آلدئید (µM g-1FW)، پرولین (µM g-1FW) و آلکالوئید (mg g-1FW) کالوس گیاه پریوش با گروه کنترل پنج روز پس از تیمار با نیترات‌سرب (۱۰ و ۵۰ میکرومولار).

شاخص / غلظت(µM)	مالون‌دی‌آلدئید (µM g-1FW)	پرولین (µM g-1FW)	آلکالوئید (mg g-1FW)
۰	۲۰/۳۵۶c±۰/۰۸	۶/۹۳۳c±۰/۱۱	۱۵/۶۰c ± ۰/۴۳
۱۰	۲۳/۵۵۳b±۲/۰۹	۷/۸۲۲b ±۰/۲۱	۲۲/۲۸b ± ۱/۳۵
۵۰	۲۶/۷۷۰a±۰/۸۴	۹/۳۷۷a ±۰/۴۹	۲۸/۵۵a ± ۰/۴۴

مقادیر به‌صورت میانگین ±انحراف استاندارد می‌باشد. میانگین‌ها با کد حروف متفاوت در یک ستون دارای تفاوت معنی‌دار می‌باشند.

بحث

کاتالاز: حضور سرب به‌دلیل اختلال در هموستازی سلول منجر به افزایش H_2O_2 در سلول گیاهی می‌شود (۲۵) زیرا سرب با اتصال به گروه S-H آنزیم‌ها مانند آنزیم‌هایی که در زنجیره انتقال الکترون حضور دارند، جایگزین شدن فلز سرب با کوفاکتور آنزیم‌هایی که در غشای پلاسمایی وجود دارند (سبب نشت الکترون از طریق غشای پلاسمایی) و یا اتصال فلز سرب به اسیدهای نوکلئیک سبب افزایش تولید گونه‌های اکسیژن واکنش‌گر مانند هیدروژن‌پراکسید می‌شود (۲۶). هیدروژن‌پراکسید تولید شده می‌تواند منجر به تخریب غشا و پراکسیداسیون لیپید شود. این مولکول می‌تواند به‌وسیله کاتالاز یا پراکسیداز حذف گردد (۲۷). کاتالاز سبب تجزیه H_2O_2 به آب و اکسیژن می‌شود و از جمله آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی است که در غلظت‌های پایین گونه‌های اکسیژن واکنش‌گر فعال نمی‌شود (۲۸). در مطالعه حاضر میزان فعالیت آنزیم در غلظت ۵۰ و ۱۰ میکرومولار به‌طور معنی‌دار نسبت به شاهد افزایش داشت. در غلظت ۵۰ میکرومولار میزان فعالیت آنزیم نسبت به غلظت ۱۰

میکرومولار کاهش یافت ولی این کاهش معنی‌دار نبود. Jiang و همکاران (۲۹) با بررسی اثر سرب با غلظت‌های ۲۰۰ تا ۸۰۰ میکرومولار بر نهال‌های گیاه Luffa cylindrical نشان دادند که میزان فعالیت آنزیم کاتالاز با افزایش غلظت سرب در کوتیکول، هیپوکوتیکول و ریشه‌چه افزایش یافت. همچنین Verma و همکاران (۱۳) با بررسی تاثیر نیترات‌سرب با غلظت ۵۰۰ تا ۱۰۰۰ میکرومولار به‌مدت ۵ تا ۲۰ روز روی گیاه برنج (Oryza sativa) نشان دادند که فعالیت آنزیم کاتالاز در اثر تیمار با سرب افزایش داشت. افزایش فعالیت کاتالاز در تیمار با فلزات سنگین به‌دلیل افزایش تولید سوبسترای آن مانند H_2O_2 در سلول‌های گیاهی و به‌منظور مقابله با شرایط تنش می‌باشد (۲۹ و۳۰). میزان فعالیت آنزیم کاتالاز وابسته به‌شدت، مدت و نوع تنش است (۱۴). در تضاد با این نتایج آزمایش‌ها دیگر نشان دادند که در غلظت‌های بالای تیمار با سرب فعالیت آنزیم کاهش می‌یابد مثلا Mishra و همکاران (۳۰) تاثیر غلظت‌های ۱۰ تا ۱۰۰ میکرومولار از سرب را به‌مدت ۲ تا ۷ روز روی گیاه L Ceratophyllum demersum بررسی کردند. نتایج نشان داد که در غلظت‌های پایین و مدت زمان کوتاه از تیمار فعالیت آنزیم افزایش و با افزایش غلظت و مدت زمان فعالیت آنزیم کاهش می‌یابد (۳۰). Malecka و همکاران (۲۷) نشان دادند که در ساقه‌های برنج با افزایش غلظت سرب تا 1mM فعالیت آنزیم کاهش می‌یابد. این نشان می‌دهد که فعالیت سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانتی وابسته به غلظت سرب است (۳۱). در نتیجه در غلظت‌های بالای سرب و یا طولانی بودن مدت زمان تیمار با سرب تولید H_2O_2 و رآدیکال‌های آزاد دیگر در سلول به‌شدت زیاد است لذا موجب بازدارندگی در متابولیسم شده و فعالیت آنزیم کاتالاز کاهش می‌یابد (۱۳). همچنین کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز در غلظت‌های بالا احتمالا به‌دلیل غیرفعال شدن آنزیم توسط ROS، کاهش سنتز آنزیم و یا تغییر در اجتماع زیر واحدهای آنزیم می‌باشد از طرفی ممکن است فعال شدن پروتئازهای پراکسی‌زومی دلیل دیگری برای کاهش فعالیت آنزیمی باشد (۳۰). همچنین کاتالاز آنزیمی است که حاوی آهن است و سرب سبب کاهش سنتز هم می‌شود و از این‌رو فعالیت کاتالاز در غلظت بالا کاهش می‌یابد (۳۲). در مطالعه حاضر افزایش فعالیت کاتالاز در کالوس‌های تیمار شده در مقایسه با کنترل احتمالا در نتیجه تولید پراکسیدهیدروژن است. از طرفی در این مطالعه میزان فعالیت آنزیم در غلظت ۵۰ میکرومولار نسبت به ۱۰ میکرومولار کاهش می‌یابد ولی این کاهش معنی‌دار نبود این امر احتمالا در نتیجه افزایش تولید پراکسید هیدروژن در غلظت ۵۰ میکرومولار از تیمار است که سبب بازدارندگی در فعالیت آنزیم می‌شود. محققین بدیهی دانسته‌اند که کاتالاز ممکن است در فرایندهای سیگنالینگ سلولی از طریق کنترل هیدروژن پراکسید نقش داشته باشد و وقتی که فعالیت کاتالاز کاهش می‌یابد فعالیت آنزیم‌های دیگر حذف کننده ROS از طریق یک مسیر جبرانی افزایش می‌یابند (۲۷). در این شرایط که میزان تولید هیدروژن‌پراکسید افزایش می‌یابد (۱۴) پراکسیداز نقش بسیار مهم‌تری از کاتالاز درحذف هیدروژن پراکسید دارد. از این‌رو فعالیت گایاکول پراکسیداز نسبت کاتالاز در غلظت ۵۰ میکرومولار افزایش می‌یابد (۲۷). گزارشی از تاثیر نیترات سرب بر فعالیت آنزیم کاتالاز کالوس یافت نشد.

آنزیم پراکسیداز: گایاکول‌پراکسیداز شاخص تنش فلزات سنگین است و در سیتوزل، دیواره سلولی و واکوئل واقع شده است (۳۳). افزایش فعالیت گایاکول‌پراکسیداز ممکن است بر روند پیری در گیاه تاثیر داشته باشد. میزان فعالیت پراکسیداز به تولید H_2O_2 و ترکیبات فنلی بستگی دارد (۳۴). افزایش میزان سرب در سلول گیاهی سبب افزایش گونه‌های اکسیژن واکنش‌گر مانند پراکسیدهیدروژن و سوپراکسید در سلول شده لذا موجب آسیب مولکولی به گیاهان می‌شود. این گونه‌های اکسیژن واکنش‌گر با لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک واکنش می‌دهند و سبب پراکسیداسیون لیپیدی، آسیب به غشا و غیرفعال شدن آنزیم‌ها می‌شوند (۳۵). سرب سبب افزایش غلظت کلسیم در گیاه می‌شود (۳۶). مشاهده شده که افزایش غلظت کلسیم سیتوزولی به‌نوبه خود آنزیم NADPH اکسیداز غشایی پلاسمایی را فعال می‌کند که این امر منجر به القای تنش اکسیداتیو و افزایش تولید پراکسیدهیدروژن می‌شود (۳۷). با افزایش تولید پراکسیدهیدروژن میزان رادیکال هیدروکسیل در سلول افزایش می‌یابد. رادیکال هیدروکسیل سبب آسیب به قسمت‌های مختلف مولکول DNA مانند بازهای پورین و پیرمیدین و همچنین دئوکسی ریبوز می‌شود. لذا سبب حذف باز، دیمرهای پیرمیدین، شکسته شدن رشته DNA و تغییر بازها که شامل آلکیل دارشدن و اکسایش است می‌شود (۱۰) در نتیجه سرب سبب مهار فعالیت‌های متابولیکی، رشد سلولی و کاهش نسبت DNA به RNA می‌شود، به‌علاوه سبب افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن می‌شود (۳۸). Wang و همکاران (۳۶) نشان دادند که میزان فنول و فلاونوئید در گیاه Vallisneria

natans که با غلظت‌های ۱۰ تا ۱۰۰ میکرومولار از سرب به‌مدت ۱ تا ۷ روز تیمار شده بود افزایش می‌یابد ولی پس از سپری شدن ۶ روز در غلظت ۷۵ میکرومولار محتوی فنلی و فعالیت آنزیم‌ها سنتز کننده این ترکیبات کاهش یافت. در این گیاه دیده شده که، تیمار با غلظت‌های پایین فلز سرب سبب افزایش غلظت فلزاتی مانند آهن، مس و روی نسبت به کنترل می‌شود و در نتیجه افزایش غلظت این قبیل فلزات فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیلیاز (PAL) و بیان بسیاری از ژن‌هایی را که مرتبط با بیوسنتز ترکیبات فنولیک هستند افزایش می‌دهد. پراکسیداز با تجزیه H_2O_2، ترکیبات فنلی (مانند گایاکول به‌عنوان دهنده الکترون) را به ترکیبات فنوکسی اکسید می‌کند و این ترکیبات در تشکیل اجزای دیواره سلولی مانند لیگنین نقش دارد (۳۳ و ۳۹). در مطالعه حاضر نتایج حاصل از آنالیز داده‌ها نشان داد که تیمار با نیترات‌سرب سبب افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم نسبت به کنترل شده است. Garnczarska و همکاران (۴۰) تاثیر غلظت‌های ۱، ۳ و ۵ میکرومولار از سرب را به‌مدت ۲۴ ساعت بر فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز ریشه خزه (Lemna minir) بررسی نمودند. همچنین Dey (۴۱) گیاه برنج را با غلظت‌های ۰تا۲۰۰ ماکرومولار از نیترات سرب تیمارنمود هر دو محقق نشان دادند که میزان فعالیت گایاکول‌پراکسیداز در اثر تیمار با سرب افزایش می‌یابد. افزایش فعالیت پراکسیداز در نتیجه تیمار با سرب به‌دلیل پاسخ سلول به آسیب ایجاد شده تنش سرب موجب افزایش آزاد شدن آنزیم‌های پراکسیداز واقع در دیواره سلول می‌شوند (۲۷ و ۴۱). این افزایش احتمالا یک واکنش حفاظتی برای به تاخیر انداختن پیری است زیرا آنزیم پراکسیداز واکنش‌های که سبب حفاظت گیاهان در مقابل آسیب رادیکال‌های آزاد می‌شود را کاتالیز می‌کند (۴۲). لذا پراکسیداز در ایجاد مقاومت گیاه در برابر آسیب اکسیداتیو که به‌وسیله سرب القا می‌شود نقش دارد (۱۳ و ۳۰). Mishra و همکاران (۳۰) گیاه Ceratophyllum demersum را با غلظت‌های ۱۰ تا ۱۰۰ میکرومولار از سرب به‌مدت هفت روز تیمار کردند، نتایج نشان داد که در غلظت‌های پایین و مدت زمان کوتاه از تیمار فعالیت آنزیم افزایش داشت؛ اما با افزایش مدت و غلظت تیمار فعالیت آنزیم کاهش یافت. در گیاه گندم (Triticum aestivum) که در خاک‌های آلوده به نیترات سرب با غلظت‌های ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۵۰۰۰ میکرومولار رشد می‌کند (۳۹) و همچنین در گیاه Ceratophyllum demersum که به‌مدت ۷ روز در معرض تیمار با سرب بود میزان فعالیت گایاکول پراکسیداز کاهش یافت (۳۰). در غلظت‌های بالاتر و مدت زمان طولانی تیمار به‌دلیل افزایش تولید ROS، اختلال در متابولیسم سلول و القای تنش اکسیداتیو میزان فعالیت آنزیم کاهش می‌یابد (۲۷، ۳۰ و ۳۹). همچنین به نظر محققین کاهش فعالیت پراکسیداز در غلظت بالا سرب در نتیجه از دست دادن نفوذپذیری غشا و کاهش توانایی زیستی به‌دلیل اثرات مضرر رادیکال‌های آزاد می‌باشد (۴۲). احتمالا اختلاف موجود در فعالیت آنزیم پراکسیداز می‌تواند به‌دلیل تفاوت در گونه گیاهی و غلظت سرب مورد استفاده برای تیمار باشد که متعاقبا سبب پاسخ های سلولی متفاوت وابسته به گونه گیاهی و غلظت سرب می‌شود. گزارشی از تاثیر نیترات سرب بر فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز کالوس یافت نشد.

سوپر اکسید دیسموتاز: SOD اولین خط دفاعی سلول در برابر ROS است. معمولا رادیکال سوپراکسید اولین رادیکال آزادی است که در طی تنش تولید می‌شود و SOD سریعا رادیکال سوپراکسید را به پراکسید هیدروژن و اکسیژن مولکولی تبدیل می‌کند و با حذف سوپراکسید نقش حیاتی‌تری را در سیستم آنتی‌اکسیدانتی نسبت به آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز ایفا می‌کند لذا سبب افزایش مقاومت گیاهان به تنش‌های محیطی می‌شود (۲۸، ۴۳ و ۴۴). در اکثر مطالعات انجام شده میزان فعالیت SOD متغیر است. این امر تا حدودی به‌دلیل تفاوت در فاکتورهای مورد آزمایش مانند گونه‌گیاهی، نوع بافت، نوع فلز، غلظت فلز مورد تیمار، و مدت زمان تیمار می‌باشد (۲۶). در مطالعه حاضر نیز میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در اثر تیمار با غلظت‌های ۱۰ و ۵۰ میکرومولار نیترات‌سرب نسبت به شاهد افزایش معنی‌دار یافت و بیشترین فعالیت آنزیم در غلظت ۵۰ میکرومولار از تیمار بود. مشاهده شده که فعالیت SOD در شرایط تیمار با فلزات سنگین افزایش می‌یابد. Kaur و همکاران (۳۹) با تیمار گیاه گندم (Triticum aestivum) با غلظت‌های ۱۰۰، ۵۰۰ و ۲۵۰۰۰ میکرومولار نیترات سرب نشان دادند که فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در طی تنش افزایش یافت. در مطالعه حاضر نیز میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در اثر تیمار با غلظت‌های ۱۰ و ۵۰ میکرومولار نیترات‌سرب نسبت به شاهد افزایش معنی‌دار یافت و بیشترین فعالیت آنزیم در غلظت ۵۰ میکرومولار از تیمار بود. افزایش فعالیت SOD به‌دلیل مقابله با تنش اکسیداتیو و محافظت از سیستم دفاعی گیاه در برابر آسیب اکسیداتیو است

(۲۷)؛ همچنین افزایش فعالیت آنزیم به دلیل افزایش سوپراکسید می‌باشد که سبب افزایش سنتز de novo از پروتئین‌های آنزیمی می‌شود احتمالا یون‌های سوپراکسید از طریق نقش سیگنالی سبب افزایش بیان ژن‌های سوپراکسیددیسموتاز می‌شوند (۱۳) همچنین Mishra و همکاران (۳۰) با بررسی میزان فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز در گیاه Ceratophyllum demersum که به‌مدت ۷ روز با غلظت‌های ۱۰ تا ۱۰۰ میکرومولار سرب آلوده شده بود نشان دادند که در مدت زمان و غلظت‌های کم تیمار میزان فعالیت آنزیم افزایش، ولی با افزایش زمان و غلظت تیمار میزان فعالیت آنزیم کاهش می‌یابد. کاهش فعالیت آنزیم در غلظت‌های بالا احتمالا به‌دلیل افزایش تولید H_2O_2 در سلول و غیر فعال شدن آنزیم توسط H_2O_2 و یا اتصال فلز سرب به جایگاه فعال آنزیم می‌باشد و در نتیجه فعالیت آنزیم کاهش می‌یابد (۴۵). گزارشی از تاثیر نیترات سرب بر فعالیت سوپراکسیددیسموتاز کالوس یافت نشد.

بررسی تاثیر نیترات سرب بر تغییرات بیوشیمیایی کالوس گیاه پریوش

مالون دی آلدئید: پراکسید شدن لیپید به‌عنوان شاخصی از آسیب اکسیداتیو می‌باشد و در طی پیری مشخص کننده ازدیاد رادیکال‌های آزاد است که همراه با افزایش آلدئیدها و کتون‌های سمی است که برای گیاه خطرناک هستند (۴۶). تولید H_2O_2 در سلول‌های گیاهی از طریق واکنش‌های بیوشیمی موجود در قسمت‌های مختلف سلول مانند تنفس نوری و یا از طریق فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز و گزانتین‌اکسیداز انجام می‌شود. لیپیدهای غشایی به‌دلیل پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع بسیار مستعد آسیب به‌وسیله رادیکال‌های آزاد هستند. افزایش میزان H_2O_2 در اثر تنش سبب افزایش تولید رادیکال هیدروکسیل از طریق واکنش هابر– وایس می‌شود. رادیکال هیدروکسیل تولید شده می‌تواند سبب افزایش واکنش‌های زنجیره‌ای شود که به غشا آسیب می‌رسانند. با این حال H_2O_2نیز جزو انواع اکسیژن واکنش‌گر می‌باشد می‌باشد که موجب پراکسید شدن لیپیدی، آسیب به غشا و در نهایت مرگ سلول می‌شود (۳۹). طبق گزارش Mishra و همکاران (۳۰) در گیاه Ceratophyllum demersum که به‌مدت ۷ روز با غلظت‌های ۱۰ تا۱۰۰ میکرومولار سرب تیمار شد بود میزان مالون‌دی‌آلدئید افزایش می‌یابد. Zacchini و همکاران (۱۷) تاثیر ۰/۵ میلی‌مولار از کلرید سرب را به‌مدت ۶ ماه روی کالوس ذرت (Zea mays L) مطالعه کردند و نتایج نشان داد که میزان مالون‌دی‌آلدئید ۴۲ درصد نسبت به کنترل افزایش یافته است. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که در کالوس گیاه پریوش تحت تیمار نیترات سرب، میزان مالون‌دی‌آلدئید به‌طور معنی‌داری نسبت به کنترل افزایش داشته است ($p<0/05$). افزایش در غلظت مالون‌دی‌آلدئید ناشی از پراکسیداسیون لیپیدها دلالت بر ایجاد رادیکال‌های آزاد در بافت است. گرچه فرایندهای تولید ROS در شرایط نرمال آهسته است، اما سرب سبب افزایش تولید آنها می‌شود (۱۳). لذا گونه‌های فعال اکسیژن سبب القای تنش اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپیدی در گیاه می‌شوند (۳۹) و در نتیجه میزان MDA در تیمار با سرب افزایش می‌یابد (۴۷).

پرولین: یکی از پاسخ‌های عمومی سلول به تغییرات فشار اسمزی خارجی تجمع متابولیت‌هایی است که قابلیت انحلال دارند ولی متابولیسم طبیعی گیاه را مختل نمی‌کنند (۴۸). در اکثر گیاهان میزان پرولین در تنش‌های زیستی و غیر زیستی افزایش می‌یابد (۴۹). نقش‌های فیزیولوژیکی متعددی برای تجمع پرولین به تنش گزارش شده که مهم‌ترین آن‌ها تاکید بر نقش پرولین به‌عنوان یک ماده تنظیم کننده اسمزی و عامل حفاظت کننده آنزیم‌های سیتوپلاسمی و ساختمان غشا است (۵۰) زیرا تجمع اسمولایت‌ها در سیتوزول امکان تعدیل فشار اسمزی را در سلول فراهم می‌آورد؛ لذا مانع تجمع یون‌های سمی مانند سدیم می‌شود که برای پروتئین‌ها و غشاها زیان‌آور است (۵۱). همچنین تجمع پرولین مسئول تعادل اسمتیکی برای کاهش پروتئین‌های محلول در سلول می‌باشد (۵۲). پرولین در بهبود تنش‌های محیطی، از جمله تنش فلزات سنگین در گیاهان و میکروارگانیسم‌ها نقش مهمی ایفا می‌کند در سلول‌های تحت تنش نقش آنتی‌اکسیدانتی دارد و به‌عنوان جاروب کننده گونه‌های اکسیژن واکنش‌گر و یک محافظ مولکولی جهت حفظ ساختار پروتئین می‌باشد (۵۳-۵۵). تجمع پرولین هنگامی رخ می‌دهد که پتانسیل آبی برگ به زیر حد آستانه رسیده باشد و بالای این محدوده تغییرات اندک است (۵۰). در مطالعه‌ای که توسط John و همکاران (۵۶) روی گیاه Brassica juncea L. انجام شده مشخص گردید که غلظت ۰ تا ۱۵۰۰ میکرومولار از سرب تاثیر بسیار اندکی بر تجمع پرولین دارد. Singh و همکارانش (۵۷) در تحقیقات خود که بر روی نهال‌های گیاه (Vingna mungo L) که با غلظت‌های ۱۰ تا ۱۰۰ میکرومولار

سرب تیمار شد بودند نشان دادند که با افزایش غلظت فلز، میزان سنتز پرولین افزایش می‌یابد. در مطالعه حاضر اثر غلظت‌های متفاوت نیترات سرب بر افزایش تجمع پرولین معنی‌دار (p<۰/۰۵) بوده است. تحقیقات انجام شده توسط محققان دیگر نیز با نتایج به‌دست آمده در مطالعه حاضر مطابقت دارد (۵۶ و ۵۸). محقین نتیجه گرفته‌اند که افزایش تجمع پرولین در تنش سرب ممکن است به‌دلیل افزایش سنتز و یا کاهش تجزیه پرولین و یا هر دو باشد (۵۸). بدین ترتیب با افزایش پرولین در سلول اسیدیفیکاسیون سلولی القا شده توسط تنش را کاهش می‌دهد (۴۹). دلایلی دیگری که برای افزایش تجمع پرولین در حین تنش پیشنهاد شده عبارتنداز: الف) تحریک سنتز آن از اسید گلوماتیک ب) جلوگیری از اکسیداسیون آن در طول تنش ج) تخریب و اختلال در فرایند سنتز پروتئین است (۵۹). علاوه بر این زمانی‌که تنش رخ می‌دهد در زنجیره انتقال الکترون، الکترون‌های زیادی تولید می‌شوند و این امر سبب افزایش تولید رادیکال‌های آزاد می‌شود (۱۴). در شرایط تنشی در سلول گیاهی میزان سنتز پرولین افزایش می‌یابد (۴۹) زیرا هنگامی‌که پرولین تولید می‌شود سبب مصرف NADPH و تولید NADP+ می‌شود و این ترکیب با مصرف الکترون‌های اضافی تولید شده در زنجیره انتقال الکترون از تولید گونه‌های فعال اکسیژن جلوگیری می‌کند.

آلکالوئید: آلکالوئیدها یک گروه گسترده از متابولیت‌های ثانویه با وزن مولکولی پایین و حاوی نیتروژن هستند این ترکیبات عمدتا از اسیدآمینه‌ها مشتق می‌شوند (۶۰). گزارش شده که آلکالوئیدها سبب حفاظت سلول‌های گیاهی در شرایط تنش می‌شوند (۶۱). تیمار گیاه پریوش با غلظت‌های یکسان ۵ میلی‌مولار سرب، نیکل و منیزیم به‌مدت ۱۵ روز سبب افزایش محتوی آلکالوئیدهای ریشه شد (۴). در مطالعات دیگر که توسط Pandey (۶۲) انجام شد تاثیر کلرید سرب و کلرید کادمیوم بر محتوی آلکالوئید گیاه پریوش نشان داد که میزان آلکالوئید کل نسبت به شاهد کاهش یافت. احتمالا در غلظت‌های بالا سرب روی متابولیسم و فرآیندهایی که سبب تولید ATP در سلول می‌شوند اثرات منفی دارد در مطالعه حاضر مقایسه میانگین آلکالوئید کل نشان داد که تیمار با غلظت‌های۱۰ و ۵۰ میکرومولار باعث افزایش معنی‌دار محتوی آلکالوئید کل نسبت به کنترل می‌شوند. افزایش میزان آلکالوئید سبب افزایش مقاومت گیاه به فلزات سنگین می‌شود شاید این افزایش به‌دلیل این است که برخی از این فلزات به‌عنوان پیامبرهای ثانویه عمل می‌کنند و سبب افزایش سنتز آلکالوئیدها می‌شوند (۴). با توجه به اینکه اهمیت آلکالوئیدها درحفاظت سلول‌های گیاهی تحت تنش مشخص شده است، لذا می‌توان گفت که افزایش یا کاهش میزان آلکالوئید کل در یک گیاه متناسب با نوع تنش می‌باشد.

نتیجه گیری

سرب به‌دلیل القا تنش اکسیداتیو و افزایش تولید رادیکال آزاد سبب افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی و محتوی پرولین و آلکالوئید و پراکسیداسیون لیپید در کالوس گیاه پریوش می‌شود.

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر طبق قرارداد شماره ۹۱/۹۸۸۱ مورخ ۹۱/۱۲/۲۷ با حمایت مالی حوزه معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه اراک انجام شده که بدین‌وسیله از حوزه فوق الذکر تشکر به‌عمل می‌آید.

منابع

1. Nammi S, Boini MK, Lodagala SD, Behara RB. The fresh leaves of Catharanthus roseus Linn. Reduces blood glucose in normal and alloxan diabetic rabbits. BMC Complement Altern Med. 2003; 3(4); 1-4.

2. Idrees M, Naeem M, Masroor M, Khan A. The superiority of cv ‘rosea’ over cv ‘alba’ of periwinkle (Catharanthus roseus L) in alkaloid production and other physiological attributes. Plant Physiol. 2011; 34:81-8.

3. Shams KA, Nazif NM, Azim NSA, Shafeek KAA, et al. Isolation and characterization of antineoplastic alkaloids from Catharanthus roseus l. Don. cultivated in Egypt. African Journal of Traditional, Complementary, Altern Med. 2009; 6(2):118.

4. Srivastava NK, Srivastava AK. Influence of Some Heavy Metals on Growth, Alkaloid Content and Composition in Catharanthus roseus LIndian J Pharm Sci. 2010; 72(6): 775–8.

5. Yaron B, Calvet R, Prost R. Soil Pollution: Processes and Dynamics. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. 1996; 312.

6. Sebastiani L, Scebba F, Tognetti R. Heavy metal accumulation and growth responses in poplar clones Eridano (Populus deltoides × maximowiczii) and I-

214(P. × euramericana) exposed to industrial waste. Environ. Exp. Bot. 2004; 52:79–88.

7. Pais I, Jones J. The Handbook of Trace elements. St Lucie Press. 2000: 115-6.

8. Islam E, Yang XE, Li TQ, Liu D, et al. Effect of Pb toxicity on root morphology, physiology and ultrastructure in the two ecotypes of Elsholtzia argyi. J Hazard Mater. 2007; 147(3): 806–16.

9. Pichtel J, Carol AS. Vegetative Growth and Trace Metal Accumulation on Metalliferous Wastes. Environ. Poll. 1998; 27: 618-24.

10. Pourrut B, Shahid M, Dumat C, Winterton P, et al. Lead Uptake, Toxicity, and Detoxification in Plants. Rev. Environ. Contamin. Tox. 2012; 213:113-36.

11. Apel K, Hirt H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. Ann. Rev. Plant Biol. 2004; 55: 373–399.

12. Neill S, Boini MK, Lodagala SD, Behara RB. The fresh leaves of Catharantus roseus Linn. Reduces blood glucose in normal and alloxan diabetric rabbites. BMC Complement Altern Med. 2003; 3(4).

13. Verma S, Dubey RS. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant in growing rice plants. Plant Sci. 2003; 164: 1489–1498.

14. Sharma A, Jha AM, Dubey RS, Pessarakli M. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plant under stressful conditions. J. botany. 2012; 26: 1–26.

15. Gamburg OL, Miler RA, Ojima K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp Cell Res. 1968; 50:148-51.

16. Saifullah HS. Callus induction and cell suspension culture production of catharantthuse roseus for biotransformation studies of 2-caryophyllene oxide. Pak J Bot. 2011; 43(1): 467-73.

17. Zacchini M, Rea E, Tullio M, Agazio M. Increased antioxidative capacity in maize calli during and after oxidative stress induced by a long lead treatment. Plant Physiol. Biochem. 2002; 41: 49–54.

18. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the phenol Reagent. J Biol chem. 1951; 193: 265- 75.

19. Cakmak I, Marschner H. Manesium Deficiency And High Light Inensity Enhance Activities Of Superoxide Dismutase, Ascrobate Peroxidase, And Glutatione Reductase In Bean Leaves. Plant Physiol. 1992; 98(4): 1222-7.

20. Polle A, Eiblmeier M, Sheppard L, Murray M. Responses Of Antioxidative Enzymes To Elevated Co2 In Leaves Of Beech (Fagus Sylvatica L.) Seedlings Grown Under A Range Of Nutrient Regimes. Plant Cell Environ. 1997; 20: 1317–21.

21. Giannopolitis CN, Ries SK. Superoxide Dismutases I. Occurrence In Higher Plants. Plant Physiol. 1977; 59(2): 309-14.

22. Heath RL, Packer L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation, Arch. Biochem. Biophys. 1968; 125(1): 189–98.

23. Bates LS. Rapid Determination Of Free Proline For For Water-Stress Studies. Plant And Soil. 1973; 39: 205-7.

24. Sreevidya N, Mehrotra S. Spectrophotometric Method for Estimation of AlkaloidsPrecipitable with Dragendorff's Reagent in PlantMaterial. J. AOAC Int. 2003; 86(6): 1-4.

25. Sharma P, Dubey RS. Lead toxicity in plants. Brazilian Journal of Plant Physiology Print version ISSN. 17: 49–55, 2005.

26. Chin L. Investigations into Lead (Pb) Accumulation in Symphytum officinale L.: A Phytoremediation Study. 2007; 6 (10): 1182-1192.

27. Malecka A, Piechalak A, Mensinger A, Hanc D, Baralkiewicz D. Tomaszewska,B. Antioxidative Defense System in Pisum sativum Roots Exposed to Heavy Metals (Pb, Cu, Cd, Zn). Pol. J. Environ. Stud.2012;21(6):1721-30

28. Gill SS, Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinert in abiotic stress in crop plants. Plant Physiol. Biochem. 2010; 48(12): 909-30.

29. Jiang N, Luo X, Zeng J, Yang Z, et al. Lead toxicity induced growth and antioxidant responses in Luffa cylindrica seedlings. Int. j. agri. biol. 2010; 12(2): 205–10.

30. Mishra S, Srivastava S, Tripathi R, Kumar R, Seth C, Gupta D. Lead detoxification by coontail (Ceratophyllum demersum L.) involves induction of phytochelatins and antioxidant system in response to its accumulation. Chemosphere. 2006; 65(6): 1027–39.

31. Gwozdz EA, Przymusinski R, Rucinska R, Deckert J. Plant cell responses to heavy metals: molecular and physiological aspects. Acta physiol. Plant. 1997; 19(4): 459-65.

32. Frcal N, Gurcr-Orthan H, Aykin- Burns.A. Toxic Metals and Oxidative Stress Part1: Mechanisms

Invoved in Metal Indced Oxidative Damage. Med. Chem. 2001; 1(6): 529-39.

33. Malecka A, Jarmuszkiewicz W, Tomaszewska B. Antioxidative defence to lead stress in subcellular compartments of pea root cells. Acta Biochim. Pol. 2001; 48(3): 687-98.

34. Mohan BS, Hosetti BB. Potential phytotoxicity of lead and cadmium to Lemna minor grown in sewage stabilization ponds. Environ. Poll. 1997; 98: 233- 8.

35. Kumar SP, arman AM, Kumari BDR. Identification of differentially expressed proteins in response to Pb stress in Catharanthus roseus. Af. J. Environ. Sci. Tech. 2011; 5(9): 689-99.

36. Wang C, Lu J, Zhang S, Wang P, et al. Effects of Pb stress on nutrienttuptakeand secondary metabolismin submerged macrophyte Vallisneria natans. Ecotoxicol. Environ. Safe. 2011; 74(5): 1297–303.

37. Harding SA, Roberts.DM. Transgenic tobacco expressing foreign calmodulin genes. Show an enhanced production of active oxygen species. EMBO J. 1997; 16(6): 1137-44.

38. Perez RR, Sousa CA, Vankeersbilck T, Machado MD, et al. Evaluation of the Role of Glutathione in the Lead-Induced Toxicity in Saccharomyces cerevisiae. Springer. 2013; 67(3): 300-5.

39. Kaur G, Singh HP, Batish DR, Kohli RK. Growth, photosynthetic activity and oxidative stress in wheat(Triticum aestivum) after exposure of lead to soil. J. Environ. Biol. 2012; 33(2): 265-9.

40. Garnczarska M, Ratajczac L. Metabolic responses of Lemna minor to lead ions I. Growth, chlorophyll level and activity of fermentative enzymes. Acta Physiologia Plantarum 2000; 22(4): 423–7.

41. Dey SK, Dye J, Petra S, Pothole D. Chang in the antioxidantiveenzyme activities and lipid peroxidation in wheat seedling exposed to Cadmium and Lead stress. Braz J Plant physiol. 2007; 19(1): 53-60.

42. Bhardwaj P, Chaturvedi AK, Prasad P. Effect of Enhanced Lead and Cadmium in soil on Physiological and Biochemical attributes of Phaseolus vulgaris L. Nat. Sci. 2001;7(8): 63-75.

43. Bernardi R, Nali C, Gargiulo R, Pugliesi CT, et al. Protein pattern and fe-superoxide dismutase activity of bean plants under sulphur dioxide stress. Phytopathol. 2001; 149: 477-80.

44. Shi Q, Ding F, Wang X, Wei M. Exogenous Nitric Oxide Protects Cucumber Roots Against Oxidative Stress Induced By Salt Stress. Plant Physiol. Biochem. 2007; 45(8): 542-50.

45. Fatima RA, Ahmad M. Certain antioxidant enzymes of Allium cepa as biomarkers for the detection of toxic heavy metals in wastewater. Sci Total Environ. 2004; 346(1-3): 256–73.

46. Dat J, Vandenabeele S, Vranová E, Van Montagu MV, et al. Dual Action Of The Active Oxygen Species During Plant Stress Responses. Cell. Mol. Life Sci. 2000; 57(5): 779–95.

47. Keser G, Saygideger S. Effects of Pb on the activities of antioxidant enzymes in watercress, Nasturtium officinale R Br. Biol Trace Elem Res. 2010; 137(2): 235-43.

48. Orcutt DM, Nilsen ET. The Physiology of Plants Under Stress, Soil and Biotic Factors. John Wiley, New York. 2000. 8(1):75–78.

49. Tan J, Zhao H, Hoang J, Han Y, et al. Effects of exogenous nitric oxide on photosynthesis, antioxidant capacity and proline accumulation in wheat Seedlings subjected to osmotic stress. Agri. Sci. 2008; 4: 307-13.

50. Levitt J. Responses of plant to environmental stress. Water, radiation, salt and other stresses. Academic Press, New York. 1980. 102: 4203–4208.

51. Wallace DM. Larg and Small Scall Phenol Extraction Methods in Enzymology. Academic Press, New York. 1987. 33–41.

52. Jain M, Mathur G, Koul S, Sarin NB. Ameliorative Effects Of Proline On Salt Stress-Induced Lipid Peroxidation In Cell Lines Of Groundnut (Arachis HypogaeaL.). Plant Cell Rep. 2001; 20: 463–8. .

53. Smirnoff N, Cumbes QJ. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. Phytochem. 1989; 28: 1057–60.

54. Siripornadulsil S, Traina S, Verma DS, Sayre RT. Molecular mechanisms of prolinemediated tolerance to toxic heavy metals in transgenic microalgae. Plant Cell. 2002; 14: 2837-47.

55. Matysik J, Alia Bhalu B, Mohanty P. Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants. Curr. Sci. 2002; 82: 525-32.

56. John R, Ahmad P, Gadgil K, Sharma S. Heavy metal toxicity: Effect on plant growth, biochemical parameters and metal accumulation by Brassica juncea L. Int. J. Plant Pro. 2009; 3(3): 1735-8043.

57. Singh GRKA, Reshma RK, Ahmad M. Effect of lead and nickel toxicity on chlorophyll and proline content of Urd (Vigna mungo L.) seedlings. Int. J. Plant Physiol. Biochem. 2012; 4(6): 136-41.

58. Naderi N, Mirzamasoumzadeh B, Aghaei A. Effects of different levels of Lead (Pb) on

physiological characteristics of sugar beet. International Journal of Agriculture and Crop Sciences. 2013; 5(10): 1154-7.

59. Liamas A, Ullrich CI, Sanz A. Cadmium effects on transmembrance electrical potential difference, respiration and membrane permeability of rice (Oryza sativa) roots. Plant and Soil. 2000; 219: 21-8.

60. Ziegler j, Facchini PJ. Alkaloid Biosynthesis: Metabolism and Trafficking. Annu Rev Plant Biolm. 2008; 59:735-69.

61. Tumova L, Tuma J, Cheel J, Dusek J. Oxidative stress and flavonoid production by Onois arvensis L. . culture in vitro, pp. 2008; 24.

62. Pandey S, Gupta K, Mukherjee AK. Impact of cadmium and lead on Catharanthus roseus - A phytoremediation study. J. Environ. Bio. 2007; 28(3): 655-62.

Journal of Cell & Tissue (JCT)
Spring 2015; 6(1): 9-21

Original Article

Investigation the Effect of Lead on the Activity of Antioxidant Enzymes, Level of Prolin and Alkaloid in the Callus of *Catharantus roseus*

Amirjani MR, Ph.D.[1*], Abnosi MH, Ph.D.[1], Mahdiyeh M, Ph.D.[1], Ghareh shaikhloo S, M.Sc.[2]

1. Department of Biology, Faculty of Science, Arak University, Arak 38156-8-8349
2. M.Sc. Student of Plant Physiology, Department of Biology, Faculty of Science, Arak University, Arak

* Email corresponding author: m-amirjani@araku.ac.ir

Received: 5 Jan. 2014 Accepted: 19 May. 2015

Abstract

Aim: Periwinkle (Catharanthus roseus) is a medicinal plant as a result of which its medicinal compounds and alkaloids have been under a great consideration. Lead is one of the most common heavy metal contaminant in the environment. Induction of oxidative stress is a result of the presence of heavy metals in plant cells. Due to the problem of heavy metal pollution and the dangers of pollution to plant in this study, the effects of oxidative stress caused by the presence of lead on activity of antioxidant enzymes, level of prolin and alkaloid in callus grown on MS medium with different concentrations of lead were investigated.

Material and Methods: Catharanthus roseus seeds were planted in the vase containing Pearlite, then to induce callus, the leaves under the sterile condition were put on the solid MS culture media. Calluses were subcultured after three weeks, the calluses after two subculture were treated with different concentrations of lead nitrate (0, 10 and 50 μM). The activity of antioxidant enzymes and content of proline and alkaloid were assayed. Data analyzed at $P \leq 0.05$ level using SPSS software.

Results: The results of this study showed that the activity of antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POX), catalase (CAT) and the level of proline and alkaloid as well as lipid peroxidation increased significantly ($p<0.05$) in comparison to control.

Conclusion: Due to induction of oxidative stress, lead was caused an increase in antioxidant enzymes activity and the content of malondialdehyde, alkaloid and proline.

Keywords: Alkaloid, Antioxidative enzymes, Lead, Lipid peroxidation, Oxidative stress