

بررسی اثر سرب بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانسی، میزان پرولین و آلکالوئید کل کالوس گیاه پریش

محمد رضا امیرجانی ^{۱*} Ph.D.، محمدحسین آبنوسی ^۲ Ph.D.، مجید مهدیه ^۱ Ph.D.، ساراقره‌شیرلو ^۱ M.Sc.

۱- دانشگاه اراک، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی، کدپستی ۳۸۱۵۶-۸-۸۳۳۹۹

۲- دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی گیاهی، دانشگاه اراک، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی، اراک، ایران

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

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۲/۲۹

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۰/۱۵

چکیده

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

مواد و روش‌ها: بذر گیاه پریش 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 واکنش شدند و کالوس‌های واکنش دوم با غلظت‌های مختلف نیترات سرب (۰، ۱۰، ۵۰ میکرومولار) به مدت ۵ روز تیمارگردیدند و پس از گذشت پنج روز از زمان تیمار، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانسی، 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 داد که فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانسی مانند سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، پراکسیداز (POX) و آنزیم کاتالاز (CAT)، میزان پرولین و آلکالوئید و پراکسیداسیون لیپید در نتیجه تیمار با سرب به‌طور معنی‌دار افزایش یافت.

نتیجه‌گیری: سرب به‌دلیل القای تنش اکسیداتیو و افزایش تولید رادیکال آزاد سبب افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانسی و محتوی پرولین و آلکالوئید و پراکسیداسیون لیپید در کالوس گیاه پریش شد.

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

مقدمه

اکسیژن واکنش‌گر یا ROS (Reactive oxygen species) می‌باشند (۱۱) بنابراین وقتی گیاه در معرض سرب قرار می‌گیرد به منظور 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 سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و گایاکول پراکسیداز (GPX) هستند. در گیاهان 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 ترجیحاً ترکیبات آروماتیک دهنده الکترون را به‌ازای مصرف پراکسید هیدروژن اکسید می‌کند (۱۴). با توجه به مزایایی متعدد کشت بافت و اهمیت دارویی گیاه پیروش و با توجه به اینکه اثر فلز سرب بر روی کالوس بسیار کم مطالعه شده در تحقیق حاضر از کالوس گیاه پیروش بهره گرفته شد و بررسی اثر سرب بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی کالوس گیاه پیروش مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

القای کالوس و شروع تیمار: بذر گیاه پیروش در گلدان حاوی پرلیت کشت شد و پس از گذشت دو ماه به منظور القای کالوس، برگ‌های جوان از قسمت راسی گیاه پیروش کشت شده در گلدان جدا شدند و مورد استفاده قرار گرفتند. قطعات گیاهی مورد نظر به منظور ضدعفونی شدن به مدت ۱۵ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۵ درصد قرار داده شدند سپس سه مرتبه با آب مقطر اتوکلاو شده شستشو و به مدت ۱۰ دقیقه در اتانول ۷۰ درصد قرار گرفته شدند و مجدداً 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

پیروش 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 پیروش منابع مهم آلکالوئیدهای دیمریک وین‌بلاستین و وین‌کریستین هستند که جزو داروهای ضدسرطان می‌باشند (۱). علاوه بر این در ریشه‌های گیاه آلکالوئیدهای سرپنتین و آجمالیسین که داروهای ضد فشار خون هستند، نیز تجمع می‌یابند (۲ و ۳). به دلیل قیمت بالای این ترکیبات و محتوای اندک آلکالوئیدی گیاه پیروش محققین از روش کشت بافت برای افزایش تولید آلکالوئیدهای گیاه پیروش 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 Fe, Co, Ni, Zn, Mn, Cu و Mo وجود دارند که به‌عنوان عناصر ریزمغذی یا عناصر کمیاب برای متابولیسم گیاهی ضروری هستند؛ علاوه بر این عناصر دیگری نظیر Ag, Cd, Hg, As, Ni, Pb 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 به حساب می‌آید (۸). عناصری مانند سرب و کادمیوم در فرآیندهای فیزیولوژیک 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 به دلیل 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 پراکسید هیدروژن از شایع‌ترین انواع گونه‌های

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 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 شرکت PG instrument کشور انگلستان) به مدت ۲ دقیقه در طول موج ۴۳۶ نانومتر خوانده شد. از محلول واکنش بدون عصاره جهت صفر کردن دستگاه استفاده شد. همچنین از فرمول زیر به منظور اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز استفاده گردید. فعالیت آنزیم پراکسیداز مساوی است با جذب خوانده شده تقسیم بر عدد ۰/۲۶۶.

در فرمول فوق الذکر، جذب خوانده شده معادل میزان تراگایاکول تولید شده در یک دقیقه و ۰/۲۶۶ 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 سوپراکسید دیسموتاز، 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 به منظور تهیه نمونه شاهد ۲۰ میکرولیتر آب مقطر و ۱ میلی‌لیتر محلول واکنش در لوله‌های مربوطه ریخته و لوله‌های آزمایش حاوی نمونه‌های تیماری و کنترل به مدت 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 سوپراکسید دیسموتاز برای هر نمونه محاسبه شد. برای صفر کردن دستگاه اسپکتروفتومتر از محلول بلانک که فاقد رنگ بود استفاده شد. فعالیت سوپراکسید دیسموتاز مساوی است با OD نمونه منهای OD کنترل تقسیم بر OD کنترل ضربدر عدد ۱۰۰.

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

داده شدند و شیشه‌های حاوی جداگشت‌ها به اتاق کشت با دمای 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد منتقل گردیدند (۱۶). کالوس‌ها بعد از سه هفته واکنش و به محیط کشت جدید منتقل شدند و از کالوس‌های واکنش 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 فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار (pH=۷) به آن اضافه و به مدت نیم ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با تکان‌های ملایم استخراج شد (۱۸). ترکیب حاصل در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ (مدل: EDISON, NJ U6A Labnet international, Inc. RATING. QUANTITY) و از محلول شفاف‌رویی برای انجام آزمایش‌های بیوشیمیایی 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 به مدت ۲ دقیقه اندازه‌گیری شد (لازم به ذکر است قبلاً 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 شرکت PG 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 هیدروژن پراکسید در دقیقه محاسبه گردید. فعالیت آنزیم کاتالاز مساوی است با اختلاف جذب تقسیم بر عدد ۳۹/۵ ضربدر عدد ۱۰۰.

میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال و ۲ میلی‌لیتر معرف نین‌هیدرین به مدت یک ساعت در حمام آب گرم در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. بعد از گذشت یک ساعت زمانی که محلول سرد شد ۴ میلی‌لیتر 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 کاملاً از هم جدا گردد. فاز آلی به رنگ 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) به وسیله تولوئن در طول موج ۵۲۰ نانومتر روی عدد صفر تنظیم گردید و سپس محلول رنگی مربوط به هر نمونه در دستگاه قرار گرفت و میزان جذب خوانده شد. میزان پرولین بافت مورد نظر با توجه به منحنی استاندارد پرولین و فرمول خطی $y = 0.123x + 0.304$ با $R^2 = 0.9955$ تعیین شد.

اندازه‌گیری آلکالوئید کل: میزان آلکالوئید کل با استفاده از روش اسپکتروفتومتری 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 به مدت ۲۴ ساعت به انکوباتور شیکردار با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند بعد از سپری شدن مدت زمان معین نمونه‌ها با دور 12000 rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند سپس محلول رویی را به آن 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 ۰/۱N، pH محلول رویی 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 کلروفرمیک 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 به منظور آشکارسازی موقعیت آلکالوئیدها از معرف دراژندروف به میزان ۱ میلی‌لیتر اضافه و این ترکیب به مدت ۵ دقیقه در دور 12000 rpm سانتریفوژ شد. محلول رویی را دور ریخته و رسوب باقیمانده با اتانول ۹۶ درصد شستشو داده

پراکسیداسیون در نظر گرفته شده است. مراحل اندازه‌گیری میزان مالون‌دی‌آلدئید به ترتیب زیر انجام شد. ۰/۵ گرم از بافت کالوس با ۱ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید ۰/۱ درصد در هاون چینی سائیده شد و عصاره به دست آمده به مدت ۳۰ دقیقه در 4000 rpm سانتریفوژ گردید. به ۱ میلی‌لیتر از محلول شفاف رویی، ۱ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید ۲۰ درصد حاوی تیوباربیئوریک اسید ۰/۵ در صد افزوده شد. مخلوط به دست آمده به مدت ۳۰ دقیقه در حرارت ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد در حمام آب گرم قرار داده شد و بلافاصله لوله‌ها به مدت 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 آنجایی که بعضی از ترکیبات، به عنوان 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 تیوباربیئوریک اسید ۰/۵ در صد برای صفر کردن دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۳۲ نانومتر استفاده شد. غلظت کمپلکس تیوباربیئوریک-مالون‌دی‌آلدئید با استفاده از ضریب خاموشی $\epsilon = 155 \text{ cm}^{-1} \text{ mmo}$ و فرمول زیر محاسبه شد:

$$A = \epsilon bc$$

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 روش Bates 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 به نام دی‌کتوهیدرین‌دی‌لیدین می‌کند، ترکیب رنگی فوق به کمک حلال آلی غیرقطبی تولوئن تشکیل دو فاز رنگی متفاوت می‌دهد که می‌توان با استفاده از منحنی استاندارد میزان پرولین را محاسبه کرد. 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 به مدت یک شب در دمای آزمایشگاه نگهداری شد و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در 10000 rpm سانتریفوژ شد. سپس ۲ میلی‌لیتر از محلول رویی، به اضافه ۲

آنالیز آماری: آزمایشات انجام شده برای هر تیمار در سه تکرار انجام شد. داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم افزار آماری SPSS نسخه ۱۶ و با استفاده از روش ANOVA و آزمون Duncan آنالیز شد. در هر اندازه گیری ارتباط بین گروه‌ها بررسی و وجود تفاوت معنی دار در سطح $P < 0.05$ 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 ($P < 0.05$). که این افزایش نسبت به شاهد به ترتیب ۳۵ و ۲۴ درصد بود؛ ولی تفاوت معنی دار بین کالوس‌های تیمار شده با غلظت‌های ۵۰ و ۱۰ میکرومولار وجود نداشت (جدول ۱).

و مجدداً سانتریفوژ شد. پس از دور ریختن محلول رویی به رسوب ۱ میلی لیتر دی‌سدیم سولفید ۱ درصد اضافه و پس از تکمان دادن محلول به مدت ۵ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد. در این مرحله پس از حذف محلول روئی به رسوب قهوه‌ای تشکیل شده ۲ میلی لیتر دی‌سدیم سولفید ۱ درصد اضافه و مجدداً به مدت ۵ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد. پس از دور ریختن محلول رویی ۲ میلی لیتر اسید نیتریک غلیظ به رسوب اضافه و با آب مقطر دو بار تقطیر حجم محلول را به ۵ میلی لیتر رسانیده شد. از محلول فوق ۱ میلی لیتر برداشته، به آن ۲/۵ میلی لیتر محلول تیوره ۳ درصد اضافه و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل Instrument UV/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 خطی $y = 0.0291x - 0.0302$ با $R^2 = 0.9986$ محاسبه گردید.

جدول ۱: مقایسه میانگین فعالیت آنزیم‌های کاتالاز ($U \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ protein}$)، پراکسیداز ($U \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ protein}$) و سوپراکسید دیسموتاز ($U \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ protein}$) 1 mg-1protein کالوس گیاه پریوش با گروه کنترل پنج روز پس از تیمار با غلظت‌های مختلف نیترات سرب (۱۰ و ۵۰ میکرومولار).

شاخص	کاتالاز ($U \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ protein}$)	پراکسیداز ($U \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ protein}$)	سوپراکسید دیسموتاز ($U \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ protein}$)
غلظت (μM)			
۰	$0.413 \text{ b} \pm 0.04$	0.513 ± 0.02	18.935 ± 1.79
۱۰	$0.558 \text{ a} \pm 0.02$	0.811 ± 0.07	45.577 ± 4.03
۵۰	$0.516 \text{ a} \pm 0.03$	$1.07 \text{ a} \pm 0.02$	60.656 ± 2.05

مقادیر به صورت میانگین \pm انحراف استاندارد می‌باشد. میانگین‌ها با کد حروف متفاوت در یک ستون دارای تفاوت معنی دار می‌باشند.

اثر نیترات سرب بر فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD): آنالیز آماری داده‌های حاصل از اندازه گیری فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز با استفاده از روش ANOVA یک طرفه نشان داد که فعالیت آنزیم در کالوس گیاه پریوش تیمار شده با نیترات سرب در مقایسه با کنترل معنی دار ($P < 0.05$) 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

اثر سرب بر فعالیت آنزیم پراکسیداز (POX): داده‌های حاصل از اندازه گیری میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در کالوس گیاه پریوش تیمار شده در مقایسه با کنترل نشان داد که اثر سرب بر فعالیت این آنزیم معنی دار ($P < 0.05$) است (جدول ۱). 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 غلظت ۵۰ 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.

نیترات سرب در مقایسه با کنترل معنی‌دار است ($p < 0.05$). تیمار با غلظت‌های ۱۰ و ۵۰ میکرومولار نیترات سرب موجب افزایش محتوی پرولین نسبت به گروه کنترل شد. این افزایش وابسته به غلظت بود به طوری که محتوی پرولین در غلظت ۵۰ میکرومولار به بالاترین مقدار خود رسید که این افزایش نسبت به شاهد ۳۵ درصد بود (جدول ۲).

اثر سرب بر آلکالوئید کل کالوس گیاه پریش

مقایسه میانگین آلکالوئید کل نشان داد که تیمار با غلظت‌های ۱۰ و ۵۰ میکرومولار نیترات سرب باعث افزایش معنی‌دار $P < 0.05$ 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).

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

اثر نیترات سرب بر تغییرات بیوشیمیایی

تأثیر نیترات سرب بر مقدار مالون‌دی‌آلدئید کالوس گیاه پریش: 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 ($p < 0.05$) 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، به طوری که مقدار مالون‌دی‌آلدئید در غلظت ۵۰ میکرومولار به بالاترین مقدار خود رسید. این افزایش نسبت به شاهد ۳۱ درصد بود (جدول ۲).

اثر سرب بر محتوی پرولین کالوس گیاه پریش: آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از روش ANOVA یک‌طرفه نشان داد که محتوی پرولین در کالوس‌های گیاه پریش تیمار شده با

جدول ۲: مقایسه میانگین محتوی مالون‌دی‌آلدئید ($\mu\text{M g-1FW}$)، پرولین ($\mu\text{M g-1FW}$) و آلکالوئید (mg g-1FW) کالوس گیاه پریش با گروه کنترل پنج روز پس از تیمار با نیترات سرب (۱۰ و ۵۰ میکرومولار).

شاخص	مالون‌دی‌آلدئید ($\mu\text{M g-1FW}$)	پرولین ($\mu\text{M g-1FW}$)	آلکالوئید (mg g-1FW)
غلظت (μM)			
۰	$20/356c \pm 0.8$	$6/933c \pm 0.11$	$15/60c \pm 0.43$
۱۰	$23/553b \pm 2/09$	$7/822b \pm 0.21$	$22/28b \pm 1/35$
۵۰	$26/770a \pm 0.84$	$9/377a \pm 0.49$	$28/55a \pm 0.44$

مقادیر به صورت میانگین \pm انحراف استاندارد می‌باشد. میانگین‌ها با کد حروف متفاوت در یک ستون دارای تفاوت معنی‌دار می‌باشند.

واکنش گرمانند هیدروژن پراکسید می‌شود (۲۶). هیدروژن پراکسید تولید شده می‌تواند منجر به تخریب غشا و پراکسیداسیون لیپید شود. این مولکول می‌تواند به وسیله کاتالاز یا پراکسیداز حذف گردد (۲۷). کاتالاز سبب تجزیه H_2O_2 به آب و اکسیژن می‌شود و از جمله آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانسی است که در غلظت‌های پایین گونه‌های اکسیژن واکنش‌گر فعال نمی‌شود (۲۸). در مطالعه حاضر میزان فعالیت آنزیم در غلظت ۱۰ و ۵۰ میکرومولار به طور معنی‌دار نسبت به شاهد افزایش داشت. در غلظت ۵۰ میکرومولار میزان فعالیت آنزیم نسبت به غلظت ۱۰

بحث

کاتالاز: حضور سرب به دلیل 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

نمود این امر احتمالاً 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 می‌یابد (۲۷). در این شرایط که میزان تولید هیدروژن پراکسید افزایش می‌یابد (۱۴) پراکسیداز نقش بسیار مهم‌تری از کاتالاز در حذف هیدروژن پراکسید دارد. از این‌رو فعالیت گایاکول پراکسیداز نسبت کاتالاز در غلظت ۵۰ میکرومولار افزایش می‌یابد (۲۷). گزارشی از تاثیر نترات سرب بر فعالیت آنزیم کاتالاز کالوس یافت نشد.

آنزیم پراکسیداز: گایاکول پراکسیداز شاخص تنش فلزات سنگین است و در سیتوزول، دیواره سلولی و واکوئل واقع شده است (۳۳). افزایش فعالیت گایاکول پراکسیداز 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 پراکسید هیدروژن 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 پراکسید هیدروژن می‌شود (۳۷). با افزایش تولید پراکسید هیدروژن میزان رادیکال هیدروکسیل در سلول افزایش می‌یابد. رادیکال هیدروکسیل سبب آسیب به قسمت‌های مختلف مولکول DNA مانند بازهای پورین و پیریمیدین و همچنین دئوکسی ریبوز می‌شود. لذا سبب حذف باز، دیمرها پیریمیدین، شکسته شدن رشته DNA و تغییر بازها که شامل آلکیل دار شدن 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*

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 نترات سرب با غلظت ۵۰۰ تا ۱۰۰۰ میکرومولار به مدت 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 به دلیل افزایش تولید سوبسترای آن مانند H_2O_2 در سلول‌های گیاهی و به‌منظور مقابله با شرایط تنش می‌باشد (۲۹ و ۳۰). میزان فعالیت آنزیم کاتالاز وابسته به شدت، 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 مثلاً Mishra و همکاران (۳۰) تاثیر غلظت‌های ۱۰ تا ۱۰۰ میکرومولار از سرب را به مدت ۲ تا ۷ روز روی گیاه *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 رادیکال‌های آزاد دیگر در سلول به شدت زیاد است لذا موجب بازدارندگی در متابولیسم شده و فعالیت آنزیم کاتالاز کاهش می‌یابد (۱۳). همچنین کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز در غلظت‌های بالا احتمالاً به دلیل 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 احتمالاً در نتیجه تولید پراکسید هیدروژن است. از طرفی در این مطالعه میزان فعالیت آنزیم در غلظت ۵۰ میکرومولار نسبت به ۱۰ میکرومولار کاهش می‌یابد ولی این کاهش معنی‌دار

پراکسیداز کاهش یافت (۳۰). در غلظت‌های بالاتر و مدت زمان طولانی تیمار به دلیل 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 به دلیل اثرات مضر رادیکال‌های آزاد می‌باشد (۴۲). احتمالاً اختلاف موجود در فعالیت آنزیم پراکسیداز می‌تواند به دلیل تفاوت در گونه گیاهی و غلظت سرب مورد استفاده برای تیمار باشد که متعاقباً سبب پاسخ‌های 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. معمولاً رادیکال سوپراکسید اولین رادیکال آزادی است که در طی تنش تولید می‌شود و SOD سریعاً 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 به دلیل تفاوت در فاکتورهای مورد آزمایش مانند گونه گیاهی، 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 نیترات سرب 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 ۲۵۰۰ 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 نیترات سرب نسبت به شاهد افزایش معنی‌دار یافت و بیشترین فعالیت آنزیم در غلظت ۵۰ میکرومولار از تیمار بود. افزایش فعالیت SOD به دلیل مقابله با تنش اکسیداتیو و محافظت از سیستم دفاعی گیاه در برابر آسیب اکسیداتیو است

natans که با غلظت‌های ۱۰ تا ۱۰۰ میکرومولار از سرب به مدت 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 فنیل‌آلانیل‌آمونیلایز (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 نیترات سرب سبب افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم نسبت به کنترل شده است. Garnczarska و همکاران (۴۰) تاثیر غلظت‌های ۱، ۳ و ۵ میکرومولار از سرب را به مدت ۲۴ ساعت بر فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز ریشه خزه (*Lemna minor*) بررسی نمود. همچنین Dey (۴۱) گیاه برنج را با غلظت‌های ۲۰ تا ۲۰۰ میکرومولار از نیترات سرب تیمار نمود هر دو محقق نشان دادند که میزان فعالیت گایاکول پراکسیداز در اثر تیمار با سرب افزایش می‌یابد. افزایش فعالیت پراکسیداز در نتیجه تیمار با سرب به دلیل پاسخ سلول به آسیب ایجاد شده تنش سرب موجب افزایش آزاد شدن آنزیم‌های پراکسیداز واقع در دیواره سلول می‌شوند (۲۷ و ۴۱). این افزایش احتمالاً 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 به مدت 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 ۲۵۰۰ میکرومولار رشد می‌کند (۳۹) و همچنین در گیاه *Ceratophyllum demersum* که به مدت ۷ روز در معرض تیمار با سرب بود میزان فعالیت گایاکول

تاثیر ۰/۵ میلی‌مولار از کلرید سرب را به مدت 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 پریش 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 تنظیم‌کننده اسمزی و عامل حفاظت‌کننده 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 غشاهای 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 میکروارگانیزم‌ها نقش مهمی ایفا می‌کند در سلول‌های تحت تنش نقش آنتی‌اکسیدانتی دارد و به‌عنوان جاروب‌کننده 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 (*Vigna mungo L*) که با غلظت‌های ۱۰ تا ۱۰۰ میکرومولار

(۲۷)؛ همچنین افزایش فعالیت آنزیم به دلیل افزایش سوپراکسید می‌باشد که سبب افزایش سنتز *de novo* از پروتئین‌های آنزیمی می‌شود احتمالاً 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 به مدت 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 احتمالاً به دلیل 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 پریش

مالون دی آلدئید: پراکسید شدن لیپید به‌عنوان شاخصی از آسیب اکسیداتیو می‌باشد و در طی پیری مشخص‌کننده 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_2 نیز 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 به مدت ۷ روز با غلظت‌های ۱۰ تا ۱۰۰ میکرومولار سرب تیمار شد بود میزان مالون‌دی‌آلدئید افزایش می‌یابد. Zacchini و همکاران (۱۷)

که برخی از این فلزات به‌عنوان پیامبرهای ثانویه عمل می‌کنند و سبب افزایش سنتز آلکالوئیدها می‌شوند (۴). با توجه به اینکه اهمیت آلکالوئیدها در حفاظت 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 آنتی‌اکسیدانسی 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 فوق‌الذکر تشکر به‌عمل می‌آید.

منابع

- 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.
- 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.
- 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.
- Srivastava NK, Srivastava AK. Influence of Some Heavy Metals on Growth, Alkaloid Content and Composition in *Catharanthus roseus* L. *Indian J Pharm Sci*. 2010; 72(6): 775-8.
- Yaron B, Calvet R, Prost R. *Soil Pollution: Processes and Dynamics*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. 1996; 312.
- Sebastiani L, Scebbba F, Tognetti R. Heavy metal accumulation and growth responses in poplar clones *Eridano* (*Populus deltoides* × *maximowiczii*) and I-

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 ($p < 0.05$) بوده است. تحقیقات انجام شده توسط محققان دیگر نیز با نتایج به‌دست آمده در مطالعه حاضر مطابقت دارد (۵۶) و (۵۸). محققین 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 عبارتند از: الف) تحریک سنتز آن از اسید گلواماتیک ب) جلوگیری از اکسیداسیون آن در طول تنش ج) تخریب و اختلال در فرایند سنتز پروتئین است (۵۹). علاوه بر این زمانی که 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 هنگامی که 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 عمدتاً از اسیدآمینها 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. احتمالاً 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 غلظت‌های ۱۰ 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

- 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 argy.* *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 diabetic rabbits. *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 *catharantthus 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 Intensity Enhance Activities Of Superoxide Dismutase, Ascrobate Peroxidase, And Glutathione 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 Alkaloids Precipitable with Dragendorff's Reagent in Plant Material. *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

- Involved in Metal Induced 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 nutrient uptake and secondary metabolism in submerged macrophyte *Vallisneria spiralis*. *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, Ratajczak 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. Change in the antioxidant enzyme 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, Vandenberghe 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. Large and Small Scale 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 hypogaea* L.). *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 proline mediated 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 transmembrane 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 *Ononis 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.

Archive of SID

Investigation the Effect of Lead on the Activity of Antioxidant Enzymes, Level of Prolin and Alkaloid in the Callus of *Catharanthus 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 μ M). The activity of antioxidant enzymes and content of proline and alkaloid were assayed. Data analyzed at P = 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