

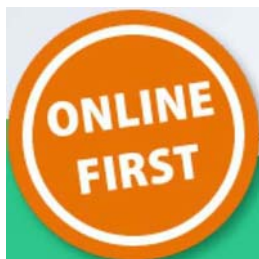
بررسی پاسخ‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی در کشت ساقه (*Artemisia annua* L.) تحت تنش

نیترا ت نقره

لیلا شبانی* و بهنوش صغیرزاده

شهرکرد، دانشگاه شهرکرد، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۲/۴ تاریخ پذیرش: ۹۴/۷/۲۵



چکیده

در گیاهان، سیستم‌های دفاعی متعددی برای مقابله با شرایط تنش‌زا، همانند آلودگی محیط رویش آنها به فلزات سنگین، با یکدیگر همکاری می‌کنند. در این پژوهش به بررسی اثر غلظت‌های مختلف نیترا ت نقره بر شاخص رشد، رنگیزه‌های فتوسنتزی، میزان H_2O_2 ، پراکسیداسیون لیپید، میزان پرولین و فعالیت سیستم‌های دفاعی آنزیمی در کشت ساقه گیاه آرتیمیزیا (*Artemisia annua* L.) با استفاده از تکنیک کشت بافت پرداخته شده است. به‌منظور نشان دادن اثرات فلز سنگین نقره بر این شاخص‌ها، آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار اجرا شد. غلظت‌های متفاوت (۰، ۰/۰۱، ۰/۱، ۱ و ۲ میلی-مولار) نیترا ت نقره به محیط کشت مایع MS حاوی ساقه آرتیمیزیا اضافه شد. نتایج نشان داد که نسبت وزن تر به وزن خشک نمونه‌های تحت تیمار در غلظت ۰/۱ میلی‌مولار نیترا ت نقره نسبت به نمونه شاهد ۷۷/۷۵٪ افزایش یافت. میزان کلروفیل a و b در غلظت ۰/۰۱ میلی‌مولار افزایش و کلروفیل a تنها در غلظت ۰/۱ میلی‌مولار نسبت به شاهد کاهش یافت. از میان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان اندازه‌گیری شده تنها آنزیم کاتالاز در تمام غلظت‌ها افزایش نشان داد. ایزیتور نیترا ت نقره باعث افزایش میزان پرولین، H_2O_2 و پراکسیداسیون لیپیدی در تمام غلظت‌ها شد. نتایج این پژوهش نشان داد که نقره موجود در ساقه‌ها باعث تجمع ترکیباتی مثل پراکسید هیدروژن شده که به‌عنوان یک مولکول پیام‌رسان عمل کرده و باعث القای دفاع آنتی‌اکسیداتیو در برگ‌ها می‌شود.

واژه‌های کلیدی: دفاع آنتی‌اکسیدانی، درمنه یکساله، پرولین، فلزات سنگین، نیترا ت نقره

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۳۸۱۴۴۲۴۴۰۵، پست الکترونیکی: shabani-l@sci.sku.ac.ir

مقدمه

گیاهان جنس *Artemisia* بوته‌های چندساله و آروماتیک متعلق به راسته Asterales، خانواده Asteraceae و طایفه Anthemedeae هستند و به عنوان گیاهان اغلب اجتماعات گیاهی در استپ‌های خشک و نیمه خشک شناخته شده‌اند. *A. annua* با نام فارسی (گندواش) گیاهی یکساله است که جدا از ۴۰۰ گونه دیگر جنس *Artemisia* که اغلب دو ساله یا پایا هستند قرار می‌گیرد و نام‌گذاری این گونه به این دلیل می‌باشد (۹). پودر سر شاخه‌ای بیشتر گونه‌های این گیاه دارای ماده سانتونین است. این ماده یکی از ترکیبات گلیکوزیدی موجود در بعضی از گونه‌های جنس درمنه است و از قدیم به دلیل خاصیت ضد انگلی و سایر خواص دارویی در طب سنتی و جدید مصرف دارویی داشته است. اهمیت جنس درمنه در حال حاضر به دلیل ترکیبات مهم دارویی و اثرات درمانی قابل توجه، در حال افزایش است. ترکیبات ثانویه جنس درمنه تا به امروز به عنوان داروی ضد مالاریا، ضد باکتری، ضد قارچ، آنتی‌اکسیدان و سایتوتوکسیک مورد مصرف قرار گرفته است (۱۸). بررسی‌ها نشان می‌دهد که مقادیر بالای فلزات سنگین (چه

گیاهان جنس *Artemisia* بوته‌های چندساله و آروماتیک متعلق به راسته Asterales، خانواده Asteraceae و طایفه Anthemedeae هستند و به عنوان گیاهان اغلب اجتماعات گیاهی در استپ‌های خشک و نیمه خشک شناخته شده‌اند. *A. annua* با نام فارسی (گندواش) گیاهی یکساله است که جدا از ۴۰۰ گونه دیگر جنس *Artemisia* که اغلب دو ساله یا پایا هستند قرار می‌گیرد و نام‌گذاری این گونه به این دلیل می‌باشد (۹). پودر سر شاخه‌ای بیشتر گونه‌های این گیاه دارای ماده سانتونین است. این ماده یکی از ترکیبات

جمله نقره در غلظت‌های بالا، احتمال اثرات کشنده آن را افزایش می‌دهد. سمیت نقره در محیط‌های آبی به غلظت یون‌های نقره آزاد وابسته است و کاهش میزان دسترسی زیستی به یون نقره از سمیت آن می‌کاهد. به طور کلی در میان ترکیبات نقره‌دار، ترکیبات قابل حل مانند نیترات نقره سمیت بیشتری نسبت به اشکال غیرقابل حل نقره دارند. حساسیت گونه‌های گیاهی عالی خشکی‌زی در برابر سمیت ناشی از نقره متنوع است. در گونه‌های گیاهی حساس، رشد و جوانه زنی در ۷/۵ میلی‌گرم در لیتر نیترات نقره تضعیف شده است (۲۷).

افزایش تولید آرتیمیزینین در کشت بافت گیاه *A. annua* یکی از اهداف بسیاری از گروه‌های تحقیقاتی می‌باشد. این هدف تنها از طریق شناخت بیشتر مسیر بیوشیمیایی سنتز این ماده و تنظیم آن توسط فاکتورهای خارجی به‌کار رفته امکان پذیر می‌باشد. تحریک (elicitation) راهبرد مؤثری برای تولید ترکیبات ثانویه به‌ویژه در کشت سلول و اندام گیاهان در نظر گرفته می‌شود. برخی از الیستینورها مثل کیتوزان، اسید سالیسیلیک، متیل جاسمونات، اسید جیبرلیک و عصاره مخمر برای بهبود تولید آرتیمیزینین استفاده شده‌اند (۸). با وجود آنکه پژوهش‌های زیادی در زمینه آثار سمی فلزات سنگین بر رشد و متابولیسم گیاهان مختلف انجام شده است، ولی اطلاعات درباره راه‌های کاهش آسیب‌های ناشی از سمیت آنها در گیاهان اندک است. همچنین از آنجایی که فلزات سنگین در محیط کشت این ویتر و منجر به تنش اکسیداتیو و تولید گونه‌های فعال اکسیژن بعنوان تنش ثانویه می‌شوند، بنابراین این پژوهش با هدف بررسی پاسخ‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی و نقش مولکول سیگنال پراکسید هیدروژن در گیاهی با پتانسیل بالای تولید متابولیت ثانویه با ارزش آرتیمیزینین تحت تنش نیترات نقره انجام شد.

مواد و روشها

بذرهای گیاه *A. annua* مورد استفاده در این پژوهش از

آنها که ضروری‌اند و چه آنها که ضروری نیستند) می‌توانند تولید رادیکال‌های آزاد و گونه‌های اکسیژنی فعال و در نتیجه آسیب اکسیداتیو را در گیاهان تحریک کنند (۲۸). براساس خصوصیات فیزیکی و شیمیایی فلزات سنگین، می‌توان سه مکانیسم مولکولی احتمالی از قبیل تولید گونه‌های فعال اکسیژن از طریق خود اکسیداسیون و یا واکنش‌هایی مانند واکنش فنتون و ایجاد تنش اکسیداتیو، مهار گروه‌های فعال عملکردی در مولکول زیستی و جایگزینی با یون‌های فلزی ضروری در ماکرومولکول‌های زیستی و آنزیم‌ها برای سمیت آنها مطرح کرد.

ROSها در همه گیاهان در درجات و مقادیر مختلف و در نتیجه متابولیسم طبیعی تولید می‌شوند ولی افزایش و تجمع بیش از حد آنها منجر به تنش و آسیب اکسیداتیو می‌گردد (۴). در اثر شرایط تنش‌زا، تولید اکسیژن فعال افزایش می‌یابد. اکسیژن فعال در گیاه از طریق فرایندهای اکسیدکنندگی محتویات سلول، اثرات مخرب جبران‌ناپذیری بر گیاه می‌گذارد. گیاهان دارای مکانیزم‌های متفاوتی برای حذف یا کاهش این ترکیبات مخرب می‌باشند که در سطوح مختلف تنش وارده، ظاهر می‌شوند. یکی از این سیستم‌های تدافعی، سیستم آنزیمی پراکسیداز و سوپراکسیددیسموتاز است که رادیکال‌های آزاد را به پراکسید هیدروژن تبدیل می‌کند. در ادامه پراکسید هیدروژن توسط پراکسیداز تبدیل به آب می‌شود. فعالیت این آنزیم‌ها در مواجهه با تنش‌های محیطی تحریک می‌شود و از این طریق مقاومت گیاه را به این شرایط تغییر می‌دهد (۲، ۲۹). از طرفی اسید آمینه پرولین تحت شرایط نامطلوب محیطی در گیاه تجمع پیدا می‌کند. نقش پرولین در تنش، جلوگیری از تخریب آنزیم‌ها، جلوگیری از تجزیه ماکرومولکول‌ها و دخالت در حفظ استحکام دیواره سلولی و پاکسازی رادیکال‌های هیدروکسیل (OH \cdot) تولید شده تحت تنش در گیاهان عنوان شده است (۳۶).

به خوبی مشخص شده است که تجمع فلزات سنگین از

کلروفیل‌ها از روش Arnon (۵) استفاده شد. ۰/۰۵ گرم از بافت تازه گیاهان با استفاده از استون ۸۰ درصد در محیطی تاریک بر روی یخ درون هاون چینی سائیده شد. عصاره حاصل برای ۳ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، با دور rpm ۴۰۰۰ سانتریفیوژ شد. سوپرناتانت حاصل به کوت منتقل و جذب آن در طول موج‌های ۶۴۵ و ۶۶۳ نانومتر در دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل JENWAY 6300) خوانده شد. سپس میزان کلروفیل a و کلروفیل b بر حسب میلی-گرم در هر گرم وزن تر بافت گیاهی طبق روابط ۱ و ۲ محاسبه گردید.

$$\text{Chlorophyll a} = \{(12.7 \times D 663) - (2.69 \times D 645)\} \\ \times V / 1000 \times W \quad \text{رابطه ۱}$$

$$\text{Chlorophyll b} = \{(22.9 \times D 645) - (4.93 \times D 663)\} \\ \times V / 1000 \times W \quad \text{رابطه ۲}$$

D = جذب نوری، V = حجم نهایی عصاره (میلی‌لیتر)، W = وزن بافت (گرم)،

اندازه‌گیری میزان H_2O_2 : برای اندازه‌گیری H_2O_2 از روش Alexieva و همکاران (۳) استفاده شد. برای عصاره-گیری ۰/۰۵ گرم بافت تازه گیاه در هاون سرد شده با ۱/۵ میلی‌لیتر TCA (تری‌کلرواستیک‌اسید) ۰/۱ درصد سائیده شد. عصاره تهیه شده به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت g ۱۲۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. ۵۰۰ میکرولیتر از عصاره‌ها با ۵۰۰ میکرولیتر بافر فسفات (pH ۷) (= ۱ میلی‌لیتر محلول KI ۱ مولار ترکیب و در طول موج ۳۹۰ نانومتر خوانده شد.

اندازه‌گیری میزان پراکسیداسیون لیپید غشاء: برای اندازه-گیری پراکسیداسیون لیپید غشاء از روش Heath و Packer (۱۲) استفاده شد. ابتدا ۰/۰۲۵ گرم از بافت اندام هوایی در ۵ میلی‌لیتر TCA ۰/۱ درصد کاملاً هموژنیزه و یکنواخت گردید. مخلوط هموژنیزه در ۱۰۰۰۰g به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. به یک میلی‌لیتر محلول رویی حاصل ۵/۴ میلی‌لیتر TCA ۲۰ درصد حاوی تیوباربیتوریک‌اسید ۰/۵

مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران خریداری شد که از شهر گیلان در تاریخ ۲۰۱۲/۱۲/۱۶ جمع‌آوری شده بود. بذره‌های گیاه *A. annua* بعد از ضد عفونی‌شدن با محلول هیپوکلریت سدیم ۵ درصد در شرایط کاملاً استریل درون شیشه‌های مخصوص کشت بافت حاوی محیط کشت MS، قرار داده شدند. شیشه‌های کشت در تاریکی، دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۳۰ درصد درون اتاقک رشد نگهداری شدند. بعد از ۸ روز بذرها جوانه زدند و برای جلوگیری از اتیوله شدن گیاهچه‌ها، لامپ‌های اتاقک رشد با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی روشن گردیدند. پس از یک ماه گیاهچه‌ها از محیط‌های کشت قبلی خارج و به محیط کشت‌های جدید انتقال داده شدند و در طول سه ماه هر ۲۰ روز واکشت داده شدند. پس از سه ماه کشت گیاهان در شرایط این ویترو، گیاهان یکسان (با ۱۵-۱۰ سانتی‌متر ارتفاع) برای ادامه آزمایش انتخاب شدند. ساقه‌های (با ۳ گره) *A. annua* به محیط کشت مایع MS منتقل شدند، به محیط‌های کشت فوق، نیترات نقره در شش غلظت ۰، ۰/۰۰۱، ۰/۰۰۱، ۰/۰۱، ۰/۱، ۱ و ۲ میلی‌مولار اضافه گردید. محیط کشت فاقد نیترات نقره به عنوان کنترل در نظر گرفته شد. محیط‌های کشت به اتاقک رشد منتقل و بر روی شیکر با دور آرام (۱۰۰ rpm) قرار داده شدند. ساقه‌ها در این محیط برای ۷ روز رشد کردند و بعد در سه تکرار از هر ظرف کشت برای آزمایش‌ها جمع‌آوری شدند.

اندازه‌گیری وزن تر و وزن خشک ساقه‌های گیاه: وزن تر گیاهان پس از یک هفته رشد در غلظت‌های مختلف نیترات نقره، پس از خارج کردن گیاهان از محیط کشت و خشک کردن آب اضافی نمونه‌ها روی کاغذ صافی اندازه-گیری شد. به منظور اندازه‌گیری وزن خشک، نمونه‌ها داخل پاکت‌های کاغذی، به مدت ۷۲ ساعت در آن ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند.

اندازه‌گیری رنگیزه‌های فتوسنتزی: برای اندازه‌گیری

شد. طبق این روش ۱ میلی‌لیتر مخلوط واکنش و ۲۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی به همراه ۱۰ میکرولیتر ریپوفلاوین (۰/۰۰۴ درصد) در لوله آزمایش ریخته شد. مخلوط به دست آمده برای ۷ دقیقه در یک محفظه دارای دو لامپ فلورسنت ۲۰ وات قرار داده شد. افزایش در جذب به واسطه تشکیل فورمازان در طول موج ۵۶۰ نانومتر قرائت شد. فعالیت آنزیم با تعیین درصد ممانعت در دقیقه محاسبه گردید. ۵۰ درصد ممانعت برابر با ۱ واحد فعالیت آنزیم در نظر گرفته شد.

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز: برای اندازه‌گیری فعالیت این آنزیم ۶۲۵ میکرولیتر بافر سالین فسفات (۵۰ میلی مولار، pH=۷/۸) حاوی EDTA (۰/۲ میلی مولار)، ۵۰ میکرولیتر H_2O_2 (۲۵۰ میلی مولار)، ۱۷۵ میکرولیتر اسید آسکوربیک (۰/۵ میلی مولار)، ۵۰ میکرولیتر آلومین سرم گاوی (۵۰ $\mu g/ml$) و ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه مخلوط گردید و در طول موج ۲۹۰ نانومتر خوانده شد. تنظیمات دستگاه به صورت کینتیک در طول موج ۲۹۰ نانومتر به مدت ۶۰ ثانیه بود (۲۵). بعد از خواندن میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز با کمک رابطه ۳ محاسبه گردید.

EC= ضریب خاموشی برابر ۲/۸ میکرومول بر سانتی‌متر

فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز: اندازه‌گیری فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز با استفاده از روش Lin و Kao (۲۰) انجام شد. طبق این روش ۳ میلی‌لیتر مخلوط واکنش شامل بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با pH= ۷، ۳/۳۵ میکرولیتر گایاکول ۹ میلی‌مولار، ۴/۵۱ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۱۹ میلی‌مولار و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. کینتیک جذب در طول موج ۴۷۰ نانومتر در دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول ۱ دقیقه اندازه‌گیری شد. ضریب خاموشی، ۲۶/۶ میلی‌مول بر سانتی‌متر در نظر گرفته شد. میزان فعالیت آنزیم با استفاده از رابطه ۳ محاسبه شد.

فعالیت آنزیم گلوکاتایون ردوکتاز: این اندازه‌گیری طبق روش Foyer و Halliwell (۲۰) انجام شد. ۲۵۰ میکرولیتر

درصد اضافه شد. مخلوط به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد در حمام آب گرم قرار گرفت و بعد به سرعت روی یخ سرد شد. مخلوط حاصل در ۱۰۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و جذب محلول رویی حاصل با دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۵۳۲ نانومتر خوانده شد و مقدار جذب غیر اختصاصی در ۶۰۰ نانومتر از این مقدار کسر گردید. میزان مالون‌دآلدئید با استفاده از ضریب خاموشی $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ محاسبه شد.

عصاره‌گیری و اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی-اکسیدان: ۰/۰۵ گرم از بافت تازه گیاهان به همراه کمی ازت مایع درون هاون، روی یخ سائیده شدند. سپس ۱ میلی‌لیتر از بافر استخراج آنزیم (۵۰ میلی مولار بافر فسفات سدیم با pH=۷/۸) به آنها اضافه گردید و همچنان روی یخ سائیده شد. عصاره حاصل به مدت ۲۰ دقیقه، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و با دور ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند. از محلول رویی برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی-اکسیدان استفاده گردید.

فعالیت آنزیم کاتالاز: ۵۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی و ۹۵۰ میکرولیتر از محلول واکنش حاوی ۱۰ mM آب اکسیژنه در سالین بافر فسفات (PBS) افزوده شد و منحنی کاهش جذب نوری در مدت ۱۲۰ ثانیه در طول موج ۲۴۰ نانومتر رسم گردید (۱). میزان فعالیت آنزیم کاتالاز با استفاده از رابطه ۳ محاسبه شد.

$$\text{رابطه ۳} \quad EA = \{\Delta OD \times (1000/A) \times B\} / EC \times C$$

EA = میزان فعالیت آنزیم بر حسب واحد (احیای یک میلی‌مولار پراکسید هیدروژن در دقیقه) در گرم وزن تر برگ، ΔOD = تغییرات میزان جذب، A = مقدار نمونه، B = مقدار بافر استخراج، EC = ضریب خاموشی معادل ۰/۰۳۹ میکرومول بر سانتی‌متر، C = وزن بافت تر

فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز: سنجش فعالیت این آنزیم با استفاده از روش Beyer و Fridovich (۷) انجام

پیش تهیه شده محاسبه شد.

آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار اجرا گردید. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS انجام شد. برای مقایسه میانگین داده‌ها از آزمون حداقل تفاوت معنی‌داری (LSD) ($P < 0.05$) استفاده شد و در نهایت نمودارها با نرم افزار اکسل رسم گردید.

نتایج و بحث

بروز لکه‌های قهوه‌ای و سیاه رنگ روی برگ ساقه‌های A. annua موجود در محیط کشت‌های حاوی تیمار ۱ و ۲ میلی‌مولار نیترات نقره، احتمالاً نشان‌دهنده سمیت شدید نقره در این دو غلظت بود، بنابراین ساقه‌های نکرده شده در این دو غلظت برای بررسی تحقیقات مناسب تشخیص داده نشدند. به همین دلیل بررسی شاخص‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی فقط در غلظت‌های ۰/۰۱، ۰/۱ و ۰/۱ میلی‌مولار انجام شد.

نتایج حاصل از تجزیه واریانس اثر نیترات نقره بر صفات اندازه‌گیری شده A. annua در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱- تجزیه واریانس (مقادیر میانگین مربعات) تأثیر نیترات نقره بر صفات مختلف در ساقه‌های A. annua

| منابع تغییر | درجه آزادی | نسبت وزن تر/وزن خشک | کلروفیل a | کلروفیل b | H ₂ O ₂ | پراکسیداسیون لیپید | کاتالاز | آسکوربات پراکسیداز | گاپاکول پراکسیداز | تیون ردوک تاز | گلوتا سوپر اکسید دیسموتاز | پروکلین |
|-------------|------------|---------------------|-----------|-----------|-------------------------------|--------------------|---------|--------------------|-------------------|---------------|---------------------------|---------|
| نیترات نقره | ۳ | ۵/۱۵* | ۸/۵۳* | ۲/۱۹* | ۱/۰۱* | ۲۷/۷۴* | ۲۸* | ۰/۱* | ۱/۵۶* | ۱۵ | ۰/۰۹* | ۲۶۴/۹۶* |
| خطا | ۸ | ۰/۰۴ | ۰/۳۸ | ۰/۳۴ | ۱/۹۵ | ۰/۰۴ | ۱۸/۳۳ | ۰/۰۰۷۵ | ۰/۰۸ | ۰/۰۸ | ۰/۰۰۷۴ | ۲/۵۵ |
| کل | ۱۱ | | | | | | | | | | | |

*: بیانگر معنی‌دار بودن در سطح ۰/۰۵ و ns: بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار است.

فلزات سنگین قرار می‌گیرند، ایجاد تنش اکسیداتیو است. رادیکال‌های فعال اکسیژن عمدتاً در کلروپلاست و میتوکندری تولید می‌شوند و آسیب‌های اکسیداتیو بر چربی‌ها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک وارد می‌کنند، در نتیجه سبب اختلال در متابولیسم طبیعی سلول، اختلال در

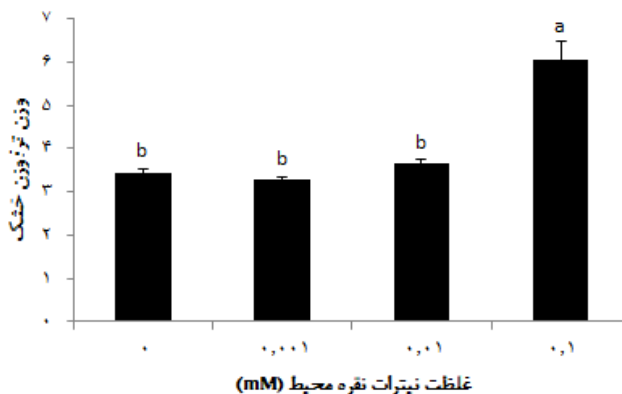
بافر پتاسیم فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار $pH = 7/8$ ، ۱۲۰ میکرولیتر NADPH ۱ میلی‌مولار، ۵۰ میکرولیتر گلوکاتینون اکسید شده ۱۰ میلی‌مولار و ۴۸۰ میکرولیتر آب مقطر مخلوط شدند. به مخلوط واکنش حاصل ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی افزوده و مصرف NADPH در یک دقیقه در طول موج ۳۴۰ نانومتر در دستگاه اسپکتروفتومتر با مد کینتیک خوانده شد. فعالیت آنزیم گلوکاتینون ردوکتاز با استفاده از رابطه ۳ محاسبه گردید. $EC =$ ضریب خاموشی معادل ۶/۲ میلی‌مول بر سانتی‌متر در نظر گرفته شد.

اندازه‌گیری پروکلین: اندازه‌گیری میزان پروکلین به روش Lindsley و Troll (۳۴) انجام شد. در ابتدا ۰/۰۵ گرم از بافت تازه گیاه در هاون سرد شده با ۱ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد سانیده شد. پس از قرار گرفتن عصاره حاصل در ۴ درجه سانتی‌گراد برای ۲۴ ساعت، به مدت ۵ دقیقه در ۱۴۰۰۰g سانتریفیوژ شد. ۲۵۰ میکرولیتر از محلول رویی، با ۴۷۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ درصد و ۱ میلی‌لیتر مخلوط واکنش رقیق گردید و از این محلول برای سنجش میزان پروکلین استفاده شد. میزان جذب در طول موج ۵۲۰ نانومتر قرائت گردید و مقدار پروکلین به کمک منحنی استاندارد از

۱- تأثیر نیترات نقره بر نسبت وزن تر/وزن خشک: طبق نتایج به‌دست آمده در این پژوهش، نسبت وزن تر و وزن خشک تنها در غلظت ۰/۱ میلی‌مولار نیترات نقره افزایش معنی‌داری نسبت به شاهد نشان داد (شکل ۱). یکی از علت‌های مهم آسیب بافتی در گیاهانی که در معرض

البسیستیشن مورد نظر محتوای آب ساقه‌های گیاه *A. annua* را در اثر تخریب غشاها افزایش داده است.

فرایندهای مهم تنفس و فتوسنتز و کاهش رشد می‌شوند (۲۲). با توجه به افزایش نسبت وزن تر به وزن خشک ساقه‌ها در غلظت ۰/۱ میلی‌مولار نیترات نقره احتمالاً

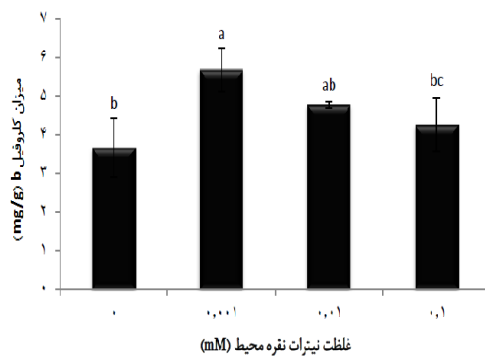


شکل ۱- تأثیر غلظت‌های مختلف نیترات نقره بر نسبت وزن تر به وزن خشک اندام هوایی در *A. annua* (حروف غیر یکسان بیانگر اختلاف معنی‌دار میانگین‌ها در سطح ۰/۰۵ با آزمون LSD است)

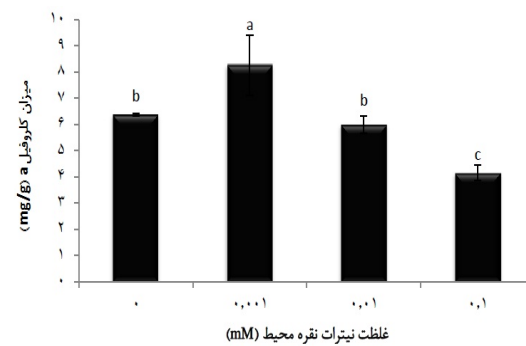
سلول‌های سالم سیانوباکتریوم و اسپیرولیناپلاتنیس باعث دگرگونی در فعالیت زنجیره انتقال الکترون و فتوسیستم II می‌شود. همچنین فلزات سنگین معمولاً از طریق مهار فعالیت آنزیم، فرایندهای متابولیکی را ممانعت می‌کنند، بنابراین کاهش میزان کلروفیل در اثر فلزات سنگین به علت مهار فعالیت آنزیم‌های بیوسنتز کلروفیل می‌باشد. برای مثال کادمیوم با مهار فعالیت آنزیم پروتوکلروفیلید ردوکتاز با واسطه برهم‌کنش با گروه‌های سولفیدریل و نیز مهار آنزیم آمینولولینیک‌اسید (ALA) سنتاز باعث کاهش کلروفیل می‌شود (۳۵). به علاوه نتایج نشان داد که یون‌های فلزات سنگین وابسته به غلظت بر روی انتقال الکترون در جایگاه‌های چندگانه از قبیل مهار آنزیم شکست آب (واقع در جایگاه اکسیداسیون فتوسیستم II) اثر می‌گذارند و انتقال انرژی را تغییر می‌دهند. Huang و Tao (۱۷) گزارش کردند که محتوای کلروفیل در حضور غلظت بالای فلز مس در جوانه‌های گیاه *Pinus sylvestris* کاهش یافت و این کاهش در محتوای کلروفیل می‌تواند ناشی از پراکسیداسیون غشاها یا کلروپلاست توسط مس باشد. از آنجایی‌که کلروپلاست‌ها غشاها را بسیار حساس دارند، احتمال دارد که فلزات سنگین از جمله نقره بر سلامت

۲- تأثیر نیترات نقره بر میزان کلروفیل a و کلروفیل b: در غلظت ۰/۰۰۱ میلی‌مولار نیترات نقره، میزان کلروفیل a و کلروفیل b افزایش معنی‌داری نسبت به شاهد یافت و در غلظت ۰/۱ میلی‌مولار نیترات نقره، میزان کلروفیل a کاهش معنی‌داری نشان داد (شکل ۲). کلروفیل نقش یگانه و اثرگذار در زندگی گیاهان عالی دارد. از آنجایی‌که تجزیه کلروفیل پاسخ عمومی به تنش است، می‌توان نتیجه گرفت که تغییرات در میزان کلروفیل یکی از شاخص‌های مهم تنش محیطی است و تحمل گونه‌ها به تنش را توصیف می‌کند. جانیشینی یون Mg^{2+} در مولکول کلروفیل با فلزات سمی مشخص مانند مس، روی، کادمیوم یا جیوه در طی تنش‌های فلزات سنگین در گیاهان عالی نشان داده شده است که باعث کاهش فتوسنتز می‌شود (۲۲)، به طوری که ساختار و فعالیت مولکول کلروفیل و همچنین فعالیت آنزیم ریبولوز ۱ و ۵- بیس فسفات-کربوکسیلاز اکسیژناز را تغییر می‌دهد. همچنین در زنجیره انتقال الکترون فتوسنتزی و دسترسی به واسطه‌ها (از جمله سیتوکروم b6f و b559) اختلال ایجاد می‌کند. Schat و همکاران (۳۱) نشان دادند که اضافه کردن فلزات سنگین کروم (۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار) و نقره (۵، ۱۰ و ۱۵ میکرومولار) به

جایگاه فعال گیرنده‌های اتیلنی موجود در غشاء پلاسمایی سلول‌ها و یا شبکه اندوپلاسمی به‌جای کوفاکتور مس، می‌تواند گیرنده‌ها را غیر فعال و مانع از پاسخ به اتیلن در گیاه شوند (۳). بنابراین افزایش غلظت کلروفیل‌های a و b در غلظت ۰/۰۰۱ میلی‌مولار نیترات نقره به طور واضح تأثیر آن را به عنوان بازدارنده فعالیت اتیلن نشان می‌دهد. در نتیجه ساقه‌های تیمار شده با ۰/۰۰۱ میلی‌مولار نیترات نقره با افزایش میزان کلروفیل می‌تواند میزان تثبیت دی-اکسیدکربن و متعاقباً فتوسنتز را افزایش دهند و باعث افزایش بیوماس گیاه شوند. کاهش میزان کلروفیل تحت تأثیر هورمون اتیلن در شرایط کشت *in vitro* گزارش شده است و مشخص شده که میان سطح اتیلن موجود در ظروف کشت بافت و سطح کلروفیل اندازه‌گیری شده رابطه‌ای معکوس وجود دارد (۱۹) که این کاهش توسط کاربرد بازدارنده‌های بیوسنتز یا فعالیت اتیلن مهار شده است.



ب



الف

شکل ۲- تأثیر غلظت‌های مختلف نیترات نقره بر مقادیر کلروفیل a (الف) و کلروفیل b (ب) در برگ *A. annua*. (حروف غیر یکسان بیانگر اختلاف معنی‌دار میانگین‌ها در سطح ۰/۰۵ آزمون LSD است)

اجتناب ناپذیر متابولیسم طبیعی سلول می‌باشد. کلروپلاست و میتوکندری سلول‌های گیاهی از مهمترین تولیدکننده‌های گونه‌های فعال اکسیژن هستند. الکترون‌های نشت‌یافته از زنجیره انتقال الکترون می‌توانند با اکسیژن مولکولی حاصل از متابولیسم طبیعی گیاه، ترکیب شده و تولید گونه‌های فعال اکسیژن نمایند. این گونه‌های اکسیژن

غشای پلاستیدها و بر فتوسنتز اثر بگذارند. از علل دیگر کاهش کلروفیل توسط فلزات سنگین تأثیر بر جمع شدن در مولکول‌های کلروفیل در کمپلکس‌های رنگدانه - پروتئین فتوسیستم‌ها و مهار سنتز پروتئین سیستم جمع‌آوری کننده نور (LHC II) در مرحله نسخه برداری است که منجر به فتواکسیدشدن کلروفیل تازه تشکیل شده می‌گردد (۱۵). Sharma و Pandey (۲۶) نشان دادند که غلظت‌های بالای نیکل، کادمیوم و کبالت منجر به کاهش قابل توجه در غلظت کلروفیل a و b در گیاه کلم شده است.

همچنین از آنجایی که محتویات کلروفیلی گیاه، یکی از شاخص‌های عملکرد هورمون اتیلن است، بررسی تأثیر نیترات نقره (به عنوان یک مهارکننده دریافت اتیلن توسط گیرنده‌های آن در گیاه) بر میزان کلروفیل کل، به صورت غیر مستقیم اطلاعاتی درباره تأثیر اتیلن بر کلروفیل و فرایند فتوسنتز فراهم می‌آورد. یون‌های نقره با جانشینی در

۳- تأثیر نیترات نقره بر میزان H_2O_2 و پراکسیداسیون لیپید غشاء: میزان H_2O_2 و پراکسیداسیون لیپید غشاء نمونه‌های تحت تیمار نیترات نقره در تمام غلظت‌ها افزایش معنی‌داری نسبت به شاهد نشان داد (جدول ۲). یکی از تغییرات بیوشیمیایی که در گیاه تحت تنش ایجاد می‌شود تجمع گونه‌های فعال اکسیژن است که محصول

محیطی نامناسب باعث آسیب رساندن به لیپیدها و اسیدهای چرب غشایی شده و رادیکال‌های لیپید و پراکسی و هیدروکسی پراکسی تولید می‌کنند. رادیکال‌های جدید تولید شده می‌توانند واکنش‌های اکسیداسیون لیپیدها را تسریع کنند. گزارش شده است که با افزایش میزان پراکسیداسیون لیپید در گیاهان تحت تنش کادمیوم، فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز افزایش می‌یابد. این آنزیم اکسیژناسیون اسیدهای چرب غیراشباع و با زنجیره طولانی را کاتالیز می‌کند (۲۹). پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء، نفوذ پذیری غشاء را تحت تأثیر قرار می‌دهد، به علاوه اکسیژناسیون اسیدهای چرب غیر اشباع پیام‌آورهای ثانویه‌ای را برای مقابله با تنش تولید می‌کنند. Gallego و همکاران (۱۱) نشان دادند که تیمار برگ‌های آفتابگردان با فلزات سنگین آهن، مس و کادمیوم منجر به افزایش پراکسیداسیون لیپیدی و فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز می‌شود. در این تحقیق نیز میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء نسبت به شاهد افزایش یافت که این مشاهده با توجه به افزایش H_2O_2 در تمام غلظت‌های نیترا ت نقره قابل توجه می‌باشد. در واقع در اثر تولید اکسیژن‌های فعال در حضور نیترا ت نقره، میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء افزایش می‌یابد.

سمی و بسیار واکنش پذیرند و در غیاب مکانیسم‌های حفاظتی می‌توانند متابولیسم طبیعی سلول را به میزان زیادی مختل کنند. این رادیکال‌ها از طریق پراکسیداسیون لیپیدها و در نتیجه تخریب غشاء، تخریب پروتئین‌ها، غیر فعال کردن آنزیم‌ها، از بین بردن رنگیزه‌ها و اختلال در عملکرد DNA، تنش ثانویه اکسیداتیو ایجاد می‌کنند که منجر به خسارت‌های جدی به ساختارهای سلولی و گیاه می‌گردد (۲۹). طبق گزارش‌های Hsu و Kao (۱۴) تنش کادمیوم باعث افزایش مقدار H_2O_2 در برگ‌های برنج شده است. همچنین افزایش میزان پراکسید هیدروژن به عنوان شاخص تنش اکسیداتیو تحت تیمار سرب در گیاهچه‌های یونجه گزارش شده است (۱۲). در این تحقیق افزایش میزان H_2O_2 احتمالاً به دلیل برهم خوردن تعادل بین تولید رادیکال‌های آزاد و فاکتورهای مؤثر در حذف آنها در حضور فلز سنگین نقره است. همچنین ممکن است الکترون‌های نشت کرده از زنجیره انتقال الکترون افزایش یافته، با اکسیژن مولکولی ترکیب شده و تولید گونه‌های فعال اکسیژن بیشتر از نمونه شاهد شده باشد.

در شرایط تنش‌زا فرایندهای مخرب غشاء فعال شده و منجر به پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء می‌شوند. به عنوان مثال رادیکال‌های آزاد تنش اکسیداتیو حاصل از شرایط

جدول ۲- تغییرات میزان H_2O_2 و پراکسیداسیون لیپید نسبت به افزایش غلظت نیترا ت نقره در ساقه‌های *A. annua*

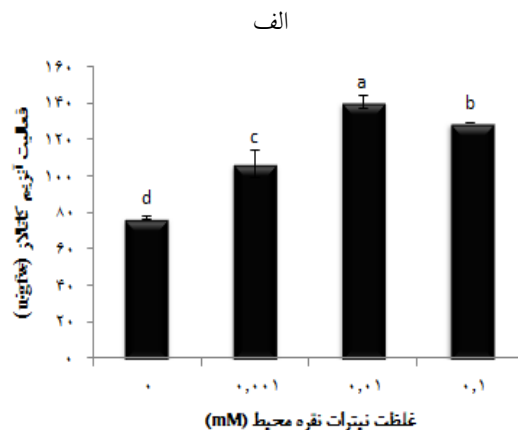
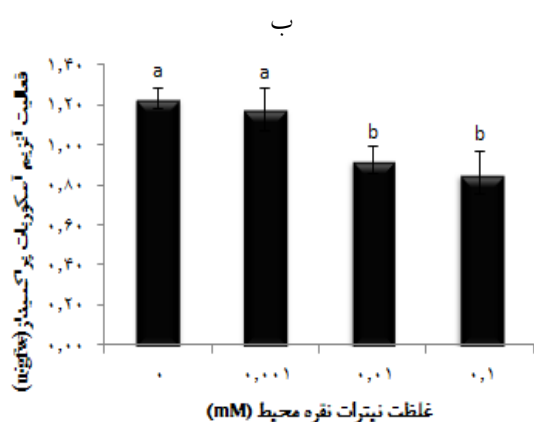
| کنترل | ۰/۰۰۱ mM | ۰/۰۱ mM | ۰/۱ mM |
|--------------------|----------------|----------------|----------------|
| H_2O_2 | c ۱۴/۰۷ ± ۱/۴۴ | b ۱۸/۰۱ ± ۱/۵۹ | a ۲۴/۲۷ ± ۱/۶۴ |
| پراکسیداسیون لیپید | c ۲/۹ ± ۰/۲ | b ۸/۷۳ ± ۰/۲ | a ۹/۴۲ ± ۰/۲ |

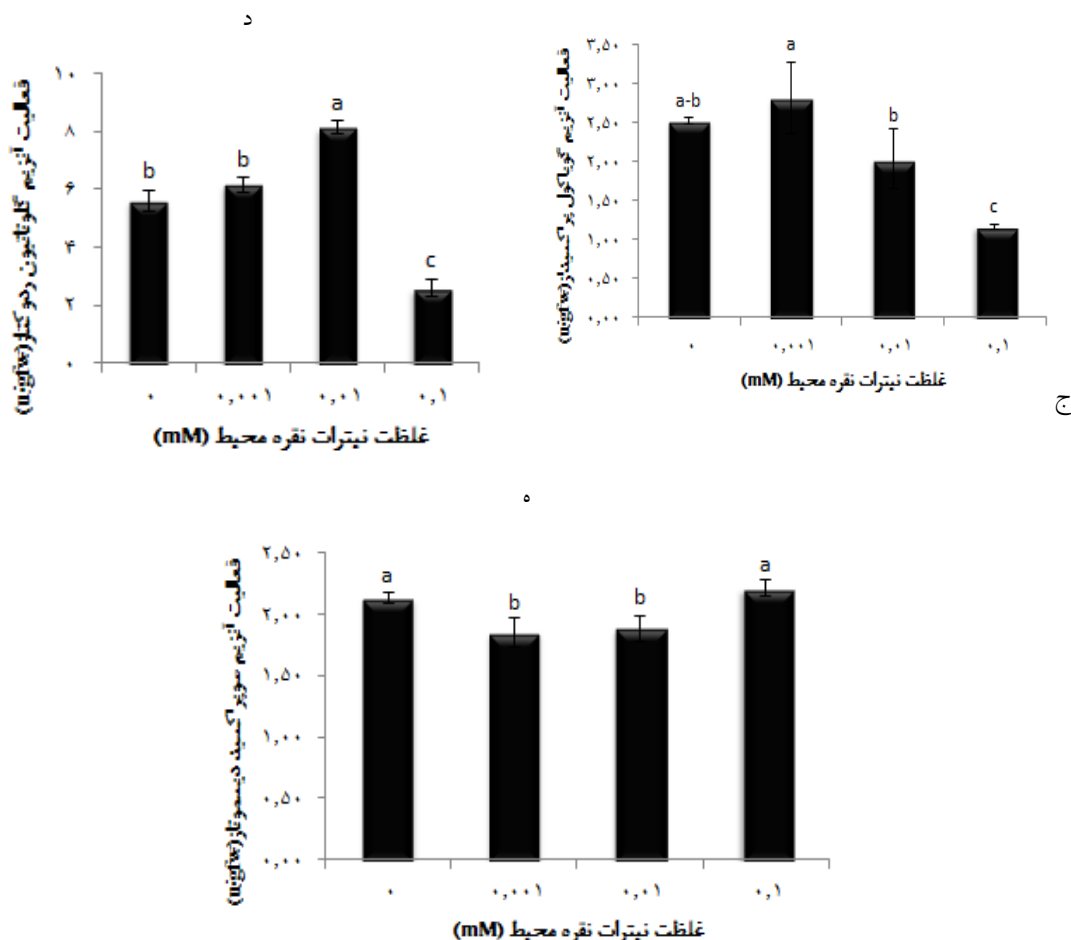
آنزیم گایاکول پراکسیداز تنها در تیمار ۰/۱ میلی‌مولار ۵۳/۶۹٪ نسبت به شاهد کاهش معنی‌داری نشان داد (شکل ۳-ج). فعالیت آنزیم گلوکاتایون ردوکتاز در تیمار ۰/۰۱ میلی‌مولار، ۴۴/۸۹٪ افزایش و در تیمار ۰/۱ میلی‌مولار، ۵۳/۹۳٪ کاهش معنی‌داری نشان داد (شکل ۳-د). همچنین فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در تیمارهای ۰/۰۰۱ و

۴- تأثیر نیترا ت نقره بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان: فعالیت آنزیم کاتالاز تحت تیمار نیترا ت نقره در تمام تیمارها نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری داشت (شکل ۳-الف). فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در تیمار ۰/۰۱ و ۰/۱ میلی‌مولار به ترتیب ۲۵/۰۴٪ و ۳۰/۴۳٪ نسبت به شاهد کاهش معنی‌داری یافت (شکل ۳-ب). فعالیت

های گلوتاتیون پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز تحت تنش سلنیم و بدنبال آن کاهش تنش اکسیداتیو در گیاهچه های گندم گزارش شده است (۱۳). در این تحقیق با توجه به اینکه فعالیت آنزیم کاتالاز در تمام تیمارها افزایش یافته می‌توان نتیجه گرفت که حذف اکسیژن‌های فعال بیشتر از سایر آنزیم‌ها بر عهده کاتالاز بوده و پاسخ ناکافی سایر آنزیم‌ها را جبران کرده است. فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز تنها در تیمار ۰/۰۱ میلی‌مولار نیترات نقره افزایش معنی‌دار یافت که احتمالاً به فعالیت آنزیم کاتالاز کمک شده است. سایر آنزیم‌ها در تمام تیمارها یا تغییر معنی‌داری نداشته یا کاهش یافتند. تغییرات ایجاد شده در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان ممکن است در ارتباط با تنش اکسیداتیو وارده به گیاه در اثر تجمع ROSها در پی تیمار فلز سنگین نقره و همچنین تشدید فرایند پراکسیداسیون لیپیدهای همسو با این تنش باشد. در کل افزایش فعالیت آنزیمی می‌تواند برابر با افزایش سرعت سمیت‌زدایی ROSها در گیاه باشد. احتمالاً از علت‌های کاهش فعالیت آنزیم‌ها می‌تواند تشدید اثرات مخرب نقره و یا ROSها القا شده بر ساختار و فعالیت این آنزیم‌ها باشد. مشخص شده که نقره می‌تواند جان‌شین فلزاتی که به عنوان کوفاکتور آنزیمی در ساختار آنزیم قرار دارند، گردد و به این ترتیب بر فعالیت آن اثر منفی داشته باشد (۲۸).

۰/۰۱ میلی‌مولار به ترتیب ۱۳/۳۳٪ و ۱۱/۵۱٪ نسبت به شاهد کاهش معنی‌داری یافت (شکل ۳-ه). همان‌طور که ذکر شد تنش فلزات سنگین افزایش تولید O_2 و H_2O_2 را در گیاهان به همراه دارد. افزایش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و گایاکول پراکسیداز توسط نیترات نقره نشان می‌دهد که این آنزیم‌ها با همکاری هم در حذف پراکسید هیدروژن عمل می‌کنند و نیز دلیلی بر شروع دفاع آنتی‌اکسیدان می‌باشد، به طوری که به عنوان مثال پاسخ ناکافی یک آنزیم به نیترات نقره توسط افزایش فعالیت آنزیمی دیگر جبران می‌شود. کاتالاز در پراکسی‌زوم سلول‌های گیاهی حضور دارد و مهمترین آنزیم برای حذف پراکسید هیدروژن است. این آنزیم سلول‌ها را از اثرات سمی پراکسید هیدروژن از طریق تجزیه آنها به اکسیژن مولکولی و آب، بدون تولید رادیکال‌های آزاد حفاظت می‌کند (۶). طبق نتایج حاصل توسط Schutzendubel و همکاران (۳۲)، اضافه کردن کادمیوم ۵۰ میکرومولار به کشت هیدروپونیک ریشه‌های *Pinus sylvestris* در ۶ ساعت اول باعث افزایش فعالیت کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز می‌شود و بعد از ۱۲ ساعت کاهش می‌یابد، در حالی که در ۶ ساعت اول باعث کاهش فعالیت گلوتاتیون ردوکتاز می‌شود و بعد از ۱۲ ساعت باعث افزایش فعالیت این آنزیم نسبت به شاهد می‌شود. همچنین افزایش فعالیت آنزیم



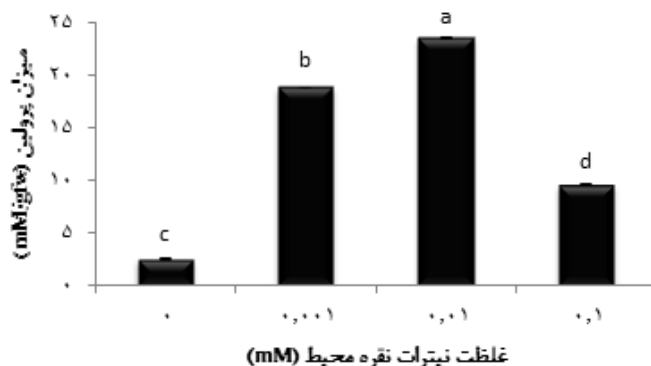


شکل ۳- تأثیر غلظت‌های مختلف نیترات نقره بر فعالیت آنزیم کاتالاز (الف)، آسکوربات پراکسیداز (ب)، گایاکول پراکسیداز (ج)، گلوکاتامین ردوکتاز (د) و سوپراکسید دیسموتاز (ه) در ساقه‌های *A. annua* (حروف غیر یکسان بیانگر اختلاف معنی‌دار میانگین‌ها در سطح ۰/۰۵ آزمون LSD است)

برای حفاظت آنزیمی گیاهان تحت تنش توسط این اسیدآمین‌ها اعلام کردند. Schat و همکاران (۳۱) دلیل افزایش پرولین تحت تیمار کادمیوم در گیاه *Silene vulgaris* را کمبود آب مؤثر از تنش کادمیوم، نه اثر مستقیم کادمیوم بر این اسیدآمین دانستند. تجمع پرولین در زمان تنش، حاصل تغییر در سرعت بیوسنتز و تجزیه این اسیدآمین می‌باشد. در این حالت میزان فعالیت آنزیم‌های مربوطه، همچنین غلظت‌های مؤثر پیش‌سازها و فرآورده‌های آن مهم است (۳۲). در این تحقیق می‌توان پیش‌بینی کرد که افزایش میزان پرولین در تمام غلظت‌های نیترات نقره به جلوگیری از آسیب اکسیداتیو القا شده توسط نیترات نقره کمک کرده است.

۵- تأثیر نیترات نقره بر میزان پرولین: میزان پرولین در تمام غلظت‌های نیترات نقره افزایش چشم‌گیری نسبت به شاهد نشان داد (شکل ۴). اسیدآمین پرولین تحت شرایط نامطلوب محیطی در گیاه تجمع می‌یابد. پرولین در محدوده وسیعی از گونه‌های گیاهی تحت تنش‌های مختلفی مانند خشکی، شوری، دما، نور زیاد و فلزات سنگین مجتمع می‌شود (۲۱).

تنش‌ها از جمله تنش فلزات سنگین، با سرعت بخشیدن به پیری برگ، میزان پرولین را افزایش می‌دهند. Shah و همکاران (۳۳) دلیل افزایش پرولین در گیاه تیمار شده با کادمیوم را تلاش برای حفظ اسیدپتید سیتوزولی و یا راهی



شکل ۴ - تأثیر غلظت‌های مختلف نیترات نقره بر میزان پرولین در ساقه‌های *A. annua* (حروف غیر یکسان بیانگر اختلاف معنی‌دار میانگین‌ها در سطح ۰/۰۵ آزمون LSD است)

سپاسگزاری

این پروژه با حمایت معاونت پژوهشی دانشگاه شهرکرد انجام شده است، که بدین وسیله قدردانی می‌گردد. همچنین نویسندگان مقاله از مسئولان مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران به دلیل در اختیار گذاشتن نمونه‌های بذر گیاه آرتمیسیا تشکر می‌کنند.

نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که نقره موجود در ساقه‌ها باعث تجمع ترکیباتی مثل پراکسید هیدروژن شده که به عنوان یک مولکول پیام رسان عمل کرده و باعث القای دفاع آنتی‌اکسیداتیو در برگ‌ها می‌شود. افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز با افزایش تنش نقره نشان‌دهنده شرکت فعال آنزیم در دفاع اکسیداتیو ناشی از نقره است، که به منظور بهبود مقاومت گیاه درمنه یکساله علیه تنش فلزات سنگین، ایجاد لاین‌های ترانسژنیک کاتالاز این گیاه توصیه می‌گردد.

منابع

- 1- Aebi, U., Fowler, W. E., Rew, P. and Sun, T.-T. 1983. The fibrillar substructure of keratin filaments unraveled. *The Journal of Cell Biology*, 97(4): 1131-1143.
- 2- Albertina, X., Leonardo, R.R., Miguel, A.V., Sylvie, C., Jean-Franc and Claudemir, F. 2006. Cadmium phytotoxicity: Quantitative sensitivity relationships between classical endpoints and antioxidative enzyme biomarkers. *Science of The Total Environment*, 357:120-127.
- 3- Alexieva, V., Sergiev, I., Mapelli, S. and Karanov, E. 2001. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant, Cell & Environment*, 24(12): 1337-1344.
- 4- Anderson, M. D., Prasad, T. K. and Stewart, C. R. 1995. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. *Plant Physiology*, 109(4): 1247-1257.
- 5- Arnon, D. I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*, 24(1): 1-15.
- 6- Arora, A., Sairam, R. K. and Srivastava, G. C. 2002. Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current Science-Bangalore*, 82(10): 1227-1238.
- 7- Beyer, Jr W. F. and Fridovich, I. 1987. Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. *Analytical Biochemistry*, 161(2): 559-566.
- 8- De Ridder, S., Van Der Kooy, F. and Verpoorte, R. 2008. *Artemisia annua* as a self-reliant treatment for malaria in developing countries. *Journal of Ethnopharmacology*, 120(3): 302-314.
- 9- Ferreira, J. F. S. and Janick, J. 1995. Floral morphology of *Artemisia annua* with special reference to trichomes. *International Journal of Plant Sciences*: 807-815.
- 10- Foyer, C. H. and Halliwell, B. 1976. The

- presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta*, 133(1): 21-25.
- 11- Gallego, S. M., Benavides, M. P. and Tomaro, M. L. 1996. Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress. *Plant Science*, 121(2): 151-159.
 - 12- Ghelich, S., Zarinkamar, F., Niknam, V. (2015). Lead accumulation and its effects on peroxidase activity, phenolic and flavonoid compounds in seedlings of *Medicago sativa* L. *Journal of Plant Researcher*. 28(1): 164-174.
 - 13- Habibi, G. 2015. Effect of foliar application of Se on growth, antioxidant defense and grain Se in two cultivars of spring wheat plants. *Journal of Plant Researcher*. 28(1): 91-102.
 - 14- Heath, R. L. and Packer, L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125(1): 189-198.
 - 15- Horvath, G., Droppa, M., Oravec, A., Raskin, V. I. and Marder, J. B. 1996. Formation of the photosynthetic apparatus during greening of cadmium-poisoned barley leaves. *Planta*, 199(2): 238-243.
 - 16- Hsu, Y. T. and Kao, C. H. 2004. Cadmium toxicity is reduced by nitric oxide in rice leaves. *Plant Growth Regulation*, 42(3): 227-238.
 - 17- Huang, Y. and Tao, S. 2004. Influences of excessive Cu on photosynthesis and growth in ectomycorrhizal *Pinus sylvestris* seedlings. *Journal of Environmental Sciences*, 16(3): 414-419.
 - 18- Iranshahi, M. and Emami S. A., Mahmoud, S. M. 2007. Detection of sesquiterpene lactones in ten *Artemisia* species population of Khorasan Provinces. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 3(35): 183-185.
 - 19- Jona, R., Cattro, A. and Travaglio, D. 1997. Chlorophyll content as index of ethylene inside culture vessels. *Acta Horticulturae*. 447, 229-230.
 - 20- Lin, C. C. and Kao, C. H. 1999. NaCl induced changes in ionically bound peroxidase activity in roots of rice seedlings. *Plant and Soil*, 216(1-2): 147-153.
 - 21- Mansour, M. M. F. 2000. Nitrogen containing compounds and adaptation of plants to salinity stress. *Biologia Plantarum*, 43(4): 491-500.
 - 22- Marchiol, L., Assolari, S., Sacco, P. and Zerbi, G. 2004. Phytoextraction of heavy metals by canola (*Brassica napus*) and radish (*Raphanus sativus*) grown on multicontaminated soil. *Environmental Pollution*, 132(1): 21-27.
 - 23- McKenna, I.M., Chaney, R.L., and Williams, F.M. 1993. The effects of cadmium and zinc interactions on the accumulation and tissue distribution of zinc and cadmium in lettuce and spinach. *Environmental Pollution*, 79: 113- 120.
 - 24- Mishra, S., Srivastava, S., Tripathi, R. D., Govindarajan, R., Kuriakose, S. V. and Prasad, M. N. V. 2006. Phytochelatin synthesis and response of antioxidants during cadmium stress in *Bacopa monnieri* L. *Plant Physiology and Biochemistry*, 44(1): 25-37.
 - 25- Nakano, Y. and Asada, K. 1987. Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts; its inactivation in ascorbate-depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical. *Plant and Cell Physiology*, 28(1): 131-140.
 - 26- Pandey, N. and Sharma, C. P. 2002. Effect of heavy metals Co^{2+} , Ni^{2+} and Cd^{2+} on growth and metabolism of cabbage. *Plant Science*, 163(4): 753-758.
 - 27- Ratte, H. T. 1999. Bioaccumulation and toxicity of silver compounds: a review. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18(1): 89-108.
 - 28- Rotilio, G., Rossi, L., De Martino, A., Da Costa Ferreira, A. M. and Ciriolo, M. R. 1995. Free radicals, metal ions and oxidative stress: chemical mechanisms of damage and protection in living systems. *Journal of The Brazilian Chemical Society*, 6(3): 221-227.
 - 29- Sandalio, L. M., Dalurzo, H. C., Gomez, M., Romero-Puertas, M. C. and Del Rio, L. A. 2001. Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *Journal of Experimental Botany*, 52(364): 2115-2126.
 - 30- Sarkar, D., Sud, K. C., Chakrabarti, S. K. and Naik, P. S. 2002. Growing of potato microplants in the presence of alginate-silver thiosulfate capsules reduces ethylene-induced culture abnormalities during minimal growth conservation *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 68, 79-89.
 - 31- Schat, H., Sharma, S. S. and Vooijs, R. 1997. Heavy metal-induced accumulation of free proline in a metal-tolerant and a nontolerant ecotype of *Silene vulgaris*. *Physiologia Plantarum*, 101(3): 477-482.
 - 32- Schutzendubel, A., Schwanz, P., Teichmann, T., Gross, K., Langenfeld-Heyser, R., Godbold, D. L. and Polle, A. 2001. Cadmium-induced changes in antioxidative systems, hydrogen

- peroxide content, and differentiation in Scots pine roots. *Plant Physiology*, 127(3): 887-898.
- 33- Shah, K., Kumar, R.G., Verma, S. and Dubey, R. S. 2001. Effect of cadmium on lipid peroxidation, superoxide anion generation and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. *Plant Science*, 161(6): 1135-1144.
- 34- Troll, W. and Lindsley, J. 1955. A photometric method for the determination of proline. *The Journal of Biological Chemistry*, 215: 655-660.
- 35- Zengin, F. K. and Munzuroglu, O. 2005. Effects of some heavy metals on content of chlorophyll, proline and some antioxidant chemicals in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 47(2): 157-164.
- 36- Zhang, F., Li X., Wang, C. and Shen, Z. 2000. Effect of cadmium on antioxidation rate of tissue and inducing accumulation of free proline in seedlings of mung bean. *Journal of Plant Nutrition*, 23: 356-368.

Evaluation of antioxidant defense responses in *Artemisia annua* L. shoot cultures under silver nitrate stress

Shabani L. and Saghirzadeh B.

Biology Dept., Faculty of Science, Shahrekork University, Shahrekork, I.R. of Iran

Abstract

In plants, several protective systems cooperate to overcome stressful conditions such as the pollution of the medium to heavy metals. In this research, the influence of different concentrations of silver nitrate on growth index, chlorophyll content, H₂O₂ content, lipid peroxidation, proline content, and the activity of antioxidant enzymes in shoot culture of *Artemisia annua* L. were investigated. In order to show the effects of the silver as heavy metal, on the aforementioned indices, the experiment was carried out in a completely randomized design with 3 replications. The different concentrations of silver nitrate (0, 0.001, 0.01, 0.1, 1, and 2 mM) were added to liquid MS medium including *Artemisia* shoot. The results showed that the ratio "fresh weight/dry weight" of the treated samples in 0.1 mM concentration of silver nitrate was increased relative to the control. Chlorophyll a and b contents were increased in 0.001 mM concentration and chlorophyll a was decreased in 0.1 mM concentration in comparison to the control. Among the measured antioxidant enzymes activity, only catalase was increased in all concentrations. Silver nitrate elicitor caused proline, H₂O₂, and lipid peroxidation to be increased in all concentrations. This study showed that the silver led to the accumulation of H₂O₂ as a signal and induced the antioxidant defense in shoots.

Key words: *Artemisia annua* L.; Antioxidant; Heavy metals; Proline; Silver nitrate.