ششمین کنگره سراسری عناصر کمیاب ایران
تهران، دانشگاه تهران، ۶ الی ۸ اسفند ۱۳۹۸
انجمن عناصر کمیاب ایران

تأثیر نانو ذرات آلومینیوم بر رشد و فعالیت سیستم آنتی‌اکسیدان سلول‌های جدا کشت چای(*Camellia sinensis L.*)

محدثه علی‌دوست[1]، فائزه قناتی

1. *دانشجو، دانشکده علوم‌زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران،*
2. *استاد، دانشکده، دانشکده علوم‌زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران*

چکیده

گیاه چای یکی از گیاهان بیش‌انباشته‌کننده آلومینیوم است، این گیاه قادر است در خاک‌های اسیدی با مقادیر بالای آلومینیوم رشد کند و در این شرایط علائم سمیت آلومینیوم را نشان ندهد. درواقع آلومینیوم در غلظت‌های بالا محرکی برای رشد این گیاه در خاک‌های اسیدی است. در تحقیق حاضر به بررسی نقش نانو ذرات آلومینیوم بر روی سلول‌های جدا کشت چای (*Camielia scinensis L.*) پرداخته شد. بدین منظور سلول‌های چای در فاز لگاریتمی رشد با غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکرومولار نانو ذرات آلومینیوم تیمار شدند. مقدار مانولیل دی آلدهید (MDA) به‌عنوان شاخص آسیب و نا پایداری غشا در سلول‌های تحت تیمار با نانو آلومینیوم در مقایسه با نمونه‌های شاهد کاهش معنی‌داری داشته و در بالاترین غلظت سلول‌ها ضمن حفظ تمامیت غشا توانستند رشدی معادل سلول‌های کنترل داشته باشند . بررسی مکانیسم‌های دفاعی، از طریق اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان نشان داد که ۴۰۰ میکرومولار نانو آلومینیوم باعث افزایش فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز (SOD شد که به نوبه خود سبب افزایش تولید هیدروژن‌پراکسید (H2O2)می شود.. ازآنجایی‌که افزایش میزان H2O2 برای سلول سمی است لذا تبدیل این ترکیب به عوامل کم‌خطر برای سلول ضروری است. بررسی فعالیت آنزیم کاتالاز که از هیدروژن‌پراکسید به‌عنوان سوبسترا استفاده می‌کند نشان داد که در تیمار ۴۰۰ میکرومولار آلومینیوم بیشترین میزان فعالیت این آنزیم نسبت به سلول‌های کنترل در مقایسه با دیگر غلظت‌ها وجود داشته است. به‌عنوان نتیجه‌گیری کلی می‌توان گفت که نانو ذرات آلومینیوم در غلظت ۴۰۰ میکرومولار نه‌تنها سبب تخریب سلول‌های چای نشده است بلکه با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان که جاروب‌کننده های اصلی گونه‌های فعال اکسیژن می‌باشند سبب تحریک رشد سلول‌های جدا کشت چای نیز شده است

واژه‌های کلیدی: نانو ذرات آلومینیوم، سلول‌های جدا کشت چای، سیستم آنتی اکسیدان

دانشجو، دانشکده علوم‌زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران، mahsa.alidoust@modares.ac.ir

مقدمه

گونه‌های فعال اکسیژن در طی متابولیسم طبیعی سلول‌ها (فرآیندهایی مانند فتوسنتز و تنفس) و یا در اثر تحریک گیاهان با محرک‌های مختلف غیر زیستی و همچنین محرک‌های زیستی ایجاد می‌شود گیاه با استفاده از مکانیسم‌های آنزیمی و غیر آنزیمی می‌تواند غلظت گونه‌های فعال اکسیژن را کاهش دهد و از این طریق از اثرات مخرب آن بکاهد. به‌طورکلی آنتی‌اکسیدان‌ها شامل آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی نظیر آنزیم‌های کاتالاز (*CAT*)، سوپراکسیددیسموتاز (*SOD*)، پراکسیداز (*PO*) و آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی شامل فلاونوئیدها، آنتوسیانین‌ها و سایر ترکیبات فنلی، آسکوربات، آلفاتوکوفرول، بتاکاروتن و غیره می باشد گونه‌های فعال اکسیژن دارای نقش‌های متفاوت و دوگانه‌ای هستند. به‌گونه‌ای که گاهی باعث تشدید خسارت به گیاه می‌شوند و در مواقعی باعث فعال شدن مسیر علامت رسانی (سیگنالینگ) سلولی و بروز پاسخ‌های دفاعی می‌گردند. این پاسخ دفاعی در برخی موارد به شکل افزایش تولید متابولیت های ثانویه مفید و دارویی است

مواد و روش ها

بررسی تمامیت غشا

میزان آسیب به غشا با اندازه‌گیری میزان مالونیل‌دی‌آلدهید (MDA) به‌عنوان فرآورده نهایی پراکسیداسیون لیپیدهای غشا و با اندازه‌گیری میزان نشت الکترولیت‌ها از غشای سلول‌ها تعیین شد. به‌منظور اندازه‌گیری میزان MDA، 200mg از سلول-های منجمد شده با ۳mL تری‌کلرواستیک‌اسید 0/1% سابیده شد. نمونه‌ها پس از همگن‌سازی، سانتریفیوژ (12000rpm، به مدت ۱۵ دقیقه) شدند. به 1mL از نمونه‌های صاف‌شده، 1mL تیوباربیوتوریک‌اسید 0/5% در تری‌کلرواستیک‌اسید۲۰٪ اضافه گردید و به مدت نیم ساعت در دمای 95˚C قرار داده شد. پس‌ازاین مدت نمونه‌ها بلافاصله بر روی یخ سرد شده و میزان MDA با اندازه‌گیری جذب در طول‌موج‌های ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر با استفاده از ضریب ثابت (ϵ=155 $mM^{-1}cm^{-1}$) محاسبه گردید

تعیین مقدار هیدروژن پراکسید (H_2O_2)-

۲/۰ گرم وزن‌تر از نمونه‌های منجمد شده با ۳ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک‌اسید ۱/۰ درصد (TCA) تا مرحله همگن شدن سابیده شد و سپس با دور 12000rpm به مدت 20 دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس ۵/۰ میلی‌لیتر از محلول رویی با ۵/۰ میلی-لیتر پتاسیم‌فسفات ۱۰ میلی‌مولار (pH=7) و یک میلی‌لیتر پتاسیم‌یدید یک مولار مخلوط شد و جذب نوری آن در طول‌موج ۳۹۰ نانومتر با دستگاهِ اسپکتروفتومتر خوانده شد. پراکسید هیدروژن با استفاده از منحنی استاندارد آن در دامنه ۰ تا ۳۰ میکرومولار محاسبه گردید

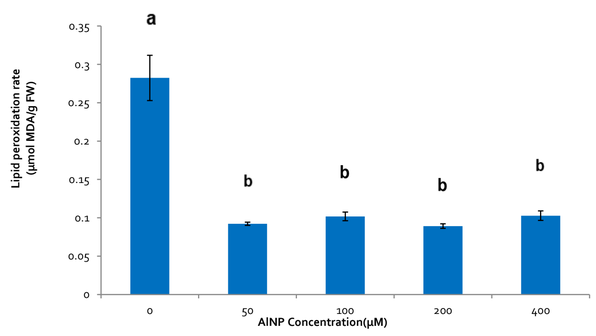
استخراج و اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT)

۲/۰ گرم توده سلولی منجمد شده در ۳ میلی‌لیتر بافر فسفات سدیم ۲۵ میلی‌مول (pH=6.8) سابیده و با دور12000rpm به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. از بخش رو شناور حاصل برای سنجش فعالیت کاتالاز استفاده شد.مخلوط واکنش در حجم نهایی ۳ میلی‌لیتر حاوی: بافر فسفات سدیم ۲۵ میلی‌مول (pH=6/8)، ۱۰ میلی‌مول H_2O_2 و عصاره آنزیم تهیه شد و سپس روند واکنش با کاهش جذب در ۲۴۰ نانومتر در مدت ۱ دقیقه دنبال شد. فعالیت آنزیم برحسب تغییرات جذب به نسبتmg پروتئین عصاره بیان شد

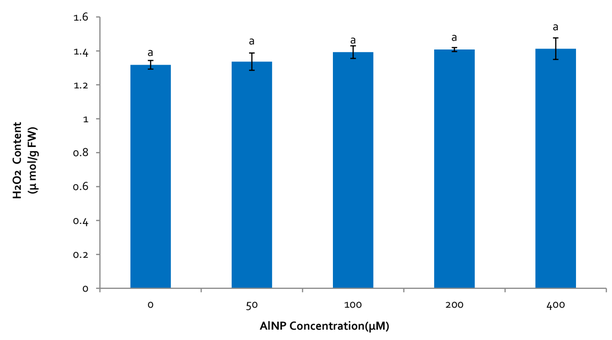
استخراج و اندازه‌گیری فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز (SOD)

برای استخراج سوپراکسیددیسموتاز محلول،200mg توده سلولی منجمدشده در 3mL بافرHEPES-KOH 50mM با pH=7/8 حاوی EDTA 0/1mM عصاره-گیری شد. همگنای حاصل در 15000gدور در دقیقه، به مدت ۱۱۵ دقیقه در دمای 4˚C سانتریفیوژ شد. بخش رو شناور حاصل برای سنجش فعالیت سوپراکسیددیسموتاز مورداستفاده قرار گرفت. ترکیب واکنش در حجم نهایی 3mL جذب مخلوط واکنش با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد.

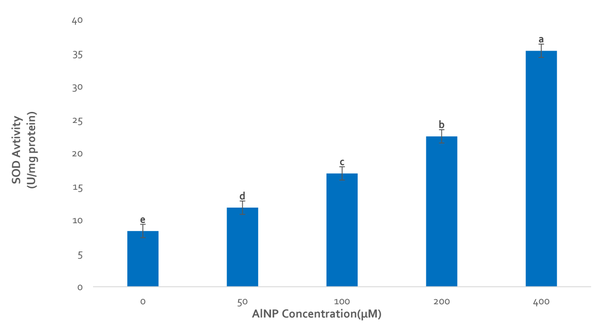
نتایج



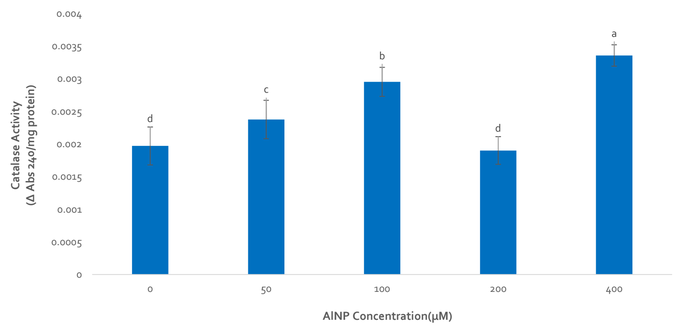
میزانMDA سلول‌های جدا کشت چای تحت تیمار با نانو ذرات آلومینیوم



تغییرات محتوای هیدروژن پراکسید (H_2O_2)سلول‌های جدا کشت چای تحت تیمار نانو ذرات آلومینیوم



تغییر فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) تحت تأثیر نانو ذرات آلومینیوم در سلول‌های جدا کشت چای)



تغییر فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) تحت تأثیر نانو ذرات آلومینیوم در سلول‌های جدا کشت چای

بحث و نتیجه گیری

مشخص‌شده است که گیاه چای قادر است که از آلومینیوم برای تحریک سیستم آنزیمی آنتی‌اکسیدان خود و درنتیجه افزایش رشد و مقاومت استفاده کند در این تحقیق نیز نشان داد که تیمار نانو ذرات آلومینیوم باعث افزایش رشد و درصد زنده‌بودن سلول‌ها شد. به‌طوری‌که در غلظت-های 100,200,400µM افزایش معنی‌داری در رشد سلول‌ها مشاهده شد. اندازه‌گیری مانولیل دی آلدهید (MDA) به‌عنوان شاخص پایداری غشا نشان که تیمار نانو ذرات آلومینیوم در غلظت‌های (50,100,200,400µM) باعث کاهش معنی‌دار میزان این پارامتر در مقایسه با شاهد شد و این بدان معنی است که در این سلول‌ها تمامیت غشای سلول حفظ‌شده است و درنتیجه کمک به رشد سلول می‌کند.از نخستین پاسخ‌های سلولی به تنش که در طی چند دقیقه پس از القای استرس صورت می‌گیرد، تولید و آزادسازی ROS هاست.نقش اصلی حفاظت در مقابل ROS بر عهده آنزیم سوپراکسید دیسموتاز هست که آنیون خطرناک سوپر اکسید را جمع‌آوری کرده و آن را به H2O2 تبدیل می‌کند.با توجه به اثرات مضر پراکسیدهیدروژن به‌عنوان محصول واکنش فوق تبدیل این ترکیب در مراحل بعدی ضروری است. این واکنش با فعالیت کاتالاز و تبدیل H2O2 به H2O کاتالیز می‌شود. عدم افزایش میزان H2O2 در سلول‌های جدا کشت چای حاصل افزایش معنی‌دار فعالیت کاتالاز است،

نتیجه گیری کلی

به‌عنوان نتیجه‌گیری کلی می‌توان گفت که نانو ذرات آلومینیوم در غلظت ۴۰۰ میکرومولار نه‌تنها سبب تخریب سلول‌های چای نشده است بلکه با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان که جاروب‌کننده های اصلی گونه‌های فعال اکسیژن می‌باشند باعث افزایش رشد سلول ها شده توان زنده‌بودن سلول‌ها را در حد مطلوب و نزدیک به کنترل نگه‌داشته است

منابع

Cakmak, I., Horst. W.J., 1991.Effect of aluminum on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities in root tips of soybean (Glycine max) Physiol. Plant, 83: 463-468.

Ghanati, F., Morita, A. and Yokota, H., 2005. Effects of aluminum on the growth of tea plant and activation of antioxidant system, Plant and Soil, 276: 133-141.

Loseva, N., Gordon, L., Alyabyev, A., Andreyeva, I., Kolesnikov, O., Chernov, V., Ponomareva, A., Kemp, R.B., 2004. Effect of induced changes in membrane permeability on the defence response of Chlorella vulgaris to infection by Achole plasma laidlawii. Thermochimica Acta, 422: 95–100

Plazek. A., Zur, I., 2003. Cold-induced plant resistance to necrotrophic pathogens and antioxidant enzyme activities and cell membrane permeability.Plant Science, 164: 1019-1028.

Sahebjamei H, Abdolmaleki P , Ghanati F (2007) Effects of magnetic field on the antioxidant enzyme activities of sus p ension-cultured tobacco cells Bioelectromagnetics, 28: 42-47.