اثر کلرید کادمیوم بر رنگیزه‌های فتوسنتزی، محتوای پرولین، میزان پروتئین‌های محلول و برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاهچه‌های عدس

فاطمه بارنده و حمیدرضا کاوسی*

[1]گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

(تاریخ دریافت: ۹۳/۱۲/۱۶، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹٤/۰٤/۱۰)

چکیده:

کادمیوم به آسانی توسط سیستم ریشه‌ای بسیاری از گونه‌های گیاهی جذب شده و به علت سمیت و حلالیت بالا در آب به عنوان یکی از مهم-ترین آلاینده‌ها محسوب می‌شود و بررسی اثرات فیزیولوژیک آن در گیاهان حائز اهمیت است. هدف از این تحقیق، بررسی اثر سمیت کادمیوم بر برخی صفات فیزیولوژیک گیاهچه‌های عدس بود. گیاهچه‌های دو هفته‌ای به مدت ۱۰ روز با غلظت‌های مختلف (صفر (شاهد)، ۰/۱۲۵، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲/۵ و ۵ میلی‌مولار) کلرید کادمیوم در قالب طرح کاملا تصادفی با ۳ تکرار مورد تیمار قرار گرفتند و سپس میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی، پرولین، پروتئین محلول و برخی آنزیم‌های آنتی اکسیدان (نظیر سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز) آن‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت کادمیوم، کاهش معنی‌داری در میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی مشاهده شد. به علاوه، کادمیوم بطور معنی-داری میزان پرولین را در گیاهچه‌های تیمار شده در مقایسه با شاهد افزایش داد. همچنین، کادمیوم سبب کاهش شدید پروتئین‌های محلول گیاه شد و محتوی پروتئین با افزایش غلظت کادمیوم بطور فزاینده‌ای کاهش یافت. نتایج حاصل از اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان نشان داد با افزایش غلظت کادمیوم، میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز در گیاهچه‌های عدس افزایش یافت. به دلیل کاهش محتوای پروتئین و میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی گیاه، می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که گیاه عدس تحت تاثیر سمیت کادمیوم قرار گرفته است. بعلاوه، گیاهچه‌های عدس برای غلبه بر تنش کادمیوم، میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان و پرولین را افزایش داده‌اند.

کلمات کلیدی: عدس، تنش کادمیوم، پرولین، رنگیزه‌های فتوسنتزی، آنزیم‌های آنتی اکسیدان.

مقدمه:

گیاهان طی چرخه زندگی خود معمولا در معرض انواع وسیعی از تنش‌های محیطی قرار می‌گیرند که از جمله آن‌ها می‌توان به تنش فلزات سنگین اشاره نمود. فلزات سنگین خطرناک ترین آلاینده‌ها هستند که در پوسته زمین و رسوبات وجود دارند. برخی فلزات سنگین مانند روی، نیکل و مس چون بخشی از ترکیبات مهم رنگیزه‌ها و آنزیم‌ها را تشکیل می‌دهند، جزء عناصر ضروری محسوب می‌شوند و فقط در غلظت‌های بالاتر از نیاز فیزیولوژیک گیاهان آثار سمی دارند. ولی برخی دیگر از فلزات سنگین مانند کادمیوم، آرسنیک، سرب و غیره که جزء فلزات غیر ضروری محسوب می‌شوند، حتی در غلطت‌های پایین نیز آثار سمی روی گیاهان دارند و به همین علت، فلزات سنگین به عنوان عوامل تنش‌زا برای گیاهان محسوب می‌شوند (Babula *et al*., 2008).

*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: hrkavousi@uk.ac.ir

در بین فلزات سنگین با پتانسیل ایجاد تنش، کادمیوم بیش از بقیه آن‌ها مورد توجه جوامع علمی قرار گرفته است. این فلز به علت سمیت زیاد و حلالیت بالا در آب و همچنین جذب سریع توسط سیستم ریشه‌ای بسیاری از گونه‌های گیاهی به عنوان یکی از مهم‌ترین آلاینده های فلزی محسوب می‌شود (Vassilev *et al*., 1998). منابع مختلف شامل صنایع، فاضلاب شهری و مواد سوختی غلظت این آلاینده را افزایش می‌دهند. همچنین استفاده از کودهای شیمیایی، مخصوصاً کودهای فسفاته مقدار این عنصر را در خاک افزایش می‌دهد (Baryla *et al*., 2001).

بررسی‌ها نشان داده است که کادمیوم بر تقسیم و رشد سلول‌ها، رشد کلی گیاه، تقسیم سلولی منطقه مریستمی و تنظیم رشد و نمو گیاهان اثر می‌گذارد و سبب تاخیر در رشد گیاهان می‌شود (Liu *et al*., 2003). از آنجایی که این فلز دو ظرفیتی می‌باشد، با عناصری مانند منیزیوم (Mg^{++}) موجود در کلروفیل و یا با یون آهن (Fe^{++}) که دو ظرفیتی‌اند، رقابت کرده و جایگزین آن‌ها می‌شود بنابراین فتوسنتز را در گیاه دچار اختلال می‌نماید (Sanita *et al*., 1999). همچنین کادمیوم کمبود عناصر غذایی ضروری را در گیاه افزایش داده و غلظت بسیاری از عناصر کم مصرف را کاهش می‌دهد (Jiang *et al*., 2004).کادمیوم اضافی از فعالیت روبیسکو آنزیم کلیدی چرخه کالوین، ممانعت به عمل آورده تنفس، جذب و انتشار عناصر غذایی و متابولیسم نیتروژن و سولفات را در گیاهان مختل می‌نماید (Chen *et al*., 2011).

یکی از آسیب‌های مهم بافتی که در اثر قرار گرفتن گیاهان در معرض فلزات سنگین از جمله کادمیوم رخ می‌دهد، افزایش تولید گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) مانند سوپراکسید، پراکسید هیدروژن و رادیکال هیدروکسیل و ایجاد تنش اکسیداتیو است (احمدوند و همکاران، ۱۳۹۱).

انواع مختلف اکسیژن فعال می‌توانند به ترکیبات حیاتی سلول مانند اسیدهای چرب غیر اشباع، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک حمله نمایند. این واکنش‌ها بطور طبیعی ویژگی‌هائی چون سیالیت غشاء، انتقال یونی، فعالیت آنزیمی و سنتز پروتئین‌ها را کاهش داده و باعث تخریب DNA هسته‌ای و میتوکندریائی و در نهایت مرگ سلولی می‌شوند (بهمنی و همکاران، ۱۳۹۱).

برای مقابله با تنش اکسیداتیو ایجاد شده یک سیستم دفاع آنتی اکسیدانی با کارآیی بالا در گیاهان وجود دارد که می‌توانند رادیکال‌های آزاد را از بین برده و یا خنثی کنند. این سیستم شامل آنزیم‌های آنتی اکسیدان مانند کاتالاز(CAT)، سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)، آسکوربات پراکسیداز (APX)، فنل پراکسیداز (POX) و گایاکول پراکسیداز (GPX) و نیز سیستم آنتی اکسیدانی غیر آنزیمی شامل آسکوربات، آلفاتوکوفرول، کاروتنوئیدها، فلاونوئیدها و گلوتاتیون می‌باشد (Shahid *et al*., 2014).

کمبود پروتئین یا عدم توازن بین مصرف پروتئین و هیدرات کربن از مشخصات رژیم غذایی کشورهای در حال توسعه از جمله ایران است. بنابراین یکی از نیازهای اساسی کشور در زمینه تولید محصولات کشاورزی، تأمین پروتئین گیاهی است (کوچکی و بنایان اول، ۱۳۸۱). در اکثر کشورهایی که با کمبود پروتئین مواجه هستند کمیت و کیفیت پروتئین مساله اساسی تغذیه می‌باشد. مطالعات حاکی از آن است که ترکیب مناسبی از پروتئین گیاهی می‌تواند سوء تغذیه و کمبود پروتئین را مرتفع سازد و قسمتی از کمبود پروتئین را می‌توان به وسیله مصرف حبوبات جبران نمود. حبوبات با داشتن بیش از ۲۰ درصد پروتئین نقش مهمی را در تأمین پروتئین مورد نیاز انسان دارند و مکمل غذایی طبیعی و بسیار مطلوبی برای غلات محسوب می‌شوند (کوچکی، ۱۳۷۶).

عدس (*Lens culinaris* Medik.) از گیاهان مهم خانواده بقولات است و در ایران از نظر سطح زیر کشت بعد از نخود در مقاوم دوم اهمیت قرار دارد. این گیاه با دارا بودن ۲۳ تا ۳۲ درصد پروتئین دارای ارزش غذایی زیادی می‌باشد. علاوه بر این به واسطه توانایی تثبیت نیتروژن نقش ویژه‌ای در حاصلخیزی خاک برای کشت‌های بعدی دارد (باقری و همکاران، ۱۳۷۶).

در این تحقیق به منظور بررسی اثر سمیت یون کادمیوم بر

رشد و نمو عدس پارامترهایی چون میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی، محتوای پرولین، میزان پروتئین‌های محلول و فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی اکسیدانی در گیاهچه‌ها مورد اندازه‌گیری و مقایسه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها:

کشت بذور و تیمار کادمیوم: بذور عدس مورد استفاده از بازار محلی تهیه و سپس بذرهای یکسان از نظر شکل و اندازه انتخاب شدند. در ابتدا سطح بذور با اتانل ۷۵ درصد به مدت ۳۰ ثانیه و هیپوکلریت سدیم ۵ درصد به مدت ۲ دقیقه ضدعفونی و به کمک آب مقطر چندین بار شستشو داده شد. بذرها به مدت ٢٤ ساعت در پتری دیش‌های ۹ سانتی متری حاوی کاغذ واتمن قرار داده شده و درون انکوباتور ۲۵ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. سپس بذرهای جوانه زده به گلدان های حاوی نسبت مساوی از کوکوپیت و شن بادی شسته شده منتقل شدند. میانگین دمای روزانه در طول این آزمایش ۲۵ درجه سانتی گراد در نظر گرفته شد. گلدان‌ها پس از کاشت در اتاق رشد، تحت شرایط ١٦ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند. گیاهان به مدت ١٤ روز به صورت یک روز در میان با محلول هوگلند آبیاری شدند و پس از این که گیاهان به مرحله دو تا چهار برگی رسیدند، به مدت ده روز در معرض غلظت‌های مختلف کلرید کادمیوم (صفر (شاهد)، ۰/۱۲۵، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲/۵ و ۵ میلی‌مولار) قرار گرفتند.

سنجش میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی(کلروفیل و کارتنوئیدها): محاسبه غلظت کلروفیل و کارتنوئیدهای (کاروتن وگزانتوفیل) برگ با استفاده از روش Lichtenthaler و Wellburn (١٩٩٤) انجام شد. ۰/۱ گرم از بافت تر برگ وزن و رنگیزه‌های آن توسط استون ۸۰ درصد استخراج شد. پس از صاف کردن نمونه‌ها با کاغذ صافی، جذب در طول موج‌های ٦٦٣/٢، ٦٤٨/٨ و ٤٧٠ نانومتر بوسیله اسپکتروفتومتر (Analytik Jena, Germany) خوانده شد. مقدار کلروفیل a، b و کلروفیل (کلروفیل a + کلروفیل b) و کارتنوئیدها با استفاده از فرمول زیر برحسب میلی گرم بر گرم وزن تر، محاسبه شد:

$$Ch_a = 12.25\ A_{663.2} - 2.798\ A_{648.8}$$

$$Ch_b = 21.50\ A_{648.8} - 5.10\ A_{663.2}$$

$$Ch_t = Ch_a + Ch_b$$

$$C_{x+c} = (1000\ A_{470} - 1.82\ Ch_a - 85.02\ ch_b)/198$$

Ch_a مقدار کلروفیل a، Ch_b مقدار کلروفیل b، Ch_t مقدار کلروفیل کل و C_{x+c} مقدار کل کاروتنوئیدها می‌باشد.

اندازه‌گیری پرولین: برای تعیین مقدار پرولین از روش Bates و همکاران (١٩٧٣) استفاده شد. بدین منظور ۵ گرم از نمونه‌های تر برگ در ۱۰ میلی لیتر اسید سولفوسالسیلیک ٪۳ به وسیله هاون هموژن شده و عصاره حاصل صاف گردید. به ۲ میلی لیتر از عصاره صاف شده فوق ۲ میلی لیتر اسید استیک و ۲ میلی لیتر اسید نااین هیدرین (شامل ۰/۰۵ گرم نااین هیدرین، ۱/۲ میلی لیتر اسید استیک و ۰/۸ میلی لیتر اسید ارتوفسفریک ٦ مولار) اضافه شد. محلول حاصل به مدت یک ساعت در حمام آب و در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد، پس از آن برای پایان یافتن واکنش لوله‌های آزمایش در داخل یک بستر یخی قرار گرفتند و ٤ میلی لیتر تولوئن به هر لوله اضافه شد. غلظت پرولین نمونه‌ها در تولوئن با استفاده از اسکپتروفتومتر در طول موج ۵۲۰ نانومتر و در نهایت با توجه به منحنی استاندارد حاصل از غلظت‌های مختلف پرولین، میزان پرولین نمونه‌ها برحسب میکرومول بر گرم وزن تر محاسبه شد.

اندازه‌گیری آنزیم‌های آنتی اکسیدان و پروتئین محلول برگ: به منظور سنجش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و آسکوربات پراکسیداز و پروتئین محلول برگ از نمونه‌های منجمد عصاره آنزیمی تهیه گردید و جذب کلیه واکنش‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری شد. برای تهیه عصاره آنزیمی میزان ۱۰۰ میلی گرم بافت توزین و به همراه یک میلی لیتر بافر استخراج شامل فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی مولار با pH=٧/٨، EDTA ۰/۱ میلی مولار و PVP ١٪ در هاون چینی سرد و بر روی یخ همگون گردید. سپس عصاره‌های حاصل در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه و در دمای ٤ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و محلول رویی حاصل در ظرف‌های استریل جمع‌آوری گردید. محلول رویی بدست آمده به عنوان عصاره آنزیمی جهت اندازه‌گیری فعالیت ۳ آنزیم کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز و همچنین مقدار پروتئین محلول مورد استفاده قرار

گرفت.

به منظور اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز (EC ۱. ۱۱. ۱. ٦) از روش Beers و Sizer (۱۹۵۲) استفاده شد. یک میلی‌لیتر مخلوط واکنش شامل بافر فسفات پتاسیم یک مولار (pH = ۷/۸)، پراکسید هیدرژن ۱ مولار و ۱۰ میکرولیتر عصاره خام بود. فعالیت آنزیم کاتالاز بر اساس میزان تجزیه شدن H_2O_2 در طول موج ۲٤۰ نانومتر با استفاده از ضریب خاموشی $mM^{-1}cm^{-1}$ ۳۹/٤ تعیین گردید.

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (EC ۱. ۱۱. ۱. ۱) به روش Nakano و Asada (۱۹۸۷) اندازه‌گیری گردید. یک میلی‌لیتر مخلوط واکنش شامل بافر فسفات پتاسیم یک مولار (pH = ۷/۸)، آسکوربات ۱۰ میلی‌مولار، پراکسید هیدرژن ۱۰ میلی‌مولار و ۱۰ میکرولیتر عصاره خام بود. فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز بر اساس میزان اکسید شدن آسکوربات در طول موج ۲۹۰ نانومتر و با استفاده از ضریب خاموشی $mM^{-1}cm^{-1}$ ۲/۸ تعیین گردید.

فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (EC ۱. ۱۵. ۱. ۱) از طریق اندازه‌گیری توانایی آن در جلوگیری از احیای نوری نیتروبلوتترازولیوم کلراید (NBT) به روش Dhindsa و همکاران (۱۹۸۱) اندازه‌گیری شد. ۳ میلی‌لیتر مخلوط واکنش شامل فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار (pH = ۷/۸) ، متیونین ۱۳ میلی‌مولار، نیتروبلو تترازولیوم کلراید ۷۵ میکرومولار، اتیلن دی آمین ترا استیک اسید ۰/۱ میلی‌مولار، ریبوفلاوین ۳٦۰ میکرومولار و ۳۰ میکرولیتر عصاره خام بود. پس از آن که مخلوط به هم زده شد سل‌های اسپکتروفتومتر به مدت ۱۰ دقیقه در زیر یک لامپ فلورسنت ۱۵w به فاصله ۳۵ سانتی‌متر قرار داده شد. با خاموش کردن لامپ واکنش متوقف و جذب مخلوط واکنش در ٥٦۰ نانومتر خوانده شد. یک واحد فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز، مقدار آنزیمی در نظر گرفته می شود که می‌تواند تا ۵۰ درصد مانع از احیای نوری نیتروبلوتترازولیوم کلراید گرد. فعالیت ویژه آنزیم به صورت تعداد واحدهای آنزیم در میلی‌گرم پروتئین گزارش گردید.

جهت اندازه‌گیری پروتئین نمونه‌ها از روش Bradford (۱۹۷٦) استفاده شد. قرائت جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر و رسم منحنی رگرسیون انجام شد.

تجزیه و تحلیل‌های آماری: کلیه آزمایشات در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام شد. تجزیه واریانس داده‌های بدست آمده با استفاده از نرم افزار آماری SAS version 9 انجام و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ٥٪ صورت گرفت. جهت ترسیم نمودار از نرم افزارExcel استفاده شد.

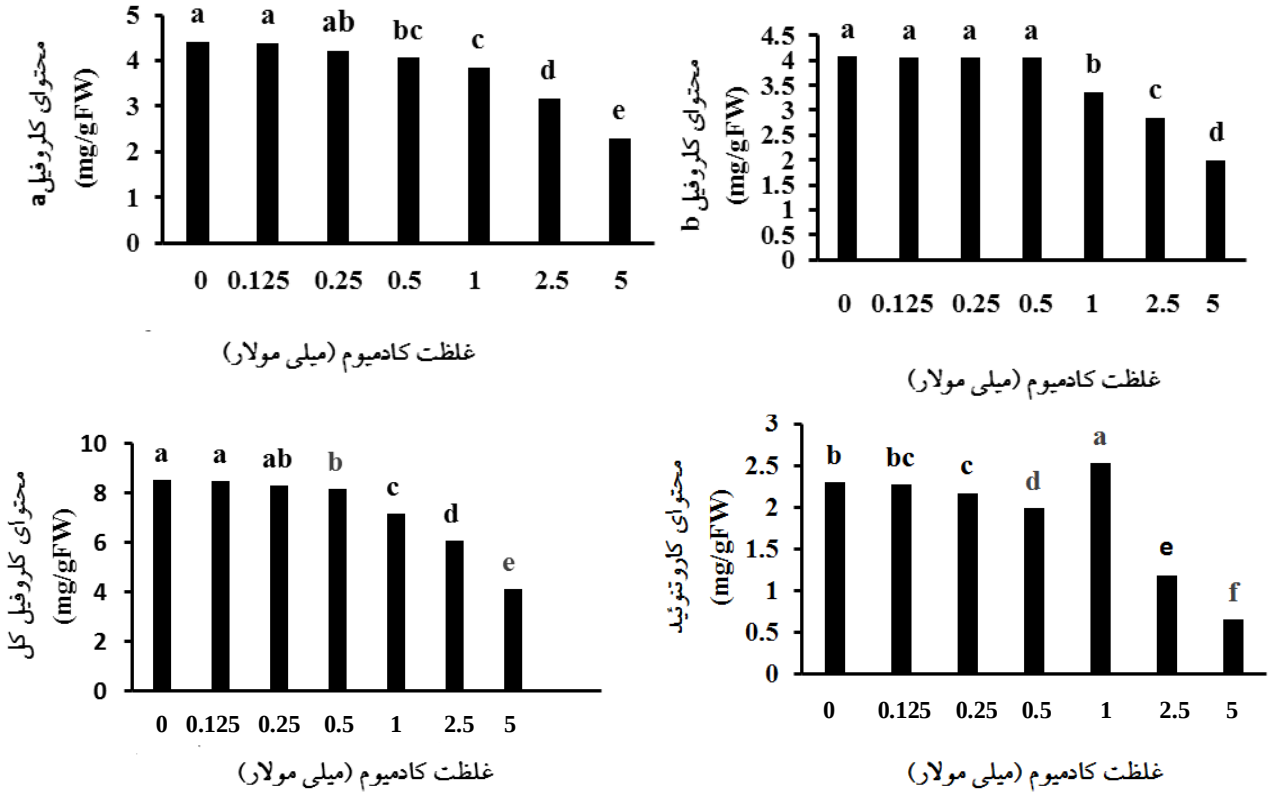
نتایج و بحث:

اثر کادمیوم بر میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی: نتایج نشان داد که قرار گرفتن در معرض تنش کادمیوم به طور معنی‌داری ($P<0.05$) سبب کاهش میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی (کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کاروتنوئید) در مقایسه با شاهد شد (جدول ۱). با افزایش غلظت کادمیوم، میزان کلروفیل و کاروتئوئید برگ‌ها کاهش یافت به طوری که بیشترین میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی در تیمار شاهد و کمترین آن در غلظت ۵ میلی‌مولار کلرید کادمیوم مشاهده شد. همانگونه که نتایج نشان می‌دهد کادمیوم در غلظت های کمتر از ۰/۵ میلی‌مولار اثر چندانی بر مقدار کلروفیل a نداشت اما در غلظت‌های بیشتر از آن مقدار کلروفیل a نسبت به گیاه شاهد بطور معنی‌داری *($P<0.05$)* کاهش پیدا کرد (شکل ۱). میزان بازدارندگی کلروفیل a پس از ۱۰ روز قرار گرفتن در معرض غلظت ۵ میلی‌مولار کلرید کادمیوم در مقایسه با شاهد ٤۹/۷ درصد بود. کاهش میزان کلروفیل b نیز در مورد غلظت‌های کمتر از ۱ میلی‌مولار در مقایسه با شاهد معنی‌دار نبود و افزایش غلظت کلرید کادمیوم در محیط به بیش از این مقدار سبب کاهش معنی‌دار ($P<0.05$) میزان کلروفیل b در مقایسه با گیاه شاهد گردید (شکل ۱). میزان بازدارندگی کلرید کادمیوم بر میزان کلروفیل b گیاه عدس پس از ۱۰ روز قرار گرفتن در معرض غلظت ۵ میلی مولار در مقایسه با گیاهان شاهد بیش از ۵۱ درصد بود. در تحقیق حاضر در شرایط تنش کادمیوم نسبت کلروفیل a به b افزایش یافت (بویژه در غلظت‌های بیش از ۱

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر آزمایش بر صفات اندازه‌گیری شده

منابع تغییرات	درجه آزادی	کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل کل	کارتنوئید	پروتئین محلول	محتوای پرولین	فعالیت (SOD)	فعالیت (CAT)	فعالیت (APX)
کلرید کادمیوم	٦	۱/۸**	۱/۹۷۳**	۸/۱۸۵**	۱/٤۲۳**	٦۲۳/٦**	۱۳/۹۵۸**	۰/٦۷۳**	۰/۰٤۳**	۰/۰۳۹**
خطا	١٤	۰/۰۱۷۷	۰/۰۰۳۳	۰/۰۱۵٤	۰/۰۰٤۲	۱/٦۲٤	۰/۰۰۵۲	۰/۰۰۰۱۸	۰/۰۰۰۰٤٦	۰/۰۰۰۰۷۳
ضریب تغییرات (٪)		۳/۵۳	۱/٦٦	۱/۷۱	۳/٤٦	۲/۱۳	۱/۷۱	۰/٦۹	۲/٦٦	۲/۵۸

** : معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد سوپراکسید دیسموتاز **(SOD)**، کاتالاز **(CAT)** و آسکوربات پراکسیداز **(APX)**



شکل ۱- اثر کادمیوم بر مقدار کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کاروتنوئید برگ گیاه عدس. مقایسه میانگین‌ها (میانگین سه تکرار) با استفاده از آزمون دانکن انجام شد (P<0.05). میانگین‌هایی که حداقل یک حرف مشترک دارند، از نظر آماری اختلاف معنی‌داری ندارند (P<0.05).

میلی‌مولار) که این امر می‌تواند به دلیل حساسیت و تخریب بیشتر کلروفیل b تحت اکسیژن‌های آزاد تولید شده ناشی از تنش کلرید کادمیوم باشد. فلزات سنگین از عملکرد فتوسیستم های I و Π ممانعت می‌کنند. مشخص شده است که حساسیت فتوسیستم Π به فلزات سنگین بیش از فتوسیستم I است (Aggarwal *et al.*, 2012). Almeida و همکاران (۲۰۰۷) بیان کردند که فلزات سنگین بر ناقلان الکترون اثر می‌گذارند و با رساندن خود به مرکز واکنش فتوسیستم II اثر خود را بر جای می‌نهند و در نتیجه سبب کاهش سطح انرژی و کاهش فتوسنتز در گیاه می شوند. بنابراین چون کلروفیل b بیشتری در این فتوسیستم موجود است، مقدار تخریب کلروفیل b تحت شرایط تنش فلز سنگین کادمیوم بیشتر است. در مورد کلروفیل کل نیز نتایج مشابهی بدست آمد بطوری که غلظت‌های کمتر از ۰/۵ میلی مولار سبب کاهش معنی‌داری در میزان کلروفیل کل نشد و با افزایش غلظت به بیش از این مقدار، میزان کلروفیل کل در مقایسه با شاهد بطور معنی‌داری (P<0.05) کاهش یافت

(شکل ۱). نتایج نشان داد که کاربرد سطوح مختلف کلرید کادمیوم بطور کلی سبب کاهش میزان کاروتنوئیدها می‌شود، هر چند غلظت ۱ میلی‌مولار سبب افزایش معنی‌دار میزان این رنگیزه شد که با افزایش میزان کادمیوم در محیط دوباره میزان کاروتنوئید روند نزولی نشان داد. پس از ۱۰ روز از قرار گرفتن در معرض غلظت ۵ میلی‌مولار کلرید کادمیوم میزان بازدارندگی رنگیزه کاروتنوئید در مقایسه با شاهد بیش از ۷۱ درصد بود. به عبارت دیگر میزان بازدارندگی کادمیوم بر این رنگیزه نسبت به کلروفیل a و b به مراتب بیشتر بود (شکل ۱).

نتایج این تحقیق نشان داد که با افزایش یون کادمیوم از مقدار رنگیزه‌های گیاه به طور معنی‌داری کاسته شد. نتایج این تحقیق با نتایج دیگر محققان همخوانی دارد. در تحقیقی که روی دو علف هرز Cyperus و Digitaria انجام گرفت، کاهش معنی‌داری در میزان کلروفیل در اثر اعمال ۲۰ میلی‌گرم در کیلوگرم کادمیوم دیده شد (Ewaise, 1997). در سویا نیز کاهش میزان کلروفیل و نیز فتوسنتز در اثر افزایش غلظت کادمیوم گزارش شده است (Xue *et al.*, 2013). سلطانی و همکاران (۱۳۸۵) نشان دادند که کادمیوم بطور معنی‌داری سبب کاهش مقدار کلروفیل کل، کلروفیل a و b کلزا در غلظت‌های ٤۰۰، ٦۰۰ و ۸۰۰ میکرومولار می‌شود. همچنین John و همکاران (۲۰۰۹) نشان دادند که*Brassica juncea* در اثر تیمار با سرب و کادمیوم کاهش در رشد و محتوای کلروفیل را نشان می‌دهد که در این میان اثرات کادمیوم نسبت به سرب بمراتب زیان آورتر می‌باشد. نورانی آزاد و کفیل زاده (۱۳۹۰) در آزمایشی واکنش بیوشیمیائی گیاه گلرنگ را به غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰، ٤۰۰ و ٦۰۰ میکرومولار کادمیوم بررسی کردند. نتایج نشان داد که کلروفیل a و b برگ‌ها به جزء در تیمار ۱۰۰ میکرومولار کادمیوم در مقایسه با شاهد اختلاف معنی‌دار داشت. نتایج آزمایشات کاظم علیلو و صدقیانی (۱۳۹۱) نیز نشان داد که با افزایش غلظت کادمیوم در خاک، از غلظت کلروفیل a و b برگ‌های گیاه بنگدانه بطور معنی‌داری کاسته می‌شود.

نتایج این تحقیق نشان داد که در غلظت‌های پایین کادمیوم میزان کلروفیل a و b در مقایسه با شاهد تغییر معنی‌داری نشان نمی‌دهد و با افزایش غلظت به بیش از ۰/۵ میلی‌مولار محتوای کلروفیل a و b کاهش معنی‌داری یافت. افزایش و یا عدم تغییر کلروفیل در تنش ملایم می‌تواند به دلیل افزایش در وزن مخصوص برگ باشد. وقوع تنش، میزان سطح برگ را کاهش می‌دهد که ناشی از کاهش اندازه سلول است. بنابراین طی تنش ملایم، به دلیل وجود سلول‌های بیشتر در واحد وزن برگ، محتوای کلروفیل می‌تواند افزایش یابد و یا تغییر نکند (پورقاسمیان و احسان زاده، ۱۳۹۲). مشاهدات انجام شده توسط Shi و همکاران (۲۰۱۰) نیز به عدم تغییر محتوای رنگیزه‌های کلروفیلی در سطوح پائین‌تر کادمیوم اعمال شده بر گیاه گلرنگ اشاره داشت. وی بیان می‌کند که وجود فرآیندهای محافظتی مانند آنتی‌اکسیدانت‌ها و یا باند شدن کادمیوم با پپتیدها می‌تواند سیستم فتوسنتزی گیاه را تحت حفاظت قرار دهد.

یکی از علل کاهش مقدار کلروفیل، مهار بیوسنتز آن به وسیله فلزات سنگین به خصوص کادمیوم است. فلزات سنگین به وسیله مهار آنزیمهای آنزیم‌های δ – آمینولوولنیک اسید ردوکتاز (AAL–ردوکتاز) و پروتوکلروفیلد ردوکتاز سبب مهار بیوسنتز کلروفیل می‌شوند. این فزات ستنز گاما – آمینو لوولنیک اسید و تشکیل کمپلکس آنزیم پروتوکلروفیلد ردوکتاز با سوسبترا را مهار می‌کنند. برهم کنش متقابل فلز سنگین با گروه سولفیدریل آنزیم‌ها مهم‌ترین مکانسیم این مهارها عنوان شده است (Padmaja *et al.*, 1990). علاوه بر مهار بیوسنتز کلروفیل به وسیله فلزات سنگین، این فلزات باعث تجزیه زیستی کلروفیل نیز می‌شوند. از اثرات دیگر فلزات سنگین بر بیوسنتز کلروفیل میتوان به جانشین شدن آن‌ها به جای منیزیوم مرکزی کلروفیل اشاره کرد که این جانشینی سبب کاهش دریافت نور به وسیلهٔ کلروفیل و منجر به کاهش فتوسنتز می‌شود (علت مهار کلروفیل) (kupper *et al.*,1998). کاهش دسترسی به فلزات ضروری دخیل در سنتز کلروفیل نظیر Fe^{2+} و Zn^{2+} (Küpper *et al.*, 1996)، تخریب غشا، کلروپلاست به دلیل پراکسیداسیون لیپیدی (Prasad and Strzalka, 1999)، کاهش در تراکم، اندازه و سنتز کلروفیل و مهار فعالیت برخی آنزیم های چرخه کالوین (Benavides *et al.*, 2005) از دیگر دلایل

کاهش در محتوای کلروفیل می‌باشد.

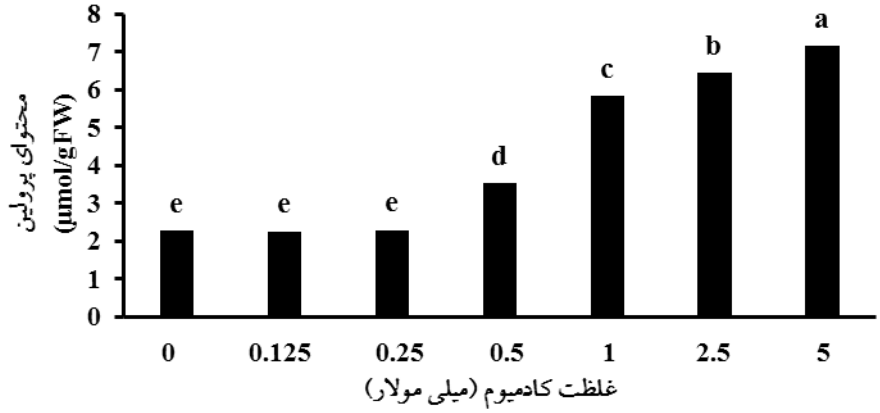
از دست رفتن کلروفیل در اثر اعمال تنش کادمیوم در این تحقیق می‌تواند جنبه سازگاری نیز داشته باشد زیرا با کاهش کلروفیل، الکترون برانگیخته شده طی فتوسنتز کاهش یافته و به دنبال آن خسارت‌های ناشی از تشکیل رادیکال‌های آزاد اکسیژن کاهش می‌یابد (عبدلی و همکاران، ۱۳۹۲).

کاروتنوئیدها شامل کاروتن و گزانتوفیل‌ها آنتی اکسیدان‌های چربی دوست با وزن مولکولی کم در کلروپلاست هستند که تحت تنش فلز سنگین، غشاهای کلروپلاستی را در مقابل تنش اکسیداتیو محافظت می‌کنند. کاهش مقدار کاروتنوئیدها تحت تنش کادمیوم بدلیل فرونشانی غیرفتوشیمیایی کلروفیل‌های برانگیخته است که توسط کاروتنوئیدها انجام و در نتیجه سبب برهم ریختن ساختارشان می‌گردد. کاروتنوئیدها در سمیت زدایی کلروفیل برانگیخته سه تایی نقش دارند. کاروتنوئیدها در چند سطح باعث کاهش اثرات سمی رادیکال‌های آزاد می‌شوند که از جمله واکنش با کلروفیل برانگیخته برای ممانعت از تشکیل رادیکال‌هال فعال اکسیژن است. کاروتنوئیدها علاوه بر نقش ساختمانی و جذب نور می‌توانند به صورت مستقیم اکسیژن یکتایی را غیر فعال کنند و یا از طریق فرو نشاندن کلروفیل برانگیخته شده، به صورت غیر مستقیم از تشکیل اکسیژن یکتایی جلوگیری کنند و بدین ترتیب دستگاه فتوسنتزی را از شروع پراکسیداسیون لیپیدی محافظت می‌کنند (امینی و حداد، ۱۳۹۲). نتایج حاصل از مطالعه حاضر به کاهش محتوای کاروتنوئیدها با افزایش میزان کادمیوم اشاره داشت (شکل ۱). همچنین Tran و Raymun (۱۹۹۹) نشان دادند که کادمیوم می‌تواند در چرخه ویولاگزانتوفیل-زآزانتین که در سنتز کاروتنوئیدها نقش دارد، اختلال ایجاد نموده و سبب کاهش تولید کاروتن شود. در مطالعات دیگر روی گلرنگ (Shi *et al*., 2010)، کلزا (علومی و همکاران، ۱۳۹۱; سلطانی و همکاران، ۱۳۸۵) و *Aeluropus littoralis* (Rastgoo and Alemzadeh, 2011) کاهش محتوای کاروتنوئید به ازاء افزایش کادمیوم تائید شده است. مطالعات انجام گرفته روی گیاه آزولا (Dai *et al*., 2006) و *Bacopa monnieri* (Mishra *et al*., 2006) نیز نشان داد که کاربرد کادمیوم به علت اثرات شدید اکسیداتیو در این گیاهجه ها باعث کاهش محتوی کاروتنوئید می‌شود.

جذب یون کادمیوم توسط ریشه و سپس انتقال یون به اندام‌های هوایی و در نهایت تجمع آن در سلول‌های برگ باعث بروز علائم مورفولوژیک و فیزیولوژیک تنش یون در برگ می شود که از شاخص‌ترین این علائم زردی برگ‌ها و کلروز است که این علائم به وضوح در تیمار با کادمیوم در این تحقیق (خصوصاً غلظت‌های بالا) نیز دیده شد. John و همکاران (۲۰۰۸) گزارش نمودند که این کلروز به علت بیوسنتز ناقص کلروفیل می‌باشد. بنابراین محتوای کلروفیل برگ به مقدار قابل توجهی کاهش می‌یابد. نتایج حاصل از این تحقیق نیز بیانگر کاهش چشمگیر در مقدار کلروفیل برگ است. از طرفی دیگر وجود کادمیوم در سلول‌های برگ باعث کاهش میزان کاروتنوئیدها می‌شود که در این تحقیق هم کاملاً این اثر مشاهده شد.

اثر کادمیوم بر میزان پرولین: نتایج نشان داد که با افزایش غلظت کادمیوم در محیط میزان پرولین بطور معنی‌داری ($P<0.05$) افزایش یافت. همانگونه که نتایج مقایسه میانگین در مورد این صفت نشان می‌دهد کمترین میزان پرولین مربوط به سطح بدون تنش بود، اعمال اولین و دومین سطح تنش کلرید کادمیوم (۰/۱۲۵ و ۰/۲۵۰ میلی‌مولار) منجر به افزایش معنی‌دار محتوای پرولین در گیاه عدس نشد. محتوای پرولین با افزایش بیشتر سطح تنش کلرید کادمیوم افزایش یافت و بیشترین میزان پرولین در سطح کلرید کادمیوم ۵ میلی‌مولار مشاهده گردید (شکل ۲).

در اثر افزایش غلظت کادمیوم میزان پرولین در برگ‌ها تا سه برابر افزایش یافت. در حقیقت مکانیسم متابولیکی جهت مقابله با تنش کادمیوم منجر به افزایش میزان این ترکیب گشته است. نتایج حاصل از تحقیقات Zhao (۲۰۱۱) نیز نشان داد که تحت تنش کادمیوم میزان پرولین در برگ‌های ذرت و گندم افزایش پیدا می کند. Balestrasse و همکاران (۲۰۰۵) گزارش کردند که میزان پرولین ریشه گیاهچه‌های سویای قرار گرفته در معرض تنش کادمیوم افزایش نشان می‌دهد. نتایج مشابهی در اثر تنش کادمیوم در دیگر گیاهان نظیر *Solanum nigrum*



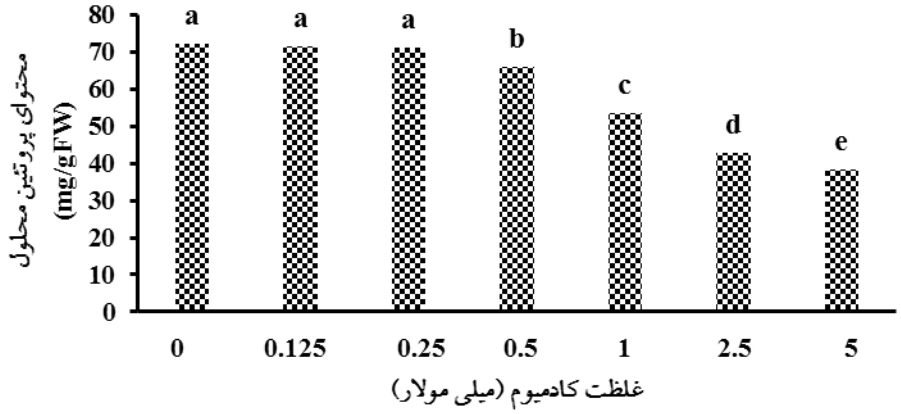
شکل ۲- اثر کادمیوم بر میزان پرولین برگ گیاه عدس. مقایسه میانگین‌ها (میانگین سه تکرار) با استفاده از آزمون دانکن انجام شد (P<0.05). میانگین‌هایی که حداقل یک حرف مشترک دارند، از نظر آماری اختلاف معنی‌داری ندارند (P<0.05).

(Sun *et al*., 2007)، لوبیا (احمدوند و همکاران، ۱۳۹۱)، *Arachis hypogaea* (John *et al*., 2008)، *Lemna polyrrhiza* (Dinakar *et al*., 2009) و *Aeluropus littoralis* (Rastgoo and Alemzadeh, 2011) بدست آمد.

در این تحقیق یک رابطه معکوس بین میزان کلروفیل و محتوی پرولین گیاهچه‌های قرار گرفته در معرض تنش کادمیوم مشاهده شد. با افزایش غلظت کادمیوم در محیط، میزان کلروفیل کاهش و محتوی پرولین گیاهچه‌ها افزایش پیدا کرد. پرولین و کلروفیل هر دو از پیش ماده گلوتامات به وجود می آیند. در شرایط تنش کادمیوم به دلیل تغییر متابولیسم نیتروژن در رابطه با ساخت ترکیباتی نظیر پرولین که نقش عمده‌ای در مواجهه گیاه با شرایط تنش دارد، گلوتامات که پیش ماده مشترک ساخت کلروفیل و پرولین است، کمتر در مسیر سنتز کلروفیل وارد می‌شود و شاید یکی از دلایل کاهش میزان کلروفیل، افزایش سنتز پرولین باشد (Forde and Lea, 2007).

به خوبی مشخص شده است که پرولین در محدوده وسیعی از موجودات از باکتری تا گیاهان عالی به هنگام مواجهه با تنش‌های غیر زیستی تجمع می‌یابد. در پاسخ به تنش فلزات سنگین، مقادیر قابل توجهی پرولین در گیاهان تجمع می‌یابد (Hayat *et al*., 2012). پرولین در بهبود تنش‌های محیطی از جمله تنش فلزات سنگین در گیاهان و میکروارگانیسم‌ها نقش مهمی دارد. تجمع پرولین در گیاهان تحت تنش با کاهش خسارت در غشاء سلولی و پروتئین‌ها در ارتباط می‌باشد. سنتز پرولین در کاهش پتانسیل اسمزی سیتوپلاسمی و حفظ نسبت $NADP/NADPH^+$ دخالت دارد. همچنین پرولین به عنوان یک اسمولیت، جاروب کننده رادیکال‌ها، تثبیت کننده ماکرومولکول‌ها و یک جزء دیواره سلولی عمل می‌کند. اهمیت تجمع پرولین در حفظ وضعیت آبی گیاه بیشتر از اهمیت سایر مواد آلی است و پرولین به عنوان رایج‌ترین اسمولیت انباشته شده در شرایط تنش عمل می‌کند. پرولین به عنوان یک محافظ شیمیایی باعث پایداری فرم طبیعی پروتئین‌ها شده و از به هم خوردن شکل طبیعی ترکیبات آنزیمی ممانعت می‌نماید و کلات کننده فلزات است و از پراکسیداسیون لیپیدها جلوگیری می‌کند و باعث حفظ تمامیت غشاء می‌گردد. بنابراین در هنگام تنش فلزات سنگین، تولید پرولین افزایش می‌یابد تا گیاه را در مقابل سمیت حفظ نماید. چهار دلیل برای افزایش تولید پرولین تحت شرایط تنش پیشنهاد شده است که عبارتند از: تحریک سنتز آن از اسید گلوتامیک، کاهش صادرات آن از طریق آوند آبکش، جلوگیری از اکسیداسیون آن در طول تنش و تخریب و اختلال در فرآیند سنتز پروتئین (Hayat *et al*., 2012).

اثر کادمیوم بر میزان پروتئین‌های محلول: نتایج نشان داد که با افزایش غلظت کلرید کادمیوم میزان پروتئین‌های محلول برگ بطور معنی‌داری (P<0.05) در مقایسه با شاهد کاهش پیدا کرد (شکل ۳). بررسی مقایسه میانگین سطوح مختلف کلرید کادمیوم گویای این واقعیت است که با افزایش غلظت این ماده به بیشتر از ۰/۲۵ میلی‌مولار از میزان پروتئین گیاه



شکل ۳- اثر کادمیوم بر میزان پروتئین‌های محلول برگ گیاه عدس. مقایسه میانگین‌ها (میانگین سه تکرار) با استفاده از آزمون دانکن انجام شد (P<0.05). میانگین‌هایی که حداقل یک حرف مشترک دارند، از نظر آماری اختلاف معنی‌داری ندارند (P<0.05).

به طور معنی‌دار کاسته شده است (شکل ۳) به گونه‌ای که کمترین مقدار این شاخص با ٤٦/٩ درصد کاهش نسبت به گیاهان شاهد، مربوط به گیاهانی بود که بمدت ۱۰ روز تحت تیمار ۵ میلی‌مولار کلرید کادمیوم قرار گرفته بودند.

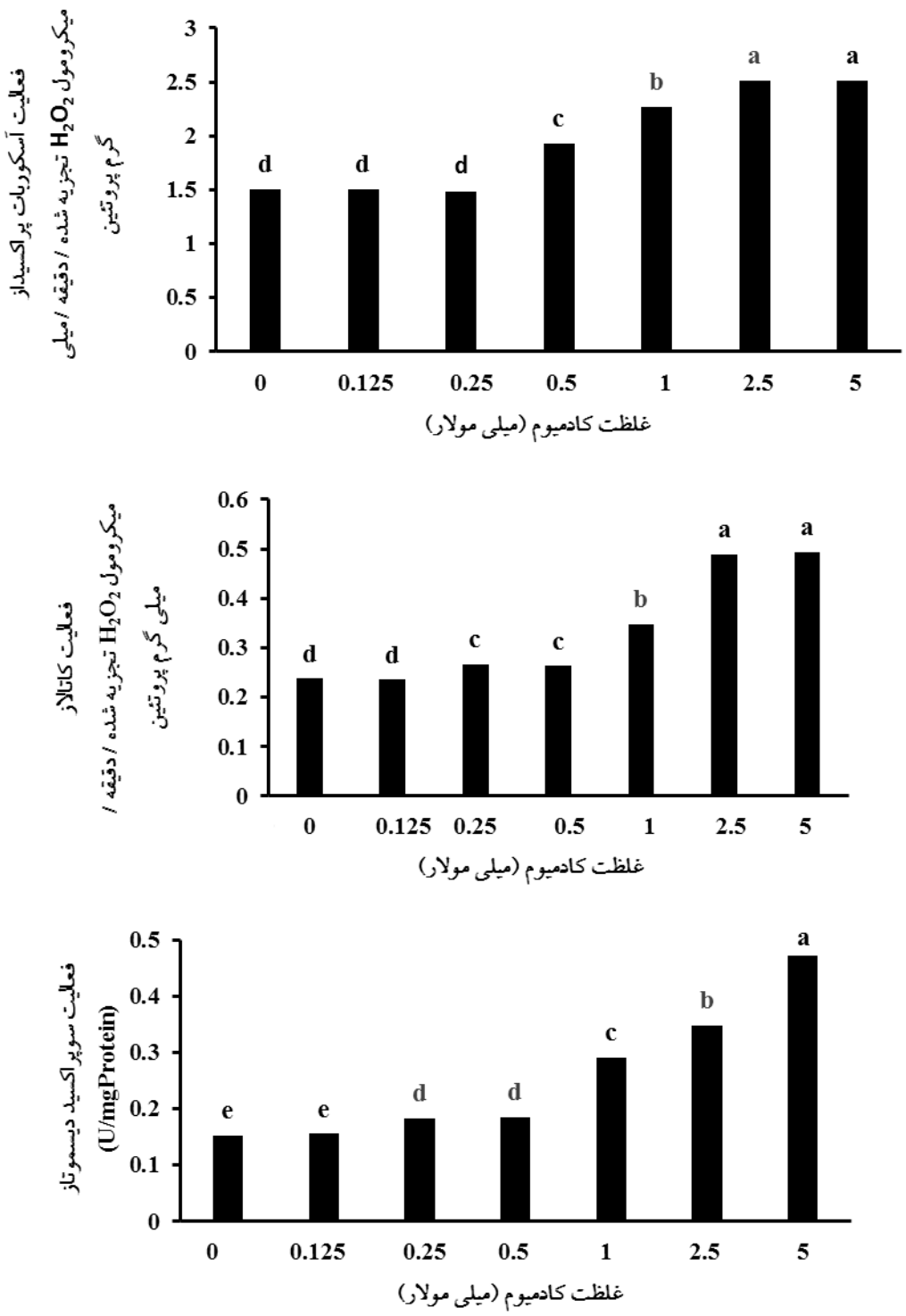
تنش‌های غیرزیستی سنتز برخی پروتئین‌ها را مهار و تولید برخی دیگر را تحریک می‌کند، هرچند روند کلی در جهت کاهش میزان کل پروتئین‌ها می‌باشد (Ericson and Alfinito, 1984). نتایج حاصل از این تحقیق با یافته‌های John و همکاران (۲۰۰۸) که کاهش در محتوای پروتئین محلول را تحت تنش کادمیوم و سرب در گیاه *Lemna polyrrhza* گزارش کرده بود، مطابقت دارد. نتایج مشابهی در لوبیا تحت تنش سرب و کادمیوم (Bhardwaj *et al*., 2009)، جو تحت تنش کادمیوم (Liu *et al*., 2005) و *Brassica juncea* تحت تنش سرب و کادمیوم (John *et al*., 2009) گزارش شده است.

تصور می‌شود که کاهش در محتوای پروتئین محلول کل تحت تنش فلزات سنگین ممکن است بواسطه افزایش در فعالیت پروتئاز (Palma *et al*., 2002)، تغییرات مختلف ساختمانی و کارکردی توسط واسرشت شدن و قطعه قطعه شدن پروتئین‌ها (John *et al*., 2009)، اتصال عرضی DNA-پروتئین (Atesi *et al*., 2004)، تعامل با باقیمانده‌های تیول پروتئین‌ها و جایگزینی آن‌ها با عناصر سنگین در متالو پروتئین ها (Pál *et al*., 2006) باشد. گزارش شده است که کادمیوم قادر است از طریق مهار جذب Mg و K و تحریک تغییرات بعد از ترجمه‌ای (Romero-Puertas *et al*., 2007)، کاهش در سنتز یا افزایش در تجزیه پروتئین‌ها (Monteiro *et al*., 2009) و جلوگیری از فعالیت روبیسکو (فراوانترین پروتئین برگ) (Muthuchelian *et al*., 2001)، محتوی پروتئین را کاهش دهد. تنش اکسیداتیو می‌تواند یکی دیگر از دلایل کاهش مقدار پروتئین‌ها باشد. تولید گونه‌های فعال اکسیژن نظیر رادیکال‌های سوپراکسید یا هیدروکسیل باعث اکسیداسیون اسیدهای آمینه شده و به ساختار و عملکرد پروتئین‌ها آسیب جدی وارد کرده و منجر به کاهش محتوای پروتئین می‌شود (امینی و حداد، ۱۳۹۲).

بر اساس پژوهش حاضر با شدت گرفتن میزان تنش، مقدار کل پروتئین‌های محلول برگ کاهش می‌یابد که این روند با افزایش غلظت پرولین همراه است. بنا بر این تحت شرایط تنش شدید افزایش چشم گیر غلظت پرولین به همراه کاهش معنی‌دار پروتئین در برگ‌های عدس را می‌توان هم به تخریب پروتئین و هم کاهش سنتز آن نسبت داد. به عبارت دیگر کاهش مصرف پرولین برای سنتز پروتئین در طی تنش فلز سنگین کادمیوم ممکن است دلیل احتمالی تجمع آن باشد.

اثر کلرید کادمیوم بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان:

بررسی نتایج حاصل از آنالیز آماری داده‌ها، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان شامل سوپراکسید دیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز و کاتالاز را تحت تنش فلز کادمیوم در گیاه نشان می‌دهد (شکل ٤). افزایش ظرفیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان یک پاسخ عمومی به مقادیر سمی فلزات سنگین می



شکل ٤- اثر کادمیوم بر میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز گیاهچه‌های عدس. مقایسه میانگین‌ها (میانگین سه تکرار) با استفاده از آزمون دانکن انجام شد ($P<0.05$). میانگین‌هایی که حداقل یک حرف مشترک دارند، از نظر آماری اختلاف معنی‌داری ندارند ($P<0.05$).

باشد. آنزیم‌های آنتی اکسیدان مهم‌ترین ترکیبات در جلوگیری از تنش اکسیداتیو در گیاهان می‌باشند. موضوع فوق بر اساس این واقعیت استوار است که عموما فعالیت یک یا چند مورد از این آنزیم‌ها در گیاهان تحت تنش افزایش می‌یابد. در این

مطالعه نیز تنش کادمیوم باعث افزایش در فعالیت SOD، CAT و APX شد (شکل ٤) که می‌تواند دلیل غیر مستقیمی بر افزایش فعالیت رادیکال‌های آزاد تحت تنش کادمیوم در گیاهچه‌های عدس باشد (خلیقی جمال آباد و خارا، ۱۳۸۷)

نتایج نشان داد که با افزایش غلظت کادمیوم در محیط میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز بطور معنی‌داری ($P<0.05$) افزایش پیدا کرد. کمترین میزان فعالیت هر سه آنزیم مربوط به سطح بدون تنش بود. غلظت‌های پایین کلرید کادمیوم اثر محسوسی بر القا، فعالیت آنزیم‌ها نداشتند و با افزایش غلظت کادمیوم به بیش از ۰/۵ میلی‌مولار، افزایش محسوس فعالیت آنزیم‌ها مشاهده شد. فعالیت این آنتی اکسیدان‌ها با افزایش بیشتر سطح تنش کلرید کادمیوم افزایش یافت و بیشترین میزان فعالیت در مورد هر سه آنزیم در سطح کلرید کادمیوم ۵ میلی‌مولار مشاهده گردید. ۱۰ روز قرار گرفتن در معرض غلظت ۵ میلی‌مولار کادمیوم به ترتیب سبب افزایش ۳، ۲ و ۱/۵ برابری میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز در مقایسه با گیاهان شاهد شد (شکل ٤).

سوپراکسید دیسموتاز یک جزء اصلی و اساسی سیستم دفاع آنتی اکسیدانی گیاه است که می‌تواند به عنوان نشانگر زیستی تنش‌های محیطی بکار گرفته شود (Dazy *et al.*, 2009). سوپراکسید دیسموتاز اولین آنزیم در فرآیند سمیت زدایی ترکیبات ROS است که با تبدیل رادیکال سوپراکسید (O^{2-}) به H_2O_2 در سیتوسول، کلروپلاست و میتوکندری، تقش حیاتی در مکانیسم‌های دفاعی سلول در برابر خطر تشکیل رادیکال هیدروکسیل (OH) ایفا می‌کند. پراکسید هیدرژن حاصله در مرحله بعدی به وسیله آنزیم‌هایی نظیر کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز پاکسازی می‌شود (Gratao *et al.*, 2005). افزایش شدید در فعالیت این آنزیم در گیاهچه‌های عدس تحت تنش کادمیوم در این تحقیق بیانگر فعال شدن سیستم دفاع آنتی اکسیدانی آنزیمی در گیاه به منظور جلوگیری از انباشته شدن رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ترکیبات ROS) تحت تنش فلز سنگین کادمیوم می‌باشد. بنظر می‌رسد که افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز احتمالا می‌تواند بواسطه تجمع رادیکال سوپراکسید، سنتز از نو پروتئین آنزیمی و القاء بیان ژن‌های کد کننده SOD باشد (Verma and Dubey, 2003). افزایش مشابهی در فعالیت آنزیم SOD در پاسخ به کادمیوم در توت سفید گزارش شده است (Benavides *et al.*, 2005). طبق تحقیقات Zhang و همکاران (۲۰۱۰) افزایش کادمیوم سبب القاء فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در *Achnatherum inebrians* می‌شود. با توجه به این که آنزیم سوپراکسید دیسموتاز به عنوان اولین و مهمترین سد دفاعی در مقابل حمله رادیکال‌های آزاد اکسیژن عمل می‌کند، در این تحقیق نیز میزان افزایش فعالیت آن در پاسخ به تنش کلرید کادمیوم از دو آنزیم دیگر بیشتر بود.

کاتالاز نیز یکی از مهم‌ترین اجزاء مکانیسم‌های محافظتی گیاه است که در میتوکندری‌ها و پراکسی‌زوم‌ها وجود دارد و دارای نقش مهمی در مهار رادیکال‌های آزاد به ویژه H_2O_2 تولید شده در حین تنفس نوری و شرایط تنش می‌باشد. کاتالاز مهمترین آنزیم برای حذف پراکسید هیدروژن می‌باشد که از طریق شکستن آن به آب و اکسیژن، آن را حذف می‌کند. القاء فعالیت کاتالاز باعث غلبه بر تنش اکسیداتیو از طریق سم‌زدایی پراکسید هیدروژن شده و از تولید رادیکال هیدروکسیل جلوگیری و پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک و چربی‌ها را در برابر ترکیبات ROS محافظت می‌کند (Rastgoo and Alemzadeh, 2011). در این تحقیق فعالیت آنزیم کاتالاز هماهنگ با فعالیت آنزیم SOD در گیاهچه‌های عدس قرار گرفته در معرض تنش کادمیوم القاء شد که این امر به نقش حفاظتی مهم این آنزیم در فرآیند مهار H_2O_2 و O^{2-} و مکمل بودن نقش کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز در متابولیسم سلول اشاره دارد.

Vitoria و همکاران (۲۰۰۱) گزارش کردند که کلرید کادمیوم سبب القا، افزایش در فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاه تربچه می‌شود. نتایج مشابهی توسط پورقاسمیان و احسان زاده (۱۳۹۲) در گلرنگ و خاوری نژاد و همکاران (۱۳۹۲) در نخود و بادپا و همکاران ۱۳۹۳) در گلرنگ گزارش شده است.

در این مطالعه میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز نیز با افزایش غلظت کادمیوم افزایش یافت. هر چند میزان افزایش فعالیت این آنزیم در مقایسه با دو آنزیم دیگر کمتر بود. نتایج تحقیق پوراکبر و اشرفی (۱۳۹۰) نیز نشان داد که میزان فعالیت آنزیم کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز در گیاهان ذرت تحت تیمار کادمیوم افزایش پیدا می‌کند. نتایج پراکسیدازها گروه بزرگی از آنزیم‌های دفاعی هستند که در گیاهان در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیر زیستی تولید می‌شوند. پراکسیدازها معمولا واکنش اکسیداسیون و احیا را بین پراکسید هیدرژن به عنوان گیرنده الکترون و انواع زیادی از سوبستراها مثل مواد فنلی، اسید آسکوربیک، آمین‌های آروماتیک و سیتوکروم c کاتالیز می‌کنند و به عنوان آنزیم‌های سم‌زدای گونه‌های فعال اکسیژن عمل می‌کنند. آنزیم پراکسیداز موجب شکسته شدن هیدرژن پراکسید در سلول می‌شود و بدین شکل از تولید ترکیبات ROS جلوگیری می‌کند و بنابراین با بالا رفتن سطوح فعالیت این آنزیم، گیاه کمتر مورد هجوم ترکیبات ROS قرار می‌گیرد. این گروه از آنزیم‌ها در سیتوسول، واکوئل، کلروپلاست و آپوپلاست وجود دارند. از جمله پراکسیدازها می‌توان به آسکوربات پراکسیداز اشاره کرد. این آنزیم نقش مهمی در تعدیل میزان ترکیبات ROS تولید شده طی تنش در سلول دارد. این آنزیم از آسکوربات به عنوان عامل احیا کننده استفاده می‌کند و H_2O_2 را از طریق چرخه‌ی آسکوربات–گلوتاتیون تجزیه می‌نماید. در این چرخه با فعالیت آنزیم APX آسکوربات به مونودهیدروآسکوربات اکسید می‌شود و برای ادامه چرخه تولید دوباره آسکوربات لازم است. به همین منظور در این چرخه آنزیم‌های مونودهیدروآسکوربات ردوکتاز، دهیدروآسکوربات ردوکتاز و گلوتاتیون ردوکتاز فعالیت می‌کنند و با استفاده از NAD(P)H و گلوتاتیون، آسکوربات را احیا می‌کنند (Mittler, 2002).

افزایش در فعالیت آنزیم کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز در گیاهچه‌های عدس قابل انتظار بود زیرا افزایش در فعالیت آنزیم SOD منجر به تولید H_2O_2 می‌شود که در مراحل بعدی باید به وسیله این آنزیم‌ها سمیت‌زدایی شود تا وضعیت ردااکس سلولی حفظ شود. بنابراین در شرایط تنش کادمیوم بالا رفتن فعالیت SOD به تنهایی نمی‌تواند از گیاه در برابر سمیت رادیکال‌های اکسیژن محافظت کند و افزایش فعالیت دیگر آنزیم‌ها (کاتالاز و پراکسیداز) در سمیت‌زدایی H_2O_2 ضروری است.

نتیجه‌گیری:

بر اساس نتایج بدست آمده کاهش میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی و محتوای پروتئین محلول برگ‌ها و نیز افزایش فعالیت آنزیم-های آنتی اکسیدان نشان از آثار سمیت کادمیوم و تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌باشد که آسیب‌های اکسیداتیو و کاهش سنتز پروتئین و تولید رنگیزه‌های فتوسنتزی را به دنبال دارد. افزایش غلظت کادمیوم منجر به افزایش میزان پرولین و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان گیاهچه‌ها شد که این مورد می‌تواند آثاری از مکانیسم مقاومت گیاه عدس در برابر تنش کادمیوم باشد.

منابع:

احمدوند، س.، بهمنی، ر.، حبیبی، د. و فروزش، پ. (۱۳۹۱) بررسی اثر کلرید کادمیوم بر پارامترهای رشدی و برخی صفات فیزیولوژیک در گیاهچه‌های لوبیا، مجله زراعت و اصلاح نباتات ۸: ۱۸۲-۱۶۷.

امینی، ز. و حداد، ر. (۱۳۹۲) نقش رنگیزه‌های فتوسنتزی و آنزیم‌های آنتی اکسیدان در مقابل تنش اکسیداتیو، مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست شناسی ایران) ۲۶: ۲۶۵-۲۵۱.

بادپا، خ.، موحدی دهنوی، م. و یدوی، ع. (۱۳۹۳). برهم‌کنش نیترات کادمیوم و سالیسیلیک اسید بر فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان، پروتئین محلول و مالون دی آلدهید برگ گلرنگ رقم صفه، فرآیند و کارکرد گیاهی ۳: ۳۳-۲۱.

بهمنی، ر.، بی همتا، م.، حبیبی، د. و فروزش، پ. (۱۳۹۱).

بررسی تغییرات جوانه‌زنی، رشد ریشه و ساقه در ژنوتیپ های مختلف لوبیا تحت تنش کادمیوم، مجله زراعت و اصلاح نباتات ۸: ۱۵٤-۱٤٥.

پوراکبر، ل. و اشرفی، ر. (۱۳۹۰). اثر کادمیوم بر میزان تولید هیدرژن پراکسید و فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی اکسیدانی در گیاه ذرت، نشریه علوم دانشگاه تربیت معلم ۹: ٤۸٤-٤۷۳.

پورقاسمیان، ن. و احسان زاده، پ. (۱۳۹۲) بررسی پاسخ‌های آنتی‌اکسیداتیو به آلودگی کادمیومی خاک و ارتباط آن با برخی صفات فیزیولوژیک در ژنوتیپ‌های گلرنگ، فرآیند و کارکرد گیاهی ۲: ۳۱-۱۵.

خاوری نژاد، ر.، نجفی، ف. و شاه محمدی، ف. (۱۳۹۲). اثر سالیسیلیک اسید بر فعالیت آنتی اکسیدانی گیاه نخود تحت تنش کلرور کادمیوم، فصلنامه علمی پژوهشی گیاه و زیست بوم ۱-۳٤: ۱۲۰-۱۱۱.

خلیقی جمال آباد، ا. و خارا، ج. (۱۳۸۷). تاثیر قارچ میکوریزای آربوسکولار *Glomus intraradices* بر روی تنش اکسیداتیو و برخی پارامترهای رشدی و فیزیولوژی در گیاه گندم رقم آذر ۲ تحت سمیت کادمیوم، مجله زیست‌شناسی ایران ۲۱: ۲۳۰-۲۱٦.

سلطانی، ف.، قربانلی، م. و منوچهری کلانتری، ف. (۱۳۸۵) اثر کادمیوم بر مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی، قندها و مالون دآلدئید در گیاه کلزا، مجله زیست شناسی ایران ۱۹: ۱٤۵-۱۳٦.

عبدلی، م.، سعیدی، م.، جلالی هنرمند، س.، منصوری فر، س. و قبادی، م. (۱۳۹۲). بررسی برخی صفات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی و ارتباط آن‌ها با عملکرد و اجزای آن در ارقام پیشرفته گندم نان در شرایط تنش کم آبی پس از گرده افشانی، مجله تنش های محیطی در علوم زراعی ٦: ٦۳-٤۷.

علومی، ح.، احمدی موسوی، ع. و حسیبی، ن. (۱۳۹۲) بررسی تیمار برون‌زای اسیدهای آلی کربوکسیلیک بر برخی ویژگی‌های بیوشیمیایی و میزان جذب فلزات کادمیوم و سرب در گیاهچه‌های کلزا، فرآیند و کارکرد گیاهی ۱: ۳۸-۲۵.

کاظم علیلو، س. و رسولی صدقیانی، م. (۱۳۹۱) اثر آلودگی کادمیومی خاک بر برخی شاخص‌های فیزیولوژیک گیاه بنگدانه(*Hyoscyamus niger L*) در حضور و عدم حضور ریز جانداران محرک رشد گیاه، نشریه دانش آب و خاک ۲۲: ۳۰-۱۷.

کوچکی، ع. (۱۳۷٦) زراعت در مناطق خشک. انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد، ۲۰۲ صفحه.

کوچکی، ع.، بنایان اول، م. (۱۳۸۱) زراعت حبوبات. انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد، ۲۳٦ صفحه.

نورانی آزاد، ح. و کفیل‌زاده، ف. (۱۳۹۰) تاثیر سمیت کادمیوم بر رشد، قندهای محلول، رنگیزه‌های فتوسنتزی و برخی آنزیم‌ها در گلرنگ (*Carthamus tinctorius* L.)، مجله زیست‌شناسی ایران ۲٤: ۸٦۷-۸۵۸.

وب، سی. و هوتین، جی. (۱۳۷٦) زراعت و اصلاح عدس ترجمه باقری، ع.، گلدانی، م . و حسن زاده، م. انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد، ۲٤۸ صفحه.

Aggarwal, A., Sharma, I., Tripathi, B. N., Munjal, A. K., Baunthiyal, M. and Sharma, V. (2012) Metal Toxicity and Photosynthesis. In: Photosynthesis: Overviews on Recent Progress and Future Perspectives (Eds: Shigeru, I., Mohanty, P. and Guruprasad, K. N.). Pp. 236-229. International publisher, New Delhi.

Almeida, A. A. F., Vale, R. R., Mielke, M. S. and Gomes, F. P. (2007) Tolerance and prospection of phytoremediator woody species of Cd, Pb, Cu and Cr. Brazilian Journals of Plant Physiology 19: 83-98.

Atesi, I., Suzen, H. S., Aydin, A. and Karakaya, A. (2004) The oxidative DNA base damage in tests of rats after intraperitoneal cadmium injection. Biometals 17: 371-377.

Babula, P., Adam, V., Opatrilova, R., Zehnalek, J., Havel, L. and Kizek, R. (2008) Uncommon heavy metals, metalloids and their plant toxicity: a review. Environmental Chemistry Letters 6: 189-213.

Balestrasse, K. B., Gallego, S. M., Benavides, M. P. and Tomaro, M. L. (2005) Polyamines and proline are affected by cadmium stress in nodules and roots of soybean plants. Plant and Soil 270: 343-353.

Baryla, A., Carrier, P., Frank, F., Coulomb, C., Sahut, C. and Havaux, M. (2001) Leaf chlorosis oilseed rape plants *(Brassica napus)* grown on cadmium-polluted soil: Causes and consequences for

Behavior 7: 1456-1466.
Jiang, X. J., Luo, Y. M., Liu, Q., Liu, S. L. and Zhao, Q. G. (2004) Effects of Cadmium on Nutrient Uptake and Translocation by Indian mustard. Environmental Geochemistry and Health 26: 319-324.
John, R., Ahmad, P., Gadgil, K. and Sharma S. (2008) Effect of cadmium and lead on growth, biochemical parameters and uptake in *Lemna polyrrhiza* L. Plant, Soil and Environment 54: 262–270
John, R., Ahmad, P., Gadgil, K. and Sharma, S. (2009) Heavy metal toxicity: Effect on plant growth, biochemical parameters and metal accumulation by *Brassica juncea* L. International Journal of Plant Production 3: 65-76.
Kupper, H., Küpper, F. and Spiller M. (1996) Environmental relevance of heavy metal substituted chlorophylls using the example of water plants. Experimental Botany 47: 259-266.
Küpper, H., Küpper, F. and Spiller M. (1998) In situ detection of heavy metal substitution chlorophylls in water plants. Photosynthesis Research 58: 123-133.
Lichtenthaler, H. K. and Welburn, W. R. (1994) Determination of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. Biochemical Society Transactions 11: 591 – 592.
Liu, D., Jiang, W. and Gao, X. (2003) Effects of cadmium on root growth, cell division and nucleoli in root tip cells of garlic. Biologia Plantarum 47: 79-83.
Liu, W., Li, P., Qi, X., Zhou, Q., Zheng, L., Sun, T. H. and Yang Y. S. (2005) DNA changes in barely (*Hordeum vulgare*) seedlings induced by cadmium pollution using RAPD. Chemosphere 61**:** 158-167.
Mishra, S., Srivastava, S., Tripathi, R. D., Govidarajan, R., Kuriakose, S. V. and Prasad, M. N. V. (2006) Phytochelatin Synthesis and response of antioxidants during cadmium stress in *Bacopa monnieri* L. Journal of Plant Physiology and Biochemistry 44: 25-37.
Monteiro, M. S., Santos, C., Soares, A. and Mann, R. M. (2009). Assessment of biomarkers of cadmium stress in lettuce. Ecotoxicology and Environmental Safety 72: 811-818.
Muthuchelian, K., Bertamini, M. and Nedunchezhian N. (2001). Triacontanol can protect *Erythrina variegata* from cadmium toxicity. Plant Physiology 158: 1487-1490.
Nakano, Y. and Asada, K. (1987) Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplast: in inactivation in ascorbate-depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical. Plant Cell Physiology 28: 131-140.
Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends in Plant Science 7: 405-410.
Padmaja, K., Prasad D. D. K. and Prasad, A. R. K. (1990) Inhibition of chlorophyll synthesis in *Phaseolus vulgaris* L. seedlings by cadmium acetate. Photosynthetica 24: 399-405.
Pál, M., Horváth, E., Janda, T., Páldi, E. and Szalai G. phothosynthesis and growth. Planta 212: 696-709.
Bates, L. S., Waldren, R. P. and Teare, I. D. (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant and Soil 39: 205-207.
Benavides, M. P., Gallego, S. M. and Tomaro, M. L. (2005) Cadmium toxicity in plants. Brazilian Journal of Plant Physiology 17: 21-34.
Beers, R. F. and Sizer, I. W. (1952) A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. Journal of Biological Chemistry 195: 133-140.
Bhardwaj, P., Chaturvedi, A. K. and Prasad, P. (2009) Effect of Enhanced Lead and Cadmium in soil on Physiological and Biochemical attributes of *Phaseolus vulgaris* L. Nature and Science 7: 63-75.
Bradford, M. M. (1976) A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.
Chen, X., Wang, J., Shi, Y., Zhao, M. Q. and Chi, G. Y. (2011) Effects of cadmium on growth and photosynthetic activities in pakchoi and mustard. Botanical Studies 52: 41-46.
Dazy, M., Masfaraud, J. F. and Ferard, J. F. (2009) Induction of oxidative stress biomarkers associated with heavy metal stress in *Fontinalis antipyretica* Hedw. Chemosphere 75: 297–302.
Dhindsa, R. A., Plumb-Dhindsa, P. and Thorpe T. A. (1981) Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. Journal of Experimental Botany 126: 93-101.
Dai, L. P., Xiong, Z. T., Huang, Y. and Li, M. J. (2006) Cadmium-induced changes in pigments, total phenolics, and phenylalanine ammonialyase activity in fronds of *Azolla imbricata*. Environmental Toxicology 21: 505-12.
Dinakar, N., Nagajyothi, P. C., Suresh, S., Damodharam, T. and Suresh, C. (2009) Cadmium induced changes on proline, antioxidant enzymes, nitrate and nitrite reductases in *Arachis hypogaea* L. Journal of Environmental Biology 30: 289-294.
Ericson, M. C. and Alfinito, A. E. (1984) Proteins produced during salt stress in tobacco cell cultures. Plant Physiology 74: 506–509.
Ewaise, E. A. (1997) Effects of cadmium, nickel and lead on growth, chlorophyll content and proteins of weed. Biologica Plantarum 39: 403-410.
Forde, B. G. and Lea, P. J. (2007) Glutamate in plants: metabolism, regulation, and signaling. Journal of Experimental Botany 58 (9): 2339–2358.
Gratao, P. L., Polle, A., Lea, P. J. and Azevedo, R. A. (2005) Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. Functional Plant Biology 32: 481-494.
Hayat, S., Hayat, Q., Alyemeni, M. N., Wani, A. S., Pichtel, J. and Ahmad A. (2012) Role of proline under changing environments. Plant Signaling and

Contamination of Toxicology 85: 256–263.

Sun, R. L., Zhou, Q. X., Sun, F. H. and Jin, C. X. (2007) Antioxidative defense and proline/phytochelatin accumulation in a newly discovered Cd hyperaccumulator, *Solanum nigrum* L. Environmental and Experimental Botany 60: 468-476.

Tran, T. L. H. and Raymundo, L. C. (1999) Biosynthesis of carotenoids in bitter melon at high temperature. Phytochemistry 52: 275–80.

Vassilev, A., Tsonev, T. and Yordanov, I. (1998) Physiological respon.se of barley plants (*Hordeum vulgare*) to cadmium contamination in soil during ontogenesis. Environmental Pollution 103: 287-293.

Verma, S. and Dubey, R. S. (2003) Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. Plant Science 164: 645-655.

Vitoria, A. P., Lea, P. J., Azvedo, R. A. (2001) Antioxidant enzymes responses to cadmium in radish tissues. Photochemistry 57: 701-710.

Xue, Z. C., Gao, H. Y. and Zhang, L. T. (2013) Effects of cadmium on growth, photosynthetic rate and chlorophyll content in leaves of soybean seedlings. Biologia Plantarum 57: 587-59.

Zhang, X., Fan, X., Li, C. and Nan, Z. (2010) Effects of cadmium stress on seed germination, seedling growth and antioxidative enzymes in *Achnatherum inebrians* plants infected with a *Neotyphodium* endophyte. Plant Growth Regulation 60: 91-97.

Zhao, Y. (2011) Cadmium accumulation and antioxidative defenses in leaves of *Triticum aestivum* L. and *Zea mays* L. African Journal of Biotechnology 10: 2936-2943.

(2006) Physiological changes and defense mechanisms induced by cadmium stress in maize. Plant Nutrition Soil Science 169: 239-246.

Palma, J. M., Sandalio, L. M., Javier Corpas, F., Romero-Puertas, M. C., McCarthy, I. and Del Rio, L. A. (2002) Plant proteases protein degradation and oxidative stress: role of peroxisomes. Plant Physiology and Biochemistry 40: 521–530.

Prasad, M. N. V. and Strzalka, K. (1999) Impact of heavy metals on photosynthesis. In: Heavy Metal Stress in Plants: from Molecules to Ecosystems. (ed. Prasad, M. N. V. and Hagemeyer, J.) Pp. 177-198. Springer, Berlin.

Rastgoo, L. and Alemzadeh, A. (2011) Biochemical responses of Gouan (*Aeluropus littoralis*) to heavy metals stress. Australian Journal of Crop Science 5: 375-383.

Romero-Puertas, M. C., Corpas, F. J., Rodríguez-Serrano, M., Gómez, M., Del Río, L. A. and Sandalio, L. M. (2007) Differential expression and regulation of antioxidative enzymes by cadmium in pea plants. Plant Physiology 164: 1346-1357.

Sanita, D., Toppi, L. and Gabrielli, R. (1999) Review, response to Cd in higher plants. Environmental and Experimental Botany 41:105-130.

Shahid, M., Pourrut, B., Dumat, C., Nadeem, M., Aslam, M. and Pinelli, E. (2014) Heavy-metal induced reactive oxygen species: phytotoxicity and physicochemical changes in plants. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology 232: 1-44.

Shi, G., Liu, C., Cai, Q., Liu, Q. and Hou, C. (2010) Cadmium accumulation and tolerance of two safflower cultivars in relation to photosynthesis and antioxidative enzymes. Bulletin of Environmental

Effect of cadmium on photosynthetic pigments, proline, soluble proteins and some antioxidant enzymes in lentil (*Lens culinaris* Medik.) seedlings

Fatemeh Barandeh and Hamid Reza Kavousi*

Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

(Received: 3 March 2015, Accepted: 1 July 2015)

Abstract:

Cadmium (Cd) is absorbed easily by the root system of many plant species. Due to its solubility in water and toxicity is considered as a major pollutant. The aim of this study was to investigate the cadmium toxicity on some physiological characteristics of lentil seedlings. Two-week-old seedlings were treated with different concentrations (0 as control, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2.5 and 5 mM) of cadmium chloride in a completely randomized design with three replications for 10 days and then the amounts of photosynthetic pigments, proline, soluble proteins and activity of some antioxidant enzymes (superoxide dismutase, catalase and ascorbate peroxidase) were investigated. Results indicated that with increase of cadmium concentration, significant reduction was observed in photosynthetic pigments. Furthermore, the cadmium significantly increased the amount of proline in treated seedlings compared with control. Also, cadmium has imposed drastic decrease in total soluble proteins and the amount of proteins declined progressively with increasing concentrations of cadmium. Antioxidant enzymes evaluation determination showed that with increasing concentrations of cadmium, the activity of antioxidant enzymes such as superoxide dismutase, catalase and ascorbate peroxidase were increased in lentil seedlings. Due to the reduction of protein contents and photosynthetic pigments, the present results allow us to conclude that the lentil plants adversely affected by cadmium toxicity. To overcome cadmium stress, seedlings have increased the activity of antioxidative enzymes as well as proline.

Key words: Lentile, Cadmium stress, Proline, Photosynthetic pigments, Antioxidant Enzymes.

*corresponding author, Email: hrkavousi@uk.ac.ir