تأثیر کلرید کادمیوم و جیوه بر میزان قند محلول، پروتئین کل، اسید آمینه‌های پرولین، لیزین، متیونین و برخی آنزیم‌ها در دو رقم گندم نان (*Triticum aestivum* L.)

سیده یلدا رئیسی ساداتی و سدابه جهانبخش گده کهریز*

گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی

(تاریخ دریافت: ۹۳/۱۱/۰۹، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹٤/۰٤/۰٦)

چکیده:

فلزات سنگین یک مشکل زیست محیطی مهم بوده و سبب نگرانی‌های بسیار جدی به دلیل خصوصیات سرطان‌زایی، تجزیه‌ناپذیری و تجمع بیولوژیکی شده است. بخش عمده‌ای از این مواد توسط گیاهان جذب شده و منجر به غیرفعال‌سازی برخی از آنزیم‌ها، ایجاد اختلال در انواع واکنش‌ها، کاهش تولید پروتئین و نیز بسیاری از اعمال سلولی را مختل و رشد و نمو را متوقف می‌سازند. هدف از این تحقیق مطالعه اثرات تیمار ناشی از کلرید جیوه و کادمیوم بر میزان پروتئین کل محلول در برگ، میزان قند محلول، غلظت اسید آمینه‌های پرولین، لیزین و متیونین به همراه آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و پلی‌فنل‌اکسیداز بر دو رقم تجن و گنبد گندم می‌باشد. در مرحله سه برگی گیاهچه‌ها با کلرید جیوه در چهار غلظت ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میکرومولار و کلرید کادمیوم در دو غلظت ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌مولار همراه با شاهد تیمار شدند. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. نتایج نشان داد که در دو رقم گنبد و تجن، تیمار کلرید جیوه سبب کاهش معنی‌دار میزان قند محلول و آنزیم پلی‌فنل اکسیداز و افزایش میزان پروتئین کل، پرولین، لیزین و متیونین نسبت به تیمار شاهد گردید. در رقم گنبد با افزایش غلظت کلرید کادمیوم میزان پروتئین کل، قند محلول و لیزین کاهش و مقدار پرولین و متیونین افزایش یافت اما در رقم تجن نتیجه برعکس بود. در نتیجه رقم تجن متحمل‌تر از گنبد می‌باشد. همچنین در رقم گنبد با افزایش غلظت جیوه از فعالیت کاتالاز و پراکسیداز کاسته شد اما در تجن فعالیت این آنزیم‌ها افزایش یافت. با افزایش غلظت کادمیوم فعالیت این آنزیم‌ها نسبت به شاهد کاهش یافت. بنابراین این تحقیق نشان داد که تیمار کلرید کادمیوم و جیوه در حد میکرومولار و میلی‌مولار نیز قادر بوده تا مکانیسم‌های دفاعی گیاه را تحریک و گیاه را در مقابل تنش‌ها متحمل‌تر سازد.

کلمات کلیدی: اسموپروتکتانت‌ها، فلزات سنگین، کلرید کادمیوم، کلرید جیوه، گندم

مقدمه:

گیاهانی از جمله گندم دائماً در معرض انواع تنش‌های زیستی و غیرزیستی هستند که رشد، تکثیر و تمایز گیاه را تغییر می دهند (Buchanan *et al.*, 2000). فلزات سنگین از آلاینده‌های مهم زیست محیطی به‌شمار می‌روند که سلامت انسان، حیوانات و محیط زیست را به‌طور جدی تهدید می‌کنند (Abioye *et al.*, 2013). واضح‌ترین علایم و نشانه‌های آسیب ناشی از فلزات سنگین عبارت از: افزایش رشد یا عدم توازن در فرآیندهای متابولیکی، تغییر در جذب عناصر غذایی و تجزیه ساختارهای پروتئین و DNA در سلول. از جمله مکانیسم‌های مختلف برای سازش و تعادل سلولی هنگام توقف رشد در اثر فلزات سمی شامل: ۱) بالاتر رفتن فعالیت بعضی از آنزیم‌های درگیر در تنظیم کاتابولیسم برای حفظ تولید انرژی سلولی ۲) استفاده از سیستم انتقال مورد نیاز با انرژی کم برای

*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: jahanbakhsh@uma.ac.ir

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-04-10]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1395.5.16.11.6]

وارد کردن اسید آمینه و منابع کربنی دیگر ۳) تسهیل سنتز اسیدهای آمینه پیوند فلزی و دیگر منابع کربن، می‌باشد (Isarankura *et al.*,2009). کادمیوم با تولید فرم‌های مختلفی از انواع اکسیژن فعال ROS (Reactive Oxygene Species) واکنش سمی ایجاد کرده و موجب آسیب به پروتئین‌ها، DNA و کربوهیدرات‌ها شده و در نهایت منجر به ایجاد تنش اکسیداتیو می‌شود (Zhang *et al.*, 2010). جیوه با تجمع در دیواره سلولی و ورود به سیتوپلاسم در متابولیسم طبیعی سلول اختلال ایجاد نموده و کاهش رشد را باعث می‌شود. همچنین یون‌های جیوه سبب تنش اکسیداتیو شده و به دنبال آن گونه های فعال اکسیژن را در گیاهان تولید می‌کنند. این فرآیند سبب آسیب در ساختار لیپیدهای غشایی شده و فعالیت میتوکندری ها را متوقف می‌سازد (Zhau *et al.*, 2007). گونه‌های فعال اکسیژنی همچنین روی بیان ژن‌ها تأثیر گذاشته و موجب تغییر در بسیاری از فرآیندها مانند رشد، چرخه سلولی، مرگ برنامه ریزی شده سلول و پاسخ به تنش‌های غیر زنده می‌شود (Singh Gill and Tuteja, 2010). با افزایش میزان جیوه، سمیت آن در گیاه باعث کاهش پتانسیل آبی، اختلال در تغذیه گیاه، تغییر در تراوایی غشای سلولی، توقف رشد ریشه و ساقه و کاهش در تولید پروتئین و جوانه‌زنی می‌گردد (Zhao *et al.*, 2008). گلوتاتیون و فیتوکلاتین شدیداً با کادمیوم واکنش داده و کادمیوم آزاد را در داخل سیتوزول برگ کاهش می‌دهند و در نتیجه سمیت کادمیوم را محدود می‌کنند (Schneider *et al.*, 2009). میزان جذب کادمیوم توسط گیاه و غلظت آن در یک گیاه، به شرایط محیطی، فیزیولوژیکی و فاکتورهای بیوشیمیایی بستگی دارد. گیاهان برای مقابله با خسارت ناشی از تنش‌های اکسیداتیو و تولید رادیکال‌های آزاد و به ویژه پراکسید هیدروژن از سیستم آنتی‌اکسیدانتی پیچیده‌ای استفاده می‌کنند که اجزای ابتدایی آن شامل: کاروتنوئیدها، آسکوربات، گلوتاتیون و توکوفرول‌ها است (Baby and Jini, 2011). تجمع پرولین در واکنش به تنش به طور طبیعی در سیتوسول اتفاق می افتد، جایی که در تنظیم اسمزی سیتوپلاسمی مشارکت دارد. این تجمع در واکنش به تنش اسمزی، بیان ژن P_5CS را که در بیوسنتز پرولین نقش دارد، تنظیم می‌کند (Ashraf and Foolad, 2007). متیونین و لیزین اسید آمینه‌های ضروری در سلول‌های گیاهی بوده و در سطح گیاهان و در برخی از بافت‌های گیاهی تحت برخی شرایط تنش تا حد زیادی میزان سنتز آنها تنظیم می‌شود و فرآیندهای ضروری سلول مانند تقسیم سلولی، سنتز دیواره سلولی، سنتز کلروفیل و سنتز غشاء را تنظیم می‌کنن (Roje, 2006). فلزات سنگین با تجمع در خاک و جذب بوسیله گیاه به زنجیره غذایی وارد می‌شوند و مسمومیت‌هایی را در گیاهان و افراد تغذیه کننده به وجود می‌آورند (Antoniadis and Alloway, 2001). در ۳۰ سال گذشته مصرف بی‌رویه کودهای فسفاته توسط زارعین و باغداران در کشور رایج شده و کودهای شیمیایی فسفاته حاوی فلزات سنگین بویژه کادمیم و جیوه می‌باشند. بنابراین با مصرف این نوع کودها، تجمع آلاینده‌ها علاوه برآنکه باعث کاهش فعالیت های میکروبی در خاک می‌شوند، توسط گیاهان جذب و از آن طریق وارد زنجیره‌غذایی انسان و حیوان شده که وجود مقدار زیادی از این عناصر سنگین در جیره غذایی روزانه برای انسان و حیوان بسیار خطرناک است. در حال حاضر در کلیه کودهای فسفاته وارداتی غلظت این آلاینده‌ها کنترل و حد مجاز کادمیوم حداکثر ۲۵ میلی‌گرم در کیلوگرم تعیین شده است. در نتیجه توجه به استفاده متعادل و متناسب از کودهای شیمیایی یک ضرورت می‌باشد (ملکوتی و شاهرخ‌نیا، ۱۳۷۹). در کشور ما با توجه به ورود آلاینده‌ها (از جمله عناصر کادمیوم که ضمیمه کودهای فسفاته بوده است) به اراضی کشاورزی، لازم است خاک و گیاه در اراضی کشاورزی کشور مورد بررسی و کنترل قرار گیرد. چرا که در اثر استفاده از کودهای فسفاته غلظت کادمیوم خاک‌های زراعی بیش از حد مجاز بوده، بطوری‌که غلظت کادمیوم کل در همه خاک‌ها، دارای غلظتی بیش از غلظت معمول و در محدوده غلظت بحرانی می‌باشد (رحمانی، ۱۳۸۸). از طرفی کاربرد مقادیر زیادی لجن فاضلاب به‌عنوان کود در زمین‌های کشاورزی باعث انباشت بیش از حد عناصر سمی مانند سرب، کادمیوم، جیوه و نیکل در خاک شده و احتمالاً موجب جذب بیش از اندازه این عناصر به‌وسیله گیاه و

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-04-10]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1395.5.16.11.6]

انتقال آنها به چرخه غذایی می‌شود (Khoshgoftarmanesh and Kalbasi, 2002). با توجه به استفاده بیش از اندازه از کودهای شیمیایی به‌خصوص کودهای فسفاته و افزایش روزافزون استفاده از لجن فاضلاب جهت حاصلخیز نمودن و به‌دنبال آن آلودگی خاک‌های این مناطق، مطالعات گسترده در مورد اثرات این عناصر بر صفات فیزیولوژیک و تنش ناشی از افزایش فلزات سنگین در خصوص گیاهانی مهم و استرتژیک مانند گندم ضروری و حائز اهمیت است. در این راستا هدف از این بررسی، مطالعه میزان پروتئین، قندهای محلول، فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و سنتز و تخریب چند اسیدآمینه ضروری در جهت شناخت اثرات تنش فلزات سنگین بر روی فیزیولوژی گیاهان زراعی برای آگاهی از مکانیسم‌های مقاومت و بقای گیاهان به‌منظور افزایش تحمل در برابر تنش ضرورت دارد.

مواد و روش‌ها:

مواد ژنتیکی مورد استفاده، شرایط کاشت و نمونه‌برداری: این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار در گلخانه‌ی دانشگاه محقق اردبیلی در سال ۱۳۹۱ اجرا گردید. بذرهای ارقام گندم درون گلدان‌هایی با گنجایش ۱۰ کیلوگرم در گلخانه و تحت شرایط میانگین ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی و دمای روزانه ۰/۵±۲۸ و دمای شبانه ۱۶ درجه سلسیوس کشت شد. در این آزمایش دو رقم گندم تجن و گنبد بعد از سه برگی شدن، با کلرید کادمیوم در دو غلظت ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌مولار و کلرید جیوه در چهار غلظت ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میکرومولار تیمار شدند و نمونه‌برداری از برگ‌ها بعد از محلول پاشی انجام شد. در هر مرحله نمونه‌برداری، گیاهچه‌های شاهد و تیمار به طور جداگانه نمونه‌برداری و بلافاصله به داخل یخچال ۷۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند.

اندازه‌گیری قند محلول برگ: برای اندازه‌گیری میزان قند محلول، ابتدا عصاره الکلی از برگ‌ها تهیه شد. بدین صورت که، ابتدا ۰/۵ گرم از بافت برگی نگهداری شده در یخچال ۷۰- درجه سانتی‌گراد برداشته و در هاون چینی کاملا هموژن گردید. سپس پنج میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد به آن اضافه و به لوله آزمایش درب‌دار منتقل شده و به مدت ۳۰ ثانیه ورتکس شد. مایع رویی جدا و به لوله‌ی دیگری منتقل شده و سپس دو بار و در هر بار پنج میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد به بخش جامد باقی‌مانده اضافه و کاملا شستشو گردید و سپس بخش مایع رویی به لوله آزمایش منتقل شده و در نهایت ۱۵ میلی‌لیتر از عصاره به دست آمد. عصاره‌ی حاصل، به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۳۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. از روشناور برای سنجش قند محلول استفاده شد (Omokolo *et al.*, 1996). میزان جذب در طول موج ۶۲۵ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری شد.

تعیین مقدار کمی پروتئین کل محلول برگ گندم: جهت غلظت پروتئین تعیین از روش برادفورد استفاده گردید (Bradford, 1976). به منظور رسم منحنی استاندارد پروتئین، از پروتئین استاندارد آلبومین گاوی BSA (Bovine Serum Albumin) استفاده شد و مقدار کمی پروتئین با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری در طول موج ۵۹۵ نانومتر اندازه‌گیری شد.

سنجش مقدار پرولین، لیزین و متیونین برگ: استخراج پرولین از برگ‌ها با استفاده از روش Bates و همکاران (۱۹۷۳) انجام گرفت. جذب نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۲۰ نانومتر قرائت گردید. غلظت لیزین و متیونین به روش لوساک و همکاران (Losak *et al.*, 2010) تعیین و در دستگاه اسپکتروفتومتری با طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد.

سنجش آنزیم کاتالاز: فعالیت سینتیکی آنزیم کاتالاز سنجیده شد (Chance and Maehly, 1955). بدین منظور ۲/۵ میلی‌لیتر بافر تریس به همراه ۰/۳ میلی‌لیتر آب اکسیژنه با ۶۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی در حمام یخ مخلوط شدند. منحنی تغییرات جذب در طول موج ۲۴۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد.

سنجش آنزیم پراکسیداز: برای اندازه‌گیری فعّالیّت کمی پراکسیداز از روش کار و میشرا استفاده گردید

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-04-10]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1395.5.16.11.6]

(Kar and Mishra, 1976). بدین منظور ابتدا محلول‌های بافر تریس ۱ مولار، آب اکسیژنه ۵۰ میلی‌مولار، پیروگالل ۱۰۰ میلی‌مولار تهیه شد و سپس از هر یک مواد ذکر شده، ۱۰ میلی‌لیتر برداشته و محلول حاصل را به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رساندیم و در نهایت ۲/۵ میلی‌لیتر از محلول فوق با ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی مخلوط شد. منحنی تغییرات جذب در طول موج ٤۲۵ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت گردید.

سنجش آنزیم پلی‌فنل اکسیداز: فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز به روش کار و میشرا بررسی شد (Kar and Mishra, 1976). برای این منظور ۱/۵ میلی‌لیتر بافر تریس با ۰/٤ میلی‌لیتر پیروگالل و ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی خوب مخلوط و به مدت ۵ دقیقه در بن‌ماری ۲۵ درجه سانتیگراد قرار گرفت، منحنی تغییرات جذب در طول موج ٤۲۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر قرائت شد.

فعالیت هر یک از آنزیم‌ها بر حسب تغییرات واحد جذب در دقیقه به ازای هر میلی‌گرم پروتئین محاسبه گردید.

تجزیه آماری داده‌ها: مطالعه صفات اندازه‌گیری شده از طریق آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار: رقم گندم در ۲ سطح و تیمار فلزات سنگین (کلرید جیوه در ٤ سطح و کلرید کادمیوم در ۲ سطح) انجام گرفت. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS، مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

نتایج و بحث:

نتایج تجزیه واریانس نشان داد اثر متقابل فلز سنگین × رقم در مورد صفات میزان پروتئین کل، میزان قند محلول، غلظت اسید آمینه‌های پرولین، لیزین، متیونین و آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و پلی‌فنل اکسیداز در ارقام مورد بررسی گندم (گنبد و تجن) معنی‌دار می‌باشد (جدول۱).

قند محلول: نتایج مقایسه میانگین نشان داد که در رقم گنبد به جز غلظت ۱۵ میکرومولار و در رقم تجن به جز غلظت ۵ میکرومولار کلرید جیوه که کاهش معنی‌داری در میزان قند محلول داشتند در بقیه غلظت‌ها اختلاف معنی‌داری نسبت به شاهد مشاهده نشد. همچنین در هر دو رقم مورد مطالعه با افزایش غلظت کلرید کادمیوم کاهش معنی‌داری در مقدار قند محلول نسبت به شاهد مشاهده شد. از طرف دیگر در رقم تجن افزایش غلظت از ۰/۲۵ تا ۰/۵ میلی‌مولار کادمیوم باعث افزایش میزان قند محلول شد. بیشترین غلظت قند محلول در سطح شاهد رقم گنبد (۱/۱۹۹) و رقم تجن ۱۰ میکرومولار کلرید جیوه (۱/۱۸۹) و کمترین غلظت قند محلول در رقم گنبد در تیمار با کلرید کادمیوم ۰/۵ میلی‌مولار (۰/٦۰۸) ملاحظه شد (جدول۲).

کربوهیدرات در گیاه علاوه بر تولید انرژی منجر به تنظیم بیان ژن‌های متفاوت شده (Rolland *et al.*, 2006) و ممکن است دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی باشد (Lang-Mladek *et al.*, 2010). ساکارز در غلظت‌های کم به‌عنوان یک مولکول علامت‌دهی و در غلظت‌های بالا به‌عنوان پالاینده‌ی گونه‌های فعال اکسیژنی عمل می‌کند (Sugio *et al.*, 2009). گیاه می‌تواند با افزایش قند محلول، ذخیره کربوهیدراتی خود را برای حفظ متابولیسم پایه سلول در شرایط محیطی تحت تنش در حد مطلوب نگه دارد. احتمالا فلزات سنگین منجر به تخریب کلروفیل برگ‌ها شوند، چنانچه بررسی علائم ظاهری در گیاهچه‌های گندم شاهد و تیمار شده با کادمیوم و جیوه نشان داد افزایش غلظت کادمیوم و جیوه در گیاهچه‌ها موجب بروز کلروز برگی به صورت رنگ سبز متمایل به زرد در برگ‌ها شد. کاهش قند محلول تحت تیمار جیوه و کادمیوم در هر دو رقم گنبد و تجن ممکن است ناشی از نیاز پایین به مواد فتوسنتزی به‌دلیل توقف رشد باشد (Ehdaie *et al.*, 2006). همچنین کاهش میزان قند محلول به عنوان یک مولکول علامت‌دهی عمل کرده و در نتیجه موجب فعال شدن ژن‌های مقاومت و یا جهت سنتز پلی پپتیدهایی فیتوکلاتین و گلوتاتیون برای کاهش و محدود کردن تجمع فلزات کادمیوم و جیوه باشد. به علت مصرف شدن قند در جهت سنتز پروتئین‌ها و پلی‌پپتیدهایی از جمله فیتوکلاتین ها و گلوتاتیون غلظت قند کاهش می‌یابد و با ورود کاتیون

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-04-10]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1395.5.16.11.6]

جدول۱- میانگین مربعات تجزیه واریانس قند محلول، پروتئین کل، پرولین، لیزین، متیونین و آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و پلی‌فنل اکسیداز تحت تیمار فلزات سنگین در دو رقم گندم

		میانگین مربعات							
منابع تغییر	درجه	قند محلول	پروتئین	پرولین	لیزین	متیونین	کاتالاز	پراکسیداز	پلی‌فنل اکسیداز
رقم	۱	۰/۰۰۰۱۶ ns	۰/۰۵۱۲ **	۱/۱۰۲ **	۰/۰۰۹ **	۰/۰۰۸ **	۰/٤٤٧ **	۰/۵۲۳ **	۰/۷٤۰ **
فلز سنگین	٦	۰/۲۵۹ **	۰/۰۲۰۹ **	۰/۲۱۳ **	۰/۱۲٤ **	۰/۰۰۱ **	۰/۱۳۷ **	۰/۱۳۱ **	۰/۲۱۲ **
فلز سنگین×رقم	٦	۰/۰۲۹ **	۰/۰۳٦۸ **	۱/۲۸۳ **	۰/۱۰۸ **	۰/۰۰۵ **	۰/۱۹۸ **	۰/۱۹۸ **	۰/۳۳۳ **
خطا	۲۸	۰/۰۰۱٤	۰/۰۰۱۹	۰/۰۰۱٦	۰/۰۰۰۳	۰/۰۰۰۰٤	۰/۰۱۰	۰/۰۱٦	۰/۰۲۳
ضریب تغییرات	-	۳/۷	۱٤/۷	٤/۱	٦/۱	۳/۲	۱٦/۸	۱۸/۲	۱۷/۱

*** اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪، ** اختلاف معنی‌دار در سطح ۱٪، ns بدون اختلاف معنی‌دار**

cd^{+2} به سلول‌های برگ سرعت تنفس کند شده، باعث کاهش میزان فتوسنتز و قند محلول شده، در داخل سلول موجب فعال شدن ژن‌های مقاومت می‌گردد (Bolton, 2009). و تغییرات فراساختاری در اندامک‌های سلول بوجود می‌آید. بعلاوه رفتار آنزیم‌های کلیدی چند مسیر متابولیک تغییر می‌کند. همچنین در سیتوسل سلول‌های برگ باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های تجزیه‌کننده قندهای غیر محلول و اسید اینورتاز و سوکروز سنتاز می‌شود. افزایش میزان قند محلول در تیمار با کلرید کادمیوم در گیاهان کلزا، گلرنگ و عدس توسط سایر محققین نیز گزارش شده است (نورانی آزاد و کفیل‌زاده، ۱۳۹۰). افزایش میزان قند محلول تحت تیمار کادمیوم در رقم تجن ممکن است باعث فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن گردیده و منجر به مهار گونه‌های فعال اکسیژن شده باشد.

پروتئین کل: نتایج تجزیه واریانس نشان می‌دهد که اثر متقابل رقم × فلز سنگین در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار می‌باشد (جدول۱). نتایج مقایسه میانگین برای میزان پروتئین کل در رقم گنبد افزایش معنی‌داری را در سطوح کلرید جیوه و کلرید کادمیوم نسبت به شاهد نشان داد به عبارت دیگر با افزایش غلظت‌های کلرید جیوه میزان پروتئین کل افزایش میریابد. در رقم تجن به جز غلظت‌های ۵ میکرومولار کلرید جیوه و ۰/۲۵ میلی‌مولار کلرید کادمیوم که میزان پروتئین نسبت به شاهد افزایش نشان داد، در بقیه غلظت‌ها کاهش معنی‌داری در میزان پروتئین کل نسبت به شاهد ملاحظه گردید. بیشترین و کمترین میزان پروتئین کل به ترتیب مربوط به غلظت ۲۰ میکرومولار کلرید جیوه (۰/٤۸۰) و در سطح شاهد (۰/۱٤٤) در رقم گنبد بودند (جدول۲).

گیاه در جهت مقابله با تنش فلزات سنگین شروع به سنتز پروتئین‌های دفاعی کرده و متابولیت‌ها و آنزیم‌های موجود در ساختار پروتئین‌ها را درگیر می‌سازد. کادمیوم تمایل زیادی به کمپلکس شدن با لیگاندهای نیتروژن و پروتئین‌های گوگردی دارد و به همین دلیل با تشکیل پیوند و اتصال به گروه‌های سولفیدریل پروتئین‌ها موجب مهار و اختلال در ساختار آنها و کنترل احیایی سلول می‌گردد، همچنین موجب تخریب کانال های یونی و نشت یونی می‌شود (Mishra *et al.*, 2009). کاهش میزان پروتئین کل در رقم تجن تحت تنش کادمیوم و جیوه ممکن است به علت تجمع بیش از حد این فلزات و اتصال آنها با گروه‌های سولفیدریل پروتئین بوده که موجب تخریب ساختارهای پروتئینی و در نهایت منجر به آزادسازی رادیکال‌های آزاد شده باشد. کادمیوم با اختلال در متابولیسم نیتروژن از طریق مهار فعالیت آنزیم‌هایی مانند گلوتامین سینتاز، گلوتامات سینتاز و نیترات ردوکتاز و فرآیند احیاء نیترات سبب کاهش تولید پروتئین شده و رشد را متوقف می‌کند (Wang *et al.*, 2008). در رقم گنبد و تجن (غلظت‌های ۵ میکرومولار و ۰/۲۵ میلی‌مولار) افزایش غلظت پروتئین برگ-های گندم تحت تأثیر کادمیوم و جیوه احتمالا به دلیل افزایش سنتز برخی آنزیم‌ها از جمله آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، همچنین سنتز پروتئین‌ها و پلی‌پپتیدهای درگیر در سیستم دفاعی سلول در برابر یون‌ها (متالوتیونین‌ها و فیتوکلاتین‌ها) باشد. مطالعات

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-04-10]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1395.5.16.11.6]

جدول۲- مقایسه میانگین اثرات متقابل رقم× فلز سنگین بر قند محلول، پروتئین کل، پرولین، لیزین، متیونین و آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز

صفات مورد مطالعه		میانگین صفات						
		کلرید جیوه (میکرو مولار)					کلرید کادمیوم (میلی‌مولار)	
	رقم	۰	۵	۱۰	۱۵	۲۰	۰/۲۵	۰/۵
قند محلول	گنبد	۱/۱۹۹^{a}	۱/۱۶۷^{ab}	۱/۱۴۲^{ab}	۱/۱۱۴^{b}	۱/۱۷۳^{ab}	۰/۷۴۵^{e}	۰/۶۰۸^{f}
(میلی‌گرم برگرم وزن تر)	تجن	۱/۱۷۶^{ab}	۰/۹۲۰^{c}	۱/۱۸۹^{a}	۱/۱۴۳^{ab}	۱/۱۵۴^{ab}	۰/۷۰۰^{e}	۰/۸۳۷^{d}
پروتئین کل	گنبد	۰/۱۴۴^{h}	۰/۱۷۵^{fgh}	۰/۳۴۴^{cd}	۰/۱۶۳^{gh}	۰/۴۸۰^{a}	۰/۳۲۴^{d}	۰/۲۲۱^{efg}
(میلی‌گرم بر گرم وزن تر)	تجن	۰/۳۲۸^{d}	۰/۴۰۴^{bc}	۰/۳۲۲^{d}	۰/۲۹۲^{de}	۰/۲۴۲^{ef}	۰/۴۳۱^{ab}	۰/۳۲۲^{d}
پرولین	گنبد	۰/۶۳۰^{h}	۱/۴۰۲^{c}	۰/۸۸۵^{f}	۰/۸۵۴^{f}	۰/۹۶۹^{e}	۱/۲۶۵^{d}	۱/۸۸۱^{a}
(میکرو مول برگرم وزن تر)	تجن	۰/۷۵۳^{g}	۰/۱۲۷^{i}	۱/۲۱۵^{d}	۱/۲۷۱^{d}	۱/۵۳۱^{b}	۰/۶۳۶^{h}	۰/۰۸۳^{i}
لیزین	گنبد	۰/۱۵۷^{fg}	۰/۵۷۴^{b}	۰/۳۱۶^{e}	۰/۳۹۷^{d}	۰/۳۲۰^{e}	۰/۳۱۱^{e}	۰/۱۱۷^{h}
(میکرو مول برگرم وزن تر)	تجن	۰/۰۸۵^{i}	۰/۴۸۴^{c}	۰/۰۵۴^{j}	۰/۳۹۶^{d}	۰/۱۷۰^{f}	۰/۱۲۶^{gh}	۰/۶۶۷^{a}
متیونین	گنبد	۰/۱۷۴^{e}	۰/۱۹۰^{cd}	۰/۲۵۳^{a}	۰/۲۱۵^{b}	۰/۲۱۹^{b}	۰/۱۸۰^{de}	۰/۲۵۱^{a}
(میکرو مول برگرم وزن تر)	تجن	۰/۱۶۰^{f}	۰/۱۹۲^{c}	۰/۱۵۰^{f}	۰/۱۸۳^{cde}	۰/۱۶۰^{f}	۰/۲۶۰^{a}	۰/۱۷۴^{e}
کاتالاز (تغییرات جذب در	گنبد	۱۰/۵۰۳^{a}	۶/۲۳۹^{b}	۲/۱۱۷^{ef}	۱۰/۸۳۲^{a}	۱/۳۹۲^{f}	۲/۲۶۹^{ef}	۴/۱۵۳^{cd}
میلی‌گرم پروتئین)	تجن	۲/۴۶۸^{def}	۱/۴۷۵^{f}	۲/۵۱۷^{def}	۳/۴۶۷^{de}	۵/۹۶۴^{bc}	۰/۹۰۲^{f}	۱/۹۶۸^{ef}
پراکسیداز (تغییرات جذب	گنبد	۱۳/۹۸۳^{a}	۹/۹۵۳^{b}	۲/۴۳۰^{ef}	۱۰/۵۳۱^{b}	۱/۳۵۵^{f}	۲/۹۵۷^{def}	۶/۲۳۷^{c}
در میلی‌گرم پروتئین)	تجن	۴/۴۶۵^{cde}	۱/۹۸۴^{ef}	۲/۹۰۶^{def}	۳/۶۴۲^{def}	۵/۲۷۶^{cd}	۱/۵۵۳^{f}	۲/۶۵۳^{ef}
پلی فنل اکسیداز (تغییرات	گنبد	۳۰/۱۲۱^{a}	۲۰/۶۰۷^{b}	۵/۴۰۶^{de}	۲۴/۲۶۴^{ab}	۲/۷۴۹^{e}	۶/۰۲۶^{cde}	۱۲/۲۸۳^{c}
جذب در میلی‌گرم پروتئین)	تجن	۱۲/۴۸۶^{c}	۳/۹۶۹^{e}	۶/۲۷۰^{cde}	۶/۰۲۲^{cde}	۱۱/۲۴۰^{cd}	۳/۳۳۹^{e}	۵/۸۱۹^{cde}

LSD	
۰/۰۶۴۱	
۰/۰۷۴	
۰/۰۶۴۱	
۰/۰۶۷	
۰/۰۳۰	
۰/۰۱۹۴	
۰/۰۱۰	
۱/۸۲۸	
۰/۰۶۴۱	
۲/۵۹۴	
۶/۷۷۶	

در هر صفت میانگین‌هایی با حروف نامشابه نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ آزمون LSD می‌باشد.

انجام گرفته توسط کریمی و نوجوان (۱۳۸۶) نشان داد که با افزایش غلظت کادمیوم پروتئین‌های محلول برگ افزایش می‌یابد.

پرولین: نتایج تجزیه واریانس نشان می‌دهد که اثر متقابل رقم × فلز سنگین در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار می‌باشد (جدول۱). نتایج حاصل از مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که در هر دو رقم گنبد و تجن با افزایش غلظت از ۵ تا ۲۰ میکرومولار کلرید جیوه افزایش معنی‌داری در میزان پرولین نسبت به تیمار شاهد وجود داشت که این افزایش در رقم تجن بیشتر از رقم گنبد بود. همچنین با افزایش غلظت کلرید کادمیوم از ۰/۲۵ به ۰/۵ میلی‌مولار در رقم گنبد محتوای پرولین افزایش و برعکس در رقم تجن کاهش معنی‌داری در محتوای پرولین مشاهده شد. بیشترین مقدار پرولین در رقم گنبد در تیمار با کلرید کادمیوم ۰/۵ میلی‌مولار (۱/۸۸۱) و کمترین مقدار پرولین در رقم تجن به ترتیب در غلظت ۵ میکرومولار کلرید جیوه (۰/۱۲۷) و ۰/۵ میلی‌مولار کلرید کادمیوم (۰/۰۸۳) ملاحظه شد (جدول۲).

پرولین به عنوان یک محافظ مولکولی، قادر به محافظت از پروتئین‌ها و افزایش فعالیت‌های مختلف آنزیمی است، همچنین در پایداری ساختارهای زیر سلولی (غشاها و پروتئین‌ها)، به عنوان محلول سازگاری پروتئینی، کاهش دهنده pH سیتوپلاسمی و حفظ کننده نسبت مناسب $NADP^{+}$/NADPH در متابولیسم، خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد، تنظیم پتانسیل اکسید و احیایی در شرایط تنش نقش دارد (Szabados and Savoure, 2009). علاوه بر این، تبدیل برخی از

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-04-10]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1395.5.16.11.6]

اسیدهای آمینه نظیر اورنیتین، آرژینین و گلوتامین به پرولین، در افزایش آن نقش دارند (Abdalla and El- khoshiban, 2007). افزایش محتوای پرولین تحت تنش جیوه در هر دو رقم گنبد و تجن و همچنین در رقم گنبد تحت تنش کادمیوم ممکن است به دلیل وجود این مکانیسم‌ها باشد. هر چه گیاه متحمل‌تر باشد، پرولین بیشتری را ذخیره می‌کند (Desnigh and Kanagaraj, 2007). تجزیه سریع پرولین به محض رهایی از تنش، می‌تواند احیاگرهای کافی را فراهم کرده تا از فسفریلاسیون اکسیداتیو در میتوکندری و تولید ATP برای بازسازی خسارت‌های القا شده از تنش، محافظت کند (Ashraf and Foolad, 2007). در رقم تجن کاهش میزان پرولین تحت تنش کادمیوم ممکن است به علت تجزیه سریع پرولین برای بازسازی خسارت‌های ایجاد شده تنش کادمیوم باشد. بطور کلی تنش فلزات سنگین تغییرات بیوشیمیایی مهمی را در گندم با توجه به محتوای اسید آمینه پرولین ایجاد می‌کنند.

لیزین: نتایج تجزیه واریانس نشان می‌دهد که اثر متقابل رقم × فلز سنگین در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار می‌باشد (جدول۱). طبق جدول ۲ در نتیجه مقایسه میانگین دو رقم گنبد و تجن، با افزایش غلظت‌های کلرید جیوه افزایش معنی داری در میزان لیزین نسبت به شاهد مشاهده شد. در حالی که در هر دو رقم مورد مطالعه با افزایش غلظت تیمار کلرید جیوه از ۵ تا ۲۰ میکرومولار میزان لیزین کاهش یافت. همچنین با افزایش غلظت کلرید کادمیوم در رقم گنبد و تجن به ترتیب کاهش و افزایش معنی‌داری در میزان لیزین نسبت به تیمار شاهد مشاهده شد. بیشترین و کمترین مقدار لیزین به ترتیب مربوط به غلظت ۰/۵ میلی‌مولار کلرید کادمیوم (۰/٦٦۷) و ۱۰ میکرومولار کلرید جیوه (۰/۰٥٤) در رقم تجن بود (جدول۲).

لیزین اسید آمینه ضروری بوده و کاتابولیسم لیزین ممکن است برای تنظیم سطح لیزین در برخی از بافت‌ها به کار برده شود. لیزین بطور کارآمد در پاسخ به تنش و برخی از برنامه های تکاملی ابتدا به گلوتامات و سپس به سایر متابولیت‌های مرتبط با تنش تبدیل می‌شود (Galili *et al.*, 2001). لیزین، پیش ماده‌ی اصلی سه متابولیت مهم مرتبط با تنش است که این سه متابولیت عبارتند از پرولین که یک اسمولیت نیرومند است (Hare and Cress, 1997)، آمینو بوتیریک اسید که یک مولکول علامت‌دهی مرتبط با تنش است و آرژنین که بالقوه پیش ماده مربوط به ترکیبات پلی‌آمین‌ها و اکسیدنیتریک می باشد (Baum *et al.*, 1996). واکنش گیاهان به تنش‌های زیستی باعث رمز شدن آنزیم‌های بیوسنتز کننده‌ی لیزین می‌شود (Song *et al.*, 2004). لیزین در تنظیم باز شدن روزنه‌های برگ، جوانه‌زنی دانه‌های گرده و سنتز کلروفیل کاربرد دارد که می‌تواند نقش مهمی در افزایش تحمل گیاه به تنش ایفا کند (نجفی، ۱۳۹۲). در این رابطه می‌توان نقش اسیدهای آمینه را در مقاومت به تنش‌ها را، صرفه‌جویی در مصرف انرژی برای گیاه خلاصه کرد (نجفی، ۱۳۹۲). کاهش لیزین در رقم گنبد تحت تیمار کلرید کادمیوم احتمالا می‌تواند به علت وارد شدن آنها در فرآیندهای تولید متابولیت‌های مقاومت به تنش از جمله آنزیم‌های آنتی اکسیدان و پرولین باشد. ممکن است مواد حدواسط ایجاد شده از کاتابولیسم این اسید آمینه در سنتز پرولین استفاده شده و یا در تولید قندهای محلول دخالت داشته باشد.

متیونین: نتایج مقایسه میانگین در رابطه با متیونین نشان داد که در رقم گنبد با افزایش غلظت‌های کلرید جیوه و کلرید کادمیوم افزایش معنی‌داری در میزان متیونین نسبت به تیمار شاهد وجود دارد. در رقم گنبد .بیشترین میزان متیونین در غلظت‌های ۱۰ میکرومولار کلرید جیوه (۰/۲۵۳) و ۰/۵ میلی مولار کلرید کادمیوم (۰/۲۵۱) و کمترین میزان متیونین در سطح شاهد (۰/۱۷٤) ملاحظه شد. رقم تجن در غلظت‌های ۵ و ۱۵ میکرومولار کلرید جیوه و ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌مولار کلرید کادمیوم افزایش معنی‌داری در میزان متیونین نسبت به تیمار شاهد نشان داد. از طرف دیگر در رقم تجن با افزایش غلظت های کلرید جیوه از ۵ تا ۲۰ میکرومولار و کلرید کادمیوم از ۰/۲۵ به ۰/۵ میلی‌مولار مقدار متیونین کاهش یافت. در رقم تجن .بیشترین میزان متیونین در غلظت ۰/۲۵ میلی‌مولار کلرید کادمیوم (۰/۲٦۰) و کمترین میزان متیونین در سطح شاهد و تیمار با ۱۰ و ۲۰ میکرومولار کلرید جیوه (به ترتیب ۰/۱٦۰،

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-04-10]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1395.5.16.11.6]

۰/۱۵۰ و ۰/۱۶۰) ملاحظه شد (جدول۲).

متیونین متابولیت اساسی در سلول‌های گیاهی است و صرف نظر از نقش آن به عنوان جزء اصلی پروتئین و نقش محوری آن در شروع ترجمه mRNA، به طور غیر مستقیم انواع فرایندهای سلولی را از طریق پیش‌ماده‌ی S-Adenosyl Methionine که دهنده‌ی اولین گروه متیل بیولوژیکی است، تنظیم می‌کند (Joshi *et al.*, 2010). متیونین فرآیندهای ضروری سلول مانند تقسیم سلولی، سنتز دیواره سلولی، سنتز کلروفیل و سنتز غشاء را تنظیم می‌کنند و همچنین پیش ماده‌ای برای ترکیبات کلاته کننده یون فلزی نیوتین آمید، فیتو سیدروفورها و کوفاکتور بیوتین است (Roje, 2006). متیونین منبع گروه پروفیلامین بوده و از این طریق در سنتز فنیل‌آمین‌ها، اسپرمیدین و اسپرمین که از جنبه‌های رشد گیاه، از جمله تکثیر، تمایز سلول و بیان ژن نقش حیاتی بازی می‌کند دخالت دارد (Pang *et al.*, 2007). شکستن متیونین و تبدیل آن به پلی‌آمین‌ها ممکن است به تحمل تنش کمک نماید. احتمالاً کاهش این اسید آمینه در رقم تجن می‌تواند به علت وارد شدن آنها در فرآیندهای تولید متابولیت‌های مقاومت به تنش از جمله آنزیم‌های آنتی اکسیدان و پرولین باشد.

کاتالاز: نتایج تجزیه واریانس نشان می‌دهد که اثر متقابل رقم × فلز سنگین در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار می‌باشد (جدول۱). نتایج مقایسه میانگین برای میزان فعالیت کاتالاز در رقم گنبد تحت تیمار کلرید جیوه کاهش معنی‌داری را نسبت به شاهد نشان داد اما در رقم تجن با افزایش غلظت‌های کلرید جیوه میزان فعالیت این آنزیم نسبت به شاهد افزایش یافت. در هر دو رقم گنبد و تجن، با افزایش غلظت کلرید کادمیوم کاهش معنی‌داری در میزان فعالیت آنزیم کاتالاز نسبت به شاهد مشاهده شد. بیشترین میزان فعالیت کاتالاز در سطح شاهد (۱۰/۵۰۳) و تیمار با ۱۵ میکرومولار کلرید جیوه (۱۰/۸۳۲) در رقم گنبد و کمترین فعالیت کاتالاز در غلظت ۰/۲۵ میلی‌مولار کلرید کادمیوم (۰/۹۰۲) رقم تجن مشاهده شد (جدول۲).

کادمیوم از طریق آسیب به لیپیدهای غشایی، عملکرد غشای سلول را تغییر می‌دهد و همچنین از طریق مکانیسم‌های غیرمستقیم مانند تداخل در سیستم‌های دفاعی، تخریب زنجیره انتقال الکترون و القای پراکسیداسیون چربی موجب خسارت به سلول می‌گردد. همچنین در سطح سلولی، با کاهش قابلیت ارتجاع دیواره سلولی سبب کاهش فشار تورگر شده و مانع رشد سلول‌ها می‌شود (Aina *et al.*, 2007). غلظت‌های بالای فلزات سنگین موجب ایجاد سمیت در گیاه و در نتیجه باعث ایجاد تنش‌های اکسیداتیو شده و با تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن به سلول‌های گیاهی آسیب وارد می‌کنند (Chen *et al.*, 2007). برای کم کردن و از بین بردن انواع اکسیژن‌های فعال و اجتناب از آسیب‌های اکسیداتیو در گیاهان، فعالیت آنزیم‌های آنتی-اکسیدان نظیر کاتالاز، سوپراکسید دسمیوتاز و پراکسیداز افزایش می‌یابد (Smeets *et al.*, 2007). که با نتایج به‌دست آمده ما در این پژوهش در رابطه با رقم تجن مطابقت داشت. حذف مقادیر اضافی گونه‌های فعال اکسیژنی و دخالت در تنظیم سلولی به عهده دو آنزیم کاتالاز و پراکسیداز است که کاتالاز در این عملکرد نقش موثرتری را ایفا می‌کند (Mura *et al.*, 2007). از آن‌جایی‌که کاتالاز به حفظ هموستازی اکسیژن فعال در زمان تنش‌های زنده و غیرزنده کمک می‌کند، بنابراین فعالیت آن نیز در گیاه به هنگام تنش بیشتر می‌شود (Magbanua *et al.*, 2007). عدم تعادل بین پراکسید هیدروژن تولیدی و القا شده، منجر به تجمع مقدار زیادی پراکسید هیدروژن در تیمارهای کادمیوم می‌شود و وجود آنزیم‌هایی مانند کاتالاز و پراکسیداز از تجمع آن جلوگیری کرده و در نتیجه تحمل گیاه نسبت به تنش را افزایش می‌دهند (Zhang *et al.*,2010). در تحقیق حاضر فعالیت کاتالاز در رقم تجن تیمار شده با جیوه افزایش یافته است که احتمالاً نشان دهنده تخریب پراکسیدهای سمی در تجمع کادمیوم به‌وسیله کاتالاز می‌باشد. همچنین افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدان در برگ‌ها و فعال شدن دفاع آنتی‌اکسیدانی می‌تواند از سازوکارهای تحمل به سمیت جیوه باشد که با نتایج بدست آمده ما در رابطه با رقم تجن مطابقت دارد. کادمیوم سبب کاهش جوانه‌زنی بذر و رشد گیاه‌چه، بازدارندگی فعالیت بعضی آنزیم‌ها، رسوب عناصر ضروری یا

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-04-10]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1395.5.16.11.6]

متابولیت‌ها و سبب تخریب سلولی می‌گردد (Ghosh and Singh, 2005). کاهش در فعالیت کاتالاز نیز به عنوان یک پاسخ عمومی در بسیاری از تنش‌های شدید محیطی مانند شوری، خشکی، سرما و تنش فلزات سنگین گزارش شده که این امر احتمالاً به‌علت بازدارندگی از سنتز آنزیم یا تغییر در تجمع زیر واحدهای این آنزیم است. همچنین کاتالاز در اثر پروتئازهای موجود در پراکسی‌زومها می‌تواند کاهش یابد (Shah *et al*., 2001). که با نتایج حاصل از تحقیق ما تحت تیمار کلرید کادمیوم در ارقام گنبد و تجن نسبت به شاعد مطابقت داشت. میزان جذب کادمیوم توسط گیاه و غلظت آن در یک گیاه، به شرایط محیطی، فیزیولوژیکی و فاکتورهای بیوشیمیایی بستگی دارد. کاهش فعالیت کاتالاز همراه با افزایش غلظت کادمیوم در برخی گیاهان به‌علت کاهش در میزان پروتئین‌های گیاه در اثر سمیت این فلز و تنش اکسیداتیو گزارش شده است (Vajpaee *et al.*, 2000). کاهش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در این مطالعه، می‌تواند باعث تولید و تجمع گونه‌های اکسیژن واکنش‌گر شده و با ایجاد تنش اکسیداتیو، تولید رنگیزه‌های فتوسنتزی و رشد را مهار کند.

پراکسیداز: نتایج تجزیه واریانس نشان می‌دهد که اثر متقابل رقم × فلز سنگین در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار می‌باشد (جدول۱). نتایج مقایسه میانگین نشان داد در رقم گنبد با افزایش غلظت‌های کلرید جیوه از میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز کاسته شد اما بر عکس در رقم تجن با افزایش غلظت‌های کلرید جیوه افزایش معنی‌داری نسبت به شاهد ملاحظه گردید. در هر دو رقم مورد مطالعه، هر چند با افزایش غلظت کلرید کادمیوم بر میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز افزوده شد اما کاهش معنی‌داری در میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز نسبت به شاهد وجود داشت. بیشترین میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در سطح شاهد (۱۳/۹۸۳) و تیمار با ۱۵ میکرومولار کلرید جیوه (۱۰/۵۳۱) و کمترین فعالیت پراکسیداز در غلظت ۲۰ میکرومولار کلرید جیوه (۱/۳۵۵) در رقم گنبد مشاهده شد (جدول۲).

پراکسیدازها نقش بسیار مهمی در پاسخ به انواع تنش‌ها داشته و مسئول حذف مقادیر اضافی پراکسید هیدروژن می باشند. آن‌ها به خانواده بزرگی از مولتی‌ژن‌ها تعلق دارند و در طیف گسترده‌ای ازفرآیندهای فیزیولوژیکی مانند تشکیل لیگنین و سوبرین، سنتز فیتوالکسین‌ها و متابولیسم گونه‌های فعال اکسیژنی دخالت می‌کنند (Almagro *et al* ., 2009). به نظر می‌رسد پراکسیدازها عموماً به‌عنوان آنزیم‌های مسمومیت‌زدای گونه‌های اکسیژن فعال عمل می‌کنند، زیرا هیدروژن پراکسید ماده‌ای است که برای دامنه گسترده‌ای از واکنش‌های وابسته به پراکسیداز به‌عنوان ماده پذیرنده الکترون عمل می‌کند. در این میان، پراکسیدازها در امر شکستن پراکسید هیدروژن از طریق چندین سازوکار مختلف عمل می‌کنند (Kawano, 2003). بنابراین چنین استنباط می‌گردد که محلول‌پاشی تیمارهای برتر از لحاظ سطوح فعالیت آنزیم پراکسیداز موجب شکسته شدن هیدروژن پراکسید در سلول خواهد شد و در نتیجه از تولید گونه های فعال اکسیژنی جلوگیری می‌نماید (Tiwari *et al.*, 2005). از جمله پروتئین القا شده در طول دفاع گیاه میزبان در برابر تنش، تولید پراکسیداز است. تجمع پراکسید هیدروژن به‌وسیله آنزیم های کاتالاز و پراکسیداز کاهش می‌یابد و سبب کاهش میزان این رادیکال در اندامک‌های سلولی می‌شود. این آنزیم‌ها سبب تبدیل پراکسید هیدروژن به اکسیژن و آب می‌شوند (Zhang *et al.*, 2009). پوراکبر و اشرفی (۱۳۹۰) نشان دادند که کادمیوم موجب افزایش فعالیت کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز، افزایش پراکسیداسیون لیپیدها، تجمع پراکسید هیدروژن و مرگ سلولی در ذرت می‌شود. افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز در اثر افزایش غلظت کادمیوم در دو رقم گنبد و تجن با نتایج حاصل از تحقیقات فوق مطابقت داشت. ز آثار سمیت ناشی از کادمیوم می‌توان به کاهش فعالیت این آنزیم‌ها اشاره کرد. رادیکال‌های آزاد اکسیژن که در شرایط تنش ناشی از فلزات سنگین به وجود می‌آیند با حمله به آنزیم‌های آنتی اکسیدان و آسیب‌های اکسیداتیو باعث مهار این آنزیم‌ها می شوند و با کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز، تجمع پراکسید هیدروژن افزایش می‌یابد که این فرآیند نیز باعث مهار آنزیم های کاتالاز و پراکسیداز می‌گردد (Dellrio *et al.*, 2003). که

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-04-10]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1395.5.16.11.6]

با نتایج بدست آمده ما تحت تیمار افزایش غلظت کادمیوم، در رقم گنبد مطابقت داشت. ا

پلی‌فنل اکسیداز: نتایج تجزیه واریانس نشان می‌دهد که اثر متقابل رقم × فلز سنگین در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار می‌باشد (جدول۱). نتایج مقایسه میانگین نشان داد که در هر دو رقم گنبد و تجن با افزایش غلظت‌های کلرید جیوه و کلرید کادمیوم کاهش معنی‌داری در میزان فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز نسبت به شاهد وجود داشت. بیشترین میزان فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز در سطح شاهد (۳۰/۱۲۱) و تیمار با ۱۵ میکرومولار کلرید جیوه (۲٤/۲٦٤) و کمترین فعالیت پراکسیداز در غلظت ۲۰ میکرومولار کلرید جیوه (۲/۷٤۹) در رقم گنبد مشاهده شد (جدول۲).

پلی‌فنل اکسیداز با نام‌های کاتکول اکسیداز، کاتکولاز و تریوزیناز، در بیشتر گیاهان عالی یافت می‌گردد و وظیفه اصلی آن در سلول‌های گیاهی اکسیداسیون فنل‌ها به کئینون‌ها و تشکیل لیگنین است. پلی‌فنل اکسیداز در واکنش‌های دفاعی و فوق حساسیت گیاه دخالت دارد (Yilmaz *et al.*, 2003). تجمع ترکیباتی از جمله پلی‌فنل اکسیداز به‌عنوان متابولیت‌های ثانویه در پاسخ به تنش، در گیاهان به اثبات رسیده و اهمیت پلی‌فنل‌اکسیداز به‌دلیل وجود هماهنگی در تنظیم میزان فعالیت پلی‌فنل‌اکسیداز و سنتز فنیل پروپانوئید می‌باشد. وقتی‌که سلولی آسیب می‌بیند، در نتیجه فعالیت این آنزیم، ترکیبات فنلی به کئینون تبدیل می‌شود و همچنین، ترکیبات فنلی پلیمریزه شده را برای جلوگیری از آسیب‌های بعدی مهیا می‌سازد (Newman *et al.*, 2011).

نتیجه‌گیری کلی:

به طور کلی از نتایج حاصل چنین استنباط می‌شود که تأثیر تنش ناشی از افزایش غلظت کلرید کادمیوم و کلرید جیوه بر فرآیندهای فیزیولوژیک گندم متفاوت بوده و هر دو رقم از مکانیسم‌های متفاوتی برای مقابله با تنش فلزات سنگین استفاده می‌کنند. ارقام گندم (گنبد و تجن) به‌منظور سازگاری و تحمل بیشتر در جهت مقابله با توسعه و تجمع غلظت‌های مسموم کننده این فلزات سنگین در شرایط تنش تمام انرژی خود را صرف سنتز عوامل دخیل در مکانیسم دفاعی می‌کنند. نتایج حاصل از بررسی صفات اندازه‌گیری شده نشان داد در دو رقم گنبد و تجن، تحت تیمار کلرید جیوه میزان قند محلول کاهش یافته و بر مقدار پروتئین کل، پرولین، لیزین و متیونین افزوده شد. همچنین در رقم گنبد با افزایش غلظت کلرید کادمیوم میزان پروتئین کل، قند محلول و لیزین برگ‌ها کاهش یافته که نشان از آثار سمیت کادمیوم و تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌باشد که آسیب‌های اکسیداتیو و کاهش رشد را دنبال دارد و مقدار پرولین و متیونین افزایش یافت اما در رقم تجن نتیجه برعکس بود. در نتیجه رقم تجن متحمل‌تر از گنبد می‌باشد. همچنین نتایج حاصل از بررسی فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی کاتالاز، پراکسیداز و پلی‌فنل اکسیداز در رقم گنبد نشان داد که با افزایش غلظت کلرید جیوه از میزان فعالیت هر سه آنزیم کاسته شده و برعکس در رقم تجن فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز افزایش نشان داد. افزایش سطوح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی القا شده در تیمار با جیوه ممکن است به‌عنوان مکانیسم دفاعی ثانویه در قبال تنش اکسیداتیو باشد. در هر دو رقم مورد مطالعه با افزایش غلظت کلرید کادمیوم آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز، پراکسیداز و پلی‌فنل اکسیداز فعالیت کمتری نسبت به شاهد نشان دادند. فعالیت کمتر این آنزیم‌ها نشان از آثار سمیت کادمیوم و تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌باشد که آسیب‌های اکسیداتیو و کاهش رشد را دنبال دارد.

منابع:

پور اکبر، ل. و اشرفی، ر. (۱۳۹۰). اثر کادمیوم بر میزان تولید هیدروژن پراکسید و فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در گیاه ذرت (*Zea mays* L.). نشریه علوم دانشگاه تربیت معلم ۹: ٤٨٤-٤٧٣.

رحمانی، ح.ر. (۱۳۸۸) بررسی تأثیر کاربرد دراز مدت کودهای فسفره بر میزان کادمیوم خاک و گیاه و مخاطرات زیست محیطی ناشی از آن، گزارش نهایی، سازمان تحقیقات،

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-04-10]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1395.5.16.11.6]

آموزش و ترویج کشاورزی.

کریمی، گ. و نوجوان، م. (۱۳۸٦) اثر کادمیوم کلرید بر پارامترهای رشدی، محتوای پرولین، قندها و پروتئین محلول در دانه‌رست‌های عدس. پژوهش و سازندگی در زراعت و باغبانی ۷٦: ۵۱- ٤٦.

ملکوتی، م.ج و شاهرخ‌نیا، ع. (۱۳۷۹) ضرورت تغییر نگرش در مصرف کودهای فسفاته در راستای کاهش کادمیم در مواد غذایی، نشریه فنی ۱٦٤، نشر آموزش کشاورزی

نجفی، م. نقش اسیدهای آمینه در کشاورزی ارگانیک http://www.talfighdaneh.ir/News/post-23550 زمان استخراج اسفند ۱۳۹۲.

نورانی‌آزاد، ح. و کفیل‌زاده، ف. (۱۳۹۰) تأثیر سمیت کادمیوم بر رشد، قندهای محلول، رنگیزه‌های فتوسنتزی و برخی آنزیم‌ها در گلرنگ (*Carthamus tinctorius* L.). مجله زیست شناسی ۲٤: ۸٦٦- ۸۵٤

Ashraf, M. and Foolad, M. R. (2007) Roles of glycine betaine and prolin improving plant a biotic stress resistance. Journal of Experimental Botany 56: 206-216.

Abdalla, M. M. and El- khoshiban, N. H. (2007) The influence of water stress on growth, relative water content, photosynthetic pigments, some metabolic and hormonal contents of two *Triticium aestivum* cultivars. Journal of Applied Sciences Research 3: 2062- 2074.

Abioye, O. P., Ijah, U. J. J. and Aransiola, S. A. (2013) "Remediation mechanisms of tropical plants for lead-contaminated environment. Soil Biology 35: Pp. 59-77.

Antoniadis, N. and Alloway, B. J. (2001) Availability of Cd, Ni and Zn to rye grass in seawage sludge treated soils at different temperatures. Water, Air and Soil Pollution 132: 201-204.

Almagro, L., Gomez, L. V., Belchi-Navarro, S., Bru, R., Barcelo, A. and Pedreno, M. A. (2009) Class III peroxidases in plant defence reactions. Journal of Experimental Botany 60: 377-390.

Aina, R., Labra, M., Fumagalli, P., Vannini, C., Marsoni, M., Cucchi, U., Bracale, M., Sgorbati, S. and Citterio, S. (2007) "Thiol-dpeptide level and proteomic changes in response to cadmium toxicity in *Oryza sativa* L. roots". Environ and Experimental Botany 59:381-392.

Bradford, M. M. (1976) Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Annals of Biochemistry 72: 248-254.

Buchanan, B. B., Gruissem, W., and Jones, R. L. (2000) Biochemistry and Molecular Biology of Plants. John Wiley& sons. USA. 1195p.

Baum, G., Lev-Yadun, S., Fridmann, Y., Arazi, T., Katsenelson, H., Zik, M. and Fromm, H. (1996) Calmodulin binding to glutamate decarboxylase is required for regulation of glutamate and GABA metabolism and normal development in plants. EMBO Journal 15: 2988-2996.

Baby, J. and Jini, D. (2011) Development of salt stress-tolerant plants by gene manipulation of antioxidant enzymes. Asian Journal of Agricultural Research 5: 17-27.

Bolton, M. D. (2009) Primary metabolism and plant defense fuel for the fire. Molecular Plant Microbe Interactions 22:487-497.

Bates, L., Waldrem, R. and Teare, I. (1973) Rapid determination of free praline for water stress studies. Plant and Soil 39: 205-207.

Chance, B. and Maehly, A. C. (1955) Assay of catalases and peroxidases. Method Enzymol 11: 764-755.

Chen, J., Zhu, C., Lin, D. and Sun, Z. X. (2007) The effects of Cd on lipid peroxidation, hydrogen peroxide content and antioxidant enzyme activities in Cd-sensitive mutant rice seedlings. Canadian Journal of Plant Science 87: 49-57.

Ghosh, M. and Singh, S. P. (2005) A comparative study of cadmium phytoextraction by accumulator and weed species. Environmental Pollution 133: 365-371.

Desnigh, R. and Kanagaraj, G. (2007) Influence of salinity stress on photosynthesis and ant oxidative systems in two cotton varieties. Plant Physiology 33: 221-234.

Dellrio, L. A., Copas, F. J. Sandali, L. M. palma, J. M. and Barroso, J. B. (2003) plant peroxisomes, reactive oxygen metabolism and nitric oxide. IUBMB Life 55: 71 -81.

Ehdaie, B., Alloush, G. A., Madore, M. A. and Waines, J. G. (2006) Genotypic variation for stem reserves and mobilization in wheat: I. Post anthesis changes in internode dry matter. Crop Science 46: 735-746.

Galili, G., Tang, G., Zhu, X. and Gakiere, B. (2001) Lysine catabolism: a stress and development super-regulated metabolic pathway. Current Opinion In Plant Biology 4:261-266.

Hare, P. D. and Cress, W. A. (1997) Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. Journal of Plant Growth Regulation 21: 79-102.

Isarankura, P., Isarankura, Ch., Kasikun, K., Thipkeaw, K. and Prachayasittikul, V. (2009) Proteomic profiling of Escherichia Coli in response to heavy metals stress. European. Journal of Science Research 25: 679-688.

Joshi, V., Joung, J. G., Fei, Z. and Junder, G. (2010) Interdependence of threonine, methionine and isoleucine metabolism in plants: accumulation and transcriptional regulation under abiotic stress.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-04-10]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1395.5.16.11.6]

universal methyl group donor. Phytochemistry 67: 1986-1698.

Schneider, T., Schellenberg, M., Meye, S., Keller, F., Gehrig, P., Lee, Y. S., Eber, L., Martinoia, E. and Riedel, K. (2009) Quantitative detection of changes in the leaf-mesophyll tonoplast proteome in dependency of a cadmium exposure of barley (*Hordeum vulgare* L.) plants. Proteomics 9: 2668-2677.

Singh Gill, S. and Tuteja, N. (2010) Reactive Oxygen Species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiology and Biochemistry 48: 909-930.

Szabados, L. and Savoure, A. (2009) Proline: a multifunctional amino acid. Trends in Plant Science 15: 89-97.

Sugio, A., Dreos, R., Aparicio, F., and Maule, A. J. (2009) The cytosolic protein response as a subcomponent of the wider heat shock response in Arabidopsis. Plant Cell 21: 642-645.

Song, J. T., Lu, H. and Greenberg, J. T. (2004) Divergent roles in *Arabidopsis thaliana* development and defense of two homologous genes, aberrant growth and death2 and agd2 -like defense response protein1, encoding novel aminotransferases. Plant Cell 16: 353–366.

Smeets, K., Ruytinx, J., Semane, B., Belleghem, F.V., Remans, T., Sanden, S. V., Vangronsveld, J. and Cuypers, A. (2007) "Cadmium-induced transcriptional and enzymatic alterations related to oxidative stress" Environmental and Experimental Botany Pp: 1-8.

Shah, K., Kumar, R. G., Verma, S. and Dubey, S. (2001) "Effect of cadmium on lipid peroxidation, superoxide anion generation and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings", Plant Science 161: 1135-1144.

Tiwari, R. K., Kumar, P., Neetu, P. and Sharma, N. (2005) Sign of oxidative stress in the chlorotic leaves of iron starved plants. Plant Science 169: 1037-1045.

Vajpaee, P. R D. Tripathi, U. N. Rai, , M. B. Ali and Singh, S. N. (2000) Cd Accumulation reduces chlorophyll biosynthesis, Nitrate reductase activity and protein content in *Nymphaea alba* L. Chemosphere. 41: 1075-1082.

Wang, L., Zhou,Q., Ding, L., and Sun,Y. (2008) Effect of cadmium toxicity on nitrogen metabolism in leaves of *Solanum nigrum* L. Journal of Hazard Mater. 154: 818-825.

Yilmaz, H., Taskin, T. and Otludil, B. (2003) Polyphenol oxidase activity during rooting in cuttings of grape (*Vitis vinifera* L.) varieties.Turkish Journal of Botany 27: 495-498.

Zhang, X. X, Fan, X. M, Li, C. J, and Nan, Z. B. (2010) Effects of cadmium stress on seed germination, seedling growth and antioxidative enzymes in *Achnatherum inebrians* plants infected with Amino Acids 39: 33-47.

Khoshgoftarmanesh, A. H., and Kalbasi. M. 2002. Effect of Municipal waste Leachate on soil properties and growth and yield of rice. Communications in Soil Science and Plant Anal 33: 2011-2020.

Kar, M. and Mishra, D. (1976) Catalase, Peroxidase, and Polyphenoloxidase activities during Rice leaf senescence. Plant Physiology 57: 315-319.

Kawano, T. (2003) Roles of the reactive oxygen species-generating peroxidase reactions in plant defense and growth induction. Plant Cell Reproduction 21: 829-837.

Lang-Mladek, C., Popova, O., Kiok, K., Berlinger, M., Rakic, B., and Aufastez, W. (2010) Transgenerational inheritance and resetting of stress-induced loss of epigenetic gene silencing in Arabidopsis. Molecular Plant 3: 594-602.

Losak, T., Hlusek, J., Filipcik, R., Pospisilova, L., Manasek, J., Prokes, K., Bunka, F., Kracmar, S.,

Martensson, A. and Orosz., F. (2010) Effect of nitrogen fertilization on metabolism of essential and non-essential amino acids in yield-grown grain maize (*Zea mays* L). Plant Soil and Environment 56: 574-579.

Mishra, R., Tripathi, D., Dwivedi, S. and Kumar, S. T. (2009) Thiol metabolism play sign if cant role during cadmium detoxification by *Ceratophyllum demersum* L. Bioresource Technologies 100: 2155-2161.

Mura, A., Pintus, F., Medda, R., Floris, G., Rinaldi, A. C. and Padiglia, A. (2007) Catalase and antiquitin from Euphorbia characias: Two proteins involved in plant defense. Biochemistry 72: 501-508.

Magbanua, Z. V., Moraes, C. M. D., Brooks, T. D., Williams, W. P. and Luthe, D. S. (2007) Is catalase activity one of the factors associated with maize resistance *to Aspergillus flavus*? Molecular Plant Microbe Interactions. 20: 697-706.

Newman, S., D. Tantasawat., and Steffens, J (2011) Tomato Polyphenol Oxidase B is spatially and temporally regulated during development. Molecules 6: 493-517.

Omokolo, N. D., Tsala, N. G. and Djocgoue, P. F. (1996) Changes in carbohydrate, amino acid and phenol content in cocoa pods from three clones after infection with *Phytophthora megakarya* Bra. and Grif. Annul Botany London 77: 153-158.

Pang, X. M., Zhang, Z. Y., Wen, X. P., Ban, Y. and Moriguchi, T. (2007) Polyamines, allpurpose players in response to environment stresses in plants function of polyamines in plants: recent development (new approaches). Plant Growth Regulation 34: 135-148.

Rolland, F., Baena-Gonzalez, E., and Sheen, J. (2006) Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. Annul Rev Plant Biology 57: 675-709.

Roje, S. (2006) S-Adenosyl-l-methionine: beyond the

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-04-10]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1395.5.16.11.6]

Zhou, Z. S, Huang, S.Q., Gou, K., Mehta, S. K., Zhang, P. C., and Yang, Z. M. (2007) Metabolic adaptations to mercury-induced oxidative stress in roots of *Medicago sativa* L. Journal of Biochemistry 101: 1-9.

Zhao, Z. S, Wang, S.J., and Yang, Z. M. (2008) Biological detection and analysis of mercury toxicity to alfalfa (*Medicago sativa* L.) plants. Chemosphere 70:1500-1509.

Neotyphodium endophyte. Plant Growth Regulation 60: 91-97.

Zhang, F. Q., Zhang, H. X. and Wang, G. P. (2009) Cadmium-induced accumulation of hydrogen peroxide in the leaf apoplast of Phaseo lusaureus and *Vicia sativa* and the roles of different antioxidant enzymes. Journal of Hazard Mater 168: 76-84.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-04-10]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1395.5.16.11.6]

The effect of cadmium chloride and mercuric on carbohydrate, total protein and proline, lysine and methionine amino acids and some of enzymes in two wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.)

Seyede Yalda Raeesi Sadati and Soodabeh Jahanbakhsh Godekahriz *

Department of Agronomy and Plant Breeding, University of Mohaghegh Ardabili
(Received: 29 January 2015, Accepted: 27 June 2015)

Abstract:

Heavy metals are a major environmental problem and have caused serious concerns because of characteristics of carcinogenesis, non-degradability and biological accumulation. Major part of this material is absorbed by plants and leads to inactivation of some enzyme, decreased protein production and disrupting variety of reactions and many cellular functions and growth and development cessation. The aim of this study was to evaluate the treatment effects of mercuric chloride and cadmium chloride on total soluble protein, soluble sugars content, concentration of proline, lysine and methionine amino acids with catalase, peroxidase and polyphenol oxidase activity in Tajan and the Gonbad wheat cultivars. The Seedlings were treated in three leaflets stage with mercuric chloride at concentrations of 5, 10, 15 and 20 µM and cadmium chloride at concentrations of 0.5 and 0.25 mM as well as control. The experiment were conducted as factorial in a completely randomized design with three replications. The results showed that in both Gonbad and Tajan cultivars, mercuric chloride treatment significantly decreased the total soluble sugars content and polyphenol oxidase and increased the amount of protein, proline, lysine and methionine compared to control. In Gonabd, with increasing concentrations of cadmium chloride, total protein, soluble sugar and lysine contents increased but proline and methionine contents reduced. But inTajan cultivar opposite result was obtained. Tajan is therefore more tolerant than Gonbad. Also in Gonabd cultivar, with concentration increasing of mercury, catalase and peroxidase activity were reduced but in Tajan increased activity of these enzymes. With increasing concentration of cadmium activity were reduced compared to control enzymes. Thus, this study showed that treatment with cadmium chloride and mercury chloride at micromolar and millimolar levels is able to stimulate plant defense mechanisms and makes plants more tolerant against stress.

Key words: Cadmium chloride, Heavy metals, Mercuric chloride, Osmoprutektants, Wheat.

*Corresponding author: jahanbakhsh@uma.ac.ir

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-04-10]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1395.5.16.11.6]