

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: ۱۳۹۴/۰۴/۰۶)

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 پلی‌فنل‌اکسیداز 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:

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

گیاهانی از جمله گندم دائماً در معرض انواع تنش‌های زیستی و غیرزیستی هستند که رشد، تکثیر و تمایز گیاه را تغییر می‌دهند (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 علائم و نشانه‌های آسیب

پرویلین 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 می‌کنند (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 بر آنکه باعث کاهش فعالیت های میکروبی در خاک می‌شوند، توسط گیاهان جذب و از آن طریق وارد زنجیره غذایی 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 کادمیم 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 کادمیم 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 کادمیم خاک‌های زراعی بیش از حد مجاز بوده، بطوری‌که غلظت کادمیم 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، کادمیم، جیوه و نیکل در خاک شده و احتمالاً موجب جذب بیش از اندازه این عناصر به‌وسیله گیاه و

وارد کردن اسید آمینه و منابع کربنی دیگر (۳) تسهیل سنتز اسیدهای آمینه پیوند فلزی و دیگر منابع کربن، می‌باشد (Isarankura et al., 2009). کادمیم با تولید فرم‌های مختلفی از انواع اکسیژن فعال (Reactive Oxygen Species) ROS 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 (Zhou 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). گلوکاتایون و فیتوکلاتین شدیداً با کادمیم واکنش داده و کادمیم آزاد را در داخل سیتوزول برگ کاهش می‌دهند و در نتیجه سمیت کادمیم را محدود می‌کنند (Schneider et al., 2009). میزان جذب کادمیم 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، گلوکاتایون و توکوفرول‌ها است (Baby and Jini, 2011). تجمع پرویلین در واکنش به تنش به طور طبیعی در سیتوسول اتفاق می‌افتد، جایی که در تنظیم اسمزی سیتوپلاسمی مشارکت دارد. این تجمع در واکنش به تنش اسمزی، بیان ژن P_5CS را که در بیوسنتز

درجه سانتی‌گراد برداشته و در هاون چینی کاملاً هم‌وزن 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 کاملاً 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 (Bovine Serum Albumin) BSA 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 اسپکتروفتومتری 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 اسپکتروفتومتری قرائت شد.

سنجش آنزیم پراکسیداز: برای اندازه‌گیری فعالیت کمی

پراکسیداز از روش کار و میشر استفاده گردید

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 استراتژیک 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 کاملاً 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 28 ± 0.5 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 سانتی-گراد 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-

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 (۰/۶۰۸) ملاحظه شد (جدول ۲).

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. احتمالاً 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 برگ‌ها 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 به‌عنوان یک مولکول علامت‌دهی عمل کرده و در نتیجه موجب فعال شدن ژن‌های مقاومت و یا جهت سنتز پلی‌پپتیدهای فیتوکلاتین و گلوکاتینون برای کاهش و محدود کردن تجمع فلزات کادمیوم و جیوه باشد. به علت مصرف شدن قند در جهت سنتز پروتئین‌ها و پلی‌پپتیدهایی از جمله فیتوکلاتین‌ها و گلوکاتینون غلظت قند کاهش می‌یابد و با ورود کاتیون

(Kar and Mishra, 1976). بدین منظور ابتدا محلول‌های بافر تریس ۱ مولار، آب اکسیژنه ۵۰ میلی‌مولار، پیروگال 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 ۴۲۵ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت گردید.

سنجش آنزیم پلی‌فنل اکسیداز: فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز به روش کار و میشر بررسی شد (Kar and Mishra, 1976). برای این منظور ۱/۵ میلی‌لیتر بافر تریس با ۰/۴ میلی‌لیتر پیروگال 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 ۴۲۰ 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 ۴ 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 (جدول ۱).

قند محلول: نتایج مقایسه میانگین نشان داد که در رقم گنبد به جز غلظت ۱۵ میکرومولار و در رقم تجن به جز غلظت ۵

جدول ۱- میانگین مربعات تجزیه واریانس قند محلول، پروتئین کل، پرولین، لیزین، متیونین و آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز تحت تیمار فلزات سنگین در دو رقم گندم

میانگین مربعات								درجه	منابع تغییر
پلی فنل اکسیداز	پراکسیداز	کاتالاز	متیونین	لیزین	پرولین	پروتئین	قند محلول		
۰/۷۴۰**	۰/۵۲۳**	۰/۴۴۷**	۰/۰۰۸**	۰/۰۰۹**	۱/۱۰۲**	۰/۰۵۱۲**	۰/۰۰۰۱۶ ^{ns}	۱	رقم
۰/۲۱۲**	۰/۱۳۱**	۰/۱۳۷**	۰/۰۰۱**	۰/۱۲۴**	۰/۲۱۳**	۰/۰۲۰۹**	۰/۲۵۹**	۶	فلز سنگین
۰/۳۳۳**	۰/۱۹۸**	۰/۱۹۸**	۰/۰۰۵**	۰/۱۰۸**	۱/۲۸۳**	۰/۰۳۳۸**	۰/۰۲۹**	۶	فلز سنگین × رقم
۰/۰۲۳	۰/۰۱۶	۰/۰۱۰	۰/۰۰۰۰۴	۰/۰۰۰۳	۰/۰۰۱۶	۰/۰۰۱۹	۰/۰۰۱۴	۲۸	خطا
۱۷/۱	۱۸/۲	۱۶/۸	۳/۲	۶/۱	۴/۱	۱۴/۷	۳/۷	-	ضریب تغییرات

* اختلاف معنی دار در سطح ۰/۰۵، ** اختلاف معنی دار در سطح ۰/۰۱، ^{ns} بدون اختلاف معنی دار

به غلظت ۲۰ میکرومولار کلرید جیوه (۰/۴۸۰) و در سطح شاهد (۰/۱۴۴) در رقم گنبد بودند (جدول ۲).

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 کانال‌های یونی و نشسته 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 سنتتاز، گلوتامات سنتتاز 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 احتمالاً 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

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 سنتتاز 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 معنی دار می‌باشد (جدول ۱). نتایج مقایسه میانگین برای میزان پروتئین کل در رقم گنبد افزایش معنی داری 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 می‌یابد. 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 معنی داری در میزان پروتئین کل نسبت به شاهد ملاحظه گردید. بیشترین و کمترین میزان پروتئین کل به ترتیب مربوط

جدول ۲- مقایسه میانگین اثرات متقابل رقم × فلز سنگین بر قند محلول، پروتئین کل، پرولین، لیزین، متیونین و آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز

LSD	میانگین صفات							صفات مورد مطالعه		
	کلرید کادمیوم (میلی مولار)			کلرید جیوه (میکرو مولار)				رقم		
	۰/۵	۰/۲۵	۲۰	۱۵	۱۰	۵	۰			
۰/۰۶۴۱	۰/۶۰۸ ^f	۰/۷۴۵ ^e	۱/۱۷۳ ^{ab}	۱/۱۱۴ ^b	۱/۱۴۲ ^{ab}	۱/۱۶۷ ^{ab}	۱/۱۹۹ ^a	گنبد	قند محلول	
	۰/۸۳۷ ^d	۰/۷۰۰ ^e	۱/۱۵۴ ^{ab}	۱/۱۴۳ ^{ab}	۱/۱۸۹ ^a	۰/۹۲۰ ^c	۱/۱۷۶ ^{ab}	تجن	(میلی گرم برگرم وزن تر)	
۰/۰۷۴	۰/۲۲۱ ^{efg}	۰/۳۲۴ ^d	۰/۴۸۰ ^a	۰/۱۶۳ ^{gh}	۰/۳۴۴ ^{cd}	۰/۱۷۵ ^{fgh}	۰/۱۴۴ ^h	گنبد	پروتئین کل	
	۰/۰۶۴۱	۰/۳۲۲ ^d	۰/۴۳۱ ^{ab}	۰/۲۴۲ ^{ef}	۰/۲۹۲ ^{de}	۰/۳۲۲ ^d	۰/۴۰۴ ^{bc}	تجن	(میلی گرم برگرم وزن تر)	
۰/۰۶۷	۱/۸۸۱ ^a	۱/۲۶۵ ^d	۰/۹۶۹ ^e	۰/۸۵۴ ^f	۰/۸۸۵ ^f	۱/۴۰۲ ^c	۰/۶۳۰ ^h	گنبد	پرولین	
	۰/۰۸۳ ⁱ	۰/۶۳۶ ^h	۱/۵۳۱ ^b	۱/۲۷۱ ^d	۱/۲۱۵ ^d	۰/۱۲۷ ⁱ	۰/۷۵۳ ^g	تجن	(میکرو مول برگرم وزن تر)	
۰/۰۳۰	۰/۱۱۷ ^h	۰/۳۱۱ ^e	۰/۳۲۰ ^e	۰/۳۹۷ ^d	۰/۳۱۶ ^e	۰/۵۷۴ ^b	۰/۱۵۷ ^{fg}	گنبد	لیزین	
	۰/۶۶۷ ^a	۰/۱۲۶ ^{gh}	۰/۱۷۰ ^f	۰/۳۹۶ ^d	۰/۰۵۴ ^j	۰/۴۸۴ ^c	۰/۰۸۵ ⁱ	تجن	(میکرو مول برگرم وزن تر)	
۰/۰۱۹۴	۰/۲۵۱ ^a	۰/۱۸۰ ^{de}	۰/۲۱۹ ^b	۰/۲۱۵ ^b	۰/۲۵۳ ^a	۰/۱۹۰ ^{cd}	۰/۱۷۴ ^e	گنبد	متیونین	
	۰/۰۱۰	۰/۱۷۴ ^e	۰/۲۶۰ ^a	۰/۱۶۰ ^f	۰/۱۸۳ ^{cde}	۰/۱۵۰ ^f	۰/۱۹۲ ^c	تجن	(میکرو مول برگرم وزن تر)	
۱/۸۲۸	۴/۱۵۳ ^{cd}	۲/۲۶۹ ^{ef}	۱/۳۹۲ ^f	۱۰/۸۳۲ ^a	۲/۱۱۷ ^{ef}	۶/۲۳۹ ^b	۱۰/۵۰۳ ^a	گنبد	کاتالاز (تغییرات جذب در	
	۰/۰۶۴۱	۱/۹۶۸ ^{ef}	۰/۹۰۲ ^f	۵/۹۶۴ ^{bc}	۳/۴۶۷ ^{de}	۲/۵۱۷ ^{def}	۱/۴۷۵ ^f	تجن	میلی گرم پروتئین)	
۲/۵۹۴	۶/۲۳۷ ^c	۲/۹۵۷ ^{def}	۱/۳۵۵ ^f	۱۰/۵۳۱ ^b	۲/۴۳۰ ^{ef}	۹/۹۵۳ ^b	۱۳/۹۸۳ ^a	گنبد	پراکسیداز (تغییرات جذب	
	۲/۶۵۳ ^{ef}	۱/۵۵۳ ^f	۵/۲۷۶ ^{cd}	۳/۶۴۲ ^{def}	۲/۹۰۶ ^{def}	۱/۹۸۴ ^{ef}	۴/۴۶۵ ^{cde}	تجن	در میلی گرم پروتئین)	
۶/۷۷۶	۱۲/۲۸۳ ^c	۶/۰۲۶ ^{cde}	۲/۷۴۹ ^e	۲۴/۲۶۴ ^{ab}	۵/۴۰۶ ^{de}	۲۰/۶۰۷ ^b	۳۰/۱۲۱ ^a	گنبد	پلی فنل اکسیداز (تغییرات	
	۵/۸۱۹ ^{cde}	۳/۳۳۹ ^e	۱۱/۲۴۰ ^{cd}	۶/۰۲۳ ^{cde}	۶/۲۷۰ ^{cde}	۳/۹۶۹ ^e	۱۲/۴۸۶ ^c	تجن	جذب در میلی گرم پروتئین)	

در هر صفت میانگین‌هایی با حروف نامشابه نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۵٪ آزمون LSD می‌باشد.

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 (جدول ۲).

پرولین به عنوان یک محافظ مولکولی، قادر به محافظت از پروتئین‌ها و افزایش فعالیت‌های مختلف آنزیمی است، همچنین در پایداری ساختارهای زیر سلولی (غشاهای 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

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 (جدول ۱). 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

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 می‌باشد (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 احتمالاً می‌تواند به علت وارد شدن آنها در فرآیندهای تولید متابولیت‌های مقاومت به تنش از جمله آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان 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 (۰/۱۷۴) ملاحظه شد. رقم تجن در غلظت‌های ۵ و ۱۵ میکرومولار کلرید جیوه و ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی مولار کلرید کادمیوم افزایش معنی‌داری در میزان متیونین نسبت به تیمار شاهد نشان داد. از طرف دیگر در رقم تجن با افزایش غلظت‌های کلرید جیوه از ۵ تا ۲۰ میکرومولار و کلرید کادمیوم از ۰/۲۵ به ۰/۵ میلی مولار مقدار متیونین کاهش یافت. در رقم تجن بیشترین میزان متیونین در غلظت ۰/۲۵ میلی مولار کلرید کادمیوم (۰/۲۶۰) و کمترین میزان متیونین در سطح شاهد و تیمار با ۱۰ و ۲۰ میکرومولار کلرید جیوه (به ترتیب ۰/۱۶۰،

اسیدهای آمینه نظیر اورنیتین، آرژنین 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 (جدول ۱). طبق جدول ۲ در نتیجه مقایسه میانگین دو رقم گنبد و تجن، با افزایش غلظت‌های کلرید جیوه افزایش معنی‌داری 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 میلی مولار کلرید کادمیوم (۰/۶۶۷) و ۱۰ میکرومولار کلرید جیوه (۰/۰۵۴) در رقم تجن بود (جدول ۲).

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 برنامه‌های 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

۰/۱۵۰ و ۰/۱۶۰) ملاحظه شد (جدول ۲).

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 فرایندهای ضروری سلول مانند تقسیم سلولی، سنتز دیواره سلولی، سنتز کلروفیل و سنتز غشاء را تنظیم می‌کنند و همچنین پیش‌ماده‌ی برای ترکیبات کلاته‌کننده یون فلزی نیوتین آمید، فیتو سیدروفورها و کوفاکتور بیوتین است (Roje, 2006). متیونین منبع گروه پروفیل‌آمین 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 فرایندهای تولید متابولیت‌های مقاومت به تنش از جمله آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و پرولین باشد.

کاتالاز: نتایج تجزیه واریانس نشان می‌دهد که اثر متقابل رقم \times فلز سنگین در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار می‌باشد (جدول ۱). 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 (جدول ۲).

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 به دست 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 به وسیله 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

داشته و مسئول حذف مقادیر اضافی پراکسید هیدروژن می باشند. آن‌ها به خانواده بزرگی از مولتی‌ژن‌ها تعلق دارند و در طیف گسترده‌ای از فرآیندهای 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 گونه‌های فعال اکسیژنی جلوگیری می‌نماید (Tiwari et al., 2005). از جمله پروتئین‌ها القا شده در طول دفاع گیاه میزبان در برابر تنش، تولید پراکسیداز است. تجمع پراکسید هیدروژن به‌وسیله آنزیم‌های 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). پوراکیبر 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 آنتی‌اکسیدان و آسیب‌های اکسیداتیو باعث مهار این آنزیم‌ها می‌شوند و با کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز، تجمع پراکسید هیدروژن افزایش می‌یابد که این فرآیند نیز باعث مهار آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز می‌گردد (Dellrio et al., 2003). که

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 پروتئین‌های 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 (Vajpae 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 \times فلز سنگین در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار می‌باشد (جدول ۱). 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 (جدول ۲).

پراکسیدازها نقش بسیار مهمی در پاسخ به انواع تنش‌ها

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 آنتی‌اکسیدانی 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.

معلم ۹: ۴۸۴-۴۷۳.

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،

با نتایج بدست آمده ما تحت تیمار افزایش غلظت کادمیوم، در رقم گنبد مطابقت داشت. ۱

پلی‌فنل اکسیداز: نتایج تجزیه واریانس نشان می‌دهد که اثر متقابل رقم \times فلز سنگین در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار می‌باشد (جدول ۱). 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 (۲۴/۲۶۴) و کمترین فعالیت پراکسیداز در غلظت ۲۰ میکرومولار کلرید جیوه (۲/۷۴۹) در رقم گنبد مشاهده شد (جدول ۲).

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 کتون‌ها 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 پلی‌فنل اکسیداز به‌دلیل وجود هماهنگی در تنظیم میزان فعالیت پلی‌فنل اکسیداز و سنتز فنیل پروپانویید می‌باشد. وقتی که سلولی آسیب می‌بیند، در نتیجه فعالیت این آنزیم، ترکیبات فنلی به کتون 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

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

- 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 proline 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 antioxidant 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. آموزش و ترویج کشاورزی. کریمی، گ. و نوجوان، م. (۱۳۸۶) اثر کادمیوم کلرید بر پارامترهای رشدی، محتوای پرولین، قندها و پروتئین محلول در دانه‌رست‌های عدس. پژوهش و سازندگی در زراعت و باغبانی ۷۶: ۵۱-۴۶.
- ملکوتی، م.ج. و شاهرخ‌نیا، ع. (۱۳۷۹) ضرورت تغییر نگرش در مصرف کودهای فسفاته در راستای کاهش کادمیوم در مواد غذایی، نشریه فنی ۱۶۴، 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 زیست‌شناسی ۲۴: ۸۶۶-۸۵۴.
- Ashraf, M. and Foolad, M. R. (2007) Roles of glycine betaine and proline 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 sewage 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-d-peptide 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.

- 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.
- Vajpae, 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.
- Khoshgofarmanesh, 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

- 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 *Phaseolus aureus* and *Vicia sativa* and the roles of different antioxidant enzymes. *Journal of Hazard Mater* 168: 76-84.

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, Osmoprotectants, Wheat.

*Corresponding author: jahanbakhsh@uma.ac.ir