

بررسی پاسخ‌های آنتی اکسیدانتیو به آلودگی کادمیومی خاک و ارتباط آن با برخی صفات فیزیولوژیکی در ژنوتیپ‌های گلنگ.

نسیبه پورقاسمیان و پرویز احسان زاده*

گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان.

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۱/۲۷؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۴/۱۹).

چکیده:

کادمیوم به آسانی توسط سیستم ریشه‌ای بسیاری از گونه‌های گیاهی جذب شده و به علت سمیت و حلالیت بالا در آب به عنوان یکی از مهم‌ترین آلاینده‌ها محسوب می‌شود و بررسی اثرات فیزیولوژیک آن در گیاه حائز اهمیت است. آزمایشی گلدنگ به صورت فاکتوریل بر روی دو گونه اهلی و وحشی گلنگ، اجرا گردید که در آن چهار ژنوتیپ اهلی (اراک، ۲۸۱۱، Saffire، C111 و AC-Sterling) و چهار ژنوتیپ وحشی (آذری، اراک، اصفهان و شیراز) به عنوان فاکتور اول و چهار سطح آلودگی به کادمیوم (صفر، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم کادمیوم در کیلوگرم خاک) به عنوان فاکتور دوم در نظر گرفته شدند. ژنوتیپ‌های AC-Sterling، اصفهان و اراک ۲۸۱۱ بر مبنای شاخص مقاومت به کادمیوم، میزان پراکسیداسیون لیپیدها و میزان رنگدانه‌های کلروفیل در گروه ژنوتیپ‌های مقاوم و اراک، C111 و شیراز در گروه ژنوتیپ‌های حساس به کادمیوم قرار گرفتند. Saffire و آذری در گروه ژنوتیپ‌های نیمه حساس قرار گرفتند. بین دو گونه اهلی و وحشی گلنگ در هیچ یک از صفات مورد مطالعه تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. بیشترین میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز (CAT) و اسکوربیات پراکسیداز (APX) در سطح آلودگی ۵ میلی‌گرم در کیلوگرم مشاهده شد. میزان افزایش فعالیت آنزیم‌های CAT و APX در ژنوتیپ‌های مقاوم بیش از حساس بود. فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز (GR) در ژنوتیپ‌های حساس بیش از ژنوتیپ‌های مقاوم بود. می‌توان نتیجه‌گیری نمود که فعال شدن سیستم دفاع آنزیم‌های APX و CAT در ژنوتیپ‌های مقاوم گلنگ نقش کلیدی در افزایش مقاومت به آلودگی داشته است ولی چنین نقشی برای GR در شرایط آزمایش حاضر پیدا نشد.

کلمات کلیدی: اسکوربیات پراکسیداز، کارابی کوانتمی فتوسیستم II، کادمیوم، کاتالاز، گلنگ، و گلوتاتیون ردوکتاز.

مقدمه:

بشر در محیط زیست، موجب ایجاد انواع آلودگی‌ها در آن می‌گردد که از این بین، تجمع عناصر سنگین به یک مشکل زیست محیطی جهانی تبدیل شده است. این مسئله در برخی مناطق شهری-صنعتی از جمله عوامل محیطی موثر در کاهش کیفیت و کمیت محصولات تولید شده، می‌باشد (Vassilev *et al.*, 1998).

*نویسنده مسؤول، نشانی پست الکترونیکی: ehsanzadehp@gmail.com

های محیطی بسیار حساس است و اندازه گیری فلورسانس کلروفیل به عنوان ابزاری برای کمی کردن اثر تنش‌های محیطی بر فتوستتر گیاه مورد استفاده قرار می‌گیرد (Maxwell and Johnson, 2000).

هنگامی که سلول گیاهی سالم باشد، نور در سطح معمول و مراکز واکنش کلروفیل کاملاً باز باشند، بخش غالب آن در فعالیت‌های فتوشیمیایی به مصرف می‌رسد و در نهایت بخش کمی از انرژی نورانی به صورت فلورسانس دور می‌شود که به آن فلورسانس پایه (F_0) می‌گویند. در مقابل، هنگامی که سلول در معرض آسیب قرار گیرد، به دلیل تداوم واکنش‌های فتوشیمیایی فتوسیستم II، مراکز واکنش اشباع و بسته می‌شوند، فلورسانس به میزان بالای افزایش می‌یابد، که به آن فلورسانس بیشینه (F_m) می‌گویند. افزایش از F_0 به F_m فلورسانس متغیر یا F_v نامیده می‌شود (Maxwell and Johnson, 2000). نسبت $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$ می‌تواند به عنوان یک ابزار مستقیم برای تعیین عملکرد کواتنومی مطلوب در گیاه مورد استفاده قرار گیرد.

به طور کلی چندین مکانیسم مختلف برای مقاومت و سمت زدایی فلزات سنگین در گیاهان مشاهده شده است. بر پایه پیشنهاد Macfie و Welbourn (۲۰۰۰) این مکانیسمها به دو گروه بزرگ تقسیم شده‌اند: ۱- مکانیسم‌هایی که سبب محدودیت عبور یون‌های فلزی و رسیدن آنها به غشاء پلاسمایی می‌شوند (از طریق مایکورپزا، باند شدن با دیواره سلولی و یا ترشحات ریشه)، ۲- مکانیسم‌هایی که به دنبال ورود یون فلزی به سیتوپلاسم درگیر سمت زدایی یون‌های فلزی می‌شوند (کلات شدن در سیتوسول از طریق انواع لیگاندها، تولید پروتئین‌های تعمیر کننده غشاء پلاسمایی و تولید آنتی اکسیدانت‌ها).

در بین گیاهان دانه روغنی گلنگ بومی ایران است که با توجه به پایین بودن نیاز آبی و مقاومت به خشکی به لحاظ داشتن ریشه عمیق و هم چنین مقاومت به شوری مورد توجه می‌باشد (ناصری، ۱۳۷۰). در ایران علاوه بر

در بین فلزات سنگین با پتانسیل ایجاد تنش، کادمیوم بیش از بقیه آنها مورد توجه جوامع علمی قرار گرفته است. این فلز به علت سمت زیاد و حلالیت بالا در آب و همچنین جذب سریع توسط سیستم ریشه‌ای بسیاری از گونه‌های گیاهی به عنوان یکی از مهم‌ترین آلاینده‌های فلزی محسوب می‌شود (Vassilev *et al.*, 1998). گیاهان تحت تنش آلدگی به فلزات سنگین، درجات متفاوتی از مسمومیت را نشان می‌دهند. این مسمومیت‌ها به دلیل تنش اکسیداتیو به واسطه تشکیل رادیکال‌های آزاد اکسیژن مثل پراکسید هیدروژن (H_2O_2)، رادیکال سوپر اکسید (O_2^-)، رادیکال هیدروکسیل (OH^-) و اکسیژن یکتاپایی به وجود می‌آیند (Schickler and Caspi, 1999). رادیکال‌های آزاد، اتم‌ها یا مولکول‌هایی با الکترون جفت نشده هستند که قادرند به طور برگشت ناپذیر به مولکول‌های سیستم‌های بیولوژیک نظیر اسیدهای نوکلئیک، پروتئین‌ها، اسیدهای آمینه آزاد، لیپیدها، لیپوپروتئین‌ها و کربوهیدرات‌ها آسیب وارد نمایند (Hall, 2002).

کلروفیل‌ها و کاروتونوئیدها از مهم‌ترین رنگدانه‌های فتوستتری به حساب می‌آیند. کلروفیل‌های نوع a و b از رایج‌ترین رنگدانه‌های کلروفیلی در موجودات فتوستتر کننده است (Lobban *et al.*, 1988). کلروپلاست‌ها در اعمال بیوشیمیایی و فیزیولوژیک گیاه نقش‌های اصلی را ایفا می‌کنند. علاوه بر فتوستتر، آنها در سنتز آمینواسیدها، اسیدهای چرب، نشاسته و بسیاری از ترکیبات متابولیکی ثانویه، مؤثرند (هاپکینز، ۱۳۸۶). کلروپلاست‌ها محل جریان الکترون هستند و منابعی از تولید گونه‌های اکسیژن فعال در سلول‌های گیاهی محسوب می‌شوند. تولید گونه‌های فعال اکسیژن توسط این منابع در شرایط تنش‌های محیطی مانند فلزات سنگین که ثبت دی اکسید کربن محدود می‌شود، افزایش می‌یابد (Mittler *et al.*, 2004). در واقع فلزات سنگین بازدارنده‌های مؤثر در فتوستتر بوده و باعث تغییر فعالیت فتوسیستم II در مقادیر مختلف می‌شوند. مرحله اکسید کردن آب در فتوسیستم II به فاکتور

(شامل: شیراز، آذری، اراك و اصفهان به عنوان فاكتور دوم در فضای باز گلخانه دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان از اسفند تا اردیبهشت انجام گردید).

شرایط رشد گیاهان و اعمال تیمار کادمیوم: برای اعمال تیمار کادمیوم خصوصیات خاک (هدایت الکتریکی، پی اچ، بافت خاک و میزان عناصر نیتروژن، فسفر، پتاسیم و کادمیوم) تعیین شدند (جدول ۱) و سپس خاک الک شده (الک ۲ سانتیمتری) در دستگاه همزن ریخته شد. محلول نیترات کادمیوم با غلظت‌های ۱، ۵ و ۱۰ میلی گرم کادمیوم بر کیلوگرم خاک، اضافه و خاک به طور یکنواخت به کادمیوم آلوده شد. خاک آلوده شده به مدت ۳۰ روز در شرایط رطوبتی و دمایی نسبتاً ثابت، خوابانیده شد تا تعادل فلز در فاز محلول و جامد برقرار گردد (Amacher, 1996) و گلدان‌های ۱۰ لیتری از خاک آلوده شده پر شدند. در هر گلدان در ابتدا ۱۰ بذر کاشته و پس از اطمینان از سبز شدن بوته‌ها اقدام به تنک کردن گیاه‌چه‌ها گردید و در نهایت در هر گلدان ۵ بوته باقی گذاشته شد. بر اساس آزمون خاک به عمل آمده پیش از شروع آزمایش، در اواسط دوره رشد محلول پاشی برخی عناصر غذایی بر روی برگ‌های گیاه انجام شد. دوره‌های آبیاری در زمانی که رطوبت خاک به حدی پایین‌تر از ظرفیت زراعی رسید، صورت گرفت. گیاهان در مرحله آغاز گل‌دهی برداشت و سه بوته از میان پنج بوته در هر گلدان برای اندازه-گیری صفات فیزیولوژیکی و بیوشمیابی و دو بوته جهت اندازه گیری وزن خشک اختصاص یافتند.

میزان فلورسانس کلروفیل: میزان پارامترهای فلورسانس کلروفیل (F_0 , F_v/F_m) توسط دستگاه Flourescens Meter OS-30p (Opti- Science USA) در گلدان (اراک، ۲۸۱۱) یک روز قبل از برداشت در مرحله گل‌دهی اندازه گیری شد. قبل از اندازه گیری، سه برگ جوان و کاملاً توسعه یافته از هر گلدان به صورت تصادفی انتخاب شدند

گونه زراعی گلنگ گونه‌های وحشی آن نیز به وفور یافت می‌شوند. یکی از محتمل‌ترین اجداد گلنگ که به لحاظ ذخایر ژنتیکی از اهمیت و ارزش زیادی برخوردار است، گونه *Carthamus oxyacanthus* می‌باشد (زینی، ۱۳۸۰). گونه‌های وحشی گلنگ ممکن است این پتانسیل را داشته باشند که بتوان از ذخایر ژنتیکی آنها در جهت بهبود برخی صفات ژنتیکی‌های اهلی استفاده کرد (Sabzalian et al., 2008). گزارش‌های متعددی در مورد تحمل گلنگ به شرایط نامساعد و تنش‌های محیطی مانند شوری و خشکی وجود دارد. با این حال نظر به کمبود مطالعات در مورد مقاومت ژنتیکی‌های موجود در ایران به تنش‌های مختلف نیاز به مطالعات بیشتری بر روی این گیاه می‌باشد (خواجه پور، ۱۳۸۳). بنابراین با توجه به پاسخ‌های متفاوت گونه‌ها و حتی ژنتیکی‌های گیاهی در مواجهه با فلزات سنگین و همچنین به دلیل مطالعات بسیار محدود در پاسخ گلنگ به کادمیوم و همچنین پتانسیل این گیاه به عنوان یک بیش تجمع دهنده کادمیوم (Shi et al., 2010)، بررسی پاسخ ژنتیکی‌های مختلف گلنگ به تنش اکسیداتیو ناشی از فلز سنگین کادمیوم و همچنین معرفی ژنتیکی‌های مقام‌تر به این فلز می‌تواند محققین را در پیشبرد بهتر مطالعات به نژادی و به زراعی در این گیاه یاری کند. مطالعه حاضر به منظور بررسی پاسخ‌های فیزیولوژیک مریبوط به تنش اکسیداتیو در شرایط رشد گیاه گلنگ در خاک و در حضور کادمیوم انجام شد.

مواد و روش‌ها:

آزمایش به صورت فاكتوریل در قالب بلوك کامل تصادفی با سه تکرار و با استفاده از چهار سطح کادمیوم (۰، ۵، ۱۰ میلی گرم کادمیوم بر کیلوگرم خاک) در گلدان به عنوان فاكتور اول و چهار ژنتیکی اهلی گلنگ *Saffire* (شامل: اراك، ۲۸۱۱) و *C111* AC-Sterling و چهار ژنتیک وحشی گلنگ

جدول ۱- مقادیر مربوط به نیتروژن، فسفر، پتاسیم و کادمیوم (میلی گرم بر کیلو گرم)، هدایت الکتریکی (دسمی زیمنس بر متر) و پی اج خاک مورد استفاده در آزمایش.

نیتروژن	فسفر	پتاسیم	کادمیوم	هدایت الکتریکی	پی اج
۵۱۴	۴۳	۱۲۸	<۰/۰۲	۴/۱	۷/۴

مقدار کسر گردید. برای محاسبه غلظت MDA از ضریب خاموشی معادل $155 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ استفاده گردید.

محتوای کلروفیل و کاروتونئیدها: اندازه گیری محتوای کلروفیل و کاروتونئیدها بر اساس روش Lichtenthaler (۱۹۹۴) انجام شد. مطابق با این روش یک گرم از بافت تر برگ‌های جوان و فعال (برگ سوم از رأس گیاه) از هر گلدان (از بین سه بوته‌ای که جهت اندازه گیری صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیابی در نظر گرفته شده بودند) وزن شد. هر گلدان به عنوان یک تکرار در نظر گرفته شد. رنگیزه‌های این نمونه‌ها با استفاده از استون ۸۰ درصد استخراج شدند. سپس نمونه‌ها با کاغذ صاف و اتمن صاف و میزان جذب نمونه‌ها در طول موج‌های ۶۶۳، ۶۴۵ نانومتر برای کلروفیل و ۴۷۰ نانومتر برای کاروتونئیدها با دستگاه اسپکتروفوتومتر مدل 303S PD - (JAPAN,C.O.TDK) خوانده شد. مقدار کلروفیل^a, b، کل و کاروتونئیدها بر حسب میلی گرم بر گرم وزن تر برگ به ترتیب با استفاده از روابط ۲، ۳ و ۴ محاسبه گردید.

$$\text{C chl a (mg/g leaf)} = ((0.0122 \times \text{Abs 663}) - (0.00269 \times \text{Abs 645})) \times \text{ml acceton /mgleaf} \quad (2)$$

$$\text{C chl b (mg/g leaf)} = ((0.0229 \times \text{Abs 645}) - (0.00460 \times \text{Abs 663})) \times \text{ml acceton /mgleaf} \quad (3)$$

$$\text{C Cx+c (mg/g leaf)} = ((1000 \times \text{Abs 470}) - 1.82 \times \text{Cchl a} - 85.02 \times \text{Chlb}) / 198 \times \text{ml acceton /mgleaf} \quad (4)$$

در این معادلات C نشان دهنده غلظت و Chl-, Chl-a, Chl-b و Cx+c به ترتیب کلروفیل a, b و کاروتونئیدها (شامل کاروتین و کرانتوفیل) می‌باشد. همچنین Abs ۶۶۳، Abs ۶۴۵ و Abs ۴۷۰ عبارت از جذب در طول موج‌های ۶۶۳، ۶۴۵ و ۴۷۰ نانومتر می‌باشد.

و با استفاده از گیره‌های مخصوص، در شرایط تاریکی قرار داده شدند. پس از حدود بیست دقیقه پارامترهای فلورسانس کلروفیل شامل F_0/F_m , F_v/F_m و F_0 اندازه گیری و ثبت شد و از میانگین سه عدد در هر گلدان به عنوان یک تکرار استفاده شد.

شاخص مقاومت به کادمیوم: به این منظور هر گلدان به عنوان یک تکرار در نظر گرفته شد. قسمت هوایی از دو بوته در هر گلدان جهت تعیین وزن خشک در آون با حرارت ۸۵ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شد و وزن آنها با ترازوی دقیق جهت محاسبه شاخص مقاومت به کادمیوم (رابطه ۱) ثبت گردید.

$$(1) \quad \frac{\text{وزن خشک گیاه در تیمار کادمیوم (g)}}{\text{وزن خشک گیاه در شاهد(g)}} \times 100 = \text{شاخص مقاومت به کادمیوم} (\%)$$

میزان پراکسیداسیون لیپیدها: جهت سنجش پراکسیداسیون لیپیدها، غلظت مالون دی آلدهید به روش Packer و Heath (۱۹۶۹) اندازه گیری شد. طبق این روش ۰/۲ گرم از بافت تازه گیاهی از هر گلдан (از بین سه بوته ای که جهت اندازه گیری صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیابی در نظر گرفته شده بودند) وزن شدند. هر گلدان به عنوان یک تکرار در نظر گرفته شد. ماده گیاهی با تری کلرواستیک (TCA) و تیوباریتوریک اسید (TBA) عصاره گیری شد. شدت جذب این محلول با استفاده از اسپکتروفوتومتر (مدل Beckman Du 530) در طول موج ۵۳۲ نانومتر خوانده شد. ماده مورد نظر برای جذب در این طول موج کمپلکس قرمز (MDA-TBA) است، جذب بقیه رنگیزه‌های غیراختصاصی در ۶۰۰ نانومتر تعیین و از این

عصاره آنزیمی اندازه‌گیری شد. کاهش جذب اسکوربات پراکسیداز در اثر فعالیت APX با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۲۹۰ نانومتر در مدت یک دقیقه اندازه‌گیری شد. لازم به ذکر است که EC اسکوربات پراکسیداز برابر $2/8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ در نظر گرفته شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم GR: جهت تعیین فعالیت GR از روش Janet و همکاران (۱۹۹۷) استفاده شد. برای طیف سنجی ترکیب واکنش، ۱ میلی لیتر فسفات پتاسیم بافر $0/2$ مولار pH=۷/۵، ۰ میلی لیتر EDTA، ۰/۱ میلی مولار $\text{DTNB} = ۳ \text{ میلیاردتایی}$ حل شده در $0/۰۱$ مولار فسفات بافر pH=۷/۵، با $0/۱$ میلی لیتر NADPH 2 میلی مولار بود، با $0/۱$ میلی لیتر عصاره آنزیمی مخلوط نموده و بلا فاصله پس از افزودن $0/۱$ میلی لیتر از گلوتاتیون اکسید شده 2 میلی مولار ، در طول موج ۴۱۲ نانومتر و در مدت ۱۰ دقیقه، هر 15 ثانیه یکبار، مورد طیف سنجی قرار گرفت.

تجزیه و تحلیل‌های آماری: داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS PROC GLM مورد تجزیه آماری قرار گرفت. مقایسه میانگین‌ها در صورت معنی‌دار بودن اثر عوامل آزمایشی با آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال 5 درصد صورت گرفت. برای بدست آوردن فهمی دقیق‌تر از تفاوت احتمالی بین واکنش گلرنگ اهلی با گلرنگ وحشی در پاسخ به آلودگی کادمیوم مقایسات مستقل گروهی نیز بین دو گروه اهلی و وحشی ژنتیپ‌های گلرنگ صورت گرفت.

نتایج و بحث:

تأثیر ژنتیپ، ژنتیپ اهلی، ژنتیپ وحشی، کادمیوم و اثر متقابل ژنتیپ در کادمیوم، ژنتیپ اهلی در کادمیوم و ژنتیپ وحشی در کادمیوم بر شاخص مقاومت به کادمیوم معنی‌دار شد (جدول ۲). ولی اثر گونه و اثر متقابل گونه در کادمیوم بر شاخص مقاومت به کادمیوم معنی‌دار نشد (جدول ۲).

در سطح 1 میلی گرم کادمیوم بر کیلو گرم خاک، ژنتیپ اصفهان با میانگین $۹۹/۱$ درصد بدون تفاوت معنی‌دار بود

فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی: جهت اندازه‌گیری آنتی اکسیدان‌های آنزیمی شامل: CAT (EC 1.11.1.16)، APX (EC 1.6.4.2) و GR (EC 1.11.1.11) های جوان و بالغ گیاه از هر گلدان (از بین سه بوته‌ای که جهت اندازه‌گیری صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در نظر گرفته شده بودند) وزن شدند. نمونه برگی تازه به همراه یک میلی لیتر بافر استخراج شامل: فسفات پتاسیم $0/1$ میلی مولار با pH=۷/۸، EDTA $0/1$ میلی مولار و $0/1$ ٪ (پلی وینیل پیرولیدون) بر روی یخ همگون گردید. سپس عصاره‌های حاصل در دور 14000 g و دمای 4 درجه سانتیگراد به مدت 30 دقیقه سانتریفیوژ شد و محلول رویی حاصل در ظرف‌های استریل جمع آوری گردید. محلول‌های رویی بدست آمده به عنوان عصاره‌های آنزیمی جهت اندازه‌گیری فعالیت CAT، APX و GR استفاده شدند. به منظور حفظ فعالیت آنزیمی، تمامی مراحل استخراج و اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم بر روی یخ انجام شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم CAT: مخلوط واکنش برای اندازه‌گیری فعالیت CAT شامل 3 میلی لیتر بافر واکنش به صورت $5/0$ میلی مولار بافر فسفات سدیمی با pH=۷، $5/0$ میلی مولار آب اکسیژنه و $4/0$ میکرو لیتر عصاره آنزیمی بر اساس روش Aebi (۱۹۸۴) اندازه‌گیری شد. واکنش با اضافه کردن آب اکسیژنه آغاز می‌شود. پس از اضافه کردن آب اکسیژنه فعالیت CAT موجود در عصاره آنزیمی، در طول موج ۲۴۰ نانومتر در مدت یک دقیقه با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (مدل Beckman Du 530) اندازه‌گیری شد. لازم به ذکر است که ضریب خاموشی کاتالاز برابر $39/4 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ در نظر گرفته شد. واحد فعالیت آنزیم بر حسب $\mu\text{mol/gFw} = \text{unit gFw}^{-1}$ محاسبه شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم APX: فعالیت این آنزیم بر اساس روش Pandy و همکاران (۱۹۸۴) در یک میلی لیتر بافر واکنش به صورت $5/0$ میلی مولار بافر فسفات پتاسیم با pH=۷، $0/5$ میلی مولار اسکوربیک اسید، $0/1$ میلی مولار EDTA $1/25$ میلی مولار آب اکسیژنه و $6/0$ میکرو لیتر

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس شاخص مقاومت به کادمیوم، پراکسید لپید برگ، F_0/F_m و F_0 در هشت ژنوتیپ گلرنگ تحت

چهار سطح آلودگی به کادمیوم

Fv/Fm	Fm	F0	میانگین مربعات		درجه آزادی	منابع تغییرات
			پراکسیداسیون لپید برگ	شاخص مقاومت ^۱		
۰/۰۰۷۶*	۲۲۷ ^{n.s}	۱۲۰*	۱۰/۶۷ ^{n.s}	۳۱/۵ ^{n.s}	۲	بلوک
۰/۰۱۷۸**	۲۰۹۷**	۶۳۶**	۲۴۲/۲**	۳۱۶**	۷	ژنوتیپ
۰/۰۴۴**	۲۳۷ ^{n.s}	۴۸۸**	۲۲۲/۱**	۲۴۰*	۳	اهلی
۰/۰۳۶**	۲۹۷۵**	۳۸۵**	۴۳/۱۴ ^{n.s}	۶۶۶**	۳	وحشی
۰/۰۰۰۲ ^{n.s}	۱۳/۸ ^{n.s}	۱۴/۵ ^{n.s}	۳۸/۵۹ ^{n.s}	۸/۵۰ ^{n.s}	۱	گونه
۰/۰۸۵**	۲۸۰۳**	۱۰۶۳**	۱۳۱۴/۰۴**	۱۶۴۰۳**	۲(۲)	کادمیوم
۰/۰۰۰۶۹ ^{n.s}	۳۵۶ ^{n.s}	۳/۷۸ ^{n.s}	۲۵/۷۵*	۳۳/۰۱**	۲۱(۱۴)	ژنوتیپ×کادمیوم
۰/۰۰۰۵۱ ^{n.s}	۳۷۶ ^{n.s}	۶/۰۸ ^{n.s}	۲۳/۹۴ ^{n.s}	۲۹/۹*	۹(۶)	اهلی×کادمیوم
۰/۰۰۰۷۹ ^{n.s}	۳۲۷ ^{n.s}	۱/۹۷ ^{n.s}	۳۴/۰۲*	۴۵/۴**	۹(۶)	وحشی×کادمیوم
۰/۰۰۰۹۵ ^{n.s}	۴۰۰ ^{n.s}	۲/۳۲ ^{n.s}	۰/۲۴ ^{n.s}	۴/۸ ^{n.s}	۲(۲)	گونه×کادمیوم
۰/۰۰۰۴۶	۲۴۷	۳/۵۹	۱۵/۹۰	۱۰/۶	۶۲(۴۶)	خطا

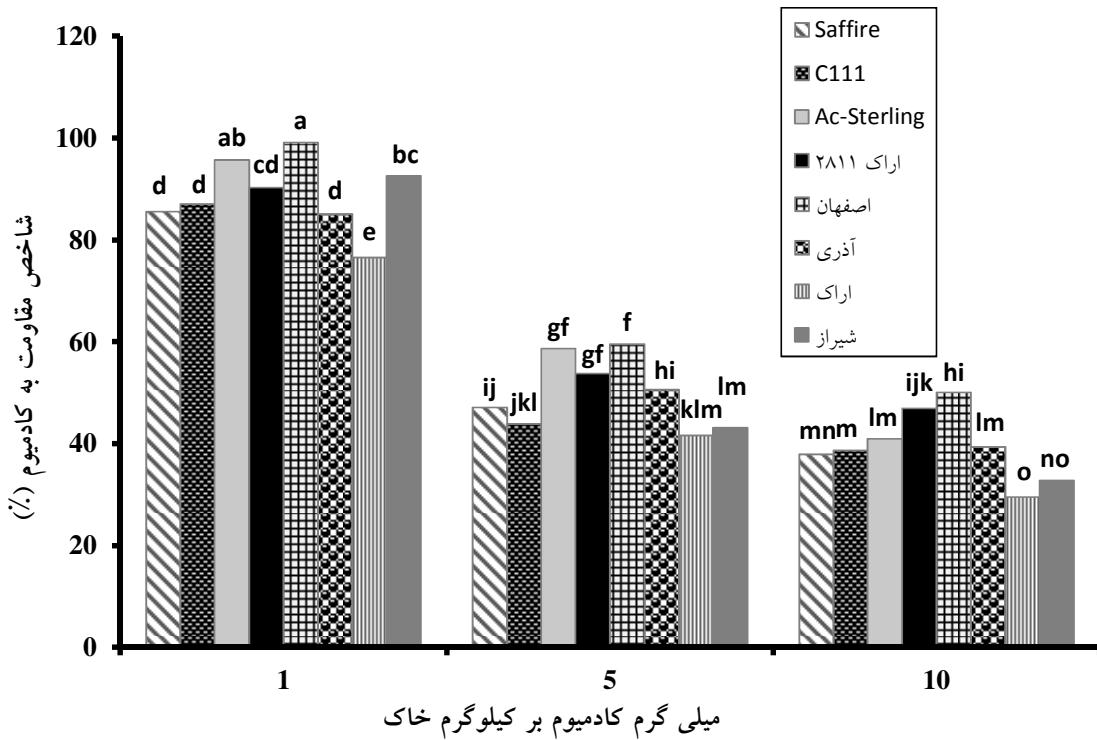
* و ** به ترتیب معنی دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و ^{n.s} غیر معنی دار

۱- اعداد داخل پرانتز درجات آزادی در شاخص مقاومت برای کادمیوم، ژنوتیپ×کادمیوم، اهلی×کادمیوم، وحشی×کادمیوم، گونه×کادمیوم و خطای باشد.

توجهی به گیاه وارد نساخته است و ژنوتیپ‌های AC-Sterling با میانگین ۹۵/۶ درصد بیشترین و ژنوتیپ Sterling، اصفهان و ۲۸۱۱ در مقایسه با بقیه ژنوتیپ‌ها از مکانیسم‌های مقاومت و سمیت زدایی بیشتری استفاده کرده‌اند. مطالعه انجام شده توسط Shi و همکاران (۲۰۱۰) نیز به پاسخ متفاوت ژنوتیپ‌های گلرنگ در سطوح ۵، ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم کادمیوم در کیلوگرم خاک در کشت گلدنی اشاره داشت.

کادمیوم سبب اختلال در متابولیسم کلی سلول‌ها می‌شود (Schickler and Caspi, 1999). سمیت کادمیوم در گیاهان می‌تواند به اثرات منفی بر فرایند فتوستیر منجر شود، این عمل از طریق آسیب به برخی آنزیم‌های فتوستیری مخصوصاً آنهایی که در چرخه کلوبین و بیوسیتر کلروفیل نقش دارند، صورت می‌گیرد (Van Assche and Clijsters, 1990).

با AC-Sterling با میانگین ۹۵/۶ درصد بیشترین و ژنوتیپ اراك با میانگین ۷۶/۵ درصد، کمترین شاخص مقاومت به کادمیوم را نشان دادند (شکل ۱). در سطح آلودگی ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم، ژنوتیپ اصفهان (۵۹/۵٪) بدون تفاوت معنی دار با ژنوتیپ‌های AC-Sterling (۵۸/۶٪) و ۲۸۱۱ (۵۳/۷٪) بیشترین و ژنوتیپ اراك نیز (۴۱/۶٪) بدون تفاوت معنی دار با شیراز (۴۳/۱۱٪) و C111 (۴۳/۹۲٪) کمترین شاخص مقاومت به کادمیوم را نشان داد. در سطح آلودگی ۱۰ میلی‌گرم در کیلوگرم همچنان اصفهان (۴۹/۷٪) بدون تفاوت معنی دار با ۲۸۱۱ (۴۶/۶٪) بیشترین و اراك (۲۹/۵۳٪) بدون تفاوت معنی دار با شیراز (۳۲/۷٪) کمترین شاخص مقاومت به کادمیوم را نشان دادند. به نظر می‌رسد سطح آلودگی ۱ میلی‌گرم در کیلوگرم آسیب قابل

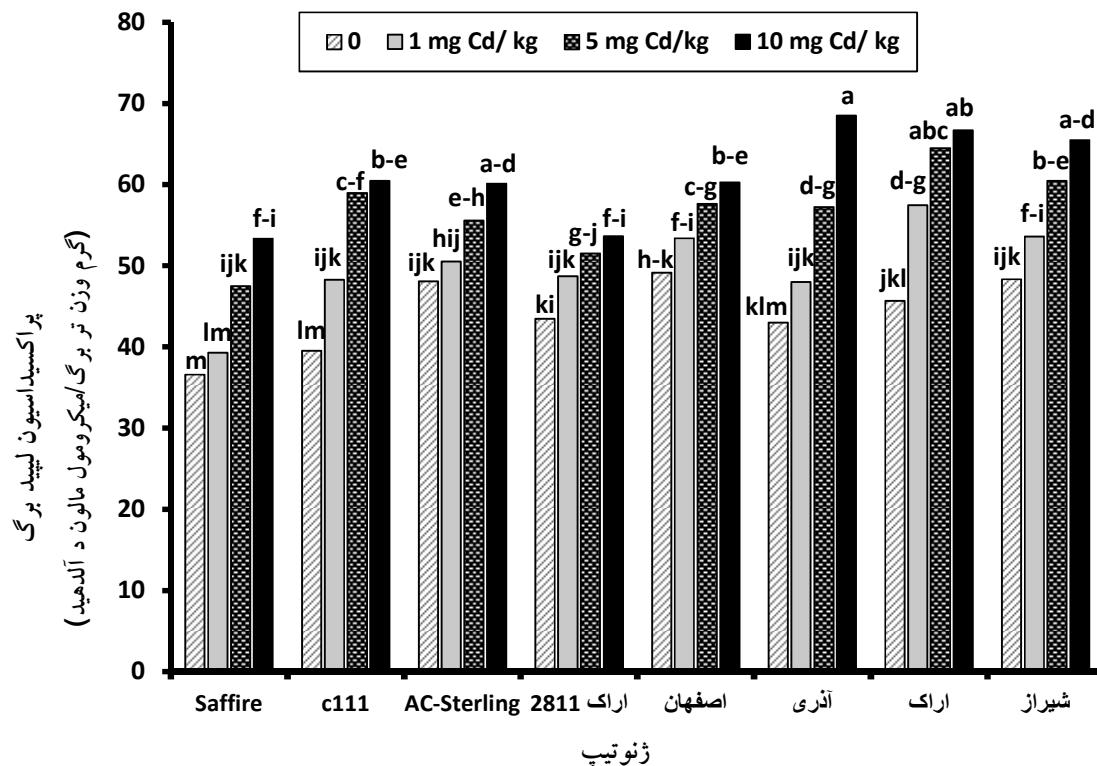


شکل ۱ - مقایسه میانگین‌های اثر متقابل هشت ژنوتیپ در سه سطح کادمیوم بر شاخص مقاومت به کادمیوم (درصد). میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند، بر اساس آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار در سطح ۵٪ اختلاف معنی‌داری ندارند.

کادمیوم همچنین می‌تواند در جذب عناصر غذایی، متابولیسم نیتروژن و تنفس اختلال وارد نماید (Di Toppi and Gabbirelli, 1999). اثر ژنوتیپ، ژنوتیپ اهلی، کادمیوم و اثر متقابل کادمیوم در ژنوتیپ و ژنوتیپ وحشی در کادمیوم بر میزان پراکسیداسیون لیپیدها معنی‌دار بود ولی اثر ژنوتیپ وحشی، گونه و اثر متقابل ژنوتیپ اهلی در کادمیوم و گونه در کادمیوم بر میزان پراکسیداسیون لیپیدها معنی‌دار نشد (جدول ۲). ژنوتیپ‌های اراک و C111 با ۲۶/۰۲ و ۲۲/۱ درصد بیشترین میزان افزایش در پراکسیداسیون لیپیدها از سطح شاهد به سطح ۱ میلی‌گرم کادمیوم بر کیلوگرم خاک را از خود نشان دادند. میزان پراکسیداسیون لیپیدها در سایر ژنوتیپ‌ها در این سطح از آلودگی نسبت به سطح شاهد افزایش معنی‌دار نداد، با این حال کمترین میزان افزایش در پراکسیداسیون لیپیدها مربوط به ژنوتیپ‌های

کادمیوم همچنین می‌تواند در جذب عناصر غذایی، متابولیسم نیتروژن و تنفس اختلال وارد نماید (Di Toppi and Gabbirelli, 1999).

اثر ژنوتیپ، ژنوتیپ اهلی، کادمیوم و اثر متقابل کادمیوم در ژنوتیپ و ژنوتیپ وحشی در کادمیوم بر میزان پراکسیداسیون لیپیدها معنی‌دار بود ولی اثر ژنوتیپ وحشی، گونه و اثر متقابل ژنوتیپ اهلی در کادمیوم و گونه در کادمیوم بر میزان پراکسیداسیون لیپیدها معنی‌دار نشد (جدول ۲). ژنوتیپ‌های اراک و C111 با ۲۶/۰۲ و ۲۲/۱ درصد بیشترین میزان افزایش در پراکسیداسیون لیپیدها از سطح شاهد به سطح ۱ میلی‌گرم کادمیوم بر کیلوگرم خاک را از خود نشان دادند. میزان پراکسیداسیون لیپیدها در سایر ژنوتیپ‌ها در این سطح از آلودگی نسبت به سطح شاهد افزایش معنی‌دار نداد، با این حال کمترین میزان افزایش در پراکسیداسیون لیپیدها مربوط به ژنوتیپ‌های



شکل ۲- مقایسه میانگین‌های اثر متقابل هشت ژنوتیپ گلنگ در چهار سطح کادمیوم بر پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی نمونه‌های برگ (میکرومول مالون دی‌آلدهید بر گرم وزن تر برگ). میانگینهایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند، بر اساس آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار در سطح ۵٪ اختلاف معنی‌داری ندارند.

فلورسانس در سطح احتمال ۱٪ تفاوت معنی‌دار وجود داشت. ولی اثر گونه و اثر متقابل ژنوتیپ در کادمیوم، گونه اهلی در کادمیوم، گونه وحشی در کادمیوم، و گونه در کادمیوم به لحاظ پارامترهای فلورسانس تفاوت معنی‌دار وجود نداشت (جدول ۲). ژنوتیپ C111 بیشترین میزان Fm (۴۷/۷۴) و ژنوتیپ AC-Sterling بیشترین میزان Fv/Fm (۰/۷۹۹) و Fv/Fm (۱۶۹/۶) را نشان دادند. همچنین ژنوتیپ اصفهان کمترین میزان F0 (۳۱/۸۵) و ژنوتیپ شیراز کمترین میزان Fm (۱۲۸/۲) و Fv/Fm (۰/۷۰۳) را نشان داد (جدول ۳). برای قضایت در مورد تغییر Fv/Fm بررسی دیگر پارامترهای فلورسانس هم اهمیت دارند، به عبارتی زمانی که Fv/Fm کاهش می‌یابد مهم است بدانیم که افزایش یافته و یا تغییر در دیگر اجزا موجب کاهش در این نسبت شده است (Lu et al., 2002). مشاهدات انجام

صغر به ۱۰ میلی‌گرم در کیلوگرم نشان دادند. با توجه به نتایج مطالعه حاضر، به نظر می‌رسد میزان آسیب به لیپیدها با کاهش میزان شاخص مقاومت به کادمیوم و افزایش میزان حساسیت گیاه به کادمیوم، افزایش می‌یابد. به افزایش میزان پراکسیداسیون لیپید با افزایش در حساسیت به کادمیوم در ژنوتیپ‌های جو (Guo et al., 2007)، گلنگ (Qadir et al., 2004)، کلزا (Shi et al., 2011) و بید

(Landberg and Greger, 2002) اشاره شده است. اثر ژنوتیپ و کادمیوم بر پارامترهای فلورسانس کلروفیل (Fv/Fm و Fm) در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار شد (جدول ۲). بین ژنوتیپ‌های گونه اهلی و ژنوتیپ‌های گونه وحشی به لحاظ F0 و Fv/Fm در سطح احتمال ۱٪ تفاوت معنی‌دار وجود داشت. همچنین بین ژنوتیپ‌های موجود در گونه وحشی به لحاظ کلیه پارامترهای

جدول ۳- مقایسه میانگین فلورسانس پایه (F_0)، فلورسانس ماکریم (F_m)، نسبت F_v/F_m ، کلروفیل a، b و کاروتونئیدها (میلی گرم بر گرم وزن تربگ) در هشت ژنوتیپ گلنگ و چهار سطح کادمیوم.

عامل آزمایشی	کادمیوم (میلی گرم در کیلوگرم)						
		کاروتونئید b	کلروفیل a	F_v/F_m	F_m	F_0	کاروتونئید a
		۳/۰ ^w a	۲/۵۰۰ ^{ab}	۱/۳۲۸ ^a	۰/۷۹۹ ^a	۱۶۸/ ^۲ a	۳۳/ ^۱ c
		۲/۹۵ ^a	۲/۶۱۰ ^a	۱/۳۱۱ ^a	۰/۷۹۱ ^a	۱۶۵/ ^۳ a	۳۴/ ^۱ c
		۲/۴۲ ^b	۲/۳۳۰ ^b	۱/۳۰۲ ^a	۰/۷۱۴ ^b	۱۵۵/ ^۴ b	۴۳/ ^۸ b
		۲/۱۱ ^c	۲/۱۲۰ ^c	۱/۱۶۶ ^b	۰/۶۷۷ ^c	۱۴۴/ ^۳ c	۴۶/ ^۱ c
		ژنوتیپ					
		۲/۵۵ ^{bcd}	۲/۳۶۶ ^{ab}	۱/۲۹ ^a	۰/۷۳۳ ^d	۱۶۶/ ^۰ ab	۴۳/ ^۶ b
		۲/۴۷ ^{cd}	۲/۲۳۲ ^{ab}	۱/۲۸۴ ^a	۰/۶۹۶ ^f	۱۵۹/ ^۲ ab	۴۷/ ^۷ a
		۲/۸۶ ^a	۲/۵۵۲ ^a	۱/۲۵۳ ^a	۰/۷۹۹ ^a	۱۶۹/ ^۶ a	۳۳/ ^۶ d
		۲/۷۶ ^{ab}	۲/۴۱۵ ^{ab}	۱/۲۵۶ ^a	۰/۷۷۲ ^b	۱۶۷/ ^۳ ab	۳۷/ ^۲ c
		۲/۸۲ ^a	۲/۴۰۸ ^{ab}	۱/۳۰۲ ^a	۰/۷۸۷ ^{ab}	۱۵۶/ ^۱ b	۳۱/ ^۸ e
		۲/۵۴ ^{bcd}	۲/۳۸۵ ^{ab}	۱/۲۹۳ ^a	۰/۷۵۳ ^c	۱۵۵/ ^۶ b	۳۸/ ^۱ c
		۲/۳۸ ^d	۲/۳۶۳ ^{ab}	۱/۲۶۰ ^a	۰/۷۲۰ ^{ed}	۱۶۴/ ^۲ ab	۴۴/ ^۷ b
		۲/۵۳ ^{bcd}	۲/۳۶۹ ^{ab}	۱/۲۷۶ ^a	۰/۷۰۳ ^{ef}	۱۲۸/ ^۲ c	۳۷/ ^۶ c
		شیراز					

در هر ستون و برای هر عامل آزمایشی، میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند، بر اساس آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار در سطح ۵٪ اختلاف معنی‌داری ندارند.

غلظت ۱۰۰ میکرومولار کادمیوم نسبت به شاهد سبب کاهش ۷۵ و ۶۵ درصد در F_v/F_m به ترتیب در *Fontinalis antipyrtica* (Rau *et al.*, 2007) و *Scenedesmus obliquus* (Mallick and Mohn, 2003) شد. با این حال *Papazoglou* و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند که غلظت کادمیوم تا سطح ۱۰۰ میلی گرم در کیلوگرم خاک تأثیری بر میزان فلورسانس گیاه *Arundo donax* نداشت. اثر کادمیوم بر محتوای کلروفیل a و b در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار شد، ولی اثر ژنوتیپ، ژنوتیپ اهلی، ژنوتیپ وحشی، گونه و اثر متقابل ژنوتیپ در کادمیوم، ژنوتیپ اهلی در کادمیوم، ژنوتیپ وحشی در کادمیوم و گونه در کادمیوم بر محتوای کلروفیل a و کلروفیل b معنی‌دار نشد (جدول ۴). محتوای کلروفیل a و b در سطوح ۱ و ۵ میلی گرم در کیلوگرم تفاوت معنی‌داری با سطح شاهد نداشتند، در حال یکه با افزایش شدت آلودگی به ۱۰ میلی

شده توسط *Ci* و همکاران (۲۰۰۹) نشان داد که کاهش در F_v/F_m و افزایش در F_0 بیانگر حساسیت بیشتر در گیاهان است، این مسئله گویای آسیب بیشتر به فتوسیستم II و اختلال در انتقال انرژی جهت برانگیختگی مراکز واکنش می‌باشد. بنابراین به نظر می‌رسد ژنوتیپ‌های اصفهان، اراک ۲۸۱۱ و AC-Sterling در گروه ژنوتیپ‌های مقاوم‌تر قرار می‌گیرند. و اراک، C111 و شیراز حساس‌تر از بقیه ژنوتیپ‌ها باشند. مقاومت ژنوتیپ‌های مذکور با روند پاسخ آنها به آلودگی به لحاظ شاخص مقاومت به کادمیوم نیز هماهنگ است. میزان پارامترهای فلورسانس در سطح آلودگی ۱ میلی گرم در کیلوگرم نسبت به سطح شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت، در حالی که با افزایش سطوح کادمیوم به ۵ و ۱۰ میلی گرم در کیلوگرم میزان F_0 نسبت به سطح شاهد، افزایش معنی‌دار و در F_m و F_v/F_m کاهش معنی‌دار نشان داد (جدول ۳). مطالعات نشان دادند که

جدول ۴- نتایج تجزیه واریانس محتوای کلروفیل a, b، کاروتونئید و میزان فعالیت CAT، APX و GR در هشت ژنوتیپ گلنگ تحت چهار سطح کادمیوم.

آزادی	درجه تغییرات	میانگین مریعات					
		GR	CAT	APX	کاروتونئید	کلروفیل b	کلروفیل a
بلوک		۰/۷۶۴ ^{n.s}	۰/۰۵*	۱/۶۷*	۰/۰۳۵ ^{n.s}	۰/۱۱۶ ^{n.s}	۰/۰۳۰ ^{n.s}
ژنوتیپ		۳۷/۸۱**	۳/۴۹**	۳/۵۵**	۰/۳۵۷**	۰/۰۷۳۵ ^{n.s}	۰/۰۰۴۱ ^{n.s}
اهلی		۳۶/۶۷**	۲/۰۵۷**	۲/۶۲**	۰/۳۸۷**	۰/۱۶۳۰ ^{n.s}	۰/۰۰۴۲۱ ^{n.s}
وحشی		۶۱/۶۵**	۵/۰۵۴**	۵/۳۳**	۰/۴۱۱**	۰/۰۰۴۹ ^{n.s}	۰/۰۰۴۲۲ ^{n.s}
گونه		۳/۱۰ ^{n.s}	۰/۰۷۸ ^{n.s}	۰/۰۳۹ ^{n.s}	۰/۱۰۲ ^{n.s}	۰/۰۰۹۶ ^{n.s}	۰/۰۰۳۶ ^{n.s}
کادمیوم		۱۹۵/۷**	۷/۰۵۳**	۷/۰۵۷**	۴/۱۶**	۱/۰۷۳۰**	۰/۱۳۳**
ژنوتیپ×کادمیوم		۶/۷۶**	۰/۳۵۹**	۰/۳۸۰ ^{n.s}	۰/۰۱۹ ^{n.s}	۰/۱۳۱۰ ^{n.s}	۰/۰۰۱۶ ^{n.s}
اهلی×کادمیوم		۸/۲۱**	۰/۳۰۵**	۰/۳۱۱ ^{n.s}	۰/۰۲۰ ^{n.s}	۰/۲۴۷۰ ^{n.s}	۰/۰۰۲۰ ^{n.s}
وحشی×کادمیوم		۶/۸۳**	۰/۴۹۸**	۰/۵۵ ^{n.s}	۰/۰۲۰ ^{n.s}	۰/۰۰۱۸ ^{n.s}	۰/۰۰۱۷ ^{n.s}
گونه×کادمیوم		۲/۲۴ ^{n.s}	۰/۱۰۲ ^{n.s}	۰/۰۵۵ ^{n.s}	۰/۰۱۶۳ ^{n.s}	۰/۱۷۴ ^{n.s}	۰/۰۰۰۲۶ ^{n.s}
خطا		۱/۷۸	۰/۰۹۷	۰/۲۷۲	۰/۰۸۱	۰/۰۹۲	۰/۰۰۰۳۹

* و ** به ترتیب معنی دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و ^{n.s} غیرمعنی دار.

کادمیوم می تواند سبب احیای ناقص پروتوكلروفیل ردوکتاز شده و با مهار آنزیم سیگما- آمینو لوونیک اسید دهیدروژنانز باعث کاهش مقدار کلروفیل شود (Liamas *et al.*, 2000). کاهش محتوای کلروفیل a, b و (Brassica juncea Carthamus tinctorious، (Mohamed *et al.*, 2012) (Ci *et al.*, 2009) Triticum aestivum، (shi *et al.*, 2010) Monni *et al.*, 2001) Empetrum nigrum و گزارش شدند. تأثیر کادمیوم، ژنوتیپ، ژنوتیپ اهلی و ژنوتیپ وحشی بر محتوای کاروتونئیدها در سطح احتمال ۱٪ معنی دار شد، ولی اثر گونه و اثر متقابل ژنوتیپ در کادمیوم، ژنوتیپ اهلی در کادمیوم، ژنوتیپ وحشی در کادمیوم و گونه در کادمیوم بر محتوای کاروتونئید معنی دار نشد (جدول ۴). ژنوتیپ ها به لحاظ میزان تولید کاروتونئیدها در دو گروه قرار گرفتند؛ گروه اول شامل AC-Sterling ارک ۲۸۱۱ و اصفهان که جزء ژنوتیپ های مقاوم بوده و بنابراین محتوای کاروتونئید در آنها آسیب کمتری از

گرم در کیلوگرم محتوای کلروفیل a و b نسبت به شاهد به ترتیب ۱۲/۱ و ۱۵/۲ درصد کاهش معنی داری یافت. همچنین محتوای کلروفیل b در سطح ۱ میلی گرم در کیلوگرم نسبت به شاهد ۴/۴ درصد افزایش غیر معنی دار داشت (جدول ۴). افزایش و یا عدم تغییر کلروفیل در تنفس ملایم می تواند به دلیل افزایش در وزن مخصوص برگ باشد. وقوع تنفس، میزان سطح برگ را کاهش می دهد که ناشی از کاهش اندازه سلول است، بنابراین طی تنفس ملایم به دلیل وجود سلول های بیشتر در واحد وزن برگ، محتوای کلروفیل می تواند افزایش یابد و یا تغییر نکند مشاهدات انجام شده توسط (Dlxoush و همکاران ۱۳۸۵). مشاهدات انجام شده (Shi و همکاران ۲۰۱۰) نیز به عدم تغییر محتوای رنگدانه های کلروفیلی در سطوح پایین تر کادمیوم اعمال شده بر گیاه گلنگ اشاره داشت. ایشان بیان کردند که وجود فرایندهای محافظتی مانند آنتی اکسیدانت ها و یا باند شدن کادمیوم با پپتیدها می تواند سیستم فتوستراتزی گیاه را تحت حفاظت قرار دهد.

حساس، به نظر می‌رسد APX می‌تواند ژنوتیپ‌های مقاوم را در مقابل پراکسید هیدروژن حاصل از تنش کادمیوم محافظت کند. روند تغییرات مشابهی در میزان فعالیت آنزیم‌های CAT و APX به ازای افزایش سطح کادمیوم مشاهده شد، به طوری که بیشترین فعالیت هر دو آنزیم در سطح تیمار ۵ میلی‌گرم در کیلوگرم مشاهده شد و با افزایش میزان آلودگی به ۱۰ میلی‌گرم در کیلوگرم فعالیت هر دو آنزیم به طور معنی‌داری کمتر از سطح آلودگی قبلی بود (جدول ۵).

یکی از نتایج اثرات سمی کادمیوم، تنش اکسیداتیو می‌باشد. این تنش از طریق افزایش سطح ROS حاصل می‌شود (Okamoto *et al.*, 2001). روند تغییرات آنزیم‌های آنتی اکسیدانتی به واسطه تنش فلزات سنگین بر روی گیاهان مختلف، بسیار متنوع است (Shi *et al.*, 2010; Tiryakioglu *et al.*, 2006) تولید ROS تحت شرایط تنش فلزات سنگین بستگی به شدت تنش، مدت تنش، جنس، گونه، ژنوتیپ گیاهی و همچنین مرحله نموی گیاه دارد (Tiryakioglu *et al.*, 2006). همچنین Shi و همکاران (۲۰۱۰) نشان دادند که میزان فعالیت آنزیم APX با افزایش آلودگی به کادمیوم از صفر به ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک افزایش یافت، در حال یکه با افزایش کادمیوم از ۵۰ به ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک، فعالیت این آنزیم روند کاهشی را دنبال کرد. این نتیجه با یافته‌های حاصل از مطالعه حاضر بر روی دو آنزیم CAT و APX همانگ است. افزایش فعالیت آنزیم در تنش آلودگی با شدت کمتر نسبت به تنش شدید تر نشان دهنده وجود مکانیزم‌های جمع آوری کننده مؤثر برای از بین بردن ROS در سطوح تنش آلودگی پایین‌تر و کم شدن فعالیت این آنزیم در سطوح بالاتر آلودگی می‌تواند به دلیل افزایش سطح H_2O_2 تولید شده به واسطه حضور کادمیوم باشد (Luna *et al.*, 1994). برخی دیگر از محققین معتقدند که کاهش و یا عدم تغییر در فعالیت آنتی اکسیدانت‌های آنزیمی طی تنش شدید به دلیل وارد آمدن

حضور کادمیوم دیده است و گروه دوم شامل بقیه ژنوتیپ‌ها که به لحاظ محتوای کاروتونوئیدها تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشتند. با اینحال Shi و همکاران (۲۰۱۰) نشان دادند که بین دو ژنوتیپ حساس و مقاوم به کادمیوم در گلرنگ به لحاظ تولید کاروتونوئید تفاوت معنی‌دار وجود ندارد. در مطالعه حاضر محتوای کاروتونوئیدها در تیمار ۱ میلی‌گرم در کیلوگرم تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد نداشت، در حال یکه با افزایش شدت آلودگی به ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در کیلوگرم میزان کاروتونوئیدها نسبت به تیمار شاهد کاهش معنی‌داری یافت (جدول ۴).

کاروتونوئیدها از جمله ترکیبات آنتی اکسیدانتی غیر آنزیمی هستند که می‌توانند در کاهش غلظت یون سوپراکسید، نقش داشته و تشکیل رادیکال هیدروکسیل را نیز کاهش دهند (Candan and Tarhan, 2003). با این حال نتایج حاصل از مطالعه حاضر به کاهش محتوای کاروتونوئیدها با افزایش میزان کادمیوم اشاره داشت. همچنین Tran و Raymun (۱۹۹۹) نشان دادند که کادمیوم می‌تواند در چرخه، ویولاگرانتوفیل-زازانتین که در سنتز کاروتونوئیدها نقش دارد، اختلال ایجاد نموده و سبب کاهش تولید کاروتون شود. در مطالعات دیگر بر روی گلرنگ (Shi *et al.*, 2010)، کلزا (*Anabaena doliolum*) (۱۳۸۲) و (Thapar *et al.*, 2008) کاهش محتوای کاروتونوئیدها به ازای افزایش کادمیوم تایید شده است.

اثر ژنوتیپ، ژنوتیپ اهلی، ژنوتیپ وحشی و کادمیوم بر میزان فعالیت CAT و APX در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار شد، در حال یکه گونه بر فعالیت هیچ کدام از این دو آنزیم اثر معنی‌دار نداشت (جدول ۴). بیشترین میزان فعالیت آنزیم APX با میانگین ۲/۹۸ و آنزیم CAT با میانگین ۵/۹۶ واحد بر گرم وزن تر برگ مربوط به ژنوتیپ اصفهان و کمترین میزان فعالیت APX با میانگین ۱/۳۶ و CAT با میانگین ۴/۳۶ واحد بر گرم وزن تر برگ مربوط به ژنوتیپ اراک بود (جدول ۵). به طور کلی با توجه به فعالیت بیشتر این دو آنزیم در ژنوتیپ‌های مقاوم نسبت به

جدول ۵- مقایسه میانگین میزان فعالیت آنژیم‌های CAT، APX و GR (واحد بر گرم وزن تر برگ) در هشت ژنوتیپ گلرنگ و چهار سطح کادمیوم.

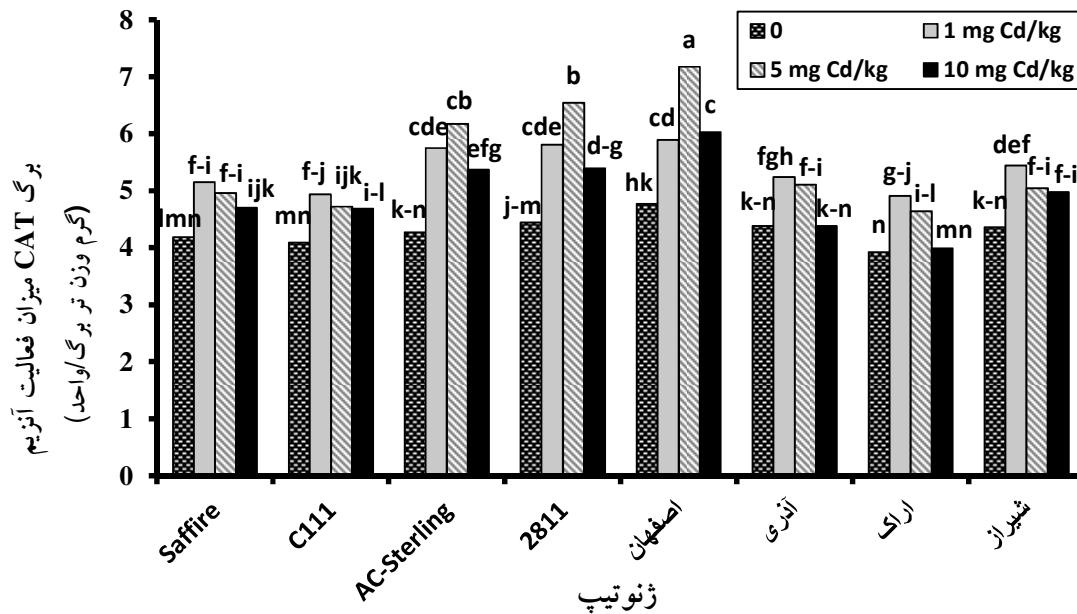
کادمیوم (میلی گرم در کیلو گرم)	عامل آزمایشی	CAT	APX	GR
۰	کادمیوم	۴/۳۰ ^d	۱/۲۹ ^c	۵/۲۰۰ ^d
۱	ژنوتیپ	۵/۳۵ ^b	۲/۳۶ ^a	۶/۳۷ ^c
۵	Saffire	۵/۵۸ ^a	۲/۵۶ ^a	۸/۲۷ ^a
۱۰	C111	۴/۹۴ ^c	۱/۹۵ ^b	۱۱/۷۵ ^a
۲۸۱۱	Ac-Sterling	۵/۵۴ ^b	۲/۵۳ ^b	۹/۴۶ ^b
اصفهان	اراک	۵/۹۶ ^a	۲/۹۸ ^a	۶/۰۵ ^c
آذری	آراک	۴/۷۷ ^{cd}	۱/۸۱ ^c	۷/۵۱ ^c
شیراز	شیراز	۴/۹۵ ^c	۱/۹۴ ^c	۹/۶۰ ^{ab}

در هر ستون و برای هر عامل آزمایشی، میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند، بر اساس آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار در سطح ۵٪ اختلاف معنی‌داری ندارند.

۱۹ تا ۲۴ درصد داشتند. با افزایش میزان آلودگی از صفر به سطح ۵ میلی گرم در کیلو گرم میزان فعالیت آنژیم CAT در همه ژنوتیپ‌ها همچنان روند افزایشی داشت، با این حال میزان این افزایش به طور قابل توجهی بین ژنوتیپ‌ها متفاوت بود. بیشترین میزان افزایش مربوط به ژنوتیپ‌های اصفهان، اراک ۲۸۱۱ و AC-Sterling به ترتیب برابر ۵۰/۵۲ ۴۷/۳ و ۴۴/۶ درصد بود، درحالیکه افزایش مربوط به بقیه ژنوتیپ‌ها بین ۱۵ تا ۱۸ درصد متغیر بود. روند افزایش فعالیت آنژیم CAT با افزایش میزان آلودگی از صفر به ۱۰ میلی گرم در کیلو گرم بسیار کند شد، به طوری که بیشترین افزایش برابر ۲۶/۳۴، ۲۵/۷۶ و ۲۱/۴۷ درصد به ترتیب مربوط به ژنوتیپ‌های اصفهان، AC-Sterling و اراک ۲۸۱۱ و کمترین افزایش برابر ۰/۱۳۶ و ۱/۷۸ درصد به ترتیب

خدمات جدی به سلول تحت تنش بوده است (Shi *et al.*, 2010; Tiryakioglu *et al.*, 2006).

اثر متقابل ژنوتیپ در کادمیوم، ژنوتیپ اهلی در کادمیوم و ژنوتیپ وحشی در کادمیوم به لحاظ فعالیت آنژیم CAT در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار بود، در حال یکه هیچ یک از اثرات متقابل فوق الذکر، بر میزان فعالیت آنژیم APX معنی‌دار نبود (جدول ۴). با افزایش شدت آلودگی از سطح شاهد به ۱ میلی گرم در کیلو گرم، میزان فعالیت آنژیم CAT در همه ژنوتیپ‌ها به طور معنی‌داری افزایش یافت (شکل ۳). بیشترین افزایش در فعالیت این آنژیم مربوط به ژنوتیپ‌های AC-Sterling و اراک ۲۸۱۱ به ترتیب با ۳۴/۶ و ۳۰/۷ درصد بود، در حال یکه بقیه ژنوتیپ‌ها روند افزایشی کم و بیش نزدیک به یکدیگر و در محدوده‌ای بین

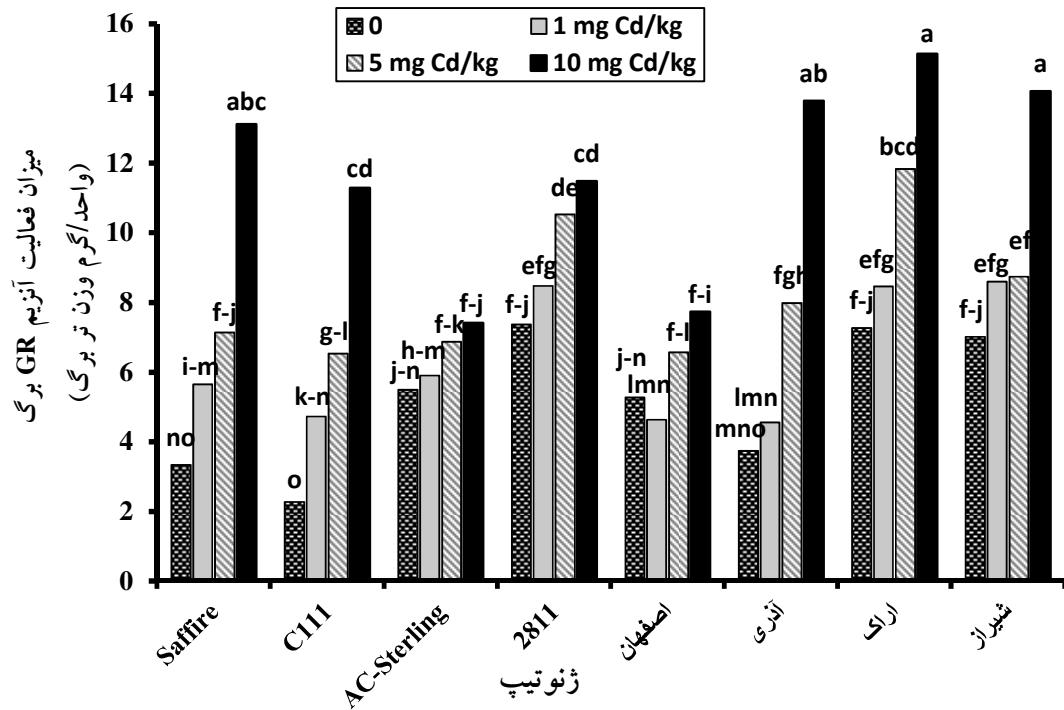


شکل ۳- مقایسه میانگین اثر متقابل هشت ژنوتیپ در چهار سطح کادمیوم بر فعالیت CAT برق (واحد/گرم وزن تر برگ). میانگین هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند، بر اساس آزمون حداقل تفاوت معنی دار در سطح ۵٪ اختلاف معنی داری ندارند.

اثر ژنوتیپ، ژنوتیپ اهلی، ژنوتیپ وحشی، کادمیوم و اثر متقابل ژنوتیپ در کادمیوم، ژنوتیپ اهلی در کادمیوم و ژنوتیپ وحشی در کادمیوم بر میزان فعالیت آنزیم GR در سطح احتمال ۱٪ معنی دار بود، ولی اثر گونه و اثر متقابل گونه در کادمیوم بر فعالیت آنزیم GR معنی دار نشد (جدول ۴). با افزایش شدت آلودگی میزان فعالیت آنزیم GR در همه ژنوتیپ‌ها افزایش یافت. ژنوتیپ‌های C111 و Saffire، بیشترین افزایش در میزان فعالیت آنزیم GR را از سطح شاهد به کلیه سطوح آلودگی نشان دادند. در حالی که کمترین افزایش در بین ژنوتیپ‌ها مربوط به ژنوتیپ AC-sterling بود (شکل ۴).

به طور کلی نتایج این قسمت از مطالعه نشان داد که میزان افزایش در فعالیت آنزیم GR در ژنوتیپ‌های حساس و نیمه حساس به طور قابل توجهی بیشتر از ژنوتیپ‌های مقاوم است. Shao و همکاران (۲۰۰۵) پیشنهاد کردند که افزایش بیشتر در فعالیت آنتی اکسیدانت‌ها می‌تواند ژنوتیپ‌های گندم را در مقابل ROS‌ها محافظت کند. در حالی که در مطالعه حاضر، توانایی تولید بیشتر

مریبوط به ژنوتیپ‌های آذری و اراک بود. درصد این تغییرات در بقیه ژنوتیپ‌ها در محدوده‌ای بین ۱۲ تا ۱۴ درصد متغیر بود. به نظر می‌رسد افزایش فعالیت آنزیم CAT در ژنوتیپ‌های AC-Sterling، اراک ۲۸۱۱ و اصفهان با افزایش آلودگی نسبت به شاهد که با کاهش کمتر در شاخص مقاومت به کادمیوم و میزان پراکسیداسیون لبیید پایین تر همراه بود، نشان دهنده توانایی بیشتر این ژنوتیپ‌ها در پاکسازی و مقابله با گونه‌های فعال اکسیژن باشد، در حال یکه در ژنوتیپ‌های حساس (Saffire و آذری) فعالیت CAT بخصوص در سطوح ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در کیلوگرم نقش چندان موثری در سیستم دفاعی گیاه نداشت. مشاهدات انجام شده توسط Tobita و Dionisio-Sese (۱۹۹۸) نیز نشان داد که ارقامی از برنج که به عنوان ارقام نیمه حساس به شوری معرفی شده بودند از نظر تولید آنتی اکسیدانت‌های آنزیمی در هنگام تنش شوری رفتاری شبیه به ارقام حساس داشتند. به نظر می‌رسد مقاومت نسبی در چنین ارقامی به دلیل وجود سیستم‌های دفاعی دیگری باشد.



شکل ۴- مقایسه میانگین اثر مقابل هشت ژنوتیپ در چهار سطح کادمیوم بر فعالیت GR برگ (واحد/گرم وزن تر برگ). میانگین هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند، بر اساس آزمون حداقل تفاوت معنی دار در سطح ۵٪ اختلاف معنی داری ندارند.

حساس به کادمیوم قرار می گیرند. به نظر می رسد آلودگی در سطح ۱ میلی گرم کادمیوم بر کیلوگرم خاک، بر ژنوتیپ های مورد مطالعه تأثیر منفی نداشته باشد. میزان فعالیت آنزیم های APX و CAT در ژنوتیپ های مقاوم بیش از ژنوتیپ های حساس بود. بنابراین به نظر می رسد آنزیم های مذکور می توانند در مقابل ROS های حاصل از تنش آلودگی به کادمیوم، ژنوتیپ های مقاوم را بیش از ژنوتیپ های حساس محافظت کرده و به عنوان یکی از مکانیسم های دفاعی در مقابل تنش اکسیداتیو در گیاه گلرنگ نقش داشته باشند.

تشکر و قدردانی:

هزینه اجرای این تحقیق توسط دانشگاه صنعتی اصفهان تأمین شده است.

آنٹی اکسیدانت ها در ژنوتیپ های حساس و نیمه حساس گلرنگ به کادمیوم مشاهده شد و این نشان می دهد که افزایش در فعالیت آنتی اکسیدانت ها ممکن است بیانگر آسیب پذیری بیشتر گیاه نسبت به تنفس Mittal and Dubey (۱۹۹۱) موافق بود، آنها نشان دادند که پراکسیداسیون بالای لیپیدها و توانایی تولید آنتی اکسیدانت، هر دو قسمتی از آسیبی است که ژنوتیپ های برنج در تنش شوری دریافت می کنند.

نتیجه گیری:

نتایج این بررسی به طور کلی نشان داد که ژنوتیپ های ۲۸۱۱، اصفهان و اراک، AC-Sterling، C111 و شیراز در گروه ژنوتیپ های حساس و آذری در گروه ژنوتیپ های نیمه

- Guo, T. R., Zhang, G. P. and Zhang, Y. H. (2007) Physiological changes in barley plants under combined toxicity of aluminum, copper and cadmium.a Colloids and Surfaces. *Biointerfaces* 57: 182–188
- Hall, J. L. (2002) Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany* 53: 1-11.
- Heath, R.L. and Packer, L. (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 125: 189–198.
- Janet, L. D.; Okpodu, C. M. Carole, I. Cramer, E. Grabau, A. and Alscher, R. G. (1997) Responses of antioxidants to paraquat in Pea leaves. *Plant Physiology* 13:249-257
- Landberg, T. and Greger, M. (2002) Differences in oxidative stress in heavy metal resistant and sensitive clones of *Salix viminalis*. *Journal of Plant Physiology* 159: 69–75.
- Liamas, A., Ullrich, C. I. and Sanz, A. (2000) Cadmium effects on transmembrane electrical potential difference, respiration and membrane permeability of rice (*Oryza sativa*) roots. *Plant and Soil* 219: 21-28.
- Lichtenthaler, H. K. (1994) Chlorophylls and carotenoids pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology* 148: 350-382.
- Lobban, C. S., Chapman, D. J. and Kremer, B. P. (1988) *Experimental Physiology*. Cambridge University Press. 295p.
- Lu, Q., Lu, C., Zhang, J. and Kuang, T. (2002) Photosynthesis and chlorophyll a fluorescence during flagleaf senescence of field- grown wheat plants. *Journal of Plant Physiology* 159: 1173-1178.
- Luna, C. M., Gonzalez, C. A. and Trippi, V. S. (1994) Oxidative damage caused by an excess of Cu in oat leaves. *Plant and Cell Physiology* 35: 11–15.
- Macfie, S. M and Welbourn, P. M. (2000) The cell wall as a barrier to uptake of metal ions in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae). *Environmental Contamination and Toxicology* 39: 413–419.
- Mallick, N. and Mohn, F. H. (2003) Use of chlorophyll fluorescence in metal-stress research: a case study with the green microalga *Scenedesmus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 55: 64–69.
- Maxwell, K and Johnson, G. N. (2000) Chlorophyll fluorescence a practical guide. *Journal of Experimental Botany* 51: 59-668.
- Mittal, R and Dubey, R. S (1991) Behaviour of peroxidases in rice changes in enzyme activity and isoforms in relation to salt tolerance. *Plant Physiology and Biochemistry* 29:31-40.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M. and Van Beruusegem, F. (2004) Reactive oxygen منابع: خواجه پور، م. ر. (۱۳۸۳) تولید نباتات صنعتی، انتشارات جهاد دانشگاهی، دانشگاه صنعتی اصفهان. دلخوش، ب.، شیرانی راد. ا. ح.، نورمحمدی، ق. و درویش، ف. (۱۳۸۵) تاثیر تنفس خشکی بر عملکرد و مقدار کلروفیل ارقام کلزا. *مجله علمی پژوهشی علوم کشاورزی* ۱۲: ۳۵۹-۳۶۷
- زینلی، ا. (۱۳۷۸) گلرنگ (شناخت، تولید و مصرف)، انتشارات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان.
- علومی، ح. و منوچهری کلانتری، خ. (۱۳۸۲) مطالعه اثر کادمیوم کلراید بر پارامترهای رشد، محتوای کلروفیل، کاروتینوئیدها و محتوای قند و پروتئین در گیاهک کلزا (*Brasica napus*). *مجله پژوهش و سازندگی در زراعت و باغبانی* ۵۹: ۷۴-۸۰
- ناصری، ف. (۱۳۷۰) *دانه‌های روغنی، انتشارات آستان قدس رضوی، مشهد.*
- هایکینز، وج. (۱۳۸۶). مقدمه‌ای بر فیزیولوژی گیاهی (جلد دوم). ترجمه احمدی، ع.، احسانزاده، پ. و جباری، ف. انتشارات دانشگاه تهران.
- Aebi, H. (1984) Catalase in vitro. *Methods in Enzymology* 105:121-126.
- Amacher, M. C. (1996) Nickel, cadmium, and lead. In: *Methods of Soil Analysis* (ed. Sparks, D.L) pp.739-768. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin.
- Candan, T. and Tarhan, L. (2003) Changes in chlorophyll-carotenoid contents, antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation level in Zn-stressed *Mentha pulegium*. *Turkish Journal of Chemistry* 27: 21-30.
- Ci, D., Jiang, D. Dai, T. Jing, Q. and Cao, W. (2009) Affects of cadmium on plant growth and physiological traits in contrast wheat recombinant inbred lines differing in cadmium tolerance. *Chemosphere* 77: 1620–1625.
- Di Toppi, L. S. and Gabbielli, R. (1999) Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany* 41:105–130.
- Dionisio-Sese, M. L. and Tobita, S. (1998) Antioxidant responses of rice seedlings to salinity stress. *Plant Science* 135: 1–9.

- three safflower species. *Journal of American Chemical Society* 85: 717–721.
- Schickler, H., Caspi, H. (1999) Response of the genus *Alyssum*. *Plant Physiology* 105: 39–45.
- Shao, B., Liang, Z. S., Shao, M. A., Sun, Q. and Colloids Surf, B. (2005) Dynamic changes of anti-oxidative enzymes of 10 wheat genotypes at soil water deficits. *Biointerfaces* 42: 187–195.
- Shi, G., Liu, C., Cai, Q., Liu, Q. and Hou, C. (2010) Cadmium accumulation and tolerance of two safflower cultivars in relation to photosynthesis and antioxidative enzymes. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 85: 256–263.
- Thapar, R., Srivastava, A. K., Bhargava, P., Mishra, Y. and Rai, L. C. (2008) Impact of different abiotic stresses on growth, photosynthetic electron transport chain, and nutrient uptake and enzyme activities of Cu-acclimated *Anabaena doliolum*. *Journal of Plant Physiology* 165: 306–316.
- Tiryakioglu, M., Eker, S., Ozkutlu, F., Husted, S. and Cakmak, I. (2006) Antioxidant defense system and cadmium uptake in barley genotypes differing in cadmium tolerance. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 20: 181–189.
- Tran, T. L. H. and Raymundo, L. C. (1999) Biosynthesis of carotenoids in bitter melon at high temperature. *Phytochemistry* 52: 275–80.
- Van Assche, F. and Clijsters, H. (1990) Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant Cell and Environmental* 13: 195–206.
- Vassilev, A., Tsonev, T. and Yordanov, I. (1998) Physiological response of barley plants (*Hordeum vulgare*) to cadmium contamination in soil during ontogenesis. *Environmental Pollution* 103: 287–293.
- gene network of plant. *Trends in Plant Science* 9: 490–498.
- Mohamed, A. A., Castagna, A., Ranieri, A. and Santita di Toppi, L. (2012) Cadmium tolerance in *Brassica juncea* roots and shoots is affected by antioxidant status and phytochelatin biosynthesis. *Plant Physiology and Biochemistry* 57: 15–22.
- Monni, S., Uhlig, C., Hansen, E. and Magel, E. (2001) Ecophysiological responses of *Empetrum nigrum* to heavy metal pollution. *Environmental Pollution* 112: 121–129.
- Pandy, R. K., Herrera, W. A. T., Villegas, A. N. and Pendleton, J. W. (1984) Drought responses of grain legumes under irrigation gradient. *Agronomy Journal* 76: 557–560.
- Okamoto, O. K., Pinto, E., Latorie, L.R., Becharie E. J. H. and Colepicola, P. (2001) Antioxidant modulation in response to metal-induced oxidative stress in algal chloroplast. *Archive of Environmental Contamination and Toxicology* 40: 18–24.
- Papazoglou, E. G., Serelis, K. G. and Boiranis, D. L. (2007) Impact of high cadmium and nickel soil concentration on selected physiological parameters of *Arundo donax* L. *European Journal of Soil Biology* 43: 207–215.
- Qadir, S., Qureshi, M. I., Javed, S. and Abdi, M. Z. (2004) Genotypic variation in phytoremediation potential of *Brassica Juncea* cultivars exposed to Cd stress. *Plant Science* 167: 1171–1181.
- Rau, S., Miersch, J., Neumann, D., Weber, E. and Krauss, G. J. (2007) Biochemical responses of the aquatic moss *Fontinalis antipyretica* to Cd, Cu, Pb and Zn determined by chlorophyll fluorescence and protein levels. *Environmental and Experimental Botany* 59: 299–306.
- Sabzalian, M.R., Saeidi, G. Mirlohi, A. 2008. Oil content and fatty acid composition in seeds of

Response of cadmium-induced oxidative stress contamination and its relation to some physiological characteristics of safflower genotypes

Nasibeh Pourghasemian and Parviz Ehsanzadeh*

Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture Isfahan University of Technology, Isfahan 84156-83111, Iran.

(Received: 16 April 2013; Accepted: 10 July 2013)

Abstract:

Cadmium (Cd) is easily absorbed by root system in many plant species and due to its solubility in water and toxicity is considered as a major pollutant. A factorial pot experiment was conducted on two cultivated and wild safflower species, in which four cultivated genotypes (Arak-2811, Saffire, C111, and AC-Sterling) and four wild genotypes (Arak, Shiraz, Isfahan and Azari) were treated by four levels of Cd (0, 1, 5, and 10 mg CdNo₃/kg soil). Based on Cd Tolerance Index, chlorophyll (Chl) concentration and lipid peroxidation Ac-Sterling, Isfahan, and Arak-2811 were ranked tolerant and Arak, C111 and Shiraz ranked sensitive to the Cd stress. Wild and cultivated safflowers did not appear to differ in terms of the latter attributes. The greatest activities of ascorbate peroxidase (APX) and catalase (CAT) were observed to be at the 5 mg kg⁻¹ level of Cd. The tolerant genotypes indicated a greater increase in their APX and CAT activity, compared to the sensitive genotypes. It was concluded that the enzymatic antioxidant defence system in safflower played a major role in its response to Cd and APX and CAT antioxidants played a more crucial role in this regard, relative to GR.

Key words: Safflower, Cadmium, APX, CAT, GR, Lipid Peroxidation

*Corresponding Author: ehsanzadehp@gmail.com