تاثیر عناصر سنگین بر میزان قند محلول، پروتئین کل و فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی اکسیدان در گندم

سیده یلدا رئیسی ساداتی[۱]، سدابه جهانبخش گده کهریز[۲*]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی در کشاورزی دانشکده کشاورزی دانشگاه محقق اردبیلی

۲- دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه محقق اردبیلی

نویسنده مسوول*: jahanbakhsh@uma.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۳/۶/۷ **تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۱/۱۹**

چکیده

امروزه آلودگی ناشی از فلزات سنگین یک مسئله مهم در کشاورزی است. فلزات سنگین با تجمع در خاک و جذب بوسیله گیاه به زنجیره غذایی وارد می‌شوند و مسمومیت‌هایی را در گیاهان و افراد تغذیه کننده به‌وجود می‌آورند. کادمیوم و جیوه از جمله دو آلاینده خطرناک و سرطان‌زا به شمار رفته که در اکوسیستم‌های طبیعی میزان آن توسط فعالیت‌های انسانی افزایش یافته که منجر به کاهش تولید پروتئین، غیر-فعال‌سازی برخی از آنزیم‌ها، ایجاد اختلال در انواع واکنش‌ها و اعمال سلولی و باعث توقف رشد و نمو می‌شوند و در کل خطرهای بزرگی برای کشاورزی به شمار می‌روند. بدین منظور آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در گلخانه دانشگاه محقق اردبیلی در سال ۱۳۹۱ انجام گردید. تیمارهای آزمایشی شامل کلرید جیوه (با غلظت ۱۰ و ۲۰ میکرومولار)، کلرید کادمیوم (۰/۵ میلی‌مولار) و اثرات متقابل کادمیوم با جیوه در دو سطح (۱۰میکرومولار جیوه با ۰/۵ میلی‌مولار کادمیوم، ۲۰ میکرومولار جیوه با ۰/۵ میلی‌مولار کادمیوم) همراه با گیاهچه‌های شاهد بود. نتایج نشان داد که در رقم گنبد با تیمار کادمیوم، جیوه و اثر متقابل هر دو فلز سنگین، میزان قند محلول و پروتئین کل افزایش یافته اما از فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت کاسته شد. در رقم تجن میزان پروتئین کل برگ‌ها کاسته شده بر میزان فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، کاتالاز و پلی‌فنل اکسیداز (به جز اثر متقابل هر دو فلز سنگین) افزوده شد. با توجه به این که فعالیت آنزیم‌های آنتی-اکسیدان موجب کاهش آسیب‌های ناشی از تنش‌های مختلف می‌شود بنابراین به نظر می‌رسد که افزایش فعالیت این آنزیم‌ها در رقم تجن می-تواند به افزایش مقاومت به تنش این رقم کمک کند. همچنین احتمالا رقم گنبد از سایر مکانیزم‌ها برای تحمل به تنش استفاده کند.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، قند محلول، فلزات سنگین

مقدمه

فلزات سنگین معمولاً سمی و یا حتی سرطان‌زا هستند. از طریق گیاهان جذب شده و وارد زنجیره‌های غذایی می‌شوند (کلی و همکاران.، ۱۹۸۴). آلودگی محیط زیست با یون‌های فلز سمی، به‌ویژه فلزات سنگین گسترش یافته و به‌عنوان یک نگرانی به‌خاطر تاثیر در مسئله سلامتی انسان و زنجیره منابع غذایی و توزیع آن در منابع آبی، نیازمند توجه بیشتری است (هوستن، ۲۰۰۷). فلزات سنگین بر مولکول‌های آلی مانند پروتئین‌ها، آنزیم‌ها و لیپیدها تاثیر نامطلوب داشته و از جمله تغییرات آن‌ها می‌توان به غیر فعال کردن پروتئین‌ها و آنزیم‌ها، اکسید کردن چربی‌ها و اختلال در متابولیسم قندها اشاره کرد (ساوبیگی و همکاران.، ۲۰۰۰). کادمیوم و جیوه در گروه فلزات سنگین بسیار سمی طبقه‌بندی شده و باعث توقف رشد، کاهش تولید پروتئین و منجر به تنش اکسیداتیو، تشکیل رادیکال‌های آزاد و گونه-های واکنش پذیر اکسیژن نیز می‌شوند (زو و همکاران.، ۲۰۰۷). زمانی‌که رشد در اثر فلزات سمی متوقف شد، مکانیسم‌های مختلفی از جمله: فعالیت بعضی از آنزیم‌های

درگیر در تنظیم کاتابولیسم برای حفظ تولید انرژی سلولی. هر کدام از این آنزیم‌ها عملکردهای فیزیولوژیکی را تحت شرایط غیر تنش دارا می‌باشند ولی فعالیت آن‌ها تحت تنش محیطی، افزایش یافته و از راه‌های مقابله گیاهان با اثرات منفی انواع اکسیژن فعال می‌باشند، استفاده از سیستم انتقال برای وارد کردن اسید آمینه‌ها و منابع کربنی دیگر، تقویت سیستم انتقالی-فلزی برای تنظیم فلز درون سلولی تسهیل سنتز اسیدهای آمینه پیوند فلزی و دیگر منابع کربن برای سازش و تعادل سلولی در نظر گرفته می‌شود(ایسرانکورا و همکاران.، ۲۰۰۹). کادمیوم با تولید فرم‌های مختلفی از انواع اکسیژن فعال واکنش سمی ایجاد کرده و موجب آسیب به پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها و DNA شده و در نهایت منجر به ایجاد تنش اکسیداتیو می‌شود (زانگ و همکاران.، ۲۰۱۰). یون‌های جیوه سبب تنش اکسیداتیو شده که به دنبال آن گونه‌های اکسیژن واکنش‌گر را در گیاهان تولید می‌کنند. این فرآیند سبب آسیب در ساختار لیپیدهای غشایی شده و متابولیسم سلولی را دچار اختلال می‌کند (کارگنلوتی و همکاران.، ۲۰۰۶). سمیت جیوه در اثر افزایش این عنصر به محیط رشد در گیاه باعث کاهش در تولید پروتئین و جوانه-زنی می‌گردد (زو و همکاران.، ۲۰۰۸). با توجه به افزایش روزافزون استفاده از کودهای شیمیایی آلوده به فلزات سنگین به‌نظر می‌رسد مطالعات گسترده در مورد اثرات این عناصر بر صفات فیزیولوژیک گیاهانی مهم و استرتژیک مانند گندم ضروری باشد. در این راستا هدف از این بررسی، مطالعه میزان پروتئین کل، قندهای محلول و فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان می‌باشد. عملکرد نهایی و با ارزش گندم دانه آن است. بنابراین هدف از تولید گندم به‌دست آوردن عملکرد نهایی بالاتر در شرایط مختلف محیطی می-باشد.

مواد و روش‌ها

به‌منظور بررسی اثر جیوه و کادمیوم بر بذر گندم بر روی پایه مادری، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی در آزمایشگاه دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه محقق اردبیلی در سال ۱۳۹۱ انجام شد. محلول-پاشی با کلرید کادمیوم (۰/۵ میلی‌مولار)، کلرید جیوه (با غلظت ۱۰ و ۲۰ میکرومولار) و مخلوط کادمیوم با جیوه در دو سطح (۱۰میکرومولار جیوه با ۰/۵ میلی‌مولار کادمیوم، ۲۰ میکرومولار جیوه با ۰/۵ میلی‌مولار کادمیوم) همراه با گیاه‌چه‌های شاهد در مرحله سه‌برگی انجام گرفت و بعد از مرحله سنبله‌دهی گیاه گندم، نمونه‌برداری از بذور شاهد و تیمار انجام شد.

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 محلول رویی برای سنجش قند محلول استفاده شد (اوموکولو و همکاران.، ۱۹۹۶). 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 (برادفورد، ۱۹۷۶). 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 آنزیم کاتالاز: فعالیت سینتیکی آنزیم کاتالاز سنجیده شد (چنس و مهلی، ۱۹۵۵). بدین منظور ۲/۵ میلی-لیتر 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 (کار و میشرا، ۱۹۷۶). 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 ۴۲۵ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت گردید.

سنجش آنزیم پلی‌فنل اکسیداز: فعالیت آنزیم پلی-فنل‌اکسیداز به روش کار و میشرا بررسی شد (کار و میشرا، ۱۹۷۶). برای این منظور ۱/۵ میلی‌لیتر بافر تریس با ۰/۴ 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 ۴۲۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر قرائت شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها با کمک دو نرم افزار SAS، SPSS و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال ۵٪ و رسم نمودارها نیز با استفاده از نرم‌افزار Excel انجام گرفت.

نتایج و بحث

همانطور که در جدول۱ مشاهده می‌شود اثر متقابل رقم × فلز سنگین در رابطه با مقدار پروتئین، میزان قندهای محلول و فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و پلی‌فنل اکسیداز در ارقام مورد بررسی گندم (گنبد و تجن) در سطح یک درصد معنی‌دار می‌باشد. نوع ارقام مورد مطالعه به جز در صفت میزان کربوهیدرات اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نشان ندادند اما در بقیه صفات اندازه‌گیری شده اختلاف معنی‌داری با یکدیگر داشتند. اثر فلز سنگین (کادمیوم و جیوه) بر روی تمامی صفات بررسی شده معنی‌دار گردید (احتمال یک درصد).

پروتئین کل:

نتایج مقایسات میانگین برای میزان پروتئین کل در رقم گنبد افزایش معنی‌داری را در سطوح کلرید جیوه، کلرید کادمیوم و اثرات متقابل کادمیوم با جیوه نسبت به شاهد نشان داد (شکل۱، a). در رقم تجن به جز اثر متقابل کلرید جیوه ۲۰ میکرومولار با کلرید کادمیوم ۰/۵ میلی‌مولار اختلاف معنی‌داری در میزان پروتئین نسبت به حالت کنترل مشاهده شد اما با افزایش غلظت‌های کلرید جیوه و کلرید کادمیوم کاهش معنی‌داری در میزان پروتئین کل نسبت به شاهد ملاحظه گردید. بیشترین میزان پروتئین را رقم تجن تحت تیمار اثر متقابل اثر متقابل کلرید جیوه ۲۰ میکرومولار با کلرید کادمیوم ۰/۵ میلی‌مولار را دارا بود و کمترین میزان پروتئین بذر را رقم گنبد شاهد داشت.

جدول۱- تجزیه واریانس تاثیر فلزات سنگین بر قند محلول، پروتئین کل و آنزیم‌های آنتی اکسیدان در بذور دو رقم گندم

		میانگین مربعات (MS)				
منبع تغییر	درجه آزادی	کربوهیدرات	پروتئین کل	کاتالاز	پراکسیداز	پلی‌فنل اکسیداز
رقم	۱	۰/۰۳*	۴۱/۵۳ ns	۰/۲۲ **	۱/۲۷ **	۰/۰۰۴ ns
فلز سنگین	۵	۰/۳۰ **	۸۳۵/۴ **	۰/۲۶ **	۰/۲۵ **	۰/۰۸ ns
رقم× فلز سنگین	۵	۰/۲۴ **	۱۵۱۵/۸ **	۰/۵۶ **	۰/۹۰ **	۰/۱۸ **
خطا	۲۴	۰/۰۰۸	۱۷۷/۵۱	۰/۰۰۸	۰/۰۶	۰/۰۳
ضریب تغییرات(cv)	-	۶/۴	۱۱/۳	۸/۶	۸/۱	۱۱/۲

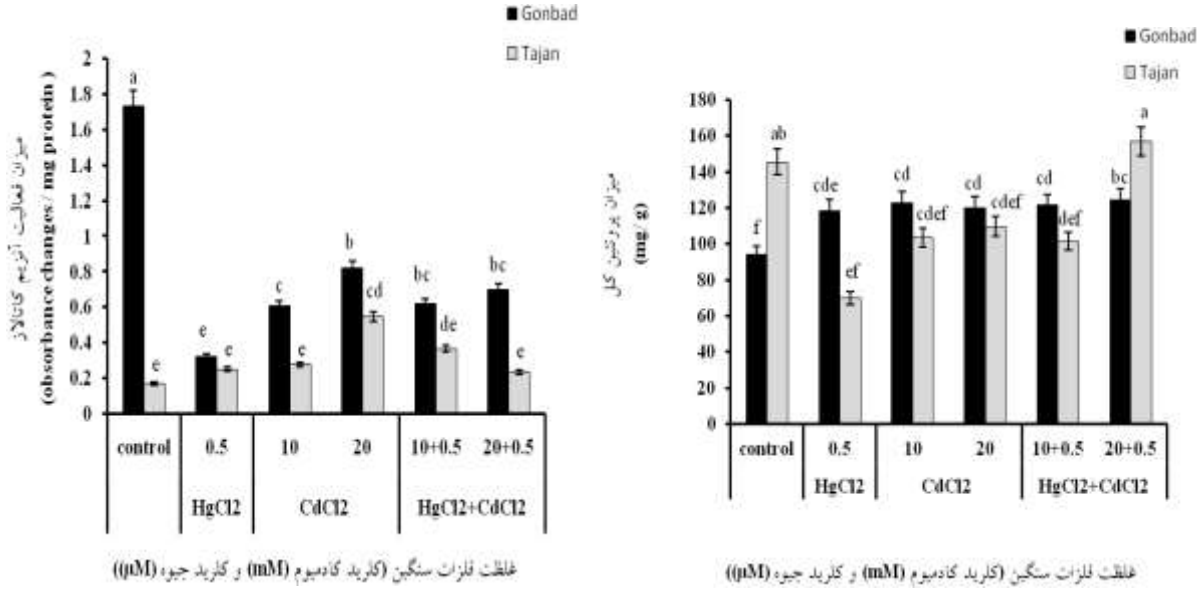
* اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪، ** اختلاف معنی‌دار در سطح ۱٪، ns بدون اختلاف معنی‌دار

گیاه در جهت مقابله با تنش فلزات سنگین شروع به سنتز پروتئین‌های دفاعی می‌کند، در این راستا متابولیت‌ها و آنزیم‌های موجود در ساختار پروتئین‌ها را درگیر می‌سازد. در بذور رقم تجن افزایش بیان این پروتئین‌ها در اثر تیمار اثر متقابل کلرید جیوه ۲۰ میکرومولار با کلرید کادمیوم ۰/۵ میلی‌مولار گندم احتمالاً به‌دلیل افزایش سنتز پروتئین‌ها و پلی‌پپتیدهای درگیر در سیستم دفاعی سلول در برابر یون‌ها (متالوتیونین‌ها و فیتوکلاتین‌ها) و یا سنتز بعضی آنزیم‌ها از جمله آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، می‌باشد(کوبت و گولدسبروگ، ۲۰۰۲). این افزایش می‌تواند بیانگر افزایش آنزیم‌های درگیر در مکانیسم دفاعی گیاه و پلی‌پپتیدهای آنتی‌اکسیدان باشد. که با نتایج به‌دست آمده ما در رقم تجن تحت تیمار کلرید جیوه با کلرید کادمیوم مطابقت داشت. کادمیوم شباهت زیادی با لیگاندهای نیتروژن و پروتئین‌های گوگردی دارد و به‌همین 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 نشت یونی می‌شود (میشرا و همکاران، ۲۰۰۹). کاهش میزان پروتئین‌های ذخیره‌ای به‌علت از بین رفتن ساختارهای پروتئینی و حضور رادیکال‌های آزاد نسبت داده می‌شود که با نتایج ما در رابطه با رقم گنبد شاهد مطابقت داشت.

فعالیت آنزیم کاتالاز:

بر اساس نتایج مقایسات میانگین این پژوهش، در رقم گنبد فعالیت آنزیم کاتالاز در دو غلظت کلرید جیوه و در تیمار با کلرید کادمیوم و همچنین اثر متقابل آن‌ها کاهش معنی‌داری نسبت به شاهد داشت. اما در رقم تجن، فعالیت آنزیم کاتالاز تحت تیمار کلرید جیوه ۱۰ و ۲۰ μM افزایش یافت. همچنین فعالیت آنزیم کاتالاز در تیمار ۰/۵ میلی‌مولار کلرید کادمیوم افزایش داشت (شکل۱، b). بیشترین و کمترین فعالیت این آنزیم را به ترتیب سطح شاهد رقم گنبد و رقم تجن دارا بودند. کادمیوم از طریق آسیب به لیپیدهای غشایی، عملکرد غشای سلول را تغییر می‌دهد و این مسئله می‌تواند فعالیت‌های آنزیمی مرتبط با غشا مانند H^+-ATPase را تحت تاثیر قرار دهد (مک کورتی و همکاران.، ۲۰۰۱). کادمیوم برخلاف فلزاتی مانند مس و آهن که از طریق چرخه احیایی مثل فنتون (Fenton) و یا واکنش‌های هابر-ویز (Haber-weiss) موجب تنش اکسیداتیو می‌شود، از طریق مکانیسم‌های غیر مستقیم مانند تداخل در سیستم‌های دفاعی، تخریب زنجیره انتقال الکترون و القای پراکسیداسیون چربی موجب خسارت به سلول می‌گردد (بناویدس و همکاران.، ۲۰۰۵). در سطح سلولی، کادمیوم با کاهش قابلیت ارتجاع دیواره سلولی سبب کاهش فشار تورگر شده و مانع رشد سلول‌ها می‌شود (آینا و همکاران.،

۲۰۰۷). غلظت‌های بالای فلزات سنگین موجب ایجاد شده و با تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن به سلول‌های گیاهی آسیب وارد می‌کنند (میتلر و همکاران.، ۲۰۰۴). رادیکال‌های آزاد هیدروکسیل آغازگر واکنش‌هایی است که موجب پراکسیداسیون چربی می‌شود (چن و همکاران.، ۲۰۰۷). برای کم کردن و از بین بردن انواع اکسیژن‌های فعال و اجتناب از آسیب‌های اکسیداتیو در گیاهان، فعالیت آنزیم-های آنتی‌اکسیدان نظیر کاتالاز، سوپراکسید دیسمیوتاز و پراکسیداز افزایش می‌یابد (اسمیت و همکاران.، ۲۰۰۸). تنش‌های اکسیداتیو ناشی از یون جیوه، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نظیر سوپراکسید دیسمیوتاز، پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز و کاتالاز را به دنبال دارد که تولید آن‌ها میزان تنش اکسیداتیو را نشان می‌دهد (زو و همکاران.، ۲۰۰۷). این نتایج، با نتایج به‌دست آمده ما در این پژوهش در رابطه با رقم تجن مطابقت داشت. کاتالاز آنزیم مشترکی است که تقریباً در تمام موجودات زنده در حضور اکسیژن یافت می‌شود و پراکسید هیدروژن را به آب و اکسیژن تجزیه می‌کند (چلیکانی و همکاران.، ۲۰۰۴). 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. کاتالاز در سیستم دفاعی و پدیده القای پیری در گیاهان نقش دارد (مورا و همکاران.، ۲۰۰۷). از آنجایی که 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 (مقبونیا و همکاران.، ۲۰۰۷). در تحقیق حاضر سمیت در گیاه و در نتیجه باعث ایجاد تنش‌های اکسیداتیو فعالیت کاتالاز به‌طور معنی‌داری در ارقام تیمار شده با کادمیوم افزایش یافته است که احتمالاً نشان دهنده تخریب پراکسید هیدروژن و پراکسیدهای سمی در تجمع کادمیوم به‌وسیله کاتالاز انجام می‌گیرد و آن هم به نوبه خود می‌تواند پراکسیداسیون چربی‌ها را که به‌واسطه رادیکال‌های آزاد در طی سمیت کادمیوم کاهش دهد. در یکسری مطالعات انجام شده نتایج نشان داد که کادمیوم موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز، افزایش پراکسیداسیون لیپیدها، تجمع پراکسید هیدروژن و مرگ سلولی در ذرت می‌شود (پوراکبر و اشرفی.، ۲۰۱۱). افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز در بذور رقم گنبد و تجن با نتایج حاصل از این تحقیقات مطابقت دارد. کادمیوم سبب کاهش جوانه‌زنی بذر و رشد گیاه‌چه، بازدارندگی فعالیت بعضی آنزیم‌ها، رسوب عناصر ضروری یا متابولیت‌ها و سبب تخریب سلولی می‌گردد (گوش و سینگ، ۲۰۰۵). کاهش در فعالیت کاتالاز نیز به‌عنوان یک پاسخ عمومی در بسیاری از تنش‌های شدید محیطی مانند شوری، خشکی، سرما و تنش فلزات سنگین گزارش شده است که این امر احتمالاً به‌علت بازدارندگی از سنتز آنزیم یا تغییر در تجمع زیر واحدهای این آنزیم است (شاه و همکاران.، ۲۰۰۱). این مسئله می-تواند دلیلی بر کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز تحت تیمار کلرید کادمیوم رقم گنبد باشد. میزان جذب کادمیوم توسط گیاه و غلظت آن در یک گیاه، به شرایط محیطی، فیزیولوژیکی و فاکتورهای بیوشیمیایی بستگی دارد.



شکل۱- (a) میانگین تغییرات میزان پروتئین (b) نمودار میانگین تغییرات فعالیت آنزیم کاتالاز در بذور دو رقم تجن و گنبد گندم تحت تیمار کلرید جیوه، کلرید کادمیوم و اثر متقابل آن‌ها (حروف نامشابه نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ آزمون LSD می‌باشد)

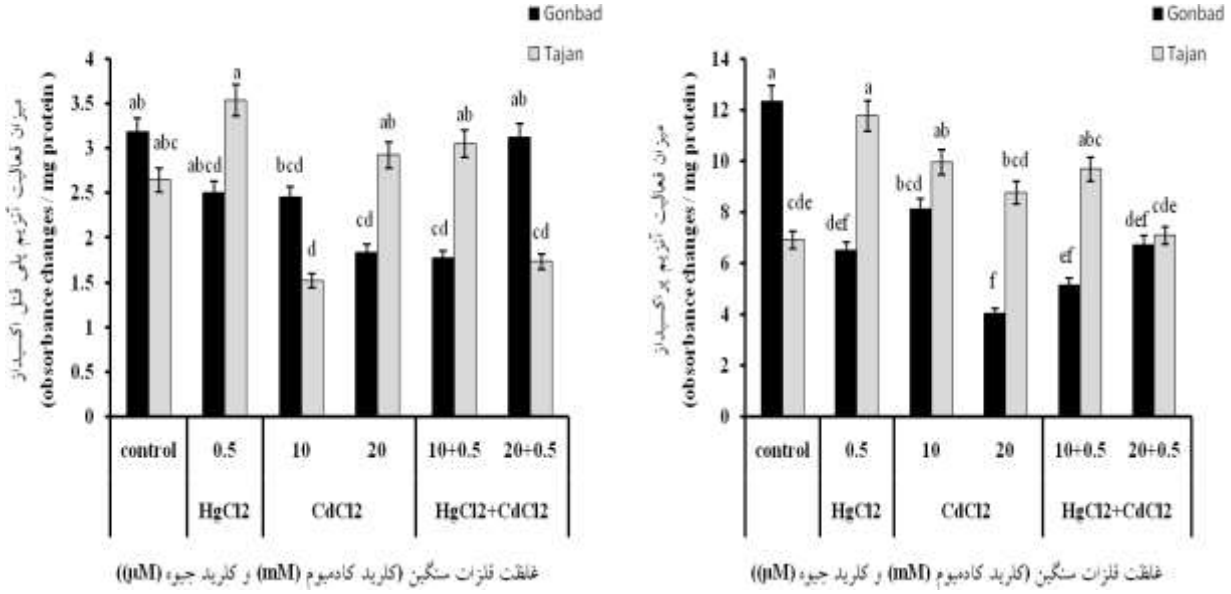
فعالیت آنزیم پراکسیداز:

با توجه به نتایج مقایسه میانگین مشاهده شد که در بذور رقم گنبد فعالیت آنزیم پراکسیداز تحت تیمار کلرید کادمیوم، کلرید جیوه و اثر متقابل آن‌ها نسبت به شاهد کاهش معنی‌داری داشت. اما فعالیت پراکسیداز در رقم تجن در تمامی تیمارها افزایش معنی‌داری نسبت به حالت کنترل نشان داد (شکل۲، a). بیشترین فعالیت این آنزیم را در سطح شاهد رقم گنبد در تیمار کلرید جیوه ۱۰ میکرومولار و رقم تجن در تیمار با کلرید کادمیوم دارا بودند و کمترین فعالیت این آنزیم در سطح کلرید جیوه ۲۰ میکرومولار رقم گنبد مشاهده شد. گیاهان برای مقابله با خسارت ناشی از تنش-های اکسیداتیو و تولید رادیکال‌های آزاد و به‌ویژه پراکسید هیدروژن از سیستم آنتی‌اکسیدانتی پیچیده‌ای استفاده می‌کنند که اجزای ابتدایی آن شامل: کاروتنوئیدها، آسکوربات، گلوتاتیون و توکوفرول‌ها است. آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان شامل: سوپراکسید دیسمیوتاز، کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز، پراکسیداز، گلوتاتیون پراکسیداز و آنزیم‌های دخیل در چرخه گلوتاتیون– آسکوربات نظیر گلوتاتیون ردوکتاز هستند (بابی و جینی، ۲۰۱۱). پراکسیدازها نقش بسیار مهمی در پاسخ به انواع تنش‌ها داشته و مسئول حذف مقادیر اضافی پراکسید هیدروژن می‌باشند. 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 (آلماگرو و همکاران.، ۲۰۰۹). از جمله پروتئین القا شده در طول دفاع گیاه میزبان در برابر تنش، تولید پراکسیداز است. بنابراین محلول پاشی تیمارهای برتر از لحاظ سطوح فعالیت آنزیم پراکسیداز موجب شکسته شدن هیدروژن پراکسید در سلول شده و بدین شکل از تولید گونه‌های فعال اکسیژنی جلوگیری می‌نماید. در نتیجه با افزایش سطوح فعالیت پراکسیداز گیاه کمتر مورد تهاجم گونه‌های فعال اکسیژنی قرار می‌گیرد، زیرا اصولاً آنزیم

پراکسیداز به‌عنوان اصلی‌ترین آنزیم از بین برنده پراکسید هیدروژن شناخته شده است (تیواری و همکاران.، ۲۰۰۵). 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 (زانگ و همکاران.، ۲۰۰۹). با توجه به این که میزان فعالیت پراکسیداز در شرایط بدون تنش در رقم گنبد بیشتر از شرایط تنش بود. به نظر می‌رسد این رقم گندم از پراکسیداز برای تحمل به تنش ناشی از فلزات سنگین بهره‌ای نمی‌برد. در حالی‌که رقم تجن میزان فعالیت پراکسیداز را افزایش داد.

فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز:

نتایج مقایسه میانگین نشان داد که از لحاظ آماری در بذور رفم گنبد به جز تیمار با اثر متقابل کلرید جیوه ۲۰ میکرومولار با کلرید کادمیوم ۰/۵ میلی‌مولار با افزایش غلظت تیمارها کاهش معنی‌داری در میزان فعالیت پلی‌فنل اکسیداز ملاحظه می‌گردد. اما بر عکس در بذور رفم تجن به جز تیمار با اثر متقابل کلرید جیوه ۲۰ میکرومولار با کلرید کادمیوم ۰/۵ میلی‌مولار با بالا رفتن غلظت تیمارها افزایش معنی‌داری در میزان فعالیت این آنزیم مشاهده گردید. بیشترین و کمترین میزان فعالیت پلی‌فنل اکسیداز رقم گنبد به ترتیب مربوط به اثر متقابل کلرید جیوه ۲۰ میکرومولار با کلرید کادمیوم ۰/۵ میلی‌مولار و اثر متقابل کلرید جیوه ۱۰ میکرومولار با کلرید کادمیوم ۰/۵ میلی‌مولار می‌باشد. پلی-فنل اکسیداز که با نام‌های کاتکول اکسیداز، کاتکولاز و تریوزیناز نامیده می‌شود که در حضور اکسیژن دو نوع واکنش از خود نشان می‌دهد که این واکنش‌ها عبارتند از: هیدروکسی کردن ترکیبات مونو فنل و تبدیل آن‌ها به ترکیبات کوئینین (دینگ و همکاران.، ۲۰۰۲). تجمع ترکیباتی از جمله پلی‌فنل اکسیداز به‌عنوان متابولیت‌های ثانویه در پاسخ به تنش، در گیاهان به اثبات رسیده و در بیشتر گیاهان عالی یافت می‌شود. وظیفه اصلی آن کاتالیز نوعی کوئینون از فنل‌ها در مجاورت مولکول اکسیژن و تاثیر آن بر تشکیل ریشه‌های نابجا، سازماندهی و نمو ریشه است (ایلماز و همکارارن.، ۲۰۰۳). نمودار حاصل از فعالیت پلی-فنل اکسیداز نشان می‌دهد که فعالیت این آنزیم همانند پراکسیداز (شکل ۲ a) و برخلاف کاتالاز (شکل ۱ b) در رقم گنبد نسبت به رقم تجن در شرایط تنش کمتر است. با توجه به این مساله به نظر می‌رسد سیستم دفاعی رقم گنبد از کاتالاز برای مهار ROSها بهره برده و به میزان کمتری از سایر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان استفاده می‌کند.

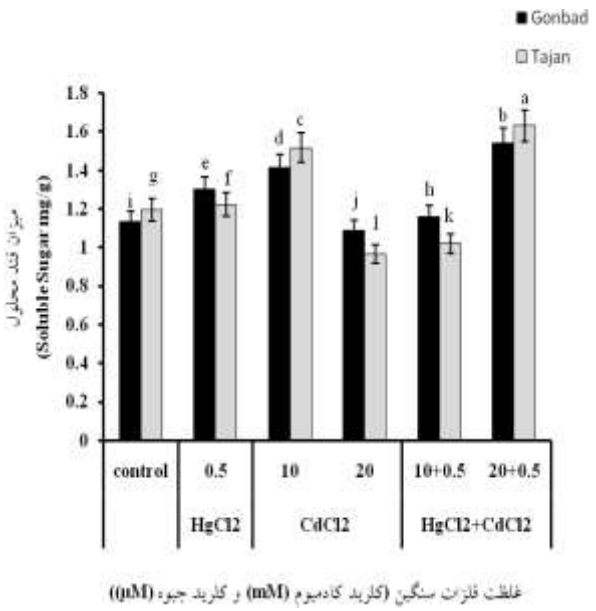


حروف نامشابه نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ آزمون LSD می‌باشد.

شکل۲- (a) مقایسه میانگین تغییرات فعالیت آنزیم پراکسیداز و فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز (b) در بذور دو رقم گنبد و تجن گندم تحت تاثیر کادمیوم و جیوه و اثر متقابل هر دو فلز سنگین

میزان قندهای محلول:

در نتایج مقایسه میانگین مربوط به میزان قندهای محلول مشاهده شد که در بذور رقم گنبد و تجن به جز تیمار جیوه با بالا رفتن غلظت کادمیم و اثر متقابل کادمیوم و جیوه، بر میزان قندهای محلول نسبت به شاهد افزوده شد (شکل۳). در کل بیشترین مقدار قند محلول در غلظت ۲۰ میکرومولار جیوه همراه با ۰/۵ میلی‌مولار و کمترین میزان آن مربوط به تیمار ۱۰ میکرومولار جیوه همراه با ۰/۵ میلی-مولار در رقم تجن بود. افزایش کربوهیدرات به‌عنوان یک پیام متابولیکی عمل می‌کند و موجب افزایش بیان ژن‌های مربوط به دفاع و کاهش فتوسنتز می‌شود. به‌عنوان مثال قند هگزوز در خاموش کردن ژن‌های فتوسنتز نقش دارد (کاکول و همکاران.، ۲۰۰۸). با افزایش قند محلول، گیاه می‌تواند ذخیره کربوهیدراتی خود را برای حفظ متابولیسم پایه سلول در شرایط محیطی تحت تنش در حد مطلوب نگه دارد و از آن‌جا که فلزات سنگین باعث از بین رفتن کلروفیل برگ‌ها شده در نتیجه باعث کاهش میزان کربوهیدرات می‌شود و در داخل سلول موجب فعال شدن ژن‌های مقاومت می‌گردد (بولتن، ۲۰۰۹). به‌علت مصرف شدن قند در جهت سنتز پروتئین‌ها و پلی‌پپتیدهایی از جمله فیتوکلاتین‌ها و گلوتاتیون غلظت قند کاهش می‌یابد. بسیاری از تحقیقات نشان داده است که با ورود کاتیون cd^{+2} به سلول‌های برگ سرعت تنفس کند شده و در نتیجه تغییرات فراساختاری در اندامک‌های سلول به‌وجود می‌آید. به‌علاوه رفتار آنزیم‌های کلیدی چند مسیر متابولیک تغییر می‌کند (وارما و دوبی، ۲۰۰۱).



حروف نامشابه نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ آزمون LSD می‌باشد.

شکل۳- مقایسه میانگین تغییرات میزان قندهای محلول در دو رقم گنبد و تجن بذور گندم تحت تیمار با کلرید کادمیوم، کلرید جیوه و اثر متقابل هر دو فلز سنگین

نتیجه‌گیری کلی:

به طور کلی از نتایج حاصل چنین استنباط می‌شود که تأثیر تنش ناشی از افزایش غلظت کلرید کادمیوم و کلرید جیوه و اثر متقابل این دو فلز سنگین بر فرآیندهای فیزیولوژیک دو رقم 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 رقم گنبد تحت تیمار کلرید جیوه و اثرات متقابل کادمیوم و جیوه، میزان قند محلول و پروتئین کل افزایش یافته اما از فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت کاسته شد. در رقم تجن با اعمال تیمار فلزات سنگین کادمیوم، جیوه و اثرات متقابل کادمیوم–جیوه، از میزان پروتئین کل برگ‌ها کاسته شده بر میزان فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، کاتالاز و پلی‌فنل اکسیداز (به جز اثرات متقابل کادمیوم–جیوه) افزوده شد. 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 پلی-فنل اکسیداز فعالیت کمتری نسبت به شاهد نشان دادند. فعالیت کمتر این آنزیم‌ها نشان از آثار سمیت کادمیوم و تولید رادیکال-های آزاد اکسیژن می‌باشد که آسیب‌های اکسیداتیو و کاهش رشد را دنبال دارد.

منابع

ارزانی، ا. ۱۳۸۷. اصلاح گیاهان زراعی(ترجمه). صص ۳۴۴-۳۱۹.

پور اکبر، ل.، 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 ج ۹، ۳: ۴۸۴-۴۷۳.

Almagro, L., Gomez, L. V., Belchi-Navarro, S., Bru, R., Barcelo, A., 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., 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.

Baby, J., 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.

Benavides, M. P., Gallego, S. M., Tomaro, M. L. 2005. Cadmium toxicity in plants. Brazilian Journal of Plant Physiology 17: 21-34.

Chen, J., Zhu, C., Lin, D., 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.

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

Cobbett, C., Goldsbrough, P. 2002. Phytochelatins and metalothioneins: roles in heavy metal detoxification and home ostasis. Annul Plant Biology 53: 159- 182

Cargnelutti, D., Tabaldi, L. A., Spanevello, R. M., Jucoski, G. O., Battisti, V. 2006. Mercury toxicity induces oxidative stress in growing cucumber seedlings. Chemosphere, 65: 999-1006.

Chelikani, P., Fita, I., Loewen, P. C. 2004. Diversity of structures and properties among catalases. Cellular and Molecular Life Sciences 61: 192-208-208.

Ding, C., Chachin, K., Ueda, Y., Wang C. Y. 2002. Inhibition of loquat enzymatic browning by sulfhydryl compounds. Food Chemistry 76: 213- 218.

Ghosh, M., Singh, S. P. 2005. A comparative study of cadmium phytoextraction by accumulator and weed species. Journal of Environ Pollut 133: 365-371.

Houston, M. C. 2007. The role of mercury and cadmium heavy metals in vascular disease hypertension, coronary heart disease, and myocardial infarction, Alternative therapies in health and medicine 13. 128 - 133.

Hall, J. L. 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany* 53: 1-11.

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

Jung, S. 2004. Variation in antioxidant metabolism of young and mature leaves of Arabidopsis thaliana subjected to drought. Plant Science 166: 459-66.

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

Kocal, N., Sonnewald, U., Sonnewald, S. 2008. Cell wall-bound invertase limits sucrose export and is involved in symptom development and inhibition of photosynthesis during compatible interaction between tomato and Xanthomonas campestris pv vesicatoria. Plant Physiology 148: 1523-36.

Khatamipour, M., Piri, E., Esmaeilian Y., Tavassoli, A. 2011. Toxic effect of cadmium on germination, seedling growth and prolin content of Milk thistle (*Silybum marianum*). Annals of Biological Research 2:527-532.

Kelley, W. D., Martens, D. C., Reneau, R. B., Simpson, T. W. 1984. Agricultural use of sewage sludge. Department of Agriculture virginia polytechnic. Black sburg, Virginia2406-3397.

Lyne, M. A., Kang, Y. J., Sensi, S. L., Perdrizet G. A., Hightower, L. E. 2007. Heavy metal ions in normal physiology, toxic stress, and cytoprotection, Annals of the New York Academy Trends in Plant Science pp. 159-172.

Magbanua, Z. V., Moraes, C. M. D., Brooks, T. D., Williams, W. P., 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.

Mccarthy, I., Romero-Puertas, M. C., Palma, J. M., Sandalio, L. M.,Corpas, F. J.,Gomez,M., Del rio, L. A. 2001. Cadmium induces senescence symptoms in leaf peroxisomes of pea plants, Plant Cell and Environment 24:1065-1073.

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

Mishra, S., Srivastava, S. R., Tripathi, D., Govindarajan, R., Kuriakose, S. V., Prasad, M. N. V. 2006. Phytochelatin synthesis and response of antioxidants during cadmium stress in *Bacopa monnier*i L. Plant Physiology and Biochemistry 44: 25-37.

Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., Breusegem, F. V. 2004. The reactive oxygen gene network of plants. Trends Plant Science 9: 490-498.

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

Omokolo, N. D., Tsala, N. G., 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.

Rajarm, S., Braun, H. 2006. Wheat yield potential. In*:* Raynolds, M. P., Pietragalla, J. and Braun, H. J (Eds), International symposium on wheat yield potential: Challenges to International wheat breeding. CIMMYT, Apartado Postal 6-641, 06600, Mexico D. F., Mexico. 3: 103-107.

Ramon, O., Vazquez, E., Fernandez, M., Felipe, M., Zornoza, P. 2003. Cadmium -stress in white lupine: effects on nodule structure and functioning. Plant Physiology 161: 911-919.

Savabeghi, G. R., Malakooti, M. J. 2000. The effect of zinc and cadmium in concentrations and chemical composition of wheat grain. Journal of soil and water 9: 54-65.

Shah, K., Kumar, R. G., Verma, S., 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.

Siddhu, G., Ali Khan, M. A. 2012. Effects of cadmium on growth and metabolism of Phaseolus mungo. Journal of Environmental Biology 33: 173-179.

Sigfirdsson, K. G. V., Bernat, G., Mamedov, F., Styring, S. 2004. Molecular interference of Cd^{2+} with Photosystem II. BBA-Bioenergetics. 1659: 19-31.

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

Song, J. T., Lu, H., 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.

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

Verma, S., Dubey, R. S. 2001. Effect of Cd on soluble sugars and enzymes of their metabolism in rice. Biology plantarum 44: 117-123.

Yilmaz, H., Taskin, T., 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., Nan, Z. B. 2010. Effects of cadmium stress on seed germination, seedling growth and antioxidative enzymes in *Achnatherum inebrians* plants infected with Neotyphodium endophyte. Plant Growth Regulation 60: 91-97.

Zhang, F. Q., Zhang, H. X., Wang, G. P., Shen, Z. 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.

Zhou, Z. S, Huang, S.Q., Gou, K., Mehta, S. K., Zhang, P. C., 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., Yang, Z. M. 2008. Biological detection and analysis of mercury toxicity to alfalfa (*Medicago sativa* L.) plants. Chemosphere 70:1500-1509.

The Effect of Heavy Metals on Soluble Sugars Content, Total Protein and Activity of Antioxidant Enzymes in Wheat

Seyede Yalda. Raeesi sadati[1], Soodabeh. Jahanbakhsh Godekahriz[*2]
1- M.Sc. Student of Agriculture Biotechnology, University of Mohaghegh Ardabili
2- Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, University of Mohaghegh Ardabili
[*]For Correspondence: jahanbakhsh@uma.ac.ir

Received: 29.08.14 **Accepted: 08.02.15**

Abstract

Todays, pollution caused by heavy metals is a major concern in agriculture field. Heavy metals, by accumulation in soil and uptake by plants, inter into food chain and causes toxicity in the plants and consumers of these plants. Cadmium and mercury are two dangerous and carcinogenic substances that their amounts is increasing in natural ecosystems through human activities resulting in decreased proteins production, inactivation of some enzymes, interfering with variety of reactions and cell functions and cessation of cell growth and development and in general is a great treat to agriculture. For this purpose, a factorial experiment in a completely randomized design with three replications was conducted in greenhouse of Mohaghegh university of Ardabil in 1391. The experiment consisted of mercuric chloride treatments (with concentrations of 10 and 20µM), cadmium chloride treatment (0.5 mM), interaction between cadmium and mercury in two levels (10 µM of mercury with 0.5 mM of cadmium, 20 µM of mercury with 0.5 mM of cadmium) and control seedlings. The results showed that in Gonbad cultivar treated by cadmium, mercuric and the interaction of both heavy metals, the soluble sugar content and total protein were increased, but the activity of antioxidant enzymes decreased. In Tajan cultivar, total protein content was reduced but the activity of peroxidase, catalase and polyphenol oxidase enzymes (but for interaction of both heavy) was increased. Due to the activities of antioxidant enzymes to reduce the damage caused by various stresses, so seems that the increased activity of these enzymes in Tajan can increase stress resistance compared help. The Gonbad of other mechanisms also probably used for tolerance.

Keywords: Antioxidant enzymes, soluble sugar, heavy metals