

## اثر کادمیوم بر میزان تولید هیدروژن پراکسید و فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در گیاه ذرت (*Zea mays* L)

لطیفه پوراکیر، رقیه اشرفی: دانشگاه ارومیه

### چکیده

گیاهان رشد یافته در شرایط هیدروپونیک با کلرید کادمیوم  $50 \mu\text{M}$  تیمار شدند. میزان رشد و پارامترهای متابولیکی دخیل در تنش اکسیداتیو و پاسخ‌های آنتی‌اکسیدانی در اندام هوایی و ریشه‌های گیاهان تیمار شده بررسی شد. افزایش پراکسیداسیون لیپیدها، مرگ سلولی و تجمع پراکسید هیدروژن با اعمال کادمیوم موجب کاهش رشد و وزن خشک گیاهان گردید. میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز (CAT)، آسکور بات پراکسیداز (APX)، گلیکول پراکسیداز (GPX) و گلوتاتیون ردوکتاز (GR) در گیاهان تحت تیمار با کادمیوم افزایش یافت. بنابراین اعمال کادمیوم  $50 \mu\text{M}$  باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های مسئول محافظت اکسیدانی در گیاه ذرت می‌شود.

### مقدمه

آلودگی خاک و آب به وسیله فلزات سنگین خطر محیطی بزرگی برای سلامت انسان است. کادمیوم (Cd) که در زمره مواد سرطان‌زا برای انسان طبقه‌بندی شده است [۳۳]، از طریق فعالیت‌های انسانی، مثل استخراج معدن، ذوب فلزات، ترکیبات سوختی، فاضلاب‌های صنعتی و استعمال کودهای فسفاته در محیط آزاد می‌شود [۱۵]. با وجود آن‌که کادمیوم ماده‌ای غیرضروری است، سریعاً به وسیله گیاهان جذب می‌شود و می‌تواند در محصولات آن‌ها تجمع یابد [۲۲]. ریشه اولین محل تماس با این یون است، بنا بر این، غشای پلاسمایی سلول‌های ریشه به‌عنوان سد بین سیتوپلاسم و محیط خاکی عمل می‌کند. واکنش‌های بین کادمیوم و سلول‌های ریشه به خواص غشای پلاسمایی و به همان اندازه جذب و انتقال مواد غذایی بستگی دارد. شواهد زیادی پیشنهاد می‌کند که محتوای چربی و پروتئین غشاها ممکن است به وسیله این فلز آسیب ببیند [۲۲]. تا کنون نشان داده شده است که کادمیوم موجب بسیاری از تغییرات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و ساختاری در گیاهان مثل مهار رشد و جوانه‌زنی [۵]، [۱۹]، کاهش جذب عناصر معدنی [۲۸]، زرد شدن برگ و نکروزه شدن آن‌ها [۲۹]، تغییر ساختار سلول بالخص کلروپلاست‌ها [۲۴] و تسریع پیری [۵] می‌شود. غلظت زیاد Cd رشد گیاهان را مهار می‌کند و موجب آسیب سلول‌ها می‌گردد [۲۶].

واژه‌های کلیدی: آنتی‌اکسیدان، پراکسیداسیون چربی، تنش اکسیداتیو، ذرت، سمیت کادمیوم، گونه‌های فعال اکسیژن، مرگ سلولی

پذیرش ۸۹/۵/۲۵

دریافت ۸۸/۹/۳

کادمیوم برخلاف فلزاتی مثل مس و آهن که از طریق چرخه احیایی مثل فنتون و یا واکنش‌های هدر- وایز<sup>۱</sup> در سمیت شرکت می‌کنند از طریق مکانیسم‌های غیرمستقیم مثل مداخله در سیستم‌های دفاعی، تخریب زنجیره انتقال الکترون و القای پراکسیداسیون چربی موجب تنش اکسیداتیو می‌شود [۵]. کادمیوم از طریق اتصال به گروه‌های سولفیدریل پروتئین‌ها موجب مهار و اختلال در ساختار آن‌ها و یا اختلال در کنترل احیای سلولی می‌گردد [۲۶]. همچنین این فلز عاملی برای تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) است [۲۵]. برای کنترل سطوح ROS و محافظت سلول‌ها، گیاهان دارای آنتی‌اکسیدان‌ها با وزن مولکولی کم (آسکوربیک اسید، گلوکاتایون احیا شده، کاروتنوئیدها و توکوفرول) و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (سوپراکسید دیسمیوتاز (SOD)، آسکوربات پراکسیداز (APX)، گایاکول پراکسیداز (GPX) و کاتالاز (CAT)) هستند [۷]، [۱۴]، [۲۳].

چرخه گلوکاتایون-آسکوربات مکانیسمی است که از اهمیت زیادی برای کنترل وضعیت احیایی سلول، به ویژه بعد از اعمال فلزات سنگین برخوردار است [۳۰]. آسکوربیک اسید (AsA) آنتی‌اکسیدانی ثانویه است که نقش مهمی در تولید دوباره آلفا توکوفرول دارد [۱۳]. همچنین گروه‌های تیول غیر پروتئینی، به‌ویژه گلوکاتایون دارای نقش‌های بسیار مهمی در محافظت گیاهان از تنش‌های محیطی، مخصوصاً در مورد سمیت کادمیوم هستند [۳۰].

این تحقیقات به دلیل نبود منابع اطلاعات کافی در زمینه مکانیسم‌های دخیل در پاسخ گیاه ذرت به‌عنوان یک محصول مهم کشاورزی به فلز سنگین کادمیوم انجام شده است.

### مواد و روش‌ها

بذرهای ذرت<sup>۱</sup> بعد از تهیه از مرکز تحقیقات کشاورزی، قبل از کشت به مدت ۱۰ دقیقه با محلول ۰/۱٪  $HgCl_2$  ضدعفونی و بعد با آب مقطر کاملاً شستشو داده شدند. ظروف پتری به قطر ۹ سانتی‌متر قبل از اقدام به کشت به مدت دو ساعت در آون در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. در پایان پس از سرد شدن ظروف پتری، در هر یک از آن‌ها دو ورق کاغذ صافی گذاشته شد و سپس با استفاده از یک پنس استریل ده عدد بذر که ۱۲ ساعت قبل از کشت در داخل آب مقطر قرار گرفته و دوره آماس را طی کرده بودند، در داخل آن‌ها کشت و سپس تمام ظروف پتری در داخل انکوباتور در ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت سه روز قرار داده شدند. سپس دانه‌ست‌های سه روزه به داخل ظرف‌های کشت محتوی ۳۰۰ ml محلول هوگلند منتقل شدند. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی (CDR) با دو تیمار و هر تیمار در ۳ تکرار انجام شد. برای تهیه محلول‌های کادمیوم، از کلرید کادمیوم ( $CdCl_2$ ) استفاده شد. دانه‌ست‌ها به مدت ۱۵ روز در اتاق کشت با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، شدت نوری ۱۰۰۰۰ لوکس، درجه حرارت  $22/27^{\circ}C$  (روز/شب) با میانگین رطوبت ۸۵٪ قرار گرفتند. در طی این دوره محلول هوگلند هر سه روز یک بار تعویض شد. پس از گذشت ۱۵ روز گیاهان به داخل محلول هوگلند حاوی ۰ و ۵۰ میکرومولار کلرید کادمیوم منتقل شدند و به مدت ۱۵ روز

۱. Hader-Weiss

۲. *Zea mays* L.

دیگر در این محیطها مانده و سپس برداشت شدند [۱۳]. بعد از اندازه‌گیری طول ریشه با یک خطکش تمیز، برای خشک کردن نمونه‌ها برای تعیین وزن خشک و برخی آزمایش‌ها که نیاز به وزن خشک نمونه‌ها داشت، ریشه‌ها و ساقه‌ها بعد از شستشو با آب مقطر در پاکت‌های مجزا قرار داده شدند و در آن ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت قرار گرفتند. وزن خشک با ترازویی با حساسیت ۰/۰۰۱ گرم اندازه گرفته شد.

#### اندازه‌گیری میزان $K^+$ نشت یافته به محیط کشت

برای انجام این آزمایش دانه‌رست‌های ۳ روزه ذرت به مدت ۲۴ ساعت تحت تیمار ۱۰ ml KCl، ۲۰ mM قرار گرفتند و سپس دانه‌رست‌ها با آب مقطر شسته شده و با غلظت‌های مختلف کادمیوم تیمار شدند. پس از ۴۸ ساعت نمونه‌ها برداشت شده و میزان برون تراوش پتاسیم در محلول باقی‌مانده همه گیاهان با دستگاه فلیم‌فتومتر (فاطر الکترونیک ساخت ایران) اندازه‌گیری شد و با استفاده از منحنی استاندارد، میزان پتاسیم نشت یافته به محیط کشت بر حسب ppm محاسبه شد [۱].

#### اندازه‌گیری مرگ سلولی

مرگ سلولی به‌عنوان معیاری برای نشان دادن آسیب وارد شده به غشای سلولی در گیاهان تیمار شده با کادمیوم، با استفاده از جذب معرف آبی اوانس<sup>۱</sup> اندازه‌گیری شد [۴]. بعد از تیمار با کادمیوم، سه قطعه ۱ سانتی‌متری از نوک ریشه‌ها در داخل معرف آبی اوانس ۰/۰۲۵٪ در آب (w/v) به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شدند و بعد به مدت ۱۵ دقیقه با آب شستشو داده شدند و سپس در ۱ ml محلول متانول ۵۰٪ (v/v) و SDS ۱٪ (w/v) له گردیدند که این عمل موجب آزاد شدن معرف به تله افتاده گردید. عصاره حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در داخل بن ماری ۵۰°C قرار گرفته و سپس به مدت ۱۵ دقیقه با نیروی ۱۴۰۰۰ g سانتریفوژ گردید. جذب با دستگاه اولترا اسپکتروفتومتر<sup>۲</sup> در طول موج ۶۰۰ nm اندازه‌گیری شد که افزایش میزان رنگ جذبی حاکی از افزایش میزان مرگ سلولی است. نهایتاً میزان مرگ سلولی بر حسب درصد نسبت به شاهد تعیین گردید.

#### اندازه‌گیری میزان $H_2O_2$ در گیاهان تحت تیمار کادمیوم

میزان  $H_2O_2$  با استفاده از روش جاننا<sup>۳</sup> و شادوهاری<sup>۴</sup> [۱۶] اندازه‌گیری شد. ۰/۵ گرم بافت تری‌توزین و با ۳ ml بافر فسفات با pH ۶/۸ له شد. هموژنات حاصل به مدت ۲۵ دقیقه در داخل سانتریفوژ با نیروی ۶۰۰۰ g گذاشته شد. برای تعیین میزان  $H_2O_2$ ، به ۳ ml از عصاره حاصل ۱ ml نیتانیم کلراید ۰/۱٪ در ۲۰٪  $H_2SO_4$  (v/v) اضافه شد و محلول فوق به مدت ۱۵ دقیقه با شدت ۶۰۰۰ g سانتریفوژ شد. جذب محلول زرد رنگ حاصل به وسیله دستگاه اولتراسپکتروفتومتر در طول موج ۴۱۰ nm اندازه‌گیری شد ( $mM^{-1} cm^{-1}$  = ۰/۲۸ ضریب خاموشی).

۱. Evans blue

۲. (Ultraspac II مدل LKB انگلیس)

۳. Jana

۴. Choudhuri

## اندازه‌گیری میزان پراکسیداسیون چربی‌ها

برای اندازه‌گیری میزان پراکسیداسیون چربی‌ها از روش هیت<sup>۱</sup> و پکر<sup>۲</sup> [۱۵] استفاده شد. ۱ گرم بافت تروتوزین و توسط ۲/۵ ml محلول تری کلرواستیک اسید ۱۰٪ خوب له گردید. سپس محلول حاصل به مدت ۲۰ دقیقه در داخل سانتریفوژ با نیروی ۱۵۰۰۰ g گذاشته شد بعد از عمل سانتریفوژ، حجم مساوی از عصاره و تیوباربیوتیک اسید ۵/۰٪ در تری کلرو استیک اسید ۲۰٪ به داخل لوله آزمایش منتقل شده و به مدت ۳۰ دقیقه در داخل انکوباتور °C ۹۶ قرار داده شد. در نهایت لوله‌ها به مدت ۵ دقیقه وارد آب یخ شده و بعد به مدت ۵ دقیقه در داخل سانتریفوژ با نیروی ۱۰۰۰۰ g گذاشته شد. جذب محلول حاصل با دستگاه اولتراسپکتروفتومتر در طول موج‌های ۵۳۲ nm و ۶۰۰ nm اندازه‌گیری شد ( $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  = ضریب خاموشی).

## تهیه عصاره گیاهی برای تعیین میزان فعالیت آنزیم‌ها کاتالاز، آسکوربات و گایاکول پراکسیداز و گلوکاتیون ردوکتاز

برای تهیه عصاره گیاهی از روش کنگ<sup>۳</sup> و همکاران [۱۷] با اندکی تغییرات استفاده شد. ۵/۰g وزن تر بافت از هر دو اندام ریشه و اندام هوایی به‌طور جداگانه از همه تیمارها توزین شد و سپس به داخل هاون سرد منتقل شد و توسط ۳ ml بافر شامل (بافر تریس- HCl ۰/۰۵ مولار با pH ۷/۵، ۳ MgCl<sub>2</sub> میلی مولار، EDTA ۱ میلی مولار) با دسته هاون خوب ساییده شد. بافر استخراجی برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX) شامل ۰/۲ میلی مولار آسکوربات نیز بود. هموژنات سپس به مدت ۲۰ دقیقه در داخل سانتریفوژ با نیروی ۵۰۰۰ دور در دقیقه قرار گرفت. محلول رویی حاصل به‌عنوان عصاره خام برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان استفاده شد.

## اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX)

فعالیت آنزیم APX با استفاده از متد ناکانو<sup>۴</sup> و آسادا<sup>۵</sup> [۲۱] با اندکی تغییرات اندازه‌گیری شد. ۲/۵ ml بافر فسفات ۵۰ میلی مولار با pH ۷ شامل (EDTA ۰/۱ میلی مولار، آسکوربات سدیم ۱ میلی مولار، ۰/۲ ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ۱۰ میلی مولار) برداشته و روی آن ۰/۱ ml آنزیم استخراجی افزوده، سپس فعالیت آنزیم از طریق اکسید شدن آسکوربات با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۹۰ nm اندازه‌گیری شد که همراه با کاهش جذب در طی دو دقیقه فعالیت آنزیم بود ( $2/8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  = ضریب خاموشی).

## اندازه‌گیری فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز (GPX)

فعالیت (GPX) با استفاده از روش آپدایایا<sup>۱</sup> و همکاران [۳۱] انجام گرفت. به ۲/۵ ml از بافر فسفات ۵۰ میلی مولار ۱ ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ۱٪ (W/V)، ۱ ml گایاکول ۱٪ و ۰/۳ ml عصاره آنزیم استخراجی افزوده و فعالیت آنزیم در طی دو دقیقه با دستگاه اولتراسپکتروفتومتر در طول موج ۴۲۰ nm اندازه‌گیری شد که همراه با افزایش جذب بود ( $26/6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  = ضریب خاموشی).

۱. Heath

۲. Packer

۳. Kang

۴. Nakano

۵. Asada

**اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT)**

فعالیت آنزیم کاتالاز با استفاده از روش ایبی<sup>۲</sup> [۲] اندازه‌گیری شد. به ۲/۵ ml از بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با pH ۷ و ۱ ml ۱۰ mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> و ۰/۳ ml عصاره آنزیمی اضافه گردید و فعالیت آنزیم در طی دو دقیقه با دستگاه اولتراسپکتروفتومتر در طول موج ۲۴۰ nm اندازه‌گیری شد که با کاهش جذب همراه بود (ضریب خاموشی = ۴۳/۶ mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>).

**اندازه‌گیری فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز (GR)**

فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز با استفاده از روش فویر<sup>۳</sup> و هالیول<sup>۴</sup> [۱۲] اندازه‌گیری شد. به ۲/۵ ml بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با pH ۷ محتوی (MgCl<sub>2</sub> ۲/۵ mM, GSSG ۰/۵ mM, NADPH ۰/۲ mM) و ۰/۳ ml عصاره آنزیمی اضافه گردید و فعالیت آنزیم در طی دو دقیقه با دستگاه اولتراسپکتروفتومتر در طول موج ۳۴۰ nm اندازه‌گیری شد (ضریب خاموشی = ۶/۲ mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>).

**اندازه‌گیری میزان کادمیوم**

برای اندازه‌گیری میزان کادمیوم، ۰/۱ گرم از بافت خشک ریشه و اندام هوایی به طور جداگانه توزین شد و در محلول نیتریک-پرکلریک اسید (۱/۳) (v/v) در دمای ۱۰۰°C و در طی ۶ ساعت هضم گردید و سپس میزان کادمیوم به وسیله دستگاه جذب اتمی<sup>۵</sup> اندازه‌گیری شد [۱۹].

**آنالیز آماری**

میانگین و انحراف استاندارد نمونه‌ها با استفاده از آنالیز واریانس در برنامه‌های رایانه‌ای (SPSS و Excel) محاسبه گردید. در همه شکل‌ها، ستون‌ها نماینده میانگین ۳ تکرار و بارهای عمودی نشان دهنده انحراف استاندارد (SE ±) است. میزان معنی‌دار تغییرات در گروه تجربی در مقایسه با شاهد بر اساس آزمون (ANOVA) در سطح ۰/۰۵ است.

**نتایج**

بررسی علائم ظاهری در گیاهان ذرت شاهد و تیمار شده با کادمیوم، نشان داد که افزایش غلظت کادمیوم در گیاهان ذرت موجب بروز کلروز برگ‌ها به صورت رنگ سبز متمایل به زرد در برگ‌ها شد. نتایج حاصل از اثر کادمیوم بر طول ریشه‌ها، وزن خشک و میزان کادمیوم موجود در اندام هوایی و ریشه‌ها نشان‌گر آن است که با افزایش کادمیوم طول ریشه و وزن خشک آن کاهش معنی‌داری (P ≤ ۰/۰۵) پیدا می‌کند (جدول ۱).

نتایج حاصل از اثر کادمیوم بر نشأت یون پتاسیم به محیط کشت نشان می‌دهد که با افزودن کادمیوم نشأت

یون K<sup>+</sup> به محیط کشت نیز افزایش معنی‌داری دارد (شکل ۱ الف).

۱. Updhyaya ۲. Aebi ۳. Foyer ۴. Halliwell ۵. (Shimadzu AA-670 ساخت ژاپن)

بررسی مرگ سلولی به عنوان معیاری برای نشان دادن آسیب وارد شده به غشای سلولی در گیاهان تیمار شده با کادمیوم، نشان داد که با افزایش غلظت کادمیوم، آسیب رسیده به سلول‌های ریشه نیز افزایش معنی‌داری پیدا می‌کند (شکل ۱ ب).

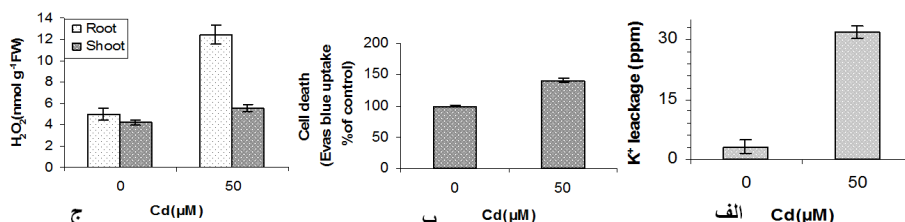
نتایج حاصل از بررسی میزان  $H_2O_2$  درون زان نشان‌گر آن است که میزان  $H_2O_2$  درون زان با افزودن کادمیوم به محیط کشت در گیاهان تحت تیمار به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد (شکل ۱ ج).

اندازه‌گیری میزان مالون دی‌آلدئید (MDA) به عنوان شاخص پراکسیداسیون چربی‌ها نشان داد که میزان MDA در گیاهان تحت تیمار با کادمیوم در هر دو اندام هوایی و ریشه‌ها افزایش معنی‌داری نسبت به گیاهان شاهد می‌یابد (شکل ۲ الف).

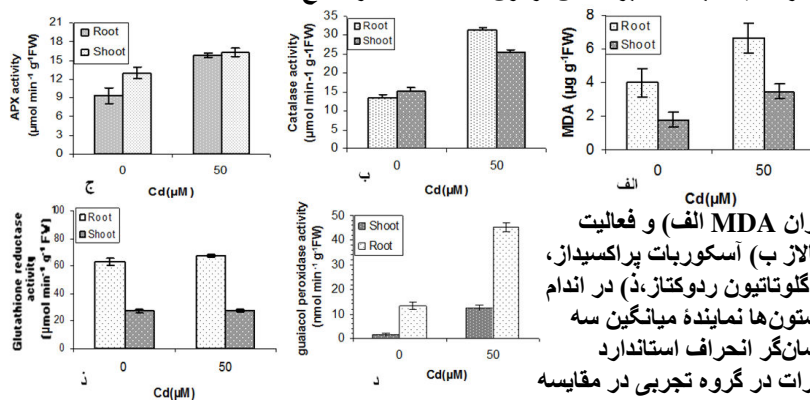
سنجش آنزیم‌ها نشان داد که فعالیت آنزیم‌های کاتالاز (شکل ۲ ب)، آسکوربات پراکسیداز (شکل ۲ ج)، گایاکول پراکسیداز (شکل ۲ د) و گلوتاتیون ردوکتاز (شکل ۲ ذ) در هر دو اندام هوایی و زمینی گیاهان تیمار دیده با کادمیوم به طور معنی‌داری نسبت به گیاهان شاهد افزایش یافت.

جدول ۱. اثر کادمیوم بر میزان طول، وزن خشک ریشه و میزان تراکم فلز کادمیوم در اندام هوایی و زمینی گیاه ذرت \* معرف تفاوت آماری در سطح ۰/۰۵ بر اساس آزمون ANOVA است.

غلظت کادمیوم (۰ μ M)	غلظت کادمیوم (۵۰ μ M)	
۲۵ ± ۱/۳	۱۲/۶ ± ۰/۹ *	طول ریشه (cm)
۰/۶۵ ± ۰/۰۹	۰/۲۹ ± ۰/۰۵ *	وزن خشک ریشه (g)
۰	۳۷۰ ± ۱۲ *	میزان کادمیوم تجمع یافته در ریشه (mg/KgDW <sup>-1</sup> )
۰	۱۶۵ ± ۹/۶ *	میزان کادمیوم تجمع یافته در اندام هوایی (mg/KgDW <sup>-1</sup> )



شکل ۱. اثر کادمیوم بر نشت پتاسیم ریشه الف)، میزان مرگ سلولی ریشه، ب) و میزان  $H_2O_2$  درون زان، ج) در گیاه ذرت. ستون‌ها نماینده میانگین سه تکرار و بارهای عمودی نشان‌گر انحراف استاندارد بوده و میزان معنی‌دار تغییرات در گروه تجربی در مقایسه با شاهد بر اساس آزمون ANOVA در سطح ۰/۰۵ است.



شکل ۲. اثر کادمیوم بر میزان MDA الف) و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز ب) آسکوربات پراکسیداز، ج)، گایاکول پراکسیداز د) و گلوتاتیون ردوکتاز، ذ) در اندام هوایی و ریشه گیاه ذرت. ستون‌ها نماینده میانگین سه تکرار و بارهای عمودی نشان‌گر انحراف استاندارد بوده و میزان معنی‌دار تغییرات در گروه تجربی در مقایسه با شاهد بر اساس آزمون ANOVA در سطح ۰/۰۵ است.

## بحث

افزایش سطوح فلزات سنگین مثل کادمیوم در محیط امروزه واقعیتی انکارناپذیر است. کاهش معنی‌دار در وزن خشک ریشه ناشی از اثر سمیت در این اندام است. به دلیل این‌که ریشه اولین اندامی است که در معرض سمی شدن قرار دارد و بیش از سایر اندام‌ها در معرض آسیب عوامل بیرونی قرار می‌گیرد، در واقع می‌توان گفت که ریشه به‌طور مستقیم در معرض سمیت کادمیوم قرار دارد. اما این سمیت در سایر قسمت‌های دیگر گیاه به‌طور غیرمستقیم عمل می‌کند [۳۲]. اثر کاهش بیوماس ریشه و رشد آن در اثر مسمومیت کادمیوم در گیاهان، در تحقیقات دیگران نیز گزارش شده است [۲۳]، [۳۶]. رشد ریشه‌ها و وظیفه آن‌ها به‌عنوان سطوح جذب‌کننده آب و مواد غذایی، به عوامل محیطی زیادی بستگی دارد. تنش فلزات سنگین از جمله عوامل محدودکننده رشد ریشه است که این نیز می‌تواند یکی از عوامل کاهش وزن تر و خشک ریشه باشد [۵]. با بررسی درصد مرگ سلولی در این تحقیق مشخص گردید که با افزایش کادمیوم در محلول غذایی درصد مرگ سلولی نیز در ریشه‌های گیاه ذرت افزایش می‌یابد. توانایی تعدادی از سلول‌ها در تجمع کادمیوم و سپس مرگ آن‌ها می‌تواند به سایر سلول‌ها اجازه دهد که غلظت‌های غیرآسیب‌رسان کادمیوم را حفظ نموده و به عمل کرد طبیعی خود ادامه دهند [۲۳].

نتایج حاصل از سنجش میزان کادمیوم در اندام هوایی و زمینی نشان دهنده این بود که کادمیوم بیش‌تر در اندام زمینی گیاه ذرت تجمع می‌یابد. میزان جذب کادمیوم توسط گیاه و غلظت آن در یک گیاه به شرایط محیطی، فیزیولوژیکی و فاکتورهای بیوشیمیایی بستگی دارد. ریشه‌ها معمولاً محتوای کادمیوم بیش‌تری نسبت به اندام هوایی نشان می‌دهند؛ زیرا آن‌ها اولین اندام‌هایی هستند که در ارتباط با کادمیوم قرار می‌گیرند و یون‌های کادمیوم در بافت‌های ریشه رسوب می‌کند و تا حد امکان از جابه‌جایی به اندام هوایی جلوگیری می‌کنند. بنا بر این نقش ریشه بسیار مهم است؛ زیرا ریشه‌ها می‌توانند به‌عنوان محل اصلی برای رسوب‌گیری و غیرفعال‌سازی فلزات عمل نمایند [۵] که این یافته‌ها با نتایج تحقیقات انجام گرفته بر روی گندم، خیار، سورگوم و غلات نیز مشابه است [۳۵].

تحقیقات نشان داده است که وجود فلزات سنگین در سلول منتهی به تجمع گونه‌های فعال آزاد اکسیژن می‌گردد [۲۳]. ROSها مثل اکسیژن منفرد ( $O_2^-$ )، پراکسید هیدروژن ( $H_2O_2$ ) و رادیکال هیدروکسیل ( $OH^-$ ) به مولکول‌های زیستی (DNA، RNA و پروتئین‌ها) صدمه می‌زنند. افزایش تولید  $H_2O_2$  در گیاه ذرت تحت تیمار کادمیوم در این تحقیق نشان دهنده تنش اکسیداتیو ناشی از تیمار کادمیوم در این گیاه است.  $H_2O_2$  یک بخش‌سازنده اکسیداتیو متابولیسم گیاهی است و یک محصول عمده تولید شده در واکنش‌های اکسیداتیو کلروپلاستی و پراکسیزومی است [۱۰].  $H_2O_2$  می‌تواند با رادیکال سوپراکسید وارد واکنش شده و رادیکال‌های هیدروکسیل فعال شده بیش‌تری را شکل دهد [۹]. رادیکال‌های آزاد هیدروکسیل آغازگر واکنش‌هایی است که موجب پراکسیداسیون چربی می‌شود [۹]. همچنین افزایش سطوح  $H_2O_2$  درون‌زا هم موجب القای پیری و

پراکسیداسیون چربی در گیاهان می‌گردد [۹]. سطوح MDA به‌عنوان یک شاخص سلولی تجمع پراکسیدها در این پژوهش سنجیده شد. افزایش MDA در برگ‌ها و ریشه‌های ذرت تحت تیمار کادمیوم نشان‌گر آن است که کادمیوم در این گیاه تنش اکسیداتیو را القا کرده است. حداکثر تولید MDA در ریشه‌ها مشاهده شد که پاسخی به تجمع بیش‌تر کادمیوم در ریشه ذرت است. ناپایداری غشا غالباً به خاطر پراکسیداسیون چربی‌ها در اثر افزایش تولید رادیکال‌های آزاد سمی اکسیژن بعد از قرار گرفتن در معرض فلزات سنگین است [۲۰]. افزایش MDA با افزودن Cd نشان دهنده آسیب‌رسانی این فلز به غشای سلولی است که MDA می‌تواند با اتصال به پروتئین‌های غشا و آنزیم‌ها منجر به آسیب‌رسانی به ساختار و عمل غشا شود [۹]. از طرف دیگر کادمیوم همانند دیگر فلزات شباهت بسیار زیادی با لیگاند‌های نیتروژن و سولفور پروتئین‌ها دارد پس با تشکیل پیوند با پروتئین‌ها موجب تخریب کانال‌های یونی و نشت یونی می‌گردد [۱۹]. بنا بر این قابلیت نفوذ پذیری غشا نیز آسیب دیده که نتایج حاصل از اندازه‌گیری نشت پتاسیم به محیط کشت هم آن را تأیید می‌کند. این نتایج با نتایج اکمی<sup>۱</sup> و همکاران [۱۱] همسویی نشان می‌دهد.

گیاهان دارای مکانیسم آنزیم‌های محافظ و مکانیسم غیرآنزیمی برای پاکسازی گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و کاهش اثرات مضر آن‌ها هستند. آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی می‌توانند به‌عنوان سیستم دفاعی مهمی در گیاهان در قبال تنش‌های اکسیداتیو ایجاد شده به‌وسیله فلزات بررسی شوند [۳۴]. مسیر آنزیمی شامل کاتالاز (CAT)، پراکسیدازها از قبیل آسکوربات پراکسیداز (APX) و گایاکول پراکسیداز (GPX)، سوپراکسید دیسمیوتاز (SOD) و گلوکاتایون ردوکتاز (GR) است در حالی‌که مولکول‌هایی مثل گلوکاتایون، آسکوربات و کاروتنوئیدها حفاظت غیرآنزیمی را تأمین می‌کنند. پاسخ آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی به کادمیوم، و در کل به فلزات، بحث برانگیز باقی مانده است و در بین گونه و حتی در بین بافت‌های گیاهان هم متفاوت است. نتایج این بررسی پاسخ‌های متمایز آنزیم‌های آنتی‌اکسیداتیو به کادمیوم در قسمت‌های مختلف گیاه را نشان می‌دهد. CAT آنزیمی مهم در قبال تنش اکسیداتیو است. این آنزیم می‌تواند  $H_2O_2$  را که محصول عمده تولید شده به وسیله SOD است پاکسازی کند [۳]. CAT یک نماینده عمومی اکسیدوردوکتاز است که  $H_2O_2$  را به آب و مولکول‌های اکسیژن تجزیه می‌کند [۱۸]. در تحقیق حاضر فعالیت CAT به طور معنی‌داری در ریشه‌ها نسبت به اندام هوایی گیاهان تیمار شده با کادمیوم افزایش یافته بود که این پیشنهاد می‌کند که احتمالاً نشان دهنده تجزیه  $H_2O_2$  و پراکسیدهای سمی در تجمع کادمیوم به وسیله CAT انجام می‌گیرد و آن هم به نوبه خود می‌تواند پراکسیداسیون چربی‌ها را که به واسطه رادیکال‌های آزاد در طی سمیت کادمیوم کاهش دهد. اثر افزایش فعالیت آنزیم CAT در گیاهان تیمار شده با کادمیوم، در تحقیقات مشابه بر روی کافی ارابیکا<sup>۲</sup> [۱۴] و گوجه فرنگی [۷] نیز گزارش شده است. APX به‌عنوان آنزیم دیگر جارو کننده  $H_2O_2$  در این بررسی مورد سنجش قرار گرفت. افزایش فعالیت این آنزیم در گیاهان تیمار شده با Cd در واقع نقش کلیدی در پاسخ گیاه به افزایش تجمع  $H_2O_2$  است. آسکوربات

۱. Ekmekci      ۲. *Coffea arabica*



پراکسیداز عمدتاً در کلروپلاست، سیتوزول و دیگر اندامک‌های داخل سلول تولید می‌شود و برای حفظ حالت احیا در سلول‌ها مورد نیاز است [۳۱].

نتایج حاصل در مورد افزایش فعالیت GPX در اثر تنش کادمیوم نشان می‌دهد که این آنزیم به‌عنوان وسیله‌ای دفاعی در مقاومت به آسیب اکسیداتیو کادمیوم القایی در ذرت عمل می‌کند. القای فعالیت GPX در گیاهان همچین در اثر سطوح سمی دیگر فلزات مثل Al، Cu و Zn نیز گزارش شده است [۶]، [۷]، [۸]. تحت شرایط سمیت فلز، از میزان فعالیت GPX می‌توان به‌عنوان بیومارکر در تنش‌های شدید سیستمیک استفاده کرد [۲۷].

نتایج این تحقیق نشان داد گلوکوتاتیون ردوکتاز که (NADPH) وابسته به واکنش‌های اکسید شده گلوکوتاتیون را کاتالیز می‌کند، به طور معنی‌داری در گیاهان تحت تیمار با Cd افزایش می‌یابد. فویر و هالیول [۱۲] گفته‌اند که  $H_2O_2$  به‌طور عمده به‌وسیله چرخه گلوکوتاتیون-آسکوربات دخیل در واکنش‌های تناوبی احیایی از آسکوربات، گلوکوتاتیون و (NADPH) حذف می‌شود.  $H_2O_2$  به‌وسیله APX، GPX، GR و CAT به‌عنوان آنزیم‌های کلیدی در طی مکانیسم دفاعی آنتی اکسیداتیو کاتالیزه می‌گردد. نتایج حاصل نشان می‌دهد که افزایش سطوح آنزیم‌های آنتی اکسیدانت القا شده به وسیله کادمیوم ممکن است به‌عنوان مکانیسم دفاعی ثانویه در قبال تنش اکسیداتیو باشد. در نتیجه‌گیری کلی می‌توان گفت که سمیت فلزات سنگین رشد گیاهان را کاهش می‌دهد که به علت تنش اکسیداتیو به تغییرات فیزیولوژیکی مربوط می‌شود. سمیت کادمیوم باعث آسیب فراساختاری می‌شود و چند فرایند بیوشیمیایی را نیز متأثر می‌سازد. این صدمات و تغییرات می‌تواند منجر به تنش زیستی و غیرزیستی شوند. در نتیجه ROS با شدت بیش‌تری تولید می‌شود و صدمات جبران‌ناپذیری به ماکرومولکول‌ها وارد می‌سازد. فرض شده است که تولید ROS در اثر سمیت کادمیوم شاید باعث تغییرات در زنجیره انتقال الکترون و آسیب به غشای تیلاکوئید شود. آنزیم‌های آنتی اکسیدانتی مثل CAT، APX، GPX و GR می‌توانند ROS را حذف کنند. از همین‌رو این آنزیم‌ها و بیان آن‌ها می‌تواند در پاسخ به سمیت کادمیوم اضافی تحریک شود. این آنزیم‌ها برای رفع صدمات ناشی از تنش کادمیوم، افزایش می‌یابد و بنا بر این گیاهانی که توانایی افزایش بیان و فعالیت این آنزیم‌ها را دارند، متحمل به کادمیوم هستند.

#### منابع

۱. طیبه فریودنیا، بررسی اثرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی ناشی از آلودگی سرب بر دانه‌ست‌های ذرت، اثر pH و EDTA بر تجمع سرب و مکانیسم‌های مقاومت ذرت در برابر آلودگی سرب، پایان نامه دوره دکترا. دانشگاه ارومیه گروه زیست‌شناسی (۱۳۸۳).
2. H. Aebi, Catalase, In H Bergmeyer, ed, "Methods of Enzymatic Analysis 3. Verlag Chemie", Weinheim, Germany (1983) 273-277.
3. K. Asada, "Ascorbate peroxidase a hydrogen peroxide scavenging enzyme in plants.", Plant Physiology, 85 (1992) 235-241.

4. C. J. Baker. and N. M. monck, "An improved method for monitoring cell death in a cell suspension and leaf disk assays using Evans blue", *Plant cell and Organ culture*, 39 (1994) 7-12.
5. M. P. Benavides, S. M. Gallego, and M. L. Tomaro, "Cadmium toxicity in plants. Braz", *J. Plant Physiology*, 17 (2005) 21-34.
6. I. Cakmak, and W. J. Horst "Effect of aluminum on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities in root tip of soybean (*Glycine max*)" *Physiologia Plantarum*, 83 (1991) 463-468.
7. M. Chamseddine, B. A. Wided, H. Guy, C. Marie-Edith, and J. Fatma, "Cadmium and copper induction of oxidative stress and antioxidative response in tomato (*Solanum Lycopersicon*) leaves", *Plant Growth Regul*, 57 (2009) 89-99.
8. A. Chaoui, S. Mazhoudi, M. H. Ghorbal and E. El-Ferjani, "Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L.)." *Plant Science*, 127 (1997) 139-147.
9. J. Chen, C. Zhu, D. Lin, and Z. X. Sun, "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 (2007) 49-57.
10. L. A. Del Rio, L. M. Saudalio, J. M. Palma, P. Bueno, and F. J. Corpas, "Metabolism of oxygen radicals in peroxisomes and cellular implications", *Free Radical Medicine and Biology*, 13 (1992) 557-580.
11. Y. Ekmekçi, D. Tan Yolaç and B. Ayhan, "Effects of cadmium on antioxidant enzyme and photosynthetic activities in leaves of two maize cultivars", *J. Plant Physiology*, 165 (2008) 800-811.
12. C. H. Foyer, and B. Halliwell, "The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism", *Planta*, 133 (1976) 21-25.
13. C. H. Foyer, and G. Noctor, "Oxidant and antioxidant signaling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in physiological context", *Plant Cell Environment*, 28 (2005) 1056-1071.
14. R. A. Gomes-Junior, C. A. Moldes, F. S. Delite, and G. B. Pompeu, "Antioxidant metabolism of coffee cell suspension cultures in response to cadmium", *Chemosphere*, 65

- (2006) 1330-1337.
15. R. L. Heath, L. Packer, "Photoperoxidation in isolated chloroplasts, I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125 (1968) 189-198.
  16. S. Jana, M. A. Choudhuri, "Glycolate metabolism of three submerged aquatic angiosperms during aging", *Aquatic Botany*. 12 (1981) 345-354.
  17. H. M. Kang, M. E. Saltveit, "Chilling tolerance of maize, cucumber and rice seedling (leaves and roots) and differentially affected by salicylic acid", *Physiologia Plantarum*, 115 (2002) 577-576.
  18. C. C. Lin, C. H. Kao, "Effect of NaCl stress on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> metabolism in rice leaves", *J. Plant Growth Regulation*. 30 (2000) 151-155.
  19. S. Mishra, R. D. Tripathi, S. Srivastava, Dwivedi, S. T. Kumar, "Thiol metabolism play significant role during cadmium detoxification by *Ceratophyllum demersum* L. Bioresource Technology, 100, (2009) 2155-2161.
  20. A. Mitwally, I. Finkemeier, M. Georgi, K. J. Dietz, "Salicylic acid alleviates the cadmium toxicity in barley seedling", *Plant Physiology*, 132 (2003) 272-281.
  21. Y. Nakano, K. Asada, "Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts", *Plant Cell Physiology*, 22 (1981) 867-880.
  22. M. F. Quartacci, E. Cosi, F. Navari-Izzo, "Lipids and NADPH-dependent superoxide production in plasma membrane vesicles from roots of wheat grown under copper deficiency or excess", *J. Experimental Botany*. 52 (2001) 77-84.
  23. K. Radotic, T. Ducic, D. Mutavdzic, "Changes in peroxidase activity and isoenzymes in spruce needles after exposure to different concentrations of cadmium", *Environmental and Experimental Botany*, 44 (2000) 105-113.
  24. N. Rascio, F. D. Vecchia, M. Ferretti, L. Merlo, R. Ghisi, "Some effect of cadmium on maize plants. *Arch*", *Environmental Contamination and Toxicology*, 25 (1993) 244-249.
  25. M. C. Romero-Puertas, M. Podriguez-Serrano, L. A. Del Rio, L. M. Sadalio, "Cadmium-induced subcellular accumulation of O<sub>2</sub><sup>2-</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in pea leaves", *Plant Cell and Environment*, 27 (2004) 1122-1134.

26. A. Schützendübel, A. Polle, "Plant responses to abiotic stress: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization", *J. Experimental Botany*. 53 (2002) 1351-1365.
27. K. Shah, R. G. Kumar, S. Verma, R. S. Dubey, "Effect of cadmium on lipid peroxidation, superoxide anion generation and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings", *Plant Science*. 161(2001) 1135-1144.
28. A. m. Siedlecka, "Some aspects of interactions between heavy metals and plant mineral nutrients", *Acta. Societatis Botanicorum poloniae*, 64 (1995) 265-272.
29. A. Stroiński, "Some physiological and biochemical aspects of plant resistance to cadmium effect. I. Antioxidative system", *Acta Physiologia Plantarum*, 21 (1999) 175-188.
30. M. Tiryakioglu, S. Eker, F. Ozkutlu, S. Husted, I. Cakmak, "Antioxidant defense system and cadmium uptake in barley genotypes differing in cadmium tolerance", *J. Trace Elements in Medicine and Biology*, 20 (2006) 181-189.
31. A. Updhyaya, D. Sankhla, T. D. Davis, N. Sankhla, B. N. Smidh, "Effect of paclobutrazol on the activities of some enzymes of activated oxygen metabolism and lipid peroxidation in senescing soybean leaves", *Plant Physiology*, 121(1985) 453-461.
32. K. Verma, G. S. Shekhawat, S. K. Mehta, V. Sharma, "Cadmium induced oxidative stress and changes in soluble and ionically bound cell wall peroxidase activities in roots of seedling and 3-4 leaf stage plants of *Brassica Juncea* (L) Czern", *Plant Cell Reports*, 27(2008) 1261-1269.
33. M. Waisberg, P. Joseph, B. Hale, D. Bayersmann, "Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis", *Toxicology*, 192 (2003) 95-117.
34. J. E. J. Weckx, and H. Clijsters, "Oxidative damage and defense mechanisms in primary leaves of *Phaseolus vulgaris* as a result of root assimilation of toxic amounts of copper", *Physiologia Plantarum*, 96 (1996) 506-512.
35. A. Youn-Joo, "Soil ecotoxicity assessment using cadmium sensitive plants", *Environment and Pollution*, 127 (2004) 21-26.
36. F. Zhang, W. Shi, Z. Jin, and Z. Shen, "Response of antioxidative enzymes in Cucumber chloroplasts to cadmium toxicity", *J. Plant Nutrition*, 26 (2002) 1779-1788.