یافته های نوین کشاورزی
سال دهم- شماره۱- پاییز ۱۳۹٤

تاثیر فلز کادمیوم بر میزان آنزیم کاتالاز و بیومارکر دی تیروزین در برخی از گونه‌های گیاهان زراعی

سیده فاطمه موسوی*، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اراک، ایران
داود حبیبی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، گروه زراعت و اصلاح نباتات، کرج، ایران
افشین مظفری، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ایلام، گروه زراعت و اصلاح نباتات، ایلام، ایران
نورعلی ساجدی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اراک، گروه زراعت و اصلاح نباتات، اراک، ایران

چکیده

این آزمایش در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج در سال ۸۹-۱۳۸۸ به اجرا در آمد. آزمایش بصورت فاکتوریل در قالب طرح پایه بلوک های کامل تصادفی با ۳ تکرار اجرا شد. فاکتورهای آزمایش شامل میزان کادمیوم در خاک در سه سطح (صفر، ٤٠ و ۸۰ میلی گرم در کیلو گرم خاک خشک) و گونه گیاه زراعی در سه سطح (یونجه یکساله (*Medicago rigidula*)، ماشک گل خوشه ای (*Vicia villosa*) و کلزا (*Barassica napus*)) بود. نتایج آزمایش نشان داد میزان کادمیوم در خاک و گونه های زراعی بر کلیه صفات مورد مطالعه اثر معنی داری داشت. بالاترین میزان بیومارکر دی تیروزین (D-T) در کلزا (با ۱۰/۹۹ میکرومول بر گرم وزن تازه بافت) و پایین ترین میزان در گیاه ماشک گل خوشه ای (با ۸/۸٦ میکرومول بر گرم وزن تازه بافت) بود. بیشترین و کمترین میزان آنزیم آنتی اکسیدانت کاتالاز (CAT) به ترتیب متعلق بود یونجه (با ۵۵/۷۹ واحد بر میلی گرم پروتئین) و ماشک گل خوشه ای (با ۵۲/۷۷ واحد بر میلی گرم پروتئین). نتایج آزمایش نشان داد با افزایش غلظت کادمیوم (Cd) در خاک، مقدار بیومارکر دی تیروزین افزایش یافت اما برعکس میزان آنزیم کاتالاز کاهش یافت. دوز ۸۰ و صفر (میلی گرم کادمیوم در کیلوگرم خاک خشک) به ترتیب با ۱۱/۷۲ و ٦/۵۲ (میکرومول بر گرم وزن تازه بافت) بالاترین و پایین ترین میزان بیومارکر دی تیروزین را به خود اختصاص دادند. دوز صفر و ۸۰ (میلی گرم کادمیوم در کیلوگرم خاک خشک) به ترتیب با ٦۳/۳۰ و ٤۹/۳۹ (میکرومول بر گرم وزن تازه بافت) بالاترین و پایین ترین میزان آنزیم کاتالاز را به خود اختصاص دادند.

واژه های کلیدی: کادمیوم، آنزیم آنتی اکسیدانت، بیومارکر بیوشیمیایی، کاتالاز و دی تیروزین

---

* نویسنده مسئول: E-mail: s.moosavi@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله:۹۳/۱/۱۹ تاریخ پذیرش مقاله: ۹۳/۱۰/۹

مقدمه

تنش‌های محیطی از قبیل (خاک، آب و فلزات سنگین) یکی از موانع اصلی در تولید محصولات زراعی و باغی در بسیاری از نقاط دنیا به ویژه مناطق خشک و نیمه خشک مانند ایران محسوب می‌شوند. نظر به صنعتی شدن جوامع در دهه‌های اخیر و تولید مقادیر قابل توجهی پساب های صنعتی توسط کارخانجات و رها سازی آنها در اکوسیستم‌های طبیعی و روان آب ها و از سوی دیگر افزایش استفاده از سوخت‌های فسیلی و احتمال بازگشت ترکیبات احتراق یافته به محیط، استفاده از آفت کشها در مزارع، خطر وقوع تنش غیر زنده تجمع فلزات سنگین در خاک را افزایش می‌دهد، از سوی دیگر مشکلات عدیده کم آبی در برخی از نقاط و از جمله آب های با کیفیت پایین کشاورزان را بر آن داشته تا از تمامی منابع آبی استفاده نمایند، مشروط بر آنکه گیاهان کشت شده در برابر عناصر سنگین موجود در آب آبیاری متحمل باشند و همچنین بتوانند از تجمع این عناصر در خاک ممانعت بعمل آورند. عناصر سنگین عناصری هستندکه وزن اتمی آنها بین ٦٣/٥٤٦ تا ٢٠٠/٥٩٠ باشد و جرم مخصوص آنها بزرگتر از ۵ گرم بر سانتیمترمکعب باشد (٣٦).

۵۳ عنصر از ۹۰ عنصر طبیعی جزو فلزات سنگین محسوب می شوند، اما تمامی آنها اهمیت بیولوژیکی ندارند. بر اساس حلالیت این فلزات در محیط فیزیکی، ۱۷ عنصر سنگین ممکن است در دسترس سلول های زنده بوده و برای موجودات زنده و اکوسیستم ها اهمیت داشته باشند (٤٨). از میان این فلزات آهن (Fe)، مولیبدن (Mo)، منگنز (Mn) بعنوان ریزمغذی مهم هستند. روی (Zn)، نیکل (Ni)، مس (Cu)، وانادیوم (V)، کبالت (Co)، W و کروم (Cr) فلزات سمی با اهمیت بالا و پایین به‌عنوان Trace elements هستند. آرسنیت (As)، جیوه (Hg)، نقره (Ag)، Sb، کادمیوم (Cd)، سرب (Pb) و اورانیوم (U) هیچ نوع نقشی از نظر غدایی نداشته و به نظر برای گیاهان و میکرو ارگانیسم ها از سمیت بالا یا پایینی برخوردار است. منبع اصلی کادمیوم در محیط، فرآیندهای صنعتی و کودهای فسفاته می‌باشد (٤٦). غلظت کادمیوم در خاک های غیر آلوده ۱/۵–۱ میلی گرم در کیلوگرم است، اما در خاک های آلوده انگلیس بیش از ۱۵۰ میلی گرم در کیلوگرم می باشد (٤٠).

فلزات سنگین کادمیوم (Cd)، سرب (Pb)، آلومینیوم (Al) و روی (Zn) با تولید ROS باعث ایجاد تنش اکسیداتیو در برخی گونه های گیاهی می شوند (۵، ٦، ١٦، ٢٣، ٢٧،٣٨ و ٤١). ROS (گونه های فعال اکسیژن) مولکول های سمی هستند که شامل ترکیباتی نظیر رادیکال های سوپراکسید ($O_2^{\cdot-}$)، پروکسید هیدروژن (H_2O_2) و رادیکال هیدروکسیل ($OH^{\cdot}$)، پروکسید و اکسیژن منفرد که حاصل انتقال یک، دو و سه الکترون از یک مولکول اکسیژن (O_2) هستند (۱۰، ۲۰ و ۳۱).

ROS ها محصولات ناگزیر حاصل از متابولیسم بی هوازی هستند که در طی واکنش های زنجیره انتقال الکترون واقع در اندامک های میتوکندری، کلروپلاست و پروکسی زوم تولید می شوند. ROS ها می

توانند باعث تخریب پروتئین ها، غشاء های زیستی و DNA شده و در نهایت باعث مرگ سلول شوند (۱۰). ROS ها باعث افزایش پراکسیداسیون چربی در شرایط تنش شدید خشکی (۲)، درجه حرارت بالا (۳)، اشعه ماوراء بنفش (۲٦) و تنش شدید کادمیوم و روی (۳۸ و ٤۱) در گونه های مختلف گیاهی، می شوند. دیتز و همکاران (۱۹۹۹) و شاو و همکاران (۲۰۰٤) گزارش دادند که فلزات سنگین باعث القاء تنش اکسیداتیو در سلول ها و بافت های گیاهی از راه های زیر می شوند:

الف) فلزات سنگین بصورت مستقیم الکترون ها را در واکنش های الکترون منفرد نتقال داده و باعث تولید رادیکال های آزاد می شوند. فلزات معروف به فلزات انتقالی مانند آهن (Fe)، مس (Cu)، منگنز (Mn) و غیره، که دارای الکترون های جفت نشده در اربیتال های خود هستند الکترون های منفرد یا تکی را دریافت یا از دست می دهند، بنابراین باعث انتقال یک الکترون از مولکول اکسیژن (O_2) و عموما تولید ROS و پدیده های اکسیداسیون و احیاء می شوند.

ب) فلزات سنگین باعث ایجاد اختلال در مسیر های متابولیکی بویژه در غشاء تیلاکوئید می شوند، آنها همچنین موجب افزایش میزان تشکیل رادیکال های آزاد و گونه های فعال اکسیژن (ROS) می شوند.

ج) علاوه بر این، فلزات سنگین اصولا باعث غیر فعال شدن آنزیم های آنتی اکسیدانتی (پروکسیداز ها، کاتالاز ها، سوپراکسید دیسموتاز ها) که مسئول سمیت زدایی رادیکال های آزاد هستند، می شوند، اگر چه ممکن است پروکسیداز ها در طی تنش فلزات سنگین فعال باشند.

د) و در پایان، تجمع فلزات سنگین باعث تخلیه اکسیدانت های با وزن مولکولی پایین (نظیر گلوتاتیون) می شوند که این بخاطر مصرف آنها جهت تشکیل شلات های گیاهی است.

بطورکلی سلول های گیاهان سعی در نگه داشتن غلظت ROS ها در حداقل مقدار ممکن دارند چرا که ROS ها واکنش پذیری بالایی در مقایسه با اکسیژن مولکولی یا عنصری (O_2) داشته (٤۷) و تقریبا با هر تشکیل دهنده آلی در سلول زنده واکنش می دهند. ROS ها از طریق پروکسیداسیون چربی‌ها به غشاء ها آسیب می رسانند (۳۹). آنها همچنین می توانند باعث تخریب DNA، پروتین ها، چربیها و کلروفیل، شوند (۳۲). پرواکسید هیدروژن (H_2O_2) در حضور رادیکال سوپراکسید (O_2^-) قادر به تولید رادیکال هیدروکسیل (OH) با واکنش پذیری خیلی بالا از طریق کاتالیز–فلز واکنش هابر–وایس می باشد بنابراین جاروب کردن H_2O_2 در داخل سلول جهت کاهش میزان خسارت اکسیداتیو بسیار حیاتی و مهم است (۱۹ و ۵۰).

واکنش هابر–وایس:

$$H_2O_2 + O^{2-} \rightarrow OH + OH^- + O_2$$

پرواکسید هیدروژن H_2O_2 با حضور فلزات انتقالی فعال اکسید شده نظیر Cu^{2+} و Fe^{2+} می تواند به رادیکال هیدروکسیل (OH) در یک واکنش کاتالیز-فلزی از طریق واکنش فنتون، تبدیل شود.

واکنش فنتون:

$$H_2O_2 + Fe^{2+}(Cu^{+}) \rightarrow Fe^{3+}(Cu^{2+}) + {}^{\cdot}OH + OH$$
$$O_2 + Fe^{3+}(Cu^{2+}) \rightarrow Fe^{2+}(Cu^{+}) + O_2$$

فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت تحت تنش کادمیوم به غلظت آن بستگی دارد و می‌تواند تحریک یا محدود شود (۱۵).

احتمال اول این است که یون های کادمیوم هم می توانند از فعالیت برخی آنزیم های آنتی اکسیدانتی جلوگیری کرده و هم باعث افزایش فعالیت آنها شوند. تاثیر فلز کادمیوم بر روی برخی آنزیم های آنتی اکسیدانتی نظیر پروکسیداز (POX)، کاتالاز (CAT)، آسکوربیت پروکسیداز (ASC) و گلوتاتیون ریدوکتاز (GR) قبلا بررسی شده است (۱۷).

کادمیوم فعالیت آنزیم کاتالاز را در گیاه نخود فرنگی کاهش داد در صورتی که فعالیت سوپراکسید دیسموتاز (SOD) افزایش یافت (۹). کادمیوم باعث افزایش پراکسیداسیون لیپیدی و کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت در گیاه لوبیا شد (٤۳). گیاهان برای اینکه خود را در برابر هجوم رادیکال های آزاد اکسیژن حفاظت کنند از سیستم دفاع آنتی اکسیدانتی استفاده می برند (۳۵).

سیستم آنزیمی آنتی اکسیدانتی یکی از مهمترین روش های دفاعی گیاه است که می تواند با جاروب کردن ROS ها در سلول از آسیب های اکسیداتیو جلوگیری کند (۲۰). آنزیم های آنتی اکسیدانتی بطور قابل توجهی می توانند از آسیب های ناشی از فلزات سنگین در گیاه جلوگیری کنند (۱).

آنزیم های آنتی اکسیدانتی نظیر آنزیم کاتالاز (CAT) سیستم دفاعی برای بقای موجودات زنده هوازی را مهیا می سازد (۲). شواهد زیادی وجود دارد که بیان می کند گیاهان در معرض غلظت های بالای فلزات سنگین نظیر آهن و مس باعث آسیب های اکسیداتیو در گیاه می شود (٤۹).

توانایی گیاهان در افزایش حفاظت آنتی اکسیدانتی در برابر تنش فلزات سنکین محدود می باشد تعداد، زیادی از مطالعات نشان داده که غلظت های بالای فلزات سنگین بیشتر باعث کاهش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانتی می شود تا افزایش فعالیت آنها (٤۰). واکنش های خود اکسیداسیون (Autoxidation) و فنتون (Fenton) ممکن است باعث تضعیف سیستم دفاع آنزیمی شود. به‌عنوان مثال فعالیت آنزیم کاتالاز به‌طور مستقیم توسط رادیکال سوپر اکسید $O^{\cdot-}_2$ متوقف می شود (۲۲). رادیکال های هیدروکسیل $HO^{\cdot}$ باعث توقف فعالیت آنزیم Zn-Cu- سوپراکسید دیسموتاز می شوند (۷). بر اساس خصوصیات فیزیکی و شیمیایی سه مکانیزم مولکولی مختلف برای سمیت فلزات سنگین را می توان بیان کرد: الف) تولید گونه های فعال اکسیژن (ROS) توسط واکنش های خود اکسیداسیون و فنتون ب) بلوکه کردن گروه های کارکرد ضروری بیومولکول ها ج) جایگزینی یون های فلزات ضروری در بیومولکول ها کادمیوم و دیگر

فلزات سنگین باعث تخلیه GSH (گروه سولفوهیدریل) و جلوگیری از فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانتی بویژه گلوتاتیون ریدکتاز (GR) می شود (٤٠).

آنزیم کاتالاز (CAT) در جاروب کردن H_2O_2 تولید شده در طی فرآیند های تنفس نوری و β- اکسیداسیون اسیداهای چرب، دخالت دارد (۳۳).آنزیم کاتالاز غالبا با حضور آنزیم اکسیدوردوکتاز (Oxidoreductase) باعث تجزیه پرواکسید هیدروژن (H_2O_2) به مولکول آب (H_2O) و اکسیژن (O_2) شده و بعنوان یک آنزیم کلیدی نقش مهمی را در از بین بردن پرواکسید های سمی در گیاه ایفاء می کند (۲۳).

دی تیروزین، یک بیومارکر مهم حاصل از اکسیداسیون پروتئین ها توسط ROS ها است که میزان آن بطور مستقیم با افزایش تنش اکسیداتیو، بالا میرود (۲۸). بنابراین، گیاهان در معرض تنش فلزات سنگین به میزان زیادی با تنش اکسیداتیو مواجه هستند (٤٢).در این آزمایش تأثیر فلز سنگین کادمیوم بر روی سطوح آنزیم آنتی اکسیدانتی کاتالاز (CAT) و بیومارکر بیوشیمیایی دی تیروزین (D-T) در گونه های زراعی مختلف و استفاده از آن جهت شناسایی گونه یا گونه های زراعی مقاوم به تنش فلز سنگین کادمیوم مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

این تحقیق به منظور بررسی تاثیر فلز کادمیوم (Cd) بر روی میزان آنزیم آنتی اکسیدانتی کاتالاز (CAT) و بیومارکر بیوشیمیایی دی تیروزین (D-T) در چند گونه زراعی در شرایط گلخانه ای در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج در سال ۸۹- ۱۳۸۸ به اجرا در آمد. این آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه بلوک های کامل تصادفی با ۳ تکرار اجرا شد. فاکتورهای آزمایشی شامل فلز سنگین کادمیوم در سه سطح ۰، ٤٠ و ۸۰ میلی گرم در کیلو گرم وزن خشک خاک و سه گونه گیاه زراعی شامل یونجه یکساله (*Medicago rigidula*)، کلزا (*Barassica napus*) رقمOkapi و ماشک (*Vicia villosa*) بودند. آزمایش به‌صورت گلخانه‌ای در گلدان‌های پلاستیکی با ارتفاع ۱۵ و قطر ۲۰ سانتی‌متر که حاوی ۵ کیلوگرم خاک خشک لومی رسی در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی کرج انجام گردید. میزان غلظت اولیه فلز کادمیوم خاک گلدان ها توسط آزمایشگاه تعیین گردید، پس از آن خاک های مورد مطالعه را از الک ۲ میلی‌متری عبور داده و ۳ گونه گیاه زراعی در شرایط گلخانه ای در گلدان ها کشت شدند و خاک گلدان‌ها به‌طور مساوی و حداقل به مقدار ۵ کیلوگرم در نظر گرفته شد. بر اساس وضعیت حاصلخیزی خاک ازت، فسفر و پتاسیم مورد نیاز گیاهان زراعی قبل از کشت و در طول دوره رشد به آنها داده شد. در زمان کاشت ۵ بذر با قوه نامیه بالا با فواصل یکنواخت در هر گلدان کشت و گلدان‌ها در همان روز آبیاری شدند. آبیاری‌های بعدی در زمان مورد نیاز با آبپاش انجام گردید. بسته به دوز فلز سنگین روی در خاک بعد از سبز شدن گیاهان در گلدان ها، آلوده‌سازی

خاک گلدانها به فلز سنگین روی صورت گرفت. یک ماه پس از رویش گیاهان، اندامهای هوایی از سطح خاک کف بر شده و به‌منظور بررسی میزان میزان آنزیم کاتالاز (CAT) و بیومارکر بیوشیمیایی دی تیروزین (D-T) به آزمایشگاه تحویل داده شد.

روش اندازه گیری آنزیم کاتالاز (CAT)

جهت اندازه گیری آنزیم کاتالاز (CAT) دو برگ از گیاه پس از نمونه گیری با آب مقطر شستشو داده شده و بلافاصله در بافر فسفات تریس ۰/۱٦ مولار با pH =۷/۵ وارد، خرد وهموژن خواهد گردید. آنگاه اجازه داده شد تا حجم مشابه از همان بافر حاوی دیجیتونین و آنزیم هضم کننده دیواره فرآیند هضم غشا و دیواره سلول را انجام دهد. در پایان مقدار ۰/۵ میلی لیتر از محلول هموژن برای سنجش پروتئین توسط روش Lowry (۱۹۵۱) برداشته شده و مقدار پروتئین آن بر حسب میلی گرم بر میلی لیتر تعیین می گردد. پس از آن در باقیمانده محلول استخراجی مقدار آنزیم کاتالاز بر اساس روش paglia (۱۹۸۷) مورد انداه گیری قرار خواهد گرفت. دراین روش شدت واکنش حذف آب اکسیژنه به‌عنوان سوبسترا ارزیابی می شود. بافرزمینه برای کار حاوی ۰/۱۷ میلی مول فسفات دی سدیک با pH =۷/۵ همراه ۰/۱۵ مول EDTA، ۰/۱۱ میلی مول کلرید منیزیم می باشد. یک واحد فعالیت آنزیم کاتالاز معادل نسبت تبدیل آب اکسیژنه در مدت یک دقیقه هنگامیکه واکنش درجه اول پیش رود در نظر گرفته خواهد شد.

روش اندازه گیری بیومارکر دی تیروزین (D-T)

جهت اندازه گیری بیومارکر بیوشیمیایی دی تیروزین (D-T)، دو برگ از گیاه استخراج و با آب مقطر شستشو داده شد و بلافاصله در بافر فسفات تریس ۰/۱٦ مولار با pH =۷/۵ وارد، خرد و هموژن گردید. آنگاه اجازه داده شد تا حجم مشابه از همان بافر حاوی دیجیتونین و آنزیم هضم کننده دیواره فرآیند هضم غشا و دیواره سلول را انجام دهد. در پایان مقدار ۰/۵ میلی لیتر از محلول هموژن برای سنجش پروتئین توسط روش استون (۱۹۸۷) برداشته شد و مقدار پروتئین آن بر حسب میلی گرم بر میلی لیتر تعیین گردید. پس از آن در باقیمانده محلول استخراجی مقدار دی تیروزین بر اساس روش استون (۱۹۸۷) مورد ارزیابی قرار گرفت. دراین روش میزان فعالیت بر اساس واکنش به مایع کروماتوگرافی ارزیابی شد. بافر زمینه برای کار حاوی تریس اسید کلریدریک(با pH =۷/۲)، ۰/۲ میلی مول بر لیتر سدیم دی سدیک و ۰/۲ میلی مول بر لیتر آسکوربات بود. یک واحد فعالیت مالون دی آلدئید معادل مقدار آنزیمی که بتواند یک میکرومول از سوبسترا را در یک دقیقه کاتالیز کند، در نظر گرفته شد.

کلیه محاسبات آماری و تجزیه واریانس با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ١٦ تحت ویندوز صورت گرفت. کلیه مقایسه میانگین ها بر اساس روش چند دامنه ای جدید دانکن انجام گرفت. تمامی نمودار ها با استفاده از نرم افزار میکروسافت Excel تحت ویندوز ۲۰۰۷ صورت گرفت.

نتایج و بحث

تاثیر کادمیوم بر میزان آنزیم کاتالاز (CAT)

با توجه به نتایج واریانس، در بین گونه های زراعی و مقادیر مختلف کادمیوم در خاک اختلاف بسیار معنی داری (P<۰/۰۱) از نظر میزان آنریم آنتی اکسیدانت کاتالاز (CAT) مشاهده شد (جدول۱). با توجه به جدول مقایسه میانگین ها به روش دانکن (جدول ۲)، در بین گونه های زراعی مختلف، گونه یونجه، کلزا و ماشک به ترتیب با ۵۵/۷۹، ۵۳/٦٦ و ۵۲/۷۷ (واحد/میلی گرم پروتئین) رتبه های اول تا سوم را از نظر میزان آنزیم کاتالاز (CAT) بخود اختصاص دادند (نمودار ۱). توجه به جدول مقایسه میانگین ها به روش دانکن (جدول ۲)، در بین دوزهای مصرفی کادمیوم در خاک، دوز ۰، ٤۰ و ۸۰ (میلی گرم در کیلوگرم) به ترتیب با ٦۳/۳۰، ٤۹/۵۳ و ٤۹/۳۹ (واحد/میلی گرم پروتئین) رتبه های اول تا سوم را از نظر میزان آنزیم کاتالاز (CAT) بخود اختصاص دادند (نمودار ۲).

احتمالا کاهش در میزان فعالیت آنزیم آنتی اکسیدانت کاتالاز (CAT) در غلظت های بالای فلزات سنگین از جمله کادمیوم (Cd) بر می گردد به غیر فعال شدن این آنزیم از طریق تولید بیش از حد گونه های فعال اکسیژن (ROS) و تجزیه یا تخریب غیر تخصصی آنزیم (١٤) یا پیوند خوردن فلزات سنگین غیر ضروری به جایگاه یا مرکز عمل آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز (٤٤). نوسان در فعالیت آنزیم ها ی آنتی اکسیدانتی در شرایط تنش فلزات سنگین بستگی به گونه های گیاهی (وضعیت فیزیولوژیکی و پتانسیل ژنتیکی گیاه)، زمان اعمال تیمار و میزان غلظت فلز سنگین دارد (٤۰ و ٤۵). کاهش میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در شرایط تنش فلزات سنگین احتمالا از یک طرف به خاطر تاخیر در برداشت H_2O_2 و پروکسیدهای سمی توسط این آنزیم و از طرف دیگر بخاطر تولید بالای رادیکال های آزاد ناشی از پرواکسیداسیون چربی باشد. نتایج مشابهی در کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز در شرایط تنش شوری (۸)، یخ زدگی (۱۲)، خشکی (۵۱) گزارش شده است. کاهش در میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در شرایط تنش شدید فلزات سنگین از جمله کادمیوم می تواند به دلیل غیر فعال شدن پروتئین آنزیم توسط ROS ها یا به خاطر کاهش سنتز آنزیم و یا به سبب تغییر در اجتماع زیر واحد های آنزیم باشد (۱۳، ۱۸ و ۲۵).

تاثیر کادمیوم بر میزان بیومارکر بیوشیمیایی دی تیروزین (D-T)

با توجه به نتایج واریانس، در بین گونه های زراعی اختلاف بسیار معنی داری (P<۰/۰۱) از نظر میزان بیومارکر بیوشیمیایی دی تیروزین (D-T) مشاهده شد (۹). با توجه به جدول مقایسه میانگین ها به روش دانکن (جدول ۲)، می توان اظهار داشت که در بین گونه های زراعی، کلزا با ۱۰/۹۹، یونجه با ۹/۵۹ و ماشک با ۸/۸٦ (میکرو مول در گرم وزن تازه بافت) به ترتیب رتبه اول تا سوم را از نظر میزان بیومارکر بیوشیمیایی دی تیروزین (D-T) به‌خود اختصاص دادند (نمودار ۳).

باتوجه به نتایج تجزیه واریانس، در بین دوزهای مصرفی کادمیوم در خاک اختلاف بسیار معنی داری (P<۰/۰۱) از نظر میزان میزان بیومارکر بیوشیمیایی دی تیروزین (D-T) مشاهده شد (جدول ۱). با توجه به جدول مقایسه میانگین ها به روش دانکن (جدول ۲)، می توان اظهار داشت که در بین دوزهای مصرفی کادمیوم در خاک، دوز ۸۰، ٤۰ و ۰ (میلی گرم در کیلوگرم) به ترتیب با ۱۱/۷۲، ۱۱/۲۰ و ٦/۵۲ (میکرو مول در گرم وزن تازه بافت) رتبه های اول تا سوم را از نظر میزان بیومارکر بیوشیمیایی دی تیروزین (D-T) به خود اختصاص دادند که با نتایج مایسا و همکاران (۲۰۰۸) مطابقت داشت (نمودار٤).

بلادی و همکاران (۲۰۱۱) در تحقیقی به عنوان گیاه پالایی فلز سرب و مس توسط گیاه اسپرس دریافتند که با افزایش غلظت فلز سرب و مس در خاک میزان بیو مارکر های تخریب مالون دی آلدهید (MDA)، دی تیروزین (D-T) و (8-2-OH-DG) 8-hydroxy-2-deoxyguanosine افزایش یافت.

جدول۱: میانگین مربعات آنزیم آنتی اکسیدانت کاتالاز و بیومارکر دی تیروزین تحت تاثیر فلز کادمیوم

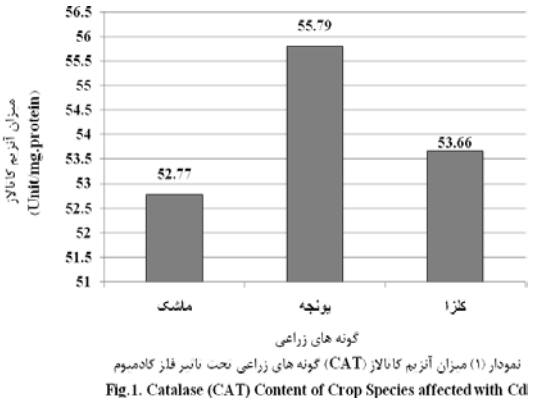
منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		کاتالاز (CAT)	دی تیروزین (D-T)
تکرار	۲	۳/۱۲ ns	۰/۹۵ ns
گونه زراعی	۲	۳۰/۲٦ **	۱۰/۵۸ **
دوز فلز سنگین	۲	۲۵۳/۰۱ **	۷٤/۰٦ **
اثر متقابل گونه زراعی و دوز فلز سنگین	٤	۵/۷۲ *	۲/۲۸ *
اشتباه آزمایشی	۱٦	۱/۲۹	۰/٦٤

**، * و ns: به ترتیب اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ ، ۵٪ و غیر معنی‌دار

جدول۲: مقایسه میانگین میزان آنزیم آنتی اکسیدانت کاتالاز و بیومارکردی تیروزین

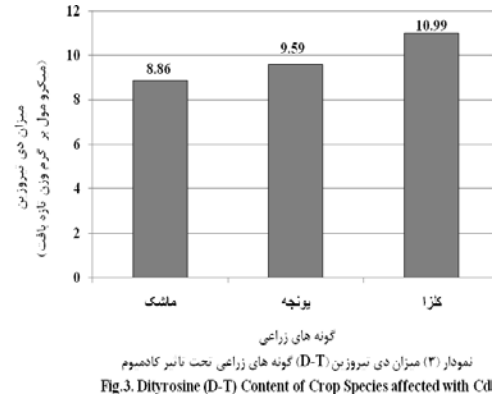
تیمارهای آزمایشی		کاتالاز (U/mg.protein)	دی تیروزین (µMol/g.Fw)
گونه زراعی			
ماشک	(Hairy vetch)	۵۲/۷۷ c*	۸/۸٦ b
یونجه	(Alfalfa)	۵۵/۷۹ a	۹/۵۹ b
کلزا	(Canola)	۵۳/٦٦ ab	۱۰/۹۹ a
دوز فلزکادمیوم			
D_1	۰ (mg/kg.dw soil)	٦۳/۳۰ a	٦/۵۲ b
D_2	٤۰ (mg/kg.dw soil)	٤۹/۵۳ b	۱۱/۲۰ a
D_3	۸۰ (mg/kg.dw soil)	٤۹/۳۹ b	۱۱/۷۲ a

اختلاف میانگین های هر ستون که دارای حروف مشترک هستند از نظر آماری در سطح ۵٪ بر اساس معنی دار نمی باشد.



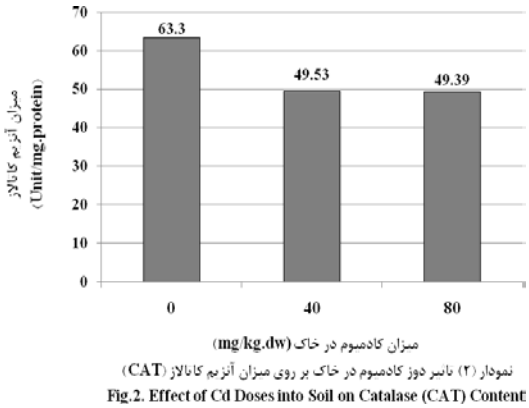
نمودار (۱) میزان آنزیم کاتالاز (CAT) گونه های زراعی تحت تاثیر فلز کادمیوم

Fig.1. Catalase (CAT) Content of Crop Species affected with Cd



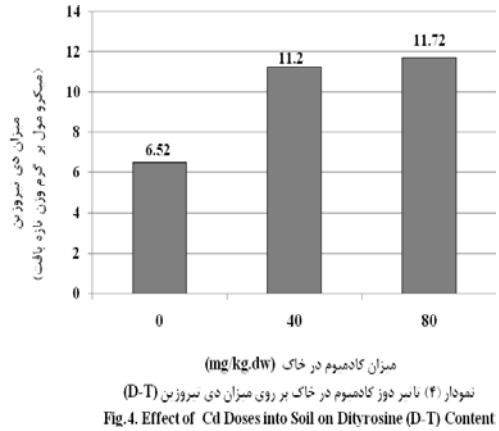
نمودار (۳) میزان دی تیروزین (D-T) گونه های زراعی تحت تاثیر کادمیوم

Fig.3. Dityrosine (D-T) Content of Crop Species affected with Cd



نمودار (۲) تاثیر دوز کادمیوم در خاک بر روی میزان آنزیم کاتالاز (CAT)

Fig.2. Effect of Cd Doses into Soil on Catalase (CAT) Content



نمودار (۴) تاثیر دوز کادمیوم در خاک بر روی میزان دی تیروزین (D-T)

Fig.4. Effect of Cd Doses into Soil on Dityrosine (D-T) Content

باتوجه به نتایج این پژوهش به‌طورکلی با افزایش غلظت فلز کادمیوم در خاک میزان بیومارکر دی تیروزین(D-T) به خاطر افزایش تولید رادیکال های آزاد اکسیژن (ROS)، افزایش یافت. در بین گونه های زراعی مختلف، بیشترین میزان تجمع بیومارکر دی تیروزین مربوط به گونه کلزا بود و در این بین گونه ماشک گل خوشه های کمترین میزان دی تیروزین را به خود اختصاص داد. با افزایش غلظت فلز

کادمیوم در خاک، میزان آنزیم آنتی اکسیدانت کاتالاز (CAT) کاهش یافت. در بین گونه های زراعی مختلف، بیشترین میزان تجمع آنزیم کاتالاز مربوط به گونه یونجه یکساله و کمترین آن متعلق به گیاه ماشک بود. با توجه موارد فوق می توان اظهار داشت که گیاه ماشک در بین سایر گونه های زراعی از تحمل نسبتا خوبی در برابر تنش فلزات سنگین برخوردار می باشد.

منابع

1- Ali, B.M., Vajpayee, P., Tripathi, R.D., Rai, U.N., Singht, S.N. and Singhgh, S.P. 2003. Phytoremediation of lead, nickel and copper by *Salix acmophyllaboiss*. : Role of Antioxidant Enzymes and Antixidant substances. Bull. Environ. Contam. Toxicol**.** 70: 462-469.

2- Baisak, R., Rana, D.A., Acharya, P.B.B. and Kar, M. 1994. Alterations in the activities of active oxygen scavenging enzymes of wheat leaves subjected to water stress. Plant Cell Physiol. 35: 489-495.

3- Becana, M., Dalton, D.A., Moran, J.F., Iturbe-Ormaetxe, I., Matamoros, M.A. and Rubio, M.C. 2000. Reactive oxygen species and antioxidants in legume nodules. Physiol. Plant. 109: 372-381.

4- Beladi, M., Habibi, D., Kashani, A., Paknejad, F. and Nooralvandi, T. 2011. Phytoremediation of Lead and Copper by Sainfoin *(Onobrychis vicifolia)*: *Role of Antioxidant Enzymes and Biochemical Biomarkers*. American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci. 10: 440-449.

5- Cakmak, I. and Horst, W.J. 1991. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities in root tip of soybean (*Glycine max*). Physiol. Plant. 83: 463-468.

6- Chaoui, A., Mazhoudi, S., Ghorbal, M.H. and El-Ferjani, E. 1997. Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Plant Sci. 127: 139-147.

7- Casano, L.M., Gomez, L.D., Lascano, H.R., Gonzales, C.A. and Trippi, V.S. 1997. Inactivation and degradation of CuZn-SOD by active oxygen species in wheat chloroplasts exposed to photo-oxidative stress. Plant Cell Physiology. 38: 433-440.

8- Comba, M.E., Benavides, M.P. and Tomaro, M.L. 1998. Effect of salt stress on antioxidant defence system in soybean root nodules. Aust. J. Plant Physiol. 25: 665-671.

9- Dalurzo, H.C., Sandalio, L.M., Gomez, M. and Delrio, L.A. 1997. Cadmium infiltration of detached pea leaves: effect on its activated oxygen metabolism. Phyton-Annales Rei Botanicae. 37: 59–64.

10- Davey, M.W., Stals, E., Panis, B., Keulemans, J. and Swennen, R.L. 2005. High-Throughput determination of mabndialdehyde in plant tissues. Analytical Biochemistry. 347: 201-207.

11- Dietz, K.J., Baier, M. and Kramer, U. 1999. Free radicals and active oxygen species as mediators of heavy metal toxicity in plants. In: Prasad M.N.V., Hagemeyer J. (Eds.), Heavy Metal Stress in Plants. From Molecule to Ecosystems. Springer, Berlin, pp 73–97.

12- Fadzillah, N.M., Gill, V., Finch, R.P. and Burdon, R.H. 1996. Chilling, oxidative stress and antioxidant responses in shoot cultures of rice. Planta. 199: 552-556.

13- Feieraband, J. and Engel, S. 1986. Photoinactivation of catalase in vitro and in leaves. Arch. Biochem. Biophys. 251: 567-576.

14- **Filek, M., Keskinen, R., Hartikainen, H., Szarejko, I., Janiak, A., Miszalski, Z. and Golda A. 2008.** The protective role of selenium in rape seedlings subjected to cadmium stress. Plant Physiol. 165: 833-844.

15- Gallego, S., Benavides, M. and Tomaro, M. 2002. Involvement of an antioxidant defense system in the adaptive response to heavy metal ions in *Helianthus annuus* L. cells. Plant Growth Regulation. 36: 267–273.

16- Groppa, M.D., Tomaro, M.L. and Benarides, M.P. 2007. Polyamines and heavy metal stress: the antioxidant behavior of spermine in Cadmium and Copper treated wheat leaves. Biometals. 20: 185-195.

17- Hegedus, A., Erdei, S. and Horvath, G. 2001. Comparative studies of H_2O_2 detoxifying enzymes in green and greening barley seedling under cadmium stress. Plant Science. 160: 1085-1093.

18- Hertwig, B., Streb, P. and Feieraband, J. 1992. Light dependence of catalase synthesis and degradation in leaves and the influence of interfer- ing stress conditions. Plant Physiol. 100: 1547-1553.

19- Inzed, D. and Van Montagu, M. 1995. Oxidative stress in plants. Curr. Opin. Biotech. 6: 153.

20- Khatun, S., Ali, M.B., Hahn, E.J. and Paek, K.Y. 2008. Cooper toxicity in withania somnifera: Growth and antioxidant enzymes responses of in vitro grown plants. Environmental and Experimental Botany. 64: 279-285.

21- Kling, J. 1997. Phytoremediation of organics moving rapidly into field trials. Environ. Sci. Technol. 31, A129.

22- Kono, Y. and Fridovich, I. 1982. Superoxide radical inhibits catalase. J. Biological Chemistry. 257: 5751-5754.
23- Lin, C.C. and Kao, C.H. 2000. Effect of NaCl stress on H_2O_2 metabolism in rice leaves. Plant Growth Regul. 30: 151-155.
24- Lowry, O.H., N.J., Rosebrough, Farr, A.L. and Randall, **R.J. 1951.** Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. J. Biol. Chem. 193: 275-265.
25- MacRae, E.A. and Ferguson, I.B. 1985. Changes in catalase activity and hydrogen peroxide concentration in plants in response to low temperature. Physiol. Plant. 65: 51-56.
26- Malanga, G. and Puntarulo, S. 1995. Oxidative stress and antioxidant Content in Chlorella vulgaris after exposure to ultraviolet-B radiation, Physiol. Plant. 94: 672-679.
27- Malecka, A., Jarmuszkiewicz, W. and Tomaszewska, B. 2001. Antioxidative defense to lead stress in subcellular compartments of pea root cells. Acta Biochim. Polon. 48: 687-698.
28- Mashhadi Akbar Boojar, M. and Goodarzi, F. 2007. The Copper tolerance strategies and the role of antioxidative enzymes in three plant species grown on copper mine. Chemosphere**.** 67: 2138-2147.
29- Maysa, M. Hatata and E. Adel Abdel-Aal. 2008. Oxidative Stress and Antioxidant Defense Mechanisms in Response to Cadmium Treatments. American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci. 4: 655-669.
30- McEldowney, S., Hardman, D.J. and Waite, S. 1993. Treatment Technologies. In Pollution Ecology and Biotreatment Technologies (Edited by S. McEldowney J. Hardman, and S. Waite)**.** Longman Singapore Publishers, Singapore.
31- Michalak, A. 2006. Phenolic Compounds and Their Antioxidant Activity in Plants Growing under Heavy Metal Stress. Polish J. of Environ. Stud. 15: 523-530.
32- Mittova, V., Volokita, M., Guy, M., Tal, M. 2000. Activities of SOD and the ascorbate-glutathione cycle enzymes in subcellular compartments in leaves and roots of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii*. Physiol. Plant. 110: 45.
33- Morita, S., Tasaka, M., Fujisawa, H., Ushimaru, T. and Tsuji, H. 1994. A cDNA clone encoding a rice catalase isozyme. Plant Physiol. 105: 1015-1016.
34- Paglia, D.E. and Valentine W.N. 1987. Studies on the quantitative and qualitative characterization of glutathion proxidase. J. Lab. Med. 70: 158-165.
35- Page, A.L., Miler, R.H. and Keeney, D.R. 1982. Methods of soil analysis, 2. Chemical and microbiological properties. American Society of Agronomy and Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin**.**
36- Pais, I.J. and Benton Jones, J.R. 1997. The hand book of trace elements. Publishing by: St. Luice Press Boca Raton Florida.
37- Polle, A. 2001. Dissection of the superoxide dismutase-ascorbate-glutathione pathway by metabolic modeling: computer analysis as a step towards flux analysis. Plant Physiol. 126: 445-462.
38- Prasad, K.V.S.K., Saradhi, P.P. and Sharmila, P. 1999. Concerted action of antioxidant enzymes and curtailed growth under zinc toxicity in *Brassica juncea*. Environ. Exp. Bot. 42: 1-10.
39- Ramadevi, S. and Prasad M.N.V. 1998. Copper toxicity in *Ceratophyllum demeresum* L. (Coontail), a free floating macrophyte: Response of antioxidant enzymes and antioxidants. Plant Sci. 138: 157.
40- Schutzendubel, A. and Polle, A. 2002. Plant responses to abiotic stress: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. J. Exp. Botany. 53: 1351-1365.
41- Shah, K., Kumar, R.G., Verma, S. and Dubey, R.S. 2001. Effect of cadmium on lipid peroxidation, superoxide anion generation and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. Plant Sci. 161: 1135-1144.
42- Sharma, S.S., Kaul, S., Metwally, A., Goyal, K.C., Finkemeier, I. and Dietz, K.J. 2004. Cadmium toxicity to barley *(Hordeum vulgar)* as affected by varying Fe nutritional status. Plant Sci. 166: 1287- 1295.
43- Somashekaraiah, B.V., Padmaja, K.and Prasad, A.R.K. 1992. Phytotoxicity of cadmium ions on germinating seedlings of mung bean (*Phaseolus vulgaris*): involvement of lipid peroxides. in chlorophyll degradation. Physiologia Plantarum. 85: 85–9.
44- Stroinski A. and Kozlowska, M. 1997. Cadmium induced oxidative stress in potato tuber. Acta. Soc. Bot. Pol. 66: 189-195.
45- Tamàs, L., Dudíková, J., Ďurčeková, K., Huttová, J., Mistrík, I. and Zelinová, V. 2008. The impact of heavy metals on the activity of some enzymes along the barley root. Environ. Exp. Bot. 62: 86- 91.
46- Wagner, G. 1993. Accumulation of cadmium in crop plants and its consequences to human health. **Advances in Agronomy.** 51: 173–211.
47- Wojtaszek, P. 1997. Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. Biochem. J. 322: 681.
48- Weast, R.C. 1984. CRC Handbook of chemistry and physics, 64th edn. Boca Raton, CRC Press.
49- Yamamoto, Y. , Hachia, A. and Matsumoto, H. 1997. Oxidative damage to membranes by a combination of aluminum and iron in suspension-cultured tobacco cells. Plant Cell Physiology. 38: 1333-1339.

50- Yamasaki, H., Sakihama, Y., Ikehara, N. 1997. Flavonoid-peroxidase reaction as a detoxification mechanism of plant cell against H_2O_2. Plant Physiol. 115: 1405.
51- Zhang, J. and Kirkham, M.B. 1994. Drought-stress induced changes in activities of superoxide dismutase, catalase and peroxidase in wheat species. Plant Cell Physiol. 35: 785-791.