



تأثیر تنش کادمیوم بر فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانت در ژنوتیپ های مختلف لوبیا

رامین بهمنی^{۱*}، محمدرضا بی همتا^۲، داود حبیبی^۳

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج و عضو باشگاه پژوهشگران جوان واحد کرج، ۲. عضو هیئت علمی

دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران، ۳. عضو هیئت علمی دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج

*رامین بهمنی، دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، email: bahmani_nib@yahoo.com

چکیده:

تنش اکسیداتیو به وسیله تغییرات وسیع فاکتورهای محیطی شامل تنش فلزات سنگین از قبیل کادمیوم ایجاد می شود. بنابراین مکانیسم های مقاومت آنتی اکسیدانتی ممکن است یک استراتژی برای افزایش تحمل به فلزات فراهم کند و پروسه های پاسخ های آنتی اکسیدانتی به تنش فلزات باید به روشنی فهمیده شود و نیز شناخت ژنوتیپ های متحمل به تنش عناصر سنگین امری ضروری می باشد. به منظور بررسی اثر تنش کادمیوم بر میزان فعالیت آنزیم های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز، آزمایشی گلدانی به صورت فاکتوریل در قالب بلوک های کامل تصادفی در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج انجام گرفت. در این آزمایش ۶ ژنوتیپ لوبیا در شرایط گلخانه ای در خاک حاوی کلرید کادمیوم دارای غلظت های صفر (شاهد)، ۴۵mg/kg و ۹۰mg/kg رشد کردند. نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که تأثیر تنش کادمیوم بر صفات فوق در ژنوتیپ های مختلف معنی دار است. به طوریکه در اثر تیمار با کادمیوم میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (۱۴۶/۲٪)، کاتالاز (۹۶/۲٪) و گلوتاتیون پراکسیداز (۹۲٪)، در بالاترین سطح سمیت کادمیوم افزایش معنی داری نسبت به شاهد نشان دادند که این موارد می توانند آثاری از سازوکارهای مقاومت گیاهان در برابر تنش کادمیوم باشد. مقایسه میانگین تیمارها نشان داد که ژنوتیپ های G-01437 و Emerson از نظر میانگین صفات مورد مطالعه در بالاترین سطح سمیت کادمیوم در مقایسه با شاهد، بیشترین فعالیت را به خود اختصاص دادند. با توجه به نتایج بدست آمده افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانت در یک ژنوتیپ خاص اشاره به شاخصی از تحمل به تنش کادمیوم دارد. واژگان کلیدی: تنش اکسیداتیو، کادمیوم، ژنوتیپ، آنزیم های آنتی اکسیدانت.

مقدمه

امروزه آلودگی فلزات سنگین، بیوسفر را در بسیاری از نقاط جهان تحت تأثیر قرار داده است. کادمیوم یکی از بیشترین عناصر سمی حاضر در محیط می باشد که عمدتاً از طریق فعالیت های صنعتی و کودهای فسفاته وارد محیط زیست شده و سپس به زنجیره غذایی انتقال می یابد. کادمیوم به آسانی به وسیله ریشه گیاه جذب می شود و به دیگر قسمت های گیاه انتقال می یابد. تنش فلزات سنگین باعث افزایش تولید گونه های اکسیژن فعال در گیاهان می شود که نتیجه آن افزایش پراکسیداسیون لیپیدها و در نهایت زوال غشاها می باشد. گیاهان دارای مکانیسم های متفاوتی جهت حذف یا کاهش اثرات ناشی از گونه های اکسیژن فعال می باشند. یکی از این سیستم های تدافعی، فعال شدن آنزیم های آنتی اکسیدانی مانند آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز است. افزایش فعالیت این آنزیم ها مقاومت گیاه را به شرایط تنش افزایش می دهد (Zhang et al, 2000). رادیکال های سوپراکسید تولید شده با عملکرد سوپراکسید دیسموتاز (SOD) به H_2O_2 تبدیل شده و فعالیت آنزیم های کاتالاز (CAT) و گلوتاتیون پراکسیداز (GPX) از تجمع H_2O_2 جلوگیری می نمایند، بنابراین تعادل بین تولید گونه های اکسیژن فعال (ROS) و از بین رفتن آن، بقاء سیستم را تضمین می کند. کمبود پروتئین یا عدم توازن بین مصرف پروتئین و هیدرات کربن از مشخصات رژیم غذایی کشورهای در حال توسعه از جمله ایران است. بنابراین یکی از نیازهای اساسی کشور در زمینه تولید محصولات کشاورزی تأمین پروتئین گیاهی

است. در ایران گسترش اماکن صنعتی اطراف شهرهایی نظیر اراک و استفاده از پساب های صنعتی حاوی عناصر سنگین باعث آلودگی خاک در این منطقه که از مناطق مهم کشت لوبیا می باشد، شده است. لذا انتخاب گیاه زراعی مناسب و تولید ژنوتیپ های جدید که در این شرایط بتوانند رشد نمایند و بازده اقتصادی مناسبی را داشته باشند از اهداف کشاورزی است و شناخت ارقام متحمل و مطالعه مکانیسم های تحمل به تنش عناصر سنگین امری ضروری می باشد.

مواد و روش ها:

این پژوهش در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج انجام گرفت. طرح آماری به کار رفته در این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب بلوک های کامل تصادفی با ۴ تکرار بود. فاکتور اول ژنوتیپ در ۶ سطح (AAkhtar, Emerson, Taylor, G-01437, G-14088 و G-11867) و فاکتور دوم فلز سنگین کادمیوم در ۳ سطح صفر (شاهد)، ۴۵mg/kg و ۹۰mg/kg بود. بذره های ۶ ژنوتیپ لوبیا با کمک هیپوکلرید سدیم ضد عفونی و سپس با آب مقطر شست و شو داده شدند. جهت اعمال تیمار کادمیوم، محلول هایی با غلظت های مورد نظر تهیه و جهت جذب بهتر در خاک اسپری شد. پس از گذشت ۴۵ روز، تعداد ۱۲ عدد بذر از هر ژنوتیپ در گلدان های ۷ کیلویی مورد کشت واقع شد. در پایان مرحله رشد شاخص های مورد نظر برای هر تیمار به طور جداگانه مورد آزمایش و بررسی قرار گرفت.

برای اندازه گیری آنزیم سوپراکسید دیسموتاز از روش Misra و همکاران (۱۹۷۲) استفاده شد. تغییرات جذب نوری حاصله از اکسیداسیون اپی نفرین، به عنوان فعالیت آنزیمی ارزیابی و از آنزیم استاندارد و خالص جهت استاندارد نمودن نتایج استفاده شد. میزان فعالیت آنزیم کاتالاز با استفاده از روش Paglia (۱۹۸۷) تعیین شد. واحد فعالیت آنزیم کاتالاز معادل نسبت تبدیل آب اکسیژنه در مدت ۱ دقیقه به هنگام پیشرفت واکنش درجه اول در نظر گرفته شد. همچنین برای اندازه گیری میزان فعالیت آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز از روش Paglia (۱۹۸۷) استفاده شد. یک واحد از فعالیت آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز معادل مقدار آنزیمی که بتواند ۱ میکرو مول از سوپسترا NADPH در یک دقیقه کاتالیز کند در نظر گرفته شده است.

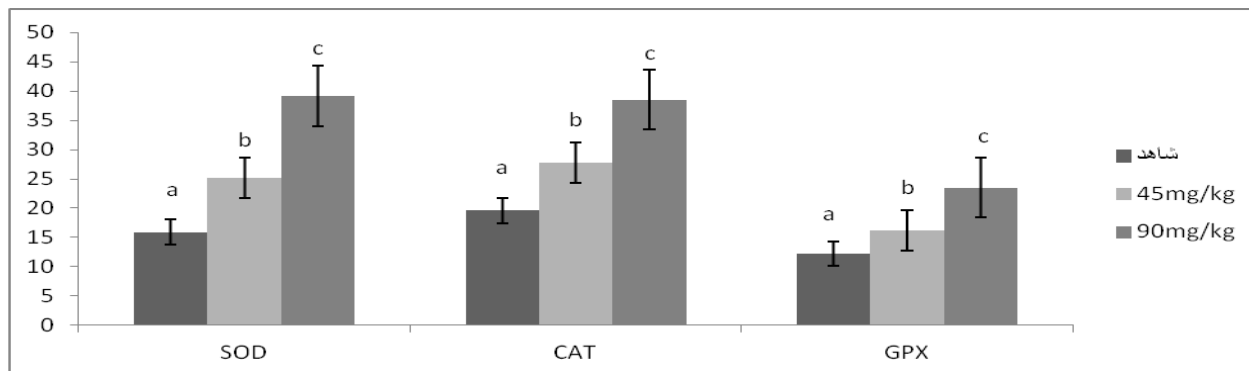
تجزیه واریانس داده های بدست آمده با استفاده از نرم افزار آماری SAS انجام گرفت و مقایسه میانگین ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۱٪ صورت گرفت. جهت ترسیم نمودار نیز از نرم افزار Excel استفاده شد.

نتایج و بحث

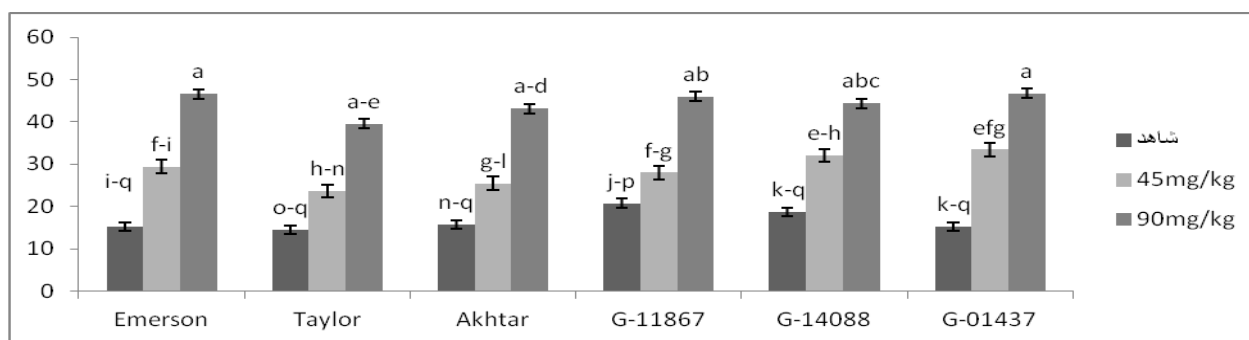
بررسی نتایج تجزیه واریانس برای تمامی صفات حاکی از تأثیر معنی دار تیمار کادمیوم و نیز اثر متقابل ژنوتیپ × کادمیوم در سطح احتمال ۱٪ می باشد. میانگین فعالیت آنزیم های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوکاتایون پراکسیداز در بالاترین سطح سمیت کادمیوم ۱۴۶/۲٪، ۹۶/۲٪ و ۹۲٪ افزایش نسبت به تیمار شاهد نشان داده اند (شکل ۱). در بالاترین سطح سمیت کادمیوم ژنوتیپ های G-01437 و Emerson بیشترین مقدار سوپراکسید دیسموتاز را به خود اختصاص داده اند (شکل ۲). که این افزایش در فعالیت آنزیم SOD توسط سایر محققین نیز گزارش شده است (Scebba et al., 2006). در بین ژنوتیپ ها، Akhtar و G-11867 بیشترین مقدار کاتالاز را دارا می باشند (شکل ۳). همچنین از لحاظ فعالیت آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز ژنوتیپ های Emerson و G-01437 بیشترین مقدار را به خود اختصاص داده اند (شکل ۴). سایر محققان نیز افزایش در فعالیت آنزیم های CAT و GPX را در گونه های گیاهی مختلف گزارش کرده اند (Mashhadi Akbar Boojar and Goodarzi, 2007) در مجموع نتایج این تحقیق نشان داد که سمیت کادمیوم فعالیت های بیوشیمیایی گیاه لوبیا را تحت تأثیر قرار می دهد و این حقیقت را بیان

۱۱ و ۱۲ اسفندماه ۱۳۹۰ دانشگاه آزاد اسلامی خوارسگان دانشکده کشاورزی

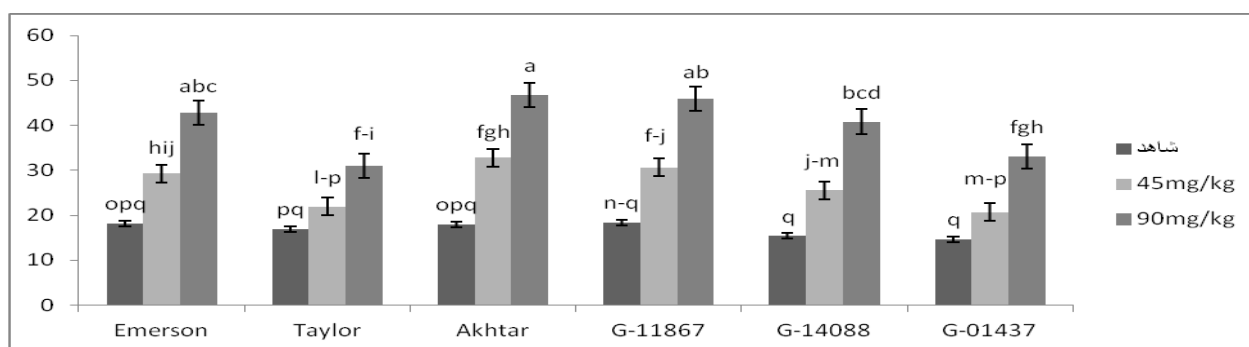
می کند که تغییرات بیوشیمیایی گیاهچه های لوبیا به تنوع ژنتیکی میان ژنوتیپ ها بستگی دارد. با توجه به نتایج، ژنوتیپ های G-01437 و Emerson در مقایسه با سایر ژنوتیپ ها از نظر میانگین صفات مورد مطالعه در بالاترین سطح سمیت کادمیوم، بیشترین فعالیت را به خود اختصاص دادند و از تحمل بیشتری برخوردار بودند.



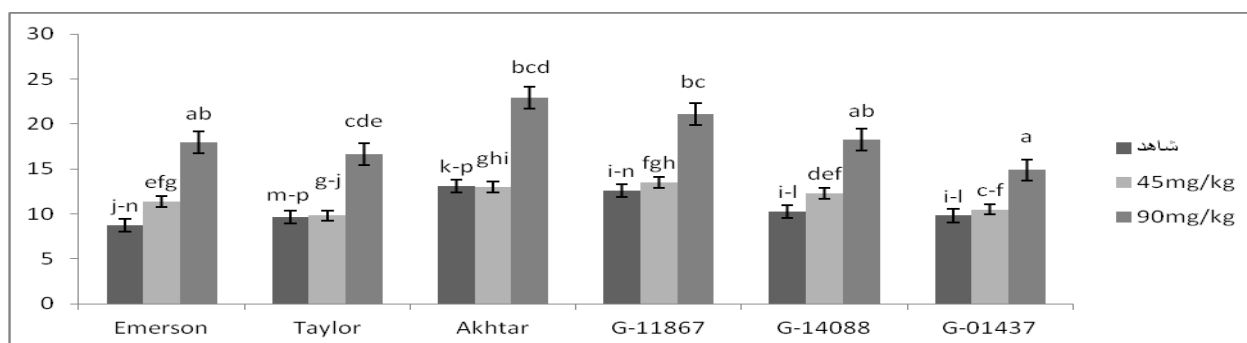
شکل ۱- مقایسه میانگین صفات مورد بررسی در شرایط نرمال و تنش کادمیوم
^{a,b,c} میانگین های دارای حروف مشترک از لحاظ آماری اختلاف معنی داری ندارند



شکل ۲- مقایسه میانگین آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در ژنوتیپ های مختلف تحت شرایط نرمال و تنش کادمیوم
^{a,b,c} میانگین های دارای حروف مشترک از لحاظ آماری اختلاف معنی داری ندارند



شکل ۳- مقایسه میانگین آنزیم کاتالاز در ژنوتیپ های مختلف تحت شرایط نرمال و تنش کادمیوم
^{a,b,c} میانگین های دارای حروف مشترک از لحاظ آماری اختلاف معنی داری ندارند



شکل-۴: مقایسه میانگین آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز در ژنوتیپ های مختلف تحت شرایط نرمال و تنش کادمیوم
^{a,b,c} میانگین های دارای حروف مشترک از لحاظ آماری اختلاف معنی داری ندارند

نتیجه گیری کلی

نتایج بدست آمده از این تحقیق می تواند به عنوان شاخص مفیدی از تحمل به فلز سنگین کادمیوم برای کشت ژنوتیپ های متحمل در مناطق آلوده به فلز سنگین کادمیوم مورد استفاده قرار گیرد.

منابع

- Mashhadi Akbar Boojar. M. and F. Goodarzi, 2007. The Copper tolerance strategies and the role of antioxidative enzymes in three plant species grown on copper mine. *Chemosphere*, 67: 2138-2147.
- Scebba F., Arduini I., Ercoli L., Sebastiani L. 2006. Cadmium effects on growth and antioxidant enzymes activities in *Miscanthus sinensis*. *Biologia Plantarum*, 50: 688-692.
- Zhang, F., Li, X., C. Wang and Z. Shen. (2000). Effect of cadmium on antioxidation rate of tissue and inducing accumulation of free prolin in seedlings of mung bean. *J. Plant Nutr.* 23:356-368.

Abstract

Oxidative stress is induced by a wide range of environmental factors including heavy metals stress such as Cadmium. Therefore, antioxidant resistance mechanisms may provide a strategy to enhance metal tolerance, and processes of antioxidant responses to metal stress must be clearly understood. And also Identification of tolerant cultivars and study of tolerance mechanisms to heavy metal stress is necessary. In order to evaluation of Cadmium stress effect on superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxydase activity, a pot experiment was done in the form of factorial in randomized complete block design (RCBD) in research greenhouse of Islamic Azad University, college of agriculture and natural resources branch of karaj. In this experiment 6 bean seeds genotypes grew in greenhouse conditions in the soil consist of $CdCl_2$ with concentration of 0, 45, 90 mg/kg. The results of analysis of variance indicated that effect of Cd stress on above traits in different bean genotypes were significant. Thus, amount of SOD, CAT and GPX enzymes activities, in the highest level of Cd toxicity, were increased 146.2%, 96.2% and 92% respectively in compared to control that these results can be the effects of tolerance mechanisms of plants against Cd stress. Mean compartion showed that Emerson and G-01437 genotypes have the most activity in the highest level of Cd toxicity by comparsion with control. According to received results, increase in antioxidant activity in an special genotypes is refered to the index of tolerance to Cadmium stress.

Keywords: oxidative stress, Cadmium, genotype, antioxidant enzymes