نشریهٔ پژوهش‌های حبوبات ایران
جلد۷ شمارهٔ۲، صفحهٔ ۱۳۷-۱۲۵، نیمهٔ دوم ۱۳۹۵

Iranian Journal of Pulses Research
Vol. 7, No. 2, 2016, p. 125-137
DOI: 10.22067/ijpr.v7i2.45542

اثر کادمیوم بر تغییرات برخی اجزاء سیستم دفاع آنتی‌اُکسیدان آنزیمی و غیرآنزیمی در گیاهچه‌های عدس

فاطمه بارنده[1] و حمیدرضا کاوسی[2*]

۱ و ۲ به‌ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد و استادیار گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی دانشگاه شهیدباهنر کرمان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۱/۱۶
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۷/۰۶

چکیده

سیستم‌های دفاعی متعددی در فائق‌آمدن گیاهان به شرایط تنش‌زا با یکدیگر همکاری می‌نمایند. یکی از این تنش‌ها آلودگی محیط رویش گیاهان به فلزات سنگین است. در این تحقیق به بررسی اثر غلظت‌های مختلف کلریدکادمیوم بر محتوای پرولین، فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی‌اُکسیدان، فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز و ترکیبات فنلی کل در گیاه عدس پرداخته شده است. از این‌رو، گیاهچه‌های دو هفته‌ای به‌مدت ۱۰روز با غلظت‌های مختلف (صفر (شاهد)، ۰/۱۲۵، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲/۵ و ۵میلی‌مولار) کلریدکادمیوم مورد تیمار قرار گرفتند و فاکتورهای ذکرشده در بالا مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج بررسی نشان‌داد که میزان ترکیبات آنتی‌اُکسیدان غیرآنزیمی (پرولین و فنل) کادمیوم به‌طور معنی‌داری در گیاهچه‌های تیمارشده در مقایسه با شاهد افزایش داد. نتایج حاصل از اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اُکسیدان نشان‌داد که با افزایش غلظت کادمیوم، میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اُکسیدان سوپراُکسیددیسموتاز، کاتالاز و آسکوربات‌پراُکسیداز در گیاهچه‌های عدس افزایش پیدا می‌کند. هرچند این افزایش در غلظت‌های بیشتر از ۰/۵میلی‌مولار مشهودتر بود. با افزایش میزان کادمیوم در محیط، میزان فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز نیز افزایش نشان‌داد. روند افزایش میزان فعالیت این آنزیم در پاسخ به غلظت‌های مختلف کادمیوم، همانند آنزیم‌های آنتی‌اُکسیدان بود. هرچند میزان القاء فعالیت این آنزیم در مقایسه با آنزیم‌های آنتی‌اُکسیدان بیشتر بود. از نتایج حاصل می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که سیستم دفاع آنتی‌اُکسیدانی آنزیمی، پرولین و ترکیبات فنلی تولیدشده از طریق مسیر فنیل‌پروپانوئید نقش کلیدی در پاسخ گیاه عدس به تنش فلز سنگین کادمیوم ایفاء می‌کنند.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های آنتی‌اُکسیدان، ترکیبات فنلی کل، عدس، فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز، کادمیوم

مقدمه

گیاهان طی چرخه زندگی خود معمولاً در معرض انواع وسیعی از تنش‌های محیطی قرار می‌گیرند که از جمله آن‌ها می‌توان به تنش فلزات سنگین اشاره نمود. فلزات سنگین خطرناک‌ترین آلاینده‌ها هستند که در پوسته زمین و رسوبات وجود دارند (Babula *et al*., 2008). آلودگی خاک با فلزات سنگین یکی از مشکلات زیست‌محیطی عمده در جوامع بشری است که علاوه‌بَر اثرات زیان‌آور بر فون و فلور خاک و آلودگی آب‌های زیرزمینی از طریق آبشویی، موجب کاهش عملکرد و کیفیت محصول و در نهایت به خطر افتادن سلامتی افراد جامعه و دیگر موجودات زنده می‌شود. اگرچه فلزات سنگین می‌توانند به‌طور طبیعی و از طریق هوادیدگی سنگ‌ها و کانی‌ها و طی فرایند خاک‌سازی در خاک تجمع یابند، ولی این منبع طبیعی در مقایسه با آلودگی ناشی از فعالیت‌های انسان از جمله احداث کارخانجات صنعتی، استخراج معادن، سوخت‌های فسیلی، مصرف کودهای شیمیایی و آلی، فاضلاب‌های صنعتی و لجن فاضلاب دارای اهمیت کمی می‌باشد (Benavides *et al*., 2005).

برخی فلزات سنگین مانند روی ، نیکل و مس، چون بخشی از ترکیبات مهم رنگیزه‌ها و آنزیم‌ها را تشکیل می‌دهند، جزء عناصر ضروری محسوب می‌شوند و فقط در غلظت‌های بالاتر از نیاز فیزیولوژیک گیاهان آثار سمی دارند. ولی برخی دیگر از فلزات سنگین مانند کادمیوم و سُرب که جزء فلزات غیرضروری محسوب می‌شوند، حتی در غلظت‌های پایین نیز آثار سمی روی گیاهان دارند و به‌همین علت این فلزات سنگین به‌عنوان عوامل تنش‌زا برای گیاهان محسوب می‌شوند (Callahan *et al*., 2005). در بین فلزات سنگین، فلز کادمیوم به علت سمیت قابل‌توجه، تحرک و پویایی زیاد در خاک و حلالیت بالا در آب و همچنین جذب سریع توسط سیستم ریشه‌ای بسیاری از گونه‌های گیاهی، نیمه‌عمر بیولوژیکی حدود

* **نویسنده مسئول:** دانشگاه شهیدباهنر کرمان، دانشکده کشاورزی، بخش بیوتکنولوژی، تلفن: ۰۳۴۳۳۲۰۲۶۵۴، تلفن همراه: ۰۹۱۵۵۲۵۰۰۹۳،
hrkavousi@uk.ac.ir

۲۰سال و بروز عوارضی از جمله نارسایی کبد و کلیه، بیماری‌های قلبی-عروقی، استخوانی، ریوی و غیره در انسان دارای اهمیت خاصی می‌باشد (Vassilev *et al*., 1998). میزان این عنصر در اثر استفاده از فاضلاب کارخانه‌های صنعتی و شهری به‌همراه مصرف بی رویه حشره‌کش‌ها و مقادیر بالای کودهای شیمیایی به‌ویژه فسفاته در زمین‌های زراعی در حال افزایش است (John *et al*., 2008). کادمیوم میل ترکیبی شدیدی با گروه‌های سولفیدریل، هیدروکسیل و لیگاندهای حاوی نیتروژن دارد. در نتیجه این عنصر بسیاری از آنزیم‌های مهم را غیرفعال کرده که منجر به اختلال در فتوسنتز، تنفس و سایر فرآیندهای متابولیک در گیاه می‌گردد (Torres *et al*., 2000). یکی از دلایل بروز سمیت ناشی از کادمیوم در گیاهان، برهم‌کنش آن با عناصر غذایی ضروری گیاه است. تأثیر کادمیوم بر جذب و توزیع عناصر غذایی در گیاه می‌تواند دلیل برخی کمبودهای عناصر در گیاهان باشد که باعث بَرهم‌خوردن تعادل عناصر غذایی و کاهش باروری گیاه می‌گردد (Dudka *et al*., 1996). یکی از آسیب‌های مهم بافتی که در اثر قرارگرفتن گیاهان در معرض فلزات سنگین از جمله کادمیوم رخ می‌دهد، افزایش تولید گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) مانند سوپراُکسید، پراُکسیدهیدروژن و رادیکال هیدروکسیل و ایجاد تنش اُکسیداتیو است (Schutzendubel *et al*., 2001). انواع مختلف اکسیژن فعال می‌توانند به ترکیبات حیاتی سلول مانند اسیدهای چرب غیراشباع، پروتئین‌ها و اسیدهای‌نوکلئیک حمله نمایند. این واکنش‌ها به‌طور طبیعی ویژگی‌هائی چون سیالیت غشاء، انتقال یونی، فعالیت آنزیمی و سنتز پروتئین‌ها را کاهش داده و باعث تخریب DNA هسته‌ای و میتوکندریائی و در نهایت مرگ سلولی می‌شوند (Zhang *et al*., 2003). یکی از واکنش‌هایی که در حضور انواع اکسیژن فعال سرعت بیشتری پیدا می‌کند، پراُکسیداسیون لیپیدهای غشائی است. اثر رادیکال‌های اکسیژن بر لیپیدها و پراُکسیداسیون آن‌ها ناشی از اثر بر پیوندهای دوگانه اسیدهای چرب غیراشباع می‌باشد که واکنش‌های زنجیره پراُکسیداسیون را تحریک کرده و منجر به تخریب اسیدهای چرب می‌شوند. اثر گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) بر تخریب DNA هسته‌ای شامل تغییرشکل، اُکسیداسیون اُوکسی‌ریبوز، شکستگی رشته DNA و موتاسیون می‌باشد که در بین انواع متنوع ترکیبات ROS، رادیکال هیدروکسیل نقش مهم‌تری را در این زمینه ایفاء می‌کند. رادیکال‌های آزاد اکسیژن باعث تخریب اُکسیداتیو پروتئین‌ها می‌شود. گزارش شده است که تخریب ایجادشده در جایگاه خاصی از آمینواسیدها در پروتئین رخ می‌دهد (Ferreira *et al*., 2002). میزان آسیب سلول‌های تحت تنش فلزات سنگین به‌میزان تولید رادیکال‌های آزاد و ROS و همچنین کارآیی مکانیسم‌های سم‌زدایی در گیاهان بستگی دارد. برای مقابله با تنش اُکسیداتیو ایجادشده، یک سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی با کارآیی بالا در گیاهان وجود دارد که می‌توانند رادیکال‌های آزاد را از بین برده، خنثی و یا جاروب کنند. این سیستم شامل آنزیم‌های آنتی‌اُکسیداسیون مانند کاتالاز(CAT)، سوپراُکسیددیسموتاز (SOD)، آسکوربات پراُکسیداز (APX)، فنل‌پراُکسیداز (POX) و گایاکول‌پراُکسیداز (GPX) و نیز سیستم آنتی‌اکسیدانی غیرآنزیمی شامل آسکوربات، آلفاتوکوفرول، کاروتنوئیدها، ترکیبات فنلی، پرولین و گلوتاتیون می‌باشد (Shahid *et al*., 2014).

یکی از مکانیسم‌های حفاظتی غیرآنزیمی تحریک‌شده تحت تنش‌های غیرزیستی از جمله تنش فلزات سنگین، بیوسنتز ترکیبات فنلی است. این ترکیبات در شرایط مطلوب محیطی نیز در سلول‌های گیاهی سنتز می‌شوند، اما تنش‌های محیطی مختلف مقدار آن‌ها را در سلول تغییر می‌دهند (Kliebenstein, 2004). ترکیبات فنلی دارای خاصیت آنتی‌اُکسیدانتی هستند که با جمع‌آوری و احیای گونه‌های فعال اکسیژن از اکسیداسیون مولکول‌های زیستی حیاتی سلول پیشگیری کرده و مانع بروز تنش اکسیداتیو و یا تخفیف اثرات آن در سلول‌های گیاه می‌شوند (Myung-Min *et al*., 2009). فلاونوئیدها، آنتوسیانین‌ها، تانن‌ها، هیدروکسی‌سینامیک استرها و لیگنین‌ها جزء متابولیت‌های ثانویه حاصل از مسیر فنیل‌پروپانوئید می‌باشند که در بافت‌های گیاهی به‌وفور یافت می‌شوند. آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز (PAL) آغازگر مسیر فینل‌پروپانوئید می‌باشد که L-فنیل‌آلانین را با دآمیناسیون به ترانس‌سینامیک‌اسید تبدیل می‌کند. این مسیر، مسیر اصلی بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه در سلول می‌باشد. این آنزیم کلیدی در تشکیل ترکیبات فنلی (یکی از مکانیسم‌های دفاعی غیرآنزیمی در گیاهان) نقش اساسی داشته و به‌عنوان یکی از شاخص‌های حساس به تغییرات محیطی و همچنین یکی از نشانگرهای بیوشیمیایی دفاعی گیاه در برابر تنش‌های محیطی مطرح می‌باشد (Boudet, 2007; Vogt, 2010).

در این تحقیق به‌منظور بررسی عملکرد سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیرآنزیمی گیاه عدس (*Lens culinaris* Medik.) در مقابل سمیت کادمیوم، محتوای پرولین، میزان فعالیت آنزیم‌هایی نظیر کاتالاز، سوپراُکسیددیسموتاز، آسکوربات پراُکسیداز و فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز و همچنین ترکیبات فنلی کل در پاسخ به

غلظت‌های مختلف کلرید کادمیوم در گیاهچه‌های عدس موردبررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

کشت بذور و تیمار کادمیوم

در این تحقیق از عدس (*Lens culinaris* Medik.) رقم گچساران استفاده شد. در ابتدا سطح بذور با اتانل ۷۵درصد به‌مدت ۳۰ثانیه و هیپوکلریت‌سدیم پنج‌درصد به‌مدت ۲دقیقه ضدعفونی و به کمک آب‌مقطر چندین‌بار شستشو داده شد. بذرها به‌مدت ۲۴ساعت در پتری‌دیش‌های ۹سانتی‌متری حاوی کاغذ واتمن قرار داده شده و درون انکوباتور ۲۵درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس بذرهای جوانه‌زده به گلدان‌های حاوی نسبت مساوی از کوکوپیت و شن بادی شسته‌شده منتقل شدند. میانگین دمای روزانه در طول این آزمایش ۲۵درجه سانتی‌گراد درنظر گرفته شد. گلدان‌ها پس از کاشت در اتاقک‌رشد، تحت شرایط ۱۶ساعت نور و ۸ساعت تاریکی قرار گرفتند. گیاهان به‌مدت ۱۴روز به‌صورت یک‌روزدرمیان با آب‌مقطر آبیاری شدند و پس از این‌که گیاهان به مرحله دو تا چهاربرگی رسیدند، به‌مدت ۱۰روز در معرض غلظت‌های مختلف کلرید کادمیوم (صفر (شاهد)، ۰/۱۲۵، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲/۵ و ۵میلی‌مولار) قرار گرفتند.

استخراج عصارهٔ پروتئینی

به‌منظور سنجش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، سوپراُکسیددیسموتاز و آسکوربات‌پراُکسیداز از نمونه‌های منجمد عصارهٔ آنزیمی تهیه گردید و جذب کلیه واکنش‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری شد. برای تهیه عصارهٔ آنزیمی میزان ۱۰۰میلی‌گرم بافت (بخش هوایی) توزین و به‌همراه یک میلی‌لیتر بافر استخراج شامل فسفات‌پتاسیم ۱۰۰میلی‌مولار با pH=۷/۸، EDTA ۰/۱ میلی‌مولار و PVP ۱٪ در هاون چینی سرد و بر روی یخ همگن گردید. سپس عصاره‌های حاصل در ۱۳۰۰۰دور در دقیقه و در دمای چهار درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰دقیقه سانتریفیوژ شد و محلول رویی حاصل در ظرف‌های استریل جمع‌آوری گردید. محلول رویی به‌دست‌آمده به‌عنوان عصارهٔ آنزیمی جهت اندازه‌گیری فعالیت سه آنزیم کاتالاز، سوپراُکسیددیسموتاز، آسکوربات پراُکسیداز مورد استفاده قرار گرفت.

جهت اندازه‌گیری پروتئین نمونه‌ها از روش Bradford (1976) استفاده شد. قرائت جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵نانومتر انجام شد. غلظت پروتئین با استفاده از منحنی استاندارد آلبومن گاوی محاسبه و بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تَر محاسبه گردید.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم سوپراُکسیددیسموتاز

فعالیت آنزیم سوپراُکسیددیسموتاز (EC ۱. ۱۵. ۱. ۱) از طریق اندازه‌گیری توانایی آن در جلوگیری از احیای نوری نیتروبلوتترازولیوم‌کلراید (NBT) اندازه‌گیری شد (Dhindsa *et al.*, 1981). سه‌میلی‌لیتر مخلوط واکنش شامل فسفات‌پتاسیم ۵۰میلی‌مولار (pH= ۷/۸)، متیونین ۱۳میلی‌مولار، نیتروبلوتترازولیوم‌کلراید ۷۵میکرومولار، اتیلن‌دی‌آمین تتراستیک‌اسید ۰/۱میلی‌مولار، ریبوفلاوین ۳۶۰میکرومولار و ۳۰میکرولیتر عصارهٔ خام بود. پس از آن‌که مخلوط به‌هم زده شد، سِل‌های اسپکتروفتومتر به‌مدت ۱۰دقیقه در زیر یک لامپ فلورسنت ۱۵w به‌فاصله ۳۵سانتی‌متر قرار داده شد. با خاموش‌کردن لامپ واکنش متوقف و جذب مخلوط واکنش در ۵۶۰نانومتر خوانده شد. یک واحد فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز، مقدار آنزیمی درنظر گرفته می‌شود که می‌تواند تا ۵۰درصد مانع از احیای نوری نیتروبلوتترازولیوم‌کلراید گردد. فعالیت ویژه آنزیم به‌صورت تعداد واحدهای آنزیم در میلی‌گرم پروتئین گزارش گردید.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آسکوربات‌پراُکسیداز

فعالیت آنزیم آسکوربات‌پراُکسیداز (EC ۱. ۱۱. ۱. ۱۱) به‌روش Nakano & Asada (1987) اندازه‌گیری گردید. یک میلی‌لیتر مخلوط واکنش شامل بافر فسفات‌پتاسیم یک‌مولار (pH= ۷/۸)، آسکوربات ۱۰میلی‌مولار، پراُکسیدهیدرژن ۱۰میلی‌مولار و ۱۰میکرولیتر عصارهٔ خام بود. فعالیت آنزیم آسکوربات‌پراُکسیداز بر اساس میزان اُکسیدشدن آسکوربات در طول موج ۲۹۰نانومتر و با استفاده از ضریب خاموشی $2/8\ mM^{-1}cm^{-1}$ تعیین گردید.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز

به‌منظور اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز (EC ۱. ۱۱. ۱. ۶) از روش Beers & Sizer (1952) استفاده شد. یک‌میلی‌لیتر مخلوط واکنش، شامل بافر فسفات‌پتاسیم یک‌مولار (pH= ۷/۸)، پراُکسیدهیدرژن یک‌مولار و ۱۰میکرولیتر عصارهٔ خام بود. فعالیت آنزیم کاتالاز بر اساس میزان تجزیه‌شدن H_2O_2 در طول موج ۲۴۰نانومتر با استفاده از ضریب خاموشی $39/4\ mM^{-1}cm^{-1}$ تعیین گردید.

سنجش ترکیبات فنلی کل

محتوای ترکیبات فنلی کل با استفاده از روش Velioglu *et al,* (1998) انجام گرفت. ۰/۱گرم از نمونه‌ها با پنج‌میلی‌لیتر

متانول ۸۰درصد حاوی اسیدکلریدریک یک‌درصد سائیده و به‌مدت ۲ساعت در دمای اتاق روی شیکر عصاره‌گیری کامل شد. سپس مخلوط حاضر در ۳۰۰۰g سانتریفوژ و از محلول رویی جهت تعیین ترکیبات فنلی کل استفاده شد. به ۱۰۰میکرولیتر از محلول رویی۷۵۰میکرولیتر معرف فولین اضافه و مخلوط حاصل به‌مدت پنج‌دقیقه در دمای اتاق نگه‌داری شد. سپس ۷۵۰میکرولیتر کربنات‌سدیم ۶درصد به‌آن اضافه گردید. پس از۹۰دقیقه جذب هر نمونه در طول موج ۷۲۵نانومتر خوانده شد. برای محاسبه غلظت ترکیبات فنلی کل با استفاده از اسیدگالیک منحنی استاندارد رسم گردید و غلظت ترکیبات فنلی بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تَر گزارش گردید.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز

سنجش فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز (EC ۴. ۳. ۱. ۲۴) با استفاده از غلظت اسیدسینامیک تولیدشده و بر اساس میزان اسیدسینامیک تولیدشده صورت گرفت (Wang *et al.*, 2006). بدین‌منظور ۳۰۰میلی‌گرم از بافت تَر نمونه‌ها با ۶/۵میلی‌لیتر بافر تریس–HCl ۵۰ میلی‌مولار (pH = ۸/۸) حاوی بتامرکاپتواتانول ۱۵میلی‌مولار در هاون سرد شده سائیده شد. سپس عصارهٔ به‌دست‌آمده با دور ۵۰۰۰۰g به‌مدت ۳۰دقیقه در دمای چهاردرجه سانتی‌گراد سانتریفوژ گردید. محلول رویی برای سنجش فعالیت آنزیم مورد استفاده قرار گرفت. در این روش از فنیل‌آلانین به‌عنوان سوبسترای آنزیمی استفاده و فعالیت آنزیم PAL براساس سرعت تشکیل اسیدسینامیک تعیین گردید. در یک لوله آزمایش یک‌میلی‌لیتر از بافر استخراج به‌همراه ۰/۵میلی‌لیتر L-فنیل‌آلانین ۱۰میلی‌مولار، ۰/۴میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر و یک‌میلی‌لیتر عصارهٔ آنزیمی مخلوط و به‌مدت یک‌ساعت در دمای ۳۷درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. واکنش با اضافه‌کردن ۰/۵میلی‌لیتر اسیدکلریدریک شِش‌مولار پایان یافت. محصول به‌وجود آمده با ۱۵میلی‌لیتر اتیل‌استات استخراج و سپس اتیل‌استات بخار گردید. ماده جامد باقیمانده در سه‌میلی‌لیتر هیدروکسیدسدیم ۰/۰۵مولار حل شد و غلظت سینامیک‌اسید با اندازه‌گیری میزان جذب در طول موج ۲۹۰نانومتر و با استفاده از ضریب خاموشی معادل $M^{-1}Cm^{-1}$ ۹۵۰۰ تعیین گردید. یک واحد از فعالیت PAL معادل یک میکرومول از سینامیک‌اسید تولید شده در یک دقیقه می‌باشد. فعالیت ویژه آنزیم به‌صورت تعداد واحدهای آنزیم در میلی‌گرم پروتئین گزارش گردید.

اندازه‌گیری پرولین

برای تعیین مقدار پرولین از روش Bates *et al*, (1973) استفاده شد. بدین‌منظور پنج‌گرم از نمونه‌های تَر برگ در ۱۰میلی‌لیتر اسیدسولفوسالسیلیک سه‌درصد به‌وسیله هاون هموژن شده و عصارهٔ حاصل صاف گردید. به ۲میلی‌لیتر از عصارهٔ صاف شده فوق ۲میلی‌لیتر اسیداستیک و ۲میلی‌لیتر اسید نایندرین (شامل ۰/۰۵گرم نایندرین، ۱/۲میلی‌لیتر اسیداستیک و ۰/۸ میلی‌لیتر اسیدارتوفسفریک شش‌مولار) اضافه شد. محلول حاصل به‌مدت یک‌ساعت در حمام آب و در دمای ۱۰۰درجه سانتی‌گراد قرار داده شد، پس از آن برای پایان‌یافتن واکنش لوله‌های آزمایش در داخل یک بستر یخی قرار گرفتند و چهارمیلی‌لیتر تولوئن به‌هر لوله اضافه شد. غلظت پرولین نمونه‌ها در تولوئن با استفاده از اسکپتروفتومتر در طول موج ۵۲۰نانومتر و در نهایت با توجه به منحنی استاندارد حاصل از غلظت‌های مختلف پرولین، میزان پرولین نمونه‌ها برحسب میکرومول بر گرم وزن تَر محاسبه شد.

تجزیه و تحلیل‌های آماری

کلیه آزمایشات در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه‌تکرار انجام شد. تجزیه واریانس داده‌های به‌دست‌آمده با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS انجام گرفت. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال پنج‌درصد صورت گرفت. جهت ترسیم نمودار از نرم‌افزارExcel استفاده شد.

نتایج و بحث

اثر کلریدکادمیوم بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان

نتایج نشان‌داد که با افزایش غلظت کادمیوم در محیط میزان فعالیت آنزیم سوپراُکسیددیسموتاز، کاتالاز و آسکوربات‌پراُکسیداز به‌طور معنی‌داری ($P< ۰/۰۵$) در گیاهچه‌های عدس افزایش پیدا می‌کند. غلظت‌های پایین کلریدکادمیوم سبب افزایش معنی‌دار میزان فعالیت این آنزیم‌ها در مقایسه با گیاه شاهد نشد. با افزایش غلظت کادمیوم در محیط به ۰/۵میلی‌مولار و بیشتر، افزایش معنی‌دار فعالیت این آنزیم در مقایسه با گیاهان شاهد مشاهده شد. بیشترین فعالیت هر سه آنزیم در گیاهانی مشاهده گردید که به‌مدت ۱۰روز در معرض غلظت پنج‌میلی‌مولار قرار گرفته بودند. ۱۰روز تیمار گیاهچه‌ها با این غلظت از کلریدکادمیوم به‌ترتیب منجر به افزایش ۳، ۲ و ۱/۵برابری فعالیت آنزیم سوپراُکسیددیسموتاز، کاتالاز و آسکوربات‌پراُکسیداز در مقایسه با گیاهان شاهد گردید (شکل ۱).

در شرایط عادی رشد، بسیاری از فرایندهای متابولیکی تولید ROS می‌کنند. گیاهان دارای سیستم‌های آنتی‌اُکسیدانتی

پیچیده‌ای برای گُریز از اثرات مضرROS هستند. در شرایط تنش، تشکیلROS بیشتر از توانایی گیاه برای برطرف‌کردن آن است و در نتیجه منجر به صدمات اکسیداتیو، اُکسیدکردن رنگیزه‌های فتوسنتزی و خسارت به لیپیدهای غشایی، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک در گیاهان می‌شود (Laspina *et al*., 2005).

سیستم آنتی‌اُکسیدانتی آنزیمی یکی از مکانیسم‌های اصلی سمیت‌زُدایی فلزات سنگین در گیاهان می‌باشد. آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت نقش مهمی را در سازگاری و بقای گیاهان در طی دوره‌ی تنش ایفاء می‌کنند. میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اُکسیدانت بسته به‌مدت و نوع تنش، گونه گیاهی و بخش‌های گیاه متفاوت است (Dinakar *et al*., 2009).

در این مطالعه تنش کادمیوم باعث افزایش در فعالیت آنزیم‌های SOD، CAT و APX شد که می‌تواند دلیل غیرمستقیمی بر افزایش فعالیت رادیکال‌های آزاد تحت تنش کادمیوم در گیاهچه‌های عدس باشد. هرچند به‌نظر می‌رسد با افزایش غلظت کادمیوم به بیش از ۰/۵میلی‌مولار، میزان تولید ترکیبات سمی ROS شدت بیشتری پیدا کرده و گیاه برای مبارزه با رادیکال‌های آزاد تولیدشده، القاء فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی خود را افزایش بیشتری داده است. سوپراُکسیددیسموتاز اولین و مهم‌ترین آنزیم در فرآیند سمیت‌زدایی ترکیبات ROS است که با تبدیل رادیکال سوپراُکسید (O^{2-}) به H_2O_2 در سیتوسول، کلروپلاست و میتوکندری، تقش حیاتی در مکانیسم‌های دفاعی سلول در برابر خطر تشکیل رادیکال هیدروکسیل (OH) ایفاء می‌کند. پراُکسیدهیدرژن حاصله در مرحله بعدی به‌وسیله آنزیم‌هایی نظیر کاتالاز و آسکوربات‌پراُکسیداز پاک‌سازی می‌شود (Benavides *et al*., 2005). آنزیم سوپراُکسیددیسموتاز حمایت‌کننده گیاهان در شرایط تنش فلزات سنگین، برای مقابله با گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) تولیدی در شرایط تنش می‌باشد. با توجه شکل۱ که نشان‌دهنده فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز است، با افزایش غلظت کادمیوم در محیط رشد، میزان فعالیت آنزیم نیز افزایش یافت. کادمیوم سبب القاء فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانت مذکور در گونه موردمطالعه بسته به‌میزان غلظت فلز شد، به‌طوری‌که بیشترین فعالیت این آنزیم نیز در بالاترین سطح سمیت کادمیوم (پنج‌میلی‌مولار) مشاهده شد. کنترل سطح O^{2-} توسط این آنزیم (SOD) در شرایط ماندگار مکانیزم حفاظتی مهمی در مقابل تنش اُکسیدی در سلول می‌باشد، زیرا O^{2-} به‌عنوان پیشگامی برای مشتقات سمی‌تر یا فعال‌تر از جمله پراکسی‌نیتریت یا HO^{-} عمل می‌کند (Khatun *et al*., 2008).

افزایش مشابهی در فعالیت آنزیم SOD در پاسخ به کادمیوم در توت‌سفید (Tewari *et al*., 2008) و لوبیا (Ahmadvand *et al*., 2013) گزارش شده است. همچنین افزایش کادمیوم سبب القاء فعالیت سوپراُکسیددیسموتاز در *Achnatherum inebrians* می‌شود (Zhang *et al*., 2010).

میزان فعالیت آنزیم کاتالاز نیز که آنزیمی مؤثر در تجزیه پراُکسیدهیدرژن می‌باشد، تحت تنش کادمیوم در برگ‌های عدس افزایش پیدا کرد. کاتالاز یک آنزیم پاک‌سازی‌کننده پراُکسیدهیدروژن است، در نتیجه با افزایش فعالیت این آنزیم پراُکسیدهیدروژن از طریق شکستن آن به آب و اکسیژن، حذف می‌شود. اگر چه پراُکسیدهیدروژن در غلظت‌های بالا سمی است و به‌وسیلهٔ آنزیم کاتالاز و آسکوربات‌پراُکسیداز چرخهٔ آنتی‌اکسیدانتی آسکوربات‌گلوتاتیون از بین می‌رود، اما در غلظت‌های پایین می‌تواند نقش پیام را در فرآیندهای انتقال پیام بازی کند و ژن‌های وابسته به مقاومت را در گیاه، فعال کند (Unyayar *et al*., 2005).

القاء فعالیت کاتالاز باعث غلبه بر تنش اُکسیداتیو از طریق سم‌زدایی پراُکسیدهیدروژن شده و از تولید رادیکال هیدروکسیل جلوگیری و پروتئین‌ها، اسیدهای‌نوکلئیک و چربی‌ها را در برابر ترکیبات ROS محافظت می‌کند (Rastgoo & Alemzadeh, 2011). در این تحقیق فعالیت آنزیم کاتالاز هماهنگ با فعالیت آنزیم SOD در گیاهچه‌های عدس قرارگرفته در معرض تنش کادمیوم القاء شد که این امر به نقش حفاظتی مهم این آنزیم در فرآیند مهار H_2O_2 و O^{2-} و مکمل‌بودن نقش کاتالاز و سوپراُکسیددیسموتاز در متابولیسم سلول اشاره دارد.

افزایش در فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و سوپراُکسیددیسموتاز تحت سمیت کادمیوم در یونجه یک‌ساله گزارش شده است (Mohammadi *et al*., 2011).

در این تحقیق فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدان آسکوربات پراُکسیداز در اثر تنش کادمیوم به‌طور معنی‌داری افزایش پیدا کرد. هرچند این افزایش در مقایسه با افزایش در میزان فعالیت دو آنزیم دیگر کمتر بود. معمولاً فعالیت آنزیم آسکوربات‌پراُکسیداز در طول فعالیت سایر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در پاسخ به فاکتورهای تنش زا افزایش می‌یابد. یکی از منابع تولیدکننده H_2O_2 در سلول‌های گیاهی آنزیم SOD است که از طریق دیسموتاسیون سوپراُکسید در کلروپلاست منجر به تولید H_2O_2 می‌گردد. آنزیم کاتالاز قادر به زدایش H_2O_2 از محیط می‌باشد. اما از آن‌جایی‌که این آنزیم در پراکسی‌زوم سلول‌های برگی واقع شده و در کلروپلاست یافت نمی‌شود، بنابراین H_2O_2 تولید شده در کلروپلاست به‌وسیله دو فرم آسکوربات‌پراُکسیداز متصل به غشا، تیلاکوئید و

آسکوربات‌پراُکسیداز استرومایی از محیط حذف می‌گردند. نتایج حاصل از این تحقیق نشان‌داد که به موازات افزایش فعالیت آنزیم SOD، میزان فعالیت آنزیم APX نیز افزایش می‌یابد (Mittler, 2002).

این آنزیم از آسکوربات به‌عنوان عامل احیاکننده استفاده می‌کند و H_2O_2 را از طریق چرخهٔ آسکوربات-گلوتاتیون تجزیه می‌نماید. در این چرخه با فعالیت آنزیم APX، آسکوربات به مونودهیدروآسکوربات اُکسید می‌شود و برای ادامه چرخه تولید دوباره آسکوربات لازم است. به‌همین‌منظور در این چرخه آنزیم‌های مونودهیدروآسکوربات‌ردوکتاز، دهیدروآسکوربات‌ردوکتاز و گلوتاتیون‌ردوکتاز فعالیت می‌کنند و با استفاده از NAD(P)H و گلوتاتیون، آسکوربات را احیاء می‌کنند (Mittler, 2002).

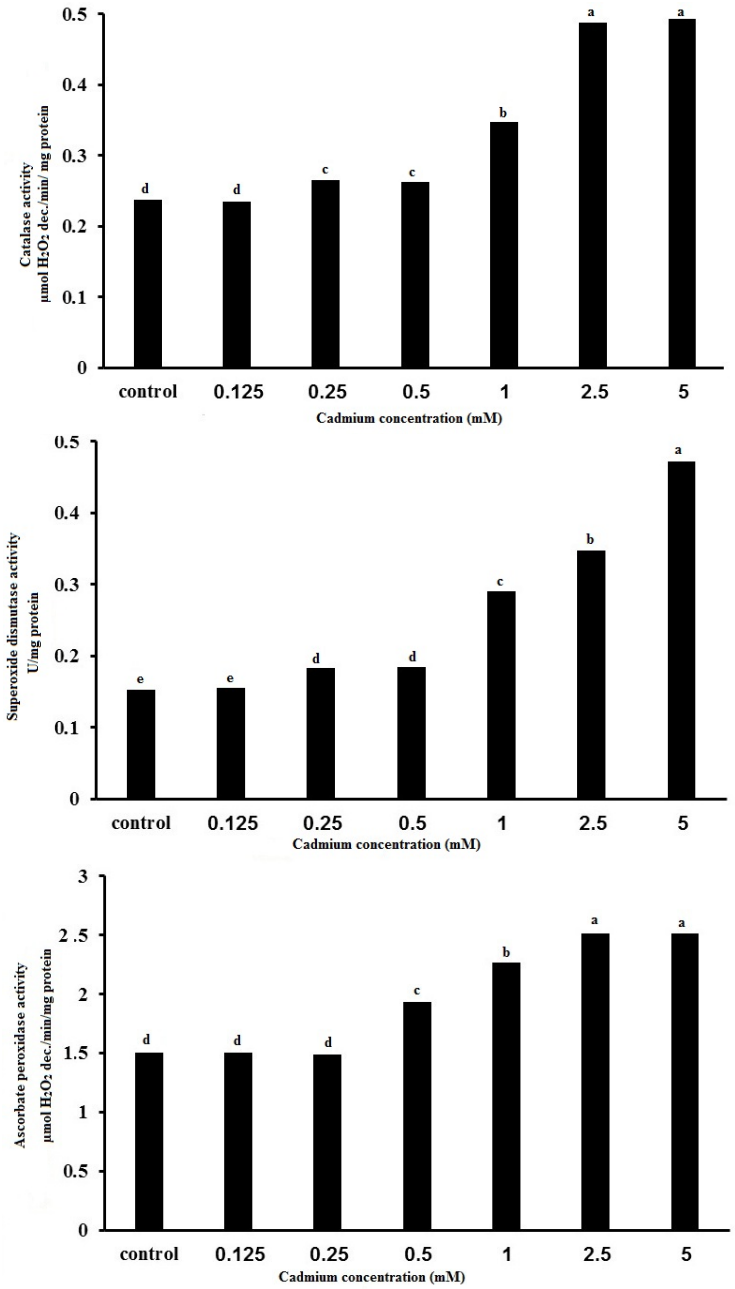
افزایش در فعالیت آنزیم کاتالاز و آسکوربات‌پراُکسیداز در گیاهچه‌های عدس قابل‌انتظار بود، زیرا افزایش در فعالیت آنزیم SOD منجر به تولید H_2O_2 می‌شود که در مراحل بعدی باید به‌وسیله این آنزیم‌ها سمیت‌زدایی شود، تا وضعیت ردااکس سلولی حفظ شود. بنابراین در شرایط تنش کادمیوم بالارفتن فعالیت SOD به‌تنهایی نمی‌تواند از گیاه در برابر سمیت رادیکال‌های اکسیژن محافظت کند و افزایش فعالیت دیگر آنزیم‌ها (کاتالاز و پراُکسیداز) در سمیت‌زدایی H_2O_2 ضروری است. نتایج مشابه حاکی از افزایش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراُکسیداز و سوپراُکسیددیسموتاز تحت تنش نیترات‌کادمیوم در رقم صفه گیاه گلرنگ بود (Badpa *et al.*, 2015).

اثر کلریدکادمیوم بر میزان ترکیبات فنلی کل و فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز

نتایج نشان‌داد که با افزایش غلظت کادمیوم در محیط میزان فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز به‌طور معنی‌داری افزایش پیدا می‌کند. به‌طور مشابه القاء فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، غلظت‌های پایین کلریدکادمیوم سبب القاء شدید میزان فعالیت آنزیم PAL نشد و با افزایش میزان کادمیوم به‌بیش از۰/۵میلی‌مولار شاهد افزایش معنی‌دار ($P< ۰/۰۵$) فعالیت آنزیم در مقایسه با شاهد بودیم. بیشترین میزان فعالیت آنزیم در گیاهانی مشاهده شد که ۱۰روز در معرض غلظت پنج‌میلی‌مولار کلریدکادمیوم قرار داشتند. میزان فعالیت آنزیم در گیاهان قرارگرفته در این غلظت پس از ۱۰روز حدود پنج‌برابر گیاهان شاهد بود که به‌مراتب بیشتر از میزان القاء فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان بود (شکل ۲).

نتایج حاصل از اندازه‌گیری ترکیبات فنلی کل نیز نشان‌داد که با افزایش غلظت کادمیوم در محیط، میزان ترکیبات فنلی به‌طور معنی‌داری افزایش می‌یابد. در غلظت‌های پایین کلریدکادمیوم میزان افزایش در مقایسه با شاهد معنی‌دار نبود و افزایش غلظت کادمیوم در محیط به ۰/۵میلی‌مولار و بیشتر سبب افزایش معنی‌دار ($P< ۰/۰۵$) در میزان ترکیبات فنلی گیاه گردید. بیشترین میزان فعالیت آنزیم در گیاهانی مشاهده شد که ۱۰روز در معرض غلظت پنج‌میلی‌مولار کلریدکادمیوم قرار داشتند. ترکیبات فنلی به‌عنوان یکی از ترکیبات آنتی‌اکسیدان شناخته شده‌اند که با مکانیسم‌های متعدد مثل رُبایش رادیکال‌های آزاد، خاموش‌کردن اکسیژن یکتایی، کلات‌کردن یون‌های فلزی و یا قرارگرفتن به‌عنوان سوبسترای آنزیم‌های پراُکسیداز، نقش آنتی‌اکسیدانی خود را ایفاء می‌کنند. این ترکیبات همچنین با انتقال سریع هیدرژن به رادیکال‌های لیپید، از ادامه زنجیره پراُکسیداسیون لیپیدها ممانعت می‌کنند (Chu & Chang, 2000). ترکیبات فنلی در شرایط طبیعی در سلول سنتز می‌گردند، اما تنش‌های محیطی مقدار آن‌ها را در سلول تغییر می‌دهد. تغییر در بیوسنتز آنزیم‌های بیوسنتزکننده یا تجزیه‌کننده این ترکیبات بر مقدار آن‌ها در سلول تأثیر می‌گذارد. فلاونوئیدها، آنتوسیانین‌ها، تانن‌ها، هیدروکسی‌سینامیک استرها و لیگنین‌ها از ترکیبات فنلی و جزء متابولیت‌های ثانویه حاصل از مسیر فنیل‌پروپانوئید می‌باشند که در بافت‌های گیاهی به‌وفور یافت می‌شوند. آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز (PAL) آغازگر مسیر فنیل‌پروپانوئید می‌باشد که L-فنیل‌آلانین را با دآمیناسیون به ترانس‌سینامیک‌اسید تبدیل می‌کند (Solecka, 1997). افزایش فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز که اولین آنزیم مسیر بیوسنتز فنل‌ها است، در پاسخ به برخی تنش‌های زیستی و غیرزیستی گزارش شده است. آنزیم PAL می‌تواند به‌عنوان آنزیم آنتی‌اکسیدان درنظر گرفته شود، زیرا دارای خاصیت به‌دام‌اندازی رادیکال‌های اکسیژن از طریق ترکیبات فنلی تولید شده است (Tian & Li, 2007). در این تحقیق مشاهده شد که تنش کلریدکادمیوم باعث افزایش فعالیت این آنزیم شده است و این افزایش به‌موازات افزایش در میزان ترکیبات فنلی کل گیاه در مواجهه با تنش می‌باشد. افزایش میزان ترکیبات پُلی‌فنلی تحت تنش کادمیوم و آرسنیک در گیاه *Albizia procera* گزارش شده است (Pandey & Tripathi, 2011). افزایش میزان ترکیبات فنلی در گیاه چمن شور (*Aeluropus littoralis*) قرارگرفته در معرض تنش کادمیوم نیز گزارش شده است (Rastgoo & Alemzadeh, 2011). در گیاه بابونه تحت تنش کادمیوم و مس نیز افزایش فعالیت آنزیم PAL گزارش شده است (Kovacik & Backor, 2007). با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق و افزایش میزان ترکیبات فنلی کل و افزایش

شدید میزان فعالیت آنزیم PAL در گیاهچه‌های عدس قرار گرفته در معرض تنش کادمیوم که در مقایسه با میزان القاء فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نیز بیشتر بود، به‌نظر می‌رسد که افزایش ترکیبات مختلف فنلی حاصل از مسیر فنیل‌پروپانوئید (به‌عنوان یک جزء آنتی‌اکسیدان غیرآنزیمی) نقش بسیار مهمی در پاسخ گیاه عدس به تنش فلز سنگین کادمیوم ایفاء می‌کند.



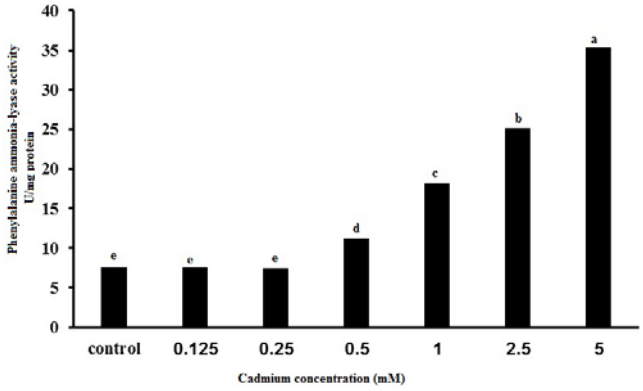
شکل ۱- اثر کادمیوم بر میزان فعالیت آنزیم سوپراُکسیددیسموتاز، کاتالاز و آسکوربات‌پراُکسیداز گیاهچه‌های عدس

مقایسه میانگین‌ها (میانگین سه‌تکرار) با استفاده از آزمون دانکن انجام شد (P<۰/۰۵).

میانگین‌هایی که حداقل یک حرف مشترک دارند، از نظر آماری اختلاف معنی‌داری ندارند (P<۰/۰۵).

Fig. 1. Effect of Cadmium on superoxide dismutase, catalase and ascorbate peroxidase activity in lentil seedlings

Values are means (n = 3) ± SE. Means followed by the same letters are not significantly different for P < 0.05 according to the Duncan's test.



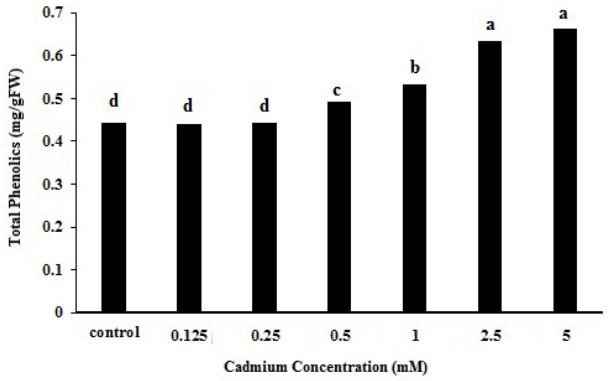
شکل ۲- اثر کادمیوم بر میزان فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز گیاهچه‌های عدس

مقایسه میانگین‌ها (میانگین سه تکرار) با استفاده از آزمون دانکن انجام شد (P<۰/۰۵).

میانگین‌هایی که حداقل یک حرف مشترک دارند، از نظر آماری اختلاف معنی‌داری ندارند (P<۰/۰۵).

Fig. 2. Effect of Cadmium on Phenylalanine ammonialyase activity in lentil seedlings

Values are means (n = 3) ± SE. Means followed by the same letters are not significantly different for P < 0.05 according to the Duncan's test.



شکل ۳- اثر کادمیوم بر میزان ترکیبات فنلی کل گیاهچه‌های عدس

مقایسه میانگین‌ها (میانگین سه‌تکرار) با استفاده از آزمون دانکن انجام شد (P<۰/۰۵).

میانگین‌هایی که حداقل یک حرف مشترک دارند، از نظر آماری اختلاف معنی‌داری ندارند (P<۰/۰۵)

Fig. 3. Effect of Cadmium on total phenolics in lentil seedlings

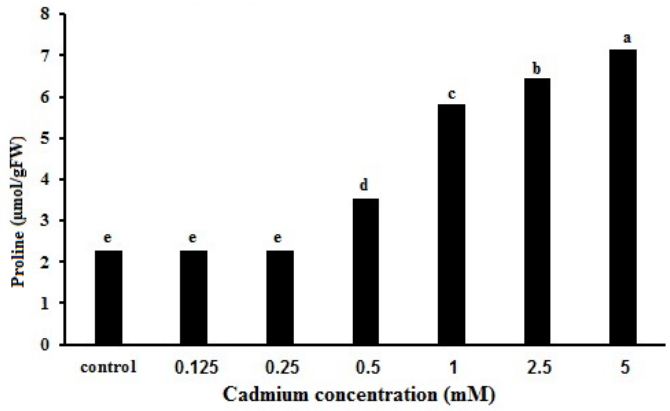
Values are means (n = 3) ± SE. Means followed by the same letters are not significantly different for *P* < 0.05 according to the Duncan's test.

اثر کادمیوم بر میزان پرولین

نتایج نشان‌داد که با افزایش غلظت کادمیوم در محیط میزان پرولین به‌طور معنی‌داری (P<۰/۰۵) افزایش یافت. همان‌گونه که نتایج مقایسه میانگین در مورد این صفت نشان می‌دهد، کمترین میزان پرولین مربوط به سطح بدون تنش بود، اعمال اولین و دومین سطح تنش کلریدکادمیوم (۰/۱۲۵ و ۰/۲۵۰ میلی‌مولار) منجر به افزایش معنی‌دار محتوای پرولین در گیاه عدس نشد. محتوای پرولین با افزایش بیشتر سطح تنش کلریدکادمیوم افزایش یافت و بیشترین میزان پرولین در سطح کلریدکادمیوم پنج‌میلی‌مولار مشاهده گردید (شکل ۴).

در اثر افزایش غلظت کادمیوم میزان پرولین در برگ‌ها تا سه‌برابر افزایش یافت. در حقیقت مکانیسم متابولیسمی گیاه عدس جهت مقابله با تنش کادمیوم احتمالاً منجر به افزایش میزان این ترکیب شده است. نتایج مشابهی در اثر تنش کادمیوم در دیگر گیاهان نظیر تاجریزی (*Solanum nigrum*) (Sun *et al*., 2007)، لوبیا (*Phaseolus vulgaris*) (Ahmadvand *et al*., 2013)، عدسک آبی (*Lemna polyrrhiza*) (John *et al*., 2008)، بادام‌زمینی (*Arachis hypogaea*) (Dinakar *et al*., 2009) و چمن‌شور (*Aeluropus littoralis*) به‌دست آمده است (Rastgoo & Alemzadeh, 2011).

به‌خوبی مشخص شده است که پرولین در محدوده وسیعی از موجودات از باکتری تا گیاهان عالی به‌هنگام مواجهه با تنش‌های غیرزیستی تجمع می‌یابد. در پاسخ به تنش فلزات سنگین، مقادیر قابل‌توجهی پرولین در گیاهان تجمع می‌یابد. تجمع پرولین در گیاهان تحت تنش با کاهش خسارت در غشاء سلولی و پروتئین‌ها در ارتباط می‌باشد. سنتز پرولین در کاهش پتانسیل اسمزی سیتوپلاسمی و حفظ نسبت $NADP/NADPH^{+}$ دخالت دارد. همچنین پرولین به‌عنوان یک اسمولیت، جاروب‌کننده رادیکال‌ها، تثبیت‌کننده ماکرومولکول‌ها و یک جزء دیواره سلولی عمل می‌کند. اهمیت تجمع پرولین در حفظ وضعیت آبی گیاه بیشتر از اهمیت سایر مواد آلی است و پرولین به‌عنوان رایج‌ترین اسمولیت انباشته‌شده در شرایط تنش عمل می‌کند. پرولین به‌عنوان یک محافظ شیمیایی باعث پایداری فرم طبیعی پروتئین‌ها شده و از به‌هم‌خوردن شکل طبیعی ترکیبات آنزیمی ممانعت می‌نماید و کلات‌کننده فلزات است و از پراُکسیداسیون لیپیدها جلوگیری می‌کند و باعث حفظ تمامیت غشاء می‌گردد. بنابراین، در هنگام تنش فلزات سنگین، تولید پرولین افزایش می‌یابد تا گیاه را در مقابل سمیت حفظ نماید (Hayat *et al*., 2012).



شکل ۴- اثر کادمیوم بر میزان پرولین گیاهچه‌های عدس

مقایسه میانگین‌ها (میانگین سه‌تکرار) با استفاده از آزمون دانکن انجام شد (P<۰/۰۵).

میانگین‌هایی که حداقل یک حرف مشترک دارند، از نظر آماری اختلاف معنی‌داری ندارند (P<۰/۰۵).

Fig. 4. Effect of Cadmium on proline content in lentil seedlings

Values are means (n = 3) ± SE. Means followed by the same letters are not significantly different for P < 0.05 according to the Duncan's test.

نتیجه‌گیری

افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و افزایش تولید آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی (پرولین و ترکیبات فنلی) در گیاهچه‌های عدس به‌دنبال قرارگرفتن در معرض کادمیوم، دلیلی بر سمیت کادمیوم و تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن در گیاه می‌باشد که آسیب‌های اکسیداتیو و خسارات فیزیواوژیک را به‌دنبال دارد. افزایش غلظت کادمیوم منجر به افزایش میزان پرولین، ترکیبات فنلی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان گیاهچه‌ها شد که این مورد می‌تواند نشانه‌ای از مکانیسم‌های مقاومت گیاه عدس در برابر تنش فلز سنگین کادمیوم باشد.

منابع

1. Ahmadvand, S., Bahmani, R., Habibi, D., and Forouzesh, P. 2013. Investigation of cadmium chloride effect on growth parameters and some physiological characteristics in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings. Journal of Agronomy and Plant Breeding 8(4): 167-182. (In Persian).
2. Babula, P., Adam, V., Opatrilova, R., Zehnalek, J., Havel, L., and Kizek, R. 2008. Uncommon heavy metals, metalloids and their plant toxicity: a review. Environmental Chemistry Letters 6: 189-213.
3. Badpa, K., Movahhedi Dehanvi, M., and Yadavi, A. 2015. Interaction of cadmium nitrite and salicylic aside on antioxidant enzyme activity and leaf soluble protein and malondialdehyde of safflower

(*Carthamus tinctorius* L. cv. Soffe). Journal of Plant Process and Function 3(9): 21-32. (In Persian with English Summary).
4. Bates, L.S., Waldren, R.P., and Teare, I.D. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant and Soil 39: 205-207.
5. Beers, R.F., and Sizer, I.W. 1952. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. Journal of Biological Chemistry 195: 133-140.
6. Benavides, M.P., Gallego, S.M., and Tomaro, M.L. 2005. Cadmium toxicity in plants. Brazilian Journal of Plant Physiology 17: 21-34.
7. Boudet, A.M. 2007. Evolution and current status of research in phenolic compounds. Phytochemistry 68: 2722-2735.
8. Bradford, M.M. 1976. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.
9. Callahan, D.L., Baker, A.J.M., Kolev, S.D., and Wedd, A.G. 2005. Metal ion ligands in hyper accumulating plants. Journal of Biological Inorganic Chemistry 11: 2-12.
10. Chu, Y.H., Chang, C.L., and Hsu, H.F. 2000. Flavonoid contents of several vegetable and their antioxidant activity. Journal of Agriculture and Food Science 80: 561-566.
11. Dhindsa, R.A., Plumb-Dhindsa, P., and Thorpe T.A. 1981. Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. Journal of Experimental Botany 126: 93-101.
12. Dinakar, N., Nagajyothi, P.C., Suresh, S., Damodharam, T., and Suresh, C. 2009. Cadmium induced changes on proline, antioxidant enzymes, nitrate and nitrite reductases in *Arachis hypogaea* L. Journal of Environmental Biology 30(2): 289-294.
13. Dudka, S., Piotrowska, M., and Terelak, H. 1996. Transfer of cadmium, lead and zinc from industrially contaminated soil to crop plants: A field study. Environmental Pollution 94: 181-188.
14. Ferreira, R.R., Fornazir, R.F., Vitoria, A.P., and Lea, P.J. 2002. Changes in antioxidant enzyme activities in soybean under cadmium stress. Journal of plant Nutrition 25: 327-342.
15. Hayat, S., Hayat, Q., Alyemeni, M.N., Wani, A.S., Pichtel, J., and Ahmad, A. 2012. Role of proline under changing environments. Plant Signaling and Behavior 7(11): 1456-1466.
16. John, R., Ahmad, P., Gadgil, K., and Sharma, S. 2008. Effect of cadmium and lead on growth, biochemical parameters and uptake in *Lemna polyrrhiza* L. Plant, Soil & Environment 54(6): 262-270.
17. Khatun, S., Babar Ali, M., Hahn, E.J., and Paek, K.Y. 2008. Copper toxicity in *Withania somnifera*: Growth and antioxidant enzymes responses of in vitro grown plants. Environmental and Experimental Botany 64: 279-285.
18. Kovacik, J., and Backor, M. 2007. Phenylalanine ammonialyase and phenolic compounds in chamomile tolerance to cadmium and copper excess. Water, Air & Soil Pollution 185: 185-193.
19. Kliebenstein, D.J. 2004. Secondary metabolites and plant/environment interactions: a view through Arabidopsis thaliana tinged glasses. Plant Cell and Environment 27: 675-684.
20. Laspina, N.V., Groppa, M.D., Tomaro, M.L., and Benavides, M.P. 2005. Nitric oxide protects sunflower leaves against Cd-induced oxidative stress. Plant Sciences 169(2): 323-330.
21. Mohammadi, M., Habibi, D., Ardakani, M., and Asgharzadeh, A. 2011. Effect of biologic fertilizers, homic acid and super absorbent polymer on chlorophyll content, membrane and superoxide dismutase and catalase activity in annual *Medicago* species under cadmium toxicity. 6(2): 79-65. (In Persian).
22. Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. TRENDS in Plant Science 7(9): 405-410.
23. Myung-Min, H., Trick, H.N., and Rajasheka, E.B. 2009. Secondary metabolism and antioxidant are involved in environmental adaptation and stress tolerance in lettuce. Journal of Plant Physiology 166: 180-191.
24. Nakano, Y., and Asada, K. 1987. Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplast: in inactivation in ascorbate-depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical. Plant Cell Physiology 28: 131-140.

25. Pandey, P., and Tripathi, A.K. 2011. Effect of heavy metals on morphological and biochemical characteristics of *Albizia procera* benth seedlings. International Journal of Environmental Sciences 1(5): 1009-1018.
26. Rastgoo, L., and Alemzadeh, A. 2011. Biochemical responses of Gouan (*Aeluropus littoralis*) to heavy metals stress. Australian Journal of Crop Science 5(4): 375-383.
27. Schutzendubel, A., Schwanz, P., Teichmann, T., Gross, K., Langenfeld, R., Douglas, L., and Polle, A. 2001. Cadmium-induced changes in antioxidative systems, hydrogen peroxide content, and differentiation in Scots pine roots. Plant Physiology 127: 887-898.
28. Shahid, M., Pourrut, B., Dumat, C., Nadeem, M., Aslam, M., and Pinelli, E. 2014. Heavy-metal induced reactive oxygen species: phytotoxicity and physicochemical changes in plants. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology 232: 1-44.
29. Solecka, D. 1997. Role of phenylpropanoid compounds in plant responses to different stress factor. Plant Physiology 19: 257-268.
30. Sun, R.L., Zhou, Q.X., Sun, F.H., and Jin, C.X. 2007. Antioxidative defense and proline/phytochelatin accumulation in a newly discovered Cd hyperaccumulator, *Solanum nigrum* L. Environmental and Experimental Botany 60: 468-476.
31. Tewari, R.K., Kumar, P., and Sharma, P.N. 2008. Morphology and physiology of zinc-stressed mulberry plants. Journal of Plant Nutrition and Soil Science 171: 286-294.
32. Tian, X., and Li, Y. 2007. Nitric oxide treatment alleviates drought stress in wheat seedlings. Biologia Plantarum 50: 775-778.
33. Torres, E., Cid, A., Herrero, C., and Abalde, J. 2000. Effect of cadmium on growth, ATP content, carbon fixation and ultra-structure in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin. Water, Air & Soil Pollution 117: 1-14.
34. Unyayar, S., Kele, Y., and Cekic, F.O. 2005. The antioxidative response of two tomato species with different drought tolerances as a result of drought and cadmium stress combinations. Plant Soil Environment 51(2): 57-64.
35. Vassilev, A., Tsonev, T., and Yordanov, I. 1998. Physiological response of barley plants (*Hordeum vulgare*) to cadmium contamination in soil during ontogenesis. Environmental Pollution 103: 287-293.
36. Velioglu, Y.S., Mazza, G., Gao, L., and Oomah, B.D. 1998. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. Journal of Agricultural and Food Chemistry 46: 4113-4117.
37. Vogt, T. 2010. Phenylpropanoid biosyntesis. Molecular Plant 3: 2-20.
38. Wang, J.W., Zheng, L.P., Wu, J.Y., and Tan, R.X. 2006. Involvement of nitric oxide in oxidative burst phenylalanine ammonialyase activation and taxol production induced by low-energy ultrasound in *Taxus yunnanensis* cell suspension cultures. Nitric Oxide Biology and Chemistry 15: 351-358.
39. Zhang. F., Shi, W., Jim, Z., and Shen, Z. 2003. Response of antioxidative enzymes in cucumber chloroplasts to cadmium toxicity. Journal of Plant Nutrition 26: 1779-1788.
40. Zhang, X., Fan, X., Li, C., and Nan, Z. 2010. Effects of cadmium stress on seed germination, seedling growth and antioxidative enzymes in *Achnatherum inebrians* plants infected with a Neotyphodium endophyte. Plant Growth Regulation 60: 91-97.

Iranian Journal of Pulses Research
Vol. 7, No. 2, 2016, p. 125-137

Effect of Cadmium on changes of some enzymatic and none-enzymatic antioxidant defense systems in lentil seedlings (*Lens culinaris* Medik.)

Barandeh, F. & Kavousi,* H.R.

Department of Biotechnology, College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

Received: 5 April 2015
Accepted: 28 September 2015

DOI: 10.22067/ijpr.v7i2.45542

Introduction

Throughout their life cycle, plants are subjected to various types of environmental stresses which include salinity, water deficit, temperature extremes, toxic metal ion concentration and UV radiation. These environmental factors limit the growth and productivity of plants to various degrees, depending upon severity of stress. Heavy metal toxicity is one of the major current environmental health problems and potential dangerous due to bioaccumulation through the food chain and in plant products for human consumption. Cadmium (Cd) is a high toxic trace element that enters the environment mainly from industrial processes and phosphate fertilizers. It can reach high levels in agricultural soil and is easily accumulated in plants. Cd ions are taken up readily by the plant roots and translocated to the above-ground vegetative parts. The presence of Cd at higher concentrations in the soil damages root tips, reduces nutrient and water uptake, impairs photosynthesis and inhibits growth of the plants. Furthermore, Cd directly or indirectly induces reactive oxygen species (ROS), which affect the redox status of the cell and cause oxidative damage to proteins, lipids, and other biomolecules. Cd damages the nucleoli in cells of the root tip, alters the synthesis of RNA, inhibits ribonuclease activity and inhibits the DNA repairing mechanism. Understanding the biochemical and molecular responses to Cd stress is essential for a holistic opinion of plant resistance mechanisms of heavy metal stress.

Materials and Methods

In this study, the effect of different concentrations of cadmium on proline and phenolic contents, activity of some antioxidative enzymes such as superoxide dismutase, catalase and ascorbate peroxidase, phenylalanine ammonialyase in *Lense culinaris* Medik. was studied. Therefore, two-week-old plantlets were treated with different concentrations of cadmium chloride (0 as control, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2.5 and 5 mM) of cadmium chloride for 10 days and then the above mentioned factors were investigated. The experiments were carried out by using a complete randomized block design with three replications. The statistical analyses were carried out using the SAS version 9. Changes in biochemical parameters were tested statistically by performing one-way analysis of variance (ANOVA). The treatment means separated using Duncan's multiple-range test (DMRT) taking $P < 0.05$ as significant.

Results and Discussion

Surveying the results indicated that the amount of non-enzymatic antioxidant compounds (phenol and proline) were increased in treated seedlings compared with the control. Review of the literature indicates that a stressful environment results in an overproduction of proline in plants which in turn imparts stress tolerance by maintaining cell turgor or osmotic balance; stabilizing membranes thereby preventing electrolyte leakage; and bringing concentrations of ROS within normal ranges, thus preventing

* **Corresponding Author:** hrkavousi@uk.ac.ir, Mobile: 09155250093

oxidative burst in plants. The increase in phenolic content may be due to protective function of these compounds against heavy metal stress by metal chelation and ROS scavenging. The results obtained from measuring the activity of antioxidant enzymes showed that with increasing concentrations of cadmium, the activity of antioxidant enzymes superoxide dismutase, catalase and ascorbate peroxidase were increased in lentil seedlings. However, this increase was more evident at concentrations greater than 0.5 mM. These results suggest that lentil seedlings tend to cope with free radicals generated by Cd through coordinated, enhanced activities of the antioxidative enzymes involved in detoxification. With increasing levels of cadmium in the medium, the activity of the phenylalanine ammonialyase also increased. The trend of phenylalanine ammonialyase activity induction in response to different concentrations of cadmium, was similar to those of antioxidant enzymes. Although the induction of activity of this enzyme was higher than the antioxidant enzymes. PAL is a key enzyme in the phenolic metabolism that has been reported to protect plants against stress conditions via synthesizing various phenylpropanoid products such as simple phenols, anthocyanin, flavonoid, and lignin.

Conclusion

The present study demonstrated that antioxidative system in *L. culinaris* underwent biochemical changes to survive under high concentrations of cadmium. Increase in metal chelate components (free phenols and proline) in all treatment levels proves this fact. Proline and phenolic compounds produced by the Phenylpropanoid Pathway in lentil played a major role in its response to Cd stress. Also that prolonged stress induced by Cd concentrations, can result into the activation of antioxidant enzymes such as superoxide dismutase, catalase and ascorbate peroxidase.

Key words: Antioxidant enzymes, Cadmium, Lentil, Phenylalanine ammonialyase, Total phenolics