بررسی شاخص‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی برخی رقم‌های سویا تحت تنش کادمیوم

شهلا هاشمی[1]، فرشته محمد حسنی[2*]

تاریخ دریافت:
تاریخ تصویب:

چکیده

در این پژوهش، اثرات تیمار کادمیوم (۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکرومولار) بر رشد ریشه و ساقه ، محتوای مالون‌دی‌آلدئید، فنل‌کل، پراکسیدهیدروژن، کلروفیل، آنتوسیانین و فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL) در سه رقم سویا شامل تلار، کاسپین، DPX گزارش شد. نتایج نشان داد که تیمار کادمیوم باعث کاهش پارامترهای رشد ریشه و ساقه و همچنین محتوای کلروفیل در رقم های تلار، کاسپین، DPX شده است که این کاهش در رقم تلار چشم‌گیرتر بود. محتوای آنتوسیانین، فنل کل و فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز در تیمار گیاهان با کادمیوم در سه رقم سویا افزایش یافت. محتوای مالون‌دی‌آلدئید در هر سه رقم در تیمار ۴۰۰ میکرومولاری کادمیوم نسبت به شاهد، افزایش معنی‌داری نشان داده است.. نتایج این تحقیق نشان داد که رقم تلار تحت تنش کادمیوم حساسیت بیشتری نسبت به رقم‌های کاسپین و DPX دارد.

واژه‌های کلیدی: ***آنتوسیانین، سویا، فنل، کادمیوم***

مقدمه

گیاه سویا یا لوبیای روغنی با نام علمی *Glycine max* L. از خانواده بقولات می‌باشد (Shafi *et al.*, 2009). سویا بزرگ‌ترین منبع تأمین‌کننده پروتئین و روغن دنیاست و یکی از معدود گیاهان فراهم‌کننده پروتئین کامل برای سلامتی انسان است. همچنین سویا دارای خواص دارویی نظیر خواص ضدسرطانی، ضدمیگرنی، ضدعفونی‌کنندگی، پایین‌آورندگی چربی خون و ضددیابتی (Abuajah *et al.*, 2015)، می‌باشد. بنابراین بدلیل خواص گوناگون سویا، کشت وسیعی از این گیاه صورت می‌گیرد. از سوی دیگر، آلودگی با فلزات سنگین از مهم‌ترین معضلات جهانی آلودگی خاک است که با فعالیت‌های انسانی از قبیل معدن-کاوی، صنایع فلزی و شیمیایی، وسایل نقلیه فرسوده و غیره در ارتباط است. بسیاری از عناصر سنگین حتی درغلظت‌های بسیار پایین نیز سمی به شمار می‌روند (Lee *et al.*, 2003). کادمیوم به‌عنوان یک فلز بسیار سمی برای انسان و همه موجودات زنده شناخته شده است (Chen *et al.*, 2007). موضوع ورود عناصر سنگین به خاک‌های کشاورزی، یکی از نگرانی‌های مهم زیست محیطی در دنیا می‌باشد (Shafi *et al.*, 2009). کادمیوم اگر چه برای رشد گیاه ضروری نیست، اما این فلز براحتی از

۱-گروه زیست شناسی،دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران
۲-استادیار، گروه زیست شناسی،دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
*(نویسنده مسئول:fereshtehmhasani@yahoo.com)

طریق پوست ریشه جذب می‌شود. ریشه گیاه اولین محل تماس با این یون است، بنابراین، غشای پلاسمایی سلول‌های ریشه به عنوان سدی بین سیتوپلاسم و محیط خاکی عمل می‌کند. شواهد زیادی پیشنهاد می‌کند که محتوای چربی و پروتئین غشاها ممکن است به وسیله این فلز آسیب ببیند (Schützendübel & Polle, 2002). تاکنون نشان داده شده است که کادمیوم موجب بسیاری از تغییراتی در گیاهان از جمله مهار جوانه‌زنی (Benavides *et al.*, 2005)، کاهش جذب عناصر معدنی (Siedlecka, 1995)، زرد شدن برگ و نکروزه شدن آن‌ها (Stroihski, 1999)، تغییر ساختار سلول بالاخص کلروپلاست‌ها و تسریع پیری (Benavides et al. 2005) می‌شود. غلظت زیاد کادمیوم رشد گیاهان را مهار می‌کند (Schützendübel & Polle, 2002). پراکسیداسیون لیپید، یکی دیگر از اثرات سمیت کادمیوم می‌باشد (Vassilev *et al.*, 2002).

در گیاه نخود و لوبیا، کادمیوم به‌طور قابل ملاحظه‌ای سبب افزایش پراکسیداسیون لیپید شد، درصورتی‌که در ریشه‌های هویج پراکسیداسیون لیپید مشاهده نشد (Toppi & Gabbrielli, 1999; Schützendübel & Polle, 2002).

پاسخ‌های گوناگون به تنش کادمیوم، احتمالاً به سطح کادمیوم تیمار شده و به گونه گیاه بستگی دارد. رقم‌های مختلف یک گیاه نیز پاسخ‌های متفاوتی در برابر تنش فلزات سنگین نشان می‌دهند. برای مثال، ارقام مختلف گیاهی از لحاظ جذب و تجمع عناصر سنگین تفاوت دارند که این تفاوت‌ها تحت تأثیر عوامل ژنتیکی قرار می‌گیرد. گرگر و لوفستد گزارش کردند که رقم‌های مختلف گندم پاسخ‌های متفاوتی نسبت به یکدیگر در مواجهه با تنش کادمیوم نشان دادند. وجود تنوع ژنتیکی بین گونه ها و ارقام گیاهی از لحاظ تجمع کادمیم و پاسخ‌های مقاومتی، امکان استفاده از روش های اصلاحی جهت انتخاب ژنوتیپ‌هایی با میزان پایین تجمع کادمیم را میسر می سازد (Greger & Lofstedt, 2004).

در این پژوهش به‌دلیل خواص خوراکی و دارویی این گیاه که در بالا ذکر شد و از سوی دیگر به دلیل اهمیت موضوع آلودگی خاک‌های کشاورزی در مناطق مجاور مناطق صنعتی، اثر کادمیوم بر واکنش‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی برخی رقم‌های این گیاه از جمله رقم های تلار، کاسپین، DPX که دارای تفاوت‌های ژنتیکی و پاسخ‌های مقاومتی متفاوتی هستند در شرایط تحت تنش مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

رقم‌های مورد مطالعه در این پژوهش، ارقام تلار، کاسپین وDPX گیاه سویا بود که بذرهای مربوطه از موسسه تحقیقات و اصلاح نهال و بذر کرج تهیه گردید. برای بررسی اثر فلز کادمیوم بر واکنش‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی ارقام مختلف سویا آزمایش به‌صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با تعداد ۳ تیمار و ۳ تکرار در سال ۱۳۹۴ در دانشگاه شهید باهنر کرمان انجام شد. ابتدا بذرهای ارقام مذکور با هیپوکلریت سدیم ۵ درصد به مدت ۶ دقیقه ضدعفونی و سپس بخوبی با آب‌مقطر دو بار شستشو شدند. بذرها به گلدان‌های حاوی پرلیت با قطر دهانه ۱۹ سانتی‌متر و ارتفاع ۱۵ سانتی‌متر انتقال داده شد. در هر گلدان

۳ بذر کشت داده شد. در طول هفته اول آبیاری با آب به صورت سه بار در هفته انجام شد. آبیاری در هفته دوم و سوم با محلول هوگلند (سه بار در هفته) با pH تقریبی ۶ توسط تنظیم pH محلول‌ها با استفاده از اسید کلریدریک و سود یک میلی‌مولار انجام گرفت. بعد از سپری شدن این زمان، آبیاری به‌مدت سه هفته توسط محلول‌های غذایی حاوی غلظت‌های ۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکرومولار کلرید کادمیوم انجام شد. سپس گیاهان جمع‌آوری و در ازت مایع فریز گردید و برای سنجش پارامترهای رشد، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در فریزر با دمای ۸۰- درجه سیلسیوس نگه‌داری شد.

اندازه‌گیری طول اندام هوایی و ریشه

طول ساقه و ریشه با استفاده از خط‌کش اندازه‌گیری شد. طول ساقه از یقه تا قسمت انتهای ساقه و طول ریشه از یقه تا انتهای ریشه در نظر گرفته شد. برای هر گروه تیماری ۳ تکرار و مقادیر بر اساس سانتی‌متر گزارش شد.

اندازه‌گیری مقدار پراکسیدهیدروژن و مالون‌دی‌آلدئید

مقدار پراکسیدهیدروژن براساس واکنش پراکسیدهیدروژن با پتاسیم یدید (KI) با روش الکسیوا و همکاران انجام شد(Alexieva *etal*., 2001). در این روش ۰/۵ گرم از بافت تازه گیاه در تری‌کلرواستیک‌اسید (TCA) ۰/۱ درصد روی یخ سائیده شد. عصاره حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در g × ۱۲۰۰۰ در دمای ۴ درجه سیلسیوس سانتریفیوژ گردید. سپس به ۵۰۰ میکرولیتر از محلول رویی، ۵۰۰ میکرولیتر بافر پتاسیم‌فسفات ۱۰۰ mM (pH=۷) و ۲ میلی‌لیتر یدیدپتاسیم ۱M اضافه گردید. مخلوط واکنش به مدت ۱ ساعت در تاریکی در دمای اتاق قرار داده شد و سپس جذب نمونه‌ها در ۳۹۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر UV-Visible مدل Cary-50 ساخت شرکت Varian اندازه‌گیری شد. برای محاسبه غلظت پراکسید هیدروژن از منحنی استاندارد استفاده گردید. اندازه‌گیری غلظت مالون‌دی‌آلدئید به روش هیت و پکر انجام شد (Heath & Packer, 1968). طبق این روش ۰/۲ گرم از بافت فریزشده برگ با ۵ میلی لیتر تری کلرواستیک اسید (TCA) ۰/۱ درصد سائیده شد. عصاره ی حاصل با استفاده از سانتریفوژ به مدت ۵ دقیقه در g × ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ شد. از فاز رویی برای سنجش غلظت مالون‌دی‌آلدئید استفاده گردید.

سنجش محتوای آنتوسیانین

برای سنجش محتوای آنتوسیانین از روش واگنر استفاده شد (Wagner, 1979). برای سنجش محتوای آنتوسیانین، ۰/۱ گرم برگ گیاه با ۱۰ میلی لیتر متانول اسیدی (متانول خالص و اسید کلریدریک خالص به نسبت حجمی ۱:۹۹) کاملا ساییده و به‌مدت ۲۴ ساعت در تاریکی و دمای ۲۵ درجه سیلسیوس قرار گرفت. سپس ۱۰ دقیقه در g× ۴۰۰۰ سانتریفوژ و جذب محلول بالایی در طول موج ۵۵۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر UV-Visible مدل Cary-50 ساخت شرکت Varian اندازه‌گیری شد.

محتوای فنل‌کل

محتوای فنل‌کل با استفاده از معرف فولین اندازه‌گیری شد (Guo *et al.*, 2004). ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت گیاهی در ۱ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد سائیده شد. عصاره حاصل به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق نگه‌داری شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در g × ۲۰۰۰ سانتریفیوژ شدند و از محلول رویی برای سنجش فنل‌کل استفاده گردید. ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره گیاهی با ۲۰۰ میکرولیتر معرف فولین و ۲ میلی‌لیتر آب مخلوط گردید و به‌مدت ۳ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. سپس ۱ میلی‌لیتر کربنات‌سدیم ۲۰ درصد به مخلوط اضافه گردید و به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق قرار داده شد. پس از این مدت جذب در طول موج ۷۶۵ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر UV-Visible مدل Cary-50 ساخت شرکت Varian خوانده شد.

اندازه‌گیری مقدار کلروفیل و کاروتنوئید

مقدار کلروفیل و کارتنوئید از روش لیچتن تالر محاسبه گردید (Lichtenthaler, 1987). ۰/۲ گرم از برگ های فریز شده گیاه با ۱۵ میلی‌لیتر استن ۸۰ درصد سائیده شده و پس از صاف کردن جذب آنها با اسپکتروفتومتردر طول موج های ۶۴۶/۸، ۶۶۳/۲۰ و ۴۷۰ نانومتر خوانده شد.

تعیین میزان یون کادمیوم در ریشه و برگ به روش جذب اتمی

اندازه‌گیری یون کادمیوم از روش جذب اتمی (Lozak *et al.*, 2002) توسط دستگاه جذب اتمی Absorption Atomic Spectrometer مدل Spectr AA220 ساخت آمریکا انجام گردید. اندازه‌گیری یون کادمیوم در بافت ریشه و برگ انجام شد. برای این منظور ۰/۵ گرم از بافت گیاهی خشک در ۱۰ میلی‌لیتر اسید نیتریک غلیظ به‌مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد تا نمونه گیاهی به‌خوبی در اسید هضم شود. بعد از این مدت محلول حاصل را گرم کرده تا بخارات اسیدی از محلول خارج شوند. سپس حجم محلول با آب مقطر به ۵۰ میلی‌لیتر رسانده شد و پس از عبور ازکاغذ صافی محلول بدست آمده برای اندازه‌گیری عنصر موردنظر استفاده شد.

بررسی فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز(PAL)

جهت تهیه عصاره آنزیمی مقدار ۳۰۰ میلی‌گرم از بافت تازه برگ با ۶/۵ میلی‌لیتر بافر تریس-HCL (۵۰ میلی مولار) حاوی بتامرکاپتواتانول (۱۵ میلی‌مولار) در هاون سرد سائیده شد. سپس عصاره بدست آمده به‌مدت ۳۰ دقیقه با دور g × ۵۰۰۰ سانتریفوژ گردید. محلول رویی برای سنجش فعالیت آنزیم مورد استفاده قرار گرفت.

آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز واکنش تبدیل فنیل‌آلانین به سینامیک اسید را کاتالیز می‌کند. در این روش از فنیل آلانین به‌عنوان سوبسترای آنزیمی استفاده شد و فعالیت آنزیم PAL بر اساس سرعت تشکیل سینامیک اسید تعیین گردید. در یک لوله

آزمایش ۱ میلی لیتر از بافر استخراج به‌همراه ۰/۵ میلی لیتر ال- فنیل‌آلانین (۱۰ میلی مولار)، ۰/۴ میلی لیتر آب دوبار تقطیر و ۱ میلی لیتر عصاره آنزیمی مخلوط گردید و به‌مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سیلسیوس نگهداری شد. واکنش با اضافه کردن ۰/۵ میلی‌لیتر تری کلرواستیک اسید (۱۰ درصد) پایان پذیرفت. غلظت سینامیک اسید با اندازه‌گیری میزان جذب محلول‌ها در طول موج ۲۹۰ نانومتر و با استفاده از ضریب خاموشی $9500 M^{-1}cm^{-1}$ بدست آمد. یک واحد از فعالیت PAL معادل ۱میکرومول از سینامیک اسید تولید شده در یک دقیقه است (Hahldbrock & Rogg, 1975).

تجزیه و تحلیل آماری

آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS و آزمون دانکن صورت گرفت. رسم نمودارها با استفاده از نرم افزار Excel صورت پذیرفت.

نتایج

نتایج حاصل از بررسی اثر تیمار کادمیوم بر طول ساقه و ریشه

با افزایش غلظت کادمیوم، طول ساقه و ریشه در هر سه رقم سویا نسبت به شاهد کاهش معنی‌داری نشان داد. پایین‌ترین طول ساقه و ریشه در رقم تلار و در غلظت ۴۰۰ میکرومولار کادمیوم، مشاهده شد. طول ساقه رقم‌های تلار، کاسپین و DPX در تیمار ۲۰۰ میکرومولاری کادمیوم نسبت به شاهد، به ترتیب ۳۶، ۱۳ و ۷ درصد کاهش یافت و طول ساقه در تیمار ۴۰۰ میکرومولاری کادمیوم نسبت به تیمار ۲۰۰ میکرومولاری به ترتیب ۳۵، ۲۶، ۱۷ درصد کاهش یافت. (جدول ۱) .تیمار کادمیوم طول ریشه را نیز در ارقام مورد بررسی سویا به صورت معنی‌داری نسبت به شاهد کاهش داد. تیمار ۲۰۰ میکرومولاری کادمیوم در رقم‌های تلار، کاسپین و DPX به‌ترتیب منجر به کاهش ۳۲، ۱۱ و ۹ درصد طول ریشه نسبت به شاهد شد. همچنین در تیمار ۴۰۰ میکرومولاری کادمیوم ، طول ریشه نسبت به شاهد کاهش یافت که این کاهش در رقم تلار بیش از دو رقم مورد بررسی دیگر بود (جدول۱).

نتایج اثر تیمار کادمیوم بر محتوای کلروفیلa و کاروتنوئید

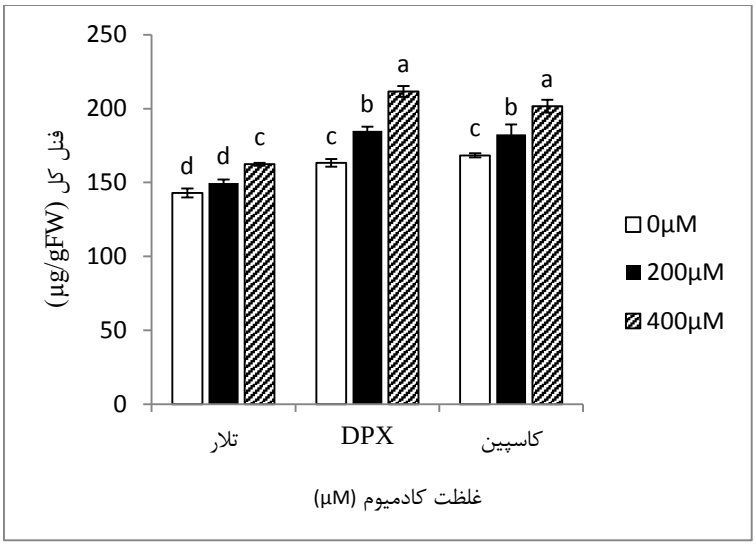
با افزایش غلظت کادمیوم، محتوای کلروفیل a و کاروتنوئید در ارقام مورد مطالعه سویا نسبت به شاهد کاهش نشان داد و بیشترین کاهش مربوط به بالاترین غلظت یعنی غلظت ۴۰۰ میکرومولار بود (جدول ۲). نتایج همچنین نشان داد بیشترین کاهش محتوای کلروفیل a و کاروتنوئید نسبت به نمونه های شاهد مربوط به رقم تلار بوده است و کمترین کاهش محتوای کلروفیل a و کاروتنوئید در دورقم دیگری مشاهده گردید.

نتایج حاصل از بررسی اثر تیمار کادمیوم بر محتوای مالون‌دی‌آلدئید و پراکسیدهیدروژن برگ

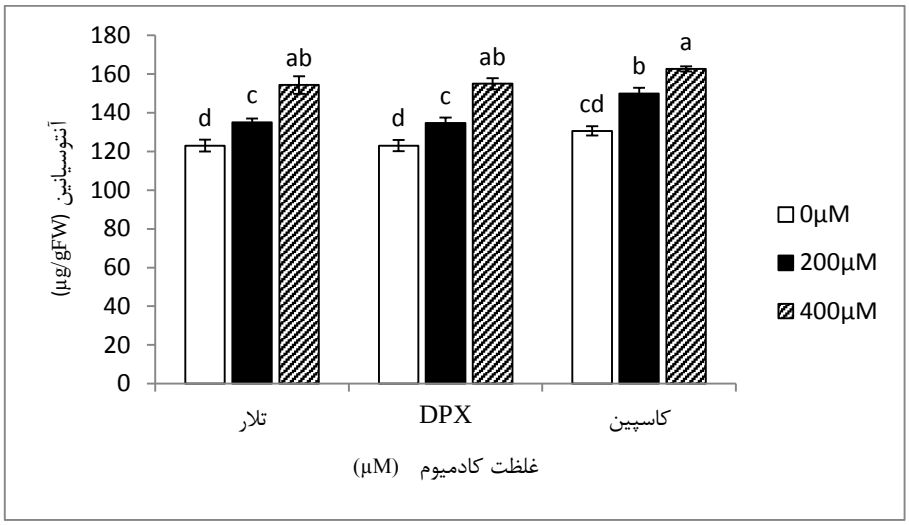
تیمار کادمیوم بر محتوای مالون‌دی‌آلدئید و پراکسیدهیدروژن در هر سه رقم سویا افزایش معنی‌داری نسبت به شاهد نشان داد. افزایش محتوای مالون‌دی‌آلدئید در تیمار ۲۰۰ میکرومولاری کادمیوم نسبت به شاهد دررقم های تلار، DPX و کاسپین به‌ترتیب ۱۵، ۸/۵ و ۷ درصد بود. همچنین افزایش محتوای پراکسیدهیدروژن در تیمار ۲۰۰ میکرومولاری کادمیوم نسبت به شاهد دررقم های تلار، DPX و کاسپین به‌ترتیب ۲۸، ۸ و ۳ درصد بود. بالاترین محتوای مالون‌دی‌آلدئید و پراکسیدهیدروژن در رقم تلار، در تیمار ۴۰۰ میکرومولار ی کادمیوم مشاهده شد (جدول ۲).

نتایج حاصل از بررسی اثر تیمار کادمیوم بر محتوای فنل کل و آنتوسیانین برگ

تیمار کادمیوم بر محتوای فنل کل و آنتوسیانین در سه رقم مورد مطالعه سویا افزایش معنی‌داری را نسبت به شاهد نشان داد. بالاترین محتوای فنل کل و آنتوسیانین در رقم‌های کاسپین و DPX در تیمار ۴۰۰ میکرومولاری کادمیوم مشاهده شد. محتوای فنل‌کل در تیمار ۲۰۰ میکرومولاری کادمیوم در رقم تلار تغییر معنی‌داری را نسبت به نمونه شاهد نشان نداد (شکل ۱).



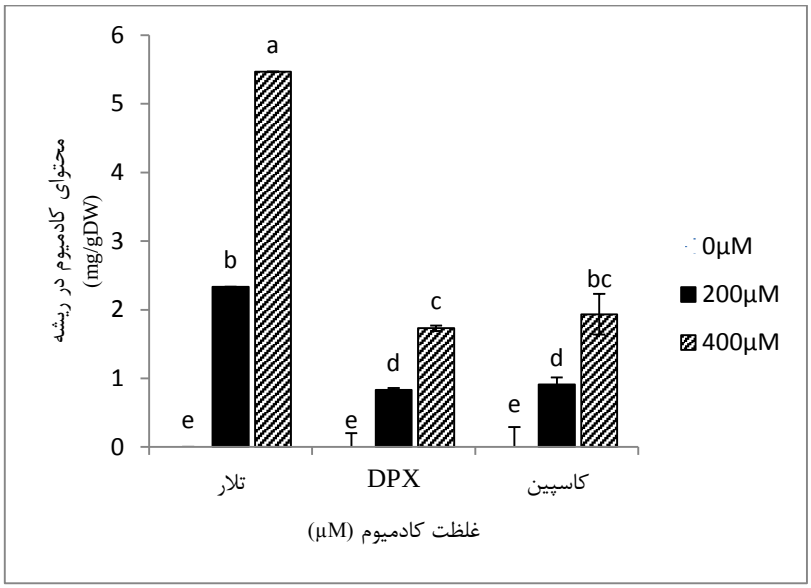
شکل ۱: اثر تیمار کادمیوم بر محتوای فنل‌کل رقم‌های مختلف سویا. میانگین‌های (میانگین ۳ تکرار) دارای حداقل یک حرف مشابه از نظر آماری اختلاف معنی‌داری ندارند (آزمون دانکن،$p\leq$ ۰/۰۵).



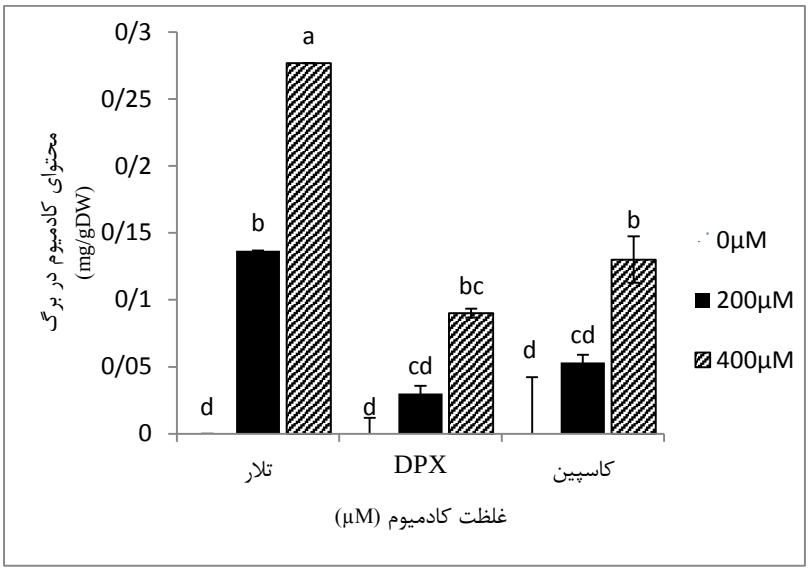
شکل ۲: اثر تیمار کادمیوم بر محتوای آنتوسیانین رقم‌های مختلف سویا. میانگین‌های (میانگین ۳ تکرار) دارای حداقل یک حرف مشابه از نظر آماری اختلاف معنی‌داری ندارند (آزمون دانکن، $p\leq$ ۰/۰۵).

نتایج حاصل از بررسی اثر تیمار کادمیوم بر محتوای کادمیوم ریشه و برگ

بررسی غلظت کادمیوم در ریشه و برگ نشان داد، با افزایش غلظت کادمیوم در محیط محتوای آن در بافت ریشه و برگ نیز افزایش یافت. بالاترین مقدار محتوای کادمیوم در ریشه و برگ در تیمار ۴۰۰ میکرومولاری کادمیوم در رقم تلار و پایین‌ترین محتوای کادمیوم در دو رقم دیگری مشاهده شد.



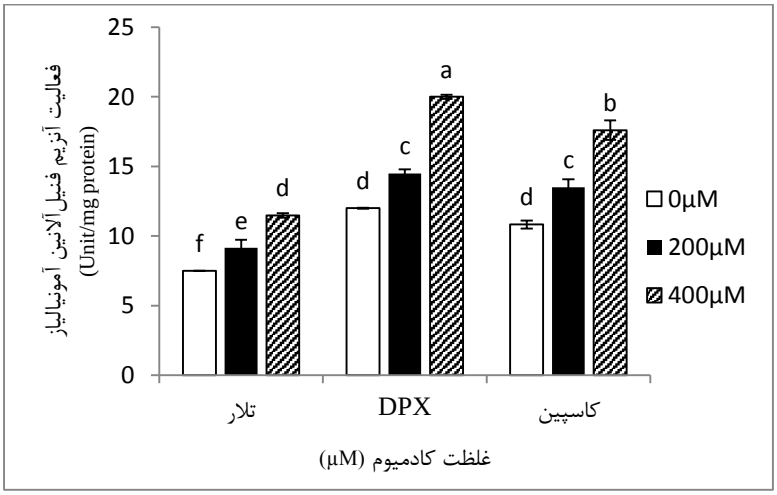
شکل۳: اثر تیمار کادمیوم بر محتوای کادمیوم در ریشه و برگ رقم‌های مختلف سویا. میانگین‌های (میانگین ۳ تکرار) دارای حداقل یک حرف مشابه از نظر آماری اختلاف معنی‌داری ندارند (آزمون دانکن، $p\leq$ ۰/۰۵).



ادامه شکل۳: اثر تیمار کادمیوم بر محتوای کادمیوم در ریشه و برگ رقم‌های مختلف سویا. میانگین‌های (میانگین ۳ تکرار) دارای حداقل یک حرف مشابه از نظر آماری اختلاف معنی‌داری ندارند (آزمون دانکن، $p\leq$ ۰/۰۵).

نتایج حاصل از بررسی اثر تیمار کادمیوم بر فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز برگ

شکل ۴ نشان داد که تیمار کادمیوم منجر به افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز برگ در ارقام مورد مطالعه سویا نسبت به شاهد شده است. بالاترین میزان فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز مربوط به تیمار ۴۰۰ میکرومولاری کادمیوم در رقم DPX بود. تیمار ۲۰۰ میکرومولاری کادمیوم در ارقام تلار، DPX و کاسپین به ترتیب باعث افزایش ۱۷، ۱۷و ۲۰ درصدی فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز نسبت به شاهد شده است. همچنین در تیمار ۴۰۰ میکرومولاری کادمیوم، فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز در ارقام DPX، کاسپین و تلار به ترتیب ۴۰، ۳۸ و ۳۳ درصد نسبت به شاهد افزایش یافت.



شکل ۴: اثر تیمار کادمیوم بر فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز در برگ رقم‌های مختلف سویا. میانگین‌های (میانگین ۳ تکرار) دارای حداقل یک حرف مشابه از نظر آماری اختلاف معنی‌داری ندارند (آزمون دانکن،$p\leq$ ۰/۰۵).

جدول ۱: مقایسه میانگین‌های(میانگین ۳ تکرار) اثرات کادمیوم بر رشد در سه رقم سویا

گیاه	غلظتCd (µM)	طول ساقه (cm)	طول ریشه (cm)
تلار	۰	۱۲/۶^{ab}±۰/۳	۱۵/۶ ^{a}±۰/۲
	۲۰۰	۷/۹۶^{e}±۰/۳۱	۱۰/۴۶^{d}±۰/۳۱
	۴۰۰	۵ /۱^{f}±۰/۳۷	۷/۶^{e}±۰/۳۷
DPX	۰	۱۳/۰۳۳۳^{ab}±۰/۳۱	۱۶/۰۳^{a}±۰/۲۹
	۲۰۰	۱۲/۰۶^{bc}±۰/۱۲	۱۴/۵۶^{b}±۰/۱۲
	۴۰۰	۸/۸۳۳^{de}±۰/۴۴	۱۱/۳۳^{d}±۰/۴۴
کاسپین	۰	۱۳/۳۶^{a}±۰/۴۴	۱۵/۸۶^{a}±۰/۴۴
	۲۰۰	۱۱/۵^{c}±۰/۲۸	۱۴^{bc}±۰/۲۸
	۴۰۰	۹/۵^{d}±۰/۲۸	۱۳/۳۳^{c}±۰/۴۴

حروف مشترک بیانگر اختلاف غیرمعنی‌دار تیمارها براساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشد

جدول ۲: مقایسه میانگین‌های (میانگین ۳ تکرار) اثرات کادمیوم بر محتوای رنگیزه‌ها در سه رقم سویا

گیاه	غلظت Cd (µM)	محتوای کاروتنوئید (µg/gFW)	محتوای کلروفیل a (µg/gFW)	پراکسیدهیدروژن (µg/gFW)	مالون‌دی-آلدئید (µg/gFW)
تلار	۰	۱۰۱^{ab}±۳	۱۳۱^{ab}±۳	۱۷۵^{e}±۳	۱۶۳^{ef}±۳
	۲۰۰	۵۴/۶^{e}±۳/۱	۸۴/۶۶۶۷^{e}±۳/۱	۲۰۳^{b}±۲	۱۹۱^{bc}±۲
	۴۰۰	۲۶^{f}±۳/۷	۵۶^{f}±۳/۷	۲۴۲^{a}±۵/۷	۲۳۶^{a}±۳/۳
DPX	۰	۱۰۱^{ab}±۲	۱۳۱^{ab}±۲	۱۷۲^{e}±۲/۸	۱۶۰^{f}±۲/۸
	۲۰۰	۹۴/۶^{b}±۲/۹	۱۲۴/۶^{b}±۲/۹	۱۸۷^{c}±۲/۸	۱۷۵^{d}±۲/۸
	۴۰۰	۷۳/۶^{d}±۳/۶	۱۰۳/۶^{d}±۳/۶	۲۰۰/۳^{b}±۱/۲	۱۸۸/۳^{bc}±۱/۲
کاسپین	۰	۱۰۸/۶^{a}±۴/۴	۱۳۸/۶۶^{a}±۴/۴	۱۷۹^{ce}±۱/۷	۱۷۰/۳^{de}±۲
	۲۰۰	۹۰^{bc}±۲/۸	۱۲۰^{bc}±۲/۸	۱۸۶^{c}±۲	۱۸۴^{c}±۲
	۴۰۰	۷۹/۶^{cd}±۵/۴	۱۰۹/۶^{cd}±۵/۴	۲۰۳^{b}±۱/۵۲	۱۹۴/۳^{b}±۲/۶

حروف مشترک بیانگر اختلاف غیرمعنی‌دار تیمارها براساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشد

بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج، در حضور تیمار کادمیوم، طول ریشه و ساقه ارقام سویا کاهش نشان داد. این کاهش در رقم تلار چشمگیرتر از رقم DPX و کاسپین بود. در تحقیقاتی که پوپووا و همکاران انجام دادند، مشخص شد که کادمیوم، منجر به کاهش رشد در **گیاه** نخود شده است (Popova *et al*., 2009). همچنین آیدینپ و مارینوا گزارش کردند که کادمیوم طول ریشه و ساقه را در گیاه یونجه کاهش داده است (Aydinalp & Marinova, 2009). مهار رشد توسط کادمیوم می‌تواند به‌علت مهار تقسیم سلولی و سرعت طویل شدن سلول‌ها باشد که اغلب توسط مهار غیر قابل برگشت پمپ پروتون که مسئول این فرایند است، رخ می‌دهد (Liu *et al*., 2004). همچنین در تحقیق حاضر، محتوای کلروفیل a تحت تیمار کادمیوم در غلظت‌های ۲۰۰ و ۴۰۰

میکرومولاری در سه رقم مورد مطالعه کاهش یافت که این کاهش در رقم تلار چشمگیرتر بود. در این زمینه هو و همکاران گزارش کردند که کادمیوم باعث کاهش محتوای کلروفیل در گیاه لوبیا شده است (Hou *et al*., 2011). همچنین پوپووا و همکاران نشان دادند که با افزایش غلظت کادمیوم، میزان کلروفیل در گیاهان نخود کاهش یافت (Popova *et al*., 2009) کاهش ذخیره کلروفیل در برگ‌ها می‌تواند به‌علت مهار مراحل مختلف بیوسنتز کلروفیل باشد. مهار بیوسنتز کلروفیل احتمالا بواسطه مهار سنتز δ-آمینولوولنیک اسید و مهار تشکیل پروتوکلروفیلدرداکتاز می‌باشد. همچنین در برگ‌های تحت تنش کادمیوم، تشکیل LHCII مختل می‌شود که علت آن مهار سنتز پروتئین LHCII در مرحله نسخه‌برداری است که باعث فتواکسید شدن کلروفیل می‌گردد (Popova *et al*., 2009). مقدار کاروتنوئیدها نیز شاخص دیگری است که تحت تاثیر کادمیوم قرار گرفت. با افزایش غلظت کادمیوم مقدار کاروتنوئیدها نیز در هر سه رقم مورد مطالعه سویا کاهش یافت. کاهش کاروتنوئیدها بدلیل فرونشانی غیرفتوشیمیایی کلروفیل‌های برانگیخته است که توسط کاروتنوئیدها انجام و منجر به برهم‌ریختن ساختارشان می‌گردد. کاروتنوئیدها در سمیت-زدایی کلروفیل برانگیخته سه‌تایی نقش دارند (Egert & Tevini, 2002). کاروتنوئیدها در چند سطح باعث کاهش اثرات سمی رادیکال‌های آزاد می‌شوند که ازجمله واکنش با کلروفیل برانگیخته برای ممانعت از تشکیل رادیکال‌های فعال اکسیژن است. بنابراین، کاروتنوئیدها بعنوان یک سیستم حفاظتی در برابر تنش اکسیداتیو و گونه های فعال اکسیژن القا شده از بین می‌روند. گونه‌های فعال اکسیژن شامل رادیکال‌های سوپراکسید، پراکسیدهیدروژن، رادیکال‌های هیدروکسیل، اکسیژن یکتایی و غیره هستند. گونه‌های فعال اکسیژن مولکول‌های بسیار فعال و ناپایدار هستند که موجب پراکسیداسیون چربی می‌شوند (Finnegan & Chen, 2012). بررسی‌های انجام شده سنجش پراکسیدهیدروژن در سویا نشان داد که در تیمار ۴۰۰ میکرومولاری کادمیوم، محتوای پراکسیدهیدروژن در هر سه رقم سویا نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد. نتایج میزان پراکسیدهیدروژن بدست آمده در این تحقیق با یافته‌های تحقیقات اسمیت و همکاران در حضور کادمیوم، مطابقت دارد (Smeets *et al*., 2005). همچنین این محققان مشخص کردند که کادمیوم، تاثیر افزایشی بر میزان پراکسیدهیدروژن در گیاه لوبیا داشته است. پراکسیدهیدروژن یکی از شاخص‌های سنجش تنش فلزات سنگین می‌باشد. پراکسیدهیدروژن در حضور کاتالیزورهای فلزی خاص یا کلاته‌های فلزی از طریق واکنش‌های هابر-ویس یا فنتون، تولید رادیکال بسیار فعال OH^- می‌نماید و سمیت خود را افزایش می دهد (Finnegan & Chen, 2012). رادیکال‌های آزاد هیدروکسیل آغازگر واکنش‌هایی هستند که موجب پراکسیداسیون چربی ها می‌شود. در این تحقیق افزایش محتوای مالون‌دی‌آلدئید در غلظت‌های ۲۰۰ و ۴۰۰ میکرومولاری کادمیوم در هر سه رقم نسبت به شاهد مشاهده شد که این تغییرات احتمالا بدلیل اثرات سمی کادمیوم می‌باشد. همچنین تحقیقاتی مشابه با نتایج بدست آمده در این تحقیق گزارش شده است که غلظت بالای کادمیوم باعث افزایش سطوح مالون‌دی‌آلدئید در برگ و ریشه گیاه جو شده است (Popova *et al*., 2009). اندازه گیری محصولات پراکسیداسیون لیپید یکی از معمول‌ترین و قابل قبول‌ترین روش‌های اندازه‌گیری صدمات اکسیداتیو به غشاء محسوب می‌شود. رادیکال‌های آزاد اکسیژن با پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیر اشباع،

آلدئیدهایی مانند مالون‌دی‌آلدئید تولید می‌کنند که این محصولات آلدئیدی معمولاً به عنوان شاخص تنش اکسیداتیو اندازه‌گیری می‌شوند (Shulaev & Oliver, 2006). در شرایط طبیعی بین میزان تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و فعالیت مکانیسم‌های از بین برنده رادیکال‌های آزاد اکسیژن تعادل وجود دارد. اما در تنش‌های محیطی و زنده این تعادل به هم می‌خورد و موجب تنش اکسیداتیو در گیاهان می‌گردد. گیاهان برای مقابله با تنش‌های محیطی سیستم‌های آنتی اکسیدانی دارند که قادر به سم‌زدایی و جاروب کردن گونه‌های فعال اکسیژن می‌باشد. با کمک این سیستم‌های آنتی‌اکسیدان گیاه قادر به کاهش اثرات تنش اکسیداتیو می‌باشد. ترکیبات فنلی و آنتوسیانین‌ها دارای نقش آنتی اکسیدانی می‌باشند (Egert & Tevini, 2002). ترکیبات فنلی و آنتوسیانین‌ها حاصل مسیر فنیل پروپانوئیدها هستند. آنزیم‌های مختلفی در سنتز ترکیبات فنیل پروپانوئیدی نقش دارند که نخستین و مهم‌ترین آن‌ها، آنزیم PAL است. آنزیم PAL نخستین واکنش در مسیر بیوسنتز فنیل پروپانوئیدها را کاتالیز می‌کند و فنیل آلانین را به‌صورت غیراکسیداتیو دآمینه می‌کند و طی آن سینامیک اسید تولید می‌گردد.

نتایج حاصل از سنجش ترکیبات فنلی در سه رقم سویا نشان داد که میزان این ترکیبات تحت تیمار ۴۰۰ میکرومولاری کادمیوم افزایش معنی‌داری داشتند. بالاترین محتوای ترکیبات فنلی در غلظت ۴۰۰ میکرومولاری کادمیوم در ارقام کاسپین و DPX بود. تجمع ترکیبات‌فنلی در گیاهان در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیر زیستی متعددی مانند اشعه UV، دمای پائین، جراحت، کاهش تغذیه، حمله پاتوژن‌ها و خشکی گزارش شده است . در سلول‌های گیاهی معمولاً ترکیبات فیتوفنولیک بخصوص پلی‌فنل‌ها در کاهش سم‌زدایی پراکسیدهیدروژن بسیار کارا عمل کرده و به‌عنوان سیستم پشتیبان چرخه آسکوربات - گلوتاتیون در دفع رادیکال‌های پراکسیدهیدروژن شرکت می‌کنند (Sakihama *et al*., 2002). همچنین در پژوهش حاضر محتوای آنتوسیانین در سه رقم سویا تحت تیمار کادمیوم افزایش معنی‌داری نسبت به شاهد نشان داد. محتوای آنتوسیانین در غلظت ۴۰۰ میکرومولار کادمیوم تفاوت معنی‌داری در بین ارقام تلار، کاسپین و DPX نشان نداد. دای و همکاران گزارش دادند که کادمیوم باعث افزایش فعالیت آنزیم PAL گردید و از این طریق در بیوسنتز آنتوسیانین نقش دارد (Dai *et al*., 2006). در این پژوهش، افزایش فعالیت آنزیم PAL با تغییرات مقدار ترکیبات‌فنلی و آنتوسیانین در شرایط تنش هم‌خوانی دارد. با توجه به نقش آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنلی و آنتوسیانین در کاهش اثرات تنش پیشنهاد شد که ارقام سویا با افزایش فعالیت آنزیم PAL، محتوای ترکیبات فنلی و آنتوسیانین را سبب شده است. دای و همکاران نیز گزارش کردند که فلز سنگین کادمیوم از طریق تاثیر بر فعالیت فنیل‌آلانین-آمونیالیاز که یک آنزیم کلیدی در مسیر بیوسنتز آنتوسیانین می‌باشد، منجر به افزایش محتوای آنتوسیانین در گیاه آزولا شده است (Dai *etal*., 2006). همچنین افزایش همزمان فعالیت PAL ، سطح آنتوسیانین و ترکیبات فنولی نیز در ارقام توت فرنگی گزارش شده است (Jiang & Joyce . 2003). در این پژوهش، با افزایش غلظت کادمیوم، محتوای کادمیوم ریشه و برگ در سه رقم سویا افزایش یافت، اما این افزایش در رقم تلار چشمگیرتر بود. به عبارت دیگر، جذب کادمیوم در ارقام کاسپین و DPX

کمتر از تلار بود. نتایجی مشابه با نتایج بدست آمده در این تحقیق توسط پیج و همکاران گزارش گردید که در آن با افزایش غلظت کادمیوم، محتوای کادمیوم در گیاهان لوبیا و ذرت افزایش نشان داد (Page *etal*., 1971).

نتیجه‌گیری کلی

وجود فلزات سنگین از جمله کادمیوم در محیط، یکی از عوامل تاثیرگذار بر گیاهان محسوب می‌شود؛ با این‌حال، برخی گیاهان از مکانیسم‌های فیزیولوژیک خاصی استفاده می‌کنند که می‌توانند در حضور مقادیر بالایی از فلزات سنگین که به طور طبیعی برای بیشتر گیاهان سمی‌اند، به فعالیتهای حیاتی خود ادامه دهند. بنابراین در این پژوهش هدف ما شناسایی رقم‌های مقاوم سویا به کادمیوم می‌باشد. به‌طور کلی نتایج این پژوهش نشان داد که رقم‌های تلار، کاسپین و DPX نیز تحت تاثیر سمیت کادمیوم قرار گرفته و کاهش رشد و همچنین افزایش تنش اکسیداتیو را نشان دادند. نتایج این تحقیق حاکی از این است که رقم تلار تحت تنش کادمیوم حساسیت بیشتری نسبت به رقم‌های کاسپین و DPX دارد. به‌عبارت دیگر رقم‌های کاسپین و DPX مقاومت بالاتری در مقابل سمیت کادمیوم دارند. و به نظر می رسد افزایش بیشتر محتوای ترکیبات آنتی اکسیدان از جمله محتوای ترکیبات فنلی، آنتوسیانین ها و افزایش فعالیت آنزیم PAL و کاهش میزان جذب یون کادمیوم در این دو رقم میتواند در ایجاد مقاومت بیشتر نسبت به کادمیوم موثر باشد.

منابع

Abuajah, C. I., Ogbonna, A. C. and Osuji, C. M. (2015). Functional components and medicinal properties of food: a review. Journal of Food Science and Technology, 52: 2522-2529.

Alexieva, V., Sergiev, I., Mapelli, S. and Karanov, E. (2001). The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. Plant Cell and Environment, 24: 1337-1344.

Aydinalp, C. and Marinova, S. (2009). The effects of heavy metals on seed germination and Plant growth on alfalfa plant (*Medicago sativa*). Bulgarian Journal of Agricultural Science, 15: 347-350.

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

Chen, F., Dong, J., Wang, F., Wu, F., Zhang, G., Li. G., Chen, Z., Chen, J. and Wei, K. (2007). Identification of barley genotypes with low grain Cd accumulation and its interaction with four microelements. Chemosphere, 67: 2082- 2088.

Dai, L.P., Xing, Z.T., Huang, Y. and Li, M.J. (2006). Cadmium induced changes in pigments, total phenolics and phenylalanine ammonialyase activity in fronds of Azolla imbricate. Environmental Toxicology, 505-512

Egert, M. and Tevini, M. (2002). Influence of drought on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress in leaves of chives (*Allium schoenoprasum*). Environmental and Experimental Botany, 48: 43-48.

Finnegan, P.M. and Chen, W. (2012). Arsenic toxicity: the effects on plant metabolism. Frontiers in physiology, 3: 1-18.

Greger, M. and Lofstedt, M. (2004). Comparison of Uptake and Distribution of Cadmium in Different Cultivars of Bread and Durum Wheat. Crop Science, 44: 501–507.

Guo, P., Cao, Y., Li, Z., and Zhao, B. (2004). Role of an endogenous nitric oxide burst in the resistance of wheat to stripe rust. Plant, Cell and Environment, 27: 473-47

Hahlbrock, K. and Ragg, H. (1975). Light-induced changes of enzyme activities in parsley cell suspension cultures. Archive Biochemistry Biophysics, 166: 41–46.

Heath, R.L and Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplast,kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Archives Biochemistry Biophysics, 125: 189-198.

Hegedus, A., Erdi, 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.

Hou, L.Y., Shi, W.M., Wei, W.H. and Shen, H. (2011). Cadmium uptake, translocation, and tolerance in *Arabidopsis thaliana*. Biological Trace Element Research, 139:228–240

Jiang, Y.M., Joyce, D.C. (2003). ABA effects on ethylene production, PAL activity, anthocyanin and phenolic contents of strawberry fruit. Plant Growth Regulation, 39:171–174.

Lee, J., Bae, H., Jeong, J., Lee, J.Y., Yang, Y.Y. and Hwang, I. (2003). Functional expression of a bacterial Heavy metal transporter in Arabidopsis enhances resistance and decrease uptake of heavy metals. Plant Physiology, 133:589-596.

Lichtenthaler, H.K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. Methods in Enzymology, 148: 350-382.

Liu, D., Jiang, W. and Gao, X. (2004). Effect of cadmium on root growth, cell division and nucleoli in root tip cells of garlic. Plant Biology, 47: 79 -83.

Lozak, A., Soltyk, K., Ostapczukc, P. and Fijaleka, Z. (2002). Determination of selected trace elements in herbs and their influence. Science of The Total Environment, 289:33-40.

Marss, K.A. and Walbot, V. (1997). Expression and RNA splicing of the maize glutation s-transferase broneze Z gene is regulated by cadmium and other stresses. Plant Physiology, 113: 93-102.

Memon. A.R., Aktoprakligul, D., Zdemur, A. and Vertii, A. (2001). Heavy metal accumulation and detoxification mechanisms in plants. Botany journal, 25:111-121.

Page, A. L., Bingham, F.T. and Nelson, C. (1971). Cadmium absorption and growth of various plant species as influenced by solution cadmium concentration. Journal of Environmental Quality, 1: *288-291*.

Popova, L., Maslenkova, L., Yordanova, R., Ivanova, A., Krantev, A., Szalai, G. and Janda, T. (2009). Exogenous treatment with salicylic acid attenuates cadmium toxicity in pea seedlings. Plant Physiology and Biochemistry, 47: 224-231.

Sakihama, Y., Cohen, M.F., Grace, S.C. and Yamasaki, H. (2002). Plant phenolics antioxidant and oxidant activity: Phenolics-induced oxidative damage mediated by metal in plants. Toxicology, 177: 67-80.

Schützendübel, A. and Polle, A. (2002). Plant responses to abiotic stress: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization, Journal of Experimental Botany, 53: 1351- 1365.

Shafi, M., Bakht, J., Hasan, M., Raziuddin, M., and Zhang, G. (2009). Effect of cadmium and salinity stresses on growth and antioxidant enzyme activities of wheat (*Triticum aestivum. L*). Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 82:772-776.

Shulaev, V. and Oliver, D.J. (2006). Metabolic and proteomic markers for oxidative stress. new tools for reactive oxygen species research. Plant Physiology, 141: 367-372

Siedlecka, A. M. (1995). Some aspects of interactions between heavy metals and plant mineral nutrients. Acta Societatis Botanicosum poloniae, 64:265-272.

Smeets, K., Cuypers, A., Lambrechts, A., Semane, B., Hoet, P., VanLaera , A. and Vangronsveld, J. (2005). Induction of oxidative stress and antioxidative mechanisms in *Phaseolus vulgaris* after Cd application. Plant Physiology and Biochemistry, 43:437-444.

Stroihski, A. (1999). Some physiological and biochemical aspects of plant resistance to cadmium effect. I. Antioxidative system. Acta Physiologia Plantarum, 21: 175-188.

Toppi, L. and Gabbrielli, R. (1999). Response to cadmium in higher plants- review. Environmental and Experimental Botany, 41:105-130.

Vassilev, A., Vangronsveld, J. and Yordanov, I. (2002). Cadmium phytoextration; present state, biological backgrounds and reaserch needs –review. Plant Physiology, 28:68-95.

Wagner, G.J. (1979). Content and vacuole/extravacuole distribution of neutral sugars, free amino acids, and anthocyanins in protoplast. Plant Physiology, 64: 88-93

Study of physiological and biochemical parameters of some soybean (*Glycine max*) varieties under cadmium stress

Shahla Hashemi [1], Fereshteh Mohamadhasani[*2]

Received:
Accepted:

Abstract

In the current study, the effect of different concentrations of cadmium (0, 200, 400 µM) on root and shoot growth, malondialdehyde (MDA), total phenol, hydrogen peroxide (H_2O_2), chlorophyll and anthocyanin contents, phenylalanine ammonia lyase (PAL) activity were investigated in three varieties of soybean plant (Telar, DPX, Caspian). The results showed that cadmium treatment caused reduction of root and shoot biomass as well as chlorophyll a content in all three cultivars with the highest reduction in Telar. Significant increase in total phenolics and anthocyanin contents and PAL activity was observed in all the three soybean cultivars with the cadmium treatment. The content of MDA in all three cultivars was significantly increased in 400 µM concentration of cadmium treatment as compared to control. The results of this study indicated that Telar cultivar was the most sensitive cultivar to cadmium stress compared with Caspian and DPX cultivars.

Keywords: Anthocyanin, Soybean, Phenol, Cadmium

1-Biology Department, Faculty of Science, ShahidBahonar University of Kerman, Iran

2-Assistant professor, Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran

*(corresponding author: fereshtehmhasani@yahoo.com)