مجله بیوتکنولوژی کشاورزی

علمی-پژوهشی و ISC

اثر سمیت کادمیوم بر الگوی بیان ژن و فعالیت آنزیمی سوپراکسید دیسموتاز و آسکوربات پراکسیداز در گیاهچه‌های نخود (*Cicer arietinum* L.)

فهیمه هاشمی[1]، حمیدرضا کاوسی*[2]، شهرام پورسیدی[3]

[1]دانشجوی سابق کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

[2]استادیار بخش مهندسی بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

[3]دانشیار بخش مهندسی بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹٤/۱۲/۱۵، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۱/۰۳

چکیده

هنگامی که گیاهان در معرض شرایط محیطی تنش‌زا قرار می‌گیرند، تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) افزایش یافته و سبب خسارات عمده به سلول‌ها می‌شود. در گیاهان سیستم‌های دفاع آنتی اکسیدانی وجود دارند که می‌توانند ترکیبات ROS را سمیت‌زدائی کنند. در این تحقیق تغییرات در الگوی بیان و فعالیت آنزیمی سوپراکسید دیسموتاز و آسکوربات پراکسیداز گیاهچه‌های نخود در پاسخ به غلظت‌های مختلف کلرید کادمیوم (۰، ۰/۵، ۲/۵، ۷/۵، ۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ میلی مولار) بررسی شد. نتایج نشان داد که در گیاه نخود تولید هر دو آنزیم SOD و APX در هر دو سطح mRNA و فعالیت آنزیمی در برگ‌های گیاهچه‌ها در پاسخ به افزایش کادمیوم در محیط القاء می‌شوند. فعالیت آنزیمی SOD و APX و سطوح رونوشت ژن‌های Cu/ZnSOD و APX در سطوح پائین و متوسط کادمیوم بطور معنی‌داری افزایش یافت ولیکن به دنبال افزایش غلظت کادمیوم از ۱۲/۵ به ۵۰ میلی مولار فعالیت آنزیمی و میزان بیان دو ژن فوق به تدریج کاهش یافت. می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که سیستم دفاع آنتی اکسیدان آنزیمی در نخود نقش عمده‌ای در پاسخ به سمیت کادمیوم ایفا می‌کند.

واژه‌های کلیدی: *آنزیم‌های آنتی اکسیدان، کادمیوم، نخود، بیان ژن.*

* نویسنده مسئول: حمیدرضا کاووسی تلفن: ۰۹۱۵۵۲۵۰۰۹۳ Email: hrkavousi@yahoo.com

مقدمه

امروزه آلودگی محیط زیست، به عنوان یکی از مباحث بسیار مهم در زندگی بشر مطرح است. فلزات سنگین از منابع آلاینده محیط زیست از جمله خاک می‌باشند که در صورت تجمع در خاک و جذب به وسیله گیاه به زنجیره‌های غذایی وارد می‌شوند و مسمومیت‌هایی را در گیاهان و یا افراد تغذیه کننده از آن‌ها ایجاد می‌کنند (Khosravi *et al*., 2009).

در بین فلزات سنگین ، کادمیوم بیش از بقیه آن‌ها مورد توجه جوامع علمی قرار گرفته است. این فلز به علت سمیت زیاد و حلالیت بالا در آب و همچنین جذب سریع توسط سیستم ریشه-ای بسیاری از گونه‌های گیاهی به عنوان یکی از مهم‌ترین آلاینده‌های فلزی محسوب می‌شود (Vassilev *et al*., 1998).

بررسی‌ها نشان داده است که کادمیوم بر تقسیم و رشد سلول‌ها، رشد کلی گیاه، تقسیم سلولی منطقه مریستمی و تنظیم رشد و نمو گیاهان اثر می‌گذارد و سبب تاخیر در رشد گیاهان می‌شود. کادمیوم اضافی از فعالیت روبیسکو آنزیم کلیدی چرخه کالوین ممانعت به عمل آورده و تنفس، جذب و انتشار عناصر غذایی و متابولیسم نیتروژن و سولفات را در گیاهان مختل می‌نماید (Manara, 2012).

یکی از آسیب‌های مهم بافتی که در اثر قرار گرفتن گیاهان در معرض فلزات سنگین از جمله کادمیوم رخ می‌دهد، تولید گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive Oxygen Species ROS) و ایجاد تنش اکسیداتیو است. این ترکیبات می‌توانند به ترکیبات حیاتی سلول مانند اسیدهای چرب غیر اشباع، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک حمله نمایند. این واکنش‌ها بطور طبیعی ویژگی‌هایی 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 (Romero-Puertas *et al*., 2007).

در بافت‌های گیاهی این تخریب اکسیداتیو معمولا بوسیله سازوکارهای آنتی اکسیدانی آنزیمی و غیر آنزیمی خنثی می‌گردد. آنتی اکسیدان‌های غیرآنزیمی شامل بتاکاروتن‌ها، آلفا توکوفرول، آسکوربات و گلوتاتیون و آنتی اکسیدان‌های آنزیمی شامل سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، آسکوربات پراکسیداز (APX)، فنل پراکسیداز (POX) و گایاکول پراکسیداز (GPX) می‌باشند (Parmar *et al*., 2013).

سوپراکسید دیسموتاز اولین و مهمترین آنزیم در فرآیند سمیت‌زدایی ترکیبات ROS است که با تبدیل رادیکال سوپراکسید (O^{2-}) به H_2O_2 تقش حیاتی در سازوکارهای دفاعی سلول در برابر خطر تشکیل رادیکال هیدروکسیل (OH) ایفا می‌کند. پراکسید هیدرژن حاصله در مرحله بعدی به وسیله آنزیم‌هایی نظیر کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز پاکسازی می‌شود (Benavides *et al*., 2005). براساس کوفاکتورهای فلزی که در آنزیم‌ها استفاده می-

شود، SOD ها به سه گروه تقسیم می‌شوند: Cu/Zn – SOD که در سیتوسول و کلروپلاست قرار دارد، Mn – SOD که در میتوکندری سلول-های یوکاریوت وجود دارد و Fe – SOD که در کلروپلاست قرار دارد (Khatun *et al*., 2008).

پراکسیدازها گروه بزرگی از آنزیم‌های دفاعی هستند که در گیاهان در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیر زیستی تولید می‌شوند. پراکسیدازها معمولا واکنش اکسیداسیون و احیا را بین پراکسید هیدرژن به عنوان گیرنده الکترون و انواع زیادی از سوبستراها مثل مواد فنلی، اسید آسکوربیک، آمین‌های آروماتیک و سیتوکروم c کاتالیز می‌کنند و به عنوان آنزیم‌های سم‌زدای گونه‌های فعال اکسیژن عمل می‌کنند. از جمله پراکسیدازها می-توان به آسکوربات پراکسیداز اشاره کرد که نقش مهمی در تعدیل میزان ترکیبات ROS تولید شده طی تنش در سلول دارد. این آنزیم از آسکوربات به عنوان عامل احیا کننده استفاده می‌کند و H_2O_2 را از طریق چرخه‌ی آسکوربات- گلوتاتیون تجزیه می‌نماید (Mittler, 2002).

نخود (*Cicer arietinum* L.) یکی از گونه‌های جنس *Cicer*، گیاهی است خودگشن و دیپلوئید با تعداد کروموزوم ۲n=۲x=۱۶ و از منابع مهم پروتئینی به شمار می‌رود که دارای ۱۶ تا ۲٤ درصد پروتئین است. نخود از نظر اهمیت، پس از لوبیا و نخود فرنگی رتبه سوم را در بین حبوبات جهان دارد و در ایران مهمترین گیاه از رده حبوبات است (Lotfi *et al*., 2015).

در این تحقیق به منظور تعیین نقش سیستم دفاع آنتی اکسیدانی آنزیمی گیاه نخود در مواجهه با تنش فلز سنگین کادمیوم، میزان فعالیت و الگوی بیان ژن کد کننده آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز (Cu/ZnSOD) و آسکوربات پراکسیداز (APX) در غلظت‌های مختلف کلرید کادمیوم در شرایط گلخانه مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

کشت بذور و تیمار کادمیوم: در این تحقیق از ژنوتیپ Kc-218848 دریافتی از بانک ژن گیاهی ملی ایران استفاده شد. در ابتدا سطح بذور با اتانل ۷۵ درصد بمدت ۳۰ ثانیه و هیپوکلریت سدیم ۵ درصد بمدت ۲ دقیقه ضدعفونی و به کمک آب مقطر چندین بار شستشو داده شد. بذرها به مدت ۲٤ ساعت در پتری دیش‌های ۹ سانتی متری حاوی کاغذ واتمن قرار داده شده و درون انکوباتور ۲۵ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. سپس بذرهای جوانه زده به گلدان‌های حاوی نسبت مساوی از کوکوپیت و ماسه بادی شسته شده منتقل و در اتاق رشد، تحت شرایط ۱٦ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند. گیاهان به مدت ۱۰ روز به صورت یک روز در میان با محلول هوگلند آبیاری شدند. پس از ۱۰ روز آبیاری و پس از اینکه گیاهان به مرحله دو تا چهار برگی رسیدند، به مدت یک هفته در معرض غلظت‌های ۰، ۰/۵، ۲/۵، ۷/۵ ۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ میلی مولار کلرید کادمیوم قرار گرفته و سپس جهت اندازه گیری فعالیت آنزیمی و الگوی بیان ژن‌های

سوپراکسید دیسموتاز و آسکوربات پراکسیداز مورد استفاده قرار گرفتند.

استخراج عصاره آنزیمی: برای تهیه عصاره آنزیمی میزان ۱۰۰ میلی گرم بافت (بخش هوائی) توزین و به همراه یک میلی لیتر بافر استخراج شامل فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی مولار با pH=۷/۸، EDTA ۰/۱ میلی مولار و ۱٪ PVP در هاون چینی سرد و بر روی یخ همگن گردید. سپس عصاره‌های حاصل در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه و در دمای ٤ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سنجش‌های آنزیمی در مایع رویی به کمک اسپکتروفتومتر و در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و در ۳ تکرار صورت گرفت. مقدار پروتئین نمونه ها با روش برادفورد اندازه‌گیری شد (Bradford, 1976).

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز: فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (۱. ۱. ۱۵. ۱ EC) از طریق اندازه‌گیری توانایی آن در جلوگیری از احیای نوری نیتروبلو تترازولیوم کلراید (NBT) با استفاده از روش (Dehindsa *et al.*, 1981) اندازه‌گیری شد. یک واحد فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز، مقدار آنزیمی در نظر گرفته می‌شود که می‌تواند تا ۵۰ درصد مانع از احیای نوری نیتروبلوتترازولیوم کلراید گرد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز: فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (۱. ۱. ۱۱. ۱ EC) بر اساس میزان اکسید شدن آسکوربات در طول موج ۲۹۰ نانومتر به روش (Nakano & Asada 1987) اندازه‌گیری گردید. یک میلی‌لیتر مخلوط واکنش شامل بافر فسفات پتاسیم یک مولار (pH = ۷/۸)، آسکوربات ۱۰ میلی‌مولار، پراکسید هیدرژن ۱۰ میلی‌مولار و ۱۰ میکرولیتر عصاره خام بود.

استخراج RNA کل و ساخت cDNA: RNA کل با استفاده از کیت RNX™plus شرکت سیناکلون از گیاهان تحت تنش و گیاهان شاهد مطابق دستورالعمل موجود استخراج گردید. کیفیت و کمیت RNA استخراج شده با استفاده از ژل آگارز یک درصد و دستگاه نانودراپ تعیین شد. پس از تیمار RNA با آنزیم DNase I جهت حذف آلودگی احتمالی با DNA ژنومی، یک میکروگرم RNA وارد فرآیند ساختن cDNA گردید و مراحل بر اساس دستورالعمل موجود در کیت RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit شرکت ترموساینتیفیک انجام شد.

واکنش‌های RT-PCR نیمه‌کمی: واکنش‌های RT-PCR نیمه‌کمی در حجم ۲۵ میکرولیتر و با دو تکرار انجام شد. اجزای مخلوط واکنش شامل ۲/۵ میکرولیتر ۱۰X PCR buffer، ۲mM $MgCl_2$، هر dNTP با غلظت ۲۰۰µM، ۲ میکرولیتر cDNA، ۱ واحد آنزیم Taq polymerase (شرکت ترموساینتیفیک) و ۱۰پیکومول از هر آغازگر (جدول ۱) بود. سیکل دمایی استفاده شده در واکنش SQ-RT-PCR مربوط به ژن کنترل داخلی و ژن‌های اصلی دقیقاً مشابه و به صورت زیر بود. ۳ دقیقه در ۹٤C° و متعاقب آن ۳۵ چرخه شامل ٤۵ ثانیه در ۹٤C°، ۳۰ ثانیه در ۵٦C°، ۱ دقیقه در ۷۲C° و تکثیر

نهایی نیز به مدت ۵ دقیقه در ۷۲C° انجام شد. پس از پایان واکنش، ۵ میکرولیتر از محصولات واکنش تکثیر بر روی ژل آگارز ۱٪ بارگذاری و تحت ولتاژ ثابت ۷۵ ولت به مدت ۹۰ دقیقه الکتروفورز شدند. پس از اتمام الکتروفورز، ژل با استفاده از اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شده و عکس‌برداری از آن با استفاده از دستگاه ژل داک انجام شد. تصاویر ژل با استفاده از برنامه TotalLab TL120 کمی شدند.

جدول ۱. لیست آغازگرهای مورد استفاده در واکنش‌های RT-PCR نیمه کمی

Table 1. List of used primers in semi-quantitative RT-PCR reactions.

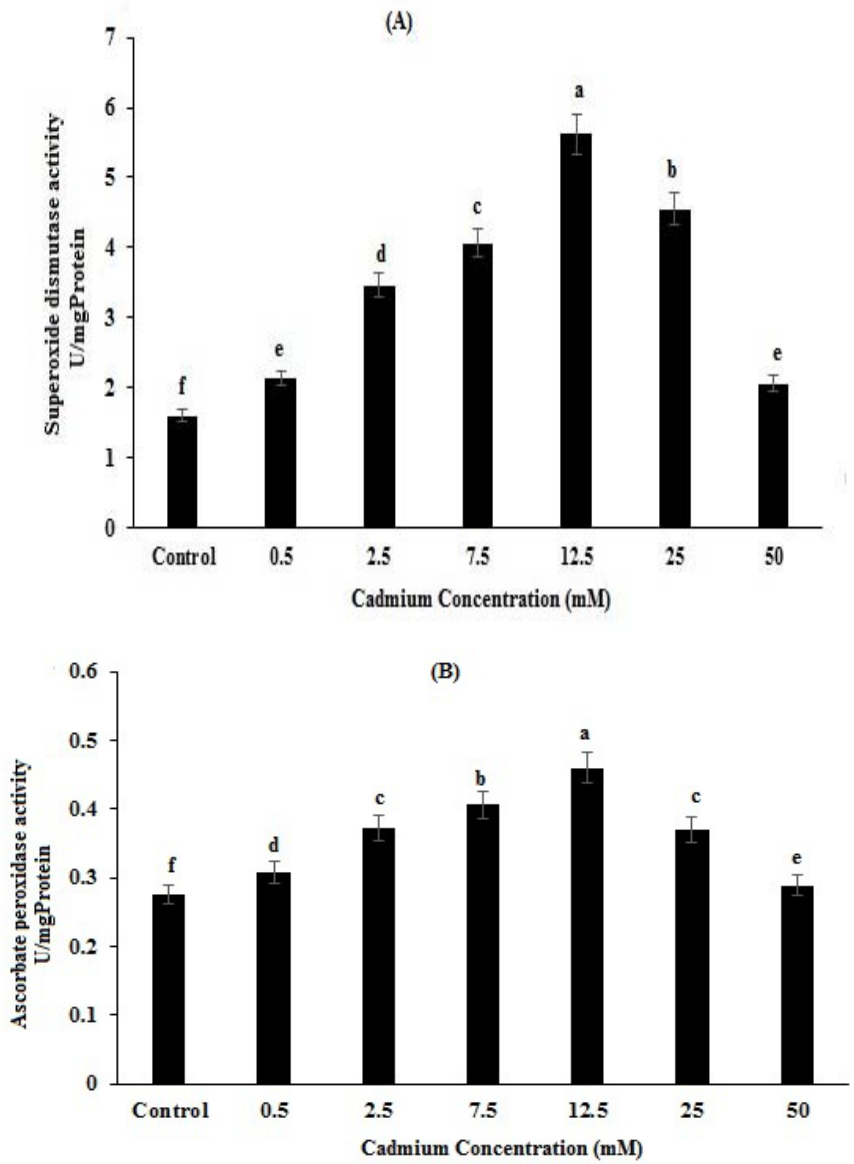
شماره دسترسی Accession Number	نام ژن Gene Name	توالی Sequence	طول محصول (جفت باز) Amplicon Length (bp)
AB024991	APX	5'-CCTTTCCACCCCGGTAGAGAGGACAAGC-3' 5'-ACCACCGGACAAAGCAACAATATCTTGATCG-3'	148
AJ012691	SOD	5'-TAACTTCAGTCAGGAGGGAG-3' 5'-GGAGTTTGGTCCAGTGAGA-3'	227
EU529707.1	ACT	5'-CTACGAATTGCCTGATGGAC-3' 5'-CCTCCTGAAAGGACGATGTT-3'	189

APX: ascorbate peroxidase; SOD: superoxide dismutase; ACT: actin

تجزیه و تحلیل‌های آماری: اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی در قالب طرح کاملا تصادفی با ۳ تکرار انجام شد. آزمایشات بیان نیز با حداقل ۲ تکرار انجام شد. تجزیه واریانس داده های بدست آمده با استفاده از نرم افزار آماری SAS انجام گرفت و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ صورت گرفت. جهت ترسیم نمودار از نرم افزارExcel استفاده شد.

نتایج و بحث

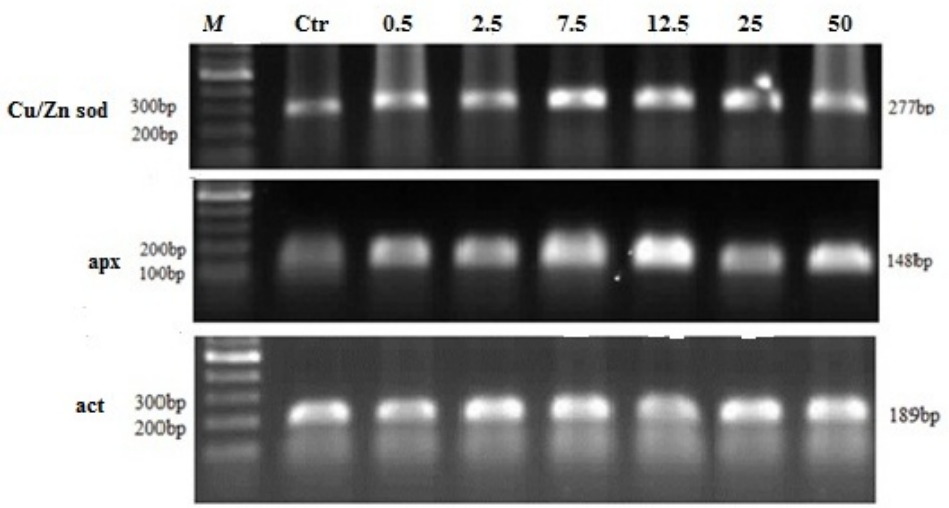
نتایج نشان داد که با افزایش غلظت کادمیوم، میزان فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و آسکوربات پراکسیداز بطور معنی-داری (P<۰/۰۵) در گیاهچه‌های نخود افزایش پیدا می‌کند. بیشترین میزان فعالیت هر دو آنزیم در غلظت ۱۲/۵ میلی مولار مشاهده گردید بطوریکه میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در این غلظت ۳/۵ برابر و میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز بیش از ۱/۵ برابر گیاهچه‌های شاهد بود. پس از آن با افزایش میزان کادمیوم در محیط میزان فعالیت هر دو آنزیم بطور تدریجی کاهش یافت، هرچند در حداکثر غلظت کادمیوم هنوز میزان فعالیت هر دو آنزیم بیش از گیاهان شاهد بود (شکل ۱).



شکل ۱- اثر کادمیوم بر میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (A) و آسکوربات پراکسیداز (B) در گیاهچه‌های نخود. میانگین‌هایی که حداقل یک حرف مشترک دارند، از نظر آماری با استفاده از آزمون دانکن(P<۰/۰۵) اختلاف معنی‌داری ندارند.

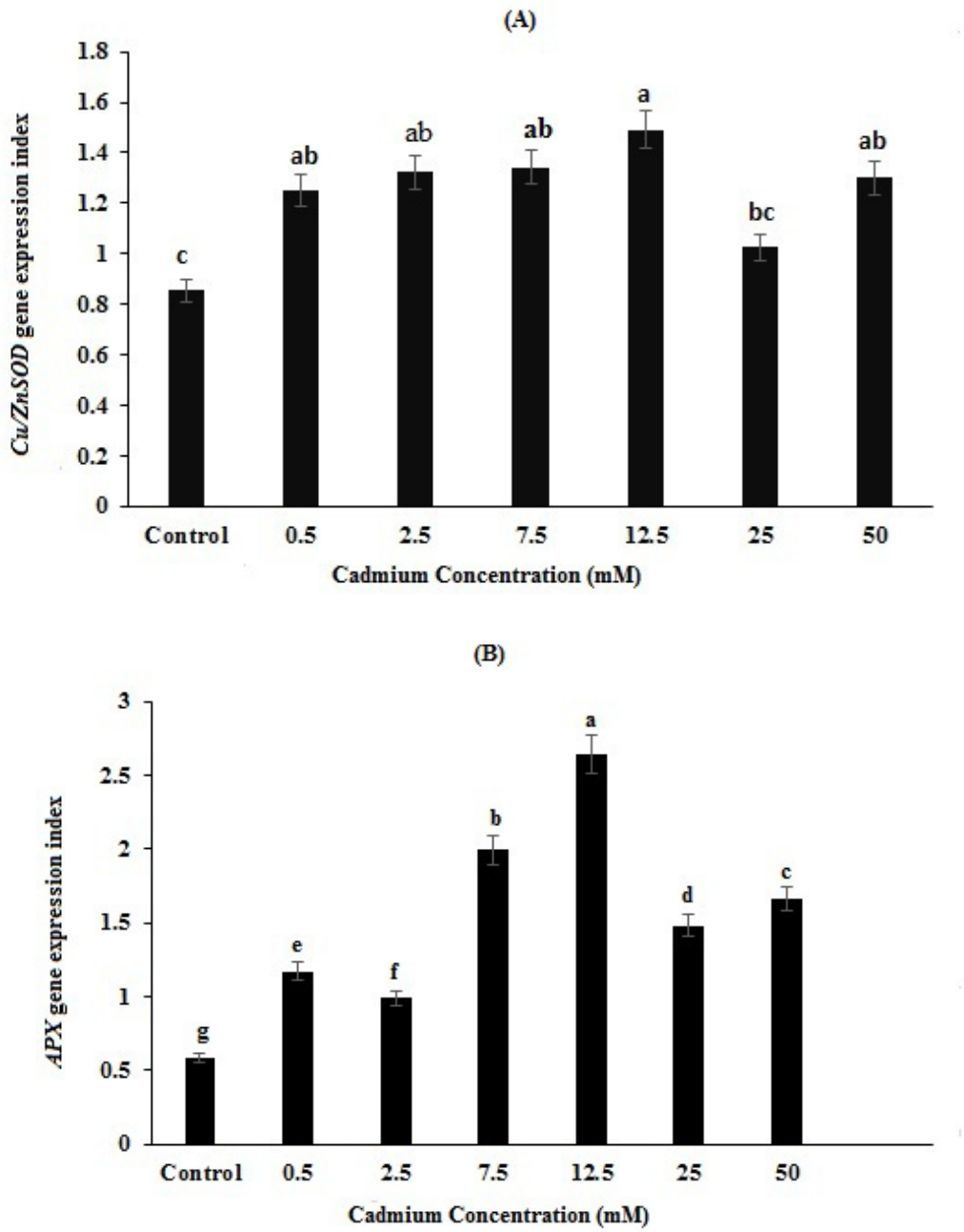
Figure 1- Effect of cadmium on superoxide dismutase and ascorbate peroxidase activity in Chickpea seedlings. Means followed by the same letters are not significantly different for P < 0.05 according to the Duncan's test.

در تحقیق حاضر، با افزایش غلظت کادمیوم میزان رونوشت ژن‌های کد کننده Cu/ZnSOD و APX در مقایسه با شاهد بطور معنی‌داری (P<۰/۰۵) افزایش یافت. بیشترین میزان بیان ژن همانند فعالیت آنزیمی در غلظت ۱۲/۵ میلی مولار کادمیوم مشاهده شد. با افزایش غلظت کادمیوم به بیش از ۱۲/۵ میلی مولار از میزان بیان هر دو ژن کاسته شد هرچند هنوز در مقایسه با گیاه شاهد میزان بیان ژن بیشتر بود. در غلظت ۵۰ میلی‌مولار دوباره میزان بیان هر دو ژن اندکی افزایش یافت هرچند این افزایش در مورد ژن Cu/ZnSOD از نظر آماری معنی‌دار نبود. نتایج آزمایشات بیان ژن با اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی تا حد زیادی مطابقت داشت (شکل ۲ و ۳).



شکل ۲- نتایج RT-PCR نیمه کمی ژن‌های Cu/ZnSOD و APX نخود در غلظت‌های مختلف کلرید کادمیوم.

Figure 2- Semi quantitative RT-PCR results of Cu/ZnSOD and APX genes of chickpea in different concentrations of cadmium chloride.



شکل ۳- میزان نسبی بیان ژن Cu/ZnSOD (A) و APX (B) در گیاهچه‌های نخود. میانگین‌هایی که حداقل یک حرف مشترک دارند، از نظر آماری با استفاده از آزمون دانکن(P<۰/۰۵) اختلاف معنی‌داری ندارند.

Figure 1. Relative expression levels of Cu/ZnSOD and APX genes in Chickpea seedlings. Means followed by the same letters are not significantly different for P < 0.05 according to the Duncan's test.

افزایش ظرفیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان یک پاسخ عمومی به مقادیر سمی فلزات سنگین می‌باشد. آنزیم‌های آنتی اکسیدان مهم‌ترین ترکیبات در جلوگیری از تنش اکسیداتیو در گیاهان می‌باشند. موضوع فوق بر اساس این واقعیت استوار است که عموما فعالیت یک یا چند مورد از این آنزیم‌ها در گیاهان تحت تنش القاء می‌شوند (Manara, 2012). در این مطالعه نیز تنش کادمیوم سبب القا SOD و APX در سطح رونویسی و فعالیت آنزیمی شد (شکل ۱ و ۲) که می‌تواند دلیل غیر مستقیمی بر افزایش ترکیبات ROS تحت تنش کادمیوم در گیاهچه‌های نخود و القاء سیستم دفاع آنتی اکسیدانی آنزیمی به منظور خنثی کردن این ترکیبات باشد. نتایج آزمایشات قبلی ما نیز نشان داد که در گیاهچه‌های نخود قرار گرفته در معرض کادمیوم، میزان فعالیت دیگر آنزیم‌های آنتی اکسیدان نظیر کاتالاز و گایاکول پراکسیداز نیز افزایش می‌یابد و الگوی افزایش فعالیت آن‌ها مشابه دو آنزیم SOD و APX می‌باشد. همچنین میزان پرولین به عنوان یک ترکیب آنتی‌اکسیدان غیرآنزیمی نیز در گیاهچه‌های تیمار شده با کادمیوم افزایش یافت (Hashemi *et al*., 2014).

افزایش مشابهی در فعالیت آنزیم SOD و APX در پاسخ به کادمیوم در برگ و ریشه *Phragmaites australis* گزارش شده است (Iannelli *et al*., 2002). همچنین افزایش کادمیوم سبب القاء فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در چاودار (Luo *et al*., 2011) و لوبیا (Ahmadvand *et al*., 2013) شد. افزایش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز تحت تنش کادمیوم در عدس (Barandeh *et al*., 2014) و *Lemna polyrrhiza* (John *et al*., 2008) نیز گزارش شده است.

نتایج این تحقیق نشان داد که به موازات افزایش فعالیت آنزیمی، میزان رونوشت‌های ژن‌های کد کننده Cu/ZnSOD و APX در گیاهان نخود قرار گرفته در معرض کادمیوم، در مقایسه با شاهد بطور معنی‌داری افزایش یافت. بررسی‌های مختلف نشاندهنده این مورد است که فاکتورهای محیطی مختلف که سبب ایجاد تنش اکسیداتیو در گیاهان می‌شوند، معمولا باعث فعال کردن آنزیم‌های آنتی اکسیدان در سطح رونویسی می‌شوند (Jithesh *et al*., 2006). در تحقیقی بر روی سویا میزان بیان ژن کد کننده Cu/ZnSOD تحت تنش کادمیوم القاء شد (Pawlak *et al*., 2009). القاء بیان آنزیم‌های آنتی اکسیدان نظیر SOD و پراکسیداز در ژنوتیپ‌های مختلف *Medicago truncatula* بوسیله کادمیوم (Rahoui *et al*., 2014)، القاء بیان APX بوسیله کادمیوم در چاودار (Luo *et al*., 2011) و سرب در *Lepidium sativum* (Ibrahim & Bafeel, 2009) نیز گزارش شده است. القاء رونوشت ژن‌های آنتی اکسیدان نشاندهنده این است که ترکیبات ROS در گیاهچه‌های نخود قرار گرفته در معرض کادمیوم، القاء شده و سیستم دفاعی آنتی اکسیدانی در سطح رونویسی فعال شده است تا ترکیبات ROS را حذف نماید.

در غلظت‌های نسبتا پایین یا متوسط کادمیوم، تولید ROS در نخود می‌تواند به وسیله افزایش فعالیت SOD و APX در سطح رونویسی و فعالیت آنزیمی بی اثر شود و احتمالا این القاء فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان به عنوان یک راهکار دفاعی عمومی برای جلوگیری از سمیت مطرح می‌باشد. برعکس، افزایش کادمیوم منجر به کاهش فعالیت آنتی اکسیدانی می‌شود. بنابراین ولو آنکه سازوکار دفاعی فعال شده باشد، سمیت زیاد اعمال شده به وسیله کادمیوم در غلظت بیش از ۱۲/۵ میلی مولار، به سبب تولید ترکیبات ROS سبب کاهش کارکرد سیستم دفاع آنتی اکسیدانی آنزیمی و احتمالا سبب تداخل در ظرفیت متابولیکی گیاه خواهد شد (Chamseddine *et al*., 2009).

SOD یک متالوآنزیم است که در گروه پروستتیک خود حاوی Fe، Cu/Zn یا Mn می‌باشد. از آن جائی که مشخص شده است که غلظت بالای کادمیوم میزان آهن، روی و منگز بافت‌های گیاهی را کاهش می‌دهد، می‌توان این گونه تصور کرد که کاهش در فعالیت SOD در گیاهچه‌های نخود قرار گرفته در معرض کادمیوم، می‌تواند ناشی از کمبود عناصر ضروری برای فعل و انفعال شیمیایی این آنزیم باشد (Chamseddine *et al*., 2009). کاهش آنزیم‌های آنتی اکسیدان می‌تواند در نتیجه تجمع ترکیبات ROS که بطور مستقیم یا غیر مستقیم به وسیله کادمیوم القاء می‌شوند، نیز باشد. تجمع ترکیبات ROS درخلال انفجار اکسیداتیو سبب افزایش بیش از حد سوبسترای آنزیم‌های آنتی اکسیدان خواهد شد که این امر غیر فعال شدن آن‌ها را در پی خواهد داشت. کاهش در فعالیت آنزیمی در غلظت‌های بالای فلز ممکن است با غیر فعال شدن آنزیم بواسطه اتصال فلز به گروه سولفیدریل آنزیم نیز مرتبط باشد. دیگر مطالعات نیز حاکی از این است که دناتوره شدن و غیر فعال شدن پروتئین نیز یک جزء مهم پاسخ‌های مرتبط با سمیت یون‌های فلزی است (Chamseddine *et al*., 2009).

همچنین امروزه به خوبی روشن شده است که کادمیوم می تواند از نظر کارکردی جایگزین روی گردد. روی (Zn^{2+}) یک عنصر ضروری است که شرایط اتصال فاکتورهای رونویسی را بر روی نقاط تنظیمی ژن‌های مختلف فراهم می آورد. لذا به نظر می‌رسد که کادمیوم در غلظت‌های بالا با جلوگیری از فعالیت فاکتورهای رونویسی یا کاهش سنتز فاکتورهای رونویسی سبب کاهش بیوسنتز رونوشت‌های SOD و APX می‌شود (Sobkowiak *et al*., 203). همچنین کادمیوم سبب خسارات عمده به DNA شده و با تغییر الگوی متیلاسیون DNA و کاهش بیوسنتز RNA و یا ممانعت از فعالیت RNA پلیمراز از رونویسی ژن‌ها ممانعت به عمل می‌آورد (Pierron *et al*., 2014).

با توجه به نتایج این آزمایش و آزمایشات قبلی به نظر می‌رسد که سیستم دفاع آنتی اکسیدانی آنزیمی نقش مهمی در راهکار دفاعی گیاه نخود در برابر سمیت کادمیوم ایفا می‌کند و

این سیستم دفاعی در سطح رونویسی و فعالیت آنزیمی القاء و فعال می‌شود تا به گیاه کمک کند با سمیت کادمیوم مقابله نماید.

منابع

Ahmadvand S, Bahmani R, Habibi D, 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: 167-182.

Barandeh F, Kavousi HR, Pourseyedi Sh (2014). Activity of antioxidant enzymes, PAL and proline content of lentil seedlings under cadmium stress. 1th Conference on New Finding in Environment and Agriculture Ecosystems. Tehran, Iran.

Benavides MP, Gallego SM, Tomaro ML (2005). Cadmium toxicity in plants. Brazilian Journal of Plant Physiology 17: 21-34.

Bradford MM (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.

Chamseddine M, Wided BA, Guy H, Marie-Edith C, Fatma J (2009). Cadmium and copper induction of oxidative stress and antioxidative response in tomato (*Solanum lycopersicon*) leaves. Plant Growth Regulation 57: 89–99.

Dhindsa RA, Plumb-Dhindsa P, Thorpe TA (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.

Farzadnejad F, Razavizade R, Shabani L (2013). Physiological responses and antioxidant enzyme activities in seedlings of *Lepidium sativum* L. under methyl isothiocyanate stress. Journal of Plant Process and Function 2: 49-61.

Hashemi F, Kavousi HR, Barandeh F, Pourseyedi Sh (2014). The effect of different cadmium concentration on some physiological parameters of Chickpea (*Cicer arietinum* L.). 1th Conference on New Finding in Environment and Agriculture Ecosystems. Tehran, Iran.

Iannelli MA, Pietrini F, Fiore L, Petrilli L, Massacci A (2002). Antioxidant response to cadmium in *Phragmites australis* plants. Plant Physiology and Biochemistry 40: 977–982.

Ibrahim M, Bafeel S (2009). Alteration of gene expression, superoxide anion radical and lipid peroxidation induced by lead toxicity in leaves of *Lepidium sativum*. Journal of Animal and Plant Sciences 4: 281-288.

Jithesh MN, Prashanth SR, Sivaprakash KR, Parida A (2006). Monitoring expression profiles of antioxidant genes to salinity, iron, oxidative, light and hyperosmotic stresses in the highly salt tolerant grey mangrove, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. by mRNA analysis. Plant Cell Reports 25: 865–876.

John R, Ahmad P, Gadgil K, Sharma S (2008). Effect of cadmium and lead on growth, biochemical parameters and uptake in *Lemna polyrrhiza* L. Plant, Soil and Environment 54: 262–270.

Khatun S, Babar Ali M, Hahn EJ, Paek, KY (2008). Copper toxicity in *Withania somnifera*: Growth and antioxidant enzymes responses of in vitro grown plants. Environmental and Experimental Botany 64: 279-285.

Khosravi F, Savaghebi Firoozabadi G, Farahbakhsh M (2009). The effect of potassium chloride on cadmium uptake by canola and sunflower in a polluted soil. Journal of Water and Soil 23: 28-35.

Lotfi M, Aghaei MJ, Vaezi SH, Majidi E (2015). Evaluation of genetic diversity, heritability and genetic progress in Kabuli type chickpea genotypes. Iranian Journal of Pulses Research 6: 100-107

Luo H, Li H, Zhang X, Fu J (2011). Antioxidant responses and gene expression in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) under cadmium stress. Ecotoxicology 20: 770–778.

Manara A (2012). Plant responses to heavy metal toxicity, In: Furini A (Eds.), Plants and Heavy Metals. Springer.

Mittler R (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends in Plant Science 7: 405-410.

Nakano Y, 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.

Parmar P, Dave B, Sudhir A, Panchal K, Subramanian RB (2013). Physiological, biochemical and molecular response of plants against heavy metals stress. International Journal of Current Research 5: 80-89.

Pawlak S, Firych A, Rymer K, Deckert J (2009). Cu/Zn-superoxide dismutase is differently regulated by cadmium and lead in roots of soybean seedlings. Acta Physiologia Plantarum 31: 741–747.

Pierron F, Baillon L, Sow M, Gotreau S, Gonzalez P (2014). Effect of low-dose cadmium exposure on DNA methylation in the endangered european eel. Environmental Science & Technology 48: 797-803.

Rahoui S, Ben C, Chaoui A, Martinez Y, Yamchi A, Rickauer M, Gentzbittel L, El Ferjani E (2014). Oxidative injury and antioxidant genes regulation in cadmium-exposed radicles of six contrasted *Medicago truncatula* genotypes. Environmental Science and Pollution Research 21: 8070–8083.

Romero-Puertas MC, Corpas FJ, Rodriguez-Serrano M, Gomez M, del Río LA, Sandalio LM (2007) Differential expression and regulation of antioxidative enzymes by cadmium in pea plants. Journal of Plant Physiology 164: 1346–1357.

Sobkowiak R, Joanna D (2003). Cadmium-induced changes in growth and cell cycle gene expression in suspension-culture cells of soybean. Plant Physiology and Biochemistry 41: 767-772.

Vassilev A, Tsonev T, Yordanov I (1998). Physiological response of barley plants (*Hordeum vulgare*) to cadmium contamination in soil during ontogenesis. Environmental Pollution 103: 287-293.

Effect of cadmium toxicity on gene expression and enzyme activity of superoxide dismutase and ascorbate peroxidas in chickpea (*Cicer arietinum* L.) seedlings

Hashemi H.[1], Kavousi H.R.[2*], Pourseyedi Sh[3].

[1]Former MSc student, Department of Biotechnology, College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran
[2]Assistant Professor, Department of Biotechnology, College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran
[3]Associate Professor, respectively, Department of Biotechnology, College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

Abstract

When plants are exposed to stressful environmental conditions, the production of reactive oxygen species (ROS) increases and can cause significant damage to the cells. Antioxidant defense systems, which can detoxify ROS, are present in plants. In this study, the changes in expression profile and enzyme activity of superoxide dismutase and ascorbate peroxidase were analyzed in chickpea seedlings in response to different concentrations (0, 0.5, 2.5, 7.5, 12.5, 25 and 50 mM) of cadmium chloride. The results showed that in Chickpea plants, the SOD and APX were induced both at mRNA and enzyme activity levels in leaves of seedlings in response to cadmium overload. The enzyme activity of SOD and APX and mRNA transcript levels of Cu/ZnSOD and APX increased significantly at low and medium cadmium levels but decreased gradually throughout on increasing cadmium concentration from 12.5 to 50 mM. It was concluded that the enzymatic antioxidant defense system in chickpea played a major role in its response to cadmium tixicity.

Key Words: ***Antioxidant enzymes, Cadmium, Chickpea, Gene expression.***

* Corresponding Author: Kavousi H.R. Tel: 09155250093 Email: hrkavousi@yahoo.com