

روند تغییرات میزان پلی آمینها در مراحل اولیه رشد گیاه ذرت (*Zea mays* L.) تحت تنش کادمیوم

مژگان لطیفی^۱، سیده بتول حسنی^{۱*}، حسن رضادوست چهارده^۲، ندا نصیری آلمانقدیم^۱، و سارا جعفری^۱ و فرانسواز برنارد^۱

^۱ ایران، تهران، دانشگاه شهید بهشتی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، گروه علوم و زیست فناوری گیاهی

^۲ ایران، تهران، دانشگاه شهید بهشتی، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، گروه فیتوشیمی

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۰/۱۸ تاریخ پذیرش: ۹۷/۳/۲۰

چکیده

تنش فلزات سنگین (تنش کادمیوم) از مهم ترین عوامل کاهش دهنده رشد گیاهان و عملکرد محصولات کشاورزی به شمار می رود. تغییرات میزان پلی آمینها در گیاهان از جمله پاسخهای گیاهان به تنش فلزات سنگین می باشد. با توجه به اهمیت کشت گیاه ذرت، اثر مدت زمان تنش کادمیوم بر جوانه زنی، شاخصهای رشد گیاه و میزان پلی آمینها (پوترسین، اسپرمیدین و اسپرمین) در دانه رسته‌های ۳ روزه و ریشه این گیاه به مدت بیست روز توسط دستگاه HPTLC بررسی شد. نتایج نشان داد تنش کادمیوم در گیاه ذرت باعث تأخیر جوانه زنی بذرها و کاهش شاخصهای رشد گیاه شد. تنش کادمیوم منجر به افزایش محتوای پلی آمین کل در نتیجه افزایش ۳۵ درصدی پوترسین در دانه رسته‌های ۳ روزه گیاه شد. به طور کلی افزایش معنی دار پوترسین در ریشه گیاه در روز ششم و پانزدهم پس از کاشت بذر تحت تنش کادمیوم مشاهده شد. در حالی که بیشترین میزان اسپرمین و اسپرمیدین در ریشه گیاه ۱۲ روزه تحت تنش کادمیوم بود. ریشه گیاه ۱۵ روزه بیشترین میزان جذب و انتقال کادمیوم را نشان داد. با توجه به نتایج حاصل، می توان اظهار داشت که تغییرات میزان پلی آمینها در گیاه ذرت طی تنش کادمیوم وابسته به میزان جذب کادمیوم توسط ریشه گیاه و نوع پلی آمینها می باشد.

واژه های کلیدی: آلودگی کادمیوم، *Zea mays* L.، پوترسین، اسپرمیدین، اسپرمین

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱۲۹۹۰۵۵۰۹، پست الکترونیکی: b_hassani@sbu.ac.ir

مقدمه

محتویات کلروفیل و فتوستتوز و کاهش تولید پروتئین می‌گردد (۱۳ و ۲۹). حضور فلزات سنگین در گیاهان باعث ایجاد تنش اکسیداتیو در نتیجه افزایش تولید گونه های فعال اکسیژن و رادیکالهای آزاد از قبیل هیدروژن پراکسید (H₂O₂)، سوپراکسید (O₂⁻) و هیدروکسیل (OH⁻) شده و متعاقباً منجر به تجزیه لیپید، غیرفعالسازی آنزیمها، اختلال در نفوذپذیری غشای سلولی و نهایتاً مرگ سلولی می‌گردد (۱۰ و ۱۸). گیاهان با مکانیسم پیچیده ای در سطح بیوشیمیایی و مولکولی به تنشهای فلزات سنگین

در سالهای اخیر، افزایش استفاده از پسابها و کودهای شیمیایی در کشاورزی باعث افزایش تنشهای فلزات سنگین در گیاهان شده است (۲۳ و ۲۸). در میان فلزات سنگین کادمیوم به دلیل عدم ضروری بودن برای گیاه و تحرک نسبتاً زیاد در خاک، حتی در غلظتهای بسیار کم منجر به ایجاد سمیت و تغییرات ساختاری، مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در گیاهان می‌گردد (۴، ۶ و ۱۳). تنش فلزات سنگین از جمله کادمیوم در گیاهان منجر به ایجاد اختلالات مختلف مانند کاهش رشد، کاهش

محلول ۱۰۰ میلی گرم در لیتر کلرید کادمیوم دارای ۲۷۷/۵ میکرو مول یون کادمیوم می باشد. سپس خاک کوکوپیت نارگیل در محلول ۱۰۰ میلی گرم در لیتر کلرید کادمیوم و آب مقطر (تیمارشاهد) به مدت ۱۸-۲۰ ساعت خیسانده شدند.

سترون سازی بذرها: بذرها ابتدا با آب جاری شستشو و پس از آن توسط اتانول ۷۰ درصد (۱-۲ دقیقه) و هیپوکلریت سدیم ۱ درصد (۱۵ دقیقه) سترون شدند. پس از هر مرحله، بذرها ۲-۳ با آب مقطر سترون شستشو شدند.

شرایط کشت بذرها: کشت در سینی نشاء به ابعاد (۳۲ × ۵۱) و عمق ۷ سانتیمتر انجام شد. خاک رویی و زیرین بذرها در سینی نشاء توزین گردید. بدین صورت که خاک زیرین ۱۲ گرم و خاک رویی ۳ گرم در نظر گرفته شد. عامل نور (۱۶ ساعت روشنایی، ۸ ساعت تاریکی) و دما (C2±23) نیز تنظیم گردید. طی یک دوره ۲۰ روزه، آبیاری به طور یک روز در میان و معادل ۵ میلی لیتر به ازای هر بذر صورت گرفت.

اندازه‌گیری درصد جوانه‌زنی و شاخصهای رشد: تعداد بذرهای جوانه زده در روزهای ۳، ۶، ۹، ۱۲، ۱۵ و ۲۰ شمارش و ثبت گردیدند. جوانه زنی زمانی ثبت شد که ریشه چه از پوست خارج گردید. میزان درصد جوانه زنی بذر از طریق معادله زیر محاسبه شد (۲۵):

$$[\text{تعداد کل بذر} / \text{تعداد بذر جوانه زده}] \times 100 = \text{درصد جوانه زنی}$$

شاخصهای رشد گیاه نظیر طول ساقه و طول ریشه نیز در روزهای ۳، ۶، ۹، ۱۲، ۱۵ و ۲۰ اندازه‌گیری شد. تعداد برگ و سطح برگ در هر گیاه در روز بیستم توسط دستگاه سطح برگ سنچ (leaf area meter, LI3100A, LiCor) اندازه‌گیری شد. همچنین وزن تر و خشک بخشهای مختلف گیاه نظیر

پاسخ می دهند. در گیاهان یکی از اثرات تنشهای فلزات سنگین بر گیاهان انباشتگی میزان پلی آمینها می باشد (۲۰ و ۲۱). پلی آمینها پلی کاتیون های آلیفاتیک با وزن مولکولی کم و دارای گروههای نیتروژنی می باشند که در پاکسازی رادیکالهای آزاد ایجاد شده در اثر تنش و ممانعت از پراکسیداسیون غشاها نقش دارند (۱۷ و ۱۹). فراوان ترین پلی آمینها در گیاهان شامل پوترسین، اسپرمین و اسپرمیدین می باشند. میزان این سه نوع پلی آمین و تنظیم آنها در پاسخ به تنش در گیاهان وابسته به یکدیگر می باشد (۷، ۱۴، ۱۵ و ۲۹).

ذرت (*Zea mays L.*) یکی از مهمترین غلات در زمینه مصارف غذایی انسان و همچنین در تغذیه دام و طیور در سطح جهانی است (۲). تحقیقات بسیاری اهمیت این گیاه را در زمینه گیاه پالایی گزارش کرده اند (۳۱، ۳۵ و ۳۶). فتاحی کیاسری و همکاران (۱۳۸۹) بیان کردند گیاه ذرت می تواند محتوای کادمیوم بیشتری را نسبت به آفتابگردان و پنبه جذب کند (۵). در حقیقت ذرت بیشتر به عنوان گیاه مقاوم در برابر فلزات سنگین به جای گیاه انباشتگر فلزات سنگین شناخته شده است و این امکان وجود دارد که پلی آمینها نقش مهمی را در این گیاه در پاسخ به تنش فلزات سنگین ایفاء کنند. لذا با توجه به اهمیت اقتصادی ذرت و افزایش میزان آلودگی فلزات سنگین در خاکهای کشاورزی، این مطالعه با هدف تعیین شاخصهای رشد و میزان تغییرات انواع پلی آمینها (پوترسین، اسپرمین و اسپرمیدین) طی مراحل اولیه رشد گیاه ذرت بر روی بستر کشت آلوده به کادمیوم انجام شد.

مواد و روشها

مواد گیاهی: بذر ذرت (*Zea mays L.*) واریته ۲۶۰ از مؤسسه اصلاح بذر و نهال کرج تهیه گردید.

تهیه تیمار کادمیوم: از پودر کلرید کادمیوم (CdCl₂) غلظت ۱۰۰ میلی گرم در لیتر در آب مقطر تهیه شد.

۲۷). ۰/۱ گرم بافت تازه گیاهی با ۱ میلی لیتر محلول ۵ درصد پرکلریک اسید (PCA) به مدت ۳ دقیقه هموژن گردید. بافتهای هموژن شده با سرعت 15000 rpm به مدت ۳۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ گردید. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رویی حاصل با ۲۰۰ میکرولیتر از سدیم بیکربنات (Na_2CO_3) اشباع شده و ۴۰۰ میکرولیتر دنسیل کلراید (5mg. ml^{-1}) نیز اضافه شد. سپس نمونه‌ها در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۹۰ دقیقه در تاریکی قرار گرفتند. پس از گذشت این زمان به منظور تخریب دانسیل کلراید باقی مانده، ۲۰۰ میکرولیتر پرولین ($0/1\text{ mg. ml}^{-1}$) به محلول اضافه شد و به مدت ۴۵ دقیقه تحت شرایط قبلی قرار داده شد. محلول حاصل که حاوی پلی آمینهای دانسیله شده است بعد از اضافه کردن ۵۰۰ میکرولیتر تولوئن کاملاً مخلوط شده و فاز رویی حاوی پلی آمینها برای آنالیز برداشت شد.

برای اندازه‌گیری غلظت پلی آمینها از دستگاه HPTLC (CAMAG, Switzerland) استفاده گردید. بدین ترتیب که کروماتوگرافی روی صفحات سیلیکاژل 20×10 سانتیمتری (Merck) 60F254 به عنوان فاز ساکن انجام گرفت و از مخلوط اتیل استات : سیکلوهاگزان با نسبت 4:5 (v/v) به عنوان فاز متحرک استفاده شد (۱۴ و ۱۶). نمونه‌گذاری با استفاده از فشار گاز N_2 ، با طول ۵ میلی متر و فاصله مراکز ۱۰ میلی متر انجام شد. آنالیزها برای هر تیمار در ۳ نمونه و برای هر نمونه در ۳ تکرار نمونه‌گذاری شده و کروماتوگرامها برحسب سطح زیر پیک روبش شده در طول موجهای ۲۴۵ و ۳۶۶ نانومتر مورد ارزیابی قرار گرفتند.

همچنین برای رسم منحنی استاندارد غلظتهای مختلف از اسپرمیدین، اسپرمین و پوتریسین تهیه شد و میزان جذب آنها در طول موجهای ۲۴۵nm و ۳۶۶nm اندازه‌گیری شد. مقادیر سطح زیر پیک در منحنی وارد گردیده و فرمول خط حاصل شد. غلظت هر یک از پلی آمینها در هر نمونه

ریشه، برگ و بخش هوایی در روز بیستم اندازه‌گیری شد. به منظور اندازه‌گیری وزن خشک نمونه‌ها، بخشهای مختلف گیاه در روز بیستم به مدت ۴۸ ساعت در آون با دمای ۷۰ درجه سانتی گراد قرار داده شدند و سپس توزین گردیدند.

سنجش غلظت یون کادمیوم: نمونه‌های گیاهی به مدت ۲۴ ساعت در آون با دمای ۸۰ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. بافت خشک شده توزین گردید و سپس نمونه‌ها در بوته‌های چینی در کوره الکتريکی با دمای ۷۰۰-۵۰۰ درجه سانتی گراد به مدت ۴ ساعت خاکستر شدند. نمونه‌های خاکستر شده با ۵ میلی لیتر اسیدنیتریک غلیظ به مدت ۱۸ ساعت هضم شده و پس از آن محلول حاصل با استفاده از کاغذ صافی واتمن صاف شد و به حجم نهایی محلول با آب مقطر به ۱۰ میلی لیتر رسانده شد. میزان جذب کادمیوم نمونه‌ها توسط دستگاه جذب اتمی Schimadzu (atomic absorption /flame emission) تعیین شد. همچنین محلولهای استاندارد نیز با غلظتهای ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲، ۴ و ۵ میلی گرم بر لیتر تهیه گردید و نمودار استاندارد مربوطه بر اساس میزان جذب کادمیوم رسم شد. غلظت کادمیوم هر نمونه با استفاده از فرمول به دست آمده از نمودار استاندارد محاسبه شد.

میزان کادمیوم بر حسب میلی گرم در هر کیلوگرم وزن خشک گیاه از طریق رابطه زیر محاسبه شد (۳۴):

$$\left[\frac{\text{وزن خشک نمونه (g)}}{\text{حجم نهایی نمونه (ml)}} \right] \times \text{غلظت کادمیوم نمونه (mg/l)} = \text{میزان کادمیوم در گیاه (mg/kg)}$$

برای محاسبه فاکتور انتقال (Translocation Factor) کادمیوم از تقسیم غلظت کادمیوم در بخش هوایی گیاه به غلظت کادمیوم در ریشه استفاده گردید (۲۶).

استخراج و اندازه‌گیری پلی آمینها: استخراج پلی آمینها با استفاده از روشهای (Roussos & Pontikis (۲۰۰۷) و Hassannejad و همکاران (۲۰۱۲) انجام گرفت (۲۲) و

دار می‌باشد، در حالی که اثر متقابل غلظت کلرید کادمیوم \times زمان بر درصد جوانه زنی بذر معنی‌دار نمی‌باشد (جدول ۱).

به‌طور کلی آلودگی کادمیوم موجب تأخیر در شروع جوانه زنی بذرها شد، در حالی که اثر بازدارندگی بر میزان جوانه زنی بذرها نداشت. به طوری که نتایج درصد جوانه زنی بذر ذرت نشان داد که بیشینه درصد جوانه زنی بذر (۱۰۰ درصد) در محیط فاقد کادمیوم و با آلودگی کادمیوم به ترتیب در روزهای دوازدهم و بیستم مشاهده شد (شکل ۱).

با کمک معادله حاصل از منحنی استاندارد پلی‌آمین مربوطه محاسبه شد.

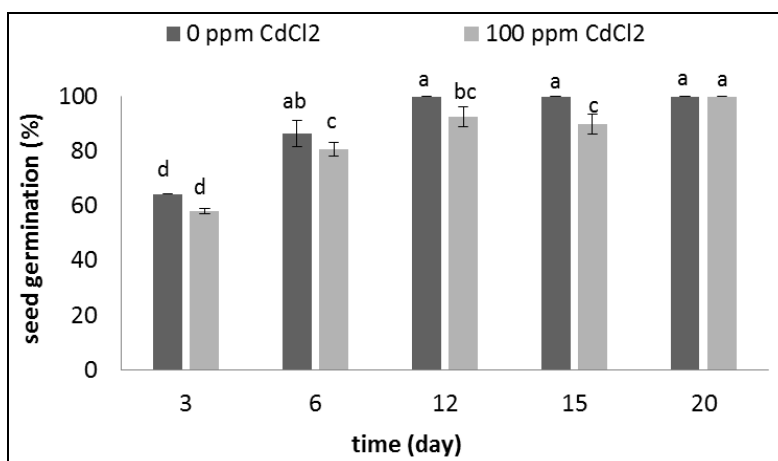
تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها: کلیه آزمایشها بر اساس طرح آماری بلوکهای کامل تصادفی صورت گرفت. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها به روش تجزیه واریانس و گروه بندی تیمارها به کمک روش ANOVA و بر اساس آزمون Tukey در سطح احتمال ($P \leq 0.05$) توسط نرم افزار SPSS (version 22) انجام گردید. نمودارها با استفاده از برنامه Excel ترسیم شدند.

نتایج

تأخیر جوانه زنی بذرهای ذرت تحت آلودگی کادمیوم: نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر غلظت کلرید کادمیوم و زمان بر درصد جوانه زنی بذر در سطح ۱ درصد معنی

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر غلظت کلرید کادمیوم (۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) و زمان (۳، ۶، ۱۲، ۱۵ و ۲۰ روز) بر میزان درصد جوانه زنی بذر، رشد ریشه، رشد ساقه و تعداد برگ گیاه ذرت.

منابع تغییر	درجه آزادی	درصد جوانه زنی	طول ریشه	طول ساقه	تعداد برگ
غلظت کلرید کادمیوم	۱	۲۱۳,۴۲**	۶۴,۸۸**	۷۰,۸۴**	۱,۱*
زمان	۴	۱۳۳۰,۳۴**	۱۶۵,۷۲**	۱۷۶۵,۷۶**	۸۵,۳۶**
غلظت کلرید کادمیوم \times زمان	۴	۲۴,۵ ^{ns}	۱۶,۴۴ ^{ns}	۲۸,۹۵*	۰,۷۳*
خطا	۲۰	۲۵,۳۷	۷,۵۲	۸,۸	۰,۲۷

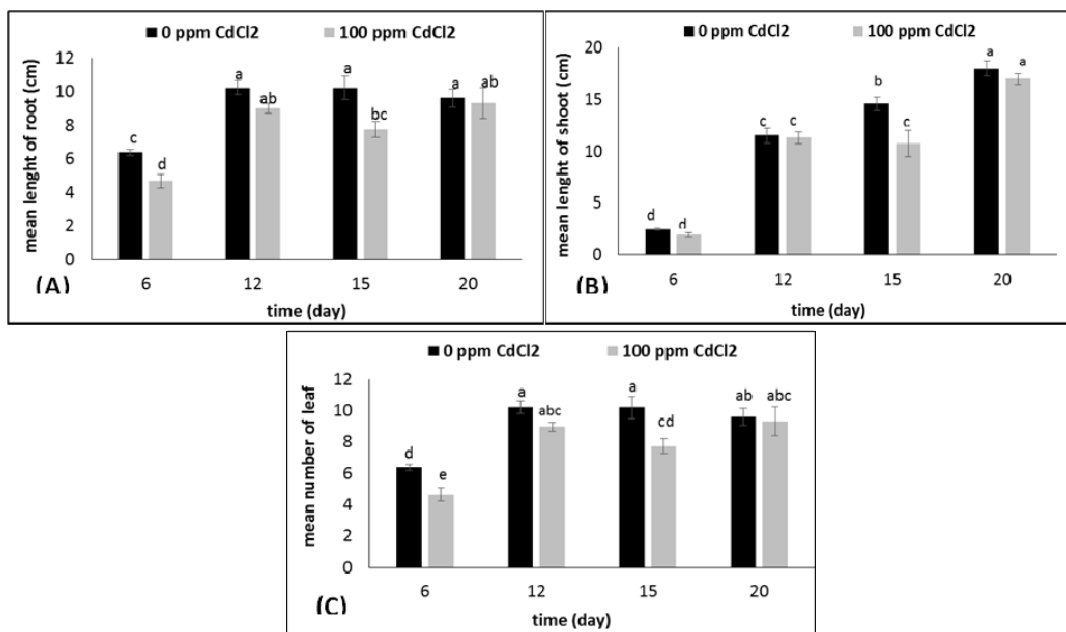


شکل ۱- مقایسه اثر متقابل غلظت (۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر کلرید کادمیوم) کادمیوم و زمان (۳، ۶، ۱۲، ۱۵ و ۲۰ روز پس از کاشت بذر) بر درصد جوانه زنی بذر گیاه ذرت. مقادیر میانگین حداقل ۳ تکرار \pm خطای معیار می‌باشد. حروف غیرمشابه نشانگر وجود تفاوت معنی‌دار بین میانگینها در سطح احتمال $P \leq 0.05$ می‌باشد.

آلودگی کادمیوم منجر به کاهش میزان رشد ساقه و تعداد برگ گیاه ذرت طی بیست روز بعد از کشت بذر شد (شکل‌های B2 و C2). البته تنها در روز پانزدهم پس از کشت بذر کاهش معنی داری را در میزان رشد ساقه و تعداد برگ گیاه نشان دادند و سپس در روز بیستم این کاهش معنی دار نبود (شکل‌های B2 و C2). همچنین نتایج مقایسه میانگین سطح برگ (اندازه‌گیری شده در روز بیستم پس از کاشت بذر) نشان می‌دهد که آلودگی کادمیوم تغییر محسوسی بر کاهش سطح برگ ایجاد نمی‌کند (جدول ۲).

کاهش میزان شاخصهای رشد گیاه ذرت تحت آلودگی کادمیوم: طبق نتایج حاصل از تجزیه واریانس، فاکتورهای آلودگی کادمیوم (غلظت کلرید کادمیوم) و زمان تأثیر معنی داری را در سطح ۱ درصد آماری بر میزان رشد ریشه، رشد ساقه و تعداد برگ نشان دادند (جدول ۱).

نتایج مقایسه میانگینها نشان داد که میزان رشد ریشه گیاه در محیط با آلودگی کادمیوم نسبت به تیمار شاهد کاهش یافت. این کاهش در روزهای ششم، دوازدهم و پانزدهم پس از کاشت بذر معنی دار بود ولی در روز بیستم اثر معنی داری بر کاهش رشد ریشه نشان نداد (شکل A2).



شکل ۲- مقایسه اثر متقابل غلظت (۰ و ۱۰۰ میلی گرم در لیتر کلرید کادمیوم) کادمیوم و زمان (۶، ۱۲، ۱۵ و ۲۰ روز پس از کاشت بذر) بر طول ریشه (A)، طول ساقه (B) و تعداد برگ (C) گیاه ذرت. مقادیر میانگین حداقل ۳ تکرار \pm خطای معیار می باشد. حروف غیرمشابه نشانگر وجود تفاوت معنی دار بین میانگینها در سطح احتمال $P \geq 0.05$ می باشد.

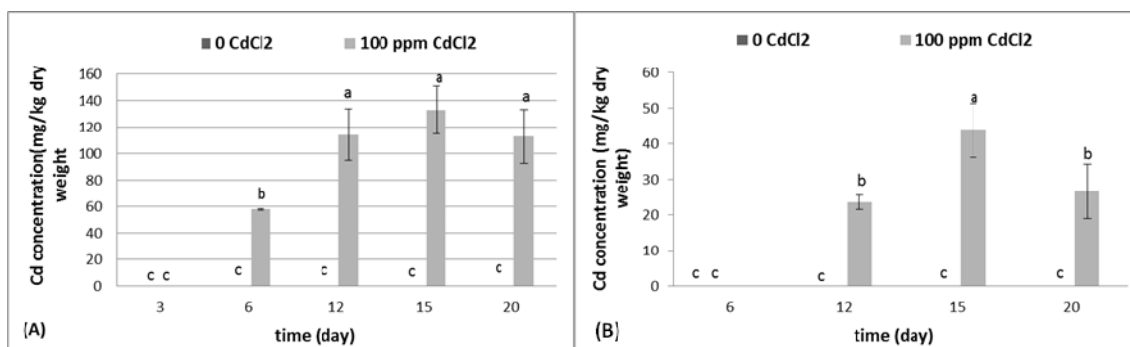
روند صعودی و نزولی میزان کادمیوم در گیاه ذرت طی دوره تنش کادمیوم: نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر غلظت کلرید کادمیوم، نوع اندام گیاه و زمان نمونه برداری و اثرات متقابل آنها بر میزان کادمیوم در گیاه معنی دار بود. در روز سوم پس از کاشت بذر در محیط با آلودگی کادمیوم، میزان کادمیوم در ریشه ها صفر بود و سپس در روز ششم حضور کادمیوم در ریشه ها مشاهده شد (شکل A2).

نتایج مقایسه میانگین وزن تر و خشک (جدول ۲) نشان داد که آلودگی کادمیوم منجر به کاهش میزان وزن تر و خشک در قسمتهای ریشه، بخش هوایی گیاه و برگ شد. البته کاهش وزن تر فقط در بخش هوایی گیاه و کاهش وزن خشک فقط در بخش برگها در محیط با آلودگی کادمیوم نسبت به محیط فاقد کادمیوم معنی دار بود (جدول ۲).

جدول ۲- مقایسه میانگین‌های سطح برگ، وزن تر و خشک از بخش‌های مختلف (ریشه، ساقه و بخش هوایی) گیاه در روز بیستم پس از کاشت بذر در محیط‌های دارای آلودگی کادمیوم و فاقد کادمیوم

وزن خشک (گرم)		وزن تر (گرم)		سطح برگ (سانتی متر مربع)		غلظت کادمیوم (میلی گرم در لیتر)
بخش هوایی گیاه	برگ	بخش هوایی گیاه	برگ	ریشه	ریشه	
۰,۱ ± ۰,۰۱ ^a	۰,۰۷ ± ۰,۰۱ ^a	۰,۰۷ ± ۰,۰۱ ^a	۰,۸۱ ± ۰,۱۱ ^a	۰,۵ ± ۰,۰۷ ^{bc}	۰,۵ ± ۰,۰۷ ^{bc}	۲۹,۹ ± ۲,۸ ^a
۰,۰۹ ± ۰,۰۱ ^a	۰,۰۶ ± ۰,۰۱ ^b	۰,۰۶ ± ۰,۰۱ ^a	۰,۶۱ ± ۰,۰۸ ^b	۰,۴ ± ۰,۰۴ ^{bc}	۰,۳ ± ۰,۰۵ ^c	۲۲,۷ ± ۱,۶۵ ^a

* در هر پارامتر اندازه‌گیری شده (سطح برگ، وزن تر و وزن خشک) میانگین‌های دارای حروف مشابه از نظر آزمون آماری Tukey در سطح ۵ درصد تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.



شکل ۳- مقایسه اثر متقابل غلظت (۰ و ۱۰۰ میلی گرم در لیتر کلرید کادمیوم) و زمان (۳، ۶، ۱۲، ۱۵ و ۲۰ روز پس از کاشت بذر) بر میزان کادمیوم در ریشه (A) و ساقه (B) گیاه ذرت. مقادیر میانگین حداقل ۳ تکرار ± خطای معیار می‌باشد. حروف غیرمشابه نشانگر وجود تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح احتمال $P \leq 0.05$ می‌باشد.

مقایسه میانگین اثرات متقابل نشان داد که با گذشت زمان میزان کادمیوم در ریشه و ساقه تا روز پانزدهم افزایش یافت و سپس در روز بیستم کاهش یافت (شکل‌های B3 و A3). بنابراین بیشترین میزان کادمیوم در ریشه و ساقه در

جدول ۳- مقایسه میانگین‌های فاکتور انتقال کادمیوم در گیاه ذرت در روزهای ۶، ۱۲، ۱۵ و ۲۰ پس از کاشت بذر در محیط دارای آلودگی ۱۰۰ میلی گرم در لیتر کلرید کادمیوم. مقادیر میانگین حداقل ۳ تکرار ± خطای معیار می‌باشد. حروف غیرمشابه نشانگر وجود تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح احتمال $P \leq 0.05$ می‌باشد.

زمان (روز)	۶	۱۲	۱۵	۲۰
فاکتور انتقال کادمیوم	۰,۰۳ ^{bc}	۰,۲۲ ± ۰,۰۳ ^{ab}	۰,۳۳ ± ۰,۰۸ ^a	۰,۲۷ ± ۰,۰۲ ^a

و اسپرمیدین تغییر قابل ملاحظه‌ای را نسبت به تیمار شاهد نشان ندادند (جدول ۴). در روز ششم پس از کاشت بذر تحت تنش کادمیوم، میزان پلی‌آمین کل و پوتریسین در ریشه‌ها نسبت به تیمار شاهد به طور معنی‌داری افزایش یافت (شکل‌های B4 و A4)، در حالی که میزان اسپرمین و اسپرمیدین در ریشه‌ها نسبت به تیمار شاهد

تأثیر متفاوت مدت زمان تنش کادمیوم بر میزان پلی‌آمین‌های گیاه ذرت: اثر تفاوت مدت زمان تنش کادمیوم بر میزان پلی‌آمین کل و انواع آن نظیر پوتریسین، اسپرمین و اسپرمیدین مشاهده شد. در بذرهای جوانه زده در روز سوم پس از کاشت بذر در محیط با آلودگی کادمیوم میزان پلی‌آمین کل و پوتریسین کمی افزایش یافت، اما میزان اسپرمین

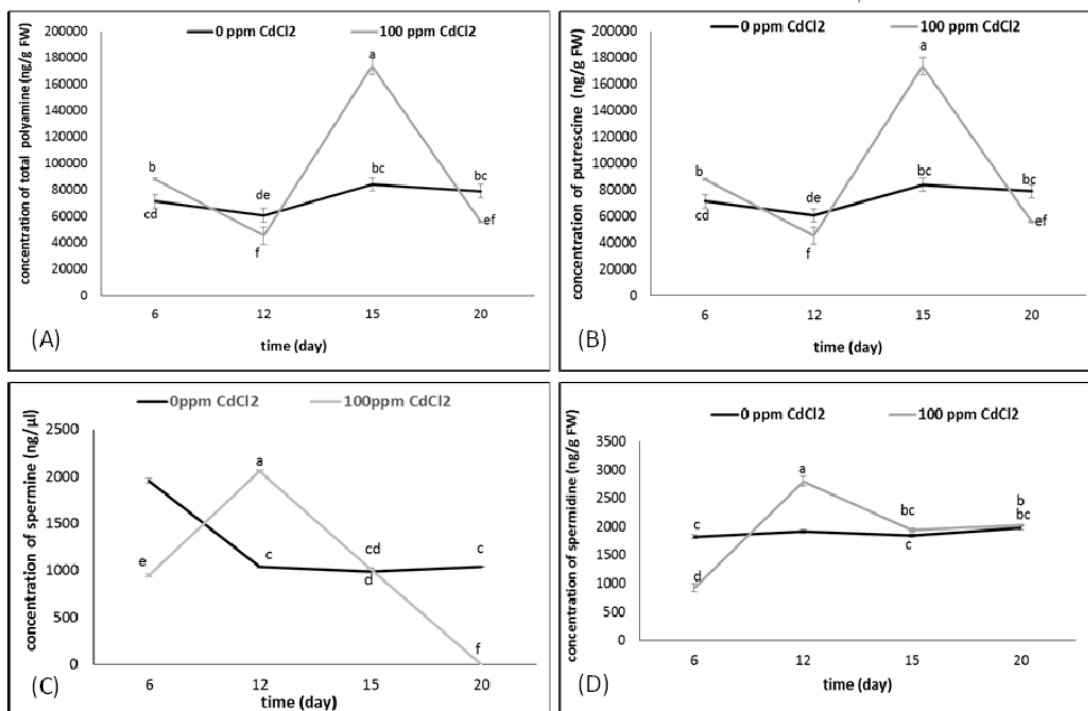
کاهش معنی‌داری را نشان دادند (شکل‌های C4 و D4).

جدول ۴- مقایسه میانگین غلظت‌های پلی‌آمین کل، پوتریسین، اسپرمین و اسپرمیدین در بذره‌های جوانه زده ذرت در روز سوم پس از کاشت بذر در محیط‌های دارای آلودگی کادمیوم و فاقد کادمیوم

اسپرمیدین (ng. g ⁻¹ FW)	اسپرمین (ng. g ⁻¹ FW)	پوتریسین (ng. g ⁻¹ FW)	پلی‌آمین کل (ng. g ⁻¹ FW)	غلظت کادمیوم (mg. l ⁻¹)
۲۹۱۵ ± ۱۷۸	۲۹۱۹ ± ۲۴۲	۵۳۱۸۳ ± ۲۵۷۳۵	۵۹۰۱۷ ± ۲۷۳۴۲	۰
۲۷۷۹ ± ۲۳۱	۳۰۴۰ ± ۹۱	۷۳۸۶۱ ± ۲۱۸۷۵	۷۹۶۸۰ ± ۲۲۸۸۹	۱۰۰

کادمیوم فقط باعث افزایش معنی‌دار میزان پلی‌آمین کل (۲۰۷ درصد) و پوتریسین (۲۰۶ درصد) شد و در حالی که میزان اسپرمین و اسپرمیدین تغییر چندانی را نسبت به تیمار شاهد نشان ندادند (شکل ۴).

سپس در روز دوازدهم کاهش معنی‌دار پلی‌آمین کل (۲۱ درصد) و پوتریسین (۲۵ درصد) و افزایش معنی‌دار اسپرمین (۱۹۷ درصد) و اسپرمیدین (۱۴۶ درصد) در ریشه‌های تحت تنش کادمیوم نسبت به تیمار شاهد مشاهده شد (شکل ۴). در روز پانزدهم پس از کاشت بذر، تیمار



شکل ۴- مقایسه اثر متقابل غلظت (۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر کلرید کادمیوم) کادمیوم و زمان (۶، ۱۲، ۱۵ و ۲۰ روز پس از کاشت بذر) بر میزان پلی‌آمین کل (A)، پوتریسین (B)، اسپرمین (C) و اسپرمیدین (D) در ریشه گیاه ذرت. مقادیر میانگین حداقل ۳ تکرار ± خطای معیار می‌باشد. حروف غیرمشابه نشانگر وجود تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح احتمال $P \leq 0.05$ می‌باشد.

ای نکرد (شکل ۴). بنابراین مدت زمان تیمار کادمیوم تأثیر متفاوتی بر میزان پلی‌آمین کل، پوتریسین، اسپرمین و اسپرمیدین دارد. به طوری که بیشترین میزان پلی‌آمین کل و پوتریسین در روز پانزدهم و بیشینه میزان اسپرمین و

پس از بیست روز کاشت بذر در محیط با آلودگی کادمیوم، میزان پلی‌آمین کل، پوتریسین و اسپرمین در ریشه‌ها به طور معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد کاهش یافت، هرچند میزان اسپرمیدین نسبت به تیمار شاهد تغییر قابل ملاحظه

اسپریمیدین در روز دوازدهم پس از کاشت بذر تحت تنش کادمیوم نسبت به تیمار شاهد به دست آمد.

بحث و نتیجه گیری

آلودگی خاک با فلزات سنگین مانند کادمیوم، به دلیل ایجاد سمیت در گیاهان و کاهش محصول آنها، مسمومیت سایر جانداران و ایجاد تهدیدی برای امنیت غذایی و سلامت جوامع انسانی همواره حائز اهمیت می‌باشد (۱ و ۳۲). کادمیوم یکی از فلزات سنگین با تحرک بالا در محیط زیست است که افزایش غلظت آن در محیط ریشه گیاه، منجر به کاهش رشد گیاه در نتیجه تنش اکسیداتیو ناشی از تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و همچنین سبب بروز اختلالات متابولیسمی در گیاه می‌گردد (۱۲ و ۲۴). به طوری که کاهش رشد و تغییر متابولیسم انواع پلی‌آمینها در اثر تنشهای فلزات سنگین در گیاهان گندم (۲۰)، آفتابگردان (۲۰ و ۲۱)، سویا (۹) گزارش شده است. این تحقیقات بیانگر آن است که پلی‌آمینها با سیستم حفاظتی ضد تنش اکسیداتیو القاء شده توسط فلزات، مرتبط می‌باشند. به طوری که تنش اکسیداتیو منجر به تولید H_2O_2 می‌شود که پیام فعال‌کننده آنزیم کاتالاز می‌باشد. با راه اندازی فعالیت کاتالاز و افزایش پلی‌آمین داخل سلولی، H_2O_2 حذف می‌گردد. همچنین پلی‌آمین باعث حفظ غشای سلولی از صدمات اکسیداتیو می‌شود (۹، ۲۰ و ۲۱).

هرچند تاکنون تحقیقات زیادی در زمینه تأثیر تنش کادمیوم بر شاخصهای رشد، فیزیولوژیکی و متابولیسم گیاه به ویژه محتوای پلی‌آمین گیاه صورت گرفته است (۹ و ۲۰). اما اطلاعات اندکی در مورد اثر زمان بر اثرات ناشی از تنش کادمیوم در گیاهان موجود است. در پژوهش حاضر با استناد به نتایج زحمتی (۳)، تنش کادمیوم با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر کادمیوم کلرید که شامل $5/277 \mu M$ یون کادمیوم می‌باشد انجام شد، که اثرات منفی کادمیوم بر درصد جوانه زنی، رشد ریشه و ساقه و تعداد برگ را نشان

داد. خصوصاً در روز پانزدهم پس از کاشت بذر شاخصهای رشد گیاه به طور معنی‌داری در اثر تنش کادمیوم کاهش یافتند. همچنین بیشترین میزان کادمیوم در ریشه و انتقال کادمیوم در گیاه ذرت در روز پانزدهم مشاهده شد. در حالی که شاخصهای رشد گیاه در روز بیستم تغییرات چندانی را در اثر تنش کادمیوم نشان ندادند و میزان انتقال کادمیوم نیز در این روز نسبت به روز پانزدهم کاهش یافت. تنش کادمیوم تأثیر قابل ملاحظه‌ای را بر روی وزن تر و خشک بخشهای مختلف گیاه (در روز بیستم) نداشت. این نتایج بیانگر آن است که از روز پانزدهم به بعد در گیاه ذرت حالتی از مقاومت نسبی به تنش کادمیوم ایجاد می‌شود. به نظر می‌رسد این سازگاری به تنش کادمیوم در گیاه ذرت در نتیجه داشتن سیستم فتوسنتزی C4 با کارایی بالا، انباشت بیشتر یون کادمیوم در ریشه و ممانعت از انتقال آن به بخشهای هوایی و همچنین سایر مکانیسمهای متابولیسمی مقاومتی می‌باشد. تحقیقات زیادی در زمینه استفاده از ذرت به منظور گیاه پالایی در خاکهای آلوده به فلزات سنگین، به دلیل رشد سریع و تجمع بیوماس بالا گزارش شده است (۳۳ و ۳۵). به طور کلی اثر بازدارنده کادمیوم بر درصد جوانه زنی بذر و شاخصهای رشد گیاه به غلظت یون کادمیوم، مدت زمان تیمار و گونه گیاهی وابسته می‌باشد.

تغییرات محتوای پلی‌آمینها از جمله اثرات دیگر تنش کادمیوم در گیاهان می‌باشد. پلی‌آمینها با افزایش کاتابولیسم ROS در آپوپلاست و یا با پاکسازی رادیکالهای آزاد و فعال کردن آنزیمهای آنتی‌اکسیدانت، تولید ROS را کاهش می‌دهند (۳۰). تحقیقات گذشته نشان داده است که میزان تغییرات محتوای پلی‌آمینها طی تنش کادمیوم وابسته به غلظت کادمیوم (۹) و نوع پلی‌آمین (۲۹) می‌باشد.

تنش کادمیوم در گیاه میخک (*Dianthus caryophyllus* L.) باعث افزایش نسبت پوترسین به مجموع اسپریمین و اسپریمیدین شد (۲۹). به نظر می‌رسد پوترسین اولین پلی

پوترسین به اسپرمین و اسپرمیدین می‌باشد. در روز پانزدهم افزایش جذب و انتقال کادمیوم منجر به کاهش معنی‌دار رشد می‌گردد، که همراه با افزایش معنادار سطح پوترسین ریشه ذرت است. این افزایش در میزان پوترسین، و کاهش تجزیه آن به اسپرمین و اسپرمیدین می‌تواند باعث اثرات مثبت در رشد طی روزهای بعدی شده، همان‌گونه که در روز بیستم بهبودی پارامترهای مرتبط با رشد مشاهده می‌گردد. از طرف دیگر احتمال می‌رود کاهش معنادار رشد در روز پانزدهم، یک مکانیسم دفاعی برای گیاه ذرت باشد، که منجر به سازگاری در روز بیستم می‌شود.

به طور کلی بر اساس نتایج حاصل از تحقیق حاضر، به نظر می‌رسد که تغییرات میزان پلی‌آمینها در گیاه ذرت طی تنش کادمیوم وابسته به میزان جذب کادمیوم توسط ریشه گیاه و نوع پلی‌آمینها می‌باشد.

آمین افزایش یافته در سلولهای تحت تنش غیرزیستی می‌باشد. قابل توجه است که افزایش غلظت پوترسین منجر به تحریک آنزیمهای مسئول تبدیل پوترسین به اسپرمیدین و اسپرمین، از طریق فرآیند خودتنظیمی می‌شود. غلظت پوترسین، اسپرمیدین و اسپرمین در سلولها غالباً به طور تدریجی تغییر می‌کند که به دلیل وجود مسیر تجزیه همزمان واقع در سلول بوده که به موجب آن H₂O₂ تولید می‌گردد (۸، ۱۱ و ۱۹).

نتایج پژوهش حاضر در گیاه ذرت نشان داد که تغییرات پلی‌آمین کل طی بیست روز پس از کاشت بذر، عمدتاً متأثر از تغییر غلظت پوترسین می‌باشد. در روز سوم و در بافت بذر ذرت، تغییر معنا داری در سطح پلی‌آمین نمونه‌ها رخ نداد اما همزمان با شروع جذب کادمیوم در ریشه‌ها در روز ششم، افزایش معنی‌داری در میزان پلی‌آمین کل مشاهده گردید. در روز دوازدهم کاهش پوترسین همراه با افزایش سطح اسپرمین و اسپرمیدین بوده که بیانگر تبدیل

منابع

- ۱- تریبان، ع، مهجوری، م، ۱۳۸۱، بررسی اثر آبیاری با فاضلاب روی جذب فلزات سنگین بوسیله سبزیهای برگی جنوب تهران، مجله علوم خاک و آب، جلد ۱۶، شماره ۲، صفحات ۱۸۹-۱۹۶
- ۲- خاوری خراسانی، س، ۱۳۸۷، راهنمای علمی و کاربردی کاشت، داشت و برداشت ذرت. انتشارات تهران، نشر سرو، ۱۱۹ صفحه.
- ۳- زحمتی، ب، ۱۳۹۴، تأثیر پوشش بذر حاوی ترکیبات زیستی/رسی/ جلبک های سبز- آبی برای افزایش مقاومت به تنش کادمیوم در گیاهان شبدر برسیم (*Trifolium alexandrinum* L.) و ذرت (*Zea mays* L)، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه شهید بهشتی.
- ۴- عابدی کوپایی، ج، متین، ن، جواهری طهرانی، م، ۱۳۹۴، جذب کادمیوم توسط سه گیاه شاهی، کاهو و گوجه فرنگی در خاک آلوده به کادمیوم، مجله علوم و فنون کشت های گلخانه ای، جلد ۶، شماره ۲۱، صفحات ۴۱-۵۲.
- ۵- فتاحی کیاسری، ا، فتوت، ا، آستارایی، ع، حق نیا، غ، ۱۳۸۹، اثر اسید سولفوریک و EDTA بر گیاه پالایی سرب در خاک توسط سه گیاه آفتابگردان، ذرت و پنبه، مجله علوم آب و خاک (علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی)، جلد ۱۴، شماره ۵۱، صفحات ۵۷-۶۸
- ۶- صارمی راد بابک، اسفندیاری عزت اله، شکرپور مجید، سفالیان امید، آوانس آرمن، موسوی سیدبهنم، ۱۳۹۳، اثر کادمیوم روی برخی از ویژگی های ریخت شناسی و فیزیولوژیک گندم در مرحله گیاهچه ای. مجله پژوهش های گیاهی (مجله زیست شناسی ایران)، جلد ۲۷، شماره ۱، صفحات ۱۱-۱،
- ۷- حاجی بلند رقیه، ابراهیمی نشمین، ۱۳۹۲، تأثیر شوری ملایم و کاربرد پلی‌آمینها بر رشد، فتوسنتز و متابولیسم فنلها در گیاه سدیم پسند چغندر قند، مجله پژوهش های گیاهی (مجله زیست شناسی ایران)، جلد ۲۶، شماره ۳، صفحات ۲۹۰-۳۰۰.

8- Alcázar, R., Cuevas, J. C., Patron, M., Altabella, T. and Tiburcio, A. F. (2006). Abscisic acid modulates polyamine metabolism under water

stress in *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum*, 128(3), 448-455.

- 9- Balestrasse, K. B., Gallego, S. M., Benavides, M. P. and Tomaro, M. L. (2005). Polyamines and proline are affected by cadmium stress in nodules and roots of soybean plants. *Plant and Soil*, 270(1), 343-353.
- 10- Boominathan, R. and Doran, P. M. (2003). Cadmium tolerance and antioxidative defenses in hairy roots of the cadmium hyperaccumulator, *Thlaspi caerulescens*. *Biotechnology and Bioengineering*, 83(2), 158-167.
- 11- Bouchereau, A., Aziz, A., Larher, F. and Martin-Tanguy, J. (1999). Polyamines and environmental challenges: recent development. *Plant Science*, 140(2), 103-125.
- 12- DalCorso, G., Farinati, S., Maistri, S. and Furini, A. (2008). How plants cope with cadmium: staking all on metabolism and gene expression. *Journal of integrative plant biology*, 50(10), 1268-1280.
- 13- Di Toppi, L. S. and Gabbrielli, R. (1999). Response to cadmium in higher plants. *Environmental and experimental botany*, 41(2), 105-130.
- 14- Dudley, H. W., Rosenheim, O. and Starling, W. W. (1926). The chemical constitution of spermine: structure and synthesis. *Biochemical Journal*, 20(5), 1082.
- 15- Dudley, H. W., Rosenheim, O. and Starling, W. W. (1927). The constitution and synthesis of spermidine, a newly discovered base isolated from animal tissues. *Biochemical Journal*, 21(1), 97.
- 16- Flores, H. E. and Galston, A. W. (1982). Analysis of polyamines in higher plants by high performance liquid chromatography. *Plant physiology*, 69(3), 701-706.
- 17- Galston, A. W. and Flores, H. E. (1991). Polyamines and plant morphogenesis. *Biochemistry and physiology of polyamines in plants*, 175-186.
- 18- Gill, S. S. and Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant physiology and biochemistry*, 48(12), 909-930.
- 19- Groppa, M. D. and Benavides, M. P. (2008). Polyamines and abiotic stress: recent advances. *Amino acids*, 34(1), 35-45.
- 20- Groppa, M. D., Benavides, M. P. and Tomaro, M. L. (2003). Polyamine metabolism in sunflower and wheat leaf discs under cadmium or copper stress. *Plant Science*, 164(2), 293-299.
- 21- Groppa, M. D., Tomaro, M. L. and Benavides, M. P. (2001). Polyamines as protectors against cadmium or copper-induced oxidative damage in sunflower leaf discs. *Plant Science*, 161(3), 481-488.
- 22- Hassannejad, S., Bernard, F., Mirzajani, F. and Gholami, M. (2012). SA improvement of hyperhydricity reversion in *Thymus daenensis* shoots culture may be associated with polyamines changes. *Plant physiology and biochemistry*, 51, 40-46.
- 23- Kashif, S. R., Akram, M., Yaseen, M. and Ali, S. (2009). Studies on heavy metals status and their uptake by vegetables in adjoining areas of Hudaira drain in Lahore. *Soil and Environment (Pakistan)* 28(1): 7-12.
- 24- Kumar, M., Tomar, M. and Bhatnagar, A. K. (2000). Influence of cadmium on growth and development of *Vicia faba* Linn. *Indian journal of experimental biology*, 38(8), 819-23.
- 25- Maguire, J. D. (1962). Speed of germination—aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop science*, 2(2), 176-177.
- 26- Mattina, M. I., Lannucci-Berger, W., Musante, C. and White, J. C. (2003). Concurrent plant uptake of heavy metals and persistent organic pollutants from soil. *Environmental pollution*, 124(3), 375-378.
- 27- Roussos, P. A. and Pontikis, C. A. (2007). Changes of free, soluble conjugated and bound polyamine titers of jojoba explants under sodium chloride salinity in vitro. *Journal of plant physiology*, 164(7), 895-903.
- 28- Salt, D. E., Prince, R. C., Pickering, I. J. and Raskin, I. (1995). Mechanisms of cadmium mobility and accumulation in Indian mustard. *Plant Physiology*, 109(4), 1427-1433.
- 29- Serrano-Martínez, F. and Casas, J. L. (2011). Effects of extended exposure to cadmium and subsequent recovery period on growth, antioxidant status and polyamine pattern in in vitro cultured carnation. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 17(4), 327.
- 30- Takahashi, T. and Kakehi, J. I. (2009). Polyamines: ubiquitous polycations with unique roles in growth and stress responses. *Annals of Botany*, 105(1), 1-6.
- 31- Thewys, T., Witters, N., Van Slycken, S., Ruttens, A., Meers, E., Tack, F. M. G. and Vangronsveld, J. (2010). Economic viability of phytoremediation of a cadmium contaminated agricultural area using energy maize. Part I:

- Effect on the farmer's income. *International journal of phytoremediation*, 12(7), 650-662.
- 32- Wagner, George J. "Accumulation of cadmium in crop plants and its consequences to human health." *Advances in agronomy* (1993).
- 33- Wang, M., Zou, J., Duan, X., Jiang, W. and Liu, D. (2007). Cadmium accumulation and its effects on metal uptake in maize (*Zea mays* L.). *Bioresource Technology*, 98(1), 82-88.
- 34- Woodis, T. C., Hunter, G. B. and Johnson, F. J. (1977). Statistical studies of matrix effects on the determination of cadmium and lead in fertilizer materials and plant tissue by flameless atomic absorption spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 90, 127-136.
- 35- Xu, W., Lu, G., Dang, Z., Liao, C., Chen, Q. and Yi, X. (2013). Uptake and distribution of Cd in sweet maize grown on contaminated soils: a field-scale study. *Bioinorganic chemistry and applications*, 2013.
- 36- Yang, Y., Nan, Z. and Zhao, Z. (2014). Bioaccumulation and translocation of cadmium in wheat (*Triticum aestivum* L.) and maize (*Zea mays* L.) from the polluted oasis soil of Northwestern China. *Chemical Speciation & Bioavailability*, 26(1), 43-51.

Trend of polyamine changes in the early stages of maize (*zea mays* L.) growth under cadmium stress

Latifi M.¹, Hassani S.B.¹, Rezadoost H.², Nasiri Almandhadim N.¹, Jafari S.¹ and Bernard F.¹

¹ Dept. of Plant Sciences, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University G.C., Tehran, I.R. of Iran.

² Dept. of Phytochemistry, Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University G.C., Tehran, I.R. of Iran.

Abstract

Heavy metals stress (cadmium stress) is one of the most important factors which lead to reduction of plant growth and productivity of agricultural products. One of the plant responses to heavy metal stresses is changes in polyamines contents in plants. Regarding the economic importance of maize, the effects of cadmium stress on seed germination, plant growth parameters and polyamines contents (putrescin, spermidine and spermine) were investigated in 3 days-old seedlings and the roots after 6, 12, 15 and 20 days. Polyamines analysis was performed by HPTLC. The results indicated that cadmium stress in maize is the cause of delay in seed germination and decreased plant growth parameters. Cadmium stress increased the total polyamine content as a result of 35% increase of the putrescine in 3 days-old seedlings. In general, a significant increase of putrescine was observed in the roots of the 6 days-old- and 15 days-old plants under cadmium stress. While the highest amount of spermine and spermidine was in the root of the 12 days-old plants under cadmium stress. Roots of the 15-days-old plant showed the highest content and translocation factor of cadmium. These results suggest that the changes in the amount of polyamines in maize plant under cadmium stress depend on the cadmium absorption by the plant root and the type of polyamines.

Key words: Cadmium contamination, *Zea mays* L., putrescin, spermidine, spermine