Effect of NaCl on Cd stress modulation, antioxidant system and Cd uptake and accumulation in *Malva parviflora* L.

Elham Jafarhaddadian, Parzhak Zoufan*, Mohammad Shafiei
Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

Abstract
This study aimed to investigate the effect of mild salinity on cadmium (Cd)-induced toxicity in *Malva parviflora*. Forty days after sowing the seeds in trays containing Peat Moss soil, the plants were transferred to nutrient solutions under controlled light and temperature conditions. After one week, the plants were transferred to complete nutrient solutions with four treatments including 50 µM Cd, two levels of NaCl (25 and 50 mM) along with 50 µM Cd and control. Six days after the treatments, the plants were harvested and some biochemical and growth indices were evaluated. Both levels of salinity, especially 25 mM, resulted in increased length, weight, and chlorophyll content in the plants exposed to Cd. In leaves and roots, the salinity reduced levels of lipid peroxidation, proline and soluble proteins contents, as well as activity of catalase, guaiacol peroxidase (GPX) and superoxide dismutase (SOD) in the plants treated with Cd. In addition, both salinity treatments reduced Cd content in roots and shoots. Investigation of electrophoretic pattern of enzyme extract in all studied plants revealed two isoenzymes of GPX. For SOD, three isoenzymes were observed in the leaves for all treatments. In the roots, five isoenzymes were detected for all plants exposed to Cd. Based on the results of this study, it seems that both levels of salinity can modulate the toxic effects of Cd and induction of oxidative stress and improve plant tolerance to Cd stress by reducing metal accumulation in *M. parviflora*.

Keywords: Cadmium, Chlorophyll, Oxidative stress, Plant growth, Salinity

* Corresponding Author: p.zoufan@scu.ac.ir

Copyright©2017, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.
DOI. 10.22108/IJPB.2021.122156.1204

زیست‌شناسی گیاهی ایران، سال دوازدهم، شمارهٔ چهل و ششم، زمستان ۱۳۹۹، صفحهٔ ۵۹-۷۶
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۹/۰۱/۲۶
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۹/۰۹/۱۲
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۹/۱۰/۲۴

اثر کلرید سدیم روی تعدیل تنش کادمیوم، سیستم آنتی‌اکسیدانی و جذب و تجمع کادمیوم در گیاه پنیرک

الهام جعفر حدادیان، پرژک ذوفن*، محمد شفیعی
گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

چکیده

این پژوهش با هدف تأثیر شوری ملایم بر سمیّت القاشده توسط کادمیوم در گیاه پنیرک انجام شد. چهل روز پس از کشت بذرها در سینی‌های نشاء، گیاهان به محلول‌های غذایی با شرایط کنترل‌شده نوری و دمایی انتقال یافتند. پس از یک هفته، گیاهان به محلول‌های غذایی کامل با چهار تیمار به صورت ۵۰ میکرومولار کادمیوم، دو سطح از کلرید سدیم (۲۵ و ۵۰ میلی‌مولار) همراه با ۵۰ میکرومولار کادمیوم و شاهد منتقل شدند. شش روز پس از اعمال تیمارها، گیاهان برداشت و برخی شاخص‌های رشدی و بیوشیمیایی بررسی شدند. هر دو سطح شوری، به‌ویژه ۲۵ میلی‌مولار، به افزایش طول، وزن و محتوای کلروفیلی در گیاهان در معرض کادمیوم منجر شد. در برگ‌ها و ریشه‌ها، شوری سطح پراکسیداسیون لیپیدی، محتوای پرولین و پروتئین‌های محلول، همچنین فعالیت کاتالاز، گایاکول‌پراکسیداز و سوپراکسیددیسموتاز در گیاهان تیمار شده با کادمیوم را کاهش داد. علاوه‌براین، هر دو تیمار شوری به کاهش محتوای کادمیوم در ریشه‌ها و قسمت‌های هوایی منجر شدند. در بررسی الگوی الکتروفورزی عصاره آنزیمی، در همه گیاهان آزمایش‌شده دو ایزوآنزیم از گایاکول‌پراکسیداز مشخص شد. برای سوپراکسیددیسموتاز، در برگ‌ها سه ایزوآنزیم برای همه تیمارها و در ریشه‌ها پنج ایزوآنزیم برای همه گیاهان در معرض کادمیوم تشخیص داده شد. بر اساس نتایج این مطالعه، به نظر می‌رسد که هر دو سطح شوری می‌توانند با کاهش تجمع کادمیوم در گیاه، آثار سمی و تنش اکسیداتیو ناشی از این فلز را کاهش دهند و تحمل گیاه به تنش کادمیوم را بهبود بخشند.

واژه‌های کلیدی: تنش اکسیداتیو، شوری، رشد گیاه، کادمیوم، کلروفیل

* نگارندهٔ مسؤول: نشانی پست الکترونیک: p.zoufan@scu.ac.ir، شمارهٔ تماس: ۰۶۱۳۳۳۳۱۰۴۵

Copyright©2017, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

مقدمه

فعالیت‌های روزافزون صنعتی و کشاورزی بشر، با آزادسازی فلزات سنگین به محیط می‌توانند سلامت موجودات زنده را به خطر اندازند و محیط‌زیست را با مشکلات جدی مواجه سازند (Clemens, 2006). کادمیوم، یکی از مهم‌ترین فلزات سنگین آلاینده محیطی محسوب می‌شود که صنایع ذوب فلز، فاضلاب‌های شهری و استفاده بی‌رویه از کودهای فسفاته می‌تواند به انباشت آن در آب و خاک منجر شود. اگرچه کادمیوم عنصری ضروری برای رشد و نمو گیاهان نیست، اما به‌علت تحرک و پویایی بالا در خاک، به راحتی توسط ریشه گیاهان جذب و سپس از طریق مسیرهای سیمپلاستی یا آپوپلاستی وارد آوندهای چوبی می‌شود و با کمک جریان تعرق به بخش‌های هوایی گیاه انتقال می‌یابد (Mishra *et al*., 2006). کادمیوم حتی در غلظت‌های پایین باعث مهار رشد و نمو، اختلال در فتوسنتز و تنفس، القای تنش اکسیداتیو و اختلال در جذب آب و عناصر ضروری در گیاهان می‌شود (Gill *et al*., 2012). در پژوهشی بر گیاه مریم‌گلی مشخص شد که غلظت‌های مختلف کادمیوم باعث کاهش رشد، محتوای رنگدانه‌های فتوسنتزی و قندهای محلول و افزایش محتوای پرولین و پراکسیداسیون غشایی می‌شود (Gerami *et al*., 2018). این موضوع می‌تواند رشد و عملکرد گیاهان به‌ویژه گیاهان زراعی، دارویی و صنعتی را به‌شدت تحت تأثیر قرار دهد. اگرچه گیاهان در معرض تنش فلزات سنگین، با القای آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی تا حدودی قادرند آسیب‌های اکسیداتیو ایجاد شده را کاهش دهند (Mishra *et al*., 2006; Zoufan *et al*., 2018; Zoufan *et al*., 2020)، باوجوداین، مطالعه و بررسی راهکارهایی که بتواند آثار ناشی از سمیّت کادمیوم را در گیاه، به‌ویژه در بخش‌های هوایی و فتوسنتزکننده کاهش دهد، از اهمیّت فراوانی برخوردار است.

کلرید سدیم (NaCl) غالباً به‌عنوان عامل تنش‌زای غیرزیستی و محدودکننده رشد گیاه محسوب می‌شود. باوجوداین، غلظت‌های کم آن می‌تواند باعث تحریک رشد و تعادل در جذب عناصر غذایی در گیاه شود (Zhang *et al*., 2014). برخی پژوهش‌ها نشان داده‌اند که کلرید سدیم می‌تواند آثار سمیّت ناشی از کادمیوم را در گیاهان مطالعه‌شده به طور معنی‌داری کاهش دهد. در گیاه جو، افزودن کلرید سدیم به محلول‌های غذایی حاوی کادمیوم، تجمع این فلز در بخش‌های ریشه‌ای و هوایی را به‌طور معنی‌داری کاهش داد (Huang *et al*., 2006). در گیاهان *Arabidopsis thaliana* در معرض تنش کادمیوم، کلرید سدیم باعث افزایش معنی‌دار محتوای کلروفیلی، پرولین و گلوتاتیون، تحریک رشد ریشه‌های اولیه و کاهش آسیب در غشاهای پلاسمایی در مقایسه با گیاهانی شد که فقط با کادمیوم تیمارشده بودند (Xu *et al*., 2010). تیمار هم‌زمان کادمیوم و کلرید سدیم باعث افزایش تحمل سمیّت کادمیوم از طریق آسیب کمتر به غشاهای زیستی، جذب کمتر کادمیوم و افزایش سنتز و فعالیت برخی آنتی‌اکسیدان‌ها در *Kosteletzkya virginica* شد (Han *et al*., 2013). در دو پژوهش دیگر در گیاهان تنباکوی در معرض کادمیوم، کلرید سدیم با کاهش تجمع

کادمیوم و انواع اکسیژن واکنشگر به تعدیل سمّیت این فلز در گیاهان منجر شد (Zhang *et al*., 2013; Zhang *et al*., 2014). در گیاهان *Sesuvium portulacastrum*، کلرید سدیم عملکرد گیاه را با کاهش جذب کادمیوم توسط ریشه‌ها و احتباس در دیواره‌ها برای ممانعت از ورود این فلز به فضاهای سیمپلاستی بهبود بخشید (Mariem *et al*., 2014). نتایج نشان دادند که تیمار کلرید سدیم می‌تواند با کاهش جذب و انتقال کادمیوم، گیاهان *Inula chrithmoides* را در برابر سمّیت این فلز محافظت کند (Ghabriche *et al*., 2017). پس از تیمار گیاهان *Thellungiella salsuginea* با کادمیوم، کاربرد کلرید سدیم با کاهش جذب و انتقال کادمیوم به بخش‌های هوایی، اثر سمی آن را بر عملکرد فتوسیستم II و فتوسنتز تعدیل کرد (Goussi *et al*., 2018).

گیاه پنیرک با نام علمی *Malva parviflora* L. از خانواده Malvaceae، گیاه دولپه‌ای علفی یک‌ساله یا دوساله است که در استان خوزستان پراکنش وسیع و مصارف غذایی و دارویی فراوانی برای مردم منطقه دارد. استان خوزستان به‌علت حضور میادین نفت و گاز فراوان و صنایع وابسته، فعالیت‌های وابسته به ذوب فلز مانند صنایع فولاد و همچنین، فعالیت‌های کشاورزی درخورتوجه در معرض آلاینده‌های آلی و معدنی مختلف به‌ویژه فلزات سنگین قرار دارد. این موضوع می‌تواند بر رشد و عملکرد گیاهان به‌ویژه گیاهان زراعی اثر منفی داشته باشد. علاوه‌براین، انتقال آلاینده‌هایی مانند فلزات سنگین به بخش‌های هوایی گیاهان به‌ویژه گیاهان خوراکی می‌تواند سلامت موجودات زنده مصرف‌کننده نظیر انسان را با تهدید جدی مواجه نماید. بنابراین، ارائه راهکارها یا استفاده از موادی که بتواند ضمن کاهش آثار سمی فلزات سنگین بر رشد و عملکرد گیاه، باعث انتقال کمتر آنها به بخش‌های هوایی و خوراکی شود، از اهمیت ویژه‌ای در بخش کشاورزی و امنیت تولید غذای سالم برخوردار است. باتوجه‌به‌اینکه پژوهشی روی پنیرک نشان داد که کادمیوم حتی در غلظت پایین می‌تواند با تشدید تنش اکسیداتیو به کاهش محتوای کلروفیل و رشد منجر شود (Zoufan *et al*., 2018)، بنابراین، تصمیم گرفته شد که در راستای کاهش آثار سمّیت کادمیوم بر پنیرک، برای نخستین‌بار تیمار همزمان کلرید سدیم اعمال شود تا نقش احتمالی شوری در تعدیل سمّیت کادمیوم بررسی شود. نتایج این پژوهش احتمالاً می‌تواند اطلاعات مفیدی را برای افزایش عملکرد و تولید غذای سالم در گیاهان رشدیافته در مناطق آلوده به کادمیوم فراهم نماید.

مواد و روش‌ها

شرایط رشدی گیاهان

بذرهای گیاه پنیرک (*M. parviflora* L.) از منطقه صنعتی شرکت فولاد خوزستان واقع در جاده اهواز-ماهشهر جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شد. در آزمایشی مقدماتی و پیش از شروع پژوهش اصلی، برای انتخاب غلظت‌های مناسب کلرید سدیم که به بروز علائم تنش در پنیرک منجر نشود، تأثیر سطوح مختلف شوری شامل ۰، ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار کلرید سدیم در شرایط کشت هیدروپونیک بر برخی شاخص‌های رشدی و بیوشیمیایی بررسی شد. نتایج این آزمایش مقدماتی

مشخص کرد که غلظت‌های بالاتر از ۵۰ میکرومولار به‌طور سریع و درخورتوجهی رشد را کاهش می‌دهد و باعث بروز علائم تنش در گیاهان می‌شود. شاخص‌های مطالعه‌شده در گیاهان در معرض ۱۰ میلی‌مولار کلرید سدیم، در بیشتر موارد تفاوت مهمی را با گیاهان در معرض ۲۵ میلی‌مولار نشان ندادند. بنابراین، سطوح ۲۵ و ۵۰ میلی‌مولار کلرید سدیم به‌عنوان غلظت‌های مناسب که بر عملکرد و رشد پنیرک تأثیر منفی نداشتند برای بررسی نقش تعدیل‌کننده شوری بر سمیّت کادمیوم انتخاب شدند. برای بررسی اثر شوری بر کاهش آثار سمی کادمیوم، بذرهای ضدعفونی‌شده با هیپوکلریت سدیم ۲۰درصد، در سینی‌های نشاء حاوی خاک پیت‌ماس و کود گرانولی NPK کشت و به اتاق کشت با دوره نوری ۸ ساعت روشنایی و ۱۶ ساعت تاریکی و دمای شبانه‌روزی ۲±۲۵ سانتی‌گراد منتقل شدند که این شرایط تا پایان دوره آزمایش استفاده شد. آبیاری سینی‌ها یک‌روز در میان با آب شهری انجام شد. گیاهان ۴۰ روزه همراه با ریشه کامل به محلول‌های غذایی با فرمول اصلاح‌شده جانسون، با قدرت ۰/۱ (Siddiqi *et al*., 1990) و اسیدیته در محدوده ۰/۲± ۵/۵ انتقال یافتند. پس از یک هفته سازگاری، گیاهان به محلول‌های غذایی کامل با حجم ۱۰ لیتر حاوی ۴ تیمار آزمایشی به‌صورت ۵۰ میکرومولار نیترات کادمیوم، دو سطح از کلرید سدیم (۲۵ و ۵۰ میلی‌مولار) همراه ۵۰ میکرومولار کادمیوم منتقل شدند. گیاهان شاهد در محلول‌های غذایی فاقد کلرید سدیم و کادمیوم قرار گرفتند. به هر تانک ۱۰ لیتری، ۳۵ گیاه منتقل شد. برای هوادهی ریشه‌ها از پمپ‌های آکواریومی استفاده شد و تعویض محیط‌کشت هر سه روز یک‌بار انجام شد. برداشت گیاهان ۶ روز پس از اعمال تیمارها انجام شد. پس از خارج کردن از محلول، ابتدا ریشه‌ها به‌منظور حذف کادمیوم از بافت‌های سطحی، با محلول ۰/۱ مولار Na_2-EDTA به مدت ۱۰ دقیقه و سپس با آب مقطر شستشو شد و درنهایت گیاهان از محل طوقه به دو بخش هوایی و ریشه‌ای تقسیم شدند. پس از اندازه‌گیری طول و وزن تر، بخشی از گیاهان برای سنجش‌های بعدی بلافاصله به فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد و بخش دیگری به آون با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت انتقال داده شد.

اندازه‌گیری غلظت کادمیوم در گیاه

برای اندازه‌گیری مقدار کادمیوم در نمونه‌های گیاهی از روش جذب اتمی استفاده شد. عصاره‌گیری از پودر خشک گیاهی با روش هضم اسیدی با استفاده از اسید نیتریک ۶۵ درصد و آب‌اکسیژنه و در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد انجام شد (Kovács *et al*., 1996). غلظت کادمیوم عصاره‌ها توسط دستگاه جذب اتمی (GBC Avanta, Australia) اندازه‌گیری و محتوای کادمیوم موجود در نمونه‌های گیاهی در مقایسه با محلول‌های استاندارد کادمیوم محاسبه شد. محاسبه عامل انتقال (Translocation factor) با استفاده از تعیین نسبت غلظت کادمیوم در بخش هوایی به غلظت کادمیوم در ریشه و عامل تغلیظ زیستی (Bioconcentration factor) با استفاده از تعیین نسبت غلظت کادمیوم در گیاه به محلول غذایی انجام شد (Rosén *et al*., 2012).

اندازه‌گیری محتوای رنگدانه‌های فتوسنتزی

سنجش میزان رنگدانه‌های فتوسنتزی مطابق با روش Lichtenthaler (۱۹۸۷) با استفاده از وزن تازه و استون ۸۰ درصد انجام شد و برای اندازه‌گیری میزان جذب عصاره در طول موج‌های ۶۶۳/۲، ۶۴۶/۸ و ۴۷۰ نانومتر از دستگاه اسپکتووفتومتر (Optision 2120UV PLUS, Korea) استفاده شد.

اندازه‌گیری محتوای مالون‌دی‌آلدئید (MDA)

برای اندازه‌گیری میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی مطابق با روش Heath and Packer (۱۹۶۸)، عصاره‌گیری از بافت تازه گیاهی با استفاده از محلول تری‌کلرواستیک‌اسید (TCA) ۰/۱ انجام شد و سپس عصاره حاصل به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰×g در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. به محلول رویی، محلول TCA ۲۰ درصد (حاوی تیوباربیوتیک‌اسید ۰/۵ درصد) اضافه شد. مخلوط حاصل به‌مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و بلافاصله برای توقف واکنش به حمام یخ انتقال یافت. مجدداً نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰×g در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. میزان جذب این محلول با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر در طول موج‌های ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر قرائت شد و مقدار MDA با استفاده از ضریب خاموشی $mM^{-1}.cm^{-1}$ ۱۵۵و تفاوت جذب در دو طول موج یادشده محاسبه شد.

اندازه‌گیری میزان نشت الکترولیتی

برای سنجش میزان نشت الکترولیتی مطابق با روش Hu و همکاران (۲۰۱۲)، قطعات برگی تازه با وزن معین به لوله آزمایش‌ای حاوی آب دیونیزه انتقال یافت. همه نمونه‌ها درون حمام آب با دمای ۳۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت انکوبه شدند و پس از آن هدایت الکتریکی اولیه فاز مایع (EC1) با دستگاه EC متر (CR-30, China) اندازه‌گیری شد. سپس همه نمونه‌ها در اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد برای ۲۰ دقیقه قرار داده شدند و پس از خارج کردن و رسیدن دمای نمونه‌ها به دمای محیط، هدایت الکتریکی ثانویه (EC2) اندازه‌گیری شد و میزان نشت الکترولیتی (EL) با استفاده از رابطه EL(%)=EC1/EC2*100 محاسبه شد.

اندازه‌گیری محتوای پرولین

برای سنجش میزان پرولین آزاد مطابق با روش Bates (۱۹۷۳)، پس از هموژن کردن بافت تر با محلول سولفوسالیسیلیک‌اسید ۳ درصد، مخلوط حاصل با دور ۱۰۰۰۰×g در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی حاصل با معرف نین‌هیدرین و اسیداستیک گلاسیال مخلوط شد. نمونه‌ها به مدت یک ساعت در حمام آب با دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از این مدت برای قطع انجام تمامی واکنش‌ها، لوله‌های حاوی مخلوط در حمام آب یخ قرار داده شدند. پس از افزودن تولوئن، از فاز صورتی بالایی برای اندازه‌گیری محتوای پرولین در طول موج ۵۲۰ نانومتر در مقایسه با منحنی استاندارد پرولین استفاده شد.

اندازه‌گیری محتوای پروتئین‌های محلول و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

جداسازی پروتئین‌های محلول مطابق با روش Mishra و همکاران (۲۰۰۶) انجام شد. بدین‌منظور، بافت تازه گیاهی با بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار با اسیدیته ۷ که حاوی EDTA ۰/۱ میلی‌مولار و PVP یک درصد بر روی حمام یخ عصاره‌گیری شد و

سپس به مدت ۱۵ دقیقه با دور g×۱۵۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. از محلول شفاف رویی برای سنجش میزان پروتئین‌های محلول در مقایسه با محلول‌های استاندارد بوین سرم آلبومین و اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان کاتالاز (Aebi, 1984)، گایاکول‌پراکسیداز (Hemeda and Klein, 1990) و سوپراکسیددیسموتاز (Beauchamp and Fridovich, 1971) استفاده شد.

جداسازی ایزوآنزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز و گایاکول‌پراکسیداز

برای جداسازی ایزوآنزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز و گایاکول‌پراکسیداز با استفاده از الکتروفورز عمودی به‌ترتیب مطابق با روش Laemmli (۱۹۷۰) و Jordy و همکاران (۲۰۰۰) عمل شد. برای جداسازی ایزوآنزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز از دو لایه ژل پلی‌اکریل‌آمید ۱۰ و ۶ درصد و برای گایاکول‌پراکسیداز از دو لایه ژل پلی‌اکریل‌آمید ۱۲ و ۶ درصد استفاده شد. پس از اتمام الکتروفورز، برای رنگ‌آمیزی ژل حاوی ایزوآنزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز، ژل در محلول نیتروبلوتترازولیوم-ریبوفلاوین به مدت ۲۵ دقیقه در تاریکی قرار گرفت و سپس در همان شرایط تاریکی به آن محلول تمد (TEMED) ۰/۱ درصد اضافه شد. نهایتاً تا زمان ظاهر شدن باندهای بی‌رنگ مایل به سفید، ژل در روشنایی قرار گرفت و عکس‌برداری از آن انجام شد. برای تشخیص ایزوآنزیم‌های گایاکول‌پراکسیداز، ژل حاوی این آنزیم در بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با اسیدیته ۶ حاوی گایاکول ۱۰ میلی‌مولار و پراکسیدهیدروژن ۱۰ میلی‌مولار برای ۵ دقیقه قرار گرفت. به دنبال ظهور باندهای قرمز رنگ، ژل از این بافر جدا و از آن عکس‌برداری شد.

تجزیه و تحلیل آماری

این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و برای هر تیمار آزمایشی در سه تکرار مستقل انجام شد. نتایج با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ تجزیه و تحلیل آماری واریانس یک طرفه (ANOVA) شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح اطمینان $P<0.05$ انجام شد.

نتایج

مطابق با جدول ۱، اگرچه تیمار کادمیوم به تنهایی باعث کاهش معنی‌داری ($P<0.05$) در وزن تر کل، وزن خشک کل و طول کل گیاه در مقایسه با گیاهان شاهد شد، اما در گیاهان در معرض کادمیوم، دو سطح شوری ۵۰ و ۲۵ میلی‌مولار باعث افزایش معنی‌داری ($P<0.05$) در وزن تر به‌ترتیب با مقادیر ۲ و ۲/۳ برابر، در وزن خشک به‌ترتیب با مقادیر ۱/۵ و ۱/۸ برابر و در طول با مقادیر به‌ترتیب ۱/۵ و ۱/۶ برابر در مقایسه با گیاهانی شدند که فقط با کادمیوم تیمار شده بودند. تیمار ۲۵ میلی‌مولار کلرید سدیم بالاترین اثر افزایشی را در شاخص‌های یادشده از خود نشان داد. همان‌طور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، هر دو سطح شوری باعث کاهش معنی‌داری ($P<0.05$) در محتوای کادمیوم بخش هوایی با مقادیر ۵۱ درصد در تیمار ۲۵ میلی‌مولار و ۳۴ درصد در تیمار ۵۰ میلی‌مولار در مقایسه با گیاهانی شدند که فقط با کادمیوم تیمار شده بودند. در ریشه‌ها، اگرچه هر دو سطح شوری باعث کاهش مقدار کادمیوم در مقایسه با گیاهان گروه

کادمیوم تنها شد، باوجوداین، در گیاهان تیمار شده با شوری ۲۵ میلی‌مولار برعکس بخش هوایی، تجمع بالاتری از کادمیوم در ریشه‌ها نسبت به گیاهان تیمار شده با شوری ۵۰ میلی‌مولار اندازه‌گیری شد (جدول ۱). مقادیر عوامل انتقال و تغلیظ زیستی برای همه گروه‌ها کمتر از یک محاسبه شدند. کمترین مقدار عامل انتقال و عامل تغلیظ زیستی بخش هوایی و بیشترین مقدار عامل تغلیظ زیستی ریشه برای گیاهان در معرض ۲۵ میلی‌مولار کلرید سدیم محاسبه شد (جدول ۱).

مطابق با جدول ۲، گیاهان در معرض کادمیوم تنها، کاهش معنی‌داری ($P<0.05$) را در محتوای کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل کل درمقایسه با شاهد و دو سطح شوری نشان دادند. باوجوداین، تحت تنش کادمیوم، سطوح شوری ۵۰ و ۲۵ میلی‌مولار به‌ترتیب باعث افزایش ۱/۵ و ۲/۴ برابر در مقدار این شاخص‌ها در مقایسه با گیاهانی شدند که فقط با کادمیوم تیمار شده بودند. غلظت ۲۵ میلی‌مولار کلرید سدیم در گیاهان در معرض کادمیوم، محتوای کلروفیلی را به اندازه گیاهان شاهد افزایش داد.

جدول ۱- طول کل (سانتی‌متر)، وزن تر و خشک کل (گرم)، محتوای کادمیوم (میلی‌گرم بر گرم وزن خشک)، عامل انتقال(TF)، عامل تغلیظ زیستی در بخش هوایی (SBF) و ریشه‌ای (RBF) پس از تیمار با۵۰ میکرومولار کادمیوم با دو سطح شوری ۲۵ و ۵۰ میلی‌مولار.

	محتوای کادمیوم							
تیمارها	RBF	SBF	TF	ریشه	بخش هوایی	وزن خشک کل	وزن تر کل	طول کل
شاهد	–	–	–	۰/۰۰^{d}	۰/۰۰^{d}	۰/۱۸۶±۰/۰۰۲^{c}	۱/۹۸±۰/۰۵^{b}	۳۶/۴۸±۲^{b}
کادمیوم	۰/۳۹±۰/۰۱^{a}	۰/۱۲±۰/۰۰۶^{a}	۰/۳۲ ±۰/۰۱^{a}	۱/۳۳ ±۰/۰۲^{a}	۰/۴۲±۰/۰۰۷^{a}	۰/۱۳۶±۰/۰۰۷^{d}	۰/۹۶±۰/۰۱^{c}	۲۸/۸۳±۳^{c}
۲۵ میلی‌مولار کلرید سدیم + کادمیوم	۰/۴۲±۰/۰۳^{a}	۰/۰۷±۰/۰۰۸^{c}	۰/۱۷±۰/۰۰۴^{b}	۱/۲۱±۰/۰۱^{b}	۰/۲۰۶±۰/۰۰۴^{c}	۰/۲۴۳±۰/۰۰۴^{a}	۲/۲۱±۰/۰۲^{a}	۴۵/۲۰±۲ ^{a}
۵۰ میلی‌مولار کلرید سدیم + کادمیوم	۰/۲۷±۰/۰۱^{b}	۰/۰۹±۰/۰۰۵ ^{b}	۰/۳۲±۰/۰۰۵^{a}	۰/۸۶±۰/۰۰۷^{c}	۰/۲۷۸±۰/۰۰۴^{b}	۰/۲۰۵±۰/۰۰۳^{b}	۱/۹۳±۰/۰۵^{b}	۴۴/۱۲±۱^{a}

مقادیر میانگین ۳ تکرار ± SD و حروف مشترک بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح $P<0.05$ مطابق با آزمون چند دامنه‌ای دانکن است. RBF: Root bioconcentration factor؛ SBF: Shoot bioconcentartion factor؛ TF: Translocation factor.

علاوه‌براین، این غلظت از شوری به افزایش ۱/۴ برابر محتوای کاروتنوئیدها در مقایسه با گیاهانی منجر شد که فقط با کادمیوم تیمار شده بودند، درحالی‌که، در گیاهان تیمارشده با ۵۰ میلی‌مولار کلرید سدیم، اختلاف معنی‌داری ($P<0.05$) در محتوای کاروتنوئیدها در مقایسه با تیمار کادمیوم تنها مشاهده نشد (جدول ۲). نتایج مرتبط با محتوای مالون‌دی‌آلدئید، نشت الکترولیتی و پرولین در جدول ۳ نشان داده شده است. تیمار کادمیوم تنها، به افزایش معنی‌دار ۲/۵ و ۴ برابر محتوای مالون‌دی‌آلدئید به‌ترتیب در ریشه‌ها و برگ‌ها در مقایسه با شاهد منجر شد ($P<0.05$). باوجوداین،

تیمار این گیاهان با کلرید سدیم ۵۰ و ۲۵ میلی‌مولار میزان این شاخص را تقریباً ۵۵ درصد در برگ‌ها و به‌ترتیب ۱۹ و ۶۵ درصد در ریشه‌ها در مقایسه با گیاهانی که فقط با کادمیوم تیمار شده بودند، کاهش داد. اگرچه تیمار با کادمیوم تنها، نشت الکترولیتی را در مقایسه با گیاهان شاهد افزایش داد، اما تیمار گیاهان با دو سطح شوری به کاهش مقدار این شاخص از ۱۵/۵ تا ۲۲ درصد منجر شد. کمینه میزان این شاخص در گیاهان در معرض ۲۵ میلی‌مولار کلرید سدیم اندازه‌گیری شد (جدول ۳). مطابق با جدول ۳، تیمار گیاهان با کادمیوم تنها، محتوای پرولین را ۵ برابر در برگ‌ها و ۱/۲ برابر در ریشه‌ها در مقایسه با گروه شاهد افزایش داد ($P<0.05$). در گیاهان در معرض ۵۰ و ۲۵ میلی‌مولار کلرید سدیم، محتوای پرولین برگ به‌ترتیب ۷۳ و ۷۷/۵ درصد و محتوای پرولین ریشه به‌ترتیب ۲۳ و ۳۰ درصد در مقایسه با گیاهانی که فقط با کادمیوم تیمار شده بودند، کاهش نشان داد ($P<0.05$). همان‌طور که در جدول ۳ نشان داده شده است، در مقایسه با گروه شاهد همه تیمارها به افزایش معنی‌دار ($P<0.05$) در محتوای پروتئین‌های محلول برگی منجر شدند. باوجوداین، در گیاهان در معرض ۵۰ و ۲۵ میلی‌مولار کلرید سدیم مقدار این شاخص به‌ترتیب ۲۰ و ۱۷/۵ درصد در مقایسه با گروه کادمیوم تنها کاهش یافت. در محتوای پروتئینی ریشه‌ها، تفاوت چندان مهمی بین تیمارهای مختلف با یکدیگر و با گروه شاهد مشاهده نشد.

جدول ۲- مقادیر کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کاروتنوئیدها (میلی‌گرم بر گرم وزن تر) پس از تیمار با۵۰ میکرومولار کادمیوم با دو سطح شوری ۲۵ و ۵۰ میلی‌مولار.

تیمارها	کاروتنوئیدها	کلروفیل کل	bکلروفیل	aکلروفیل
شاهد	۰/۳۰±۰/۰۱[b]	۱/۵۴±۰/۰۱[a]	۰/۳۴±۰/۰۲[a]	۱/۲۱±۰/۰۳[a]
کادمیوم	۰/۲۴±۰/۰۰۸[c]	۰/۶۴±۰/۰۴[c]	۰/۱۵±۰/۰۲[c]	۰/۴۹±۰/۰۲[c]
۲۵ میلی‌مولار کلرید سدیم + کادمیوم	۰/۳۵±۰/۰۰۲[a]	۱/۵۴±۰/۰۱[a]	۰/۳۷±۰/۰۱[a]	۱/۱۷±۰/۰۳[a]
۵۰ میلی‌مولار کلرید سدیم + کادمیوم	۰/۲۴±۰/۰۱[c]	۰/۹۸±۰/۰۲[b]	۰/۲۳±۰/۰۰۲[b]	۰/۷۵±۰/۰۲[b]

مقادیر میانگین ۳ تکرار ± SD و حروف مشترک بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح $P<0.05$ مطابق با آزمون چند دامنه‌ای دانکن است.

همانطور که در شکل ۱ (الف و ب) مشاهده می‌شود، تنش کادمیوم به افزایش تقریباً ۶ برابری فعالیت آنزیم کاتالاز برگی و ۲/۷ برابری فعالیت این آنزیم در ریشه‌ها در مقایسه با گروه شاهد منجر شد ($P<0.05$). باوجوداین، ۵۰ و ۲۵ میلی‌مولار کلرید سدیم این شاخص را به‌ترتیب ۳۹ و ۷۴ درصد در برگ‌ها و ۳۹ و ۶۷ درصد در ریشه‌ها در مقایسه با تیمار کادمیوم تنها کاهش دادند ($P<0.05$). در همه گیاهان تیمارشده با کادمیوم (با یا بدون شوری)، فعالیت آنزیم گایاکول‌پراکسیداز به‌طور معنی‌داری در برگ‌ها و ریشه‌ها در مقایسه با گیاهان شاهد افزایش یافت ($P<0.05$) (شکل ۲ الف و ب). باوجوداین، در برگ‌ها سطوح شوری ۵۰ و ۲۵ میلی‌مولار به‌ترتیب باعث کاهش ۲۹ و ۱۸/۵ درصد در فعالیت این آنزیم در مقایسه با تیمار کادمیوم تنها شدند ($P<0.05$). در ریشه‌ها، هر دو

سطح شوری فعالیت این آنزیم را تقریباً ۱/۲ برابر در مقایسه با تیمار کادمیوم به تنهایی افزایش دادند (P<0.05). مطابق با شکل ۳ (الف و ب)، تیمار کادمیوم به تنهایی، به افزایش تقریباً ۲ برابری فعالیت سوپراکسیددیسموتاز در برگ‌ها و ریشه‌ها در مقایسه با گروه شاهد منجر شد (P<0.05). هر دو سطح شوری فعالیت این آنزیم را در مقایسه با تیمار کادمیوم به تنهایی کاهش دادند (P<0.05). کلرید سدیم در غلظت ۵۰ میلی‌مولار باعث کاهش ۳۴ درصدی در فعالیت سوپراکسیددیسموتاز برگ و ریشه و در غلظت ۲۵ میلی‌مولار باعث کاهش ۵۴ و ۶۰ درصد آن به‌ترتیب در ریشه و برگ شد. مطابق با شکل ۴ (الف و ب) بررسی الگوی الکتروفورزی ایزوآنزیم‌های گایاکول‌پراکسیداز بر روی ژل پلی‌اکریل‌آمید نشان داد که برای همه تیمارها و گروه شاهد فقط دو ایزوآنزیم در بخش‌های برگی و ریشه‌ای قابل رویت است. همان‌طور که در شکل ۴ (ج و د) مشاهده می‌شود، با بررسی الگوی الکتروفورزی ایزوآنزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز مشخص شد که در برگ‌ها برای تیمار کادمیوم تنها و دو سطح شوری همراه با کادمیوم سه ایزوآنزیم، درحالی‌که در بخش ریشه‌ای ۵ ایزوآنزیم وجود داشت که از تعداد تشخیص داده شده برای گروه شاهد کمتر بود.

جدول ۳- درصد نشت الکترولیتی، محتوای مالون‌دی‌آلدئید (میکرومول بر گرم وزن تر)، پرولین (میکرومول بر گرم وزن تر) و پروتئین‌های محلول (میکروگرم بر گرم وزن تر) در برگ‌ها و ریشه‌ها پس از تیمار با ۵۰ میکرومولار کادمیوم با دو سطح شوری ۲۵ و ۵۰ میلی‌مولار.

تیمارها	پروتئین های محلول		پرولین		مالون‌دی‌آلدئید		
	ریشه	برگ	ریشه	برگ	ریشه	برگ	درصد نشت الکترولیتی
شاهد	۵/۵۶±۰/۱۳^{ab}	۵/۵۴±۰/۲۲^{c}	۰/۹۷±۰/۰۱^{b}	۱/۴۰±۰/۰۲^{d}	۳۴/۴±۱/۵^{c}	۷۰/۰±۲/۶^{c}	۸۱/۶±۰/۰۰^{b}
کادمیوم	۵/۳۱±۰/۱۳^{c}	۸/۰۰±۰/۱۳^{a}	۱/۲۰±۰/۰۲^{a}	۷/۲±۰/۰۱^{a}	۸۶/۰±۱/۵^{a}	۲۷۰/۱±۱/۵^{a}	۹۶/۷±۰/۰۰^{a}
۲۵ میلی‌مولار کلرید سدیم + کادمیوم	۵/۴۰±۰/۰۵^{bc}	۶/۶۰±۰/۱۸^{b}	۰/۸۴±۰/۰۰^{d}	۱/۶۲±۰/۰۲^{c}	۳۰/۱±۱/۵ ^{d}	۱۱۹/۶±۱/۵^{b}	۷۵/۲±۰/۳۵^{c}
۵۰ میلی‌مولار کلرید سدیم + کادمیوم	۵/۳۵±۰/۰۴^{bc}	۶/۴۰±۰/۱۹^{b}	۰/۹۲±۰/۰۱^{c}	۱/۹۷±۰/۰۴^{b}	۷۰/۰±۲/۶^{b}	۱۲۱/۳±۲/۶^{b}	۸۱/۹±۰/۵^{b}

مقادیر میانگین ۳ تکرار ± SD و حروف مشترک بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح P<0.05 مطابق با آزمون چند دامنه‌ای دانکن است.

بحث

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که هر دو سطح شوری به‌ویژه ۲۵ میلی‌مولار قادرند که کاهش رشد ایجاد شده توسط کادمیوم را مهار کنند و به افزایش معنی‌داری میزان شاخص‌های طول و وزن تر و خشک منجر شوند. کاهش رشد بخش‌های هوایی و

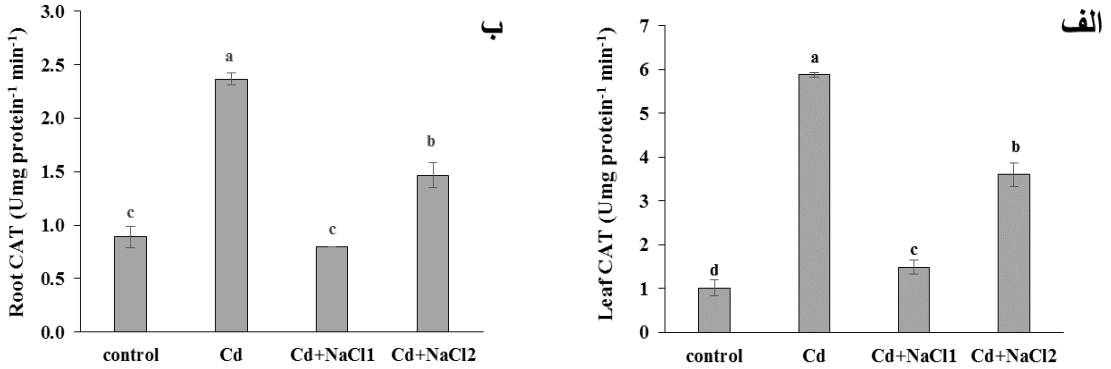
ریشه‌ها پس از تیمار با کادمیوم در گیاهان مطالعه‌شده گزارش شده است (Gill *et al*., 2012; Marzban *et al*., 2017). مهار رشد گیاه توسط کادمیوم به القای تنش کم‌آبی و اختلال در جذب عناصر غذایی (Irfan *et al*., 2014)، کاهش نرخ فتوسنتز (Gill *et al*., 2012)، تشدید تنش اکسیداتیو و تخریب عملکرد غشاهای زیستی (Zoufan *et al*., 2018) نسبت داده شده است. در گیاهان تحت تنش کادمیوم، تیمار کلرید سدیم توانسته است باعث افزایش رشد در مقایسه با گیاهانی شود که فقط با کادمیوم تیمار شده بودند (Ghnaya *et al*., 2007; Zhang *et al*., 2014). در گیاهان تنباکو پیشنهاد شده است که شوری ملایم با افزایش تولید اتیلن در ریشه‌های در معرض کادمیوم باعث بهبود وضعیت رشدی ریشه‌ها می‌شود (Zhang *et al*., 2014). پیشنهاد شده است که سطوح پایین شوری با افزایش سطح و ضخامت برگ‌ها و افزایش تعداد ریشه‌های جانبی باعث افزایش نرخ فتوسنتز، جذب بیشتر آب و املاح و در نهایت افزایش رشد در گیاهان در معرض تنش کادمیوم می‌شود (Xu *et al*., 2010). در پژوهش حاضر، با توجه به کاهش پراکسیداسیون لیپیدی و نشت یونی در گیاهان تیمارشده با کلرید سدیم، به نظر می‌رسد که شوری توانسته است تا حدود زیادی تنش اکسداتیو القاشده توسط کادمیوم را تعدیل و به بهبود شاخص‌های رشدی منجر شود. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که در هر دو سطح شوری، میزان تجمع کادمیوم در بخش‌های هوایی و ریشه‌ها در مقایسه با گیاهانی که فقط با کادمیوم تیمار شده بودند، کاهش می‌یابد. باوجوداین، گیاهان تیمار شده با ۲۵ میلی‌مولار کلرید سدیم در مقایسه با ۵۰ میلی‌مولار تجمع بالاتر و کمتری از کادمیوم به‌ترتیب در ریشه‌ها و بخش هوایی از خود نشان دادند. مقادیر کمتر و بیشتر به ترتیب عامل انتقال و عامل تغلیظ زیستی ریشه‌ها، تأییدکننده این موضوع است. کاهش جذب کادمیوم در گیاهان تیمارشده با سطوح پایین کلرید سدیم در برخی گیاهان مطالعه‌شده گزارش شده است (Zhang *et al*., 2013; Zhang *et al*., 2014; Wali *et al*., 2014; Ghabriche *et al*., 2017; Goussi *et al*., 2018). کاهش تجمع کادمیوم در گیاهان تیمارشده با سطوح ملایم کلرید سدیم و انتقال کمتر این فلز به بخش‌های هوایی، به تمایل بالای یون‌های کادمیوم برای تشکیل کمپلکس با یون‌های کلرید یا عوامل منفی موجود روی دیواره‌های سلولی در ریشه‌ها نسبت داده شده است که باعث کاهش درخورتوجهی در فعالیت و سمیّت یون در بافت‌های گیاهی می‌شود، به‌طوری که احتمالاً شوری ملایم با افزایش سطح پکتین و گروه‌های منفی دیواره‌ها، باعث اتصال کادمیوم به دیواره‌ها و ممانعت از ورود آن به سیتوپلاسم می‌شود (Wali *et al*., 2014). علاوه‌براین، پیشنهاد شده است که در شوری ملایم، رقابت احتمالی سدیم با کادمیوم برای جذب می‌تواند تجمع کادمیوم و آثار سمیّت آن را در گیاهان کاهش دهد (Zhang *et al*., 2013). بر اساس نتایج حاصل از پژوهش حاضر، تصور می‌شود که تیمار کلرید سدیم، به‌ویژه ۲۵ میلی‌مولار توانسته است که با ممانعت از انتقال بیشتر کادمیوم به بخش هوایی از بروز آثار سمیّت بیشتر در بخش‌های فتوسنتزکننده جلوگیری نماید. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که کلرید سدیم به‌ویژه در

غلظت ۲۵ میلی‌مولار به افزایش درخورتوجهی در محتوای رنگدانه‌های کلروفیلی و کاروتنوئیدی در معرض کادمیوم منجر می‌شود. یکی از علائم مشهود سمیّت کادمیوم در گیاهان زردی برگ‌ها و کاهش مقدار کلروفیل است (Dong *et al*., 2016). کاهش محتوای کلروفیلی در گیاهان تحت تنش کادمیوم به کاهش جذب منیزیم (Abdel Latef, 2013)، افزایش فعالیت کلروفیلاز، تخریب فراساختار کلروپلاست‌ها به‌علت افزایش تولید انواع اکسیژن واکنشگر (ROS) (Hattab *et al*., 2009) نسبت داده شده است. برخی گزارش‌ها حاکی از آن است که سطوح ملایم کلرید سدیم به افزایش محتوای کلروفیل (Ghnaya *et al*., 2007; Xu *et al*., 2010) و عملکرد دستگاه فتوسنتزی (Han *et al*., 2013) در گیاهان در معرض کادمیوم منجر می‌شود. در پژوهش انجاشده توسط Zhang و همکاران (۲۰۱۴)، نتایج نشان داد که کادمیوم با افزایش تولید اتیلن در برگ‌ها، به القای پیری و تجزیه کلروفیل منجر می‌شود، درحالی‌که غلظت‌های پایین کلرید سدیم می‌تواند با کاهش تولید اتیلن، شاخص کلروفیل (SPAD index) را در گیاهان تحت تنش کادمیوم افزایش دهد و از پیری برگ‌ها ممانعت کند. بر اساس نتایج پژوهش حاضر، به نظر می‌رسد که هر دو سطح شوری با کاهش تنش اکسیداتیو القاشده توسط کادمیوم، تا حدود زیادی توانسته‌اند که آثار سمّی این فلز را بر محتوای کلروفیلی کاهش دهند. باتوجه‌به افزایش محتوای کاروتنوئیدها در گیاهان در معرض کادمیوم که با کلرید سدیم تیمار شده بودند، به نظر می‌رسد که کاروتنوئیدها به‌عنوان آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی احتمالاً عملکرد مهمی را در حفاظت کلروفیل و دستگاه فتوسنتزی در برابر تنش اکسیداتیو ایجادشده توسط کادمیوم ایفا نموده‌اند. بر اساس نتایج پژوهش حاضر، هر دو سطح شوری به کاهش معنی‌داری در محتوای MDA، درصد نشت یونی و کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان کاتالاز، گایاکول‌پراکسیداز و سوپراکسیددیسموتاز در گیاهان در معرض کادمیوم منجر شدند، درحالی‌که کادمیوم به تنهایی این شاخص‌ها را به‌طور درخورتوجهی افزایش داد. مقدار MDA به‌عنوان شاخصی مهم برای ارزیابی میزان پراکسیداسیون لیپیدی غشاها و سطح تنش اکسیداتیو است. کادمیوم با اختلال در زنجیره انتقال الکترونی تنفسی و فتوسنتزی مشارکت مهمی در تولید ROS مازاد و القای تنش اکسیداتیو دارد (Gill *et al*., 2012). تنش اکسیداتیو القاشده توسط کادمیوم با افزایش تولید ROS نظیر آنیون سوپراکسید ($O_2^{\cdot-}$) و پراکسیدهیدروژن (H_2O_2) به پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع غشاهای زیستی، تخریب ساختار و عملکرد آنها و در نهایت افزایش نشت یونی منجر می‌شود (Romero-Puertas *et al*., 2019). باوجوداین، گیاهان برای تعدیل تنش اکسیداتیو، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نظیر کاتالاز، پراکسیدازهای مختلف و سوپراکسیددیسموتاز، همچنین سنتز آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی را افزایش می‌دهند تا وضعیت ردوکس سلولی را کنترل کنند (Tran and Popova, 2013). آنزیم سوپراکسیددیسموتاز با تبدیل آنیون $O_2^{\cdot-}$ به H_2O_2 و H_2O از آن سمیّت‌زدایی می‌کند. کاتالاز و انواع پراکسیدازها

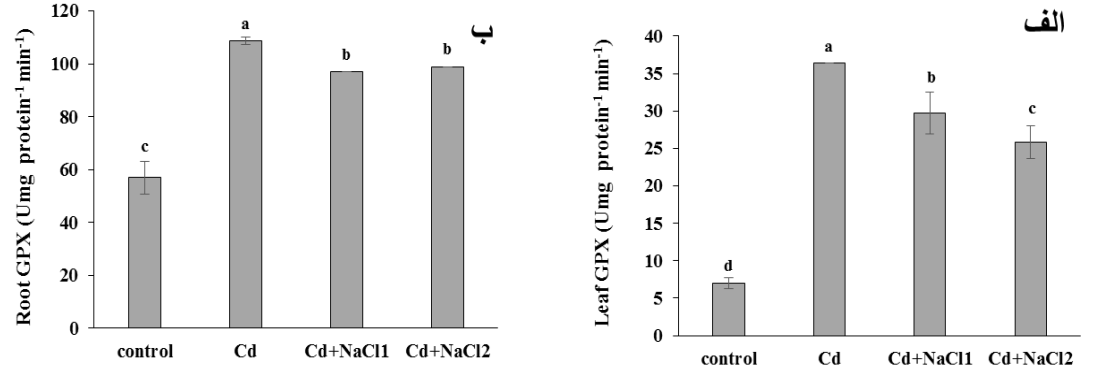
مانند گایاکول‌پراکسیداز نقش مهمی را در حذف H_2O_2 و تبدیل آن به H_2O و O_2 ایفا می‌کنند (Wu *et al*., 2015). القای تنش اکسیداتیو پس از تیمار با کادمیوم در بسیاری پژوهش‌ها گزارش شده است (Gill *et al*., 2012; Tauqeer *et al*., 2016; Deng *et al*., 2017; Zoufan *et al*., 2018) باوجوداین، برخی نتایج حاکی از آن است که غلظت‌های پایین کلرید سدیم می‌توانند میزان پراکسیداسیون لیپیدی و تولید ROS مازاد و در نتیجه تنش اکسیداتیو در گیاهان در معرض کادمیوم را به‌طور درخورتوجهی کاهش دهند (Han *et al*., 2013). کاهش تنش اکسیداتیو و میزان ROS در گیاهان تیمارشده با سطوح پایین کلرید سدیم که تحت تنش کادمیوم بودند، به نقش مؤثر شوری ملایم در حفاظت گیاه در برابر سمیّت کادمیوم از طریق اعمال مدیریت در وضعیت هورمونی و آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و افزایش در سنتز ترکیبات آنتی‌اکسیدانی نسبت داده شده است (Han *et al*., 2013; Zhang *et al*., 2013; Xu *et al*., 2010). در گیاهان تنباکو، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نظیر کاتالاز و گلوتاتیون‌پراکسیداز به‌عنوان یکی از عوامل اصلی در کاهش تنش اکسیداتیو القاشده توسط کادمیوم در گیاهان تیمارشده با غلظت‌های ملایم کلرید سدیم ذکر شده است (Zhang *et al*., 2013). نتایج این پژوهش نشان داد که تیمار کادمیوم به تنهایی محتوای پرولین را به‌طور معنی‌داری در مقایسه با سایر تیمارها افزایش می‌دهد. پرولین به‌عنوان یک اسمولیت برای حفظ تعادل آبی در گیاه (Zouari *et al*., 2016)، یک کلاتور فلزی و حذف‌کننده مستقیم ROS (Yilmaz and Parlak, 2011) تحت شرایط تنش کادمیوم عمل می‌کند تا گیاه را در برابر سمیّت و تنش اکسیداتیو ناشی از این فلز محافظت نماید. اگرچه غلظت‌های بالای کلرید سدیم گیاه را با تنش اسمزی مواجه می‌کند و بنابراین، گیاه برای حفظ جذب آب و تعدیل پتانسیل اسمزی سنتز ترکیبات آلی نظیر پرولین را افزایش می‌دهد (Lutts and Lefèvre, 2015)، باوجوداین، نتایج ما نشان داد که تیمارهای شوری به‌کار رفته به کاهش محتوای پرولین در گیاهان تیمارشده با کادمیوم منجر می‌شود. برخلاف نتایج این پژوهش، سطوح پایین شوری تولید پرولین را در گیاهان *Arabidopsis thaliana* در معرض کادمیوم، به‌طور درخورتوجهی افزایش داد (Xu *et al*., 2010). این پژوهش پیشنهاد کرد که افزایش محتوای پرولین به‌ویژه در ریشه‌ها به همراه افزایش مقدار گلوتاتیون نقش مهمی را در کاهش تنش اکسیداتیو القاشده توسط کادمیوم، افزایش تمامیت غشاء پلاسمایی و کلاته کردن یون‌های کادمیوم برعهده داشته است. با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش، به نظر می‌رسد که هر دو سطح شوری با کاهش تجمع کادمیوم در گیاه به‌ویژه در بخش‌های هوایی توانسته‌اند نقش مهمی را در تعدیل تنش اکسیداتیو و آثار سمیّت القاشده توسط کادمیوم ایفا کنند. بنابراین، تحت تنش کادمیوم کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان کاتالاز، گایاکول‌پراکسیداز و سوپراکسیددیسموتاز و همچنین، کاهش محتوای پرولین در گیاهان تیمارشده با کلرید سدیم احتمالاً بیانگر آن است که تحت این شرایط یک تعادل مناسبی بین تولید و حذف ROS در سلول‌ها وجود داشته است. به‌طوری‌که ضرورتی برای افزایش فعالیت

آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و سنتز پرولین وجود نداشته است. نتایج این پژوهش نشان داد که در همه گیاهان تحت تنش کادمیوم، پنج و سه ایزوآنزیم از سوپراکسیددیسموتاز به‌ترتیب در ریشه‌ها و برگ‌ها فعال می‌شود، درحالی‌که تنها دو ایزوآنزیم از گایاکول‌پراکسیداز در برگ‌ها و ریشه‌های همه گیاهان مطالعه‌شده تشخیص داده شد و تفاوتی را با شاهد نشان نداد. کاهش تعداد ایزوآنزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز در ریشه همه گیاهان تیمارشده با کادمیوم (بدون شوری یا با آن) در مقایسه با شاهد ممکن است که به‌علت تمرکز بر افزایش سنتز و فعالیت اشکال مؤثرتر این آنزیم برای مقابله با تنش اکسیداتیو ناشی از کادمیوم باشد. آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در حذف ROS و تعدیل تنش اکسیداتیو ناشی از تنش‌های محیطی نقش مهمی را در سلول‌های گیاهی ایفا می‌کنند. در پاسخ به شرایط تنش‌زا، سنتز، سطح فعالیت و میزان تمایل آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی به سوبسترا تغییر می‌کند (Lall and Nikolova, 2002). بنابراین، به نظر می‌رسد که تغییر فعالیت ایزوآنزیم‌های مختلف آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی با سطح تمایل متفاوت می‌تواند راهکاری مؤثر برای کنترل هماهنگ عملکرد سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی در مواجه با شرایط تنش‌زا باشد. آنزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز گروهی از متالوپروتئین‌ها هستند که به‌عنوان نخستین خط دفاعی در برابرROS اضافی عمل می‌کنند و با ممانعت از ایجاد رادیکال‌های هیدروکسیل، تحمل گیاه را به تنش افزایش می‌دهند (Pan *et al*., 2020). حداقل سه ایزوآنزیم اصلی از این آنزیم با ساختار و سطح فعالیت متفاوت و بسته به نوع عامل فلزی در گیاهان شامل Cu/Zn-SOD، Mn-SOD وFe-SOD وجود دارد. فراوان‌ترین ایزوآنزیم در گیاهان Cu/Zn-SOD است که در همه حجره‌های سلولی یافت می‌شود، اما مکان اصلی آن سیتوزول و کلروپلاست است (Pan *et al*., 2020). به نظر می‌رسد که پاسخ اشکال مختلف این آنزیم به تنش کادمیوم در بین گونه‌های مختلف گیاهی متفاوت باشد. درگیاهان نخود تحت تنش کادمیوم، تنها فعالیت سنجش‌شده از آنزیم سوپراکسیددیسموتاز، متعلق به ایزوآنزیم Mn-SOD بود (Sandalio *et al*., 2001). درگیاهان جو در معرض کادمیوم، همراه با افزایش فعالیت کل آنزیم سوپراکسیددیسموتاز در برگ‌ها، سطح فعالیت ایزوآنزیم Mn-SOD کاهش، درحالی که ایزوآنزیم Cu/Zn-SOD افزایش یافت. در ریشه‌ها، افزایش فعالیت هر دو ایزوفرم سنجش شد (Chen *et al*., 2010). تیمار کادمیوم در گیاهان *Tagetes patula* منجر شد تا ایزوزیم Cu/Zn-SOD در ریشه‌ها و برگ‌ها فعالیت بالاتری را در مقایسه با ایزوآنزیم Mn-SOD نشان دهد (Liu *et al*., 2011). در گیاهان *Kandelia obovata* به دنبال تنش کادمیوم، سه ایزوآنزیم از سوپراکسیددیسموتاز در برگ‌ها و ریشه‌ها، دو ایزوآنزیم در ساقه‌ها و یک ایزوآنزیم در هیپوکوتیل تشخیص داده شد (Pan *et al*., 2020). نتایج پژوهش حاضر نشان داد که ایزوآنزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز در برگ‌ها و ریشه گیاهانی که فقط با کادمیوم تیمار شده بودند، باندهای پررنگ‌تری را در مقایسه با گیاهان در معرض توأمان شوری و کادمیوم نشان دادند که به نظر

می‌رسد با نتایج حاصل از سنجش فعالیت این آنزیم مطابقت داشته باشد و ناشی از افزایش فعالیت آن باشد. تصور می‌شود که ایزوفرم‌های آنزیم سوپراکسیددیسموتاز می‌توانند نقش‌های متفاوتی را در کنترل میزان ROS و افزایش تحمل گیاه به تنش کادمیوم داشته باشند.



شکل ۱. فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) در برگ‌ها (الف) و ریشه‌ها (ب) پس از تیمار با۵۰ میکرومولار کادمیوم با دو سطح کلرید سدیم، ۱ معادل ۲۵ و سطح ۲ معادل۵۰ میلی‌مولار. مقادیر میانگین ۳ تکرار ± SD و حروف مشترک بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح P<0.05 مطابق با آزمون چند دامنه‌ای دانکن است.



شکل ۲- فعالیت آنزیم گایاکول‌پراکسیداز (GPX) در برگ‌ها (الف) و ریشه‌ها (ب) پس از تیمار با۵۰ میکرومولار کادمیوم با دو سطح کلرید سدیم، ۱ معادل ۲۵ و سطح ۲ معادل۵۰ میلی‌مولار. مقادیر میانگین ۳ تکرار ± SD و حروف مشترک بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح P<0.05 مطابق با آزمون چند دامنه‌ای دانکن است.

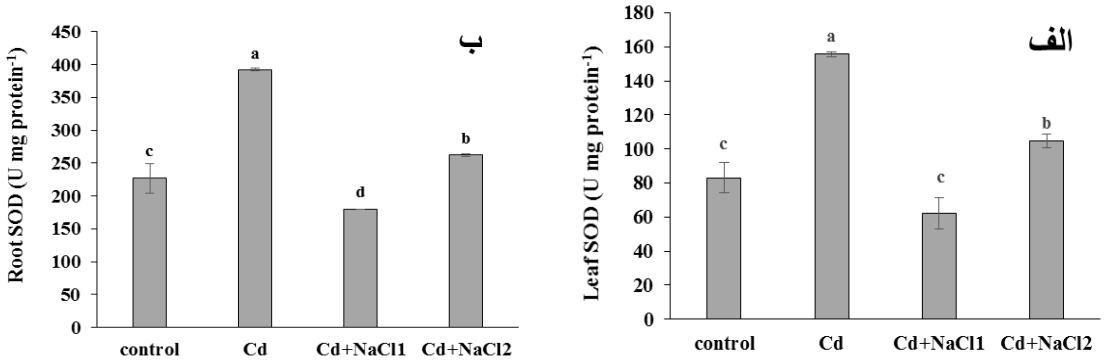
نتیجه‌گیری

در یک جمع‌بندی، هر دو سطح کلرید سدیم استفاده‌شده در این پژوهش، به‌ویژه ۲۵ میکرومولار، توانستند تجمع کادمیوم را در گیاه کاهش و رشد و محتوای کلروفیل را در گیاهان در معرض کادمیوم افزایش دهند. به نظر می‌رسد که هر دو سطح شوری با کاهش سطح پراکسیداسیون لیپیدی، پرولین و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در مقایسه با گیاهانی که فقط با کادمیوم تیمار شده بودند، به تعدیل تنش اکسیداتیو و سمیّت القاشده توسط این

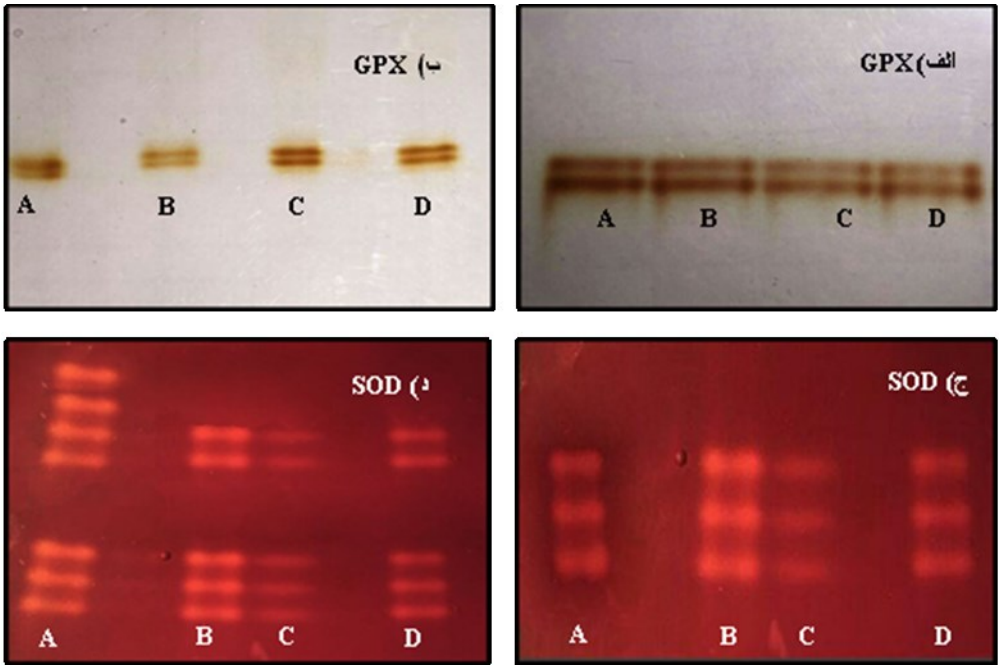
فلز و بهبود عملکرد گیاهان در این شرایط منجر شده‌اند.

این پژوهش با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز و با شماره پژوهانه ۹۶/۳/۰۲/۱۶۶۷۰ انجام شد.

سپاسگزاری



شکل ۳- فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز (SOD) در برگ‌ها (الف) و ریشه‌ها (ب) پس از تیمار با ۵۰ میکرومولار کادمیوم با دو سطح کلرید سدیم، ۱ معادل ۲۵ و سطح ۲ معادل ۵۰ میلی‌مولار. مقادیر میانگین ۳ تکرار ± SD و حروف مشترک بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح P<0.05 مطابق با آزمون چند دامنه‌ای دانکن است.



شکل ۴- الگوی الکتروفورزی ایزوآنزیم‌های گایاکول‌پراکسیداز (GPX) و سوپراکسیددیسموتاز (SOD) روی ژل پلی‌اکریل‌آمید در برگ‌ها (الف و ج) و ریشه‌ها (ب و د). A: شاهد؛ B: تیمار کادمیوم ۵۰ میکرومولار؛ C: تیمار کادمیوم ۵۰ میکرومولار و کلریدسدیم ۲۵ میلی‌مولار؛ D: تیمارکادمیوم ۵۰ میکرومولار و کلرید سدیم ۵۰ میلی‌مولار

.

References

Abdel Latef, A. A. (2013) Growth and some physiological activities of pepper (*Capsicum annuum* L.) in response to cadmium stress and mycorrhizal symbiosis. Journal of Agricultural Science and Technology 15: 1437-1448.

Aebi, H. (1984) Catalase *in vitro*. methods in enzymology 105: 121-126.

Bates, S. (1973) Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant and Soil 39: 205-207.

Beauchamp, C. and Fridovich, I. (1971) Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. Analytical Biochemistry 44: 276-287.

Chen, F., Wang, F., Sun, H., Cai, Y., Mao, W., Zhang, G., Vincze, É. and Wu, F. (2010) Genotype-dependent effect of exogenous nitric oxide on Cd-induced changes in antioxidative metabolism, ultrastructure, and photosynthetic performance in barley seedlings (*Hordeum vulgare*). Journal of Plant Growth Regulation 29: 394-408.

Clemens, S. (2006) Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechan-isms of tolerance in plants. Biochimie 88: 1707-1719.

Deng, Y., Li, D., Huang, Y. and Huang, S. (2017) Physiological response to cadmium stress in kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) seedlings. Industrial Crops and Products 107: 453-457.

Dong, Y., Chen, W., Xu, L., Kong, J. and Liu, S. (2016) Nitric oxide can induce tolerance to oxidative stress of peanut seedling under cadmium toxicity. Plant Growth Regulation 79: 19-28.

Gerami, M., Ghorbani, A. and Karimi, S. (2018) Role of salicylic acid pretreatment in alleviating cadmium-induced toxicity in *Salvia officinalis* L. Iranian Journal of Plant Biology 10(1): 81-95.

Ghabriche, R., Ghnaya, T., Mnasri, M., Zaier, H., Baioui, R., Vromman, D., Abdelly C. and Lutts, S. (2017) Polyamine and tyramine involvement in NaCl-induced improvement of Cd resistance in the halophyte *Inula chrithmoides* L. Journal of Plant Physiology 216: 136-144.

Ghnaya, T., Slama, I., Messedi, D. and Grignon, C. (2007) Cd-induced growth reduction in the halophyte *Sesuvium portulacastrum* is significantly improved by NaCl. Journal of Plant Research 120: 309-316.

Gill, S. S., Khan, N. A. and Tuteja, N. (2012) Cadmium at high dose perturbs growth, photosynthesis and nitrogen metabolism while at low dose it up regulates sulfur assimilation and antioxidant machinery in garden cress (*Lepidium sativum* L.). Plant Science 182: 112-120. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics 1859: 1274-1287.

Han, R. M., Lefèvre, I., Albacete, A., Pèrez-Alfocea, F., Barba-Espín, G., Díaz-Vivancos, P., Quinet, M., Ruan, C. J., Hernández, J. A., Cantero-Navarro, E. and Lutts, S. (2013) Antioxidant enzyme activities and hormonal status in response to Cd stress in the wetland halophyte *Kosteletzkya virginica* under saline conditions. Physiologia Plantarum 147(3): 352-368.

Hattab, S., Boutheina, D., Chouba, L., Kheder, M. B. and Bousetta, H. (2009) Photosynthesis and growth responses of pea *Pisum sativum* L. under heavy metals stress. Journal of Environmental Science 21: 1552-1556.

Heath, R. L. and Packer, L. (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts 1. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidatoin. Archives of Biochemistry and Biophysics 125: 189-198.

Hemeda, H. M. and Klein, B. P. (1990) Effects of naturally occurring antioxidants on peroxidase activity of vegetable extracts. Journal of Food Science 55: 184-185.

Hu, L., Li, H., Pang, H. and Fu, J. (2012). Responses of antioxidant gene, protein and enzymes to salinity stress in two genotypes of perennial ryegrass (*Lolium perenne*) differing in salt tolerance. Journal of Plant Physiology 169: 146-156.

Huang, Y., Zhang, G., Wu, F., Chen, J. and Xiao, Y. (2006) Interaction of salinity and cadmium stresses on antioxidant enzymes, sodium, and cadmium accumulation in four barley genotypes. Journal of Plant Nutrition 29: 2215-2225.

Irfan, M., Ahmad, A. and Hayat, S. (2014) Effect of cadmium on the growth and antioxidant enzymes in two varieties of *Brassica juncea*. Saudi Journal of Biological Sciences 21: 125-131.

Jordy, M. N., Danti, S., Favre, J. M. and Raccchi, M. L. (2000) Histological and biochemical changes in *Pinus* spp. seeds during germination and post-germinative growth: triacylglycerol distribution and catalase activity. Australian Journal of Plant Physiology 27(12): 1109-111.

Kovács, B., Gŷori, Z., Prokisch, J., Loch, J. and Dániel, P. (1996) A study of plant sample preparation and inductively coupled plasma emission spectrometry parameters. Communications in Soil Science and Plant Analysis 27: 1177-1198.

Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227(5259): 680-685.

Lall, N. and Nikolova, R. V. (2002) Developmental changes of superoxide dismutase, peroxidase and catalase isoenzyme profiles in leaves of *Impatiens flanaganiae* Hemsl. associated with variations in light intensity. South African Journal of Botany 68: 518-524.

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

Liu, Y. T., Chen, Z. S. and Hong, C. Y. (2011) Cadmium-induced physiological response and antioxidant enzyme changes in the novel cadmium accumulator, *Tagetes patula*. Journal of Hazardous Materials 189: 724-731.

Lutts, S. and Lefèvre, I. (2015) How can we take advantage of halophyte properties to cope with heavy metal toxicity in salt-affected areas? Annals of Botany 115: 509-528.

Marzban, L., Akhzari, D., Ariapour, A., Mohammadparast, B. and Pessarakli, M. (2017) Effects of cadmium stress on seedlings of various rangeland plant species (*Avena fatua* L., *Lathyrus sativus* L. and *Lolium temulentum* L.): growth, physiological traits and cadmium accumulation. Journal of Plant Nutrition 40: 2127-2137.

Mishra, S., Srivastava, S., Tripathi, R. D., Govindarajan, R., Kuriakose, S. V. and Prasad, M. N. V. (2006) Phytochelatin synthesis and response of antioxidants during cadmium stress in *Bacopa monnieri* L. Plant Physiology and Biochemistry 44: 25-37.

Pan, C., Lu, H., Liu, J., Yu, J., Wang, Q., Li, J., Yang, J., Hong, H. and Yan, C. (2020) SODs involved in the hormone mediated regulation of H_2O_2 content in *Kandelia obovate* root tissues under cadmium stress. Environmental Pollution 256: Article number 113272.

Romero-Puertas, M. C., Terrón-Camero, L. C., Peláez-Vico, M. Á., Olmedilla, A. and Sandalio, L. M. (2019) Reactive oxygen and nitrogen species as key indicators of plant responses to Cd stress. Environmental and Experimental Botany 161: 107-119.

Rosén, K., Eriksson, J. and Vinichuk, M. (2012) Uptake and translocation of ^{109}Cd and stable Cd within tobacco plants (*Nicotiana sylvestris*). Journal of Environmental Radioactivity 113: 16-20.

Sandalio, L. M., Dalurzo, H. C., Gomez, M., Romero-Puertas, M. C. and del Rio,

L. A. (2001) Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. Journal of Experimental Botany 52: 2115-2126.

Siddiqi, M. Y., Glass, A. D. M., Ruth, T. J. and Rufty, T. (1990) Studies of the uptake of nitrate in barley: I. Kinetics of $^{13}NO_3$ influx. Plant Physiology 93: 1426-1432.

Tauqeer, H. M., Ali, S., Rizwan, M., Ali, Q., Saeed, R., Ahmad, U. R., Farid, M. and Abbasi, G. H. (2016) Phytoremediation of heavy metals by *Alternanthera bettzickiana*: growth and physiological response. Ecotoxicology and Environmental Safety 126: 138-146.

Tran, T. A. and Popova, L. P. (2013) Functions and toxicity of cadmium in plants: recent advances and future prospects. Turkish Journal of Botany 37: 1-13.

Wali, M., Ben Rjab, K., Gunsé, B., Lakdhar, A., Lutts, S., Poschenrieder, C., Abdelly, C. and Ghnaya, T. (2014) How does NaCl improve tolerance to cadmium in the halophyte *Sesuvium portulacastrum*? Chemosphere 117: 243-250.

Wu, Z., Zhao, X., Sun, X., Tan, Q., Tang, Y., Nie, Z., Qu, C., Chen, Z. and Hu, C. (2015) Antioxidant enzyme systems and the ascorbate-glutathione cycle as contributing factors to cadmium accumulation and tolerance in two oilseed rape cultivars (*Brassica napus* L.) under moderate cadmium stress. Chemosphere 138: 526-536.

Xu, J., Yin, H., Liu, X. and Li, X. (2010) Salt affects plant Cd-stress responses by modulating growth and Cd accumulation. Planta 231: 449-459.

Yilmaz, D. D. and Parlak, K. U. (2011) Changes in proline accumulation and antioxidative enzyme activities in *Groenlandia densa* under cadmium stress. Ecological Indicators 11: 417-423.

Zhang, B., Shang, S., Jabeen, Z. and Zhang, G. (2014) Involvement of ethylene in alleviation of Cd toxicity by NaCl in tobacco plants. Ecotoxicology and Environmental Safety 101: 64-69.

Zhang, B., Shang, S., Jazza, B. and Zhang, G. (2013) Sodium chloride enhances cadmium tolerance through reducing cadmium accumulation and increasing anti- oxidative enzyme activity in tobacco. Environmental Toxicology and Chemistry 32: 1420-1425.

Zouari, M., Ahmed, C. B., Elloumi, N., Bellassoued, K., Delmail, D., Labrousse, P., Abdallah, F. B. and Rouina, B. B. (2016) Impact of proline application on cadmium accumulation, mineral nutrition and enzymatic antioxidant defense system of *Olea europaea* L. cv Chemlali exposed to cadmium stress. Ecotoxicology and Environmental Safety 128: 195-205.

Zoufan, P., Azad, Z., Rahnama Ghahfarokhie, A. and Kolahi, M. (2020) Modification of oxidative stress through changes in some indicators related to phenolic metabolism in *Malva parviflora* L. exposed to cadmium. Ecotoxicology and Environmental Safety 187: Article number109811.

Zoufan, P., Jalali, R., Hassibi, P., Neisi, E. and Rastegarzadeh, S. (2018) Evaluation of antioxidant bio indicators and growth responses in *Malva parviflora* L. exposed to cadmium. Physiology and Molecular Biology of Plants 24: 1005-1016.