



<https://ijpb.ui.ac.ir/?lang=en>
Journal of Plant Biological Sciences
E-ISSN: 3041-9603
Vol. 15, Issue 4, No. 58, winter 2023
Document Type: Research Paper
Received: 08/05/2024 Accepted: 04/08/2024

The effect of nano hydroxyapatite on physiological indices and enzymatic and non-enzymatic antioxidant systems of two grape cultivars under cadmium stress in soil

Hoda Karimi¹, Shahriar Mahdavi² * Nassrin Hassanzadeh³, Rouhollah Karimi⁴

¹ Department of Environmental Science, Research Institute of Grapes and Raisins, Malayer University, Malayer, Iran

² Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Malayer University, Malayer, Iran

³ Department of Environment, Faculty of Environment and Natural Resources, Malayer University, Malayer, Iran

⁴ Departments of Horticulture and Landscape Engineering, Faculty of Agriculture, Malayer University, Malayer, Iran

Abstract

Heavy metals pollution is increasing due to the excessive use of fertilizers and chemical pesticides in agricultural products. The application of nanoparticles can significantly reduce heavy metal pollution in soil. This research was conducted in the spring of 2022 to investigate the effect of nano-hydroxyapatite (n-HAP) on physiological indices and reduce oxidative stress caused by cadmium (Cd) stress (100 mg/kg of soil) in two grape cultivars (Bidaneh-Sefid and Perlette). The study was conducted factorially based on a completely randomized design in the research greenhouse of Malayer University. After 60 days of Cd stress and the application of n-HAP (1% by weight) in the pots, leaf samples were collected, and physiological indices and antioxidant activity were measured. The results showed that the application of n-HAP in both grape cultivars increased relative water content, chlorophyll, phosphorus contents, and the activity of catalase, guaiacol peroxidase, and ascorbate peroxidase enzymes in the leaves, while it reduced ion leakage. In plants under Cd stress, the highest chlorophyll content was observed in the Bidaneh-Sefid cultivar treated with n-HAP, which was 10.88% higher compared to the Cd-treated control vines. Under Cd stress, the highest relative water content was observed in the Bidaneh-Sefid cultivar treated with n-HAP, which was 4.09% higher compared to the control vines under Cd stress. The increase in ascorbate peroxidase enzyme activity was 15.71% in the Bidaneh-Sefid and 13.04% in the Perlette under Cd stress. Also, under Cd stress, the application of n-HAP led to an increase in leaf total phenol and total flavonoid content of the leaf in two grape cultivars. There was no difference in the content of these two secondary metabolites among the grape cultivars grown under Cd stress conditions. In the plants under Cd stress, the highest proline content was related to Perlette cultivar treated with n-HAP compound, which was 18.78% higher compared to control vines under Cd stress. According to the results of this research, the application of n-HAP in soil can be considered a useful strategy for controlling Cd in soils contaminated with this heavy metal.

Keywords: Grapes, Catalase, Chlorophyll, Nano-hydroxyapatite, Ion Leakage

*Corresponding author: sh.mahdavi@malayeru.ac.ir



3041-9603 © University of Isfahan

This is an open access article under the CC BY-NC-ND/4.0/ License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

10.22108/ijpb.2024.141130.1363

Introduction

Cadmium, a heavy metal with a wide range of contamination and strong toxicity, has increasingly become a serious challenge for vineyard soil and grapes in recent years. Previous studies have reported that compared to other heavy metals, cadmium can be absorbed by crops and transferred to edible parts. Heavy metal stress can negatively affect the structure of proteins and enzyme activities and disrupt the replacement reactions of essential metal ions with biomolecules. Therefore, there is an urgent need to reduce cadmium accumulation in crops. One of these methods is reducing the bioavailability of heavy metals (such as Cd) in the soil and also reducing their absorption from the soil. Among the strategies for reducing the bioavailability of Cd in the soil, stabilization is one of the most effective. In this method, using amendments and mechanisms such as adsorption, complexation, or precipitation, Cd is removed from the soil solution and made unavailable to humans, plants, or groundwater. Nano-hydroxyapatite (n-HAP), due to reasons such as environmental compatibility, ability to adsorb heavy metals, low solubility in water, high stability under oxidative and reductive conditions, high specific surface area, and availability, can be an ideal material with high capability for Cd stabilization. Since Malayer is recognized as a global city of grapes and has many diverse grape varieties, and due to the increasing use of chemical fertilizers containing Cd impurities, this plant and the Cd metal were chosen for study. Furthermore, to date, the effect of nano-hydroxyapatite on reducing the negative impacts of Cd on woody plants, including grapes, has not been examined. Therefore, this research aims to investigate the effect of nano-hydroxyapatite in soil and its impact on the physiological indices and enzymatic and non-enzymatic antioxidant systems of grape leaves under two conditions: without stress and with 100 mg/kg Cd stress in the soil, in two grape varieties, Perlette and White Seedless, in the research greenhouse of the Faculty of Agriculture, Malayer University.

Materials and Methods

This research was conducted in 2022 to investigate the effect of n-HAP on physiological indices and reducing oxidative stress caused by Cd stress (100 mg/kg) in two grape varieties (White Soltana and Perlette). The study was designed as a factorial experiment based on a completely randomized design in the research greenhouse of Malayer University. After 60 days of Cd stress and application of n-HAP (1% by weight) in pots, mature leaves were detached from each vine per treatments and following physiological and phytochemical parameters, including ion leakage, chlorophyll, phosphorus, relative water content (RWC), ascorbate peroxidase (APX), guaiacol peroxidase (GPX), catalase (CAT), proline, total phenol, total flavonoid, malondialdehyde (MDA), and soluble sugar contents were measured using a spectrophotometer (Spekol, Germany). Data analysis of variance (ANOVA) were performed by GLM procedures of SAS (SAS Institute Inc., USA), and Duncan's multiple range test at a confidence level of 5% was used for mean comparisons (three replications).

Results and Discussion

The results showed that Cd stress decreased chlorophyll content (based on SPAD index) and RWC while increasing ion leakage. The application of n-HAP in both grape varieties increased the RWC, chlorophyll, and phosphorus contents and reduced ion leakage to some extent. Under Cd stress conditions, the use of n-HAP in soil significantly influenced plant indicators such as RWC, ion leakage, chlorophyll, and phosphorus. The application of n-HAP significantly reduced ion leakage in both grape cultivars compared to untreated soil. Under cadmium stress, the highest chlorophyll content was found in the White Soltana variety treated with n-HAP, which was 10.88% higher than the control vines under cadmium stress. The highest proline content under Cd stress was in the Perlette variety treated with nano-hydroxyapatite, which was 18.78% higher than the control variety under Cd stress. This value increased by 3.99% in the White Soltana variety. The highest water content under Cd stress was in the Bidaneh-Sefid cultivar treated with n-HAP, 4.09% higher than the control under Cd stress. The application of n-HAP treatment positively affected the biosynthesis and accumulation of phenolic compounds

in the vines of both cultivars, especially under Cd stress conditions. Total flavonoid content in the White Soltana variety under cadmium stress with nano-hydroxyapatite increased by 69.51% compared to plants grown under Cd stress without n-HAP, and this value increased by 56.17% in the Perlette variety. The activity of the catalase enzyme in the White Soltana variety treated with nano-hydroxyapatite was 19.94% higher than in the same variety under Cd stress without nano-hydroxyapatite. The activity of the CAT enzyme increased by 12.63% in Perlette cultivar. The increase in GPX enzyme activity in samples treated with this compound under Cd stress was 14.47% in the White Soltana cultivar and 12.39% in the Perlette cultivar compared to control samples under cadmium stress in both cultivars. The highest activity of the APX enzyme was in the Bidaneh-Sefid variety treated n-HAP under Cd stress. There was a 15.71% increase in the activity of this enzyme in the leaves of the White Soltana variety treated with n-HAP under Cd stress, and this increase was 13.04% in the Perlette cultivar.

Conclusion

The n-HAP is known as a solution for contaminated and degraded soils. According to the results of this research, the use of n-HAP with a concentration of 1% (w/w) in soil contaminated with Cd in two grape cultivars increased some physiological indices of leaves, including chlorophyll, phosphorus contents and the RWC. Also, the Bidaneh-Sefid cultivar reacted better to the effects of n-HAP than the Perlette cultivar. Totally, the soil-application of n-HAP in 1% (w/w) concentration can be considered as a useful method to decrease Cd contamination in vineyard soil.

تأثیر نانو هیدروکسی آپاتیت بر شاخص‌های فیزیولوژیکی و سیستم‌های آنتی اکسیدانی آنزیمی و غیر آنزیمی دو رقم انگور تحت تنش کادمیم در خاک

هدا کریمی^۱، شهریار مهدوی*^۲، نسرین حسن زاده^۳، روح اله کریمی^۴

^۱ گروه علوم محیطی، پژوهشکده انگور و کشمش، دانشگاه ملایر، ملایر، ایران

^۲ دانشیار گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ملایر، ملایر، ایران

^۳ گروه محیط زیست، دانشکده محیط زیست و منابع طبیعی، دانشگاه ملایر، ملایر، ایران

^۴ گروه مهندسی باغبانی و فضای سبز، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ملایر، ملایر، ایران

چکیده

آلودگی فلزات سنگین به علت کاربرد بی‌رویه کودها و سموم شیمیایی در محصولات کشاورزی رو به افزایش است. کاربرد نانوذرات می‌تواند تا حد مطلوبی سبب کاهش آلودگی فلزات سنگین در خاک شود. پژوهش حاضر در بهار ۱۴۰۱ با هدف بررسی تأثیر نانوذره هیدروکسی آپاتیت بر شاخص‌های فیزیولوژیکی و کاهش تنش اکسایشی ناشی از تنش کادمیم (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک) در دو رقم انگور (بیدانه-سفید و پرلت) به صورت آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کامل تصادفی در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه ملایر انجام شد. پس از ۶۰ روز از اعمال تنش کادمیم و کاربرد نانو هیدروکسی آپاتیت (یک درصد وزنی) در گلدان‌ها، نمونه‌های برگ جمع‌آوری و شاخص‌های فیزیولوژیکی و فعالیت آنتی اکسیدانی برگ اندازه‌گیری شدند. نتایج نشان دادند کاربرد نانو هیدروکسی آپاتیت در هر دو رقم سبب افزایش محتوای نسبی آب، کلروفیل، فسفر و افزایش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، گایاکول-پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز برگ شد، ولی به کاهش میزان نشت یونی منجر شد. در گیاهان تحت تنش کادمیم بیشترین محتوای کلروفیل مربوط به رقم بیدانه سفید تیمار شده با ترکیب نانو هیدروکسی آپاتیت مشاهده شد که در مقایسه با تاک-های شاهد تحت تنش کادمیم تا ۱۰/۸۸ درصد بیشتر بود. بیشترین محتوای آب در تاک-های تحت تنش کادمیم مربوط به تیمار نانو هیدروکسی آپاتیت در رقم بیدانه سفید بود که در مقایسه با تاک-های شاهد تحت تنش کادمیم ۴/۰۹ درصد بیشتر بود. افزایش مقدار آنزیم آسکوربات پراکسیداز در رقم بیدانه سفید در نمونه‌های تحت تنش کادمیم ۱۵/۷۱ درصد و در رقم پرلت ۱۳/۰۴ درصد مشاهده شد. بر اساس نتایج این پژوهش، کاربرد نانو هیدروکسی آپاتیت در خاک تا حدی می‌تواند به عنوان یک راهکار مفید، برای کنترل کادمیم در خاک‌های مناطق آلوده به این فلز سنگین در نظر گرفته شود.

کلید واژه‌ها: انگور، کاتالاز، کلروفیل، نانو هیدروکسی آپاتیت، نشت یونی



مقدمه

کادمیم (Cd) به عنوان یک فلز سنگین با دامنه آلودگی زیاد و سمیت قوی، در سال‌های اخیر به طور فزاینده‌ای به یک چالش جدی برای خاک تاکستان و انگور تبدیل شده است (Mamut et al., 2023). کادمیم یک عنصر غیر ضروری و سمی برای گیاهان است که خطرات قابل توجهی برای سلامت انسان و محیط زیست ایجاد کرده است (Ke, 2023, Zeng et al., 2022). استفاده از کودها و قارچ کش ها سبب تجمع عناصر کمیاب از قبیل کادمیم در خاک تاکستان می شود که ممکن است فراهمی زیستی آنها را برای گیاهان افزایش دهد (Jafarhaddadian et al., 2021). غلظت معمولی کادمیم در خاک تاکستان‌های انگور ۰/۳-۰/۵ mg/kg، حد مسمومیت آن در خاک ۱/۵-۵ mg/kg و حد بحرانی آن در گیاه ۸/۸-۵۳ mg/kg است (Mamut et al., 2023). راه‌هایی که کادمیم می تواند توسط آن وارد خاک‌های کشاورزی شود، شامل رسوب اتمسفر، آبیاری با آب آلوده یا استفاده از کود آلوده است. غلظت بیش از حد کادمیم در خاک ممکن است به طور قابل توجهی فرآیندهای بیوشیمیایی را تغییر دهد و عملکرد محصولات کشاورزی را کاهش دهد (Juang et al., 2012). پژوهش‌های قبلی گزارش کردند در مقایسه با سایر فلزات سنگین، کادمیم می‌تواند توسط محصولات جذب شده و به قسمت‌های خوراکی منتقل شود (Ran et al., 2015; Song et al., 2015). در گیاهان، کادمیم نقش فیزیولوژیکی شناخته شده ای ندارد، اما به راحتی به بافت‌های اندام هوایی گیاه منتقل که سمیت کادمیم منجر به پیامدهای نامطلوبی مانند

زردی برگ‌ها، کاهش سرعت رشد، مهار تنفس و فتوسنتز، آسیب اکسیداتیو و کاهش جذب مواد مغذی می‌شود (He et al., 2017; Baliardini et al., 2015). همچنین کادمیم در خاک یک چرخه تجزیه طولانی، تحرک و سمیت بالا را نشان می‌دهد که منجر به کاهش جوانه زنی بذر، مهار رشد گیاه و کاهش عملکرد می‌شود (Kaya et al., 2020; Kaya et al., 2019). بنابراین، نیاز به استراتژی‌های نوآورانه و پایدار جهت کنترل جذب و انتقال کادمیم از خاک به اندام هوایی محصولات خوراکی از قبیل انگور وجود دارد.

تنش فلزات سنگین می‌تواند بر ساختار پروتئین‌ها و فعالیت آنزیم‌ها تأثیر منفی بگذارد و در واکنش‌های جایگزینی یون‌های فلزی ضروری با مولکول‌های زیستی اختلال ایجاد کند. چنین واکنشی می‌تواند یکپارچگی غشاءها را مختل کند و منجر به تغییر واکنش‌های متابولیکی اساسی، به عنوان مثال، هموستاز، تنفس و فتوسنتز شود (Seneviratne et al., 2019). علاوه بر این، تنش فلزات سنگین می‌تواند بهره‌وری گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) مانند پراکسید هیدروژن (H_2O_2)، رادیکال‌های هیدروکسیل (OH) و رادیکال‌های سوپراکسید (O_2^-) را افزایش دهد. گونه‌های فعال اکسیژن می‌تواند به تنش اکسایشی و پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء منجر شود (Tripathi et al., 2021; Metcalfe et al., 2022). کادمیم اضافی در گیاهان با تولید گونه‌های فعال اکسیژن، نشت الکترولیت، پراکسید هیدروژن و غلظت مالون دی‌آلدئید رشد گیاه را کاهش می‌دهد (Ali et al., 2015; Rizwan et al., 2016). با این حال، گیاهان دارای

کاهش فراهمی زیستی و یا حذف ترکیبات بسیار سمی از جمله فلزات سنگین در خاک‌های آلوده شوند (Mahdavi et al., 2015). نانو هیدروکسی آپاتیت (n-HAP) به علت سازگاری با محیط زیست، توانایی جذب فلزات سنگین، حلالیت کم در آب، پایداری زیاد در شرایط اکسید و احیایی، سطح ویژه بالا و در دسترس بودن می‌تواند یک ماده ایده‌آل با توانایی بالا در تثبیت کادمیم باشد (Wu et al., 2024; Shaheen & Rinklebe, 2015; Feng et al., 2021).

از سوی دیگر، نانو موادی مانند نانوذرات (NPs)، می‌توانند نقش حیاتی در کاهش تأثیر منفی جذب و جابه‌جایی فلزات سنگین به علت مساحت سطح بزرگ‌شان داشته باشند. نانوذرات می‌توانند برای کاهش سمیت فلزات سنگین در گیاهان استفاده شوند و در نتیجه می‌توانند جوانه زنی بذر و سیستم‌های فتوسنتزی را بهبود بخشند (Alhammad et al., 2016).

همچنین نانو هیدروکسی آپاتیت به طور گسترده به‌عنوان یک ماده کارآمد و سازگار با محیط زیست برای تصفیه آلاینده‌های آب و خاک استفاده می‌شود (Feng et al., 2021; Wan et al., 2021). پژوهش‌های قبلی نشان داده‌اند استفاده از n-HAP در خاک‌های کشاورزی می‌تواند منجر به بهبود عملکرد محصول و نیز کاهش دسترسی کادمیم در خاک شده و در نهایت سبب کاهش تجمع کادمیم در محصولات شود (Kottegoda et al., 2017). همچنین یافته‌ها نشان دادند نانو هیدروکسی آپاتیت در ریشه برنج می‌تواند به عنوان مانعی برای به دام انداختن سرب عمل کند،

سازوکارهای سم‌زدایی فلزات سنگین برای غلبه بر گونه‌های فعال اکسیژن با تحریک مجموعه‌ای از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند سوپر اکسید دیسموتاز، کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز هستند (Manikandan et al., 2016). پژوهش‌های متعددی اثرات سمی کادمیم را در گیاهان زراعی در سطوح مختلف گزارش کرده‌اند (Abbas et al., 2017; Ur Rehman et al., 2019; Rizwan et al., 2018). بنابراین، نیاز مبرم به کاهش تجمع کادمیم در محصولات وجود دارد.

در دهه‌های اخیر، توجه به توسعه راهکارهای مختلف برای کاهش سمیت فلزات سنگین در کشت محصولات جهت پاسخگویی به نیازهای جهانی برای غذا، و علوفه معطوف شده است. یکی از این روش‌ها، کاهش فراهمی زیستی فلزات سنگین (مثل کادمیم) در خاک و کاهش جذب آن از خاک است. از میان راهکارهای کاهش فراهمی زیستی کادمیم در خاک، روش تثبیت یکی از موثرترین آنها است. در این روش توسط اصلاح‌کننده‌ها و با سازوکارهایی مانند جذب سطحی، کمپلکس شدن و یارسوب کادمیم از محلول خاک حذف می‌شود و برای انسان، گیاه و یا آب زیرزمینی غیر فراهم می‌شود.

همچنین با گسترش نانوفناوری پژوهشگران در پالایش خاک به استفاده از نانو مواد به عنوان مواد اصلاحی توجه کردند. زیرا نانو مواد واکنش‌پذیری و سطح ویژه بیشتری نسبت به همان مواد در اندازه غیر نانو دارند (Adrees et al., 2015; Abbas et al., 2017). نانو مواد می‌توانند برای کنترل آلودگی‌های محیطی استفاده شوند تا به آرامی سبب

بنابراین انتقال سرب در برنج (*Oryza sativa* L.) را محدود می‌کند (Ye et al., 2018). استفاده از n-HAP می‌تواند با تبادل یونی، کمپلکس‌سازی سطحی و انتشار بین ذره‌ای با Cd متصل شود و بنابراین کارایی بالایی در تثبیت کادمیم دارد (Zhou et al., 2023). پیش تیمار نانو هیدروکسی آپاتیت رشد و جذب کادمیم در نشاء های برنج را تنظیم کرده است (Wu et al., 2024).

در سال‌های اخیر، سیستم تولید انگور ملایر به عنوان میراث مهم کشاورزی جهانی در سازمان خوار و بار جهانی تائید و به ثبت رسیده است (FAO, 2018) و دارای تعداد فراوانی از ارقام متنوع انگور است و به علت مصرف روز افزون کودهای شیمیایی دارای ناخالصی کادمیم، بنابراین این گیاه و فلز کادمیم انتخاب و بررسی شد. همچنین، تاکنون اثر نانو هیدروکسی آپاتیت بر کاهش اثرات منفی کادمیم بر گیاهان چوبی از جمله انگور بررسی نشده است. بنابراین پژوهش حاضر برای بررسی اثر نانو هیدروکسی آپاتیت در خاک و تأثیر آن روی شاخص‌های فیزیولوژیکی و سیستم‌های آنتی اکسیدانی آنزیمی و غیر آنزیمی برگ انگور در دو سطح بدون تنش و تنش ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم کادمیم در خاک در دو رقم انگور پرلت و بیدانه سفید در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه ملایر مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری و آماده سازی نمونه‌ها

در پژوهش حاضر، تأثیر تنش کادمیم بر شاخص‌های فیزیولوژیکی و سیستم‌های

آنتی اکسیدانی آنزیمی و غیر آنزیمی برگ دو رقم انگور (*Vitis vinifera* L.) به صورت آزمایش فاکتوریل (۲×۲) در قالب طرح کامل تصادفی در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه ملایر در بهار و تابستان ۱۴۰۱ انجام شد. فاکتور اول شامل کاربرد خاکی کادمیم در دو سطح بدون کاربرد (شاهد) و غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم (تنش) و فاکتور دوم شامل دو رقم انگور بیدانه سفید و پرلت بود. ابتدا قلمه های ریشه دار در گلدان‌های ۷ لیتری پلاستیکی با ارتفاع، قطر دهانه و قطر ته به ترتیب ۲۰، ۱۹ و ۲۵ سانتی متر حاوی خاک کاشته شدند. برای هر تیمار سه تکرار (دو گلدان در هر تکرار) انتخاب شد و در مجموع برای هر دو رقم انگور تعداد ۲۴ گلدان بر اساس طرح کامل تصادفی به کار گرفته شد. گلدان‌ها هر سه روز یکبار آبیاری و هر هفته با کود NPK ۲۰-۲۰-۲۰ (NutriPad)، مرسین کشت، کرج، ایران) با غلظت ۰/۵ گرم در لیتر قبل از شروع تیمار Cd کود داده شدند. پس از اینکه نهال‌ها به ۱۰ الی ۱۵ برگگی رسیدند، نانو هیدروکسی آپاتیت (۱ درصد) به خاک گلدان‌ها اضافه شد و پس از حدود دو هفته گلدان‌ها با محلولی از نمک کادمیم ($CdSO_4 \cdot 8H_2O$) و محلول در آب و به صورت آب آبیاری، آلوده شدند. غلظت اعمال شده تجمعی کادمیم در ۴ مرحله، ۱۰۰ میلی گرم در کیلوگرم و گلدان‌های شاهد بدون تنش بود. برای جلوگیری از شوک، مقدار وزنی کادمیم با احتساب وزن ۵ کیلوگیی خاک هر گلدان و غلظت مبنا محاسبه (۱۰۰ میلی-گرم در کیلوگرم) و به صورت هفتگی تا هفته نهم به صورت کود آبیاری به محیط کشت گلدان اضافه شد. در طول دوره تنش، رطوبت ریزوسفر در هر

و میزان نشت یونی نسبی (REL) از رابطه زیر محاسبه شد (Sairam et al., 2002).
رابطه ۱:

$$\%REL = [EC1 / EC2] * 100$$

محتوای نسبی آب برگ گیاه

نمونه برداری توسط قیچی از برگ رفرنس (آخرین برگ توسعه یافته) انجام شد و نمونه‌ها بلافاصله درون یخ قرار گرفته و در آزمایشگاه، وزن تر آن‌ها با ترازوی دقیق اندازه‌گیری شد. سپس تمامی نمونه‌ها در آب مقطر قرار داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. بعد از ۲۴ ساعت وزن اشباع برگ‌ها اندازه‌گیری و برگ‌ها به مدت ۲۴ ساعت دیگر در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد در آون قرار گرفتند و وزن خشک هر کدام اندازه‌گیری شد (Ritchie et al., 1990).

FW: وزن تر برگ بلافاصله بعد از نمونه برداری،
DW: وزن خشک برگ بعد از قرار گرفتن در آون و
SW: وزن اشباع برگ بعد از قرار گرفتن در آب مقطر است.
رابطه ۲:

$$RWC = (F_w - D_w) / (S_w - D_w) * 100$$

پراکسید هیدروژن

اندازه‌گیری پراکسید هیدروژن (H_2O_2) به روش Loreto & Velikova (2001) انجام شد. ۰/۳ گرم از نمونه برگ توزین و در ۳ میلی‌لیتر تری-کلرواستیک (TCA) یک درصد هموزن شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس

گلدان با یک تانسومتر (مدل PMS-714، Lutron، تایوان) بررسی و در حد ۶۵-۷۰٪ ظرفیت زراعی کنترل شد. پس از گذشت حدود ۶۰ روز (انتهای هفته نهم) از شروع تنش، برگ بالغ از گره‌های میانی شاخه‌های فرعی در هر گلدان به طور جداگانه برداشت و برای ارزیابی‌های بعدی به آزمایشگاه‌های تحقیقات فیزیولوژی گیاهان باغی و خاک-شناسی دانشکده کشاورزی دانشگاه منتقل شد. همچنین شاخص‌هایی از جمله نشت یونی، پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء، پراکسید هیدروژن، محتوای نسبی آب و قند محلول از برگ‌های تازه اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری سایر شاخص‌ها، برگ‌ها تا لحظه شروع آزمایش در فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

نشت یونی

جهت اندازه‌گیری پایدار غشای سلولی ۱۰ قطعه از برگ رفرنس به مساحت یک سانتی‌متر مربع از برگ هر تیمار در زمان رسیدن به سطح تنش مورد نظر بریده شد. قطعات برگ را داخل فالكون‌های ۵۰ میلی‌لیتری قرار داده و سپس مقدار ۱۵ میلی‌لیتر آب مقطر دو بار تقطیر شده به آن‌ها اضافه شد. سپس فالكون‌ها را به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق روی شیکر قرار داده و بعد از این مدت با دستگاه هدایت سنج الکتریکی، هدایت الکتریکی (EC_1) آن‌ها اندازه‌گیری شد. فالكون‌های حاوی نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱ اتمسفر اتوکلاو شدند. سپس بعد از سرد شدن فالكون‌های حاوی نمونه‌ها تا دمای اتاق، مجدداً هدایت الکتریکی (EC_2) آن‌ها اندازه‌گیری

مالون دی آلدئید

مقدار یک گرم نمونه را با ۱۰ میلی لیتر تری کلرو استیک اسید ۲۰ درصد حاوی نیم درصد وزنی- حجمی تیو باریتوریک اسید آسیاب و عصاره حاصله به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شده، محلول رویی به مدت ۲۵ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۸۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت، سپس فوری با یخ سرد شد و در ۱۲۰۰۰ دور به مدت پنج دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس فاز بالایی را جدا و جذب آن در طول موج‌های ۶۰۰ و ۵۳۲ نانومتر خوانده شد. غلظت نهایی مالون دی آلدئید از معادله زیر بدست آمد (Heath & Packer, 1986).

رابطه ۳:

$$MDA = \frac{A_{532} - A_{600}}{\epsilon} \times 1000$$

قندهای محلول

از هر گیاه ۰/۵ گرم از بافت تازه آن به همراه ۵ میلی لیتر اتانول ۹۵ درصد در داخل هاون چینی کوبیده و قسمت بالایی محلول جدا شدند. عمل استخراج دو بار دیگر و هر بار با ۵ میلی لیتر اتانول ۷۰ درصد تکرار شد. سپس محلول به دست آمده به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. برای اندازه گیری با توجه به روش Irigoyen et al. (1992) ۰/۱ میلی لیتر از عصاره الکلی برداشته و در لوله آزمایش ریخته شد و سپس سه میلی لیتر آنترون تازه تهیه شده (۱۵۰ میلی گرم آنترون + ۱۰۰ میلی لیتر اسید سولفوریک ۷۲ درصد W/W) به آن اضافه شد. لوله های آزمایش را به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب جوش قرار داده تا ماده رنگی تشکیل شود. پس از خنک شدن نمونه ها میزان جذب آن ها در طول

از آن به ۰/۷۵ میلی لیتر محلول شناور، ۰/۷۵ میلی لیتر محلول بافر فسفات پتاسیم ۱۰ میلی مولار با pH معادل ۷ و ۱/۵ میلی یدید پتاسیم ۱ مولار اضافه شد. غلظت پراکسید هیدروژن نمونه ها توسط مقایسه جذب آن ها در طول موج ۳۹۰ نانومتر و منحنی استاندارد آن در طیفی از ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ میکرومول بر لیتر محاسبه شد (Loreto & Velikova, 2001).

پرولین

با توجه به این که تجمع پرولین یک پاسخ فیزیولوژیکی به شرایط تنش است، سنجش این اسید آمینه نیز انجام شد. جهت سنجش پرولین روش Bates et al. (1973)، انتخاب شد. ۰/۵ گرم از نمونه در هاون چینی ریخته و با ازت مایع کوبیده شد. سپس ۱۰ میلی لیتر سولفو سالیسیک اسید سه درصد افزوده شد. محلول در سانتریفیوژ ۱۰ هزار دور در دقیقه قرار داده شد. از مایع رویی محلول سانتریفیوژ شده دو میلی لیتر برداشته و در زیر هود به آن دو میلی لیتر اسید استیک و دو میلی لیتر معرف نین هیدرین (۱/۲۵ گرم نین هیدرین + ۳۰ میلی لیتر استیک اسید گلاشیال + ۲۰ میلی لیتر اسید فسفریک اسید شش مولار) اضافه شد و ۱۵ دقیقه در حرارت ۴۰ سانتی گراد زیر هود توسط همزن مغناطیسی هم زده شد. محلول حاصل به مدت یک ساعت در بن ماری با دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد. بعد از سرد شدن محلول، مقدار ۴ میلی لیتر تولوئن به آن ها افزوده شد. سپس لوله ها را ورتکس کرده تا دو فاز ایجاد شود. برای سنجش میزان پرولین میزان جذب فاز فوقانی در طول موج ۵۲۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد (Bates et al., 1973).

موج ۶۲۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. غلظت قند محلول به صورت میلی گرم در گرم وزن تر از رابطه زیر محاسبه شد (Irigoyen et al., 1992).

رابطه ۴:

غلظت کربوهیدرات‌های محلول (میلی گرم بر گرم وزن خشک)

$$= \frac{\text{حجم عصاره (میلی لیتر)}}{\text{وزن نمونه (گرم)}} \times \left(\frac{\text{میلی گرم}}{1000 \text{ میلی لیتر}} \right) \text{ عدد قرائت شده}$$

فلاونوئید کل

میلی‌لیتر واکنش‌گر فولین-سیوکالتیو ۰/۲ نرمال افزوده شد، پس از ۵ دقیقه ۲ میلی‌لیتر از محلول ۰/۷٪ کربنات سدیم به آن اضافه شد. پس از ۲۰ دقیقه جذب مخلوط در طول موج ۷۶۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل JENWAY 6305، شرکت JENWAY، انگلستان) خوانده شد. میزان فنول کل بر اساس میزان معادل میلی‌گرم اسید گالیک در گرم وزن تر بیان شد (Jalili & Karimi, 2021, Slinkard & Singleton, 1977).

برای سنجش میزان فلاونوئید کل از روش رنگ سنجی کلرید آلومینیوم استفاده شد (Chang et al., 2002). در این روش ابتدا ۰/۱ میلی لیتر کلرید آلومینیوم ۱۰ درصد در لوله آزمایش ریخته شد. سپس ۰/۱ میلی لیتر استات پتاسیم یک مولار به لوله‌ها افزوده و با آن مخلوط و سپس ۲/۸ میلی لیتر آب مقطر به لوله‌ها اضافه شد. در مرحله آخر ۰/۵ میلی لیتر از محلول عصاره به مخلوط اضافه شد. نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در محیط تاریک قرار گرفتند و در نهایت جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۱۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر تعیین شد. مقدار فلاونوئید کل برای هر کدام از عصاره‌ها در سه تکرار به صورت معادل میلی گرم کوئرستین بر گرم وزن تر محاسبه شد.

پروتئین محلول

نیم گرم بافت برگ با ۵ میلی لیتر بافر استخراج (تریس با غلظت یک میلی مولار و pH=۷)، در حضور ازت مایع در هاون چینی کاملاً له شده و این مخلوط به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۶۰۰۰g سانتریفیوژ شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از محلول روشناور با ۵ میلی‌لیتر معرف بیورد [(۱۰٪ گلاشیال استیک اسید + ۲۵٪ اتانول + ۶۵٪ آب مقطر + ۰/۱٪ (حجم/وزن) محلول کوماسی بریلیانت بلوجی ۲۵۰)] مخلوط و جذب آن با اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد (Bradford, 1976). با منحنی استاندارد تهیه شده از غلظت‌های مختلف آلبومین

فنول کل

محتوای فنول کل با معرف فولین-سیوکالتیو اندازه‌گیری شد. ابتدا ۰/۵ گرم از بافت منجمد شده برگ در ۵ میلی‌لیتر متانول ۸۵٪ حل و به مدت ده دقیقه با دور ۶۰۰۰g سانتریفیوژ شد. به ۰/۵ میلی‌لیتر از هر عصاره متانولی (۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) ۲/۵

استخراج آنزیم، ۰/۱ گرم بافت پودر شده برگ در ۱ میلی لیتر «بافر استخراج» ریخته و بهم زده شد. عصاره حاصل به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴°C و با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. در هر دو کووت شاهد و کووت نمونه مقدار ۳ میلی لیتر بافر استخراج ریخته و به آن‌ها مقدار ۴/۵ میکرولیتر H_2O_2 ۳۰ درصد اضافه شد. ثبت تغییرات جذب نور نمونه‌ها در طول موج ۲۴۰ نانومتر که بیانگر میزان کاهش غلظت H_2O_2 است، هر ۱۰ ثانیه و به مدت ۱۲۰ ثانیه انجام شد. میزان فعالیت آنزیم (بر حسب واحد در میلی گرم پروتئین برگ) از رابطه زیر محاسبه شد:

رابطه ۶:

$$\text{CAT activity} = \frac{A_{240}(t_2) - A_{240}(t_1)}{t_2 - t_1} * \frac{Vt}{E * Vs}$$

آنزیم پراکسیداز (POD)

برای سنجش فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز سه میلی لیتر مخلوط واکنش شامل ۰/۸۵۵ میکرولیتر از ۲۵ میلی مولار گایاکول و ۱/۳۵۵ میکرولیتر از ۳۰٪ حجمی-حجمی آب اکسیژنه در سه میلی لیتر بافر فسفات به یک میلی لیتر عصاره آنزیمی استخراجی اضافه شدند و تغییرات جذب آن‌ها در طول موج ۴۶۵ نانومتر به مدت سه دقیقه خوانده شد. فعالیت آنزیمی بر حسب تغییرات جذب نور بر دقیقه بر میلی گرم پروتئین ($\Delta OD / \text{Min}/\text{mg protein}$) بیان شد (Herzog & Fahimi, 1973).

رابطه ۷:

$$\text{POD activity} = \frac{A_{465}(t_2) - A_{465}(t_1)}{t_2 - t_1} * \frac{Vt}{E * Vs}$$

گاوی (۱۰۰-۵۰۰ میلی گرم در میلی لیتر)، غلظت پروتئین‌های محلول به صورت میلی گرم در گرم وزن تر محاسبه شد.

آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX)

فعالیت این آنزیم به روش (Nakano & Asada, 1981) اندازه‌گیری شد. اساس این روش کاهش جذب نور در طول موج ۲۹۰ نانومتر است که ناشی از اکسید شدن آسکوربات است. جهت استخراج آنزیم، ۰/۱ گرم بافت پودر شده برگ در ۱ میلی لیتر «بافر استخراج» ریخته و بهم زده شد. عصاره حاصل به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴°C و با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و محلول شفاف بالائی که عصاره آنزیم تلقی می‌شود، به آرامی جدا شد. در هر دو کووت شاهد و کووت نمونه مقدار ۳ میلی لیتر بافر استخراج ریخته و به آن مقدار ۴/۵۱ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۳۰ درصد اضافه شد. ثبت تغییرات جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۲۹۰ نانومتر که بیانگر میزان اکسیداسیون و کاهش غلظت آسکوربات است، هر ۱۰ ثانیه و به مدت ۱۲۰ ثانیه انجام شد (Nakano & Asada, 1981; Zokaee Khosroshahi et al., 2023).

رابطه ۵:

$$\text{APX activity} = \frac{A_{290}(t_2) - A_{290}(t_1)}{t_2 - t_1} * \frac{Vt}{E * Vs}$$

آنزیم کاتالاز (CAT)

فعالیت آنزیم کاتالاز به روش (Bergmeyer, 1970) و براساس میزان ناپدید شدن آب اکسیژنه (H_2O_2) در طول موج ۲۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. جهت

تجزیه آماری

تجزیه آماری داده‌ها با نرم افزار آماری SAS 9.3 انجام شد. بعد از نرمال سازی داده ها تجزیه واریانس دوطرفه با دستورالعمل GLM و مقایسه میانگین ها با آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح ۰/۰۵ انجام شد. نمودارها با نرم افزار Excel 2013 رسم شد.

نتایج و بحث

نشت یونی

در گیاهان بدون تنش کادمیم بین تیمارهای استفاده شده و شاهد اختلاف معنی داری از لحاظ درصد نشت یونی مشاهده نشد. با این حال اعمال تنش کادمیم سبب افزایش درصد نشت یونی برگ در هر دو رقم انگور شد و بین تاک‌های تحت تنش کادمیم، تیمار هیدروکسی آپاتیت و شاهد از لحاظ درصد نشت یونی برگ اختلاف معنی داری مشاهده شد (جدول ۱). مقدار نشت یونی در رقم بیدانه سفید تحت تنش کادمیم تیمار شده با نانو هیدروکسی آپاتیت ۱٪ در مقایسه با گیاهان رشد

یافته در شرایط تنش کادمیم و بدون تیمار نانو هیدروکسی آپاتیت به میزان ۱۳/۵۳ درصد کاهش داشت و این شاخص در رقم پرلت به میزان ۱۴/۶۱ درصد نسبت به تاک‌های بدون تیمار تحت تنش کاهش یافت (جدول ۱). افزایش تجمع کادمیم در برگ منجر به ایجاد تنش اکسایشی و پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء می‌شود (Metcalf et al., 2022). این تغییرات منجر به اختلال در ویژگی نفوذ پذیری غشاء و نشت یون‌ها در فضای بین سلولی می‌شود. پیش تیمار نانو هیدروکسی آپاتیت با تأثیر بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و کاهش تنش اکسایشی و به دنبال آن حفظ یکپارچگی غشاء سبب کاهش اثرات تنش کادمیم در نشاءهای برنج شده است (Wu et al., 2024). قابلیت هیدروکسی آپاتیت در کاهش فراهمی کادمیم و زدودن رادیکال‌های آزاد منجر به پایداری بیشتر غشاء و کاهش نشت یونی در برگ تاک‌های تیمار شده با این ترکیب شده است که هم‌راستا با نتایج دیگر پژوهشگران است (Alhammad et al., 2023).

جدول ۱- اثر نانو هیدروکسی آپاتیت بر نشت یونی، مالون دی آلدئید و پراکسید هیدروژن برگ دو رقم انگور تحت تنش کادمیم

Table 1- The effect of nano hydroxyapatite (HAP) on leaf electrolyte leakage, malondialdehyde and hydrogen peroxide of content of two grapevine cultivars under cadmium (Cd) stress.

Grape cultivars	Treatments		Electrolyte leakage (%) [*]	Malondialdehyde ($\mu\text{mol g}^{-1}$ FW)	Hydrogen peroxide ($\mu\text{mol g}^{-1}$ FW)
	Cd (mg/kg)	HAP (%)			
Perlette	0	0	14.94c	0.37d	1.52c
		1	14.47c	0.36d	1.45cd
	100	0	56.04a	1.44a	3.76a
		1	47.85b	1.34b	3.37a
Bidane-Sefid	0	0	13.65c	0.35d	1.27cd
		1	12.84c	0.35d	1.17d
	100	0	54.17a	1.33b	3.03b
		1	46.84b	1.21c	2.48b

*میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون از لحاظ آماری (سطح ۵ درصد) اختلاف معنی داری ندارند.

*Means with common letters in each column do not have a statistically significant difference (5% level).

مالون دی آلدئید

با اعمال تنش کادمیم ۱۰۰ میلی گرم در کیلوگرم در هر دو رقم انگور، محتوای مالون دی آلدئید برگ افزایش پیدا کرد که این افزایش تحت تأثیر رقم و تیمار هیدروکسی آپاتیت قرار گرفت. به عبارت دیگر محتوای مالون دی آلدئید تاک‌های تیمار شده با هیدروکسی آپاتیت کمتر از تاک‌های بدون تیمار با این ترکیب تحت تنش کادمیم بود. همچنین محتوای مالون دی آلدئید برگ تاک‌های رقم بیدانه سفید تیمار شده با هیدروکسی آپاتیت تحت تنش کادمیم کمتر از دیگر تیمارها بود (جدول ۱). محتوای مالون دی آلدئید برگ در رقم بیدانه سفید و پرلیت تیمار شده با نانو هیدروکسی آپاتیت تحت تنش کادمیم در مقایسه با تاک‌های هر رقم بدون تیمار نانو هیدروکسی آپاتیت تحت تنش کادمیم به ترتیب ۹/۰۲ و ۶/۹۴ درصد کاهش نشان داد (جدول ۱). مطابق نتایج (Hussain et al., 2018)، نانوذرات اکسید روی نشأت با افزایش فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز به کاهش تولید و تجمع پراکسید هیدروژن در برگ گندم (*Triticum aestivum* L.) منجر شد. به عبارت دیگر، نانوذرات‌های هیدروکسی آپاتیت می‌توانند به طور موثری سمیت و غلظت کادمیم را در برگ کاهش داده و از تنش اکسایشی و تولید پراکسید هیدروژن جلوگیری کند (Alhammad et al., 2023).

پراکسید هیدروژن

در تاک‌های هر دو رقم انگور بیدانه سفید و پرلیت رشد داده شده در شرایط بدون تنش کادمیم بین تاک‌های تیمار شده با نانو هیدروکسی آپاتیت و

تاک‌های شاهد اختلاف معنی‌داری از لحاظ محتوای پراکسید هیدروژن مشاهده نشد (جدول ۱). با این حال، اعمال تنش کادمیم به افزایش محتوای پراکسید هیدروژن برگ در هر دو رقم انگور منجر شد. محتوای پراکسید هیدروژن برگ انگور رقم بیدانه سفید و پرلیت رشد یافته تحت شرایط تنش کادمیم + تیمار نانو هیدروکسی آپاتیت به ترتیب ۱۸/۱۵ و ۱۰/۳۷ درصد کمتر از تاک‌های تحت تنش بدون تیمار نانو هیدروکسی آپاتیت بود (جدول ۱).

در پژوهش Khan et al.، نتایج نشان دادند نانوذرات Fe_3O_4 با کاهش تجمع آرسنیک که از دانه‌رست‌های برنج در برابر تنش آرسنیک محافظت می‌کند، به عنوان یک جاذب نانو عمل کرده و جذب آرسنیک را در گیاهان برنج محدود می‌کند. در واقع کاربرد نانوذرات به کاهش محتوای H_2O_2 و مالون دی آلدئید منجر شد (Khan et al., 2022). همچنین Gohari et al. دریافتند کاربرد نانوذرات TiO_2 به طور قابل توجهی غلظت هیدروژن پراکسید را کاهش داد (Gohari et al., 2020). کاربرد تنش سرب در دانه‌رست‌های ذرت محتوای مالون دی آلدئید برگ را به میزان ۱۴۳ درصد نسبت به شاهد افزایش داد. از سوی دیگر، استفاده از نانو هیدروکسی آپاتیت به طور قابل توجهی (تا ۵۳٪) محتوای مالون دی آلدئید را کاهش داد که تأییدی بر یافته‌های پژوهش حاضر است.

تنش کادمیم با القای تنش اکسیداتیو موجب تخریب غشای سلولی، افزایش مقدار مالون دی-آلدئید و کاهش مقدار کلروفیل می‌شود که این موضوع با افزایش سنتز پرولین در شرایط تنش

ارتباط دارد. در بررسی اثر نانو هیدروکسی آپاتیت بر کاهش جذب کادمیم و اثرات آن بر سطح کلروفیل، مالون دی‌آلدئید و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی از جمله سوپراکسیداز دیسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز در خاک آلوده به کادمیم، مشخص شد نانو هیدروکسی آپاتیت می‌تواند سطح کلروفیل را افزایش داده و سطح مالون‌دی‌آلدئید را در اندام هوایی (برگ) گیاهان کاهش دهد. علاوه بر این، فعالیت‌های افزایشی سوپراکسیداز دیسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز را می‌توان پس از افزودن نانو هیدروکسی آپاتیت در خاک آلوده به کادمیم مشاهده کرد (Li & Huang, 2014).

کلروفیل (SPAD)

با افزایش سطح تنش کادمیم از صفر به ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم میزان SPAD به‌عنوان شاخص سنجش کلروفیل در تمامی تیمارها کاهش یافت. از سوی دیگر، در گیاهان تحت تنش کادمیم و نیز گیاهان رشد یافته در شرایط بدون تنش محتوای کلروفیل در تاک‌های تیمار شده با نانو هیدروکسی آپاتیت بیشتر از گیاهان شاهد بود. در گیاهان تحت تنش کادمیم بیشترین محتوای کلروفیل مربوط به رقم پیدانه سفید تیمار شده با ترکیب نانو هیدروکسی آپاتیت بود که در مقایسه با تاک‌های شاهد تحت تنش کادمیم تا ۱۰/۸۸ درصد بیشتر بود (جدول ۲).

نتایج پژوهش Akandi et al. بر روی گیاه خرفه (*Portulaca oleracea L.*) تحت تنش کادمیم که از نانو ذرات آهن در جهت کاهش میزان اثرات کادمیم در گیاه استفاده کردند نشان داد برخی از فاکتورهای رشد و غلظت کلروفیل به طور قابل توجهی در گیاه خرفه افزایش یافت (Akandi et al., 2020). همچنین Alhammad et al. اثر نانو هیدروکسی آپاتیت را بر کاهش تنش سرب در گیاه ذرت بررسی کردند و نشان دادند که تیمار نانو هیدروکسی آپاتیت به افزایش ۴۷ درصدی کلروفیل کل (SPAD) در مقایسه با نمونه‌های شاهد تحت تنش سرب شد (Alhammad et al., 2023)، که تأییدی بر یافته‌های پژوهش حاضر است. غلظت بالای فلزات سنگین در برگ‌های گیاه می‌تواند فتوسنتز را با ایجاد آسیب ساختاری، اختلال در سنتز کلروفیل، مسدود کردن انتقال الکترون و بستن روزنه‌ها برای کاهش جذب خالص CO₂ مختل کند (Alhammad et al., 2023). قابل درک است که نانو هیدروکسی آپاتیت‌ها می‌توانند حرکت و فراهمی زیستی کادمیم را در خاک کاهش دهند و در نتیجه می‌توانند منجر به کاهش جذب کادمیم توسط ریشه‌های گیاه شوند. علاوه بر این، نانو هیدروکسی آپاتیت‌ها پاک‌کننده‌های موثر فلزات سنگین از خاک نیز هستند، زیرا می‌توانند محتوای کلروفیل و سیستم آنتی‌اکسیدانی را در گیاهان افزایش دهند (He et al., 2017).

جدول ۲- اثر نانو هیدروکسی آپاتیت بر محتوای نسبی آب، شاخص کلروفیل (SPAD) و پرولین برگ دو رقم انگور تحت تنش کادمیم

Table 2- The effect of nano hydroxyapatite (HAP) on leaf relative water content (RWC), chlorophyll (SPAD) and proline content of two grapevine cultivars under cadmium (Cd) stress.

Treatments			SPAD	Proline ($\mu\text{mol g}^{-1}$ FW)	RWC (%)
Grape cultivars	Cd (mg/kg)	HAP (%)			
Perlette	0	0	9.62a	4.32d	80.60c
		1	7.68bc	4.32d	81.84bc
	100	0	5.98d	8.17c	64.94f
		1	6.42cd	10.06a	68.04e
Bidane-Sefid	0	0	10.32a	4.36d	82.48ab
		1	8.08b	4.45d	83.45a
	100	0	6.09d	8.66bc	68.53e
		1	6.71bcd	9.02b	71.45d

*میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون از لحاظ آماری (سطح ۵ درصد) اختلاف معنی‌داری ندارند.

*Means with common letters in each column do not have a statistically significant difference (5% level).

افزایش تولید ROS و تنش اکسیداتیو می‌شوند که به ماکرومولکول‌هایی مانند لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک آسیب می‌رسانند (Wani et al., 2018). در گیاه گندم افزایش غلظت کادمیم منجر به افزایش سطح پرولین، مالون‌دی‌آلدئید، پراکسید هیدروژن و افزایش فعالیت کاتالاز شد (Ur Rahman et al., 2021). بررسی اثر نانو هیدروکسی آپاتیت بر کاهش تنش سرب در گیاه ذرت نشان دادند سبب افزایش محتوای پرولین در مقایسه با نمونه‌های شاهد تحت تنش سرب شد (Alhammad et al., 2023).

محتوای نسبی آب

با افزایش تنش کادمیم محتوای نسبی آب در برگ تمامی تیمارها روند کاهشی نشان داد. با این تفاوت که در تاک‌های تیمار شده با نانو هیدروکسی آپاتیت میزان کاهش محتوای آب کمتر از تاک‌های شاهد بود. بیشترین محتوای آب در تاک‌های تحت تنش کادمیم مربوط به تیمار نانو هیدروکسی

اعمال تنش کادمیم (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) سبب افزایش محتوای پرولین در تمامی تاک‌ها شد و بیشترین محتوای پرولین مربوط به تاک‌های تیمار شده با باکتری به تنهایی بود (جدول ۲).

پرولین

با افزایش سطح تنش کادمیم از صفر به ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم محتوای پرولین در تمامی تیمارها افزایش یافت. با این حال در گیاهان تحت تنش کادمیم و نیز گیاهان رشد یافته در شرایط بدون تنش محتوای پرولین در تاک‌های تیمار شده با نانو هیدروکسی آپاتیت بیشتر از گیاهان شاهد بود. در گیاهان تحت تنش کادمیم بیشترین محتوای پرولین مربوط به رقم پرلت تیمار شده با ترکیب نانو هیدروکسی آپاتیت بود که در مقایسه با تاک‌های شاهد تحت تنش کادمیم تا ۱۸/۷۸ درصد بیشتر بود (جدول ۲). این مقدار در رقم بیدانه سفید ۳/۹۹ درصد افزایش نشان داد. نتایج پژوهش‌های مختلف نشان داده اند فلزات سنگین در گیاهان سبب

برگ در رقم بیدانه سفید و پرلیت تیمار شده تحت شرایط بدون تنش کادمیم و بدون تیمار در مقایسه با تاک‌های هر رقم بدون تیمار نانو هیدروکسی آپاتیت تحت تنش کادمیم به ترتیب ۷۲/۵ و ۷۰/۷ درصد افزایش نشان داد (جدول ۳) که حاکی از نقش تنظیم‌کنندگی قندهای محلول در گیاهان تحت تنش‌های محیطی از قبیل تنش کادمیم است. تجمع بیشتر قندهای محلول نشان‌دهنده کارکرد بهتر دستگاه فتوسنتزی در جهت تولید قند است که به علت تاثیر مثبت نانو هیدروکسی آپاتیت بر کاهش فراهمی و جذب کادمیم، دستگاه فتوسنتزی را از آسیب تنش این فلز سنگین محافظت نموده و با تولید بیشتر قند محلول منجر به بهبود تنظیم اسمزی در گیاهان تحت تنش کادمیم شده است.

فنول کل

بر اساس نتایج جدول ۳، کاربرد غلظت ۱۰۰ میلی-گرم در کیلوگرم کادمیم سبب افزایش محتوای فنول کل برگ در تاک‌های هر دو رقم انگور بیدانه سفید و پرلت شد. همچنین مشخص شد که تیمار نانو هیدروکسی آپاتیت تأثیر مثبتی بر بیوسنتز یا تجمع ترکیبات فنولی در تاک‌های هر دو رقم به ویژه تحت شرایط تنش کادمیم دارد (جدول ۳). مقدار فنول کل در رقم بیدانه سفید تحت تنش کادمیم با حضور نانو هیدروکسی آپاتیت در مقایسه با تاک‌های رشد یافته در شرایط تنش کادمیم و بدون حضور نانو هیدروکسی آپاتیت به میزان ۱۷/۴۵ درصد افزایش داشت و در رقم پرلت این مقدار ۲۹/۵۵ درصد افزایش نشان داد (جدول ۳).

آپاتیت در رقم بیدانه سفید بود که در مقایسه با محتوای آب نسبی برگ تاک‌های شاهد تحت تنش کادمیم ۴/۰۹ درصد بیشتر بود (جدول ۲). اثر نانوذرات مس، روی بر تعادل پرواکسیداتیو/آنتی‌اکسیداتیو و محتوای رنگدانه‌های فتوسنتزی و سطح برگ گیاهان گندم در شرایط تنش خشکی نشان داد این نانو ذرات با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان سبب کاهش سطح تجمع مواد واکنش‌دهنده تیوباربتوریک اسید (TBARS) و تثبیت محتوای رنگدانه‌های فتوسنتزی و افزایش محتوای نسبی آب در برگ‌ها شد (Taran et al., 2017). اثر مثبت هیدروکسی آپاتیت بر روابط آبی در ریشه گیاه و تنظیم اسمزی ایجاد شده در اثر تجمع بیشتر قندهای محلول و پرولین ضمن بهبود جذب آب منجر به افزایش محتوای نسبی آب در تاک‌های تیمار شده تحت تنش کادمیم شده است.

قند محلول

محتوای قند محلول برگ در هر دو رقم انگور تحت تنش کادمیم ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم افزایش پیدا کرد. افزایش قند محلول تحت تأثیر آثار رقم، کادمیم و تیمار هیدروکسی آپاتیت قرار گرفت، اما محتوای این محلول سازگار در تاک‌های تیمار شده با هیدروکسی آپاتیت اختلاف معنی‌داری با تاک‌های بدون تیمار با این ترکیب تحت تنش کادمیم نداشت (جدول ۳). در هر حال، محتوای قند محلول برگ تاک‌های رقم بیدانه سفید تیمار شده تحت تنش کادمیم بیشتر از رقم پرلت تحت تنش بود (جدول ۳). محتوای قند محلول

جدول ۳- اثر نانو هیدروکسی آپاتیت بر محتوای قند محلول، فنول کل و فلاونوئید کل برگ دو رقم انگور تحت تنش کادمیم
Table 3- The effect of nano hydroxyapatite (HAP) on leaf soluble sugar, total phenol and total flavonoids content of two grapevine cultivars under cadmium (Cd) stress.

Grape cultivars	Treatments		Soluble sugars (mg g ⁻¹ FW)	Total phenol (mg g ⁻¹ FW)	Total flavonoids (mg g ⁻¹ FW)
	Cd (mg/kg)	HAP (%)			
Perlette	0	0	11.18d	3.08c	1.17cd
		1	11.27d	3.24bc	1.20cd
	100	0	40.62b	2.17e	1.03d
		1	41.87b	3.08c	2.35a
Bidane-Sefid	0	0	13.36c	3.53b	1.26bc
		1	13.66c	4.07a	1.40b
	100	0	45.29a	2.65d	1.14cd
		1	45.66a	3.21bc	2.36a

*میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون از لحاظ آماری (سطح ۵ درصد) اختلاف معنی‌داری ندارند.

*Means with common letters in each column do not have a statistically significant difference (5% level).

فلاونوئید کل

محتوای فلاونوئید کل برگ در هر دو رقم انگور تحت تنش کادمیم ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم افزایش پیدا کرد. مقدار فلاونوئید کل برگ در رقم بیدانه سفید تحت تنش کادمیم با حضور نانو هیدروکسی آپاتیت در مقایسه با گیاهان رشد یافته در شرایط تنش کادمیم و بدون حضور نانو هیدروکسی آپاتیت ۵۱/۶۹ درصد افزایش نشان داد که این مقدار در رقم پرلت ۵۶/۱۷ درصد افزایش داشت (جدول ۳). (Awan et al., اثر نانو ذره اکسید روی را در گیاه کلم بروکلی (*Brassica oleracea* var *italica*) بررسی کردند و نشان دادند که سبب افزایش میزان کلروفیل، ترکیبات فنولی و قند محلول در گیاه در مقایسه با نمونه‌های شاهد شد (Awan et al., 2021). در واقع تجمع بیشتر فنول و فلاونوئید کل در تاک‌های تیمار شده با هیدروکسی آپاتیت به‌عنوان بخشی از سیستم آنتی‌اکسیدانی غیر آنزیمی است که با خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد اکسیژن از قبیل پراکسید هیدروژن منجر به کاهش

آسیب‌های اکسایشی ناشی از تنش کادمیم در گیاهان شده است.

پروتئین محلول

با اعمال تنش کادمیم ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم در هر دو رقم انگور، محتوای پروتئین محلول افزایش پیدا کرد که این افزایش تحت تأثیر رقم و تیمار هیدروکسی آپاتیت قرار گرفت. به عبارت دیگر محتوای پروتئین محلول تاک‌های تیمار شده با هیدروکسی آپاتیت بیشتر از تاک‌های بدون تیمار با این ترکیب تحت تنش کادمیم بود. همچنین محتوای پروتئین محلول تاک‌های رقم بیدانه سفید تیمار شده با هیدروکسی آپاتیت تحت تنش کادمیم بیشتر از دیگر تیمارها بود (شکل ۱). تجمع بیشتر پروتئین‌های محلول در تاک‌های تیمار شده با هیدروکسی آپاتیت نشان دهنده کارکرد بهتر این گیاهان در جلوگیری از تجمع کادمیم و حفظ ساختار پروتئین‌ها از آسیب ناشی از تنش اکسایشی است.

آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (کاتالاز، پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز)

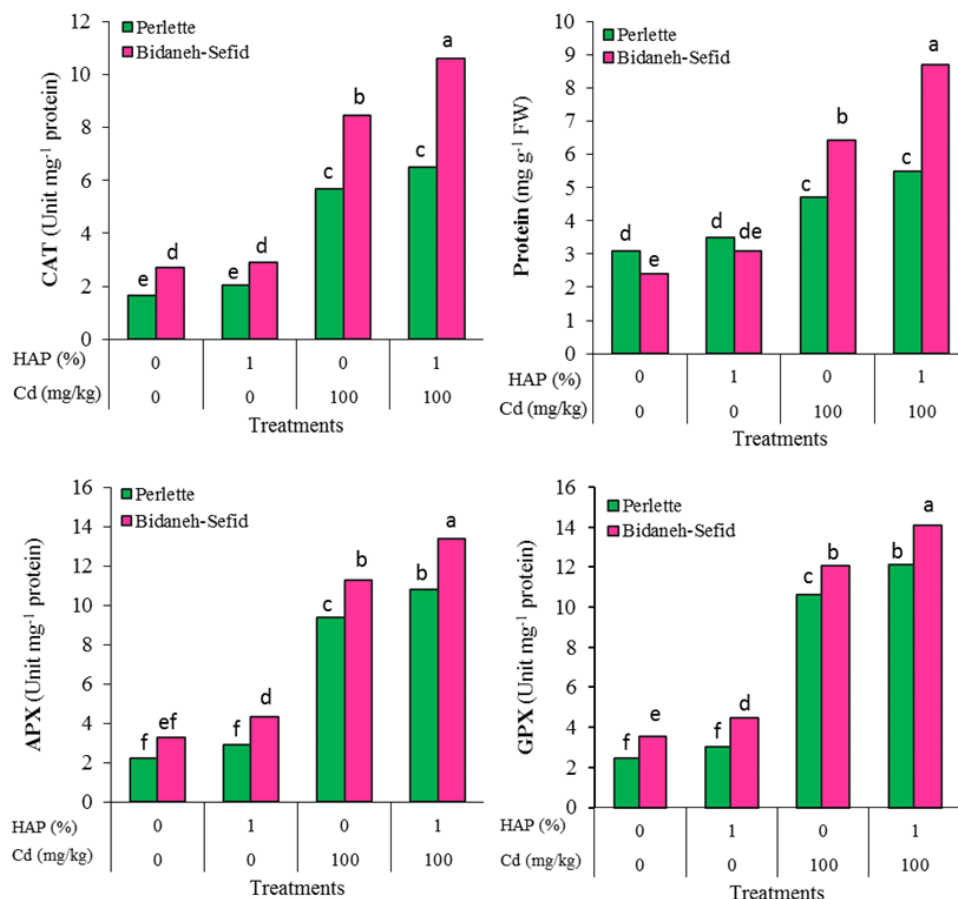
با افزایش سطح تنش کادمیم فعالیت آنزیم کاتالاز در تاک‌های تیمار شده با نانو هیدروکسی آپاتیت در مقایسه با دیگر تیمارها افزایش چشمگیری نشان داد به طوری که فعالیت آنزیم کاتالاز در رقم بیدانه سفید تیمار شده با نانو هیدروکسی آپاتیت ۱۹/۹۴ درصد بیشتر از فعالیت این آنزیم در مقایسه با این رقم تحت تنش کادمیم ولی بدون نانو هیدروکسی آپاتیت بود. این افزایش آنزیم کاتالاز در رقم پرلت ۱۲/۶۳ درصد مشاهده شد (شکل ۱). فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز برگ در هر دو رقم انگور بیدانه سفید و پرلت تحت تنش کادمیم ۱۰۰ میلی-گرم در کیلوگرم افزایش پیدا کرد. این افزایش در انگور رقم بیدانه سفید بیشتر از رقم پرلت بود. تیمار نانو هیدروکسی آپاتیت فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز برگ را در تاک‌های تحت تنش کادمیم در مقایسه با تاک‌های رشد یافته در شرایط تنش کادمیم بدون تیمار نانو هیدروکسی آپاتیت افزایش داد. افزایش فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز برگ در تاک‌های تیمار شده با این ترکیب تحت تنش کادمیم در رقم بیدانه سفید ۱۴/۴۷ درصد و در رقم پرلت ۱۲/۳۹ درصد بیشتر از تاک‌های شاهد تحت تنش کادمیم در هر دو رقم بود (شکل ۱). آنزیم آسکوربات پراکسیداز در گیاهان بدون تنش کادمیم بین تیمارهای استفاده شده و شاهد اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. اعمال تنش کادمیم سبب افزایش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز برگ در هر دو رقم انگور شد. در هر حال، در گیاهان تحت تنش کادمیم تیمارهای استفاده شده و شاهد از لحاظ فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز

اختلاف معنی‌داری داشتند. به عبارت دیگر تیمار نانو هیدروکسی آپاتیت سبب تحریک فعالیت این آنزیم در برگ تاک‌های تحت تنش کادمیم شد. بیشترین فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز مربوط به تاک‌های رقم بیدانه سفید تیمار شده با نانو هیدروکسی آپاتیت تحت تنش کادمیم بود (شکل ۱). افزایش فعالیت این آنزیم در برگ تاک‌های رقم بیدانه سفید تیمار شده با نانو هیدروکسی آپاتیت تحت تنش کادمیم ۱۵/۷۱ درصد و در رقم پرلت ۱۳/۰۴ درصد بود (شکل ۱).

گیاهان در شرایط تنش، از سیستم‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی متشکل از آنزیم‌هایی نظیر آسکوربات پراکسیداز و کاتالاز برای مهار تجمع بیش از حد رادیکال‌های آزاد استفاده می‌کنند (Bhat et al., 2019). فعالیت بیشتر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در برگ تاک‌های تیمار شده با هیدروکسی آپاتیت از این جهت است که به‌عنوان آنزیم‌های ضد رادیکال‌های آزاد اکسیژن، ضمن محافظت از درشت‌مولکول‌ها و غشاهای سلول، آسیب‌های ناشی از رادیکال‌های آزاد اکسیژن به وجود آمده در اثر تنش کادمیم را خنثی کند. پژوهش‌ها نشان دادند هیدروکسی آپاتیت می‌تواند به طور چشمگیری فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز را در گیاهان تحت تنش فلزات سنگین افزایش دهد. Alhammad et al. اثر نانو هیدروکسی آپاتیت را بر کاهش تنش سرب در گیاه ذرت بررسی کردند و نشان دادند که سبب افزایش میزان آنزیم‌های کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز در مقایسه با نمونه‌های شاهد تحت تنش سرب شد و سبب بهبود عملکرد آنزیم‌های آنتی

پراکسیداز، را می توان پس از افزودن نانوهیدروکسی آپاتیت در خاک آلوده به کادمیم مشاهده کرد (Li & Huang, 2014).

اکسیدانی نسبت به نمونه های بدون حضور نانو هیدروکسی آپاتیت شد (Alhammad et al., 2023). طبق پژوهش Li & Huang فعالیت های افزایشی سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و



شکل ۱- اثر نانو هیدروکسی آپاتیت بر محتوای پروتئین و فعالیت آنزیم های کاتالاز (CAT)، گایاکول پراکسیداز (GPX)، آسکوربات پراکسیداز (APX) برگ دو رقم انگور (بیدانه سفید و پرلت) تحت تنش کادمیم. میانگین های دارای حروف مشترک در هر ستون از لحاظ آماری (سطح ۵ درصد) اختلاف معنی داری ندارند.

Figure 1- The effect of nano hydroxyapatite on the protein content and activity of catalase (CAT), guaiacol peroxidase (GPX) and ascorbate peroxidase (APX) of the leaves of two grapevine cultivars (Bidaneh-Sefid and Perlette.) under cadmium (Cd) stress

را در نظر گرفت و همچنین می توان در ترکیب با مواد اصلاح کننده دیگر هم مورد استفاده قرار گیرد. علاوه بر این، نقش بالقوه نانو هیدروکسی آپاتیت در تثبیت فلزات سنگین خاک باید در شرایط مزرعه بلندمدت مورد پژوهش قرار گیرد. کاربرد کادمیم

نتیجه گیری کلی

استفاده از نانو هیدروکسی آپاتیت در خاک آلوده به فلزات سنگین به عنوان یک روش جدید برای کاهش اثرات آلودگی ناشی از فلزات سنگین می تواند مورد توجه قرار گیرد، البته باید مقدار آن

بیشتری دارد. می‌توان استفاده از نانو هیدروکسی آپاتیت را همراه با مواد دیگر مورد آزمایش قرار داد تا بتوان به اثرات بهتری در زمینه کنترل آلودگی و افزایش بهره‌وری محصولات دست یافت.

سپاسگزاری

بخشی از هزینه‌های این پژوهش از محل اعتبار پژوهشی بنیاد ملی علم ایران (۴۰۰۳۱۴۳) کد طرح صندوق تأمین شده است که به این وسیله از ایشان قدردانی می‌شود. همچنین از همکاران و کارشناسان محترم در آزمایشگاه‌های پژوهشی شیمی خاک و فیزیولوژی گیاهان باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه ملایر نیز کمال تشکر و قدردانی را داریم.

References

- Abbas, T., Rizwan, M., Ali, S., Zia-ur-Rehman, M., Qayyum, M. F., Abbas, F., Hannan, F., Rinklebe, J. & Ok, Y. S. (2017). Effect of biochar on cadmium bioavailability and uptake in wheat (*Triticum aestivum* L.) grown in a soil with aged contamination. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 140, 37-47. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.02.028>
- Adrees, M., Ali, S., Rizwan, M., Zia-ur-Rehman, M., Ibrahim, M., Abbas, F., Farid, M., Qayyum, M.F. & Irshad, M. K. (2015). Mechanisms of silicon-mediated alleviation of heavy metal toxicity in plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 119, 186-197. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.05.011>
- Alhammad, B. A., Ahmad, A., & Seleiman, M. F. (2023). Nano-hydroxyapatite and ZnO-NPs mitigate Pb stress in maize. *Agronomy*, 13(4), 1174. <https://doi.org/10.3390/agronomy13041174>
- Ali, B., Gill, R. A., Yang, S., Gill, M. B., Farooq, M. A., Liu, D., ... & Zhou, W. (2015). Regulation of cadmium-induced proteomic and metabolic changes by 5-aminolevulinic acid in leaves of *Brassica napus* L. *PLoS One*, 10(4), e0123328. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123328>
- Awan, S., Shahzadi, K., Javad, S., Tariq, A., Ahmad, A., & Ilyas, S. (2021). A preliminary study of influence of zinc oxide nanoparticles on growth parameters of *Brassica oleracea* var *italica*. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 20(1), 18-24. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2020.10.003>
- Baliardini, C., Meyer, C.-L., Salis, P., Saumitou-Laprade, P., & Verbruggen, N. (2015). cation exchanger cosegregates with cadmium tolerance in the metal hyperaccumulator *Arabidopsis halleri* and plays a role in limiting oxidative stress in *Arabidopsis* Spp. *Plant Physiology*, 169, 549-559. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01037>

سبب افزایش تجمع کادمیم در ارقام انگور شد. نانو هیدروکسی آپاتیت به‌عنوان یک راه‌حل برای خاک‌های آلوده و تخریب شده شناخته شده است. استفاده از نانو هیدروکسی آپاتیت با غلظت یک درصد در خاک آلوده به کادمیم در دو رقم انگور سبب افزایش در برخی شاخص‌های فیزیولوژیکی برگ از جمله کلروفیل و محتوای نسبی آب و فسفر شد. در کل رقم بیدانه سفید نسبت به رقم پرلت به اثرات نانو هیدروکسی آپاتیت بهتر واکنش نشان داد. کاربرد درست و علمی نانو هیدروکسی آپاتیت می‌تواند یک فناوری اقتصادی و مفید برای کاهش آلودگی خاک و حفظ کیفیت خاک باشد. استفاده از نانو هیدروکسی آپاتیت نیاز به پژوهش‌های

- Bates, L. S., Waldren, R. A., & Teare, I. D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, 39, 205-207. <https://doi.org/10.1007/BF00018060>
- Bergmeyer, N. (1970). Methoden der Enzymatischen Analyse. *Akademie*, Berlin, 1, 636-647.
- Bhat, J. A., Shivaraj, S. M., Singh, P., Navadagi, D. B., Tripathi, D. K., Dash, P. K., Solanke, A. U., Sonah, H., & Deshmukh, R. (2019) Role of silicon in mitigation of heavy metal stresses in crop plants. *Plants*, 8, 71. <https://doi.org/10.3390/plants8030071>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Chang, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M., & Chern, J. C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10(3). <https://doi.org/10.38212/2224-6614.2748>
- FAO (2018). *FAO Statistical Yearbook: World Food and Agriculture*. FAO.
- Feng, Y., Yang, J., Liu, W., Yan, Y & Wang, Y. (2021). Hydroxyapatite as a passivator for safe wheat production and its impacts on soil microbial communities in a Cd-contaminated alkaline soil. *Journal of Hazardous Materials* 404, 124005. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124005>
- Gohari, G., Mohammadi, A., Akbari, A., Panahirad, S., Dadpour, M. R., Fotopoulos, V., & Kimura, S. (2020). Titanium dioxide nanoparticles (TiO₂ NPs) promote growth and ameliorate salinity stress effects on essential oil profile and biochemical attributes of *Dracocephalum moldavica*. *Scientific Reports*, 10(1), 912. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57794-1>
- He, S., Yang, X., He, Z & Baligar, V.C. (2017). Morphological and physiological responses of plants to cadmium toxicity: a review. *Pedosphere* 27, 421-438. [https://doi:10.1016/s1002-0160\(17\)60339-4](https://doi:10.1016/s1002-0160(17)60339-4)
- Heath, R. L., & Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125(1), 189-198. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(68\)90654-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90654-1)
- Herzog, V., & Fahimi, H. D. (1973). A new sensitive colorimetric assay for peroxidase using 3,3'-diaminobenzidine as hydrogen donor. *Analytical Biochemistry*, 55(2), 554-562. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(73\)90144-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(73)90144-9)
- Hussain, A., Ali, S., Rizwan, M., ur Rehman, M. Z., Javed, M. R., Imran, M., Chatha, S.A.S., & Nazir, R. (2018). Zinc oxide nanoparticles alter the wheat physiological response and reduce the cadmium uptake by plants. *Environmental Pollution*, 242, 1518-1526. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.08.036>
- Irigoyen, J. J., Einerich, D. W., & Sánchez-Díaz, M. (1992). Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa (*Medicago sativa*) plants. *Physiologia Plantarum*, 84(1), 55-60. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1992.tb08764>
- Jafarhaddadian, E., Zoufan, P., & Shafiei, M. (2021) Effect of NaCl on Cd stress modulation, antioxidant system and Cd uptake and accumulation in *Malva parviflora* L. *Iranian Journal of Plant*

- Biology*, 12(4), 59-76. <https://doi.org/10.22108/IJPB.2021.122156.1204> [In Persian].
- Jalili, M., & Karimi, R. (2021) The effect of combined application of nitrogen, zinc and manganese on yield and fruit qualitative characteristics of grape. *Iranian Journal of Plant Biology*, 13(4), 33-56. <https://doi.org/10.22108/ijpb.2022.133403.1284> [In Persian].
- Juang, K. W., Ho, P. C., & Yu, C. H. (2012). Short-term effects of compost amendment on the fractionation of cadmium in soil and cadmium accumulation in rice plants. *Environmental Science and Pollution Research*, 19, 1696-1708. <https://doi.org/10.1007/s11356-011-0684-0>
- Kaya, C., Ashraf, M., Alyemini, M. N., & Ahmad, P. (2020). The role of nitrate reductase in brassinosteroid-induced endogenous nitric oxide generation to improve cadmium stress tolerance of pepper plants by upregulating the ascorbate-glutathione cycle. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 196, 110483. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110483>
- Kaya, C., Okant, M., Ugurlar, F., Alyemini, M. N., Ashraf, M., & Ahmad, P. (2019). Melatonin-mediated nitric oxide improves tolerance to cadmium toxicity by reducing oxidative stress in wheat plants. *Chemosphere*, 225, 627-638. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.03.026>
- Ke, W., Li, C., Zhu, F., Luo, X., Feng, J., Li, X., Jiang, Y., Wu, C., Hartley, W & Xue, S. (2023). Effect of potentially toxic elements on soil multifunctionality at a lead smelting site. *Journal of Hazard Materials*, 454, 131525. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.131525>
- Khan, S., Akhtar, N., Rehman, S. U., Shujah, S., Rha, E. S., & Jamil, M. (2022). *Bacillus subtilis* synthesized iron oxide nanoparticles (Fe₃O₄ NPs) induced metabolic and anti-oxidative response in rice (*Oryza sativa L.*) under arsenic stress. *Toxics*, 10(10), 618. <https://doi.org/10.3390/toxics10100618>
- Kottegoda, N., Sandaruwan, C., Priyadarshana, G., Siriwardhana, A., Rathnayake, U.A., Berugoda Arachchige, D.M., Kumarasinghe, A.R., Dahanayake, D., Karunaratne, V & Amaratunga, G.A.J. (2017). Urea-hydroxyapatite nanohybrids for slow release of nitrogen. *ACS Nano*, 11, 1214–1221. <https://doi.org/10.1021/acsnano.6b07781>
- Li, Z., & Huang, J. (2014). Effects of nanoparticle hydroxyapatite on growth and antioxidant system in pakchoi (*Brassica chinensis L.*) from cadmium-contaminated soil. *Journal of Nanomaterials*, (Special Issue). <https://doi.org/10.1155/2014/470962>
- Loreto, F., & Velikova, V. (2001). Isoprene produced by leaves protects the photosynthetic apparatus against ozone damage, quenches ozone products, and reduces lipid peroxidation of cellular membranes. *Journal of Plant Physiology*, 127(4), 1781-1787. <https://doi.org/10.1104/pp.010497>
- Mahdavi, S., Afkhami, A., & Jalali, M. (2015). Reducing leachability and bioavailability of soil heavy metals using modified and bare Al₂O₃ and ZnO nanoparticles. *Environmental Earth Sciences*, 73, 4347-4371. <https://doi.org/10.1007/s12665-014-3723-6>
- Mamut, A., Huang, J., Andom, O., Zhang, H., Zhang, N., Zhou, H., Lv, Y., & Li, Z. (2023). Stability of exogenous Cadmium in different vineyard soils and its effect on grape seedlings.

- Science of The Total Environment*, 895, 165118. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.165118>
- Manikandan, R., Ezhili, N., & Venkatachalam, P. (2016). Phosphorus supplementation alleviation of the cadmium-induced toxicity by modulating oxidative stress mechanisms in vetiver grass [*Chrysopogon zizanioides* (L.) Roberty]. *Journal of Environmental Engineering*, 142(9), C4016003. [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)EE.1943-7870.0001112](https://doi.org/10.1061/(ASCE)EE.1943-7870.0001112)
- Metcalf, N.B., & Olsson, M. (2022). How telomere dynamics are influenced by the balance between mitochondrial efficiency, reactive oxygen species production and DNA damage. *Molecular Ecology*, 31, 6040–6052. <https://doi.org/10.1111/mec.16150>
- Nakano, Y., & Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in Spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiology*, 22(5), 867-880. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076232>
- Nouri Akandi, Z., Makarian, H., Pirdashti, H., Reza, M., Amerian, M.B.F. & Ghanbary, M.A.T. (2020). Effect of some symbiotic fungi and iron nanoparticles on morphological and physiological traits of purslane (*Portulaca oleracea* L.) under cadmium stress. *Journal of Horticultural Plant Nutrition*, 3(1), 1-22. <https://doi.org/10.22070/hpn.2020.5242.1075> [In persian].
- Ran, J., Wang, D., Wang, C., Zhang, G., & Zhang, H. (2015). Heavy metal contents, distribution, and prediction in a regional soil-wheat system. *Science of The Total Environment*, 544, 422–431. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.11.105>
- Ritchie, S. W., Nguyen, H. T., & Holaday, A. S. (1990). Leaf water content and gas-exchange parameters of two wheat genotypes differing in drought resistance. *Crop Science*, 30(1), 105-111. <https://doi.org/10.2135/cropsci1990.0011183X003000010025>
- Rizwan, M., Ali, S., Abbas, T., Zia-ur-Rehman, M., Hannan, F., Keller, C., Al-Wabel, M.I., & Ok, Y.S. (2016). Cadmium minimization in wheat: a critical review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 130, 43-53. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.04.001>
- Rizwan, M., Ali, S., ur Rehman, M. Z., Adrees, M., Arshad, M., Qayyum, M. F., Ali, L., Hussain, A., Chatha, S.A.S., & Imran, M. (2019). Alleviation of cadmium accumulation in maize (*Zea mays* L.) by foliar spray of zinc oxide nanoparticles and biochar to contaminated soil. *Environmental Pollution*, 248, 358-367. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.02.031>
- Sairam, K., Dorababu, M., Goel, R., & Bhattacharya, S. (2002). Antidepressant activity of standardized extract of *Bacopa monniera* in experimental models of depression in rats. *Phytomedicine*, 9(3), 207-211. <https://doi.org/10.1078/0944-7113-00116>
- Seneviratne, M., Rajakaruna, N., Rizwan, M., Madawala, H., Ok, Y.S., & Vithanage, M. (2019). Heavy metal-induced oxidative stress on seed germination and seedling development: A critical review. *Environmental Geochemistry and Health*, 41, 1813–1831. <https://doi.org/10.1007/s10653-017-0005-8>
- Shaheen, S.M., & Rinklebe, J. (2015). Impact of emerging and low-cost alternative amendments on the (im)mobilization and phytoavailability

- of Cd and Pb in a contaminated floodplain soil. *Ecological Engineering*, 74, 319–326. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2014.10.024>
- Slinkard, K., & Singleton, V. L. (1977). Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28(1), 49-55. <https://doi.org/10.5344/ajev.1977.28.1.49>
- Song, W.E., Chen, S.B., Liu, J.F., Chen, L., Song, N.N., Li, N & Liu, B. (2015). Variation of Cd concentration in various rice cultivars and derivation of cadmium toxicity thresholds for paddy soil by species-sensitivity distribution. *Journal of Integrative Agriculture*, 14, 1845–1854. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(14\)60926-6](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(14)60926-6).
- Taran, N., Storozhenko, V., Svietlova, N., Batsmanova, L., Shvartau, V., & Kovalenko, M. (2017). Effect of zinc and copper nanoparticles on drought resistance of wheat seedlings. *Nanoscale Research Letters*, 12, 1-6. <https://doi.org/10.1186/s11671-017-1839-9>
- Tripathi, R., Gupta, R., Sahu, M., Srivastava, D., Das, A., Ambasta, R.K., Kumar, P. (2021). Free radical biology in neurological manifestations: Mechanisms to therapeutics interventions. *Environmental Science and Pollution Research*, 29, 62160–62207. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-16693-2>
- Ur Rahman, S., Xuebin, Q., Zhao, Z., Du, Z., Imtiaz, M., Mehmood, F., Hongfei, L., Hussain, B., & Ashraf, M. N. (2021). Alleviatory effects of silicon on the morphology, physiology, and antioxidative mechanisms of wheat (*Triticum aestivum L.*) roots under cadmium stress in acidic nutrient solutions. *Scientific Reports*, 11, 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80808-x>
- Ur Rehman, M. Z., Rizwan, M., Khalid, H., Ali, S., Naeem, A., Yousaf, B., Liu, G., Sabir, M., & Farooq, M. (2018). Farmyard manure alone and combined with immobilizing amendments reduced cadmium accumulation in wheat and rice grains grown in field irrigated with raw effluents. *Chemosphere*, 199, 468-476. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.02.030>
- Wani, W., Masoodi, K. Z., Zaid, A., Wani, S. H., Shah, F., Meena, V. S., Wani, S. A., & Mosa, K. A. (2018) Engineering plants for heavy metal stress tolerance. *Rendiconti Lincei Scienze Fisiche e Naturali*, 29, 709-723. <https://doi.org/10.1007/s12210-018-0702-y>
- Wu, H., Tong, J., Jiang, X., Wang, J., Zhang, H., Luo, Y., Pang, J., & Shi, J. (2024). More effective than direct contact: Nano hydroxyapatite pre-treatment regulates the growth and Cd uptake of rice (*Oryza sativa L.*) seedlings. *Journal of Hazardous Materials*, 463, 132889. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.132889>
- Ye, X.X., Wang, G.Z., Zhang, Y.X., & Zhao, H.J. (2018). Hydroxyapatite nanoparticles in root cells: reducing the mobility and toxicity of Pb in rice. *Environmental Science: Nano*, 5, 398–407. <https://doi.org/10.1039/C7EN00953D>
- Zeng, J., Li, C., Wang, J., Tang, L., Wu, C., & Xue, S. (2022). Pollution simulation and remediation strategy of a zinc smelting site based on multi-source information. *Journal of Hazardous Materials*, 433, 128774. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.128774>
- Zhang, Z., Li, M., Chen, W., Zhu, S., Liu, N., & Zhu, L. (2010). Immobilization of lead and cadmium from aqueous

solution and contaminated sediment using nano-hydroxyapatite.

Environmental Pollution, 158(2), 514–519.

<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.08.024>

Zhou, P., Zhang, P., He, M., Cao, Y., Adeel, M., Shakoor, N., Jiang, Y., Zhao, W., Li, Y., Li, M., Azeem, I., Jia, L., Rui, Y., Ma, X., & Lynch, I. (2023). Iron-based nanomaterials reduce cadmium toxicity in rice (*Oryza sativa* L.) by modulating phytohormones, phytochelatin,

cadmium transport genes and iron plaque formation. *Environmental Pollution*, 320, 121063. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.121063>

Zokaee Khosroshahi, M., Rouhollah Karimi, R., & Toranjian, A. (2023) Influence of soil application of natural zeolite and farmyard manure on physiological indices of Grapevine under drought stress. *Journal of Plant Biological Sciences*, 15(1), 65-84. <https://doi.org/10.22108/ijpb.2024.139739.1340>