

## نقش براسینواستروئید و سالیسیلیک اسید بر رشد و تجمع کادمیوم در اسفناج تحت شرایط تنش کادمیوم

کبری مقصودی<sup>۱\*</sup>، الهام اشرفی دهکردی<sup>۱</sup> و سید محمد مظلومی<sup>۲</sup>

۱- پژوهشگر مرکز تحقیقات تغذیه، دانشکده تغذیه و علوم غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، ایران

۲- دانشیار مرکز تحقیقات تغذیه، دانشکده تغذیه و علوم غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، ایران

\* نویسنده مسئول: k\_maghsoudi1982@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۸/۱۶ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۰/۲۴)

### چکیده

به منظور بررسی تأثیر پیش تیمار بذر و محلول پاشی بوته‌ها با سالیسیلیک اسید و براسینواستروئید بر رشد و تجمع کادمیوم در اسفناج تحت شرایط تنش کادمیوم، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در مرکز تحقیقات تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی شیراز در سال ۱۳۹۹ اجرا گردید. فاکتورهای آزمایش شامل سالیسیلیک اسید (صفر، ۰/۵ و ۰/۷۵ میلی‌مولار)، براسینواستروئید (صفر، ۰/۵ و ۰/۷۵ میکرو مولار) و تنش کادمیوم (صفر، ۳۰۰ و ۶۰۰ میکرو مولار) بودند. نتایج نشان داد تنش کادمیوم موجب افزایش میزان مالون دی‌آلدهید، پراکسید هیدروژن و نشت یونی و کاهش زیست‌توده گیاه گردید. فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، میزان کربوهیدرات‌ها و پرولین تحت تنش ۶۰۰ میکرو مولار کادمیوم افزایش یافت. کاربرد براسینواستروئید و سالیسیلیک اسید، در شرایط تنش ۶۰۰ میکرو مولار کادمیوم، باعث کاهش غلظت مالون دی‌آلدهید، پراکسید هیدروژن، نشت یونی و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مانند پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز شد و تأثیر کاربرد توأم این دو ماده بیشتر از کاربرد جداگانه هر کدام از آن‌ها بود. تحت تنش کادمیوم، کاربرد ۰/۵ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید، ۰/۷۵ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید، ۰/۵۰ میکرو مولار براسینواستروئید، ۰/۷۵ میکرو مولار براسینواستروئید، ۰/۵ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید + ۰/۵۰ میکرو مولار براسینواستروئید، ۰/۷۵ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید + ۰/۷۵ میکرو مولار براسینواستروئید، ۰/۷۵ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید + ۰/۷۵ میکرو مولار براسینواستروئید، ۰/۷۵ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید + ۰/۷۵ میکرو مولار براسینواستروئید، به ترتیب موجب کاهش ۱۲/۶۸، ۱۳/۶۸، ۱۳/۹۳، ۲۲/۱۳، ۲۵/۳۷، ۳۰/۰۹، ۳۰/۳۴ و ۴۵/۰۲ درصدی میزان کادمیوم در برگ گردید. همچنین اعمال این تیمارها به ترتیب موجب کاهش ۶/۵۳، ۱۰/۱۳، ۱۱/۷۶، ۱۸/۳۰، ۲۶/۳۰، ۳۲/۶۷، ۳۳/۳۴ و ۴۲/۸۱ درصدی کادمیوم در ریشه اسفناج شد. پیش تیمار بذر و محلول پاشی براسینواستروئید و سالیسیلیک اسید، تحمل گیاه را در برابر تنش کادمیوم، از طریق افزایش فعالیت سیستم آنتی‌اکسیدان و تجمع اسمولیت‌ها و بهبود پایداری غشا افزایش داد. نتایج این پژوهش نشانگر آن است که کاربرد توأم براسینواستروئید و سالیسیلیک اسید نسبت به کاربرد جداگانه کیفیت اسفناج را بهبود بخشید و تأثیر آن‌ها بیشتر از کاربرد هر کدام به تنهایی بود.

**واژه‌های کلیدی:** آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، اسمولیت‌ها، تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی.

## مقدمه

عناصر سنگین فلزات یا شبه‌فلزهای دارای اثرات مخرب زیست‌محیطی هستند (Khan & Gupta, 2018) که برخی از آن‌ها از جمله کادمیوم، نیترونیوم، برای گیاه ضروری نمی‌باشند، بلکه کاملاً سمی نیز هستند و به‌سرعت به‌وسیله سلول‌های گیاهی جذب می‌گردند. افزایش این عناصر در خاک، سبب انباشته شدن این فلزات در زنجیره غذایی و در نتیجه تأثیرات منفی بالقوه برای سلامتی انسان می‌گردد (Han et al., 2020). فلز سنگین کادمیوم به‌عنوان یک ماده سرطان‌زا، در ایجاد اغلب سرطان‌ها شناخته شده است (Han et al., 2020). کادمیوم در بدن انسان دارای طول عمر بالایی بوده و تجمع بیش از حد این فلز در بدن، بیماری‌های مختلفی از جمله تصلب شرایین، برونشیت، فشارخون بالا و نیز تخریب استخوان‌ها و کلیه‌ها را به همراه دارد (Han et al., 2020). علاوه بر این، فلز سمی کادمیوم از طریق مصرف بیش از حد نهاده‌های کشاورزی (سموم، کود و پساب)، به خاک کشاورزی وارد و از طریق گیاهان به بدن دام و انسان وارد می‌گردد و اثرات نامطلوب خود را ایجاد می‌کند (Ji et al., 2018). کادمیوم به‌علت سمیت زیاد و حلالیت بالا در آب، به‌عنوان یکی از مهمترین آلاینده‌ها محسوب می‌شود (Metwally et al., 2003).

در جذب فلزات توسط گیاه عوامل مختلفی اثرگذار است. از جمله این عوامل می‌توان به pH خاک، غلظت یونی محلول، میزان کلوئیدهای خاک و نوع آن‌ها و نیز میزان کاتیون فلزی و کاتیون‌های رقابت کننده فلز مورد نظر اشاره نمود. از طرفی، اگرچه یون‌های فلزی مختلف دارای سازوکارهای جذب متفاوت توسط گیاه هستند، ولی یون‌های با مکانیسم جذب مشابه می‌توانند در جذب با یکدیگر در رقابت باشند. نکته قابل‌تأمل دیگر این است که

در گونه‌های گیاهی توانایی جذب، تجمع و تحمل عناصر سنگین، متفاوت است (Bastosa et al., 2019). گیاهان می‌توانند بدون این‌که صدمه‌ای بینند مقادیر زیادی از عناصر سنگین را در خود تجمع دهند و اغلب غلظت‌های نسبتاً زیاد این عناصر در بخش‌های خوراکی گیاه تجمع یابد، بدون این‌که علائم بیماری و تأثیرگذاری در گیاه آشکار شود. تجمع این عناصر سنگین در گیاهان می‌تواند پتانسیل جذب این عناصر توسط انسان را افزایش دهد (Gupta et al., 2017).

سازمان بهداشت جهانی در سال ۲۰۰۴، حداکثر مقدار کادمیوم را در خاک‌های کشاورزی ۰/۲ میلی‌گرم در کیلوگرم در نظر گرفته است. دامنه میزان عنصر کادمیوم در گیاهان برحسب میلی‌گرم در کیلوگرم، ۰/۵ تا دو و در حالت سمیت، پنج تا هفت و به گزارش‌ها دیگر سه تا ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن خشک است. حد مجاز کادمیوم، در سبزی‌های برگی، سویا و قارچ‌های خوراکی ۰/۲ و در سبزی‌های ریشه‌ای ۰/۱ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن تر است (Gupta et al., 2017). در همین زمینه، گزارش شده است در جنوب پالایشگاه تهران، غلظت عناصر سنگین از جمله کادمیوم در سبزی‌ها بیش از حد مجاز می‌باشد (Kazemzadeh Khoei et al., 2012). همچنین نتایج تحقیقات حاکی از آن است که در استان اصفهان، محصولات کشاورزی (کاهو، کلم، پیاز و چغندر) دارای کادمیوم بیش از حد مجاز و استاندارد هستند (Mohajer et al., 2014).

در کشور ایران، سطح وسیعی از سبزیجات و صیفی‌جات با پساب آبیاری می‌شوند و در بیشتر موارد استفاده غیراصولی از پساب، تجمع فلزات سنگین در خاک و در نتیجه در محصولات تولیدی را به همراه دارد (Beigi Herchegani & Bani, Talebi, 2013). در همین راستا گزارش شده است

(Maghsoudi *et al.*, 2019a) و نیز کاهش قابل ملاحظه غلظت کادمیوم در دانه برنج (*Oryza sativa*) (Majumdar *et al.*, 2020) و غلظت کادمیوم در ریشه و برگ (*Lemna minor*) (Lu *et al.*, 2018) داشته است. در همین راستا گزارش شده است سالیسیلیک اسید باعث کاهش معنی دار غلظت کادمیوم در اندام هوایی گیاهچه‌های سویا (*Glycine max*)، شاهدانه (*Cannabis sativa*)، یونجه (*Medicago sativa*) و نیز کلم چینی (*Brassica oleracea*) گردید (Amoo Aghaei *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2003; Drazic *et al.*, 2006; Xiong & Qiu, 2007). اگرچه نتایج برخی تحقیق‌ها حاکی از آن است که استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد سالیسیلیک اسید و براسینواستروئید که منشأ طبیعی و سازگار با محیط‌زیست هستند، تأثیر قابل توجهی در کاهش تجمع عناصر سنگین در اندام‌های مختلف گیاهان دارند (Amoo Aghaei *et al.*, 2013; Drazic *et al.*, 2006; Xiong & Qiu, 2007). اما استفاده ترکیبی از این هورمون‌های گیاهی و نیز کاربرد این هورمون‌ها در گیاه اسفناج (*Spinacia oleracea*) (L. به‌عنوان یک سبزی برگی پرمصرف، کمتر گزارش شده است. بر اساس مطالب ارائه شده مشخص می‌گردد که مشکل سمیت فلز سنگین کادمیوم، در بسیاری از مناطق کشور ایران وجود دارد؛ بنابراین بررسی راهکاری برای کاهش تجمع این فلز سنگین در محصولات کشاورزی ضروری به نظر می‌رسد. با توجه به این‌که بحث سمیت عناصر سنگین در محصولات کشاورزی در ارتباط تنگاتنگ با سطح سلامت افراد جامعه می‌باشد، در این پژوهش تأثیر کاربرد سالیسیلیک اسید و براسینواستروئید بر کاهش میزان سمیت و تجمع عنصر سنگین کادمیوم در اسفناج، مورد بررسی قرار گرفت.

غلظت عناصر سنگین سرب، کادمیوم، مس، کروم در گندم (*Triticum aestivum* L.) و ذرت (*Zea mays*) که در مزرعه‌ای در شهرکرد (طاقانک) که به مدت ۲۳ سال با پساب شهری آبیاری شده بود، بیشتر از حد مجاز بود (Beigi Herchegani & Bani Talebi, 2013).

براسینواستروئیدها هورمون‌های استروئیدی هستند که در مقادیر بسیار کم در گیاهان وجود داشته و در تنظیم رشد و نمو گیاه نقش دارند. اغلب بافت‌های رویشی جوان و در حال رشد نسبت به بافت‌های بالغ حاوی مقادیر بیشتری از این ماده، هستند (Hayat *et al.*, 2007). گزارش‌ها حاکی از آن است که براسینواستروئید تحمل گیاهان را در برابر تنش‌های محیطی از جمله تنش فلزات سنگین افزایش می‌دهند (Amorim-Silva *et al.*, 2019; Nolan *et al.*, 2019). در همین راستا تأثیر مثبت براسینواستروئید در کاهش تجمع آرسنیک در گندم و کاهش تجمع کادمیوم در کلزا (*Brassica napus*)، فلفل (*Piper nigrum*) و گوجه‌فرنگی (*Solanum lycopersicum*) گزارش شده است (Maghsoudi *et al.*, 2019a; Hasan *et al.*, 2011; Kaya *et al.*, 2020; Hayat *et al.*, 2007; Sanjari *et al.*, 2019).

سالیسیلیک اسید نیز یک ترکیب فنولی است و با داشتن خاصیت آنتی‌اکسیدانی در تنظیم فرآیندهای فیزیولوژیکی گیاهان نقش دارد. سالیسیلیک اسید به‌عنوان یک مولکول پیام‌رسان مهم در پاسخ‌های گیاه به تنش‌های متعددی زیستی و غیرزیستی از جمله تنش فلزات سنگین شناخته شده است (Maghsoudi *et al.*, 2019b; Maghsoudi *et al.*, 2018; Hasan *et al.*, 2006; Drazic *et al.*, 2011). گزارش شده است کاربرد سالیسیلیک اسید کاهش معنی دار تجمع آرسنیک در ریشه، برگ و دانه گندم

## مواد و روش‌ها

به‌منظور بررسی تأثیر کاربرد تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی سالیسیلیک اسید و براسینواستروئید بر میزان تجمع فلز سنگین کادمیوم در اسفناج رشد یافته تحت سطوح مختلف این فلز، آزمایشی گلخانه‌ای در سال ۱۳۹۹، در مرکز تحقیقات تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، اجرا گردید. آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار بود. تیمارهای آزمایشی شامل کادمیوم (صفر، ۳۰۰ و ۶۰۰ میکرو مولار)، سالیسیلیک اسید (صفر، ۰/۵ و ۰/۷۵ میلی‌مولار) و براسینواستروئید (صفر، ۰/۵ و ۰/۷۵ میکرو مولار) بودند.

ابتدا به‌صورت تصادفی نمونه خاکی از عمق ۳۰ سانتی‌متری خاک مزرعه غیرآلوده به فلزات سنگین، تهیه و آنالیز گردید. نتایج آنالیز خاک (pH حدود ۷/۳۶، هدایت الکتریکی برابر با ۰/۴۱ دسی‌زیمنس بر متر و غلظت کادمیوم ۰/۱۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک) نشان داد این خاک از نظر فلز سنگین کادمیوم، فاقد آلودگی بوده و مقدار این عنصر کمتر از حد بحرانی بود. از نمک کلرید کادمیوم ( $CdCl_2$ )، برای اعمال تیمار فلز سنگین کادمیوم استفاده شد. خاک به طریق پاشش محلول نمک‌های فلزی مورد نظر به لایه‌های خاک، آلوده گردید و سپس به‌منظور این‌که تا حد امکان برهمکنش‌های آلاینده و خاک تکوین یافته و شرایط آلودگی طبیعی‌تر شود، خاک آلوده تا حد ظرفیت زراعی آبیاری شد. به‌منظور اطمینان از تعادل فلز با خاک، خاک آلوده شده یک ماه در این حالت نگهداری گردید.

بذر اسفناج رقم هادسون از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه و با غلظت‌های مختلف محلول‌های سالیسیلیک اسید (صفر، ۰/۵ و ۰/۷۵ میلی‌مولار) و براسینواستروئید (صفر، ۰/۵ و ۰/۷۵ میکرو مولار)،

به‌مدت ۱۲ ساعت و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد پیش‌تیمار شدند.

گلدان‌های چهار کیلوگرمی با خاک آلوده شده با غلظت‌های مختلف کادمیوم، پر شدند و سپس بذره‌های پیش‌تیمار شده در آن‌ها کشت گردید. از ابتدای کاشت تا انتهای آزمایش، گلدان‌ها با آب معمولی و تا حد ظرفیت زراعی آبیاری شدند. پس از سبز شدن و استقرار بوته‌های اسفناج، بوته‌ها با غلظت‌های ذکر شده سالیسیلیک اسید و براسینواستروئید محلول‌پاشی شدند. همچنین به‌طور هم‌زمان گیاهان شاهد نیز با آب مقطر تیمار شدند. جهت اطمینان از جذب هورمون‌ها توسط برگ، عمل محلول‌پاشی در دو روز متوالی تکرار شد. لازم به ذکر است بر اساس این‌که بذور با چه ترکیب هورمونی پیش‌تیمار شده بودند، بوته‌ها نیز دقیقاً با همان ترکیب هورمونی محلول‌پاشی شدند؛ بنابراین، هیچ‌گونه تداخلی در تیمارهای آزمایشی در مرحله پیش‌تیمار بذر و در مرحله محلول‌پاشی بوته‌ها صورت نگرفت.

دو ماه بعد از کاشت، نمونه‌برداری جهت اندازه‌گیری غلظت کادمیوم و نیز سایر پارامترهای فیزیولوژیکی صورت گرفت. جهت هضم اسیدی نمونه‌ها و اندازه‌گیری غلظت کادمیوم در ریشه و برگ، در ابتدا نمونه‌های گیاهی در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد در دستگاه آون به‌مدت ۷۲ ساعت خشک شدند. سپس ۰/۲۵ گرم بافت خشک با پنج میلی‌لیتر اسید نیتریک غلیظ ۶۵ درصد حاوی اسید کلریدریک غلیظ در لوله آزمایش پیرکس مخلوط و به‌مدت ۲۴ ساعت گذاشته شد. پس از این مدت لوله‌های مورد نظر به‌مدت یک تا سه ساعت حرارت داده شد تا بخارات اسیدی زرد رنگ از لوله‌ها خارج و محلول اسیدی شفاف و سفید رنگ به‌دست آمد. در ادامه به هر لوله ۱۵ میلی‌لیتر آب دیونیزه اضافه شد و محتوی هر لوله با استفاده از کاغذ صافی

EC برحسب درصد و بر اساس رابطه ۱ محاسبه شد (Sullivan & Ross, 1979):

$$\text{EL (\%)} = (C1/C2) \times 100 \quad \text{رابطه (۱)}$$

جهت سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز در ۲۴۰ نانومتر (Dhindsa *et al.*, 1981)، مخلوط واکنش شامل بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی مولار و پراکسید هیدروژن ۱۵ میلی مولار بود و با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی به آن، واکنش شروع شد. فعالیت آنزیم به صورت واحد آنزیمی بر حسب مقدار پروتئین کل موجود در ۱۰۰ میکرولیتر عصاره، در یک دقیقه محاسبه گردید. برای بررسی فعالیت آنزیم پراکسیداز در ۴۷۰ نانومتر، مخلوط واکنش شامل بافر فسفات ۵۰ میلی مولار، پراکسید هیدروژن و گایاکول بود و واکنش با افزودن ۲۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی به آن آغاز گردید. میزان جذب تراگایاکول در ۴۷۰ نانومتر در لحظه شروع واکنش پس از اضافه نمودن عصاره آنزیمی و پس از یک دقیقه خوانده شد. فعالیت آنزیم بر حسب واحد آنزیم در مقدار پروتئین کل موجود در ۲۰ میکرولیتر عصاره، گزارش شد (Bradford, 1976). برای سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، مخلوط واکنش نمونه‌ها شامل بافر فسفات ۵۰ میلی مولار، NBT ۰/۰۷۵ میکرو مولار، ۰/۱ میلی مولار Na-EDTA، ۷۵ میکرومولار ریبوفلاوین، ۱۳ میلی مولار متیونین و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود و با روشن شدن لامپ فلورسنت، واکنش در این عصاره‌ها شروع شد. میزان جذب کنترل در ۵۶۰ نانومتر نشان‌دهنده ۱۰۰ درصد احیای نوری NBT و نیمی از آن معادل یک واحد آنزیمی می‌باشد. اختلاف جذب نمونه‌ها و کنترل در ۵۶۰ نانومتر نشان‌دهنده مهار احیاء نوری NBT در حضور آنزیم SOD موجود در نمونه می‌باشد. با استفاده از این اختلاف جذب، واحد آنزیمی محاسبه

واتمن شماره یک صاف گردید. در نهایت با استفاده از یک بالن ژوژه ۲۵ میلی لیتر، حجم نهایی محلول با استفاده از آب دیونیزه به ۲۵ میلی لیتر رسانیده شد. غلظت فلز کادمیوم این محلول با استفاده از دستگاه جذب اتمی (مدل AA 240- varian) قرائت شد (Page *et al.*, 1982).

جهت سنجش کربوهیدرات‌ها حدود ۰/۰۲ گرم بافت برگ با ۱۰ میلی لیتر آب مقطر سائیده و حرارت داده شد. به دو میلی لیتر از هر یک از عصاره‌های حاصل، دو میلی لیتر محلول سولفات مس اضافه و ۲۰ دقیقه در حمام گرم قرار گرفتند. پس از سرد شدن، دو میلی لیتر محلول فسفومولیبیدیک اسید به آن‌ها اضافه شد. شدت جذب محلول‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل Cary50 Varian) تعیین و با استفاده از منحنی استاندارد غلظت قندهای احیا کننده محاسبه گردید (Zhang *et al.*, 2006). سنجش پروتئین مطابق روش Bradford (۱۹۷۶) اندازه‌گیری شد. سنجش پراکسید هیدروژن با استفاده از روش Velikova و همکاران (۲۰۰۰) انجام شد. سنجش مقدار پراکسیداسیون لیپیدهای غشا، غلظت مالون دآلدئید بر اساس روش Heath و Packer (۱۹۷۳) اندازه‌گیری شد.

به منظور اندازه‌گیری نشت یونی برگ‌ها، نمونه‌ها ابتدا با آب مقطر شسته و در لوله‌های درب‌دار قرار گرفتند سپس ۲۰ میلی لیتر آب مقطر به آن‌ها اضافه و در شرایط دمایی ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت، بر روی شیکر دورانی گذاشته شدند و در نهایت هدایت الکتریکی محلول (C<sub>1</sub>) اندازه‌گیری گردید. سپس نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در اتوکلاو در دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و مجدداً هدایت الکتریکی آن‌ها (C<sub>2</sub>) اندازه‌گیری شد.

براسینواستروئید ۰/۵۰ میکرو مولار و نیز ۰/۷۵ میلی مولار سالیسیلیک اسید+ براسینواستروئید ۰/۷۵ میکرو مولار، به ترتیب موجب کاهش ۱۲/۶۸، ۱۳/۶۸، ۱۳/۹۳، ۲۲/۱۳، ۲۵/۳۷، ۳۰/۰۹، ۳۰/۳۴ و ۴۵/۰۲ درصدی غلظت کادمیوم در برگ اسفناج در مقایسه با عدم کاربرد این هورمون‌ها شد (جدول ۱). همچنین اعمال این تیمارها به ترتیب موجب کاهش ۶/۵۳، ۱۰/۱۳، ۱۱/۷۶، ۱۸/۳۰، ۲۶/۳۰، ۳۲/۶۷، ۳۳/۳۴ و ۴۲/۸۱ درصدی غلظت کادمیوم در ریشه گیاه، گردید (جدول ۱). در پژوهش حاضر نقش قابل ملاحظه‌تر کاربرد توأم هورمون‌های براسینواستروئید و سالیسیلیک اسید در کاهش تجمع کادمیوم در ریشه و برگ گیاه اسفناج، در مقایسه با کاربرد جداگانه این هورمون‌ها کاملاً مشهود بود (جدول ۱).

در همین راستا، نتایج تحقیقات حاکی از آن است که کاربرد سالیسیلیک اسید موجب کاهش غلظت کادمیوم در گیاهچه‌های یونجه گردید (Drazic et al., 2006). کادمیوم معمولاً ابتدا در ریشه‌ها تجمع می‌یابد، چون ریشه نخستین اندامی است که در معرض فلزات سنگین در خاک قرار می‌گیرد، با این وجود به بخش هوایی نیز منتقل می‌شود (Metwally et al., 2003). همچنین گزارش شده است که سالیسیلیک اسید باعث کاهش معنی‌دار غلظت کادمیوم در اندام هوایی گیاهچه‌های سویا گردید (Amoo Aghaei et al., 2013). سالیسیلیک اسید باعث کاهش جذب کادمیوم در شاهدانه و در نتیجه کاهش سمیت کادمیوم در این گیاه گردید (Yang et al., 2003). تحمل به فلزات سنگین از طریق مکانیسم‌هایی که منجر به میزان پایین‌تر کادمیوم سیتوپلاسمی می‌شود، از جمله انحصار و نگهداشتن انتخابی کادمیوم در ریشه و نیز جذب پایین‌تر یا خروج فعال

و فعالیت آنزیمی بر حسب واحد آنزیم در مقدار پروتئین در ۵۰ میکرولیتر عصاره بیان گردید (Bradford, 1976). برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز مخلوط واکنش شامل بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مول، آسکوربات ۰/۵ میلی‌مولار،  $H_2O_2$  ۰/۱۵ میلی‌مولار، EDTA ۰/۱ میلی‌مولار و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. به دنبال اکسید شدن آسکوربات با شروع واکنش آنزیمی، کاهش جذب در ۲۹۰ نانومتر، دو دقیقه پس از شروع واکنش نسبت به زمان شروع واکنش محاسبه شد. با استفاده از تغییرات جذب در طول موج ۲۹۰ نانومتر، میزان آسکوربات بر جای مانده پس از دو دقیقه انجام واکنش آنزیمی محاسبه شد. فعالیت آنزیم بر حسب واحد آنزیم در مقدار پروتئین کل موجود در ۵۰ میکرولیتر عصاره، گزارش شد (Bradford, 1976).

در نهایت تجزیه واریانس داده‌ها با نرم‌افزار آماری SAS (نسخه ۹/۲) انجام و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد صورت گرفت.

## نتایج و بحث

نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر نشان داد به طور کلی غلظت کادمیوم در ریشه اسفناج بیشتر از برگ این گیاه بود (جدول ۱). تحت شرایط تنش کادمیوم ۶۰۰ میکرو مولار، پیش تیمار بذر اسفناج و نیز محلول پاشی بوته‌های این گیاه با ۰/۵ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید، ۰/۷۵ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید، ۰/۵۰ میکرو مولار براسینواستروئید، ۰/۷۵ میکرو مولار براسینواستروئید، سالیسیلیک ۰/۵ میلی‌مولار+ براسینواستروئید ۰/۵۰ میکرو مولار، سالیسیلیک ۰/۵ میلی‌مولار+ براسینواستروئید ۰/۷۵ میکرو مولار، ۰/۷۵ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید+

از ریشه‌ها، حاصل می‌گردد (Hall, 2002). اگرچه سالیسیلیک اسید در نمو و پیشرفت علائم تنش شرکت می‌کند، این هورمون برای فرآیند سازش و القای تحمل به تنش نیز مورد نیاز است. اکثر تنش‌های غیرزیستی غلظت سالیسیلیک اسید گیاه را افزایش می‌دهند که به نقش آن در پیام‌رسانی تنش اشاره دارد (Popova et al., 2008). در همین راستا کاهش غلظت کادمیوم در گیاهچه جو (*Hordeum vulgare* L.) تحت تأثیر کاربرد سالیسیلیک اسید گزارش شده است (Metwally et al., 2003). یکی از مکانیسم‌های حفاظتی هورمون‌های گیاهی در گیاهان تحت تنش فلز سنگین، کنترل جذب و انتقال فلز سنگین از طریق ریشه است (Hall, 2002). در همین راستا تأثیر مثبت براسینواستروئیدها در کاهش جذب و تجمع کادمیوم در گیاه کلزا گزارش شده است (Hayat et al., 2007). همچنین نتایج تحقیقات دیگر حاکی از کاهش اثرات سوء کادمیوم و نیز کاهش غلظت آن در گیاه گوجه‌فرنگی، در اثر استفاده از براسینواستروئید می‌باشد (Hasan et al., 2011).

از ریشه‌ها، حاصل می‌گردد (Hall, 2002). اگرچه سالیسیلیک اسید در نمو و پیشرفت علائم تنش شرکت می‌کند، این هورمون برای فرآیند سازش و القای تحمل به تنش نیز مورد نیاز است. اکثر تنش‌های غیرزیستی غلظت سالیسیلیک اسید گیاه را افزایش می‌دهند که به نقش آن در پیام‌رسانی تنش اشاره دارد (Popova et al., 2008). در همین راستا کاهش غلظت کادمیوم در گیاهچه جو (*Hordeum vulgare* L.) تحت تأثیر کاربرد سالیسیلیک اسید گزارش شده است (Metwally et al., 2003).

جدول ۱- تأثیر سالیسیلیک اسید و براسینواستروئید بر مقدار کادمیوم در برگ و ریشه اسفناج تحت تنش کادمیوم ۶۰۰ میکرو مولار

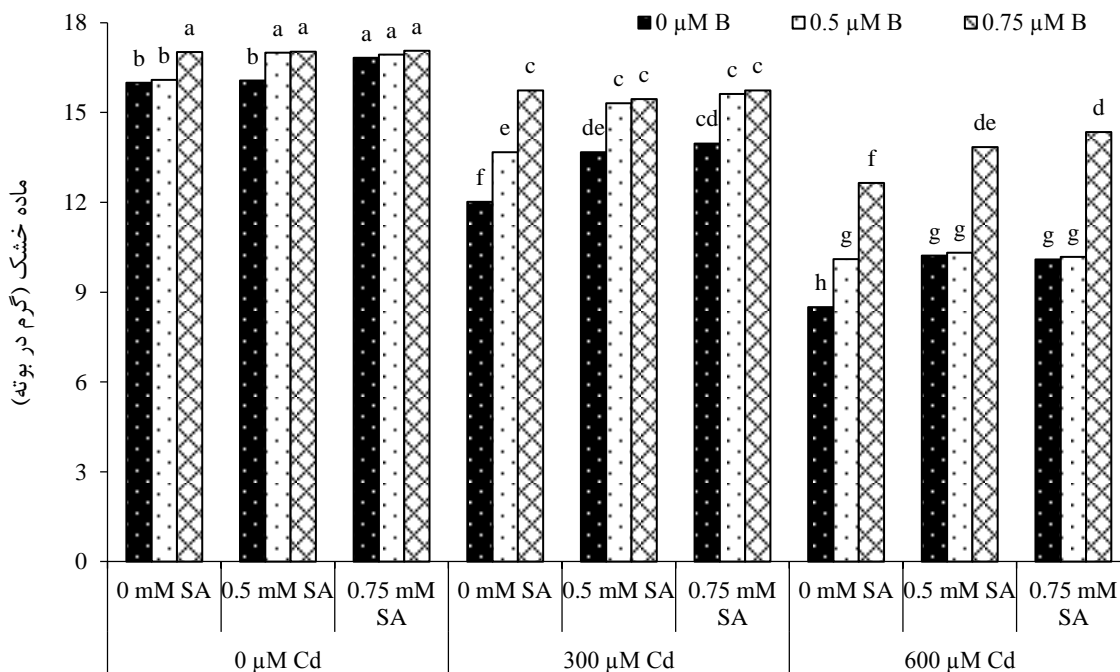
ریشه	برگ	تیمارها
۶/۱۲ <sup>a</sup>	۴/۲۰ <sup>a</sup>	۶۰۰ میکرو مولار کادمیوم
۵/۷۲ <sup>b</sup>	۳/۵۱ <sup>b</sup>	۰/۵ میلی مولار سالیسیلیک اسید
۵/۵۰ <sup>b</sup>	۳/۴۷ <sup>b</sup>	۰/۷۵ میلی مولار سالیسیلیک اسید
۵/۴۰ <sup>b</sup>	۳/۴۶ <sup>b</sup>	۰/۵ میکرو مولار براسینواستروئید
۵/۰۰ <sup>c</sup>	۳/۱۳ <sup>c</sup>	۰/۷۵ میکرو مولار براسینواستروئید
۴/۵۱ <sup>a</sup>	۳/۰۰ <sup>c</sup>	۰/۵ میلی مولار سالیسیلیک اسید + ۰/۵ میکرو مولار براسینواستروئید
۴/۱۲ <sup>a</sup>	۲/۸۱ <sup>d</sup>	۰/۷۵ میلی مولار سالیسیلیک اسید + ۰/۷۵ میکرو مولار براسینواستروئید
۴/۰۸ <sup>a</sup>	۲/۸۰ <sup>d</sup>	۰/۷۵ میلی مولار سالیسیلیک اسید + ۰/۵ میکرو مولار براسینواستروئید
۳/۵۰ <sup>a</sup>	۲/۲۱ <sup>e</sup>	۰/۷۵ میلی مولار سالیسیلیک اسید + ۰/۷۵ میکرو مولار براسینواستروئید

برای هر صفت، حروف مشترک نشان دهنده عدم وجود تفاوت معنی‌دار در سطح پنج درصد بر اساس آزمون دانکن می‌باشد.

مقایسه با گیاهان بدون تیمار گردید و بیشترین تأثیر مثبت مربوط به تیمار ۰/۷۵ میکرو مولار براسینواستروئید + سالیسیلیک اسید بود (شکل ۱). نتایج به‌دست آمده از پژوهش حاضر نشان داد در هر دو سطح تنش کادمیوم، با اختلاف آماری معنی‌داری با هم‌دیگر، مقدار پرولین برگ افزایش یافت. اگرچه کاربرد هورمون‌های رشد گیاهی تحت شرایط عدم تنش کادمیوم، هیچ گونه تأثیر قابل‌ملاحظه‌ای بر میزان پرولین برگ اسفناج نداشت، اما تحت شرایط تنش، گیاهان تیمار شده با هورمون‌های رشد گیاهی در مقایسه با گیاهان بدون

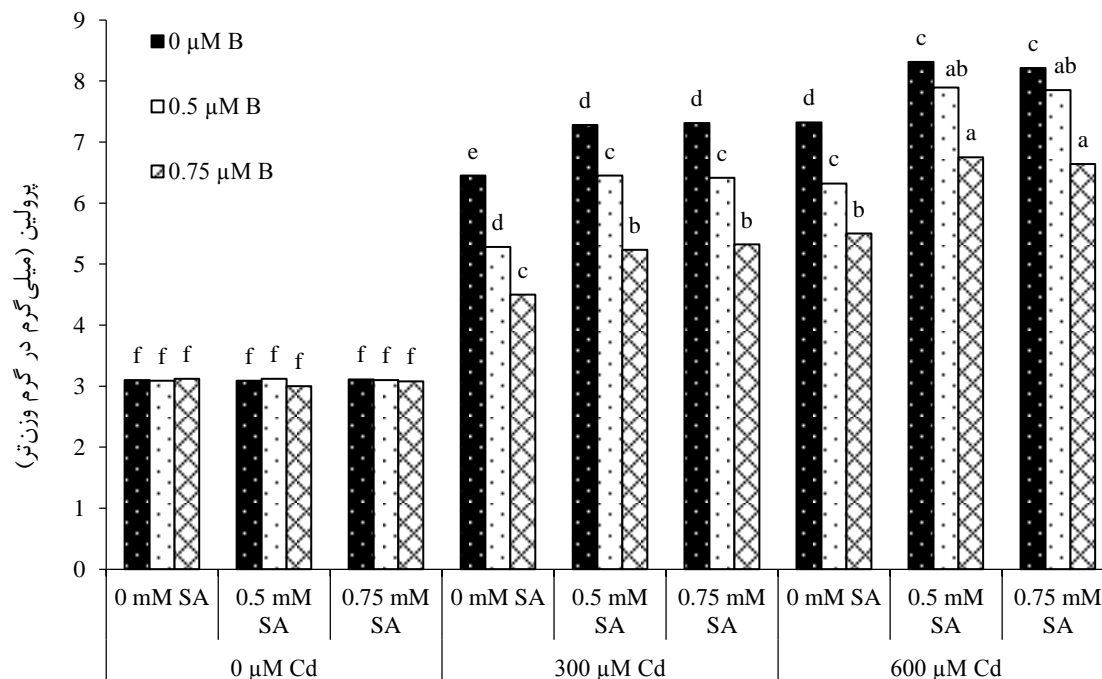
بر اساس نتایج مشخص گردید کاربرد ۰/۷۵ میلی مولار سالیسیلیک اسید و نیز براسینواستروئید ۰/۷۵ ماکرومولار در شرایط عدم تنش فلز سنگین، موجب بهبود رشد و در نتیجه افزایش زیست‌توده اسفناج گردید. تنش کادمیوم ۳۰۰ و ۶۰۰ میکرو مولار به ترتیب باعث کاهش ۲۴/۸۷ و ۴۶/۸۷ درصدی زیست‌توده اسفناج گردید. پیش تیمار بذر و محلول‌پاشی بوته‌های اسفناج با هورمون‌های گیاهی، تحت شرایط تنش، به صورت جداگانه و یا توأم، کاهش اثرات سوء ناشی از فلز سنگین را به همراه داشت و موجب افزایش معنی‌دار زیست‌توده در

تیمار، دارای میزان پرولین بیشتری بودند و تأثیر کاربرد هم‌زمان سالیسیلیک اسید و براسینواستروئید در مقایسه با کاربرد جداگانه آن‌ها، بیشتر بود (شکل ۲).



کادمیوم × سالیسیلیک اسید × براسینواستروئید

شکل ۱- تأثیر سالیسیلیک اسید و براسینواستروئید بر زیست توده اسفناج تحت تنش کادمیوم



کادمیوم × سالیسیلیک اسید × براسینواستروئید

شکل ۲- تأثیر سالیسیلیک اسید و براسینواستروئید بر پرولین برگ اسفناج تحت تنش کادمیوم

کربوهیدرات‌ها و پرولین افزایش یافت. اسمولیت‌ها یا مواد آلی سازگار قابلیت انحلال بسیار بالا و وزن مولکولی پایین دارند و معمولاً در غلظت‌های بالا برای سلول سمیت ایجاد نکرده و واکنش‌های متابولیکی طبیعی سلول را مهار نمی‌کنند. نقش این اسمولیت‌ها علاوه بر دخالت در تنظیم اسمزی، ممانعت از تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن، سم‌زدایی و جاروب کردن گونه‌های فعال اکسیژن، حفاظت از یکپارچگی غشا و ثبات پروتئین‌ها و آنزیم‌ها و به‌طور کلی ماکرومولکول‌های داخل سلولی می‌باشد (Finnegan & Chen, 2012). مشابه نتایج پژوهش حاضر، افزایش تجمع مواد قندی در گیاه در مواجهه با تنش‌های مختلف محیطی گزارش شده است (Orcutt & Nilsen, 2000). ارتباط مستقیمی بین فرآیندهای فیزیولوژیکی مثل فتوسنتز، انتقال و تنفس و تغییر در مقدار کربوهیدرات‌ها وجود دارد و تغییرات در متابولیسم و تبدیل قندها در شرایط اسمزی در تحمل تنش دارای نقش تعیین‌کننده‌ای می‌باشد (Karimi *et al.*, 2005). افزایش غلظت قندها، منفی‌تر شدن پتانسیل اسمزی در سیتوپلاسم را به همراه دارد و در نتیجه موجب تنظیم اسمزی می‌گردد. به‌علاوه، قندها می‌توانند به‌عنوان محافظ اسمزی غشاها و پروتئین‌ها عمل کرده و باعث جاروب کردن رادیکال‌های آزاد اکسیژن شوند (Orcutt & Nilsen, 2000).

نتایج تحقیقات حاکی از آن است که براسینواستروئیدها به‌عنوان هورمون‌های گیاهی استروئیدی نقش بسیار مهمی در رشد و نمو گیاهی و نیز کاهش اثرات مخرب فلزات سنگین دارند (Maghsoudi *et al.*, 2019a). همچنین تیمار براسینواستروئید تحمل گیاهچه‌های خیار (*Cucumis sativus* L.) را در مقابل تنش دمایی

مشابه نتایج حاصل از پژوهش حاضر، سایر محققین گزارش داده‌اند که اسید آمینه پرولین در پاسخ به تنش‌های مختلف محیطی تجمع می‌یابد (Finnegan & Chen, 2012). پرولین نه تنها به‌عنوان یک اسمولیت سازگار بلکه به‌عنوان یک چاپرون، در شرایط تنش‌های محیطی نقش بالقوه‌ای در افزایش مقاومت گیاه به تنش ایفا می‌نماید و قسمتی از سیگنال تنشی می‌باشد که در پاسخ‌های سازشی نقش دارد. پرولین می‌تواند باعث القای بیان ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش می‌شود که در پروموتورشان دارای عناصر پاسخ‌دهنده به پرولین می‌باشند. در بافت‌های گیاهی تجمع پرولین می‌تواند نتیجه کاهش در تجزیه پرولین، افزایش بیوسنتز پرولین، کاهش سنتز پروتئین‌ها و یا استفاده از پرولین و نیز هیدرولیز پروتئین‌ها باشد، بنابراین افزایش مقدار پرولین در تنش محیطی در سلول‌های گیاهی را می‌توان از راه‌های مختلف توجیه کرد.

نتایج نشان داد تنش ۳۰۰ و ۶۰۰ میکرو مولار کادمیوم افزایش معنی‌دار مقدار کربوهیدرات‌های محلول در برگ اسفناج را به همراه داشت و این افزایش در تنش ۶۰۰ میکرو مولار بیشتر بود. همچنین در شرایط تنش کادمیوم، کاربرد تکی و یا توأم اسید سالیسیلیک و براسینواستروئید موجب افزایش معنی‌دار این پارامتر گردید و البته تأثیر کاربرد توأم این هورمون‌های گیاهی، بیشتر از استفاده تکی آن‌ها بود. به‌طوری‌که بیشترین میزان کربوهیدرات‌ها در تیمار ۰/۷۵ میکرو مولار براسینواستروئید+ سالیسیلیک اسید حاصل شد (جدول ۲).

نتایج به‌دست آمده از پژوهش حاضر بیانگر آن بود که به‌عنوان یک سازوکار مقاومت به تنش، میزان اسمولیت‌های سازگار از جمله میزان

همراه داشت. علاوه بر این، در شرایط عدم تنش کادمیوم، کاربرد براسینواستروئید موجب کاهش معنی‌دار میزان مالون دی‌آلدهید گردید. تحت شرایط تنش نیز، کاربرد هورمون‌های رشد گیاهی به‌صورت تکی و ترکیبی موجب کاهش معنی‌دار میزان مالون دی‌آلدهید برگ گردید و استفاده توأم براسینواستروئید اسید سالیسیلیک اثر هم‌افزایی داشت (جدول ۲).

نشت یونی به‌عبارتی شاخصی برای ارزیابی میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشا می‌باشد. نتایج به‌دست آمده از این پژوهش نشان داد اگرچه اعمال هر دو سطح تنش کادمیوم افزایش معنی‌دار نشت یونی برگ اسفناج را به همراه داشت، در مقابل کاربرد سالیسیلیک اسید، براسینواستروئید و سالیسیلیک اسید+ براسینواستروئید به‌طور معنی‌داری میزان نشت یونی را در هر دو سطح تنش کادمیوم بهبود بخشید. در ضمن، تأثیر تیمار کاربرد توأم هورمون‌های گیاهی، بیشتر از تأثیر کاربرد تکی هر کدام از آن‌ها بود (جدول ۲).

نتایج به‌دست آمده از پژوهش حاضر نشان داد که تنش کادمیوم موجب اختلال در پایداری غشا سلولی و در نتیجه پراکسیداسیون لیپیدهای غشا و افزایش میزان مالون دی‌آلدهید، پراکسید هیدروژن و نیز نشت یونی (جدول ۲) گردید. به‌دنبال اختلالات ناشی از تنش کادمیوم در فرآیندهای مختلف فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاهان تحت تنش، در نهایت زیست‌توده اسفناج، تحت این شرایط کاهش یافت (جدول ۲). مکانیسم واکنش گیاهان به تنش‌های محیطی بسیار پیچیده و شامل تغییرات مولکولی و گسترش آن به کل فعالیت‌های متابولیسمی گیاه و اثرگذاری آن بر مورفولوژی و فنولوژی گیاه می‌باشد. مشابه نتایج حاصل از پژوهش حاضر، تأثیر منفی فلزات سنگین بر روی فرآیندهای مختلف فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه

پایین بهبود بخشید (Katsumi, 1985). نقش کاربرد براسینواستروئید در افزایش تحمل به خشکی در گیاه چغندرقد (*Beta vulgaris* L.) گزارش شده است (Schilling *et al.*, 1991). هورمون‌های گیاهی سالیسیلیک اسید و براسینواستروئید ممکن است به‌طور مستقیم روی فعالیت آنزیم‌های خاص اثر بگذارد یا ممکن است ژن‌های مسئول مکانیسم‌های حفاظتی را فعال نماید (Hayat & Ahmad, 2007). در همین راستا گزارش شده است که سالیسیلیک اسید فرآیندهای تعمیر و بازسازی را افزایش و با بیان برخی ترانسپورترهای خاص، موجب جدا کردن واکوئلی محصولات عمل کادمیوم می‌گردد (Metwally *et al.*, 2003).

نتایج به‌دست آمده از اندازه‌گیری پراکسید هیدروژن و مالون دی‌آلدهید به‌عنوان دو شاخص مهم برای ارزیابی پراکسیداسیون لیپیدهای غشا، نشان داد تنش کادمیوم ۳۰۰ و ۶۰۰ میکرو مولار، موجب افزایش معنی‌دار پراکسید هیدروژن در برگ اسفناج گردید و این افزایش در تنش ۶۰۰ میکرو مولار کادمیوم، قابل‌ملاحظه‌تر بود. اگرچه در شرایط بدون تنش، کاربرد هورمون‌های گیاهی تأثیری بر میزان پراکسید هیدروژن نداشت، اما در شرایط تنش (در هر دو سطح تنش)، پیش‌تیمار بذر با هورمون‌های گیاهی و نیز محلول‌پاشی این مواد، به‌صورت تکی و نیز توأم، بهبود پایداری غشا و در نتیجه کاهش پراکسید هیدروژن را به همراه داشت. لازم به ذکر است تأثیر کاربرد توأم هورمون‌های گیاهی بیشتر از تأثیر هر کدام از آن‌ها به‌تنهایی بود و بیشترین تأثیر مثبت از کاربرد ۰/۷۵ میکرو مولار براسینواستروئید+ سالیسیلیک اسید حاصل شد (جدول ۲).

در پژوهش حاضر مشخص گردید هر دو سطح تنش کادمیوم، با اختلاف آماری معنی‌داری با یکدیگر، افزایش قابل‌ملاحظه مالون دی‌آلدهید را به

پیامدهای عمل ROS روی ساختار و عمل غشا سلولی است. اسیدهای چرب غیراشباع از مهم‌ترین ترکیبات لیپیدهای غشا هستند که در برابر پراکسیداسیون بسیار آسیب‌پذیر هستند. پراکسیداسیون لیپیدها با حمله رادیکال‌های فعال اکسیژن آغاز می‌شود. اندازه‌گیری محصولات نهایی پراکسیداسیون لیپیدها یکی از راه‌های تشخیص تنش اکسیداتیو ناشی از تنش‌های محیطی از جمله تنش فلزات سنگین، می‌باشد. در نتیجه پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع، مالون دی آلدئید (MDA) و سایر آلدئیدهای غیراشباع تولید می‌گردند که این ترکیبات ثانویه آلدئیدی حاصل از پراکسیداسیون لیپیدها به‌طور معمول به‌عنوان شاخص تنش اکسیداتیو محسوب می‌شوند (Finnegan & Chen, 2012). در پژوهش حاضر نیز به‌دنبال تنش کادمیوم، غلظت مالون دی آلدئید در برگ اسفناج، تحت شرایط تنش افزایش یافت (جدول ۲). علاوه بر اندازه‌گیری مقدار آلدئیدها، نشت یونی نیز برای اندازه‌گیری مقدار آسیب وارد شده به غشا و میزان تنش اکسیداتیو مورد استفاده قرار می‌گیرد (Finnegan & Chen, 2012; Sudhakar et al., 2001). مقدار این شاخص‌ها در هنگام تنش به‌عنوان یک شاخص مقاومت به تنش در نظر گرفته می‌شود. بررسی‌ها در گیاه اسفناج (Eraslan et al., 2008) و برنج (Demiral & Turkan, 2005) حاکی از آن است که تنش شوری موجب افزایش پراکسیداسیون لیپید، مالون دآلدئید و نیز نشت یونی گردید.

نتایج پژوهش حاضر بیانگر آن بود که کاربرد هورمون‌های گیاهی سالیسیلیک اسید و براسینواستروئید در شرایط تنش کادمیوم، باعث کاهش اثرات سوء ناشی از این تنش گردید. به‌طوری‌که کاربرد این مواد، تحت شرایط تنش فلزات سنگین، باعث حفظ پایداری غشا سلولی و در

و در نتیجه کاهش رشد، توسط محققان دیگر نیز گزارش شده است (Gupta et al., 2017; Mitra et al., 2017; Liu et al., 2014; Pigna et al., 2010).

اکسیژن عنصری ضروری در فرآیندهای متابولیسمی هوازی می‌باشد، اما وقتی به‌صورت ناقص احیا شود تولید انواع گونه‌های فعال اکسیژن (ROS; Active Oxygen Species) می‌نماید. وقتی گیاهان با تنش‌های غیرزنده از جمله فلزات سنگین روبه‌رو می‌شوند برخی از ROS مانند سوپراکسید، پراکسید هیدروژن ( $H_2O_2$ ) و رادیکال‌های هیدروکسیل تولید می‌شود (Pigna et al., 2010). به‌طور مشابه، در پژوهش حاضر نیز تنش کادمیوم موجب افزایش تولید  $H_2O_2$  گردید (جدول ۲).  $H_2O_2$  دارای نیمه‌عمر بالاتری نسبت به سوپراکسید می‌باشد و می‌تواند از محل تولید خود منتشر شود.  $H_2O_2$  یک بازدارنده قوی چرخه کالوین می‌باشد.  $H_2O_2$  در حضور کاتالیزورهای فلزی خاص یا کلاته‌های فلزی، تولید رادیکال بسیار فعال OH نموده و سمیت خود را افزایش می‌دهد (Sudhakar et al., 2001).

اصلی‌ترین علت اثرات تخریبی و مضر ROS، توانایی آن‌ها برای شروع واکنش‌های زنجیره‌ای اتواکسیداتیو اسیدهای چرب غیراشباع است که منجر به پراکسیداسیون لیپید و تخریب غشا می‌شود. در پژوهش حاضر نیز به‌دنبال تنش کادمیوم و افزایش غلظت ROSها، غلظت مالون دی آلدئید افزایش یافت و منجر به تخریب غشا و افزایش میزان نشت یونی گردید (جدول ۳). غشا سلولی یکی از هدف‌های اولیه بسیاری از تنش‌های محیطی از جمله تنش فلزات سنگین محسوب می‌شود و حفظ یکپارچگی و ثبات غشا تحت تنش، یکی از نشانه‌های تحمل به تنش می‌باشد (Sudhakar et al., 2001). یکی از مهم‌ترین

نتیجه کاهش پراکسیداسیون لیپیدهای غشا و کاهش میزان مالون دی‌آلدهید، پراکسید هیدروژن و نیز کاهش نشت یونی (جدول ۲) گردید. به دنبال تأثیر مثبت کاربرد هورمون‌های گیاهی و در نتیجه کاهش اثرات سوءناشی از تنش کادمیوم در فرآیندهای مختلف فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاهان تحت تنش، در نهایت زیست‌توده اسفناج، تحت این شرایط در مقایسه با شاهد، افزایش یافت (جدول ۲).

جدول ۲- تأثیر گیاه سالیسیلیک اسید و براسینواستروئید بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز برگ اسفناج تحت تنش کادمیوم

کادمیوم (میکرو مولار)	سالیسیلیک اسید (میلی‌مولار)	براسینواستروئید (میکرو مولار)	کربوهیدرات‌ها (میلی‌گرم در گرم وزن خشک)	پراکسید هیدروژن (میکرومول در گرم وزن تر)	مالون دی‌آلدهید (نانومول در گرم وزن تر)	نشت یونی (درصد)
۰	۰	۰	۲۶/۱۰ <sup>j</sup>	۹/۱۴ <sup>f</sup>	۴/۳۱ <sup>gh</sup>	۱۹/۲۱ <sup>i</sup>
۰/۵	۰	۰/۵	۲۵/۸۴ <sup>j</sup>	۸/۸۸ <sup>f</sup>	۳/۵۴ <sup>i</sup>	۱۹/۰۰ <sup>i</sup>
۰/۷۵	۰	۰/۷۵	۲۶/۱۰ <sup>j</sup>	۹/۰۸ <sup>f</sup>	۳/۵۰ <sup>i</sup>	۱۹/۰۱ <sup>i</sup>
۰	۰	۰	۲۶/۲۳ <sup>j</sup>	۹/۱۰ <sup>f</sup>	۴/۲۰ <sup>gh</sup>	۱۹/۰۱ <sup>i</sup>
۰/۵	۰/۵	۰/۵	۲۷/۱۵ <sup>j</sup>	۹/۰۲ <sup>f</sup>	۳/۵۱ <sup>i</sup>	۱۹/۰۱ <sup>i</sup>
۰/۷۵	۰/۷۵	۰/۷۵	۲۷/۰۸ <sup>j</sup>	۹/۱۰ <sup>f</sup>	۳/۵۳ <sup>i</sup>	۱۸/۹۵ <sup>i</sup>
۰	۰	۰	۲۶/۸۷ <sup>j</sup>	۹/۲۰ <sup>f</sup>	۴/۱۸ <sup>gh</sup>	۱۹/۱۰ <sup>i</sup>
۰/۵	۰/۷۵	۰/۵	۲۷/۰۲ <sup>j</sup>	۸/۸۵ <sup>f</sup>	۳/۵۲ <sup>i</sup>	۱۹/۱۰ <sup>i</sup>
۰/۷۵	۰/۷۵	۰/۷۵	۲۷/۰۷ <sup>j</sup>	۸/۹۱ <sup>f</sup>	۳/۵۰ <sup>i</sup>	۱۸/۹۸ <sup>i</sup>
۰	۰	۰	۳۰/۱۰ <sup>i</sup>	۱۱/۲۱ <sup>b</sup>	۶/۳۲ <sup>de</sup>	۲۷/۱۰ <sup>e</sup>
۰/۵	۰	۰/۵	۳۴/۲۱ <sup>g</sup>	۱۰/۳۵ <sup>cd</sup>	۵/۳۵ <sup>fg</sup>	۲۴/۱۰ <sup>f</sup>
۰/۷۵	۰/۷۵	۰/۷۵	۳۵/۵۲ <sup>g</sup>	۹/۷۴ <sup>de</sup>	۴/۵۴ <sup>g</sup>	۲۳/۱۰ <sup>g</sup>
۰	۰	۰	۳۳/۷۸ <sup>gh</sup>	۱۰/۱۰ <sup>cd</sup>	۵/۸۴ <sup>ef</sup>	۲۴/۱۰ <sup>f</sup>
۰/۵	۰/۵	۰/۵	۳۸/۰۴ <sup>f</sup>	۹/۶۲ <sup>de</sup>	۴/۰۱ <sup>h</sup>	۲۲/۰۱ <sup>h</sup>
۰/۷۵	۰/۷۵	۰/۷۵	۳۸/۰۲ <sup>f</sup>	۹/۰۱ <sup>f</sup>	۴/۰۸ <sup>h</sup>	۲۰/۰۱ <sup>h</sup>
۰	۰	۰	۳۴/۱۲ <sup>g</sup>	۱۰/۰۰ <sup>d</sup>	۵/۰۰ <sup>g</sup>	۲۴/۰۱ <sup>f</sup>
۰/۵	۰/۷۵	۰/۵	۳۸/۰۱ <sup>f</sup>	۹/۵۰ <sup>de</sup>	۴/۰۱ <sup>h</sup>	۲۲/۰۷ <sup>h</sup>
۰/۷۵	۰/۷۵	۰/۷۵	۴۰/۲۵ <sup>c</sup>	۹/۰۰ <sup>f</sup>	۴/۰۵ <sup>h</sup>	۲۰/۰۷ <sup>h</sup>
۰	۰	۰	۳۵/۸۷ <sup>e</sup>	۱۲/۳۶ <sup>a</sup>	۸/۰۰ <sup>a</sup>	۴۵/۰۸ <sup>a</sup>
۰/۵	۰	۰/۵	۳۸/۵۴ <sup>d</sup>	۱۱/۲۰ <sup>b</sup>	۷/۱۰ <sup>bc</sup>	۴۲/۱۲ <sup>b</sup>
۰/۷۵	۰/۷۵	۰/۷۵	۴۰/۱۲ <sup>cd</sup>	۱۰/۶۵ <sup>c</sup>	۶/۵۰ <sup>d</sup>	۴۰/۰۰ <sup>c</sup>
۰	۰	۰	۳۸/۲۱ <sup>d</sup>	۱۱/۲۱ <sup>b</sup>	۷/۵۰ <sup>b</sup>	۴۲/۱۲ <sup>b</sup>
۰/۵	۰/۵	۰/۵	۴۲/۱۶ <sup>c</sup>	۱۰/۵۰ <sup>c</sup>	۶/۰۰ <sup>e</sup>	۴۰/۰۰ <sup>c</sup>
۰/۷۵	۰/۷۵	۰/۷۵	۴۵/۲۱ <sup>ab</sup>	۱۰/۰۰ <sup>d</sup>	۶/۰۲ <sup>e</sup>	۳۷/۲۱ <sup>d</sup>
۰	۰	۰	۳۸/۹۸ <sup>d</sup>	۱۰/۸۴ <sup>c</sup>	۷/۵۱ <sup>b</sup>	۴۲/۰۰ <sup>b</sup>
۰/۵	۰/۷۵	۰/۵	۴۲/۱۱ <sup>c</sup>	۱۰/۵۱ <sup>c</sup>	۶/۰۱ <sup>e</sup>	۴۰/۰۲ <sup>c</sup>
۰/۷۵	۰/۷۵	۰/۷۵	۴۷/۰۷ <sup>a</sup>	۱۰/۰۱ <sup>d</sup>	۶/۰۱ <sup>e</sup>	۳۷/۴۱ <sup>d</sup>

برای هر صفت، حروف مشترک نشان دهنده عدم وجود تفاوت معنی‌دار در سطح پنج درصد بر اساس آزمون دانکن می‌باشد.

شرایط تنش کادمیوم، فعالیت آنزیم پراکسیداز به میزان ۱۳/۸۲ و ۲۳/۱۱ درصد، فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز به میزان ۲۵/۶۰ و ۴۴/۵۴ درصد، فعالیت کاتالاز به میزان ۴۲/۰۵ و ۴۸/۵۶ درصد و همچنین فعالیت آسکوربات پراکسیداز به میزان ۷/۶۹ و ۴۲/۴۱ درصد به ترتیب در تنش ۳۰۰ و ۶۰۰ میکرو مولار کادمیوم افزایش یافت (جدول ۳). اگرچه در شرایط عدم تنش (نرمال)، پیش‌تیمار بذر و نیز محلول‌پاشی بوته‌ها با براسینواستروئید و سالیسیلیک اسید هیچ گونه تأثیر معنی‌داری بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نداشت، به‌طور استثناء موجب افزایش ۱۵/۲۷ درصدی (به‌طور میانگین) فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز گردید. به‌علاوه، تحت شرایط تنش کادمیوم، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاهان تیمار شده با هورمون‌های گیاهی، در مقایسه با گیاهان بدون تیمار به‌طور قابل‌ملاحظه بیشتر بود. لازم به ذکر است در رابطه با همه آنزیم‌ها، تأثیر کاربرد ترکیبی هورمون‌های گیاهی به‌طور معنی‌داری بیشتر از کاربرد تکی آن‌ها بود (جدول ۳).

مقدار ROS در سلول بستگی به سرعت تولید شدن آن‌ها، سرعت واکنش آن‌ها با مولکول‌های هدف نظیر پروتئین‌ها، لیپیدها یا اسیدهای نوکلئیک، سرعت تجزیه، جاروب شدن و یا خنثی شدن آن‌ها توسط آنزیم‌ها یا مولکول‌های آنتی‌اکسیدان غیرآنزیمی دارد. در شرایط طبیعی بین میزان تولید ROS و فعالیت مکانیسم‌های از بین برنده ROS تعادل وجود دارد؛ اما در تنش‌های محیطی از جمله تنش فلزات سنگین، این تعادل به هم خورده و موجب تنش اکسیداتیو در گیاهان می‌گردد (Pigna et al., 2010). گیاهان از سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی آنزیمی یا غیرآنزیمی برای مقاومت در برابر تنش اکسیداتیو استفاده می‌نمایند.

در راستای تأیید نتایج از پژوهش حاضر، تأثیر مثبت کاربرد سالیسیلیک اسید و براسینواستروئید در تعدیل اثرات سوء تنش‌های محیطی (Viciedo et al., 2019; Dong et al., 2017; Tripathi et al., 2013; Liu et al., 2011; Bogdan & Schenk, 2008) گزارش شده است، اما در زمینه کاربرد هم‌زمان سالیسیلیک اسید و براسینواستروئید کمتر گزارشی منتشر شده است. نکته حائز اهمیت آن است که بر اساس نتایج این پژوهش مشخص گردید استفاده توأم این دو هورمون گیاهی، تأثیر قابل‌ملاحظه‌تری در مقایسه با کاربرد تکی آن‌ها بر روی بهبود فرآیندهای فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و رشد گیاه اسفناج داشت. در همین راستا گزارش شده است که کاربرد سالیسیلیک اسید موجب کاهش اثرات مهاری فلزات سنگین سرب و جیوه روی جوانه‌زنی و رشد برنج و در نتیجه افزایش وزن تر و خشک ریشه و ساقه این گیاه گردید (Hayat & Ahmad, 2007). علاوه بر این، سالیسیلیک اسید موجب القای مقاومت به فلز سنگین آلومینیوم در گیاه *Cassia tora* از طریق افزایش خروج سیترات، کاهش مهار رشد ریشه و کاهش میزان تجمع آلومینیوم در ریشه‌ها گردید (Hayat & Ahmad, 2007). در بررسی دیگری در گیاه نخود (*Cicer arietinum* L.)، سالیسیلیک اسید با حفظ فعالیت فتوشیمیایی غشاهای کلروپلاستی و واکنش‌های کربوکسیلاسیون در فتوسنتز، موجب کاهش تنش اکسیداتیو ایجاد شده توسط کادمیوم گردید (Popova et al., 2009).

تحت تنش کادمیوم، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان پراکسیداز، سوپر اکسید دیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز و کاتالاز در برگ اسفناج به‌عنوان سیستم دفاعی گیاه، در مقایسه با شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. به‌طوری‌که در

آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مانند سوپراکسید دیسموتاز، تلفیقی از فعالیت‌این آنزیم‌ها فاکتور مهمی در تحمل گلوتامین ردوکتاز، کاتالاز و پراکسیداز نقش کلیدی به تنش‌های محیطی در گیاهان مختلف است (Liu مهم در مهار گونه‌های فعال شده بازی می‌کنند. *et al.*, 2014; Finnegan & Chen, 2012

جدول ۳- تأثیر گیاه سالیسیلیک اسید و براسینواستروئید بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز برگ اسفناج تحت تنش کادمیوم

آسکوربات پراکسیداز	کاتالاز	سوپراکسید دیسموتاز	پراکسیداز	براسینواستروئید (میکرو مولار)	سالیسیلیک اسید (میلی مولار)	کادمیوم (میکرو مولار)
----- (واحد در میلی گرم پروتئین) -----						
۳/۰۰ <sup>d</sup>	۴/۱۲ <sup>e</sup>	۶/۱۰ <sup>g</sup>	۲۸/۵۴ <sup>j</sup>	.	.	.
۲/۹۲ <sup>d</sup>	۴/۰۸ <sup>e</sup>	۷/۳۵ <sup>f</sup>	۲۹/۰۸ <sup>j</sup>	۰/۵	.	.
۲/۸۰ <sup>d</sup>	۴/۱۰ <sup>e</sup>	۷/۲۸ <sup>f</sup>	۲۸/۶۸ <sup>j</sup>	۰/۷۵	.	.
۲/۸۵ <sup>d</sup>	۴/۰۰ <sup>e</sup>	۷/۱۲ <sup>f</sup>	۲۹/۰۰ <sup>j</sup>	.	.	.
۲/۹۱ <sup>d</sup>	۴/۰۸ <sup>e</sup>	۷/۲۴ <sup>f</sup>	۲۹/۰۰ <sup>j</sup>	۰/۵	۰/۵	.
۳/۰۰ <sup>d</sup>	۴/۰۰ <sup>e</sup>	۷/۴۰ <sup>f</sup>	۲۸/۶۳ <sup>j</sup>	۰/۷۵	.	.
۲/۹۱ <sup>d</sup>	۴/۰۰ <sup>e</sup>	۷/۱۰ <sup>f</sup>	۲۹/۰۵ <sup>j</sup>	.	.	.
۳/۰۰ <sup>d</sup>	۴/۱۰ <sup>e</sup>	۷/۴۱ <sup>f</sup>	۲۹/۰۳ <sup>j</sup>	۰/۵	۰/۷۵	.
۳/۰۰ <sup>d</sup>	۴/۰۰ <sup>e</sup>	۷/۳۵ <sup>f</sup>	۲۸/۹۱ <sup>j</sup>	۰/۷۵	.	.
۳/۲۵ <sup>d</sup>	۷/۱۱ <sup>d</sup>	۸/۲۰ <sup>ef</sup>	۳۳/۱۲ <sup>i</sup>	.	.	.
۴/۱۰ <sup>c</sup>	۱۰/۰۵ <sup>a</sup>	۹/۴۸ <sup>de</sup>	۴۰/۱۲ <sup>f</sup>	۰/۵	.	.
۴/۰۲ <sup>c</sup>	۱۰/۲۱ <sup>a</sup>	۱۱/۰۰ <sup>c</sup>	۴۴/۳۲ <sup>c</sup>	۰/۷۵	.	.
۳/۴۱ <sup>d</sup>	۹/۱۲ <sup>b</sup>	۸/۹۵ <sup>e</sup>	۳۵/۲۱ <sup>h</sup>	.	.	.
۴/۰۸ <sup>c</sup>	۱۰/۱۱ <sup>a</sup>	۱۰/۰۱ <sup>d</sup>	۴۲/۳۲ <sup>d</sup>	۰/۵	۰/۵	۳۰۰
۴/۰۵ <sup>c</sup>	۱۰/۰۱ <sup>a</sup>	۱۱/۰۲ <sup>c</sup>	۴۶/۰۱ <sup>b</sup>	۰/۷۵	.	.
۳/۸۴ <sup>cd</sup>	۱۰/۰۰ <sup>a</sup>	۸/۸۶ <sup>e</sup>	۳۶/۰۰ <sup>g</sup>	.	.	.
۴/۱۰ <sup>c</sup>	۱۰/۰۲ <sup>a</sup>	۱۰/۰۲ <sup>d</sup>	۴۲/۰۱ <sup>d</sup>	۰/۵	۰/۷۵	.
۴/۱۰ <sup>c</sup>	۱۰/۲۱ <sup>a</sup>	۱۱/۱۰ <sup>c</sup>	۴۷/۰۰ <sup>a</sup>	۰/۷۵	.	.
۵/۲۱ <sup>b</sup>	۸/۰۱ <sup>c</sup>	۱۱/۰۰ <sup>c</sup>	۳۷/۱۲ <sup>g</sup>	.	.	.
۶/۳۲ <sup>a</sup>	۹/۸۶ <sup>a</sup>	۱۲/۰۰ <sup>b</sup>	۴۱/۴۱ <sup>de</sup>	۰/۵	.	.
۶/۳۰ <sup>a</sup>	۱۰/۰۲ <sup>a</sup>	۱۳/۰۵ <sup>a</sup>	۴۴/۸۵ <sup>c</sup>	۰/۷۵	.	.
۵/۳۲ <sup>b</sup>	۱۰/۱۰ <sup>a</sup>	۱۲/۱۰ <sup>b</sup>	۴۰/۵۴ <sup>f</sup>	.	.	.
۶/۳۱ <sup>a</sup>	۱۰/۰۲ <sup>a</sup>	۱۲/۵۰ <sup>b</sup>	۴۴/۲۱ <sup>c</sup>	۰/۵	۰/۵	۶۰۰
۶/۱۰ <sup>a</sup>	۹/۸۷ <sup>a</sup>	۱۳/۴۱ <sup>a</sup>	۴۷/۰۱ <sup>a</sup>	۰/۷۵	.	.
۵/۱۰ <sup>b</sup>	۱۰/۰۰ <sup>a</sup>	۱۲/۲۲ <sup>b</sup>	۴۱/۳۲ <sup>de</sup>	.	.	.
۶/۱۲۵۴ <sup>a</sup>	۱۰/۱۱ <sup>a</sup>	۱۲/۴۵ <sup>b</sup>	۴۴/۳۲ <sup>c</sup>	۰/۵	۰/۷۵	.
۶/۲۵ <sup>a</sup>	۹/۸۸ <sup>a</sup>	۱۳/۵۲ <sup>a</sup>	۴۷/۰۵ <sup>a</sup>	۰/۷۵	.	.

برای هر صفت، حروف مشترک نشان دهنده عدم وجود تفاوت معنی‌دار در سطح پنج درصد بر اساس آزمون دانکن می‌باشد.

2019). بر اساس نتایج حاصل از پژوهش حاضر به نظر می‌رسد که کاربرد هورمون‌های گیاهی، از طریق افزایش فعالیت سیستم آنتی‌اکسیدان گیاه، به‌عنوان یک مکانیسم دفاعی، موجب شده تا گیاه از تنش فلزات سنگین کادمیوم آسیب کمتری ببیند.

### نتیجه‌گیری کلی

بر اساس نتایج حاصل از پژوهش حاضر می‌توان بیان داشت کاربرد براسینواستروئید و سالیسیلیک اسید، مقاومت گیاه اسفناج در برابر تنش کادمیوم را از طریق افزایش فعالیت سیستم آنتی‌اکسیدان، افزایش تجمع اسمولیت‌های سازگار پرولین و کربوهیدرات‌ها و نیز بهبود پایداری غشا افزایش داد و در نهایت افزایش زیست‌توده گیاه را به همراه داشت. در نهایت استفاده از اسید سالیسیلیک و براسینواستروئید موجب بهبود رشد و کاهش افت زیست‌توده اسفناج و نیز کاهش تجمع کادمیوم در اسفناج و در نتیجه بهبود کیفیت این گیاه گردید و تأثیر استفاده توأم از اسید سالیسیلیک و براسینواستروئید در مقایسه با کاربرد هورمون‌های گیاهی به‌تنهایی، تأثیر بسیار قابل‌ملاحظه‌تری در بهبود رشد و نیز کاهش تجمع کادمیوم در اسفناج داشت.

### سپاسگزاری

بدین‌وسیله از مرکز تحقیقات تغذیه دانشگاه علوم پزشکی شیراز بابت حمایت‌های مالی جهت اجرای طرح با شماره ۹۹-۰۱-۸۷-۲۲۷۶۲ تقدیر به‌عمل می‌آید.

بر اساس نتایج حاصل از پژوهش حاضر مشخص گردید در مواجهه با تنش کادمیوم، فعالیت سیستم آنتی‌اکسیدان گیاه، به‌عنوان یک سیستم دفاعی در برابر تنش اکسیداتیو ناشی از تنش فلزات سنگین، افزایش‌یافته و به‌دنبال آن میزان فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، پراکسیداز، کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز (جدول ۳) افزایش یافت. در واقع به‌دنبال تنش فلزات سنگین، تنش اکسیداتیو در گیاه رخ می‌دهد. گزارش شده است که بیشترین خسارت در گیاهان که از طریق تنش‌های مختلف اعمال می‌شود، در ارتباط با خسارت اکسیداتیو در سطوح مختلف سلولی است. تحقیقات مختلف نشان داده که یک ارتباط قوی بین تحمل به تنش‌های اکسیداتیو که به‌دلیل تنش‌های محیطی از جمله فلزات سنگین ایجاد می‌شود و افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاهان وجود دارد (Pigna et al., 2010). در پژوهش حاضر در شرایط تنش کادمیوم، کاربرد هورمون‌های گیاهی تأثیر قابل‌ملاحظه‌ای بر افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی (کاتالاز، پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز و آسکوربات پراکسیداز) و غیرآنزیمی (از جمله پرولین) داشت و تأثیر کاربرد هم‌زمان هورمون‌های گیاهی، بیشتر از کاربرد تکی هر کدام از آنها بود. آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی از جمله مهم‌ترین ترکیبات در سیستم‌های جاروب کردن اکسیژن‌های رادیکال آزاد هستند و اولین راه دفاعی در برابر صدمات اکسیژن‌های رادیکال آزاد می‌باشند. بنابراین، برای مقابله با تنش اکسیداتیو تغییر ظرفیت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدان ضروری می‌باشد (Viciedo et al.,

### References

- Amooaghaie, R., Marefat, E. & Shabani, L. (2013). Interaction of salicylic acid and cadmium on growth, photosynthetic pigments and ion distribution in aerial parts of soybean plantlets. *Iranian Journal of Plant Biology*, 4(14), 75-88. (In Farsi)
- Amorim-Silva, V., Garcia-Moreno, A., Castillo, A. G., Lakhssassi, N., Del Valle, A. E., Perez-Sancho, J., Li, Y., Pose, D., Perez-Rodriguez, J., Lin, J., Valpuesta, V., Borsani, O., Zipfel, C., Macho, A. P. & Botella, M. A. (2019). TTL proteins

- scaffold brassinosteroid signaling components at the plasma membrane to optimize signal transduction in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 31(8), 1807-1828.
- Bastos, E., Schneider, M., de Quadros, D. P. C., Welz, B., Batista, M. B., Horta, P. A., Rorig, L. R. & Barufi, J. B. (2019). Phytoremediation potential of *Ulva ohnoi* (Chlorophyta): Influence of temperature and salinity on the uptake efficiency and toxicity of cadmium. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 174, 334-343.
  - Bates, L. S., Waldren, R. P. & Teare, I. D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, 39(1), 205-207.
  - Beigi, H. H. & Banitalebi, G. (2013). The effect of twenty-three years of surface irrigation with treated municipality wastewater on soil loadings, transfer to wheat and corn grains, and related health risks of some heavy metals. *Journal of Water and Soil (Agricultural Science)*, 27, 570-570.
  - Bogdan, K. & Schenk, M. K. (2008). Arsenic in rice (*Oryza sativa* L.) related to dynamics of arsenic and silicic acid in paddy soils. *Environmental Science & Technology*, 42(21), 7885-7890.
  - 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.
  - Demiral, T. & Turkan, I. (2005). Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance. *Environmental and Experimental Botany*, 53(3), 247-257.
  - Dhindsa, R. S. & Matowe, W. (1981). Drought tolerance in two mosses: correlated with enzymatic defence against lipid peroxidation. *Journal of Experimental Botany*, 32(1), 79-91.
  - Dong, Y., Wang, W., Hu, G., Chen, W., Zhuge, Y., Wang, Z. & He, M. R. (2017). Role of exogenous 24-epibrassinolide in enhancing the salt tolerance of wheat seedlings. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 17(3), 554-569.
  - Drazic, G., Mihailovic, N. & Lojic, M. (2006). Cadmium accumulation in *Medicago sativa* seedlings treated with salicylic acid. *Biologia Plantarum*, 50(2), 239-244.
  - Eraslan, F., Inal, A., Pilbeam, D. J. & Gunes, A. (2008). Interactive effects of salicylic acid and silicon on oxidative damage and antioxidant activity in spinach (*Spinacia oleracea* L. cv. Matador) grown under boron toxicity and salinity. *Plant Growth Regulation*, 55(3), 207-219.
  - Finnegan, P., & Chen, W. (2012). Arsenic toxicity: the effects on plant metabolism. *Frontiers in Physiology*, 3, 182-190.
  - Gupta, D. K., Tiwari, S., Razafindrabe, B. H. N. & Chatterjee, S. (2017). Arsenic contamination from historical aspects till present situation. In: D. K. Gupta & S. Chatterjee (Eds.), *Arsenic Contamination in the Environment: The Issues and Solutions*. (pp. 1-12). Springer International Publishing AG: Cham, Switzerland.
  - Hall, J. A. (2002). Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 53(366), 1-11.
  - Han, T. W., Tseng, C. C., Cai, M., Chen, K., Cheng, S. Y. & Wang, J. (2020). Effects of cadmium on bioaccumulation, bioabsorption, and photosynthesis in *Sarcodia suiaae*. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(4), 1294-1304.
  - Hasan, S. A., Hayat, S. & Ahmad, A. (2011). Brassinosteroids protect photosynthetic machinery against the cadmium induced oxidative stress in two tomato cultivars. *Chemosphere*, 84(10), 1446-1451.

- Hayat, S. & Ahmad, A. (2007). *Salicylic acid-a plant hormone*. Springer Science & Business Media.
- Hayat, S., Ali, B., Hasan, S. A. & Ahmad, A. (2007). Brassinosteroid enhanced the level of antioxidants under cadmium stress in *Brassica juncea*. *Environmental and Experimental Botany*, 60(1), 33-41.
- Ji, Y., Xie, X. & Wang, G. (2018). Effects of the heavy metal cadmium on photosynthetic activity and the xanthophyll cycle in *Phaeodactylum tricorutum*. *Journal of Oceanology and Limnology*, 36(6), 2194-2201.
- Karimi, G., Ghorbanli, M., Heidari, H., Nejad, R. K. & Assareh, M. H. (2005). The effects of NaCl on growth, water relations, osmolytes and ion content in *Kochia prostrata*. *Biologia Plantarum*, 49(2), 301-304.
- Katsumi, M. (1985). Interaction of a brassinosteroid with IAA and GA<sub>3</sub> in the elongation of cucumber hypocotyl sections. *Plant and Cell Physiology*, 26(4), 615-625.
- Kaya, C., Ashraf, M., Alyemeni, 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.
- Kazemzadeh Khouei, J., Nouri, A., Pourang, N., Alizadeh, M., Ghoreishi, J. & Padash, A. (2012). Evaluation of heavy metals Nickel, Lead, Copper, Manganese, Zinc, Cadmium and Vanadium in edible vegetables of south of Tehran. *Environmental Research*, 3, 65-74.
- Khan, E. & Gupta, M. (2018). Arsenic-silicon priming of rice (*Oryza sativa* L.) seeds influence mineral nutrient uptake and biochemical responses through modulation of Lsi-1, Lsi-2, Lsi-6 and nutrient transporter genes. *Scientific Reports*, 8(1), 1-16.
- Liu, C. W., Chen, Y. Y., Kao, Y. H. & Maji, S. K. (2014). Bioaccumulation and translocation of arsenic in the ecosystem of the Guandu Wetland, Taiwan. *Wetlands*, 34(1), 129-140.
- Liu, C., Guo, J., Cui, Y., Lü, T., Zhang, X. & Shi, G. (2011). Effects of cadmium and salicylic acid on growth, spectral reflectance and photosynthesis of castor bean seedlings. *Plant and Soil*, 344(1), 131-141.
- Lu, Q., Zhang, T., Zhang, W., Su, C., Yang, Y., Hu, D. & Xu, Q. (2018). Alleviation of cadmium toxicity in *Lemna minor* by exogenous salicylic acid. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 147, 500-508.
- Maghsoudi, K., Arvin, M. J. & Ashraf, M. (2019). Mitigation of arsenic toxicity in wheat by the exogenously applied salicylic acid, 24-epi-brassinolide and silicon. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 1-12.
- Maghsoudi, K., Emam, Y., Ashraf, M. & Arvin, M. J. (2019). Alleviation of field water stress in wheat cultivars by using silicon and salicylic acid applied separately or in combination. *Crop and Pasture Science*, 70(1), 36-43.
- Maghsoudi, K., Emam, Y., Niazi, A., Pessarakli, M. & Arvin, M. J. (2018). P5CS expression level and proline accumulation in the sensitive and tolerant wheat cultivars under control and drought stress conditions in the presence/absence of silicon and salicylic acid. *Journal of Plant Interactions*, 13(1), 461-471.
- Majumdar, S., Sachdev, S. & Kundu, R. (2020). Salicylic acid mediated reduction in grain cadmium accumulation and amelioration of toxicity in *Oryza sativa* L. cv Bandana. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 205, 111167.

- Metwally, A., Finkemeier, I., Georgi, M. & Dietz, K. J. (2003). Salicylic acid alleviates the cadmium toxicity in barley seedlings. *Plant Physiology*, 132(1), 272-281.
- Mitra, A., Chatterjee, S., Moogouei, R. & Gupta, D. K. (2017). Arsenic accumulation in rice and probable mitigation approaches: a review. *Agronomy*, 7(4), 67-75.
- Mohajer, R., Salehi, M. H. & Mohammadi, J. (2014). Investigation of lead and cadmium concentrations in agricultural products (lettuce, cabbage, onion and beet) of Isfahan province. *Journal of Health and Environment, Scientific Research Quarterly. Iranian Scientific Association of Environmental Health*, 7, 10-1.
- Nolan, T., Vukasinovic, N., Liu, D., Russinova, E. & Yin, Y. (2019). Brassinosteroids: multi-dimensional regulators of plant growth, development, and stress responses. *The Plant Cell*, doi:10.1105/tpc.19.00335
- Orcutt, D. M. & Nilsen, E. T. (2000). *The physiology of plants under stress, soil and biotic factors*. John Wiley and Sons, New York.
- Page, A. L., Miller, R. H. & Keeney, D. R. (1982). Methods of soil analysis. *Agronomy*, 24, 26-92.
- Pigna, M., Cozzolino, V., Giandonato Caporale, A., Mora, M. L., Di Meo, V., Jara, A. A. & Violante, A. (2010). Effects of phosphorus fertilization on arsenic uptake by wheat grown in polluted soils. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 10(4), 428-442.
- Popova, L. P., Maslenkova, L. T., Yordanova, R. Y., Ivanova, A. P., Krantev, A. P., Szalai, G. & Janda, T. (2009). Exogenous treatment with salicylic acid attenuates cadmium toxicity in pea seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47(3), 224-231.
- Sanjari, S., Keramat, B., Nadernejad, N. & Mozafari, H. (2019). Ameliorative effects of 24-epibrassinolide and thiamine on excess cadmium-induced oxidative stress in Canola (*Brassica napus* L.) plants. *Journal of Plant Interactions*, 14(1), 359-368.
- Schilling, G., Schiller, C. & Otto, S. (1991). Influence of brassinosteroids on organ relations and enzyme activities of sugar-beet plants. *Chemistry, Bioactivity and Applications*, 474, 208-219.
- Sudhakar, C., Lakshmi, A. & Giridarakumar, S. (2001). Changes in the antioxidant enzyme efficacy in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) under NaCl salinity. *Plant Science*, 161(3), 613-619.
- Sullivan, C.Y. & Ross, W.M. (1979). Selecting for drought and heat resistance in grain sorghum. In: H. Mussell & R. C. Staples (Eds.), *Stress Physiology in Crop Plants*. (pp. 263-281). John Wiley and Sons, New York.
- Tripathi, P., Tripathi, R. D., Singh, R. P., Dwivedi, S., Goutam, D., Shri, M., Trivedi, P. K. & Chakrabarty, D. (2013). Silicon mediates arsenic tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) through lowering of arsenic uptake and improved antioxidant defence system. *Ecological Engineering*, 52, 96-103.
- Vicedo, D. O., de Mello Prado, R., Toledo, R. L., dos Santos, L. C. N., Hurtado, A. C., Nedd, L. L. T. & Gonzalez, L. C. (2019). Silicon supplementation alleviates ammonium toxicity in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 19(2), 413-419.

- Yang, Z. M., Wang, J., Wang, S. H. & Xu, L. L. (2003). Salicylic acid-induced aluminum tolerance by modulation of citrate efflux from roots of *Cassia tora* L. *Planta*, 217(1), 168-174.
- Xiong, Z. T. & Qiu, H. J. (2007). Salicylic acid alleviates the cadmium toxicity in Chinese cabbages (*Brassica chinensis*). *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10(18), 3065-3071.
- Zhang, Z. J., Li, H. Z., Zhou, W. J., Takeuchi, Y. & Yoneyama, K. (2006). Effect of 5-aminolevulinic acid on development and salt tolerance of potato (*Solanum tuberosum* L.) microtubers in vitro. *Plant Growth Regulation*, 49, 27-34.

## The Role of Brassinosteroids and Salicylic Acid on Spinach Growth and Cadmium Accumulation under Cadmium Stress

Kobra Maghsoudi<sup>1\*</sup>, Elham Ashrafi Dehkordi<sup>1</sup> and Seyeed Mohammad Mazloumi<sup>2</sup>

1- Researcher, Nutrition Research Center, Department of Food Hygiene and Quality Control, School of Nutrition and Food Sciences, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

2- Associate Professor, Nutrition Research Center, Department of Food Hygiene and Quality Control, School of Nutrition and Food Sciences, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

\*Corresponding author: k\_maghsoudi1982@yahoo.com

(Received: November. 06, 2020, Accepted: January. 13, 2021)

### Abstract

A greenhouse investigation was performed to examine the influence of seed priming and foliar application of salicylic acid and brassinolide on growth and cadmium accumulation of spinach under cadmium stress conditions at Nutrition Research Center, Department of Food Hygiene and Quality Control, Shiraz University of Medical Sciences during 2020 using a factorial as randomized complete block design with three replications. Experimental treatments were including salicylic acid (0, 0.5 and 0.75 mM), and brassinolide (0, 0.5 and 0.75  $\mu$ M) and cadmium (0, 300 and 600  $\mu$ M). The results showed that cadmium stress enhanced the concentrations of malondialdehyde (MDA), hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) and electrolyte leakage (EL) as well as reduced the spinach biomass. Under Cd stress conditions, the activities of antioxidant enzymes such as peroxidase, superoxide dismutase, catalase and ascorbate peroxidase and the concentrations of proline and carbohydrates increased. Also, application of SA and Br considerably reduced the MDA and  $H_2O_2$  content and EL, in contrast, elevated the activities of antioxidant enzymes and osmolytes content in Cd-stressed spinach plants, however; the positive effects of SA were high when applied with Br. It was found that the cadmium content in the root was greater than that of spinach leaves. Under 600  $\mu$ M cadmium stress conditions, application of 0.5 mM salicylic acid, 0.75 mM salicylic acid, 0.50  $\mu$ M brassinosteroid, 0.75  $\mu$ M brassinosteroid, 0.5 mM salicylic acid+ 0.5  $\mu$ l brassinosteroid, 0.5  $\mu$ M salicylic acid /0 0 mM+ 0.75  $\mu$ M brassinosteroid, 0.75  $\mu$ M salicylic acid+ 0.50  $\mu$ M brassinosteroid and 0.75  $\mu$ M salicylic acid reduced the cadmium content 12.68, 13.68, 13.93, 22.13, 25.37, 30.09, 30.34 and 45.02% respectively in leaf compared to the non-use of these hormones. As well as the application of these treatments reduced 6.53, 10.13, 11.76, 18.30, 26.30, 32.67, 33.34 and 42.81% respectively in root compared to the non-use of these hormones. In conclusion, alleviation of Cd stress by seed priming and foliar application of Br and SA was associated partially with enhanced the activity of the antioxidant system, increase the accumulation of proline and carbohydrates, as well as improve cell membrane stability. Generally, supplementation with Br and SA had a significant effect on reducing the accumulation of cadmium and improving quality and quantity of spinach under Cd-stress.

**Keywords:** Antioxidant enzymes, Osmolytes, Plant growth regulators.

---