

## پاسخ رشد رویشی، فیزیولوژیک و آنزیمی گیاه دارویی خرفه (*Portulaca oleracea*) به غلظت کادمیوم در خاک

مریم جنابیان<sup>۱</sup>، همت‌اله پیردشتی<sup>۱\*</sup>، محمدعلی تاجیک قنبری<sup>۲</sup> و فردین صادق‌زاده<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> گروه زراعت، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، <sup>۲</sup> گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری و <sup>۳</sup> گروه

علوم خاک، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۰/۰۴، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۸/۰۳/۲۸)

### چکیده

کادمیوم از رایج‌ترین فلزات سنگین در مناطق آلوده است که با ورود به زیست‌بوم و زنجیره غذایی، اثرات اکولوژیکی زیانباری بر موجودات زنده بر جای خواهد نهاد. با توجه به خطر افزایش عناصر سنگین در خاک‌های کشاورزی و به دنبال آن حضور در گیاهان دارویی همچون خرفه (*Portulaca oleracea* L.)، پژوهشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار جهت بررسی واکنش رشد رویشی و پارامترهای فیزیولوژیک و آنزیمی این گیاه دارویی نسبت به افزایش غلظت کادمیوم (از صفر تا ۲۷۵ میلی‌گرم در کیلوگرم) در خاک اجرا گردید. نتایج نشان داد که صفات رویشی، رنگیزه‌های فتوسنتزی، میزان پروتئین محلول و محتوی نسبی آب برگ با افزایش غلظت کادمیوم کاهش و میزان تولید مالون دی‌آلدئید، هیدروژن پراکسید و پرولین افزایش نشان داد. همچنین روند تغییرات فعالیت سه آنزیم پراکسیداز (POX)، آسکوربات پراکسیداز (APX) و سوپراکسید دیسموتاز (SOD) در سطوح پایین سمیت افزایش و در سطوح بالاتر به صورت کاهشی بود. گیاه خرفه به مقادیر بالاتر کادمیوم حساسیت بیشتری نشان داد، به طوری که شیب تغییرات بیشتر متغیرهای مورد مطالعه از جمله وزن خشک اندام‌های رویشی، میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی، پرولین، پروتئین محلول برگ و هیدروژن پراکسید در سطوح پایین کادمیوم (محدوده صفر تا حدود ۶۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک) کمتر بود و پس از آن با شیب بیشتری ادامه یافت. در مجموع نتایج حاکی از قدرت رشد گیاه دارویی خرفه تا سطح ۲۷۵ میلی‌گرم در کیلوگرم کادمیوم خاک بود. با این حال در غلظت‌های بالاتر از حدود ۶۰ میلی‌گرم، تجمع ماده خشک و کارکرد سیستم‌های دفاعی گیاه بیش از ۵۰ درصد کاهش نشان داد.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌اکسیدان، رنگیزه‌های فتوسنتزی، پرولین

### مقدمه

سنگین، کادمیوم است که با تولید انواع اکسیژن (ROS) منجر به آسیب پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها و DNA شده و در نهایت منجر به تنش اکسیداتیو می‌گردد (Zhang et al., 2010). انتقال این عناصر از خاک و تجمع آن در گیاه مورد توجه قرار گرفته و در این میان کادمیوم به دلیل تحرک، پویایی و نیمه‌عمر

فلزات سنگین از جمله آلاینده‌های زیست‌محیطی محسوب می‌شوند که مواجه شدن با برخی از آنها از طریق آب، هوا و مواد غذایی می‌تواند مسمومیت‌های حاد، مزمن و خطرناک برای انسان و سایر موجودات ایجاد نماید. از جمله این عناصر

\* نویسنده مسؤول، نشانی پست الکترونیکی: h.pirdashti@sanru.ac.ir

2011؛ عسگری لجایر و همکاران، ۱۳۹۳). گیاه خرفه به‌عنوان یکی از قدیمی‌ترین سبزیجات مورد استفاده انسان است و از سالیان دور بومیان آفریقا از آن برای درمان تومورهای التهابی استفاده می‌نمایند (Holm et al., 1977). این گیاه دارای اهمیت اقتصادی بالایی است، به‌طوری‌که در سال‌های اخیر توجه بسیاری را به خود جلب کرده است (Safdari and Kazemitabar, 2009)، چرا که حاوی مقادیر زیادی مواد با خواص درمانی فوق‌العاده و ترکیبات بی‌نظیر بوده و ساقه‌های آن غنی از اسیدهای چرب امگا ۳، آلفاتوکوفرول، بتاکاروتن و گلوکاتیون است. همچنین یک منبع عالی برای آنتی‌اکسیدان‌هایی مانند ویتامین A، C، E و بتاکاروتن به‌شمار می‌رود (Dixit et al., 2011). با توجه به خطر افزایش عناصر سنگین در خاک‌های کشاورزی، خرفه نیز مانند سایر گیاهان دارویی در معرض عناصر سنگین قرار داد. در همین راستا، عبدی و همکاران (۱۳۹۵) و عسگری لجایر و همکاران (۱۳۹۳) در طی آزمایشی میزان عناصر سنگین سرب و کادمیوم را به‌ترتیب در ده و هشت گیاه دارویی اندازه‌گیری نمودند. نتایج این محققین نشان داد که تمام گیاهان دارویی مورد بررسی از جمله خرفه غلظت بالایی از عناصر کادمیوم و سرب را دارا بودند. بنابراین با توجه به مطالب بیان‌شده، پژوهش حاضر با هدف کمی‌سازی ویژگی‌های رویشی، فیزیولوژیکی و آنزیمی گیاه دارویی خرفه و تعیین حد آستانه تحمل این گیاه نسبت به غلظت کادمیوم خاک طراحی و اجرا گردید.

#### مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر در تابستان و پاییز ۱۳۹۶ در گلخانه تحقیقاتی پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان واقع در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. خاک مورد استفاده در آزمایش از عمق صفر تا ۳۰ سانتی‌متری مزرعه پژوهشی دانشگاه انتخاب و پس از عبور از الک دو میلی‌متری، به نسبت دو به یک با ماسه مخلوط گردید (جدول ۱). خاک مخلوط شده به ۱۱ قسمت مساوی تقسیم و مقادیر مختلف کادمیوم از

بیولوژیکی زیاد (حدود بیست سال) سمیت قابل‌توجه و همچنین سهولت جذب و تجمع در گیاه از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (Mauskar, 2007). سمیت کادمیوم به شکل‌های مختلف شامل کاهش عملکرد، کاهش رشد ریشه و برگ و تشکیل مالون دی‌آلدئید گزارش شده است (Grant et al., 1998). کاهش رشد رویشی گیاه در اثر کاربرد فلزات سنگین همانند کادمیوم و مس در لوبیا چیتی (*Phaseolus vulgaris*) (بلوچی و همکاران، ۱۳۹۶)، نخود (*Cicer arietinum*) (Faiazan et al., 2011) و ذرت (*Zea mays*) (پوراکبر و ابراهیم‌زاده، ۱۳۹۳) نیز پیش‌تر گزارش شده است. این عنصر همچنین جذب نیترات و انتقال آن از ریشه به اندام هوایی را از طریق ممانعت از فعالیت نیترات ردوکتاز، کاهش می‌دهد (Benavides et al., 2005). مقادیر بالای کادمیوم به‌دلیل اختلالات متابولیسمی، تولید انواع واکنش‌گر را در سلول افزایش داده و منجر به وقوع تنش اکسیداتیو در گیاه می‌گردد (Goncalves et al., 2007). این عنصر همچنین منجر به اختلال در مسیر بیوسنتز کلروفیل و آنزیم‌های دخیل در فتوسنتز و تثبیت دی‌اکسید کربن می‌شود (Dias et al., 2013). این آسیب‌ها به‌دلیل ایجاد رادیکال‌های آزاد اکسیژن در شرایط تنش مولکولی ناشی از کادمیوم به‌وجود می‌آیند (Schutzendubel and Polle, 2002). در این زمان آنزیم‌های مختلفی نظیر سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز وارد عمل شده و با سازوکارهای مختلف این رادیکال‌ها را از بین می‌برند (برجیان و همکاران، ۱۳۹۷).

بررسی‌های سازمان بهداشت جهانی در سال‌های اخیر حاکی از روند روبه افزایش استفاده از گیاهان دارویی در سراسر جهان است. با گسترش محبوبیت و تجارت گیاهان دارویی، سلامت، امنیت و کیفیت مواد خام گیاهان دارویی و محصولات فرآوری‌شده آنها به یک نگرانی عمده سازمان‌های جهانی تبدیل شده است، چرا که در موارد متعدد، آلودگی گیاهان دارویی به فلزات سنگین و پتانسیل بالای این گیاهان در جذب و انتقال فلزات سنگین به بخش‌های قابل‌استفاده، گزارش شده است (Ebrahim et al., 2012; Prasad et al., 2012).

جدول ۱- برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک

هدایت الکتریکی (dS.m <sup>-1</sup> )	pH	کادمیوم	پتاسیم	فسفر	نیترژن	شن	سیلت	رس	بافت خاک
		(ppm)			(%)				
۱/۲۳	۷/۵۶	۱/۲۳	۲۴۴	۸/۴۷	۰/۲۶	۲۸/۳	۳۷/۲	۳۴	رسی-سیلتی

دمای اتاق قرار گرفت. سپس میزان نور جذبی محلول در طول موج‌های ۶۵۲/۴ و ۶۶۵/۲ نانومتر به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر (Analytic jena-spekol 1300) خوانده و ثبت شد. در نهایت میزان دو پارامتر مذکور براساس رابطه‌های ۱ و ۲ محاسبه گردید (Porra, 2002).

$$\text{Chl}_a (\mu\text{g} / \text{gr fw}) = 16.72 A_{665.2} - 9.16 A_{652.4} \quad \text{رابطه ۱}$$

$$\text{Chl}_b (\mu\text{g} / \text{gr fw}) = 34.09 A_{652.4} - 15.28 A_{665.2} \quad \text{رابطه ۲}$$

**محتوای آب نسبی برگ:** جهت سنجش محتوی آب نسبی

برگ (RWC) نیز نمونه‌گیری از آخرین برگ توسعه یافته گیاه صورت گرفته و بلافاصله وزن تر آنها با ترازوی دقیق اندازه‌گیری گردید (FW). سپس نمونه‌های برگ‌ها به لوله آزمایش حاوی آب مقطر منتقل شد و پس از گذشت ۲۴ ساعت، وزن برگ‌های آماس یافته اندازه‌گیری شد. برای محاسبه وزن آماس، برگ‌ها از لوله آزمایش خارج و رطوبت اضافی با دستمال کاغذی گرفته شده و نمونه‌ها وزن گردید (TW). سپس نمونه‌ها در آون ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفته و سپس توزین انجام گردید (DW). در نهایت محتوی رطوبت نسبی برگ‌ها با استفاده از رابطه ۳ محاسبه گردید (Ritchie and Nguyen, 1990).

$$\text{RWC} = (F_w - D_w) / (T_w - D_w) \times 100 \quad \text{رابطه ۳}$$

**نشت الکترولیت:** جهت اندازه‌گیری میزان نشت

الکترولیت، نمونه‌ی برگ‌ها در لوله‌های آزمایش حاوی ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر قرار گرفت. پس از گذشت ۲۴ ساعت، هدایت الکتریکی هر نمونه با استفاده از دستگاه EC متر (Conductivity Meters 410) اندازه‌گیری شد (EC<sub>1</sub>). به منظور اندازه‌گیری میزان کل نشت الکترولیت در اثر مرگ سلول، لوله‌های آزمایش به مدت ۲۰ دقیقه در دستگاه بن‌ماری با دمای ۹۰ درجه قرار گرفته و هدایت الکتریکی نمونه‌ها ثبت

منبع کادمیوم کلرید (CdCl<sub>2</sub>.5H<sub>2</sub>O) به آن اضافه گردید تا غلظت آن در خاک آزمایش به مقادیر موردنظر (صفر، ۱۵، ۳۰، ۴۵، ۶۰، ۹۵، ۱۳۰، ۱۶۵، ۲۰۰، ۲۳۵ و ۲۷۵ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک) برسد. مقدار اولیه کادمیوم کل در خاک آزمایش ۱/۲۳ میلی‌گرم در کیلوگرم بود که معادل صفر در نظر گرفته شد. اتحادیه اروپا حداکثر غلظت مجاز کادمیوم در خاک‌های زراعی را یک تا سه میلی‌گرم در کیلوگرم خاک تعیین نموده است (Eunomia Research and Consulting Ltd, 2018). به منظور مخلوط کردن کادمیوم با خاک، مقادیر موردنظر کادمیوم از منبع کادمیوم کلرید (CdCl<sub>2</sub>.5H<sub>2</sub>O) در ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شده و مقدار خاک لازم برای هر یک از تیمارها و تکرارها تهیه و سپس محلول موردنظر به آرامی و به صورت اسپری به خاک اضافه گردید (Jadia and fulekar, 2008). طی فرآیند مه‌پاشی، خاک‌ها به آرامی بهم زده شدند تا حداکثر اختلاط لازم بین خاک و عنصر کادمیوم انجام شود. خاک‌های آلوده به مدت چهار هفته به منظور انجام برهمکنش‌های بین کادمیوم و خاک در شرایط رطوبت ظرفیت زراعی در گلخانه نگهداری شدند تا تعادل لازم بین خاک و کادمیوم فراهم شود. پس از گذشت چهار هفته از مخلوط کردن خاک، بذور خرفه به مدت ۱۰ دقیقه با هیپوکلریت سدیم یک درصد استریل و پس از جوانه‌دار شدن کشت گردید.

**سنجش کلروفیل و شاخص سبزی‌نگی برگ:** پس از چهار

هفته از کشت اندازه‌گیری پارامترهای شاخص سبزی‌نگی برگ (عدد SPAD) با استفاده از دستگاه کلروفیل متر (SPAD-502, Minolta, Japan) و رنگیزه‌های کلروفیلی (شامل کلروفیل *a* و *b*) از آخرین برگ گسترش یافته صورت گرفت.

جهت سنجش میزان کلروفیل *a* و *b* نمونه‌ها در ۸ میلی‌لیتر متانول غوطه‌ور شده و به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی و در

میلی لیتر بافر فسفات ۱۰۰ میلی مولار (pH=۷)، ۲۵۰ میکرو لیتر از EDTA ۰/۱ میلی مولار، ۱ میلی لیتر گایاکول ۵ میلی مولار، ۱ میلی لیتر پراکسید ۱۵ میلی مولار و ۵۰ میکرو لیتر از محلول آنزیمی استخراج شده است. واکنش با اضافه کردن محلول آنزیمی شروع و افزایش جذب در طول موج ۴۷۰ نانومتر به مدت یک دقیقه ثبت شد. فعالیت آنزیمی براساس میزان تترآگایاکول تشکیل و با استفاده از ضریب خاموشی  $1/33 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Tang and Newton, 2005).

**اندازه گیری میزان مالون دی آلدئید:** پراکسیداسیون لیپیدی یا مالون دی آلدئید براساس روش Stewart و Bewley (۱۹۸۰) اندازه گیری شد. بدین منظور حدود ۰/۵ گرم از برگ های گیاه خرفه در ۱۰ میلی لیتر از محلول ۰/۱٪ تری کلرو استیک اسید هموژن و به مدت ۱۰ دقیقه در  $15000 \times \text{g}$  سانتریفیوژ گردید. ۲ میلی لیتر از سوپرناتانت حاصل با ۴ میلی لیتر از محلول ۲۰٪ تری کلرو استیک اسید محتوی ۰/۵٪ تیوباربیتوریک اسید مخلوط شد. کمپلکس حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد نگهداری و سپس به حمام آب سرد منتقل گردید. نمونه ها مجدداً به مدت ۱۰ دقیقه در  $10000 \times \text{g}$  سانتریفیوژ شدند. جذب نمونه ها در طول موج ۵۳۳ و ۶۰۰ نانومتر ثبت گردید. میزان پراکسید شدن لیپیدها از اختلاف بین طول موج های جذبی در ضریب خاموشی  $155 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  به دست آمد.

هیدروژن پراکسید به روش Alexieva و همکاران (۲۰۰۱) اندازه گیری شد. ابتدا ۰/۵ گرم نمونه برگی هموژن و به آنها پنج میلی لیتر از محلول ۰/۱٪ تری کلرو استیک اسید (وزنی-حجمی) اضافه و در  $12000 \times \text{g}$  به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس کمپلکس واکنش حاوی ۰/۵ میلی لیتر از سوپرناتانت، ۰/۵ میلی لیتر بافر فسفات ۱۰ میلی مولار (pH=۷) و یک میلی لیتر KI یک مولار تهیه و میزان جذب آنها در طول موج ۳۹۰ نانومتر سنجش گردید. میزان هیدروژن پراکسید با استفاده از منحنی استاندارد به دست آمد.

میزان پروتئین موجود از نمونه های آنزیمی استخراج به روش Bradford (۱۹۷۶) اندازه گیری شد. کمپلکس واکنش

گردید ( $EC_2$ ). در نهایت درصد نشت الکترو لیت ها با استفاده از رابطه ۴ محاسبه شد (Lutts et al., 1995).

$$EL = EC_1 / EC_2 \times 100$$

رابطه ۴

**سنجش فعالیت آنزیمی:** سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز براساس روش Beauchamp و Fridovich (۱۹۷۱) انجام شد. محلول واکنش در حجم نهایی شامل ۸۳۵ میکرو لیتر بافر فسفات سدیم ۵۰ میلی مولار (pH=۸)، ۳۳ میکرو لیتر نیتروبلو تترازولیوم ۰/۷۵ میلی مولار، ۳۳ میکرو لیتر ریوفلاوین و ۳۳ میکرو لیتر عصاره آنزیمی بود. تغییرات جذب محلول واکنش نسبت به شاهد در طول موج ۵۶۰ نانومتر اندازه گیری شد.

فعالیت آنزیم کاتالاز طبق روش Abi (۱۹۸۴) اندازه گیری شد. کمپلکس واکنشی شامل ۱/۵ میلی لیتر از بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی مولار (pH=۷) ۰/۵ میلی لیتر از هیدروژن پراکسید ۷/۵ میلی مولار و ۵۰ میکرو لیتر از محلول آنزیمی بود که حجم نمونه ها با اضافه کردن آب مقطر به ۳ میلی لیتر رسانده شد. با افزودن هیدروژن پراکسید واکنش آغاز و کاهش در جذب نمونه ها در طول موج ۲۴۰ نانومتر در مدت یک دقیقه ثبت گردید. فعالیت آنزیمی از محاسبه میزان هیدروژن پراکسید تجزیه شده توسط آنزیم محاسبه گردید.

کمپلکس واکنشی آنزیم آسکوربات پراکسیداز (۱ میلی لیتر) شامل ۲۵۰ میکرو لیتر از محلول بافر فسفات ۱۰۰ میلی مولار (pH=۷)، ۲۵۰ میکرو لیتر از آسکوربات یک میلی مولار ۲۵۰ میکرو لیتر از EDTA ۰/۴ میلی مولار، ۱۹۰ میکرو لیتر آب دوبار تقطیر، ۱۰ میکرو لیتر از هیدروژن پراکسید ۱۰ میلی مولار و ۵۰ میکرو لیتر از محلول آنزیمی استخراج شده است. واکنش با کامل شدن اجزای ضروری آن یعنی آنزیم استخراج شده سوپسترا و کوفاکتور شروع به فعالیت خواهد کرد. جذب کمپلکس واکنشی در طول موج ۲۹۰ نانومتر در زمان شروع و پس از یک دقیقه یادداشت و با استفاده از ضریب خاموشی  $2/8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Yoshimura et al., 2000).

کمپلکس واکنش آنزیم پراکسیداز (۲ میلی لیتر) شامل یک

ثابت در غلظت صفر کادمیوم،  $x$  غلظت کادمیوم در خاک،  $x_0$  نقطه چرخش بین دو فاز رابطه و  $b_1$  و  $b_2$  شیب تغییرات صفات (کاهشی یا افزایشی) به ترتیب در فاز یک و دو رابطه هستند. رسم منحنی‌ها با نرم‌افزار Excel انجام شد.

### نتایج و بحث

نتایج تجزیه رگرسیونی در بررسی اثر سطوح مختلف کادمیوم خاک بر صفات مورفولوژیکی همانند تعداد برگ، سطح برگ و قطر ساقه نشان داد که روند تغییرات این صفات در پاسخ به افزایش غلظت کادمیوم از رابطه خطی تبعیت نموده و به ترتیب با شیب  $0/024$ ،  $0/0124$  و  $0/0031$  واحد کاهش یافتند (شکل D و C و B).

براساس یافته‌ها، واکنش ارتفاع بوته، وزن خشک برگ (WDL)، ساقه (WDS) و ریشه (WDR) گیاه به تغییرات غلظت کادمیوم خاک به صورت رابطه دوتکه‌ای بیان شد (شکل E و A، جدول ۲). به طوری که ارتفاع بوته، وزن خشک برگ، ساقه و ریشه به ترتیب تا سطح کادمیوم  $36/856$ ،  $53/89$ ،  $55/144$  و  $30/479$  میلی‌گرم در کیلوگرم خاک با شیب زیاد (به ترتیب  $0/186$ ،  $0/287$ ،  $0/196$  و  $0/098$  واحد) و سپس با افزایش غلظت کادمیوم تا  $275$  میلی‌گرم در کیلوگرم خاک با شیب ملایم‌تری (به ترتیب  $0/283$ ،  $0/015$ ،  $0/0021$  و  $0/0011$  واحد) کاهش یافت (شکل E). با این وجود رشد ریشه بیشتر از ساقه تحت تأثیر سطوح بالای کادمیوم کاهش می‌یابد، کاهش رد آن ممکن است به علت جذب اولیه کادمیوم توسط ریشه‌های موئین و انتقال آن به اندام‌های هوایی و یا انباشته شدن فلز سنگین کادمیوم در ریشه باشد (Seregin and Ivanov, 2001). نتایج محققین نشان می‌دهد کاهش رشد بخش هوایی در نتیجه تأثیر کادمیوم می‌تواند به علت کاهش میزان کلروفیل و فعالیت فتوسیستم I که در اثر تنش عناصر سنگین القا می‌شود ایجاد گردد (shah et al., 2001).

در همین راستا، یعقوبیان و همکاران (۱۳۹۵) کاهش ارتفاع بوته در گیاه بادرنجبویه و ولی‌زاده کامران و همکاران (۱۳۹۶) کاهش تعداد برگ در گیاه اسفناج را در اثر عناصر سنگینی

شامل  $100$  میکرولیتر محلول آنزیمی استخراج‌شده،  $200$  میکرولیتر معرف برادفورد و  $700$  میکرولیتر آب دیونیزه است. دو دقیقه پس از تشکیل کمپلکس فوق، معرف برادفورد حداکثر ترکیب را با اسیدهای آمینه آروماتیک نظیر آرژنین از خود نشان می‌دهد.

برای استخراج و سنجش پرولین از روش Bates و همکاران (۱۹۷۳) استفاده گردید. بدین منظور،  $0/2$  گرم از بافت برگ در  $2$  میلی‌لیتر اسیدسولفو سالیسیلیک سه درصد (W/V) کاملاً ساییده و همگن شد. پس از سانتریفیوژ در  $5000 \times g$  به مدت  $10$  دقیقه، یک میلی‌لیتر از محلول بالایی با یک میلی‌لیتر از معرف نین‌هیدرین و یک میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال مخلوط و به مدت یک ساعت در حمام آب  $100$  درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. مخلوط واکنش با  $2$  میلی‌لیتر تولوئن جدا شده و در طول موج  $520$  نانومتر خوانده شد. در نهایت با استفاده از منحنی استاندارد، مقدار پرولین براساس میکرومول پرولین در گرم وزن تر برگ محاسبه گردید.

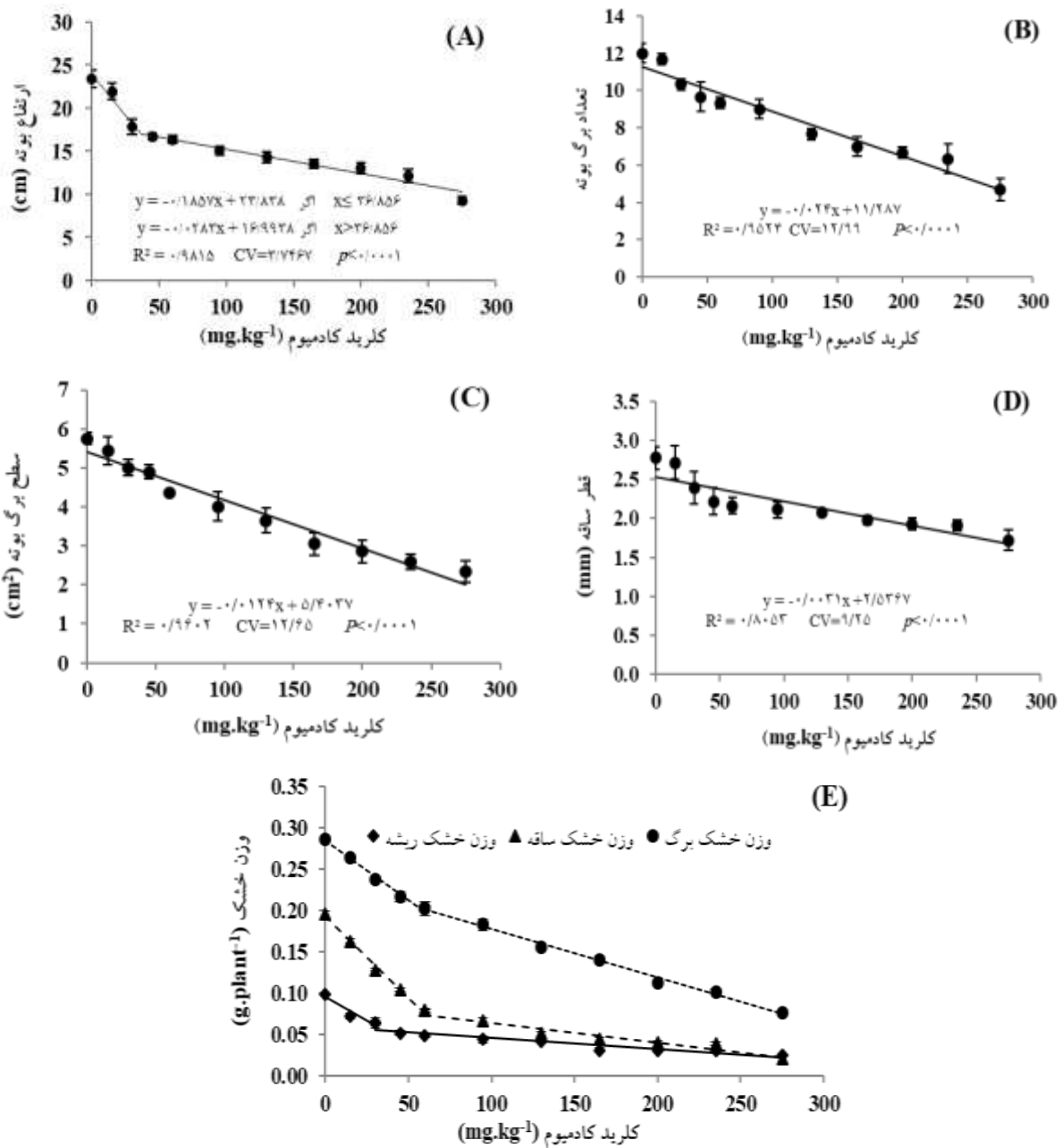
پس از نمونه‌برداری برای صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی، بوته‌های باقیمانده کف بر و صفات مورفولوژیکی شامل ارتفاع بوته، قطر ساقه (با کولیس دیجیتالی)، تعداد برگ در بوته و سطح برگ بوته (با نرم‌افزار Digimaizer نسخه ۴/۱) و همچنین وزن خشک اندام‌های رویشی شامل برگ، ساقه و ریشه اندازه‌گیری گردید. جهت تعیین وزن خشک اندام‌های گیاهی، نمونه‌ها به مدت  $72$  ساعت در آون و در دمای  $70$  درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. در نهایت، داده‌های هر یک از صفات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و آنزیمی با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS نسخه ۹/۱ مورد تجزیه قرار گرفت. برای توصیف صفات رویشی و پارامترهای فیزیولوژیکی و آنزیمی از رابطه‌های خطی (رابطه ۵) و دوتکه‌ای (رابطه ۶) پیشنهاد شده توسط Soltani و همکاران (۲۰۰۶) استفاده شد.

$$y = b_1x + a \quad \text{رابطه ۵}$$

$$y = b_1x + a \quad \text{if } x \leq x_0 \quad \text{رابطه ۶}$$

$$y = (b_1x_0 + a) + b_2(x - x_0) \quad \text{if } x > x_0$$

که در آن،  $y$  مقدار پیش‌بینی شده برای صفات مورد نظر،  $a$  مقدار



شکل ۱- روند تغییرات ارتفاع بوته (A)، تعداد برگ بوته (B)، سطح برگ بوته (C) قطر ساقه (D) و وزن خشک برگ، ساقه و ریشه (E) گیاه دارویی خرفه در پاسخ به افزایش غلظت کادمیوم خاک با استفاده از مدل خطی (رابطه ۵) و دوتکه‌ای (رابطه ۶). میله‌ها نشان‌دهنده خطای استاندارد (SE) و N=۳ است.

محققان بیان داشتند که کاهش رشد ناشی از سمیت کادمیوم، به‌علت کاهش فتوسنتز و تنفس (Moya *et al.*, 1993)، کاهش متابولیسم کربوهیدرات‌ها و ایجاد کلروز است (Sanita *et al.*, 1999). همبستگی مثبت و معنی‌دار بین وزن خشک برگ و ساقه با میزان دو کلروفیل *a* و *b* نیز بر

همچون سرب و کادمیوم گزارش نمودند. بررسی‌ها نشان می‌دهد که این فلز بر تقسیم و رشد سلول‌ها، تقسیم سلولی منطقه مرستمی و تنظیم رشد و نمو گیاهان اثر می‌گذارد و باعث کاهش تعداد گره‌ها و فاصله بین آنها شده و به‌دنبال آن ارتفاع گیاه کاهش می‌یابد (Das *et al.*,

جدول ۲- برآورد مقادیر پارامترهای مربوط به معادلات برازش یافته (خطی و دوتکه‌ای) بر پاسخ مؤلفه‌های گیاه دارویی خرفه نسبت به غلظت کادمیوم در خاک

صفات	a±SE	b <sub>1</sub> ±SE	b <sub>2</sub> ±SE	X <sub>0</sub> ±SE	R <sup>2</sup>	RMSE	CV	Sig
برگ	۰/۲۸۷±۰/۰۰۳	-۰/۰۰۱۵±۰/۰۰۰۱	-۰/۰۰۰۶±۰/۰۰۰۰۲	۵۳/۸۹±۴/۲۴	۰/۹۹۸	۰/۰۰۳	۱/۶۴	<۰/۰۰۰۱
وزن خشک ساقه	۰/۱۹۶±۰/۰۰۵	-۰/۰۰۰۲۱±۰/۰۰۰۰۲	-۰/۰۰۰۰۲±۰/۰۰۰۰۳	۵۵/۱۴۴±۴/۷۲	۰/۹۹	۰/۰۰۶	۶/۹۵	<۰/۰۰۰۱
ریشه	۰/۰۹۸۱±۰/۰۰۴	-۰/۰۰۰۱۱±۰/۰۰۰۰۲	۰/۰۰۰۰۱±۰/۰۰۰۰۲	۳۰/۴۷۹±۵/۱۸۵	۰/۹۷۱	۰/۰۰۴	۸/۴۷	<۰/۰۰۰۱

a: عرض از مبدأ در سطح بدون تنش (غلظت صفر کادمیوم). b<sub>1</sub> و b<sub>2</sub>: شیب تغییرات مؤلفه به ترتیب در مرحله ۱ و ۲. X<sub>0</sub>: نقطه چرخش بین دو مرحله. R<sup>2</sup>: ضریب تبیین. RMSE: جذر میانگین مربعات خطا. CV: ضریب تغییرات. Sig: معنی داری مدل. SE: خطای استاندارد

جدول ۳- همبستگی بین صفات رویشی، فیزیولوژیکی و آنزیمی

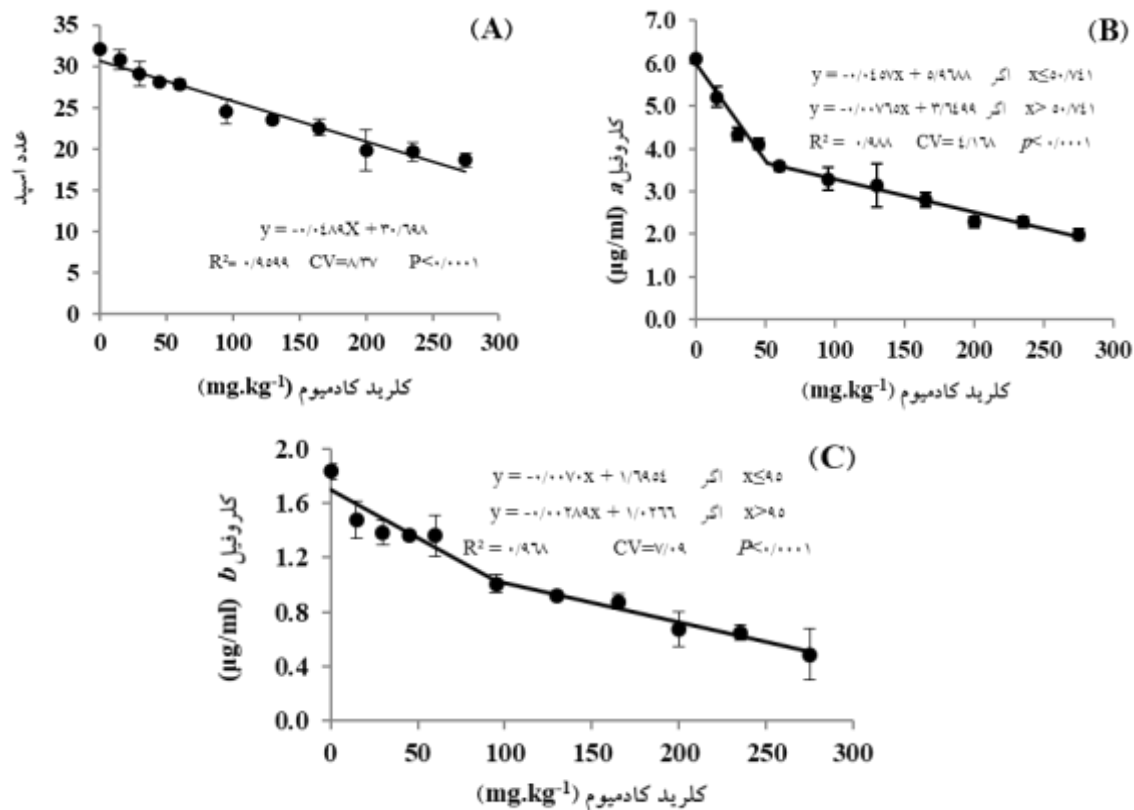
	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱۴
	CAT	POX	SOD	APX	MDA	Proilin	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Protein	EL	RWC	Chl a	Chl b	WDL	WDS
۱	۱													
۲	۰/۵۱	۱												
۳	۰/۱۲	۰/۸۶**	۱											
۴	۰/۳۷	۰/۹۷**	۰/۹۱**	۱										
۵	-۰/۹۶**	-۰/۶۱*	-۰/۲۵	-۰/۴۹	۱									
۶	-۰/۹۳**	۰/۲۹	۰/۰۹۶	۰/۱۳	۰/۸۳**	۱								
۷	-۰/۹۵**	-۰/۳۰	۰/۰۷	-۰/۱۵	۰/۹۰**	۰/۹۷**	۱							
۸	۰/۹۵**	۰/۳۰	-۰/۰۸	۰/۱۴	-۰/۹۰**	-۰/۹۶**	-۰/۹۹**	۱						
۹	-۰/۹۴**	-۰/۶۶*	-۰/۳۱	-۰/۵۷	۰/۹۸**	۰/۷۸**	-۰/۸۴**	-۰/۸۴**	۱					
۱۰	۰/۹۹**	۰/۵۲	۰/۱۳	۰/۳۶	-۰/۹۵**	-۰/۹۴**	-۰/۹۵**	۰/۹۵**	-۰/۹۰**	۱				
۱۱	۰/۹۷**	۰/۵۴	۰/۱۵	۰/۳۹	-۰/۹۲**	-۰/۹۶**	-۰/۹۵**	۰/۹۴**	-۰/۸۹**	۰/۹۸**	۱			
۱۲	۰/۹۲**	۰/۲۷	-۰/۱۴	۰/۱۰	-۰/۸۳**	-۰/۹۹**	-۰/۹۷**	۰/۹۷**	-۰/۷۷**	۰/۹۴**	۰/۹۵**	۱		
۱۳	۰/۹۶**	۰/۳۶	-۰/۰۳	۰/۱۹	-۰/۸۷**	-۰/۹۹**	-۰/۹۸**	۰/۹۷**	-۰/۸۳**	۰/۹۷**	۰/۹۷**	۰/۹۹**	۱	
۱۴	۰/۸۲**	۰/۵۴	۰/۲۱	۰/۳۹	۰/۸۱**	-۰/۶۹*	-۰/۷۴**	۰/۷۵**	-۰/۷۹**	۰/۸۱**	۰/۷۸**	۰/۶۹*	۰/۷۷**	۱

\* و \*\* به ترتیب نشان دهنده همبستگی معنی دار در سطح ۰/۰۵ و ۰/۰۱ درصد است.

وضعیت آب گیاه، زیست توده کاهش می یابد (کرامت و همکاران، ۱۳۹۳). کاهش در جذب و یا از دست رفتن آب به دنبال آسیب غشایی، از دلایل اصلی کاهش وزن گیاه است (Babula et al., 2009).

نتایج حاکی از کاهش معنی دار رنگیزه‌های فتوسنتزی (سبزیگی برگ و کلروفیل a و b) در گیاه خرفه با افزایش غلظت کادمیوم خاک بود. به صورتی که روند تغییرات سبزیگی برگ در برابر غلظت کادمیوم خاک (شکل ۲A) بیانگر پاسخ

این موضوع تأکید می کند (جدول ۳). در همین زمینه، اثر سمیت کادمیوم در رشد رویشی گیاه به صورت گسترده در گونه‌های مختلف گیاهی مانند اسفناج، گل همیشه بهار، رازیانه، گوجه فرنگی، بادرنجبویه و گیاه *Matthiola chenopodiifolia* مورد بررسی قرار گرفته است (ولی زاده کامران و همکاران، ۱۳۹۶؛ اسکندری و همکاران، ۱۳۹۶؛ رحیمی و همکاران، ۱۳۹۷؛ یعقوبیان و همکاران، ۱۳۹۵ و قادریان و حاجیان، ۱۳۸۹). گزارش‌هایی نیز وجود دارد که به علت تغییر در



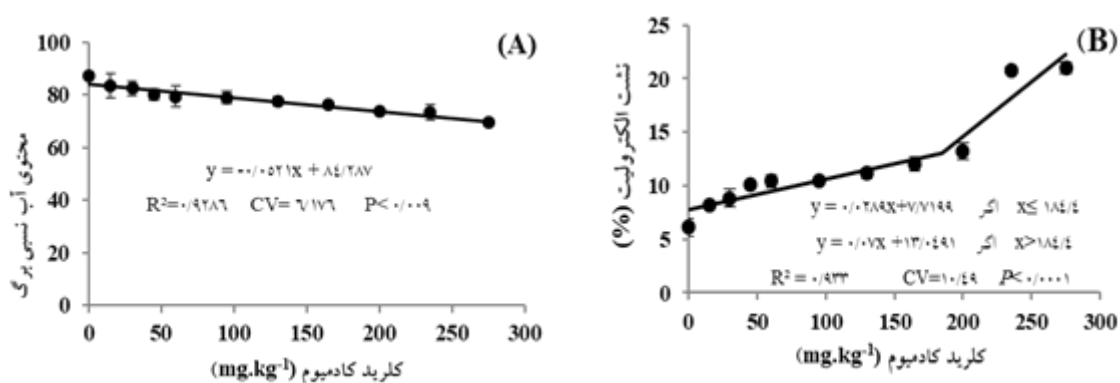
شکل ۲- روند تغییرات عدد اسید (A)، کلروفیل a (B) و کلروفیل b (C) گیاه دارویی خرفه در پاسخ به افزایش غلظت کادمیوم خاک با استفاده از مدل خطی (رابطه ۵) و دوتکه‌ای (رابطه ۶). میله‌ها نشان‌دهنده خطای استاندارد (SE) و  $N=3$  است.

کادمیوم و تنش اسمزی ناشی از آن با تولید گونه‌های اکسیژن واکنش‌گر در غشای تیلاکوئید باعث کاهش محتوای رنگدانه‌های فتوسنتزی برگ می‌گردد (Vassilev *et al.*, 1997). تشکیل گونه‌های اکسیژن واکنش‌گر در کلروپلاست، به‌علت کاهش فعالیت فتوسیستم II، کاهش فعالیت آنزیم روبیسکو و مهار سنتز ATP افزایش می‌یابد. لذا به‌نظر می‌رسد تخریب کلروفیل با گونه‌های واکنش‌گر، باعث کاهش میزان کلروفیل‌های a و b در شرایط تنش شده است. کاهش میزان کلروفیل می‌تواند به‌علت تغییر مسیر متابولیسم نیتروژن به سمت ساخت ترکیباتی مانند پرولین باشد، که در تنظیم اسمزی بکار می‌رود (Lawlor, 2002). همبستگی منفی و معنی‌دار بین محتوای پرولین با میزان کلروفیل‌های a ( $r^2 = -0.91^{**}$ ) و b ( $r^2 = -0.99^{**}$ ) نیز این موضوع را تأیید می‌کند (جدول ۳).

همچنین در این آزمایش، افزایش تنش کادمیوم به‌طور

خطی و منفی این صفت نسبت به افزایش غلظت عنصر سنگین کادمیوم در خاک بود. این صفت، با افزایش غلظت کادمیوم خاک از صفر به ۲۷۰ میلی‌گرم در کیلوگرم با شیب  $0.0489$  واحد در میلی‌گرم کادمیوم خاک کاملاً محسوسی نشان داد. روند تغییرات کلروفیل a و b به‌صورت دوتکه‌ای و کاهشی بود (شکل C و B). در غلظت‌های پایین کادمیوم (حدود صفر تا ۵۱ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک)، میزان کلروفیل a در مقایسه با کلروفیل b حساسیت بیشتری نسبت به سمیت کادمیوم نشان داد. به‌طوری‌که میزان کلروفیل a در غلظت حدود ۵۱ میلی‌گرم در کیلوگرم حدود ۳۹ درصد کاهش یافت، در صورتی‌که این میزان کاهش برای کلروفیل b در غلظت ۹۵ میلی‌گرم مشاهده گردید (شکل C و B). بررسی‌ها نشان داده است که تنش‌های محیطی از جمله کادمیوم سبب کاهش رنگیزه‌های فتوسنتزی در گیاهان عالی می‌گردد (یعقوبیان و همکاران، ۱۳۹۵؛ رحیمی و همکاران، ۱۳۹۷). به‌عبارت دیگر





شکل ۳- روند تغییرات محتوی آب نسبی برگ (A) و میزان نشت الکترولیت (B) گیاه دارویی خرفه در پاسخ به افزایش غلظت کادمیوم خاک با استفاده از مدل خطی (رابطه ۵) و دو تکه‌ای (رابطه ۶). میله‌ها نشان‌دهنده خطای استاندارد (SE) و N=۳ است.

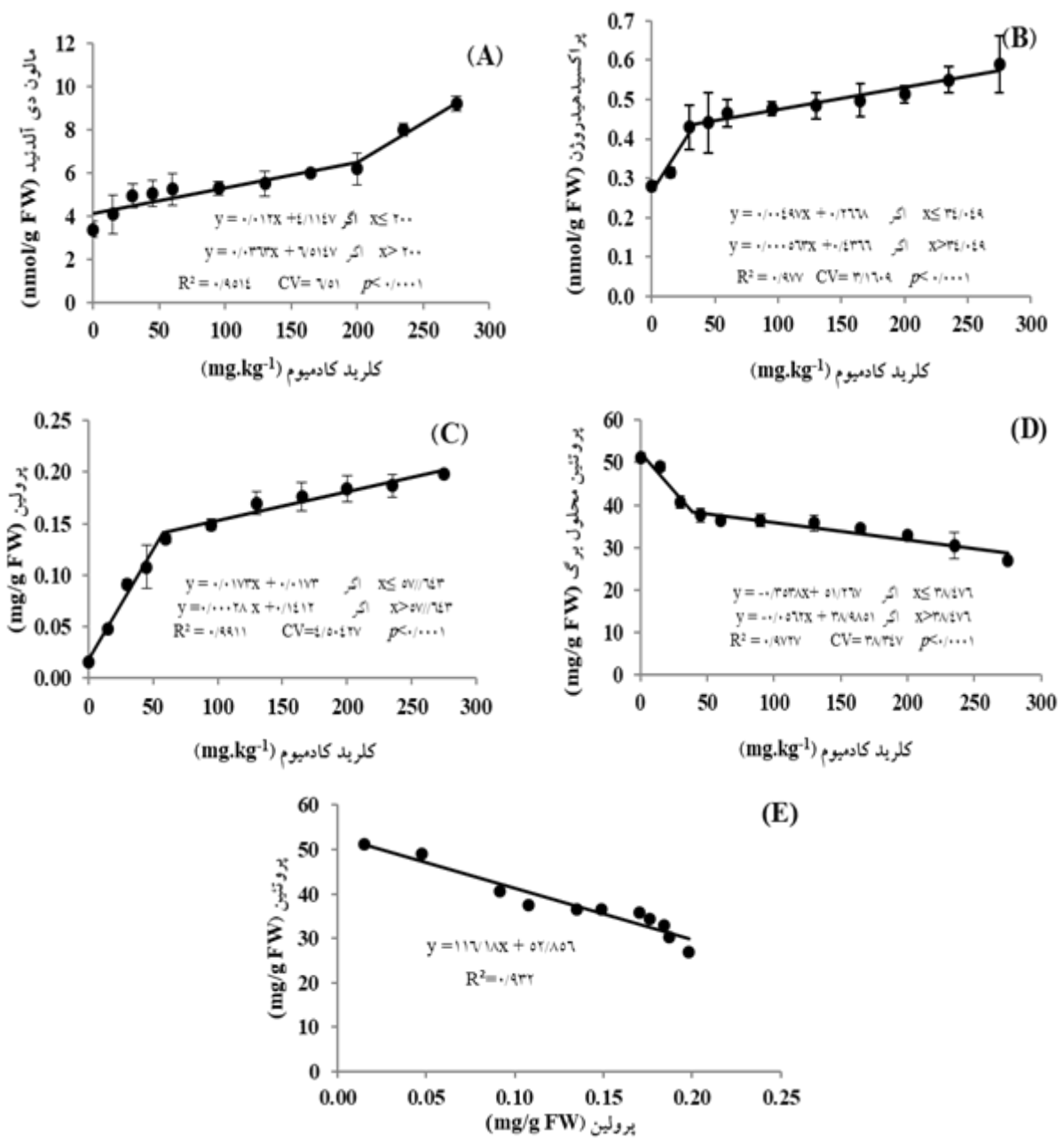
نشت الکترولیت در مطالعات سایر پژوهشگران در گیاهانی همچون ذرت (پوراکبر و ابراهیم‌زاده، ۱۳۹۳) تحت تنش عناصر سنگین مس و نیکل و اسفرزه (حسین‌زاده و همکاران، ۱۳۹۵) تحت تنش شوری نیز گزارش شده است.

روند تغییرات میزان تولید هیدروژن پراکسید، مالون دی‌آلدئید، پرولین و پروتئین محلول برگ در پاسخ به افزایش غلظت کادمیوم خاک، به صورت رابطه دو تکه‌ای بود (شکل ۴). آسیب کادمیوم به آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی گوناگون، دلیل عمده برای کاهش یکپارچگی غشا و افزایش سطوح مالون دی‌آلدئید و در نهایت نفوذپذیری غشا است (Gallego *et al.*, 2012). بدین ترتیب انتظار می‌رود که با افزایش غلظت کادمیوم کلرید میزان مالون دی‌آلدئید نیز افزایش داشته باشد. در این پژوهش میزان تغییرات مالون دی‌آلدئید و هیدروژن پراکسید در بالاترین غلظت کادمیوم خاک (۲۷۵ میلی‌گرم در کیلوگرم) نسبت به سطح صفر (شاهد) بیش از یک برابر (شکل B و A) افزایش یافت. افزایش میزان مالون دی‌آلدئید به عنوان یک نشانگر برای تنش اکسیداتیو بیانگر آسیب به لیپیدهای غشایی است (Jiang and Huang, 2001). افزایش نسبی مالون دی‌آلدئید پیش‌تر نیز در گیاهانی مانند استویا (نوری آکندی و همکاران، ۱۳۹۶) تحت تنش شوری و بامیه (جامعی و خرمی، ۱۳۹۴) تحت تنش فلزات سنگین گزارش شده است.

همچنین نتایج نشان داد که روند تغییرات هیدروژن پراکسید در سطوح کمتر (صفر تا ۳۴ میلی‌گرم) کادمیوم نسبت

معنی‌داری میزان محتوی آب نسبی برگ را (۱۷/۶۵ درصد) کاهش داد (شکل ۳A). به نظر می‌رسد که حضور کادمیوم به دلیل کاهش محدودیت جذب آب ناشی از تنش، محتوی آب نسبی برگ‌ها را کاهش داده است. از طرفی فلزات سنگین با ایجاد ممانعت از حرکت آب از ریشه به بخش‌های بالاتر گیاهان، باعث دهیدراته شدن برگ و سایر قسمت‌های گیاه می‌گردند (Chen *et al.*, 2004). طبق تحقیقاتی که بر روی تنش خشکی توسط Haspel-Harvatovic و همکاران (۱۹۸۱) انجام شد ثابت شده است، زمانی کلروفیل شروع به تجزیه شدن می‌کند که وضعیت آب برگ از حد معین کمتر شود. کاهش همزمان کلروفیل‌های *a* و *b* و محتوی آب نسبی برگ در برگ‌های خرفه و همبستگی مثبت و معنی‌دار (به ترتیب  $r^2 = 0.98^{**}$  و  $r^2 = 0.94^{**}$  بین آنها (جدول ۳) نیز عدم توانایی کلروفیل در بقا در برابر تنش کادمیوم را نشان می‌دهد.

روند تغییرات نشت الکترولیتی غشا در برابر افزایش سمیت کادمیوم به صورت دو تکه‌ای بود (شکل ۳B). نشت الکترولیت در سطوح پایین کادمیوم با شدت و شیب ملایمی تری نسبت به سطوح بالاتر کادمیوم (از ۱۸۴/۴ تا ۲۷۵ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک) افزایش یافت به طوری که در بالاترین سطح کادمیوم نسبت به سطح صفر آن به بیش از یک برابر رسید. این نتایج بیانگر حساسیت زیاد ساختار غشای پلاسمایی نسبت به سمیت کادمیوم است (Hatata and Abdel-Aal, 2008). افزایش میزان



شکل ۴- روند تغییرات محتوی نسبی مالون دی آلدئید (A)، پراکسید هیدروژن (B)، پروتئین (C)، پروتئین محلول برگ (D) و رابطه بین میزان پروتئین با پروتئین (E) گیاه دارویی خرفه در پاسخ به افزایش غلظت کادمیوم خاک با استفاده از مدل دو تکه‌ای (رابطه ۶). میله‌ها نشان‌دهنده خطای استاندارد (SE) و N=۳ است.

تجمع میزان  $H_2O_2$  می‌تواند ناشی از افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی از جمله سوپراکسید دیسموتاز (SOD) باشد. چرا که فعالیت SOD در مسیر جمع‌آوری گونه‌های اکسیژن واکنش‌گر، رادیکال سوپراکسید ( $O_2^-$ ) را به  $H_2O_2$  تبدیل می‌سازد (Lomonte et al., 2010). همچنین نتایج حاکی از افزایش ۱۰ برابری میزان پروتئین در بالاترین سطح کادمیوم

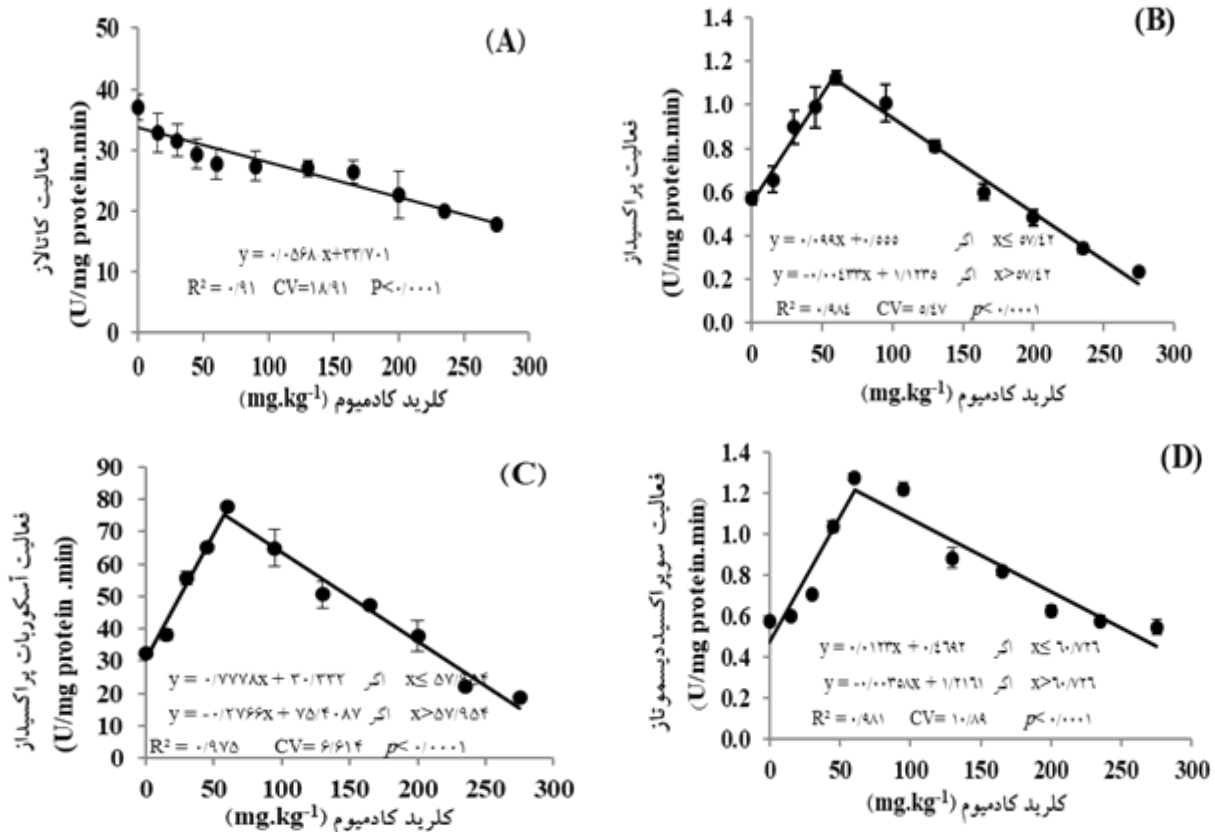
به سطوح بالاتر آن (۳۴ تا ۲۷۵ میلی‌گرم) با شیب افزایشی بیشتر و محسوس‌تری (حدود ۶۴ درصد) نسبت به شاهد افزایش یافت (شکل ۴B). در آزمایش‌های متعدد افزایش میزان هیدروژن پراکسید تحت تنش سمیت کادمیوم در گیاهان مختلف گزارش شده است (Chen et al., 2007؛ کرامت و همکاران، ۱۳۹۳).

همبستگی منفی و معنی‌داری ( $r^2 = -0/96^{**}$ ) بین آنها وجود دارد. بنابراین تحت شرایط تنش شدید افزایش چشمگیر غلظت پرولین به‌همراه کاهش معنی‌دار پروتئین محلول در برگ‌های خرفه را می‌توان هم به تخریب پروتئین و هم کاهش سنتز آن نسبت داد. به‌عبارت دیگر، کاهش مصرف پرولین در طی تنش فلز سنگین کادمیوم می‌تواند دلیل احتمالی تجمع آن باشد (بارنده و کاوسی، ۱۳۹۵).

در پژوهش‌های قبلی مشخص شده است که گیاهان در شرایط مواجهه با انواع تنش‌ها از طریق فعال‌سازی انواع متابولیت‌ها و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی غلظت گونه‌های اکسیژن واکنش‌گر را کنترل می‌کنند (Luo et al., 2011; Manara, 2012). همچنین دیسموتاسیون آنیون‌های سوپراکسید توسط آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و به‌دنبال آن افزایش کاتالاز و جاروب‌کردن  $H_2O_2$  سبب تنظیم فعالیت پراکسیدازهای مختلف سلول از جمله آسکوربات پراکسیداز می‌گردد (قناتی و نعمتی، ۱۳۸۹).

در بررسی پاسخ فعالیت سه آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز نسبت به افزایش سمیت عنصر سنگین کادمیوم مشاهده گردید که روند تغییرات آنها به‌صورت دوتکه‌ای و کاتالاز به‌صورت خطی بود (شکل ۵). بر این اساس فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز با افزایش غلظت عنصر سنگین (تا غلظت حدود ۶۰ میلی‌گرم در کیلوگرم) بیشتر شد. این نتایج می‌تواند بیانگر این مسئله باشد که سازوکار تحمل در گیاه خرفه با افزایش معنی‌دار فعالیت سه آنزیم مذکور در غلظت‌های نسبتاً پایین یا متوسط کادمیوم (تا سطح ۶۰ میلی‌گرم در کیلوگرم کادمیوم خاک)، است اما اثرات نامطلوب کادمیوم تأثیری بازدارنده بر این تغییرات داشت. از طرفی، افزایش بیشتر کادمیوم منجر به کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی گردید. نتایج همانندی در پینه گیاه *Cusuta reflexa* تحت تیمار با کادمیوم گزارش شده است (Srivastava et al., 2004). بنابراین با وجود فعال‌شدن سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی، سمیت زیاد اعمال شده به‌وسیله کادمیوم در غلظت بیش از ۶۰

نسبت به شاهد (سطح صفر) بود (شکل ۴C). افزایش میزان پرولین تحت تنش کادمیوم در گیاهچه ذرت نیز مشاهده گردید (Mohsenzadeh et al., 2011). نقش واقعی پرولین در سازگاری اسمزی بحث برانگیز است به‌طوری‌که در برخی مطالعات از تجمع آن به‌عنوان نشانه‌ای مبنی بر افزایش تحمل گیاهان نسبت به انواع حساس یاد می‌گردد (Nayyar and Wali, 2003) و از طرفی در تحقیقاتی دیگر تجمع آن را نشانه‌ی آسیب به غشا سلولی می‌دانند (De Lacerda et al., 2003). نتایج حاصل از تحقیقات Zhao (۲۰۱۱) نیز نشان داد که تحت تنش کادمیوم میزان پرولین در برگ گیاهانی چون ذرت و گندم افزایش یافت. پرولین به‌عنوان اسمولیت انباشته‌شده در شرایط تنش فعالیت می‌کند (Shah et al., 2001) و تجمع آن در شرایط تنش ممکن است به‌دلیل اکسیداسیون پرولین یا تحریک سنتز آن از گلوتامات یا افزایش فعالیت آنزیم پروتئاز به‌عنوان اولین نقش محافظت‌کنندگی آنزیم‌های سیتوزولی (حفاظت از آنزیم کربوکسیلاز) ساختار سلولی باشد (Sharma and Kuhad, 2006) پرولین افزون بر تنظیم pH سلول در شرایط تنش فلزات سنگین با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی از جمله سوپراکسید دیسموتاز سبب کاهش آسیب‌های ناشی از گونه‌های اکسیژن واکنش‌گر می‌شود (Zhang et al., 2010; Schaller et al., 2003). در این آزمایش دو صفت مذکور دارای همبستگی مثبت هستند که البته این همبستگی معنی‌دار نیست. برخلاف سه پارامتر مذکور، روند تغییرات پروتئین محلول برگ در قبال افزایش کادمیوم به‌صورت کاهشی بوده به‌طوری‌که با افزایش غلظت کادمیوم خاک از صفر تا ۳۸/۹۸۵ میلی‌گرم در کیلوگرم با شیب ۰/۳۵۴ کاهش یافت و با افزایش بیشتر غلظت کادمیوم، شیب تغییرات آن (۰/۰۴۱۷ واحد) ملایم‌تر گردید (شکل ۴D). علت کاهش محتوی پروتئین می‌تواند ناشی از تولید گونه‌های واکنش‌گری باشد که منجر به اکسیداسیون اسیدهای آمینه و درنهایت آسیب به ساختار و عملکرد پروتئین‌ها می‌شود (امینی و حداد، ۱۳۹۲). در مجموع، با افزایش غلظت کادمیوم از مقدار پروتئین محلول برگ برعکس غلظت پرولین کاسته شد. به‌صورتی‌که



شکل ۵- روند تغییرات آنزیم کاتالاز (A)، پراکسیداز (B)، آسکوربات پراکسیداز (C) و سوپراکسید دیسموتاز (D) گیاه دارویی خرفه در پاسخ به افزایش غلظت کادمیوم خاک با استفاده از مدل دو تکه‌ای (رابطه ۶). میله‌ها نشان‌دهنده خطای استاندارد (SE) و N=۳ است.

(John et al., 2008) گردید.

از طرفی فعالیت آنزیم کاتالاز برخلاف سایر آنزیم‌ها از ابتدای مواجهه با تنش و با افزایش آن به صورت خطی و با شیب  $0.0568$  کاهش یافت. کاتالازها آنزیم‌های تترامیک حاوی گروه هم هستند که توانایی تبدیل مستقیم هیدروژن پراکسید ( $H_2O_2$ ) (محصول سمی ناشی از فعالیت سوپراکسید دیسموتاز) به  $H_2O$  و  $O_2$  را دارند و برای سم‌زدایی ROS در شرایط تنش ضروری هستند (Gill and Tuteja, 2010). البته باید در نظر داشت که فعالیت این آنزیم بیشتر متوجه از بین بردن هیدروژن پراکسید تولیدشده در شرایط فیزیولوژیک است، ولی با افزایش بیش از حد هیدروژن پراکسید خارج از توانایی آنزیم‌های دیگر پاداکسندگی، آنزیم کاتالاز نیز با افزایش فعالیت می‌تواند در سرکوب کردن ROSها مشارکت کند. از طرفی محققین دیگر کاهش در فعالیت آنزیم کاتالاز را به‌عنوان یک پاسخ عمومی

میلی‌گرم در کیلوگرم خاک، به‌علت تولید ترکیبات گونه‌های اکسیژن واکنش‌گر سبب کاهش کارکرد این سیستم دفاعی در این گیاه همانند گیاه گوجه‌فرنگی (Chamseddine et al., 2009) خواهد شد. هاشمی و همکاران (۱۳۹۵) نیز در بررسی اثر سمیت کادمیوم بر الگوی بیان ژن و فعالیت آنزیمی سوپراکسید دیسموتاز و آسکوربات پراکسیداز در گیاهچه‌های نخود (*Cicer arietinum L.*) به نتایج مشابهی دست یافتند. افزایش مشابهی در فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و آسکوربات پراکسیداز (APX) در پاسخ به کادمیوم در گیاه *Phragmites australis* گزارش شده است (Iannelli et al., 2002). همچنین افزایش کادمیوم سبب القا فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در چاودار (Luo et al., 2011) و لوبیا (احمدوند و همکاران، ۱۳۹۱) و آسکوربات پراکسیداز در عدس (احمدپور و همکاران، ۱۳۹۶) و

می‌گردد که میزان تولید  $H_2O_2$  به میزان بیشتر اما با شیب کمتری افزایش می‌یابد. به نظر می‌رسد در پژوهش حاضر، آنزیم کاتالاز در کاهش آثار تنش کادمیوم نقشی نداشته است، که نتیجه آن تجمع هیدروژن پراکسید و مالون دی‌آلدئید خواهد بود که در این آزمایش مشاهده شد. همبستگی منفی و معنی‌دار مالون دی‌آلدئید ( $r^2 = -0/96^{**}$ ) و هیدروژن پراکسید ( $r^2 = -0/95^{**}$ ) با کاتالاز نیز بر این موضوع تأکید می‌کند (جدول ۳). بررسی‌های انجام‌شده در زمینه تنش‌های غیرزیستی، افزایش و یا کاهش فعالیت کاتالاز را گزارش داده‌اند. این تفاوت‌ها می‌تواند مربوط به تفاوت در گونه‌های گیاهی، شدت تنش و یا زمان‌های نمونه‌برداری باشد. کاهش آنزیم کاتالاز با افزایش تنش توسط پژوهشگران دیگر از جمله Ebrahim و همکاران (۲۰۱۲) نیز گزارش شده است. برخی از پژوهشگران بر این اعتقادند که کاهش سنتز پروتئین‌ها بر اثر تنش‌های شدید محیطی منجر به کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز می‌گردد (Khanna-Chopra and Selote, 2007). همبستگی مثبت معنی‌دار بین میزان فعالیت کاتالاز و محتوای پروتئین محلول برگ ( $r^2 = 0/95^{**}$ ) نیز بر این موضوع تأکید می‌کند (جدول ۳).

### نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش حاکی از این است که افزایش تنش کادمیوم منجر به کاهش شاخص‌های رویشی شده و سیستم دفاعی گیاه خرفه را تضعیف می‌کند. به‌علت آثار منفی حضور کادمیوم در خاک و جذب کم آب و عناصر غذایی و تأثیر سو این عنصر بر فتوسنتز و محتوای کلروفیل، انرژی لازم برای رشد مناسب ریشه و اندام هوایی در اختیار آنها قرار نمی‌گیرد. از طرفی افزایش محتوای پروتئین می‌تواند عامل مهمی در بالابردن میزان مقاومت به تنش باشد. ظرفیت و توانایی فعالیت آنتی‌اکسیدانی در گیاهان نشان‌دهنده مقاومت گیاهان در برابر تنش‌های مختلف است، که این رویداد در غلظت‌های پایین تنش کادمیوم (کمتر از ۶۰ میلی‌گرم در کیلوگرم) در این آزمایش قابل مشاهده بود. در پژوهش حاضر آنزیم کاتالاز نقش چندانی

در بسیاری از تنش‌های شدید محیطی مانند شوری، خشکی، سرما و تنش فلزات سنگین گزارش نموده‌اند. Shah و همکاران (۲۰۰۱) کاهش فعالیت کاتالاز را به‌علت بازدارندگی از سنتز این آنزیم و یا تغییر در تجمع زیر واحدهای آن دانسته‌اند. Chen و همکاران (۲۰۰۷) نیز کاهش فعالیت کاتالاز در برگ‌های برنج را تحت تیمار کادمیوم گزارش نمودند. این محققان علت کاهش فعالیت کاتالاز را مربوط به اثرات سمی کادمیوم در افزایش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن به‌ویژه هیدروژن پراکسید در برگ‌ها دانسته‌اند (Chen et al., 2007; Moya et al., 1993).

از طرفی در این مطالعه همبستگی مثبت و معنی‌داری بین فعالیت سه آنزیم SOD، GPX و APX مشاهده شد که می‌تواند دلیل غیرمستقیمی بر افزایش فعالیت گونه‌های اکسیژن واکنش‌گر از جمله هیدروژن پراکسید ( $H_2O_2$ ) تحت تنش کادمیوم در گیاه خرفه باشد. به اعتقاد Dixit و همکاران (۲۰۱۱) تجمع  $H_2O_2$ ، نتیجه تولید گونه‌های اکسیژن واکنش‌گر و افزایش فعالیت SOD در سلول است. هر چند با افزایش غلظت کادمیوم به بیش از ۶۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک، میزان تولید ترکیبات سمی ROS با شیب کمتری افزایش پیدا کرده اما فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی پس از این غلظت کاهش یافتند. به نظر می‌رسد در غلظت‌های پایین کادمیوم سوپراکسید دیسموتاز، که اولین و مهم‌ترین آنزیم در فرآیند سمیت‌زدایی ترکیبات ROS است، با تبدیل رادیکال سوپراکسید ( $O_2^-$ ) به  $H_2O_2$  در سیتوسول، کلروپلاست و میتوکندری، نقش حیاتی در سازوکارهای دفاعی سلول در برابر خطر تشکیل رادیکال‌های هیدروکسیل (OH) ایفا می‌کند اما این افزایش مانع از کاهش شاخص‌های رویشی در گیاه نگردد. از طرفی هیدروژن پراکسید حاصله از فعالیت آنزیم SOD در مرحله بعد توسط آنزیم‌های نظیر کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز پاکسازی خواهند شد اما در این آزمایش افزایش سمیت کادمیوم منجر به کاهش شدید در فعالیت آنزیم کاتالاز گردید؛ لذا فعالیت آنزیم‌های دیگر از جمله SOD نیز در سطوح بالای کادمیوم کاهش یافته و در نتیجه مشاهده

کمتر از ۶۰ میلی‌گرم حدود ۵۰ درصد از تجمع ماده خشک و کارکرد سیستم‌های دفاعی نسبت به شاهد کاهش یافته و همچنین قابلیت زنده‌مانی این گیاه تا غلظت ۲۷۵ میلی‌گرم در کیلوگرم کادمیوم در خاک، می‌توان بیان داشت این گیاه دارای توانایی زیستی نسبتاً مناسب و بالا در محیط‌های آلوده به کادمیوم است.

### سپاسگزاری

بدین وسیله از مسئولین پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان به‌خاطر حمایت‌های مالی جهت انجام این پژوهش تشکر و قدردانی می‌گردد.

در کاهش آثار سمیت کادمیوم نداشته و نتیجه آن تجمع هیدروژن پراکسید و مالون دی‌آلدئید خواهد بود که در این آزمایش مشاهده گردید. از سوی دیگر گیاه برای مقابله با این تغییرات، محتوای پروتئین محلول را کاهش و محتوای پرولین را افزایش داد. همچنین گیاه در زمان آغازین رویارویی با تنش تا غلظت ۶۰ میلی‌گرم در کیلوگرم کادمیوم فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی از قبیل SOD، POX و APX را افزایش داد، اما اثرات نامطلوب کادمیوم تأثیری بازدارنده بر این تغییرات داشت به‌طوری‌که با افزایش غلظت کادمیوم از ۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم فعالیت سه آنزیم مذکور نیز کاهش یافت. از طرفی با توجه به این نکته که غلظت‌های مورد استفاده در این آزمایش بسیار بالاتر از سطح کادمیوم موجود در خاک‌های زراعی و همچنین حد مجاز این عنصر در خاک است و در غلظت‌های

### منابع

- احمدپور، ر.، حسین‌زاده، س.، آرمن، ن. و چاشنیانی، س. (۱۳۹۶) ارزیابی خصوصیات رشدی، رنگدانه‌های فتوسنتزی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان ارقام عدس در پاسخ به تنش آبی. یافته‌های نوین در علوم زیستی ۳: ۲۳۵-۲۲۶.
- احمدوند، س.، رامین، ب.، حبیبی، د. و پیمان، ف. (۱۳۹۱) بررسی اثر کادمیوم کلرید بر پارامترهای رشدی و برخی صفات فیزیولوژیک در گیاهچه‌های لوبیا. نشریه زراعت و اصلاح نباتات ایران ۴: ۱۸۲-۱۶۷.
- اسکندری، س.، یادگاری، م. و ایرانی‌پور، ر. (۱۳۹۶) بررسی میزان تجمع کادمیوم و سرب در گیاه دارویی همیشه‌بهار *Calendula officinalis*. نشریه فیزیولوژی محیطی گیاهی ۴۷: ۹۲-۷۶.
- امینی، ز. و حداد، ر. (۱۳۹۲) نقش رنگیزه‌های فتوسنتزی و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در مقابل تنش اکسیداتیو. پژوهش‌های سلولی و مولکولی (زیست‌شناسی ایران) ۳: ۲۶۵-۲۵۱.
- بارنده، ف. و کاوسی، ح. ر. (۱۳۹۵) اثر کادمیوم کلرید بر رنگیزه‌های فتوسنتزی، محتوای پرولین، میزان پروتئین‌های محلول و برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاهچه‌های عدس. فرآیند و کارکرد گیاهی ۱۶: ۱۳۲-۱۱۷.
- برجیان، م.، خوش سخن ظفر، م. و خسروی رینه، م. (۱۳۹۷) تأثیر عنصر کادمیوم بر برخی از فاکتورهای استرس اکسیداتیو در گیاه *Brassica oleracea* cv. *Saccata* در محیط هیدروپونیک. مجله علمی- پژوهشی دانشگاه الزهرا (س) / زیست‌شناسی کاربردی ۱: ۷۴-۵۷.
- بلوچی، ح. ر.، امینی، ف.، موحدی دهنوی، م. و عطارزاده، م. (۱۳۹۶) تأثیر بسترهای مختلف کاشت بر صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی لوبیا (*Phaseolus vulgaris* L.) تحت تنش فلزات سنگین. فرآیند و کارکرد گیاهی ۲۱: ۳۹-۲۷.
- پوراکبر، ل. و ابراهیم‌زاده، ن. (۱۳۹۳) پاسخ‌های رشدی و فیزیولوژیکی گیاه ذرت (*Zea mays* L.) به مس و نیکل. نشریه پژوهش‌های کاربردی زراعی ۱۰۳: ۱۵۹-۱۴۷.
- جامعی، ر. و کارگر خرمی، س. (۱۳۹۴) تأثیر غلظت‌های مختلف مس و نیکل بر روی برخی شاخص‌های رشدی و فیزیولوژیکی در گیاه بامیه (*Hibiscus esculentus* L.). فرآیند و کارکرد گیاهی ۱۱: ۴۴-۳۴.

- حسین‌زاده، پ.، مهتدی، ا.، موحدی دهنوی، م. و آسمانه، ط. (۱۳۹۵) اثر غلظت‌های مختلف روی برخی خصوصیات فیزیولوژیک گیاه اسفرزه (*Plantago ovata L.*) تحت تنش شوری. فرآیند و کارکرد گیاهی ۱۵: ۱۶۸-۱۵۷.
- رحیمی، پ.، قنبرزاده، ز.، بهداد، آ. و محسن‌زاده، س. (۱۳۹۷) تأثیر متقابل سیلیکون و کادمیوم بر رشد و پارامترهای فیزیولوژیکی گیاهچه‌های گوجه فرنگی (*Solanum lycopersicum*). فرآیند و کارکرد گیاهی ۲۴: ۲۱۱-۱۹۹.
- عبدی، س.، شمس، ک. و کبرایی، س. (۱۳۹۵) بررسی غلظت فلزات سنگین سرب و کادمیوم در ده گیاه دارویی پرمصرف در شهرستان کرمانشاه. فصلنامه علمی- پژوهشی بیولوژی کاربردی ۴: ۴۳-۵۰.
- عسگری لاجیر، ح.، نجفی، ن. ا. و مقیسه، ا. (۱۳۹۳) اثر آلودگی خاک‌ها به فلزات سنگین بر تولید گیاهان دارویی. نشریه مدیریت اراضی ۲: ۱۱۱-۱۲۲.
- قادریان، س. م. و جمالی حاجیانی، ن. (۱۳۸۹) بررسی مقاومت، جذب و انباشتگی کادمیوم در گیاه *Matthiola chenopodiifolia* Fisch and C. A. Mey (Brassicaceae). زیست‌شناسی گیاهی ایران ۶: ۹۸-۸۴.
- قناتی، ف. و نعمتی، ف. (۱۳۸۹) تأثیر مثبت آلومینیم در فعال‌کردن سیستم آنتی‌اکسیدان ریشه‌های گیاه لیسیانئوس (*Eustoma grandiflora L.*). زیست‌شناسی گیاهی ۲: ۵۳-۴۱.
- کرامت، ب.، دریایی، ف. و آروین، م. ج. (۱۳۹۳) بررسی اثرات متقابل سلنیوم و کادمیوم بر محتوای آلدئیدها، هیدروژن پراکسید و فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاهچه گندم رقم کویر. پژوهش‌های گیاهی (زیست‌شناسی ایران) ۲۷: ۴۹۰-۵۰۰.
- نوری آکندی، ز.، پیردشتی، ه. ا.، یعقوبیان، ی. و قاسمی عمران، و. ا. (۱۳۹۶) واکنش صفات کمی و فیزیولوژیک گیاه دارویی استویا (*Stevia rebaudiana Bertoni*) به مقادیر مختلف شوری در شرایط کنترل‌شده. علوم و فنون کشت‌های گلخانه‌ای ۱: ۱۹-۹.
- ولی‌زاده کامران، ر.، وجودی مهربانی، ل. و حسن‌پور اقدم، م. ب. (۱۳۹۶) بررسی اثر سرب و کادمیوم بر رشد و فعالیت برخی آنزیم‌های اسفناج در شرایط کشت درون شیشه‌ای. مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی ۲: ۲۶۸-۲۵۷.
- هاشمی، ف.، کاوسی، ح. ر. و پورسیدی، ش. (۱۳۹۵) اثر سمیت کادمیوم بر الگوی بیان ژن و فعالیت آنزیمی سوپراکسید دیسموتاز و آسکوربات پراکسیداز در گیاهچه‌های نخود (*Cicer arietinum L.*). مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۴: ۱۱۱-۹۹.
- یعقوبیان، ی.، سیادت، س. ع. ا.، مرادی تلاوت، م. ر. و پیردشتی، ه. ا. (۱۳۹۵) کمی‌سازی پاسخ رشد رویشی و مؤلفه‌های فلورسانس کلروفیل گیاه دارویی بادرنجبویه (*Melissa officinalis L.*) به غلظت کادمیوم در خاک. پژوهش‌های تولید گیاهی ۲: ۱۸۵-۱۶۵.
- Abi, H. (1984) Catalase in vitro. Method of Enzymology 105: 121-126.
- Alexieva, V., Sergiev, I., Mapelli, S. and Karanov, E. (2001) The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. Plant Cell and Environment 24: 1337-1344.
- Babula, P., Ryant, P. and Adam, V. (2009) The role of sulphur in cadmium ions detoxification demonstrated in invitro model: *Dionaea muscipula*. Environment Chemistry 7: 353-361.
- Bates, L. S., Waldren, R. P. and Teare, I. D. (1973) Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant and Soil 39: 205-207.
- Beauchamp, C. and Fridovich, I. (1971) Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. Analytical Biochemistry 44: 276-287.
- Benavides, M. P., Gallego, S. M. and Tomaro, M. L. (2005) Cadmium toxicity in plants. Brazilian Journal of Plant Physiology 17: 21-34.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitative titration of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.
- Chamseddine, M., Wided, B. A., Guy, H., Marie-Edith, C. and Fatma, J. (2009) Cadmium and copper induction of oxidative stress and antioxidative response in tomato (*Solanum lycopersicon*) leaves. Plant Growth Regulation 57: 89-99.
- Chen, C., Chen, T. H., Lo, K. F. and Chiu, C. Y. (2004) Effect of proline on copper transport in rice seedlings under excess copper stress. Plant Science 166: 103-111.

- Chen, F., Wu, F., Dong, J., Vance, E., Zhang, G. P., Wang, F., Huang, Y. Z. and Wei, K. (2007) Cadmium translocation and accumulation in developing barley grains. *Physiologia Plantarum* 227: 223-232.
- Das, P. K., Sarangi, D., Jena, M. K. and Mohanty, S. (2002) Response of greengram (*Vigna radiata* L.) to integrated application of vermicompost and chemical fertilizer in acid lateritic soil. *Indian Agriculture* 46: 79-87.
- De Lacerda, C. F., Cambraia, J., Oliva, M. A., Ruiz, H. A. and Prisco, J. T. (2003) Solute accumulation and distribution during shoot and leaf development in two sorghum genotypes under salt stress. *Environmental and Experimental Botany* 49: 107-120.
- Dias, M. C., Monteiro, C., Moutinho-Pereira, J., Correia, C., Goncalves, B. and Santos, C. (2013) Cadmium toxicity affects photosynthesis and plant growth at different levels. *Acta Physiologiae Plantarum* 35: 1281-1289.
- Dixit, P., Mukherjee, K., Ramachandran, V. and Eapen, S. (2011) Glutathione transferase from *Trichoderma vireos* enhances cadmium tolerance without enhancing its accumulation in transgenic *Nicotiana glauca*. *Plant and Soil* 325: 198-207.
- Ebrahim, A. M., Eltayeb, M. H., Khalid, H., Mohamed, H., Abdalla, W., Grill, P. and Michalke, B. (2012) Study on selected trace elements and heavy metals in some popular medicinal plants from Sudan. *Journal of Natural Medicines* 4: 671-679.
- Eunomia Research and Consulting Ltd. (2018) Final implementation report for directive 86/278/EEC on sewage. Sludge: 2013–2015: 151.
- Faizan, S., Kausar, S. and Perveen, R. (2011) Varietal differences for cadmium-induced seedling mortality, foliar toxicity symptoms, plant growth, proline and nitrate reductase activity in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Biology and Medicine* 3: 196-206.
- Gallego, S. M., Pena, L. B., Barcia, R. A., Azpilicueta, C. E., Iannone, M. F., Rosales, E. P. and Benavides, M. P. (2012) Unravelling cadmium toxicity and tolerance in plants: Insight into regulatory mechanisms. *Environmental and Experimental Botany* 83: 33-46.
- Gill, S. S. and Tuteja, N. (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48: 909-930.
- Goncalves, J., Beker, A., Cargnelutti, D., Tabaldi, L., Pereira, B., Battisti, V., Spanevello, R., Morsch, V., Nicoloso, F. and Schetinger, M. (2007) Cadmium toxicity causes oxidative stress and induces response of the antioxidant system in cucumber seedlings. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 3: 223-232.
- Grant, C., Buckley, W., Bailey, L. and Selles, F. (1998) Cadmium accumulation in crops. *Can. Journal of Plant Sciences* 1: 1-17.
- Haspel-Harvatovic, E. and Holubkova, B. (1981) Experimental studies of chlorophyll water relation. *Phytopathologie Zeitschrift* 100: 340-346.
- Hatata, M. and Abdel-Aal, A. E. (2008) Oxidative stress and antioxidant defense mechanisms in response to cadmium. *Treatment American- Eurasian Journal of Agriculture and Environmental Sciences* 6: 655-669.
- Holm, L. G., Plunkett, D. L., Pancho, J. V. and Herberger, J. P. (1977) *The World's Worst Weeds: Distribution and Biology*. University Press of Hawaii.
- Iannelli, M. A., Pietrini, F., Fiore, L., Petrilli, L. and Massacci, A. (2002) Antioxidant response to cadmium in *Phragmites australis* plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 40: 977-982.
- Jadia, C. D. and Fulekar, M. H. (2008) Phytoremediation: The application of vermin-compost to remove zinc, cadmium, copper, nickel and lead by sunflower plant. *Journal of Environmental Engineering and Management* 7: 547-558.
- Jiang, Y. and Huang, B. (2001) Drought and heat stress injury to two cool-season turf grasses in relation to antioxidant metabolism and lipid peroxidation. *Crop Science* 41: 436-442.
- John, R., Ahmad, P., Gadgil, K. and Sharma, S. (2008) Effect of cadmium and lead on growth, biochemical parameters and uptake in *Lemna polyrrhiza* L. *Plant, Soil and Environment* 54: 262-270.
- Khanna-Chopra, R. and Selote, D. S. (2007) Acclimation to drought stress generates oxidative stress tolerance in drought resistant than susceptible wheat cultivar under field conditions. *Journal of Environmental and Experimental Botany* 60: 276-283.
- Lawlor, D. W. (2002) Limitation to photosynthesis water-stressed leaves: Stomata vs. metabolism and the role of ATP. *Annals of Botany* 89: 671-885.
- Lomonte, C., Sgherri, C., Baker, A. J. M., Kolev, S. D. and Navari-Izzo, f. (2010) Antioxidative response of *Atriplex codonocarpa* to mercury. *Environmental and Experimental Botany* 69: 9-16.
- Luo, H., Li, H., Zhang, X. and Fu, J. (2011) Antioxidant responses and gene expression in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) under cadmium stress. *Ecotoxicology* 20: 770-778.
- Lutts, S., Kinet, J. M. and Bouharmont, J. (1995) Changes in plant response to NaCl during development of rice (*Oryza sativa* L.) varieties differing in salinity resistance. *Journal of Experimental Botany* 46: 1843-1852.
- Manara, A. (2012) Plant responses to heavy metal toxicity. In: *Plants and Heavy Metals* (ed. Furini, A.) Pp. 27-53. Springer Briefs in Biometals.



- Mauskar, J. M. (2007) Cadmium an environment toxicant central pollution control board ministry of environment and forests Govt of India Parivesh Bhawan East Arjun Nagar. Delhi 110032: 15.
- Mohsenzadeh, S., Shahrtash, M. and Mohabatkar, H. (2011) Interactive effects of salicylic acid and silicon on some physiological responses of cadmium-stressed maize seedlings. *Iranian Journal of Science and Technology* 1: 57-60.
- Moya, J. L., Ros, R. and Picazo, I. (1993) Influence of cadmium and nickel on growth, net photosynthesis and carbohydrate distribution in rice plants. *Photosynthesis Research* 36: 75-80.
- Nayyar, H. and Walia, D. P. (2003) Water stress induced proline accumulation in contrasting wheat genotypes as affected by calcium and abscisic acid. *Biological Plantarum* 46: 275-279.
- Porra, R. J. (2002) The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls *a* and *b*. *Photosynthesis Research* 73: 149-156.
- Prasad, A., Kumar, S., Khaliq, A. and Pandey, A. (2011) Heavy metals and *arbuscular mycorrhizal* (AM) fungi can alter the yield and chemical composition of volatile oil of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). *Biology and Fertility of Soils* 8: 853-861.
- Ritchie, S. W., Nguyen, H. T. and Holaday, A. S. (1990) Leaf water content and gas exchange parameters of two wheat genotypes differing in drought resistance. *Crop Science* 30: 105-111.
- Safdari, Y. and Kazemitabar, S. K. (2009) Plant tissue culture study on two different races of purslane (*Portulaca oleracea* L.). *African Journal of Biotechnology* 8: 5906-5912.
- Sanita, D., Toppi, L. and Gabrielli, R. (1999) Review, response to Cd in higher plants. *Environmental and Experimental Botany* 41:105-130.
- Schaller, H. (2003) The role of sterols in plant growth and development. *Progress in Lipid Research* 42: 63-175.
- Schutzendubel, A. and Polle, A. (2002) Plant responses to abiotic stress: Heavy metal induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Experimental Botany* 53: 1351-1365.
- Seregin, I. V. and Ivanov, V. B. (2001) Physiological aspects of cadmium and lead toxic effects o higher plants. *Russian Journal of Plant Physiology* 48: 523-544.
- Shah, K., Kumar, R. G., Verma, S. and Dubey, R. S. (2001) Effect of cadmium on lipid peroxidation, superoxide anion generation and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. *Plant Science* 161: 1135-1144.
- Sharma, K. D. and Kuhad, M. S. (2006) Influence of potassium level and soil moisture regime on biochemical metabolites of Brassica species. *Brassica Journal* 8: 71-74.
- Soltani, A., Hammer, G. L., Torabi, B., Robertson, M. J. and Zeinali, E. (2006) Modeling chickpea growth and development: Phonological development. *Field Crops Research* 99: 1-13.
- Srivastava, S., Tripathi, R. D. and Dwivedi, U. N. (2004) Synthesis of phytochelatins and modulation of antioxidants in response to cadmium stress in *Cuscuta reflexa* an angiospermic parasite. *Journal of Plant Physiology* 161: 665-674.
- Stewart, R. R. C. and Bewley, J. D. (1980) Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes. *Plant Physiology* 65: 245-248.
- Tang, W. and Newton, J. R. (2005) Peroxidase and catalase activities are involved in direct adventitious shoot formation induced by thidiazuron in eastern white pine (*Pinus scorba* L.) zygotic embryos. *Plant Physiology Biochemistry* 43: 760-769.
- Vassilev, A., Yordanov, I. and Tsonev, T. (1997) Effects of Cd<sup>2+</sup> on the physiological state and photosynthetic activity of young barely plants. *Photosynthetica* 34: 293-302.
- Yoshimura, K., Yabuta, Y., Ishikawa, T. and Shigeoka, S. (2000) Expression of spinach ascorbate peroxidase isoenzymes in response to oxidative stresses. *Plant Physiology* 123: 223-234.
- Zhang, X. X., Fan, X. M., Li, C. J. and Nan, Z. B. (2010) Effects of cadmium stress on seed germination, seedling growth and antioxidative enzymes in *Achnatherum inebrians* plants infected with a Neotyphodium endophyte. *Plant Growth Regulation* 60: 1-97.
- Zhao, Y. (2011) Cadmium accumulation and antioxidative defenses in leaves of *Triticum aestivum* L. and *Zea mays* L. *African Journal of Biotechnology* 10: 2936-2943.

## Vegetative growth, physiological and enzymatic responses of purslane medicinal plant (*Portulaca oleracea*) to cadmium concentrations in the soil

Maryam Jenabiyani<sup>1</sup>, Hemmatollah Pirdashti<sup>1\*</sup>, Mohammad Ali Tajik Ghanbary<sup>2</sup>, Fardin Sadeghzadeh<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Department of Agronomy, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources Sari University

<sup>2</sup> Department of Plant Protection, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University

<sup>3</sup> Department of Soil Science, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University

(Received: 25/12/2018, Accepted: 18/06/2019)

### Abstract

Cadmium is one of the most commonly used heavy metals in the contaminated areas which has entered in the ecosystem and the food chains and has ecological harmful effects on living organisms. Considering the risk of increasing heavy elements in agricultural soils and subsequent exposure to medicinal plants such as purslane (*Portulaca oleracea* L.), a factorial experiment was conducted in a completely randomized design with three replications. The aim of the presented study was to study the vegetative growth response and the physiological and enzymatic parameters of this medicinal plant in comparison with the increase of cadmium concentration (0 to 275 mg/kg) in the soil. The results showed that vegetative traits, photosynthetic pigments, soluble protein content and relative water content of leaf decreased with increasing cadmium concentrations whereas the levels of malondialdehyde, hydrogen peroxide and proline were increased. Also, the changes in the activity of the three enzymes of peroxidase (POX), ascorbate peroxidase (APX) and superoxide dismutase (SOD) increased at lower levels of toxicity while decreased at higher levels. Purslane was more sensitive to higher levels of cadmium, so that gradient of more studied variables like dry weight of vegetative organs, the photosynthetic pigments, proline, soluble protein and hydrogen peroxide at low levels of cadmium (ranging from zero up to 60 mg/kg) was lower and continued with a more slope. Overall, the results showed that the purslane medicinal plant had the ability to grow up to 275 mg per kg of cadmium in the soil. However, at concentrations higher than about 60 mg, the accumulation of dry matter and the functioning of the plants defense systems decreased by more than 50%.

**Keywords:** Antioxidant, Photosynthetic pigments, Proline

Corresponding author, Email: h.pirdashti@sanru.ac.ir