

تأثیر اسید هومیک بر جذب نیتروژن، فسفر و شاخصهای تنش در کاهوی آلوده به کادمیوم

مریم حقیقی^۱، محسن کافی^۲، تکتم سادات تقوی^۳، عبدالکریم کاشی^۴ و غلامرضا ثوابی^۵

تاریخ دریافت: ۸۷/۱/۱۸ تاریخ پذیرش: ۸۸/۵/۱۸

۱- دانشجوی دکترا، گروه علوم باغبانی دانشگاه تهران

۲، ۳ و ۴- به ترتیب دانشیار، استادیار و استاد گروه علوم باغبانی، دانشگاه تهران

۵- دانشیار، گروه خاکشناسی، دانشگاه تهران

E-mail: ttaghavi@ut.ac.ir

*مسئول مکاتبه

چکیده

اطلاعات در مورد سمیت فلزات سنگین در ایران محدود است. در این تحقیق اثر بازدارندگی اسید هومیک بر جذب کادمیوم توسط گیاه کاهو (*Lactuca sativa*) مطالعه شد. آزمایش فاکتوریل در شرایط کشت بدون خاک در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۷ تکرار طرح ریزی شد. کادمیوم ($CdCl_2$) با ۳ غلظت صفر، ۲ و ۴ میلی گرم بر لیتر و اسید هومیک با سه غلظت صفر، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر به محلول غذایی اضافه شد. اثرات کادمیوم و هومیک اسید بر جذب کادمیوم و به دنبال آن تغییر فعالیت آنتی اکسیدانهای پرکسیداز و سوپراکسیددیسموتاز، پرولین، اسید آلی، محتوای کادمیوم، نیتروژن، فسفر و زیتوده گیاه بررسی شد. نتایج این آزمایش نشان داد که افزایش غلظت کادمیوم باعث افزایش فعالیت پرکسیداز، سوپراکسیددیسموتاز و افزایش غلظت پرولین شد. با افزایش کادمیوم در محیط کشت، غلظت آن در بافت گیاه افزایش یافت و زیتوده و اسید آلی گیاه را کاهش داد. به طور متوسط در غلظتهای ۲ و ۴ میلی گرم بر لیتر کادمیوم فعالیت پرکسیداز به ترتیب ۸ و ۵۳ درصد، فعالیت سوپراکسیددیسموتاز ۶۶ و ۱۰۶ درصد و غلظت پرولین ۳۹ و ۱۱۹ درصد نسبت به شاهد افزایش نشان داد اما غلظت اسیدهای آلی ۱۸ و ۳۰ درصد کاهش یافت. با افزودن اسید هومیک به محلول غذایی تغییری در غلظت فسفر و پرولین مشاهده نشد اما اثرهای متقابل کاربرد کادمیوم و اسید هومیک نشان داد فعالیت آنتی اکسیدانها و وزن گیاه تعدیل شد. بنابراین افزودن اسید هومیک به محلول غذایی از جذب کادمیوم ممانعت می‌کند و تنش به گیاه وارد نمی‌شود.

واژه‌های کلیدی: اسید هومیک، پرکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز، کاهو، کادمیوم، فسفر، نیتروژن.

Effect of Humic Acid on N, P and Stress Indicators of Lettuce Polluted by Cadmium

M Haghghi¹, M Kafi², TS Taghavi^{3*}, AK Kashi⁴, GhR Savabeghi⁵

Received: 18 January 2008

Accepted: 15 May 2009

¹PhD Student, Dept. of Horticultural Science, University of Tehran, Iran

^{2,3,4}Assoc, Assist. and Professor, Dept. of Horticultural Science, University of Tehran, Iran

⁵Assoc. Professor, Dept. of Soil Science, University of Tehran, Iran

*Corresponding author: E-mail: ttaghavi@ut.ac.ir

Abstract

Information is still scarce about exposure to toxic heavy metal in Iran. The attempt was made to study about the prevention effect of humic acid (HA) on Cd absorption by lettuce (*Lactusa sativa*). A factorial CRD experiment was conducted in hydroponic system with 7 replications. Treatments were: control (no additions), HA (0, 100 and 1000 mgL⁻¹), and Cd (0, 2 and 4 mgL⁻¹). Cd uptake along with enzyme activities, superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD), proline and biomass of lettuce were measured. A significant increase in SOD and POD activity and proline content were observed with increasing cadmium. Cd content increased together with biomass and organic acid decreased in plants received cadmium. The POD activity increased up to 8 and 53% and SOD to 66 and 106 and proline content to 39 and 119% with 2 and 4 mgL⁻¹ of cadmium respectively. HA did not affect P and proline content. HA decreased the toxic effects of Cd through optimizing SOD, POD activity and fresh weight. Therefore, adding HA to lettuce plants stressed by Cd can alleviate the toxic effect of cadmium.

Keywords: Cadmium, Humic acid, Lettuce, Nitrogen, Peroxidase, Phosphorous, Superoxid dismutase

مقدمه

توسط گیاه را کاهش می دهد. چنین پدیده ای در جذب آهن، روی (مسوت و یلمز ۲۰۰۵)، مس (گوپتا و هانی ۱۹۸۰) و همچنین کادمیوم با ایجاد کمپلکس با اسید هومیک دیده شده است (کمپیل ۱۹۹۵). هومیک اسید از طریق ایجاد ترکیب و جذب سطحی فلزات سنگین با ذرات سیلیکا و اکسید آهن در خاک و یا گروههای فعال هیدروکسیل، فنوکسیل و کربوکسیل موجود در هومیک اسید باعث

میزان جذب کادمیوم و سایر فلزات سنگین توسط گیاه بستگی به قابلیت تحرک و میزان دسترسی آن فلز در خاک دارد. این خصوصیات به میزان مواد آلی جامد و قابل حل موجود در خاک و عوامل دیگر نیز وابسته است. اسید هومیک به عنوان یک ماده آلی موجود در خاک با برخی فلزات ایجاد کمپلکس نامحلولی می کند که قابلیت جذب آنها

توسط پرکسیداز یا کاتالاز تجزیه می شود. فعالیت این آنزیم ها در مواجه با تنشهای محیطی افزایش می یابد و از این طریق مقاومت گیاه را به این شرایط تغییر می دهد (سان تاندر ۲۰۰۰). اگرچه آنتی اکسیدانها گیاه را در برابر تنشها محافظت می کنند اما بهترین استراتژی برای کاشتن گیاهان در مناطق آلوده به کادمیوم غیرمتحرک کردن آن در محل ریشه در خاک است (مویا و همکاران ۱۹۹۳).

پرولین در محدوده وسیعی از گونه های گیاهان تحت تنشهای مختلفی چون خشکی، شوری، دماهای زیاد و نور زیاد تجمع می یابد (منصور ۲۰۰۰). نقش پرولین در هنگام تنش جلوگیری از تخریب آنزیمها (شاه و همکاران ۲۰۰۱)، جلوگیری از تجزیه ماکرومولکولها (شوبرت و تشچز ۱۹۷۸) دخالت در حفظ استحکام دیواره سلولی و پاکسازی هیدروکسیلهای تولیدی تحت تنش در گیاه (هسو و کالو ۲۰۰۳) است. چنین اثراتی نیز در گیاه تحت تنش کادمیوم گزارش شده است (شاه و همکاران ۲۰۰۱).

از آنجایی که گزارشات زیادی مبنی بر کاهش جذب فلزات سنگین توسط گیاه در حضور اسید هومیک وجود دارد (کامپل ۱۹۹۵ و کوستا و مورل ۱۹۹۴)، آزمایشی بر روی گیاه کاهو به عنوان یکی از حساسترین سبزیها به تجمع کادمیوم انجام گرفت. در این آزمایش اثر افزایش اسید هومیک بر میزان جذب کادمیوم و تغییر فعالیت آنزیمهای آنتی اکسیدانی نظیر پرکسیداز و سوپراکسیددیسموتاز و پرولین، اسید آلی و سایر صفات کمی کاهو تحت تنش کادمیوم مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روشها

شرایط کشت و تیمارهای آزمایشی

بذرهای کاهو (*Lactuca sativa*) رقم Italy در مخلوط ورمیکولیت/پرلیت (۷/۷ v/v) کاشته شد و سپس نشاهای ۲-۳ برگی به سیستم آبکشت باز شامل گلدانهای

کاهش جذب آنها توسط گیاه می شود. این اثر با کاربرد هومیک اسید در گیاهان مختلف از جمله گندم و نعنای و کاهش جذب فلزات سنگین در آنها نشان داده شده است (کندان و ترهان ۲۰۰۳ و لویراتی و همکاران ۲۰۰۴). علاوه بر اثر اسید هومیک بر جذب فلزات سنگین، مواد هومیکی اثرات مختلفی را در گیاه ایجاد می کنند که به اختصار می توان به افزایش رشد، افزایش تولید ریشه، افزایش مقاومت به تنشهای خشکی و شوری، افزایش فتوسنتز و غیره اشاره نمود (زانگ و همکاران ۲۰۰۰ و زانگ و اروین ۲۰۰۴).

سبزیهای برگی بویژه کاهو، اسفناج، کرفس و کلم کادمیوم را به مقدار زیادی تجمع می دهند. طبق آزمایشات دیویس و اسمیت (۱۹۸۰) در بین ۱۴ سبزی مورد مطالعه حساس ترین آنها به تجمع کادمیوم را به ترتیب اسفناج، شاهی و کاهو، معرفی کردند. بیشترین کادمیوم در برگها (بخش خوراکی کاهو) تجمع می یابد. با افزایش غلظت کادمیوم در محیط کشت میزان جذب آن توسط گیاه نیز افزایش می یابد. نتایج آزمایشات بر روی کلم، هویج و کاهو نشان داد که رابطه مثبت معنی داری بین افزایش کادمیوم محیط ریشه و افزایش تجمع آن در گیاه وجود دارد (آلوی ۱۹۹۰).

افزایش کادمیوم خاک با اختلالات فیزیولوژیکی زیادی مانند جلوگیری از جوانه زنی بذر، کاهش رشد بویژه رشد ریشه، اختلال در جذب مواد معدنی و متابولیسم کربوهیدراتها و در نتیجه اثرات شدید بر روی زیتوده همراه است. کاهش زیتوده نتیجه مستقیم کاهش سنتز کلروفیل و فتوسنتز می باشد (کلوسن ۲۰۰۲).

سوپراکسیددیسموتاز در قسمتهای مختلف سلولی قرار دارد و تنها آنزیمی است که بر سوپر اکسید حاصل از رادیکال های آزاد ایجاد شده در اثر تنش موثر است و آنها را به پراکسید هیدروژن تبدیل می کند. پراکسید هیدروژن

سنجش سوپراکسید دیسموتاز طبق روش بیچامپ و فریدوویچ (۱۹۷۱) با تغییراتی انجام شد. سه میلی لیتر محلول سنجش شامل ۵۰ میکرومول بافر فسفات با اسیدیته ۷/۸، ۹/۹ میکرومول از ماده متیونین^۵، ۵/۷ میکرومول نیتروترانزولیوم بلوکلراید^۴، ۰/۰۰۴۴ (وزنی/حجمی) ریبوفلاوین^۵ و ۰/۰۲۵ (وزنی/حجمی) تریتون-۱۰۰ به عصاره اضافه گردید. فعالیت سوپراکسید دیسموتاز بر حسب تغییر نیتروترانزولیوم بلوکلراید در برابر نور توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. یک واحد فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز معادل ۵۰ درصد ممانعت از تغییر رنگ نیترو ترانزولیوم بلوکلراید در برابر نور بیان می شود.

سنجش پرکسیداز بر طبق روش کاندلی و اسکاندالویز (۱۹۹۴) با تغییراتی انجام شد. محلول واکنش شامل ۵۰ میلی مول بافر فسفات پتاسیم، ۱ درصد (وزنی/حجمی) گوئیکول^۶، ۰/۰۴ (حجمی/حجمی) پراکسید هیدروژن^۷ با اسیدیته ۶/۱ تهیه شد. سپس ۱۷۰۰ میکرولیتر محلول واکنش به ۱۰۰ میکرولیتر عصاره گیاهی اضافه شد. جذب نور به علت اکسید شدن گوئیکول افزایش می یابد که میزان جذب توسط دستگاه اسپکتروفتومتر^۸ در ۴۷۰ نانومتر سنجیده می شود. فعالیت آنزیم بر اساس مقدار گوئیکولی که در دقیقه اکسید می شود بیان می شود (کاندلی و اسکاندالویز ۱۹۸۴).

اندازه گیری کادمیوم برگها و محاسبه ضریب انتقال^۹

میزان کادمیوم پس از خاکستر شدن در دمای ۵۵۰ درجه سانتی گراد به مدت ۵ ساعت و افزودن اسید

با مخلوط پیت/پرلیت (۷/۷:۱) منتقل شده و در گلخانه نگهداری شدند. کادمیوم از منبع CdCl₂ در ۳ غلظت صفر، ۲، ۴ میلی گرم بر لیتر و اسید هومیک (اسید هومیک تجاری دارای ۷۰ درصد کربن، ۳ درصد نیتروژن و ۳ درصد فسفر از کوههای جینیان چین) در سه غلظت صفر، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر به محلول غذایی هوگلدن اضافه شد. اسیدیته محلول توسط سود و اسیدکلریدریک حدود ۶ تنظیم شد. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۷ تکرار در بهار ۲۰۰۶ در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه جیانگ چین در دمای بین ۱۷ تا ۲۵ درجه سانتی گراد انجام شد. داده ها با نرم افزار MSTAT-C و SAS تجزیه و تحلیل گردید. میانگین‌ها با روش دانکن در سطح احتمال ۰/۰۵ مقایسه شدند.

نمونه‌برداری و اندازه‌گیری جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم ها برای استخراج هر دو آنزیم ابتدا دومین برگ کاملاً رشد کرده کاهو ۵ روز پس از تیماردهی انتخاب شد و در کیسه پلاستیکی در فلاسک یخ به آزمایشگاه منتقل شد. نیم گرم نمونه برگ بعد از شستن با آب دیونیزه همراه ۵ میلی لیتر بافر فسفات شامل (۵۰ میکرومول فسفات، ۱ درصد (وزنی) BSA^۲، ۰/۰۵ درصد (وزنی) مرکاپتواتانول^۳، ۱ درصد (وزنی) اسکوربات^۴) با غلظت ۰/۵ مول بر لیتر با اسیدیته ۷/۸ در هاون در مجاورت یخ ۴ درجه سانتی گراد له شد. مخلوط حاصل با دور ۱۲۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ شد و عصاره بالایی لوله آزمایش برای سنجش هر دو آنزیم به آرامی جدا شد.

⁵L- methionine

⁴Nitro blue chlorid tetrazolium (NBT)

⁵Riboflavin

⁶Guaiacol

⁷H₂O₂

⁸AS, DU640, Beckmann, USA

⁹Transfer coefficient

¹Mount Jinyun, Chongqing, China

²Bovine serum albumin

³Mercaptoethanol

⁴Ascorbate

نشان داد اما تغییر معنی داری در وزن خشک ریشه نسبت به شاهد دیده نشد. وزن خشک اندام هوایی گیاهان به ترتیب ۱۳/۵ و ۳۰/۱۴ درصد در غلظتهای ۲ و ۴ میلی گرم بر لیتر کادمیوم نسبت به شاهد کاهش داشتند و همبستگی منفی معنی داری با $r = -0.99$ با رابطه $Y = -0.0588x + 6.77$ بین سطوح مختلف کادمیوم و وزن خشک اندام هوایی مشاهده شد.

وزن تر اندام هوایی کاهو در غلظتهای ۲ و ۴ میلی گرم بر لیتر کادمیوم به ترتیب ۱۹ و ۴۲ درصد نسبت به شاهد کاهش داشت. رابطه ضریب همبستگی منفی $r = -0.93$ اثر افزایش غلظت کادمیوم بر کاهش وزن گیاه را نشان داد. میزان جذب کادمیوم توسط گیاه با افزایش غلظت کادمیوم در محلول غذایی به طور معنی داری افزایش داشته است (جدول ۱). میزان جذب کادمیوم در غلظتهای ۲ و ۴ میلی گرم بر لیتر به ترتیب ۳۵ و ۵۴ میکروگرم در گرم وزن خشک بوده است. وزن گیاه تحت تنش کادمیوم کاهش قابل توجهی داشت (جدول ۱ و ۲). نتایج مشابه توسط سایر محققان به گزارش شده است. شاه و همکاران (۲۰۰۱) با کاربرد کادمیوم در گیاه برنج در محیط هیدروپونیک و استمان (۱۹۹۶) در کاهو کاهش در وزن گیاه را نیز گزارش کردند. استمان (۱۹۹۶) بر روی کاهو، اندرسون و بینگ فوری (۱۹۸۵) بر روی سایر گیاهان، رابطه معنی داری را بین کادمیوم تجمع یافته توسط برگها و غلظت کادمیوم در محیط غذایی ثابت کردند. بطور مشابهی در این تحقیق دیده شد که بیشترین میزان جذب کادمیوم در غلظت ۴ میلی گرم بر لیتر بود و این مقدار جذب کادمیوم در غلظت مذکور، ۵۴ درصد بیشتر از غلظت ۲ میلی گرم بر لیتر بوده است. غلظت نیتروژن و فسفر موجود در برگها با اضافه کردن کادمیوم به محیط کشت تغییر معنی داری نداشت.

کلریدریک ۱ نرمال به کمک دستگاه ICP-MS 1 اندازه گیری شد. به منظور تعیین میزان واقعی جذب عناصر توسط گیاهان، ضریب انتقال فلزات محاسبه می شود. ضریب انتقال از نسبت غلظت فلز در گیاه به غلظت فلز در بستر به دست می آید (تراپیان و مهجوری ۱۳۸۱).

اندازه گیری اسید آلی

برای تعیین میزان اسید آلی کل، برگهای گیاه را همراه با آب مقطر له کرده و مقداری کائولن ساییده شد. سپس آن را به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسانده و با کاغذ صافی، صاف شد. ۲۰ میلی لیتر از عصاره حاضر را همراه چند قطره فنل فتالئین با سود ۰/۱ نرمال تیتراژ شد عمل تیتراسیون روی همزن مغناطیسی تا رسیدن به $pH = 8$ انجام شد و میزان اسید آلی کل از این طریق محاسبه شد (هاشمی ۱۳۷۱).

اندازه گیری پرولین

میزان پرولین بر اساس روش بییتس و همکاران (۱۹۷۳) از طریق سنجش مقدار محصول رنگی حاصل از واکنش پرولین با نین هیدریک اسید به دست آمد. میزان جذب در طول موج ۵۲۰ نانومتر به کمک اسپکتروفتومتر خوانده شد. مقدار پرولین به کمک منحنی استاندارد از پیش آماده شده محاسبه شد و بر حسب میکرومول بر گرم وزن تر بیان شده است.

نتایج و بحث

اثر کادمیوم بر وزن، جذب کادمیوم، نیتروژن و فسفر در کاهو وزن خشک اندام هوایی گیاهان تیمار شده با کادمیوم تفاوت معنی داری را در سطح ۵ درصد با شاهد

¹Inductively Coupled Plasma(ICP-MS, 7500a, Agilent, USA)

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر سطوح مختلف کادمیوم محیط کشت بر فعالیت سوپر اکسید دسموتاز، پرکسیداز، غلظت محتوای پرولین، اسید آلی، کادمیوم برگها، وزن تر اندام هوایی، غلظت فسفر و نیتروژن برگ کاهو

| میانگین مربعات | | | | | | | | | |
|----------------------|------------|--------------------|---------------|----------|--------|----------|--------------------|---------|----------|
| منابع تغییرات | درجه آزادی | وزن تر اندام هوایی | کادمیوم برگها | نیتروژن | فسفر | پرکسیداز | سوپر اکسید دسموتاز | پرولین | اسید آلی |
| کادمیوم | ۲ | ۵۲۷/۶۶** | ۱۲۵۶/۰۶** | ۰/۰۰۱ns | ۰/۰۲ns | ۰/۷۷** | ۷۵۱۸/۲۶** | ۰/۱۷* | ۰/۰۱* |
| هومیک اسید | ۲ | ۲۹۵۳/۸۶** | ۵/۳۳ns | ۰/۰۱* | ۰/۰۴ns | ۱۰/۹۰ns | ۲۸۱۴/۷۶* | ۰/۴۸ ns | ۰/۰۱* |
| هومیک اسید × کادمیوم | ۴ | ۱۹۱/۳۵ * | ۱۹/۳۶* | ۰/۰۰۰۳ns | ۰/۰۱ns | ۶/۲۱* | ۲۹۱۹/۸۷** | ۰/۴۶* | ۰/۰۱** |
| خطا | ۵۴ | ۷۸/۲۵ | ۱۷/۳۹ | ۰/۰۰۱ | ۰/۰۲ | ۱۱/۱۰ | ۶۳۱/۵۲ | ۰/۱۳ | ۰/۰۰۲ |
| CV% | | ۸/۷۷ | ۲۰/۲۴ | ۸/۴۸ | ۱۱/۸۷ | ۱۳/۲۲ | ۸/۹۷ | ۶/۴۴ | ۳۴/۶۹ |

*, ** به ترتیب در سطح ۵ و ۱ درصد معنی دار و ns معنی دار نیست.

جدول ۲- مقایسه میانگین برهمکنش اثر سطوح مختلف کادمیوم و هومیک اسید در محیط کشت بر فعالیت سوپر اکسید دسموتاز، پرکسیداز، محتوای پرولین، اسید آلی، کادمیوم برگها و وزن تر اندام هوایی کاهو

| اسید آلی % | پرولین $\mu\text{mol (g FW)}^{-1}$ | سوپر اکسید دسموتاز $(\text{U g}^{-1} \text{W})$ | پرکسیداز $(\text{U g}^{-1} \text{W})$ | محتوای کادمیوم : (ppm) | وزن تر اندام هوایی (g) | تیمارهای آزمایش | |
|------------|------------------------------------|---|---------------------------------------|------------------------|------------------------|-----------------|-----------------|
| | | | | | | کادمیوم/mg/l | هومیک اسید/mg/l |
| ۰/۱۴۵ b | ۰/۳cd | ۱۵۶/۵۶ bc | ۵/۵۸۸ bcd | ۰/۷۶۲ d | ۹۶/۳۸b c | ۰ | ۰ |
| ۰/۱۶۰ b | ۰/۵۱ b | ۳۰۹/۹ab | ۶/۰۳۹ abc | ۳۵/۳۱۶ bc | ۷۸/۰۱ c | ۲ | ۰ |
| ۰/۱۰۹ b | ۰/۸۰ ab | ۳۲۴/۰۷a | ۸/۵۹ ab | ۵۴/۸۰۶ a | ۵۵/۲۸ d | ۴ | ۰ |
| ۰/۱۵۰ b | ۰/۲۶ cd | ۱۳۷/۵۳ cd | ۴/۱ cd | ۰/۵۹ d | ۱۲۲/۳۹ a | ۰ | ۱۰۰ |
| ۰/۱۵۱ b | ۰/۳۳ bc | ۱۰۶/۹۶ d | ۴/۷۸۵bcd | ۲۱/۴۶۱ c | ۱۲۲/۴۱a | ۲ | ۱۰۰ |
| ۰/۱۱۷ b | ۱/۰۴ a | ۱۰۱/۳d | ۳/۸۶۴ d | ۳۲/۲۶۲ ab | ۱۱۵/۲۶ ab | ۴ | ۱۰۰ |
| ۰/۲۶۸ a | ۰/۳۶ cd | ۱۴۳/۶۳ bc | ۴/۰۴۴ cd | ۰/۹۵ d | ۱۰۹/۲۳ab | ۰ | ۱۰۰۰ |
| ۰/۱۲۲ b | ۰/۰۱ d | ۱۸۲/۰۳ cd | ۴/۳۵۴ bcd | ۲۲/۷۵۲ c | ۱۰۷/۰۵ab | ۲ | ۱۰۰۰ |
| ۰/۱۴۲ b | ۰/۳۳ bc | ۱۶۰/۲۵ cd | ۳/۲۱۶ d | ۳۰/۳۶۹ abc | ۱۰۱/۸۲bc | ۴ | ۱۰۰۰ |

† در هر ستون، میانگین‌های که دارای حروف مشترک هستند در سطح ۵٪ آزمون دانکن اختلاف معنی‌داری ندارند

میلی گرم بر لیتر اسید هومیک نسبت به تیمار شاهد افزایش نشان داد. میزان جذب کادمیوم تحت تاثیر اسید هومیک در بستر آلوده به کادمیوم کاهش یافت. در تجزیه و تحلیل اثرات متقابل، تفاوت معنی‌داری ($P < ۰/۰۵$) در

اثر اسید هومیک بر جذب کادمیوم، نیتروژن و فسفر در کاهو تفاوت معنی‌داری در وزن تر گیاه تحت تاثیر تیمار اسید هومیک مشاهده شد (جدول ۱ و ۲). وزن تر گیاه به میزان ۲۶ و ۱۳ درصد به ترتیب تحت تاثیر ۱۰۰ و ۱۰۰۰

اسید هومیک بر میزان فسفر گیاه اثر معنی داری نداشت، اما باعث افزایش غلظت نیتروژن گیاه به میزان ۱۵ و ۳۶ درصد به ترتیب در غلظتهای ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر اسید هومیک نسبت به تیمار شاهد شد. اسید هومیک به عنوان افزایشده جذب بعضی از عناصر به خاک چون نیتروژن و فسفر عمل می کند (پانوچیو و همکاران ۲۰۰۱). با افزایش اسید هومیک در غلظتهای متفاوت به محلول غذایی کاج دریایی (*Pinus pinaster*) و کاج سیاه (*Pinus laricio*) مشاهده شد که غلظت نیتروژن هر دو گونه افزایش یافت، اما در غلظت فسفر آن تفاوتی حاصل نشد. تغییرات مشابه در کاهو زمانیکه از اسید هومیک در محلول غذایی استفاده شد مشاهده گردید (پانوچیو و همکاران، ۲۰۰۱). با افزایش اسید هومیک غلظت نیتروژن گیاه افزوده شد اما در غلظت فسفر آن تغییر معنی داری حاصل نشد (جدول ۱).

همانطور که نتایج این آزمایش نیز نشان داد ضریب انتقال کادمیوم در حضور اسید هومیک کاهش یافت. همچنین غلظت کادمیوم بافت گیاهی در حضور اسید هومیک ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر به ترتیب ۲۲/۷۵ و ۲۴/۳۱ میلی گرم به ازاء وزن خشک در تنش ۲ میلی گرم بر لیتر کادمیوم و ۳۲/۲۶ و ۳۰/۳۶ میلی گرم به ازاء وزن خشک در تنش ۴ میلی گرم بر لیتر کادمیوم بود. با توجه به غلظت کادمیوم در بافت گیاهی و بستر، ضریب انتقال کادمیوم در غلظتهای ۲ و ۴ میلی گرم بر لیتر کادمیوم به ترتیب ۱۳/۶۴ و ۱۷/۷۵ و زمانیکه از اسید هومیک ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر استفاده شد به ۰/۰۲۹ و ۰/۰۲۳ کاهش یافت که نشان دهنده کاهش انتقال کادمیوم در حضور اسید هومیک است.

میزان کادمیوم موجود در کاهو مشاهده گردید. میزان کادمیوم گیاه در غلظت ۲ میلی گرم بر لیتر کادمیوم با کاربرد ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر اسید هومیک به ۲۲ و ۲۴ درصد کاهش یافت، اما در غلظت ۴ میلی گرم بر لیتر کادمیوم و غلظتهای مشابه اسید هومیک به ۳۰ و ۳۲ درصد رسید. اسید هومیک با فلزات سنگین ایجاد پیوند می کند و از این طریق جذب آنها را کاهش می دهد. ایجاد پیوند اسید هومیک با کادمیوم و کاهش جذب آن در کاهو توسط وانگ و همکاران (۱۹۹۷) بررسی شد. تحقیقات آنان نشان داد اسید هومیک پیوند محکمی با کادمیوم ایجاد می کند و جذب آن را کاهش می دهد. در تحقیقاتی که سدلاک و همکاران (۱۹۸۴) بر روی جلبک (*capricornutum*) انجام دادند، نشان دادند که حضور اسید هومیک باعث کاهش جذب کادمیوم توسط این جلبک شد.

نتایج اثر متقابل اسید هومیک و کادمیوم بر وزن تر کاهو نشان داد که اسید هومیک باعث افزایش وزن گیاه تحت تنش کادمیوم شد. همانطور که سایر تحقیقات نیز نشان دادند، اسید هومیک با افزایش جذب بعضی عناصر چون نیتروژن، افزایش تولید ریشه و افزایش فتوسنتز باعث افزایش وزن گیاه می شود (دلفین و همکاران، ۲۰۰۵). همچنین اسید هومیک در ترکیب با کادمیوم جذب آن را کاهش می دهد و از این طریق اثرات سوء کادمیوم بر کاهش وزن گیاه را از بین می برد. لی و بارتلت (۱۹۷۶) افزایش وزن تر و خشک ذرت نسبت به شاهد در حضور اسید هومیک را نشان دادند. اما مسوت و یلمز (۲۰۰۵) به دلیل استفاده از غلظتهای پایین اسید هومیک به میزان ۵۰ میلی گرم بر لیتر در کاهو اثر معنی داری بر وزن تر و خشک مشاهده نکردند، بنابراین برای موثر بودن اسید هومیک بر کاهش جذب کادمیوم توسط گیاه و افزایش وزن، باید در غلظتهای بالا به کار رود.

اثر کادمیوم و اسید هومیک بر فعالیت پرکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز

فعالیت پرکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز در برگهای کاهو به طور معنی داری با افزایش غلظت کادمیوم افزایش یافت (جدول ۱ و ۲) به طور متوسط فعالیت پرکسیداز در غلظتهای ۲ و ۴ میلی گرم بر لیتر کادمیوم به ترتیب ۸ و ۵۳ درصد نسبت به شاهد افزایش نشان داد و فعالیت سوپراکسید دیسموتاز به ترتیب ۶۶ و ۱۰۶ درصد نسبت به شاهد افزایش یافت. فعالیت سوپراکسید دیسموتاز تا $324/07$ و پرکسیداز تا $8/59$ واحد به ازاء هر گرم وزن تر افزایش یافت. بین فعالیت سوپراکسید دیسموتاز و سطوح مختلف کادمیوم همبستگی مثبت معنی داری ($r=0/95$) و رابطه خطی $Y=127/19X+42/857$ و $Y=5/02X+0/7828$ با کادمیوم در سطح ۵ درصد معنی دار بود. در این آزمایش فعالیت هر دو آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و پرکسیداز تحت تاثیر تنش کادمیوم افزایش یافت. رابطه مثبت معنی داری بین افزایش فعالیت پرکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز تحت تاثیر سطوح مختلف کادمیوم در سطح ۵ درصد با $r=0/88$ برقرار بود.

با جذب و تجمع این فلز سنگین در گیاه، سیستم دفاعی گیاه فعال شده و رادیکالهای آزاد زیادی تولید می شود اما ممکن است در اثر افزایش و تداوم عامل تنش و به دنبال آن افزایش بیش از حد میزان رادیکالهای آزاد، مکانهای جذب و اتصال این رادیکالهای آزاد توسط آنتی اکسیدانها اشباع شود (مازودی و همکاران ۱۹۹۷). بنابراین پاسخ علیه تنشهای مختلف در سطوح مختلف آن تنش، بر حسب گونه متفاوت است. با مطالعه و بررسی سطوح مختلف تنش امکان بهبود شرایط مقاومت و مقابله با تنش وجود دارد. در این آزمایش نیز مشاهده شد سمیت

کادمیوم با افزایش فعالیت پرکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز جهت مقابله با رادیکالهای آزاد در اثر تنش کادمیوم همراه است و مقادیر آن در سلولها افزایش می یابد. نتایج مشابهی توسط سایر محققین موید این مطلب است (استمان، ۱۹۹۶ و پادماجا و همکاران، ۱۹۹۰). طبق نتایج حاصله توسط باولر (۱۹۹۴) سوپراکسید دیسموتاز حساسترین آنزیم به این تنش محیطی است که در اثر افزایش رادیکالهای آزاد، افزایش می یابد که با نتایج این آزمایش نیز مطابقت می کند. در مواجهه با تنش کادمیوم، فعالیت سوپراکسید دیسموتاز بیش از پرکسیداز افزایش می یابد، افزایش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در هر دو غلظت کادمیوم حدوداً ۸۶ درصد نسبت به شاهد بدون کادمیوم بود. نتایج حاصله با تحقیقات شاه و همکاران (۲۰۰۱) در مورد اثر تنش کادمیوم بر روی برنج مطابقت دارد. فعالیت آنزیمهای سوپراکسید دیسموتاز و پرکسیداز تحت تاثیر اسید هومیک، افزایشی نیافت (جدول ۱). زیرا بر طبق آنچه برای شرایط تنش تعریف می شود اگر به گیاه تنش وارد نشود آنتی اکسیدانها گیاه افزایش نمی یابد (قربانی و مقدم، ۱۳۸۴). از آنجایی که اسید هومیک نیز اثر تنش زایی بر گیاه ندارد فعالیت سوپراکسید دیسموتاز و پرکسیداز هم تغییر معنی داری نسبت به شاهد نداشت.

نتایج اثر متقابل کادمیوم و اسید هومیک نشان داد اسید هومیک در تعدیل فعالیت این دو آنزیم بسیار موفق بوده است. اسید هومیک باعث کاهش فعالیت این آنزیمها که تحت تنش کادمیوم افزایش یافته اند می شود. اما زمانی که فقط کادمیوم در محیط کشت وجود داشت فعالیت سوپراکسید دیسموتاز و پرکسیداز افزایش داشت. بیشترین فعالیت این دو آنزیم در غلظتهای ۲ و ۴ میلی گرم بر لیتر کادمیوم بود در حالیکه کمترین میزان آن در جایی است که

نیز مطابقت دارد (کاستوری و همکاران، ۱۹۹۲؛ زانگ و همکاران، ۲۰۰۰ و زانگ و اروین، ۲۰۰۴). کادمیوم از طریق سرعت بخشیدن به پیری برگ میزان پرولین را افزایش می دهد. مودان (۱۹۹۴) نیز اثر پیری برگ بر افزایش پرولین را در خردل هندی تحت تنش شوری نشان داد. همچنین گزارشاتی در مورد تجمع پرولین در گیاهان تحت تنش فلزات سنگین بویژه کادمیوم وجود دارد (اتال و همکاران، ۱۹۹۱). آنها دلیل افزایش پرولین در گیاه تیمار شده با کادمیوم را تلاش برای حفظ اسیدیته سیتوزولی و یا راهی برای حفاظت آنزیمی گیاه تحت تنش، بر اساس نتایج شاه و همکاران (۲۰۰۱) اعلام داشت. اسکات و همکاران (۱۹۹۷) نیز دلیل افزایش پرولین تحت تیمار کادمیوم در گیاه *Silene vulgaris* را کمبود آب موثر از تنش کادمیوم بدون اثر مستقیم کادمیوم بر این اسید آمینه دانستند. این تاثیر پذیری توسط سایرین نیز تایید شده است (بارسلو و پوشن، ۱۹۹۰ و کاستوری و همکاران، ۱۹۹۲). نتایج حاصله در این تحقیق با نتایج کاستا و مورل (۱۹۹۲) همسو نبود. او در کاهوی تیمار شده با کادمیوم افزایش پرولین را مشاهده نکرد، هر چند افزایش سایر اسیدهای آمینه چون آسپاراژین و متیونین و لیزین را مشاهده کرد (کلوسن ۲۰۰۲).

بحث و نتایج کلی

به طور کلی نتایج این آزمایش نشان می دهد که آنتی اکسیدانهای سوپراکسیددیسموتاز و پرکسیداز شاخصهای مناسبی برای نشان دادن اثر سمیت کادمیوم هستند. از آنجایی که تجمع کادمیوم در گیاه با نشانه های مورفولوژیکی کمی همراه است در این آزمایش حضور کادمیوم تنها باعث کاهش وزن اندام هوایی گیاه شد. لذا سمیت کادمیوم به صورت خطر مخفی، سلامت بشر را

از اسید هومیک بویژه در غلظت بالاتر استفاده شده است. اثر تفاوت در غلظتهای پایین و بالای اسید هومیک بر فعالیت سوپراکسیددیسموتاز مشهودتر از فعالیت پرکسیداز است.

تغییرات پرولین و اسید آلی تحت تاثیر کادمیوم و اسید هومیک

آلودگی گیاه با کادمیوم باعث افزایش غلظت پرولین در کاهو در سطح ۵ درصد شد اما اسید هومیک بر غلظت پرولین در گیاه اثر معنی داری نداشت. با کاربرد کادمیوم با غلظت ۲ و ۴ میلی گرم بر لیتر در محیط کشت غلظت پرولین گیاه به میزان ۸ و ۵۳ درصد افزایش یافت رابطه مثبت معنی داری ($r = 0.99$) نیز افزایش غلظت پرولین به دلیل افزایش غلظت کادمیوم را نشان داد. اثر متقابل اسید هومیک و کادمیوم بر تغییرات غلظت پرولین نشان داد که اسید هومیک در کاهش غلظت پرولین تولید شده در گیاه تحت تیمار کادمیوم بسیار موثر است. بیشترین میزان تولید پرولین در گیاهان تحت تنش ۴ میلی گرم بر لیتر کادمیوم حاصل شد در حالیکه حداقل مقدار پرولین در تیمار ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر اسید هومیک حتی تحت تنش ۲ میلی گرم کادمیوم به دست آمد. این نشان می دهد که با افزایش غلظت کادمیوم میزان اسید هومیک باید افزایش یابد تا تاثیر تنش ایجاد شده توسط کادمیوم را کاهش دهد. اسید آلی تحت تاثیر اسید هومیک و کادمیوم افزایش یافت. با افزایش غلظت کادمیوم به ۲ و ۴ میلی گرم بر لیتر، اسید آلی به ترتیب ۱۸ و ۳۰ درصد کاهش یافت.

نتایج آزمایش حاضر نشان داد که پرولین تحت تاثیر تنش کادمیوم به طور معنی داری افزایش یافت که با نتایج حاصل در گیاهان مختلف چون گراسها، آفتابگردان و لوبیا

سیاسگزاری

این پژوهش در دانشگاه ججیانگ (Zhejiang) چین با حمایت مالی یونسکو انجام شده است که به این وسیله قدردانی می‌گردد. همچنین از خانم پروفیسور فانگ و آقای دکتر نیکبخت که اینجانب را در اجرای این پژوهش یاری نمودند، سپاسگزارم.

تهدید می‌کند. حتی با وجود آنتی اکسیدانها برای حفاظت گیاه در برابر این تنش محیطی، خطر کادمیوم همچنان باقی است. زیرا با توجه به تکمیل شدن ظرفیت جذب این آنتی اکسیدانها برای رادیکالهای آزاد و از طرفی اثر تجمعی این فلزات سنگین در اندامهای گیاهی، وجود آنها همچنان تهدید کننده است. زمانی که از اسید هومیک که بخش اصلی تشکیل دهنده مواد آلی است استفاده شد، میزان جذب کادمیوم و میزان محتوای کادمیوم بافت گیاهی کاهش قابل توجهی پیدا کرد و خطر آن برای گیاه و متعاقباً برای انسان کاهش یافت.

منابع مورد استفاده

- ترابیان ع و مهجوری م. ۱۳۸۱. بررسی اثر آبیاری با فاضلاب روی جذب فلزات سنگین بوسیله سبزیهای برگی جنوب تهران. مجله علوم خاک و آب. جلد ۱۶. شماره ۲. ۱۷-۲۱.
- قربانی کوژدی ح و لادن مقدم ع. ۱۳۸۴. مقدمه‌ای بر تنش‌های اکسایشی و کرنش‌های گیاهی. نشر دواوین. تهران.
- هاشمی ح کاشی ع زرین کفش م لسانی ح. ۱۳۷۱. اثر ازت روی خواص کمی و کیفی ۴ رقم گوجه فرنگی. پایان نامه کارشناسی ارشد علوم باغبانی دانشگاه تهران.

Alloway BJ, 1990. Heavy Metals in Soils. Blackies and Sons Ltd .New York.

Andersson A and Bingefors S, 1985. Trends and annual variations in Cd concentration in grain of winter wheat. Acta Agriculture Scandinavia 35: 339-344.

Atal NP, Saradhi P and Mohanty P, 1991. Inhibition of the chloroplast photochemical reactions by treatment of wheat seedlings with low concentrations of cadmium. Analysis of electron transport activities and changes in fluorescence yield. Plant Cell Physiol 32: 943-951.

Barcelo J and Poschenreider C, 1990. Plant water relations as affected by heavy metals: a review Journal of Plant Nutrition 13: 1-37.

Bates LS, Waldren RP and Teare LD, 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant and Soil 39: 205-207.

Beauchamp I and Fridovich I, 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels, Anal Biochem 44: 151-155.

- Bowler CW, Van Camp M, Van Montagu and Lnze D, 1994. Superoxide dismutase in plants. *CRC Crit Rev Plant Sci* 13:199-218.
- Campbell, PGC. 1995. Interactions between trace metals and aquatic organisms: a critique of the free-ion activity model. Pp. 45-102. In: Tessier A and Turner DR (eds). *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*, John Wiley & Sons Publisher, New York.
- Candan N and Tarhan L, 2003. Relationship among chlorophyll-carotenoid content, antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation levels by Mg^{+2} deficiency in the *Mentha pulegium* leaves. *Plant Physiol Biochem* 41: 35-40.
- Chandlee JM and Scandalios JG, 1984. Analysis of variants affecting the catalase development program in maize scutellum, *Theory Appl Genet* 69: 71-77.
- Claussen W, 2002. Growth, water use efficiency, and proline content of hydroponically grown tomato plants as affected by nitrogen source and nutrient concentration, *Plant Soil* 247: 199–209.
- Costa G and Morel J, 1994. Water relations, gas exchange and amino acid content in Cd treated lettuce. *Plant Physiol Biochem* 32: 561–570.
- Gupta SK and Häni H, 1980. Effect of copper supplied in the form of different Cu-saturated sludge samples and copper salts on the Cu-concentration and dry matter yield of corn grown in sand. In *Symposium on Copper in Animal Wastes and Sewage Sludge*. Pp: 67-69. In: Hermite PL and Dehand-schutter J (eds). Reidel Publishing Co, Dordrecht.
- Hsu YT and Kao CH, 2003. Changes in protein and amino acid contents in two cultivars of rice seedlings with different apparent tolerance to cadmium, *Plant Growth Regulation* 40: 147–155.
- Kastori R, Petrovic M and Petrovic N, 1992. Effect of excess lead, cadmium, copper and zinc on water relations in sunflower. *Journal of Plant Nutrition* 15: 2427–2439.
- Lee YS and Bartlett RJ, 1976. Stimulation of plant growth by humic substances. *Soil Sci Soc Am J* 40: 876-879.
- Lguirati A, ElmousadikA and Hafidi M, 2004. Contribution alade marche dere habilitation des sites dede charges au Maroc. Pp. 26-27. In: *Proceedings of the First International Symposium on the Management of Liquid and Solid Residues (Malisore)*. April 2004, Mohammadia, Morocco.
- Mansour MMF, 2000. Nitrogen containing compounds and adaptation of plants to salinity stress, *Biol Plant* 43: 491–500.
- Mazhoudi A, Chaoui MH, Ghorbal E and Ferjani E, 1997. Response of antioxidant enzymes to excess copper in tomato (*Lycopersicon esculentum*, Mill.), *Plant Sci* 127: 129-137.

- Mesut Cimrin K And Yilmaz I, 2005. Humic acid applications to lettuce do not improve yield but do improve phosphorus availability. *Acta Agriculture Scandinavica Section B-Soil and Plant*. 55: 58-63.
- Moya JL, Ros R and Picazo I, 1993. Influence of cadmium and nickel on growth, net photosynthesis and carbohydrate distribution in rice plants. *Photosyn Res* 3: 75-80.
- Östman G, 1996. *Salix förmaga att ta upp kadmiumen fältstudie*. Swedish University of Agricultural Science, Department of Ecology and Environmental Research, Section of Short Rotation Forestry, Report 55:71-73.
- Padmaja K, Prasad DDK and Prasad ARK, 1990. Inhibition of chlorophyll synthesis in *Phaseolus vulgaris* seedlings by cadmium acetate. *Photosynthetica* 24: 399-405.
- Panuccio MR, Muscolo A and Nardi S, 2001. Effect of humic substances on nitrogen uptake and assimilation in two species of pinus. *Journal of Plant Nutrition* 24 : 693-704.
- Santandrea G, Pandolfini T and Bennici A, 2000. A physiological characterization of Mn-tolerant tobacco plants selected by in vitro culture. *Plant Sci* 150: 163–177.
- Schat H, Sharma SS and Vooijs R, 1997. Heavy metal-induced accumulation of free proline in metal tolerant and a nontolerant ecotype of *Silene vulgaris*. *Physiol Plant* 101: 477–482.
- Schobert B and Tschesche H, 1978. Unusual solution properties of proline and its interaction with proteins. *Biochim Biophys Acta* 541: 270–277.
- Sedlacek J, Kallqvist T and Gjessing ET, 1983. Effect of a aquatic humus on uptake and toxicity of cadmium to *Selenastrum capricornutum* Printz. Pp. 495–516 .In Christman RF and ET Gjessing, [eds.] *Aquatic and Terrestrial Humic Materials*. Ann Arbor Science Publishers, Ann Arbor, MI.
- Shah K, Kumar RG, Verma S and Dubey RS, 2001. Effect of cadmium on lipid peroxidation, superoxideanion generation and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. *Plant Sci* 161: 1135–1144.
- Wang DY, Qing CL, Guo TY and Guo YJ, 1997. Effects of humic acid on transport and transformation of mercury in soil plant systems. *Water, Air, and Soil Pollution* 95: 35-43.
- Zhang F, Li X, Wang C and Shen Z, 2000. Effect of cadmium on antoxidation rate of tissue and inducing accumulation of free proline in seedlings of mung bean. *Journal of Plant Nutrition* 23: 356–368.
- Zhang X and Ervin EH, 2004. Cytokinin-containing seaweed and humic acid extracts associated with creeping bentgrass leaf cytokine and drought resistance. *Crop Science* 44:1-10.