مجله علوم باغبانی ایران
دوره ۴۲، شماره ۲، ۱۳۹۰ (۱۱۲-۱۰۵)

بررسی اثر هومیک اسید بر تجمع کادمیم و تغییر در فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های پرکسیداز و سوپر اکسید دیسموتاز در کاهو

مریم حقیقی[1]*، محسن کافی[2]، تکتم سادات تقوی[3]، عبدالکریم کاشی[4] و غلامرضا ثواقبی[5]
۱، استادیار دانشگاه صنعتی اصفهان، ۲، ۳، ۴، ۵، دانشیار، استادیار، استاد و دانشیار
پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
(تاریخ دریافت: ۸۸/۱۱/۱۵ - تاریخ تصویب: ۸۹/۴/۱۲)

چکیده

هومیک اسید به عنوان یک ماده آلی با باند کردن و جذب سطحی فلزات سنگین موجود در خاک احتمالاً باعث کاهش جذب فلزات سنگین توسط گیاه می‌شود. این روش می‌تواند از بهترین استراتژیهای کاهش خطرات ناشی از فلزات سنگین برای گیاه و متعاقباً برای انسان باشد. با توجه به اهمیت موضوع، آزمایشی به صورت فاکتوریل، در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۷ تکرار انجام شد. برای بررسی اثر کادمیم و هومیک اسید بر روی فعالیت آنتی‌اکسیدانی کاهو در کشت بدون خاک سه غلظت صفر، ۲، ۴ میلی‌گرم در لیتر کادمیم و سه غلظت صفر، ۱۰۰ و۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر هومیک اسید به محلول غذایی اضافه شد. سپس عکس العمل گیاه از طریق اندازه‌گیری تغییرات آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی پرکسیداز و سوپر اکسید دیسموتاز مورد بررسی قرار گرفت و به دنبال آن اثر مخرب کادمیم بر زی‌توده گیاه مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج این آزمایش نشان داد که افزایش غلظت کادمیم با افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی پرکسیداز و سوپر اکسید دیسموتاز برای کاهش دادن رادیکال‌های آزاد ناشی از تنش کادمیم همراه است. کادمیم در بافت گیاه تجمع می‌یابد و زی‌توده را کاهش می‌دهد. در غلظت‌های ۲ و ۴ میلی‌گرم در لیتر کادمیوم به طور متوسط فعالیت پرکسیداز ۷ و ۲۹ درصد و فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز ۳۹ و ۱۹ درصد نسبت به شاهد افزایش نشان داد. در حالی که با کاربرد هومیک اسید تغییرات آنتی‌اکسیدان‌ها و وزن گیاه در حضور کادمیم تعدیل شد.

واژه‌های کلیدی: **هومیک اسید، سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)، پرکسیداز (POD)، فلزات سنگین، کادمیم، آنتی‌اکسیدان، کاهو.**

مقدمه

یکی از مشکلات عمده امروزه جوامع بشری موضوع آلودگی محیط زیست است که رفاه و سلامتی انسان را به خطر انداخته و تلاش‌های زیادی برای برطرف شدن این آلودگیها انجام می‌شود. مشکل آلودگی محیط زیست از انواع فعالیت‌های صنعتی، کشاورزی و شهرنشینی انسان حاصل می‌شود و زاییده رشد بی‌رویه جمعیت و تمدن بشری است. در بین آلاینده‌های زیست محیطی آلودگی فلزات سنگین حایز اهمیت خاصی می‌باشد، زیرا در اثر جذب فلزات سنگین توسط گیاهان نه تنها کیفیت و عملکرد گیاه کاهش می‌یابد، بلکه تجمع آن در محصولات تولیدی می‌تواند موجب انتقال این عناصر سمی به انسان شده و سلامتی او را به خطر اندازد. در این بین سمیت کادمیم (Cd) به علت متحرک بودن، راحتی جذب آن توسط گیاه و افزوده شدن به خاک به خصوص از طریق مصرف کودهای فسفاته در

* نویسنده مسئول: مریم حقیقی تلفن: ۰۳۱۱-۳۹۱۳۴۱۲ E-mail: mhaghighi@cc.iut.ac.ir

سطح بین‌المللی مورد توجه خاص می‌باشد، خصوصاً اینکه کادمیم به طور روز افزونی با پیشرفت تدریجی و مداوم صنعت و آلودگیهای حاصل از آنها و افزایش مصرف کودها و به طور خاص کودهای فسفاته به محیط زیست اضافه می‌شود.

با صنعتی و مکانیزه شدن زندگی بشر مصرف محصولات فیبری چون سبزی‌ها بسیار توصیه می‌شود. تحقیقات نشان می‌دهد سبزیجاتی نظیر کاهو، اسفناج، کرفس و کلم به سمیت کادمیم بسیار حساس هستند. طبق آزمایشات Davis & Smith (1980) به ترتیب حساس‌ترین گیاهان به سمیت کادمیم: اسفناج، سویا، شاهی، کاهو، ذرت، هویج، شلغم، لوبیا، گندم، تربچه، گوجه فرنگی، کدو، کلم و برنج می‌باشند. این دانشمندان نشان دادند که در کاهو، هویج و تنباکو بیشترین کادمیم در برگ‌ها تجمع می‌یابد. از آنجایی که بخش خوراکی کاهو برگ‌ها بوده و سرانه مصرف کاهو زیاد می‌باشد، در نتیجه ایجاد سمیت کادمیم در انسان از طریق مصرف کاهو قابل توجه است. افزایش کادمیم در خاک با اختلالات فیزیولوژیکی زیادی مانند جلوگیری از جوانه‌زنی بذر، کاهش رشد خصوصاً رشد ریشه، اختلال در جذب مواد معدنی و متابولیسم کربوهیدراتها و در نتیجه اثر شدید بر روی زی‌توده همراه است (Kaschel, et al., 2002). کاهش زی‌توده[1] در اثر سمیت کادمیم پیامد مستقیم کاهش سنتز کلروفیل و فتوسنتز می‌باشد (Mazhoudi et al., 1997). نکته قابل توجه در مورد سمیت کادمیم در کاهو این است که تا غلظت‌های بالای کادمیوم نشانه‌های مورفولوژیکی خاصی در گیاه دیده نمی‌شود.

اکسیژن فعال در گیاه در شرایط تنش افزایش می‌یابد و این اکسیژن فعال از طریق فرآیندهای اکسیدکنندگی محتویات سلول، اثرات مخرب جدی بر گیاه می گذارد. اولین فعالیت این ترکیبات مخرب اثر بر غشاء می‌باشد (Beauchamp & Fridovich, 1971; Perl-Treves & Galun, 1991). گیاه دارای مکانیزم‌های متفاوتی جهت حذف یا کاهش این ترکیبات مخرب می‌باشد (Mesut & Yilmaz, 2005; Ghorbani & Moghadam, 2005). یکی از این سیستم‌های تدافعی، افزایش آنتی‌اکسیدان‌هایی چون آنزیم‌های پرکسیداز و سوپر اکسید دیسموتاز است. سوپر اکسید دیسموتاز در قسمت‌های مختلف سلول قرار دارد و تنها آنزیمی است که بر رادیکال‌های آزاد موثر است و آنها را به پراکسید هیدرژن تبدیل می‌کند. پراکسید هیدرژن توسط آنزیم‌های مختلف چون پرکسیداز تبدیل به آب می‌شود. فعالیت این آنزیم‌ها در گیاه در مواجه با تنش‌های محیطی افزایش می‌یابد و از این طریق مقاومت گیاه را به این شرایط افزایش می‌دهد (Albertina et al., 2006; Santandrea et al., 2000). اگرچه آنتی‌اکسیدان‌ها گیاه را در برابر تنش‌ها محافظت می‌کنند، اما از تجمع کادمیم جلوگیری نمی‌کنند. لذا بهترین استراتژی برای کاشت سبزی‌ها در مناطق آلوده به کادمیم غیرمتحرک کردن آن در محل ریشه است (Moya et al., 1993).

تحقیقات Kaschel et al. (2002) نشان داد که میزان جذب کادمیوم توسط گیاه به میزان زیادی به ترکیبات آلی خاک بستگی دارد. مولکولهای درشت هومیک اسید کمپلکس‌های پایداری با کادمیوم ایجاد می‌کند و قابلیت جذب و در دسترس بودن آن را توسط ریشه کاهش می‌دهد.

هومیک اسید باعث باند شدن وجذب سطحی فلزات سنگین به ذرات سیلیکا و اکسید آهن در خاک می‌شود (Lguirati et al., 2004). همچنین گروه‌های فعال هیدروکسیل، فنوکسیل و کربوکسیل موجود در هومیک اسید باعث جذب فلزات سنگین و باند کردن آنها می‌شود و از این طریق جذب آنها را کاهش می‌دهد. این اثرات ذکر شده توسط هومیک اسید در گندم و نعناع در کاهش جذب فلزات سنگین نشان داده شده است (Candan & Tarhan, 2003; Lee & Bartlett, 1976). هومیک اسید می‌تواند اثرات مختلفی را در گیاه ایجاد کند که به اختصار می‌توان به افزایش رشد، افزایش متابولیسم، افزایش جذب عناصر، افزایش تولید ریشه، افزایش مقاومت به استرس‌های خشکی، شوری و فلزات سنگین، افزایش فتوسنتز، افزایش آنتی‌اکسیدان‌ها و غیره اشاره نمود (Delfine, 2005; Hartwigsen & Evans, 2000; Shah et al., 2001; Zhang & Ervin, 2004).

1. Biomass

در این آزمایش رشد گیاه کاهو و عکس العمل آن به افزایش غلظت کادمیم از طریق اندازه‌گیری میزان جذب کادمیم و فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی چون پرکسیداز و سوپر اکسید دیسموتاز بررسی شده و اثر افزودن هومیک اسید بر میزان جذب کادمیم و تغییرات این آنزیم‌ها تحت شرایط تنش این عنصر مورد مطالعه قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

شرایط کشت و تیمارهای آزمایشی

بذور رقم ایتالی کاهو (*Lactuca sativa* L.) در مخلوط ورمیکولیت و پرلیت (به نسبت حجمی ۲/۱) کاشته شد. نشاهایی که ۳-۲ برگ داشتند به سیستم کشت هیدروپونیک شامل گلدانهایی با مخلوط پیت و پرلیت (به نسبت حجمی ۱/۱) منتقل گردیدند و در گلخانه نگهداری شدند. کادمیم به صورت $CdCl_2$ به محلول غذایی با ۳ غلظت صفر، ۲ و ۴ میلی‌گرم در لیتر و هومیک اسید با سه غلظت صفر، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر اضافه شد. محلول غذایی طبق فرمول هوگلند آماده شد. واکنش محلول (pH) توسط سود و اسید کلریدریک حدود ۶/۵ تنظیم گردید. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۷ تکرار (۱ بوته در گلدان با میزان بستر مساوی از نظر وزنی) در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه ججیانگ چین انجام گردید و داده‌ها با نرم افزار MSTAT-C وSAS آنالیز گردید. میانگینها با روشLSD در سطح ۵٪ مقایسه شدند.

نمونه‌برداری و اندازه‌گیری فعالیت آنزیم

دومین برگ گسترده برای سنجش آنزیمی ۵ روز پس از تیماردهی انتخاب شد و در کیسه پلاستیکی در فلاسک یخ به آزمایشگاه منتقل گردید. ۰/۵ گرم نمونه برگ بعداز شستن با آب دیونیزه همراه ۵ میلی‌لیتر بافر فسفاته (۵۰ میکرومول فسفات با اسیدیته ۷/۸، ۱ درصد (وزنی/حجمی) از BSA، ۰/۰۵ درصد (وزنی/حجمی) از مرکاپتواتانول[1]، ۱ درصد (وزنی/حجمی) از اسکوربات[2]) با غلظت ۰/۵ مول بر لیتر با اسیدیته ۷/۸ در هاون در مجاورت یخ در کمتر از ۴ درجه سانتی‌گراد له شده و سپس مخلوط حاصل با ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتریفیوژ گردید. عصاره بالایی لوله آزمایش برای سنجش آنزیم به آرامی جدا شد (Beauchamp & Fridovich, 1971).

سنجش سوپر اکسید دیسموتاز طبق روش Beauchamp & Fridovich (1971) با تغییراتی انجام شد. سه میلی‌لیتر محلول سنجش شامل ۵۰ میکرومول بافر فسفاته با اسیدیته ۷/۸، ۹/۹ میکرومول از ماده متیونین[3]، ۵/۷ میکرومول نیتروتترازولیوم بلوکلراید[4]، ۰/۰۰۴۴ (وزنی/حجمی) از ریبوفلاوین[5] و ۰/۰۲۵ (وزنی/حجمی) از تریتون-۱۰۰ به عصاره اضافه گردید.

میزان فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز بر حسب تغییر NBT در برابر نور توسط اسپکتروفتومتر در ۵۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. یک واحد فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز معادل ۵۰ درصد ممانعت از تغییر رنگ NBT در برابر نور بیان می‌شود.

سنجش پرکسیداز بر طبق روش Chandlee & Scandalios (1984) با یکسری تغییرات انجام شد محلول واکنش شامل ۵۰ میلی مول بافر فسفاته پتاسیم، ۱ درصد (وزنی/حجمی) گویکول[6]، ۰/۰۴ (حجمی/حجمی) پراکسید هیدرژن[7] با اسیدیته ۶/۱ تهیه شد. سپس ۱۷۰۰ میکرولیتر محلول واکنش به ۱۰۰ میکرولیتر عصاره گیاهی تهیه شده اضافه شد. جذب نور به علت اکسید شدن گویکول افزایش می‌یابد که میزان جذب توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در ۴۷۰ نانومتر سنجیده می‌شود. میزان آنزیم بر اساس مقدار گویکولی که در دقیقه اکسید می‌شود بیان می‌گردد.

اندازه‌گیری کادمیم برگ‌ها

جهت سنجش میزان کادمیم ۵ گرم از برگ کاهو پس از خاکستر شدن در دمای۵۵۰ درجه سانتی‌گراد در کوره به مدت ۵ ساعت و افزودن اسید کلریدریک ۱ نرمال به کمک دستگاه ICP[8] اندازه‌گیری شد.

1. Mercaptoethanol
2. Ascorbate
3. L- methionine
4. Nitro tetrazolium blue chlorid(NBT)
5. Riboflavin
6. Guaiacol
7. H_2O_2
8. Inductively Coupled Plasma

نتایج

اثر کادمیم بر وزن تر و جذب کادمیوم توسط کاهو

اثر غلظت‌های مختلف کادمیوم بر وزن تر و میزان تجمع کادمیوم در برگ در جدول ۱ نشان داده شده است. وزن تر اندام هوایی کاهو در غلظت‌های ۲ و ۴ میلی‌گرم در لیتر کادمیوم نسبت به شاهد به ترتیب ۸ و ۲۵ درصد کاهش یافت. میزان جذب کادمیوم توسط گیاه با افزایش غلظت کادمیوم در محلول غذایی به طور معنی‌داری افزایش داشته است. میزان جذب کادمیوم در غلظت‌های ۲ و ۴ میلی‌گرم در لیتر به ترتیب ۳۵۵ و ۵۴۵/۹ میکروگرم درگرم وزن خشک بوده است. مقایسه بین میزان کادمیوم در گیاه و زی‌توده تولیدی توسط گیاه همبستگی منفی با R^2=۰/۹۹ و فرمول $y = -20.55x + 117.66$ را نشان می‌دهد. به این معنی که با افزایش غلظت کادمیوم در محلول غذایی، زی‌توده گیاه کاهش یافت.

اثر کادمیم بر فعالیت پرکسیداز و سوپر اکسید دیسموتاز

فعالیت پرکسیداز و سوپر اکسید دیسموتاز در برگ‌های کاهو به طور معنی‌داری با افزایش غلظت کادمیوم افزایش یافت (جدول ۱). در غلظت‌های ۲ و ۴ میلی‌گرم در لیتر کادمیوم فعالیت پرکسیداز به طور متوسط ۷ و ۲۹ درصد و فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز ۳۹ و ۱۹ درصد نسبت به شاهد افزایش نشان داد. میزان فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز تا ۲۸۸/۳۰۴ (واحد به ازاء گرم وزن تر) و فعالیت پرکسیداز تا ۸/۳۵ (واحد به ازاء گرم وزن تر) افزایش یافت. این افزایش، همبستگی مثبت معنی‌داری در سطح ۵ درصد نشان می‌دهد. این رابطه بین فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز و سطوح مختلف کادمیوم با R^2=۰/۹۵ و فرمول $Y=42.857X+127.19$ و بین فعالیت پرکسیداز و سطوح مختلف کادمیوم با فرمول $Y=0.7838X+5.02$ و R^2=۰/۹۵ است که در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود. در این آزمایش رابطه مثبت معنی‌داری بین افزایش فعالیت دو آنزیم پرکسیداز و سوپر اکسید دیسموتاز تحت تأثیر سطوح مختلف کادمیوم در سطح ۵ درصد با R^2=۰/۸۳ وجود داشت.

اثر هومیک اسید بر وزن تر، فعالیت پرکسیداز و سوپر اکسید دیسموتاز در کاهو

اثر غلظت‌های مختلف هومیک اسید بر وزن تر اندام هوایی، فعالیت پرکسیداز و سوپر اکسید دیسموتاز در جدول ۲ نشان داده شده است. اضافه شدن هومیک اسید به بستر کشت بر فعالیت پرکسیداز و سوپر اکسید دیسموتاز تأثیر معنی‌داری نداشت وزن تر گیاه به طور

جدول ۱- اثر سطوح مختلف کادمیوم در محلول غذایی بر فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز، پرکسیداز، وزن تر و مقدار کادمیوم برگ در کاهو

غلظت کادمیوم (mg/l)	فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز (U g^{-1} W)	فعالیت پرکسیداز (U g^{-1} W)	وزن تر اندام هوایی (g)	مقدار کادمیوم برگ mg/kg dry weight
۰	۱۵۶/۵۶c	۵/۵۸b	۹۶/۳۸a	۵/۱۳c
۲	۲۵۹/۹b	۶/۰۳b	۷۸/۰۱b	۲۲/۸۴b
۴	۳۲۴/۰۷a	۸/۵۹a	۵۵/۲۸c	۳۳/۸۱a

† در هر ستون، میانگین‌هایی که دارای حروف مشترک هستند، در سطح ۵٪ آزمون LSD اختلاف معنی‌داری ندارند.

جدول ۲- اثر سطوح مختلف هومیک اسید در محلول غذایی بر فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز، پرکسیداز، وزن تر و مقدار کادمیوم برگ در کاهو

غلظت هومیک اسید (mg/l)	فعالیت پرکسیداز (U g^{-1} W)	وزن تر اندام هوایی (g)	فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز (U g^{-1} W)	مقدار کادمیوم برگ mg/kg dry weight
۰	۵/۵۸a	۹۶/۳۸b	۱۵۶/۵۶a	۲۱/۶۷a
۱۰۰	۴/۱۰a	۱۲۲/۳۹a	۱۳۷/۵۳ab	۲۰/ ۱۷b
۱۰۰۰	۴/۰۴a	۱۰۹/۲۳a	۱۸۲/۰۳a	۱۹/۹۳c

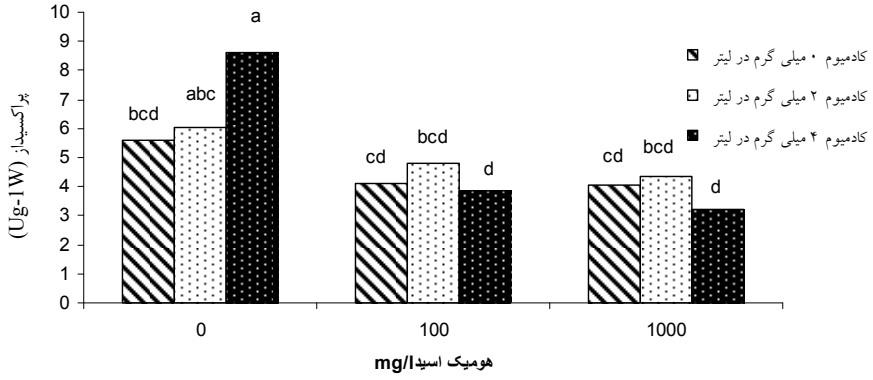
† در هر ستون، میانگین‌هایی که دارای حروف مشترک هستند، در سطح ۵٪ آزمون LSD اختلاف معنی‌داری ندارند.

معنی‌داری تحت تأثیر تیمار هومیک اسید افزایش یافت. این افزایش در غلظت‌های ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر هومیک اسید نسبت به تیمار شاهد به ترتیب ۲۱ و ۱۲ درصد بود. میزان جذب کادمیم تحت تأثیر هومیک اسید تفاوت معنی‌داری نشان نداد.

اثر متقابل هومیک اسید و غلظت‌های مختلف کادمیوم بر فعالیت پرکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز و محتوای کادمیم در کاهو

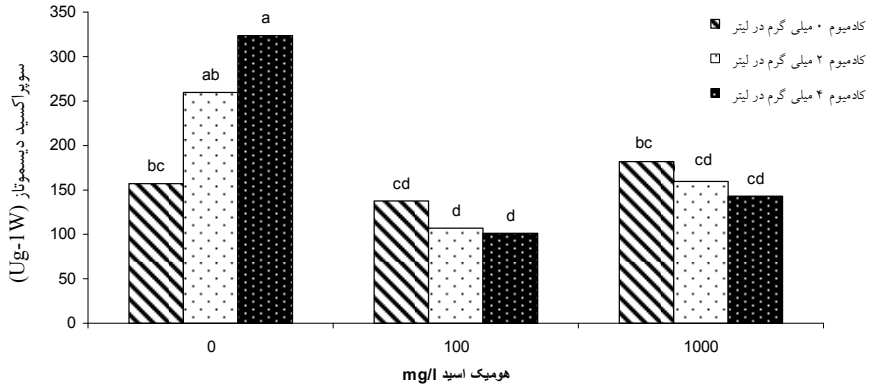
زمانی که فقط کادمیوم در محیط کشت وجود داشت، فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز و پرکسیداز گیاه مشابه شرایط تنش افزایش داشت. بیشترین فعالیت این دو آنزیم در غلظت‌های ۲ و ۴ میلی‌گرم بر لیتر کادمیم بود. هومیک اسید موجب کاهش فعالیت این دو آنزیم که تحت تنش کادمیوم افزایش یافته‌اند شد. اثر متقابل هومیک اسید و کادمیم بر فعالیت این دو آنزیم در شکل ۱ و ۲ نشان داده شده است. فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز بیشتر تحت تأثیر تعدیل کنندگی هومیک اسید در شرایط ناشی از تنش کادمیم است.

در آنالیز اثرات متقابل تفاوت معنی‌داری در میزان کادمیم موجود در برگ گیاه در حضور هومیک اسید استفاده شد، مشاهده گردید (شکل ۳). میزان کادمیم برگ در تنش ۲ میلی‌گرم بر لیتر کادمیم ۶۴ و ۵۵ درصد با کاربرد غلظت‌های ۱۰۰ و۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر هومیک اسید کاهش داشت اما این میزان در غلظت ۴ میلی‌گرم بر لیتر کادمیم و غلظت‌های مشابه هومیک اسید به ترتیب ۶۹ و ۸۰ درصد کاهش داشت. اما میزان کادمیم ۳۵ و ۵۴ میکروگرم در گرم وزن خشک با تیمار ۲ و ۴ میلی‌گرم بر لیتر کادمیم بود.



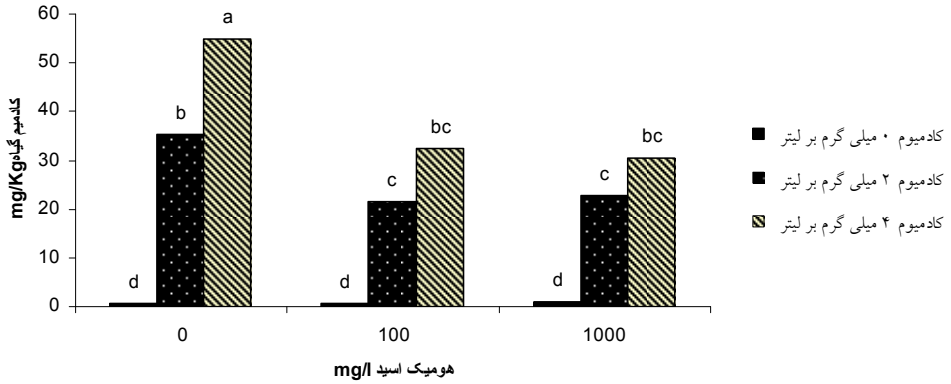
شکل ۱- اثر متقابل غلظت‌های مختلف هومیک اسید و کادمیوم بر فعالیت آنزیم پرکسیداز در کاهو

† حروف غیر مشابه در نمودار نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشد.



شکل ۲- اثر متقابل غلظت‌های مختلف هومیک اسید و کادمیوم بر فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز در کاهو

† حروف غیر مشابه در نمودار نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشد.



شکل ۳- اثر متقابل غلظت‌های مختلف هومیک اسید و کادمیوم بر مقدار کادمیوم برگ

† حروف غیر مشابه در نمودار نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشد.

بحث

نتایج به دست آمده نشان داد افزایش جذب کادمیوم اثر زیادی بر کاهش رشد گیاه داشته است، که این نشان‌دهنده اثر سمیت این عنصر بر گیاه و ایجاد تنش در آن می‌باشد. جذب کادمیوم توسط گیاه بستگی به گونه گیاه و میزان کادمیوم در محیط اطراف ریشه دارد، به طوری که با افزایش غلظت کادمیوم، میزان جذب آن نیز توسط گیاه افزایش می‌یابد. رابطه رگرسیونی معنی‌داری بین مقدار کادمیم قسمت هوایی و کاهش وزن گیاه مشاهده شد. Eriksson (1990) نیز چنین ارتباطی را در گندم گزارش کرد. جذب کادمیوم در گندم به میزان کادمیوم در خاک بستگی دارد. وی ارتباط مثبتی بین میزان جذب کادمیوم و غلظت کادمیوم قابل انتقال در خاک را نشان داد. Östman (1996) در تحقیقی بر روی کاهو مشاهده کرد که رابطه معنی‌داری بین میانگین کادمیوم قابل جذب توسط برگ‌ها و غلظت کادمیوم در محیط غذایی وجود دارد. به این معنی که جذب کادمیوم توسط گیاه، با افزایش غلظت آن در محیط افزایش می‌یابد. بطور مشابه در این تحقیق دیده شد که بیشترین میزان جذب کادمیوم در غلظت ۴ میلی‌گرم در لیتر بود و این مقدار جذب کادمیوم در غلظت مذکور، ۵۳ درصد بیشتر از غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر بوده است. نتایج این تحقیق با نتایج Andersson & Bingefors (1985) که نشان دادند میزان کادمیوم در گیاه و سرعت جذب آن متناسب با غلظت آن در محیط است نیز، مطابقت دارد. با جذب و تجمع این فلز سنگین در گیاه، سیستم دفاعی گیاه فعال شده و رادیکال‌های آزاد زیادی تولید می‌کند. 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 آنتی‌اکسیدان‌ها اشباع شود (Mackowiak et al., 2001). آسیب‌های وارده در اثر تجمع کادمیم، نتیجه تغییر سطح فعالیت‌های اکسیداتیوی گیاه است که باعث ایجاد تنش‌های اکسیداتیو در اثر تجمع اکسیژن فعال و رادیکال سوپر اکسید (O^{-2})، رادیکال هیدروکسیل (OH^{-}) و پراکسید هیدرژن (H_2O_2) در یک گونه می‌شود (Karataglis et al. 1991). سلول‌های گیاهی سیستم تدافعی علیه اکسیژن فعال دارند که از آن جمله فعال شدن آنزیم‌های پرکسیداز و سوپر اکسید دیسموتاز هستند. در این آزمایش نیز مشاهده شد سمیت کادمیوم با افزایش فعالیت پرکسیداز و سوپر اکسید دیسموتاز جهت مقابله با رادیکال‌های آزاد در اثر تنش کادمیم همراه است. نتایج مشابهی توسط سایر محققین به دست آمده است (Östman, 1996; Padmaja et al., 1990). طبق نتایج حاصله توسط Bowler et al. (1994) سوپر اکسید دیسموتاز حساس‌ترین آنزیم به این تنش محیطی است، که فعالیت این آنزیم در اثر افزایش رادیکال‌های آزاد، افزایش می‌یابد افزایش فعالیت این آنزیم در آزمایش فوق نیز مشاهده شد. در مواجه با تنش کادمیوم، فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز بیش از پرکسیداز افزایش می‌یابد و فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز حدوداً ۲۹ درصد نسبت به شاهد (بدون کادمیم) افزایش داشت. نتایج حاصله با تحقیقات Shah

.et al (2002) در مورد اثر تنش کادمیوم بر روی برنج مطابقت دارد. وزن گیاه تحت تنش کادمیوم کاهش قابل توجهی داشت رابطه رگرسیونی منفی، بین غلظت کادمیم برگ و وزن گیاه مشاهده شد. نتایج مشابهی توسط .Shah et al (2002) با کاربرد کادمیوم در گیاه برنج گزارش کردند.

اثر متقابل هومیک اسید بر غلظت مختلف کادمیوم نشان داد هومیک اسید باعث افزایش وزن تر گیاه می‌شود زیرا طبق تحقیقات، هومیک اسید با افزایش جذب عناصر، افزایش تولید ریشه، افزایش فتوسنتز توسط گیاه باعث افزایش وزن تر گیاه می‌شود (Chandlee & Scandalios, 1984; Hartwigsen & Evans, 2000). همچنین هومیک اسید با جذب و باند کردن کادمیوم جذب آن را کاهش می‌دهد و از این طریق اثرات سوء کادمیوم بر کاهش وزن گیاه را از بین می برد. اثرات مثبت هومیک اسید بر افزایش وزن گیاه دیده شده است. وزن تر گیاه زمانی که از هومیک اسید در شرایط تنش کادمیوم استفاده شده است بیش از زمانی که است که تنها کادمیوم در محیط کشت وجود داشت. نتایج مشابهی توسط .Kaschel et al (2002) در ذرت مشاهده شد. زمانی که از هومیک اسید استفاده شد وزن تر و خشک گیاه نسبت به شاهد افزایش داشت.

میزان فعالیت آنزیم‌های سوپر اکسید دیسموتاز و پرکسیداز تحت تأثیر هومیک اسید، تغییر معنی‌داری نداشت. زیرا بر طبق آنچه برای شرایط تنش تعریف می‌شود، اگر به گیاه تنش وارد نشود، فعالیت آنتی اکسیدانی گیاه افزایش نمی‌یابد (Moya et al., 1993). از آنجایی که فعالیت آنزیم‌های سوپر اکسید دیسموتاز و پرکسیداز در مجاورت هومیک اسید تغییر معنی‌داری نسبت به شاهد نداشت، بنابراین هومیک اسید باعث کاهش فعالیت این دو آنزیم که تحت تنش کادمیوم افزایش یافته‌اند می‌شود. اما زمانی که فقط کادمیوم در محیط کشت وجود داشت میزان سوپر اکسید دیسموتاز و پرکسیداز افزایش یافت و شرایطی شبیه شرایط تنش ایجاد شد (شکل‌های ۱ و ۲).

به طور کلی نتایج این آزمایش نشان می‌دهد که آنتی‌اکسیدان‌ها، شاخص‌های حساس‌تری برای نشان دادن اثر سمیت کادمیوم نسبت به تغییرات وزن خشک و زی‌توده گیاهی هستند. از آنجایی که تجمع کادمیوم در گیاه با نشانه‌های مورفولوژیکی کمی همراه است یا به عبارتی حتی در غلظت‌های بالای کادمیوم، صفات مورفولوژیکی تغییرات چندانی ندارد، لذا سمیت کادمیوم به صورت خطر مخفی، سلامت بشر را تهدید می‌کند. حتی با وجود آنتی‌اکسیدان‌ها برای حفاظت گیاه در برابر این تنش محیطی، خطر این آلوده‌کننده‌ها همچنان باقی است. زیرا با توجه به تکمیل شدن ظرفیت جذب این آنتی‌اکسیدان‌ها برای رادیکال‌های آزاد و از طرفی اثر تجمعی فلزات سنگین در اندامهای گیاهی، وجود آنها همچنان تهدیدکننده است. زمانی که از هومیک اسید که بخش اصلی تشکیل‌دهنده مواد آلی است استفاده شد، میزان جذب کادمیوم و میزان محتوای کادمیوم بافت گیاهی کاهش قابل توجهی یافت و خطر آن برای گیاه و متعاقباً برای انسان کاهش می‌یابد. با توجه به میزان کادمیوم در بافت گیاهی زمانی که از هومیک اسید ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر استفاده شد، میزان کادمیم گیاه کاهش یافت.

سپاسگزاری

این پژوهش در دانشگاه ججیانگ (Zhejiang) چین و حمایت مالی یونسکو انجام شده است، همچنین از خانم پروفسور فانگ که اینجانب را در اجرای این پژوهش یاری نمودند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

1. Albertina, X. R., Leonardo, R., Miguel A. V., Sylvie C., Jean-Franc F. & Claudemir, M. (2006). Cadmium phytotoxicity: Quantitative sensitivity relationships between classical endpoints and antioxidative enzyme biomarkers. *Science of the Total Environment*, 357, 120–127.
2. Andersson, A. & Bingefors, S. (1985). Trends and annual variations in Cd concentration in grain of winter wheat. *Acta Agriculture Scandinavia*, 35, 339-344.
3. Beauchamp, C. O. & Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamidegels. *Analytical Biochemistry*, 44, 151–155.
4. Bowler, C., Van Camp, W., Van Montagu, M. & lnze, D. (1994). Superoxide dismutase in plants. Critical reviews in plant science, 13, 199-218.

5. Candan, N. & 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 Physiology and Biochemistry*, 41, 35–40.
6. Chandlee, J. M. & Scandalios, J. G. (1984). Analysis of variants affecting the catalase development program in maize scutellum. *Theoretical and Applied Genetics*, 69, 71-77.
7. Chandlee, J. M. & Scandalios, J. G. (1984). Analysis of variants affecting the Catalase development program in maize scutellum. *Theory of Apply Genetic*, 69, 71-77.
8. Davis, R. D. & Calton-Smith, C. (1980). Crops as Indicators of the Significance of Contamination of Soil by Heavy Metals. WRC, Stevenage TR 140.
9. Delfine, S., Tognetti, R., Desiberio, E. & Alvino, A. (2005). Effect of foliar application of N and humic acids on growth and yield of durum. *Wheat Agronomy Sustainable Development*, 25, 183-191.
10. Eriksson, J. E. (1990). *Factors influencing adsorption and plant uptake of Cd from agricultural soils*. Swedish University of Agricultural Science, Department of Soil Science, Reports and Dissertations. ISBN 91-576-4111-0. ISSN 1100-4525.
11. Ghorbani, H. & Moghadam, E. (2005). *Introduction on oxidative stress and plant response*. Darvin press. 128pp.
12. Hartwigsen, J. A. & Evans, M. R. (2000). Humic acid seed and substrate treatments promote seedling root development. *Horticultural Science*, 35(7), 1231-1233.
13. Karataglis, S., Moustakas, M. & Symeonidis, L. (1991). Effects of heavy metals on isoperoxidases of wheat. *Biologia Plantarum*, 33, 3-9.
14. Kaschel, A., Römheld, V. & Chen, Y. (2002). Cadmium binding by fractions of dissolved organic matter and humic substances from municipal solid waste compost. *Journal of Enviromental Quality*, 31, 1885–1892.
15. Lee, Y. S. & Bartlett, R. J. (1976). Stimulation of plant growth by humic substances. *American Journal of Soil Seince Society*, 40, 876-879.
16. Lguirati, A., Elmousadik, A. & Hafidi, M. (2004). Contribution alade Marche de re habilitation des sites de de´charges au Maroc. In: Proceedings of *the First International Symposium on the Management of Liquid and Solid Residues (Malisore)*, Mohammadia, Morocco, 26–27 April 2004, p. 131
17. Mackowiak, C. L., Grossl, P. R. & Bugbee, B. G. (2001). Beneficial effects of humic acid on micronutrient availability to wheat. *American Journal of Soil Seince Society*, 65, 1744–1750.
18. Mazhoudi, A., Chaoui, M. H., Ghorbal, E. & Ferjani, E. (1997). Response of antioxidant enzymes to excess copper in tomato (*Lycopersicon esculentum*, Mill.). *Plant Science*, 127, 129-137.
19. Mesut Cimrin, K. & Yilmaz, I. (2005). Humic acid applications to lettuce do not improve yield but do improve phosphorus availability. *Acta Agriculturae Scandinavica Section B-Soil and Plant*, 55, 58-63.
20. Moya, J. L., Ros, R. & Picazo, I. (1993). Influence of cadmium and nickel on growth, net photosynthesis and carbohydrate distribution in rice plants. *Photosyntetica Research*, 3, 75-80.
21. 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.
22. Padmaja, K., Prasad, D. D. K. & Prasad, A. R. K. (1990). Inhibition of chlorophyll synthesis in Phaseolus vulgaris seedlings by cadmium acetate. *Photosynthetica*, 24, 399-405.
23. Perl-Treves, R. & Galun, E. (1991). The tomato Cu, Zn superoxide dismutase genes are developmentally regulated and responded to light and stress. *Plant Molocular Biology*, 17, 745-760.
24. Santandrea, G., Pandolfini, T. & Bennici, A. (2000). A physiological characterization of Mn-tolerant tobacco plants selected by in vitro culture. *Plant Science*, 150, 163–177.
25. Scandialos, J. C. (1993).Oxygen stress and superoxide diiutases. *Plant Physiology*, 101, 7-12.
26. Shah, K., Kumar, R. G., Verma, S. & Dubey, R. S. (2001). Effect of cadmium on lipid peroxidation, superoxidation generation and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. *Plant Science,* 161, 1135–1144.
27. Zhang, X. & Ervin, E. H. (2004). Cytokinin-containing seaweed and humic acid extracts associated with creeping bentgrass leaf cytokine and drought resistance. *Crop Science*, 44, 1-10.