نشریه تولید و فرآوری محصولات زراعی و باغی
سال چهاردهم / شماره اول / بهار ۱۴۰۳/ مقاله علمی-پژوهشی: صفحات ۳۱ تا ۴۶

ارزیابی تأثیر سالیسیلیک‌اسید و براسینواستروئید بر برخی پارامترهای فیزیولوژیک و تجمع آرسنیک در اسفناج رشد یافته تحت شرایط تنش فلز سنگین آرسنیک

کبری مقصودی[۱]، الهام اشرفی دهکردی[۲] و سید محمد مظلومی[۳*]

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۵/۰۳ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۹/۱۸)

چکیده

با هدف ارزیابی تأثیر سالیسیلیک اسید و براسینواستروئید بر برخی صفات فیزیولوژیک و میزان تجمع آرسنیک در اسفناج تحت شرایط تنش آرسنیک، آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سال ۱۳۹۹، در مرکز تحقیقات تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی شیراز اجرا شد. فاکتورهای آزمایش شامل سالیسیلیک‌اسید (۰، ۰/۵ و ۰/۷۵ میلی‌مولار)، براسینواستروئید (۰، ۰/۵ و ۰/۷۵ میکرومولار) و تنش آرسنیک (۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار) بودند. تنش آرسنیک، به‌ویژه تنش ۱۰۰ میکرومولار، موجب اختلال در تبادلات‌گازی و کاهش سرعت فتوسنتز، تعرق، هدایت روزنه‌ای برگ و زیست‌توده اسفناج شد. در مواجه با تنش آرسنیک میزان مالون‌دی‌آلدئید، پراکسیدهیدروژن، غلظت اسمولیت‌ها، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در اسفناج افزایش یافت. کاربرد براسینواستروئید و سالیسیلیک‌اسید به‌طور معنی‌داری موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (پراکسیداز، آسکوبات‌پراکسیداز و سوپراکسیددیسموتاز)، تجمع اسمولیت‌ها (کربوهیدرات‌ها و پرولین) و میزان ماده خشک اسفناج و در مقابل کاهش میزان مالون‌دی‌آلدئید و پراکسیدهیدروژن در اسفناج شد. تجمع آرسنیک در ریشه اسفناج بیشتر از برگ بود. در شرایط تنش آرسنیک ۱۰۰ میکرومولار، کاربرد سالیسیلیک‌اسید و براسینواستروئید به‌صورت تکی و توأم، تجمع آرسنیک در اسفناج را کاهش داد و بیشترین تأثیر مثبت در تیمار ۰/۷۵ میلی‌مولار سالیسیلیک‌اسید+ براسینواستروئید ۰/۷۵ میکرومولار مشاهده شد. به‌طورکلی، کاربرد سالیسیلیک‌اسید و براسینواستروئید، با بهبود تبادلات گازی، حفظ پایداری غشا سلولی و نیز افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، موجب افزایش تحمل اسفناج به آرسنیک شد و درنهایت بیوماس اسفناج در مقایسه با شاهد افزایش یافت. از طرفی، کاربرد این تنظیم کننده‌های رشد گیاهی موجب کاهش تجمع آرسنیک در اسفناج شد. در مجموع می‌توان بیان داشت تاثیر مثبت کاربرد توأم سالیسیلیک‌اسید و براسینواستروئید، در مقایسه با کاربرد تکی هر کدام از آن‌ها، در کاهش اثرات تنش فلز سنگین آرسنیک و تجمع آن در اسفناج و درنتیجه بهبود رشد این گیاه، قابل‌ملاحظه‌تر بود.

واژه‌های کلیدی: تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، فتوسنتز، هدایت روزنه‌ای، اسمولیت‌ها

۱. پسادکتری، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته کرمان و پژوهشگر، مرکز تحقیقات تغذیه، دانشکده تغذیه و علوم غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز. ایران.

۲ و ۳. به‌ترتیب پژوهشگر و استاد، مرکز تحقیقات تغذیه، دانشکده تغذیه و علوم غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز. ایران.

*: مسئول مکاتبات: پست الکترونیکی: smmazloomi@gmail.com

مقدمه

در بسیاری از نقاط جهان، آلودگی خاک به فلزات سنگین یکی از مهم‌ترین مشکلات زیست‌محیطی است. در واقع فلزات سنگین تحت عنوان فلزاتی با وزن مخصوص بیشتر از پنج گرم بر سانتی‌متر مکعب معرفی شده‌اند (۳۹). دوام طولانی‌مدت فلزات سنگین در خاک، موجب انباشته شدن این فلزات در زنجیره غذایی و درنتیجه تأثیرات منفی بر سلامتی انسان شده است (۳۵). میزان فلز سنگین آرسنیک در خاک‌های غیر آلوده، به‌ندرت بیشتر از ۱۰ میکروگرم در گرم است. اما در مناطق معدنی و یا مزارع کشاورزی که تحت استفاده مکرر از مواد ضد قارچی و سموم گیاهی قرار دارند، میزان آرسنیک خاک بسیار بیشتر است. آلودگی آرسنیک در آب، خاک، هوا و زنجیره غذایی به‌دلیل اثرات سمی شدید، حتی در غلظت‌های پایین، برای سلامتی انسان یک نگرانی جدی است (۱). آرسنیک به‌عنوان یک عامل سرطان‌زا معرفی شده و سازمان بهداشت جهانی حدود استاندارد این فلز سنگین را در گیاه بین ۰/۱ تا ۵ میکروگرم در گرم، در آب ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر و در خاک ۰/۱ تا ۴۰ میکروگرم در گرم اعلام کرده است (۱). تحقیقات نشان می‌دهد فلز سنگین آرسنیک موجب بیماری‌های متعددی از جمله بیماری‌های ریوی، گوارشی، عصبی و قلبی و عروقی می‌شود. مسمومیت مزمن، ضعف عمومی در عضلات، کاهش اشتها، تهوع، استفراغ و اسهال، التهاب غشاهای مخاطی چشم و بینی و حنجره، ضایعات پوستی، کم‌خونی و کاهش گلبول‌های سفید، تظاهرات عصبی و تومورهای بدخیم در اندام‌های حیاتی بدن از جمله مهم‌ترین عوارض این فلز سنگین در بدن است (۳۳).

افزایش غلظت آرسنیک در خاک مزارع کشاورزی موجب ظهور علائم مسمومیت و بازدارندگی رشد در گیاهان می‌شود که این امر به‌دلیل تحت تأثیر قرار گرفتن طیف وسیعی از واکنش‌های گیاهی در سطح سلولی و مولکولی است (۱). عمده تغییرات ناشی از تأثیر آرسنیک بر متابولیسم گیاهی مربوط به فرآیندهای فیزیولوژیک اساسی از جمله فتوسنتز، تنفس سلولی، روابط آب و گیاه و متابولیسم نیتروژن است. این اثرات در سطح سلولی و مولکولی با خسارات اکسیداتیو موجب افزایش پراکسیداسیون چربی‌ها، صدمه به DNA، اکسیداسیون پروتئین و احیاگرها در سلول می‌شوند. آرسنیک در گیاه موجب مهار جوانه‌زنی، کاهش میزان فتوسنتز، تخریب غشای کلروپلاستی و افزایش پراکسیداسیون لیپیدها و درنتیجه کاهش رشد می‌شود (۳۳). در بررسی سمیت فلزات در سیستم‌های مختلف و پیچیده گیاه- خاک، عوامل متعددی نقش دارند که با ویژگی‌های خاک، خصوصیات گیاه و دیگر عوامل زیست‌محیطی در ارتباط هستند (۲۹). لازم به ذکر است گیاه می‌تواند بدون اینکه صدمه‌ای ببیند مقدار زیادی فلزات سنگین در خود تجمع دهد و اغلب بدون اینکه علائم بیماری و تأثیرگذاری در گیاه دیده شود، غلظت-های نسبتاً زیاد این فلزات در بخش‌های خوراکی گیاه تجمع می‌یابد. به طبع تجمع فلزات سنگین در گیاه، موجب افزایش پتانسیل جذب این فلزات توسط انسان می‌شود (۱). می‌توان بیان داشت میزان فلز سنگین آرسنیک در بدن انسان با مقدار این فلز در خاک، آب و گیاهانی که روی خاک رشد کرده‌اند، متناسب است. اگر میزان فلز سنگین آرسنیک خاک و آب منطقه‌ای بالا باشد، به طبع گیاهانی که در آن منطقه رشد می‌کنند نیز از آرسنیک غنی‌شده و به‌دنبال آن آرسنیک در بافت بدن حیواناتی که این گیاهان را استفاده می‌کنند، تجمع می‌یابد. درنهایت افرادی که این گیاهان و یا حیوانات را مصرف نمایند با مشکل افزایش این فلز در بدنشان مواجه خواهند شد (۳۴). در کشور ایران وجود خاک‌های آلوده به آرسنیک در استان‌هایی ازجمله کردستان، زنجان، آذربایجان شرقی و خراسان گزارش‌شده است (۱۳، ۱۵ و ۱۶). شایان توجه است در سطح کشور، به‌ویژه در حواشی شهرهای بزرگ و مراکز استان‌ها در بیشتر مواقع پساب به‌صورت غیر اصولی برای کشت سبزیجات و صیفی‌جات استفاده می‌شود و درنتیجه موجب آلودگی زیست‌محیطی، تجمع آلودگی در خاک و به‌دنبال آن انتقال فلزات سنگین موجود در پساب به محصولات تولیدی می‌شود. لذا بررسی راهکاری برای کاهش تجمع فلزات سنگین از جمله

آرسنیک در محصولات کشاورزی الزامی به‌نظر می‌رسد.

سالیسیلیک اسید به‌عنوان یک هورمون رشد گیاهی، درواقع یک ترکیب فنلی است که با داشتن خاصیت آنتی‌اکسیدانی در تنظیم فرآیندهای فیزیولوژیکی گیاه ایفای نقش می‌نماید. به عبارت دیگر، سالیسیلیک‌اسید یک مولکول پیام‌رسان مهم در پاسخ گیاه به تنش‌های مختلف غیر زیستی از جمله تنش فلزات سنگین معرفی شده است (۳، ۱۸، ۲۱، ۲۲، ۲۵ و ۲۸). یکی از مکانیسم‌های حفاظتی سالیسیلیک‌اسید در گیاهان رشد یافته تحت شرایط تنش فلزات سنگین، کنترل میزان جذب و انتقال این فلزات از طریق ریشه گیاه است (۲۳، ۲۴، ۳۴ و ۳۶). شایان توجه است براسینواستروئیدها نیز هورمون‌های استروئیدی با منشأ طبیعی و سازگار با محیط‌زیست هستند که نقش کلیدی در تنظیم رشد و نمو گیاه دارند (۲۷). نتایج تحقیقات بیانگر این موضوع است که کاربرد براسینواستروئیدها مقاومت گیاه را در برابر تنش‌های محیطی از جمله تنش فلزات سنگین به‌طور معنی‌داری افزایش می‌دهند (۴، ۷، ۹، ۱۴، ۱۷، ۳۰ و ۳۷). باوجود اینکه نتایج برخی تحقیقات نشان می‌دهد کاربرد سالیسیلیک‌اسید و براسینواستروئید، کاهش تجمع فلزات سنگین در اندام‌های مختلف گیاهان را در پی دارد (۷، ۱۷، ۲۱، ۲۵ و ۲۸)، اما در رابطه با کاربرد توأم هورمون‌های رشد گیاهی سالیسیلیک‌اسید و براسینواستروئید در سبزی برگی پرمصرف اسفناج، کمتر گزارش شده است. با توجه به این موضوع که سمیت محصولات کشاورزی با فلزات سنگین در ارتباط نزدیک با سطح سلامت افراد جامعه است، بنابراین در پژوهش حاضر تأثیر استفاده از براسینواستروئید و سالیسیلیک‌اسید به‌عنوان یک راه‌کار جهت کاهش میزان تجمع فلز سنگین آرسنیک در گیاه اسفناج، مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

این تحقیق با هدف ارزیابی اثر کاربرد تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی سالیسیلیک‌اسید (SA) و براسینواستروئید (BR) به‌صورت پرایمینگ بذر و محلول‌پاشی، بر برخی پارامترهای فیزیولوژیکی و میزان تجمع فلز سنگین آرسنیک در اسفناج رشد یافته تحت شرایط تنش فلز سنگین آرسنیک، به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با چهار تکرار در مرکز تحقیقات تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی شیراز در سال ۱۳۹۹ به اجرا درآمد. تیمارهای آزمایشی شامل غلظت‌های مختلف SA (۰، ۰/۵ و ۰/۷۵ میلی‌مولار)، BR (۰، ۰/۵ و ۰/۷۵ میکرومولار) و آرسنیک (۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار) بودند. بذرهای اسفناج رقم هادسون از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شدند.

جهت پرایم (پیش تیمار) کردن، بذور اسفناج به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در غلظت‌های ۰/۵ و ۰/۷۵ میلی‌مولار SA و ۰/۵ و ۰/۷۵ میکرومولار BR خیسانده شدند. لازم به ذکر است در کنار غلظت‌های فوق‌الذکر از آب مقطر نیز به‌عنوان شاهد استفاده شد. جهت تهیه خاک، در ابتدا از خاک مزرعه غیرآلوده به فلزات سنگین، از عمق ۳۰ سانتی‌متری خاک به‌طور کاملاً تصادفی، نمونه خاک تهیه و آنالیز شد. بر اساس نتایج آنالیز مشخص شد که مقدار آرسنیک در خاک مورد نظر کمتر از حد بحرانی بود. برای اعمال تیمار فلز سنگین آرسنیک در خاک، از نمک سدیم آرسنات ($Na_2HAsO_4.7H_2O$) استفاده شد. به این صورت که غلظت‌های مختلف نمک سدیم آرسنات (۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار) در لایه‌های مختلف خاک پاشیده شد و از این طریق خاک به فلز سنگین آرسنیک آلوده شد. باهدف اینکه برهم‌کنش‌های آلاینده و خاک تا حد امکان تکوین یابد و شرایط آلودگی طبیعی‌تر شود، خاک‌آلوده شده به آرسنیک تا حد ظرفیت زراعی مزرعه آبیاری شد. سپس خاک‌آلوده به مدت یک ماه در شرایط فوق‌الذکر نگهداری شد (با هدف اطمینان پیدا کردن از برقراری تعادل بین آرسنیک با خاک).

جهت کاشت، گلدان‌های پنج کیلوگرمی با خاک آلوده شده با غلظت‌های مختلف آرسنیک، پر شدند و سپس بذرهای پرایم شده با SA و BR در آنها کشت شدند. گلدان‌ها در گلخانه‌ی دارای دمای ۲۸-۲۵ درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۷۰-۶۰

درصد و دوره‌ی نوری ۱۶ ساعت، قرار گرفتند. در رابطه با آبیاری، گلدان‌ها از زمان کاشت تا انتهای آزمایش، با آب معمولی و تا حد ظرفیت زراعی مزرعه آبیاری شدند. پس از سبز شدن و استقرار بوته‌های اسفناج (چهار برگی)، برحسب تیمارهای آزمایشی، بوته‌ها با غلظت‌های SA (۰، ۰/۵ و ۰/۷۵ میلی‌مولار) و BR (۰، ۰/۵ و ۰/۷۵ میکرومولار)، محلول‌پاشی شدند. گیاهان شاهد نیز به‌طور همزمان با آب مقطر محلول‌پاشی شدند. به‌منظور اطمینان از جذب هورمون‌های رشد SA و BR توسط برگ گیاه اسفناج، محلول‌پاشی بوته‌ها در دو روز پی‌درپی صورت گرفت. لازم به ذکر است بر اساس اینکه بذور اسفناج با چه ترکیب هورمونی و چه غلظتی پرایم شده بودند، گیاهان اسفناج نیز با همان ترکیب محلول‌پاشی شدند، بنابراین بین تیمارهای آزمایشی در مراحل پرایم بذر و محلول‌پاشی بوته‌ها عملاً تداخلی ایجاد نشد.

پارامترهای تبادلات گازی شامل سرعت فتوسنتز، سرعت تعرق و هدایت روزنه‌ای با استفاده از دستگاه فتوسنتزمتر (Cl-340 Handheld Photosynthesis System, Made in U.S.A) اندازه‌گیری شد. کلیه اندازه‌گیری‌ها در حد فاصل ساعت ۱۱ صبح تا ۲ بعدازظهر که در این زمان PPFD کمتر از 1800 µmol m-2 s-1 نیست، انجام شد. به‌منظور سنجش وضعیت اسمولیت‌ها در گیاه، غلظت کربوهیدرات‌ها، پرولین و پروتئین اندازه‌گیری شد. جهت سنجش میزان کربوهیدرات‌ها (۳۸)، ۰/۰۲ گرم بافت گیاهی در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر سائیده و بعد از حرارت دیدن، با کاغذ واتمن صاف شد. به دو میلی‌لیتر از عصاره حاصل، دو میلی‌لیتر محلول سولفات مس افزوده شد و برای ۲۰ دقیقه در حمام گرم (دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد) گذاشته شد. پس از سرد شدن، دو میلی‌لیتر اسید فسفومولیبدیک به آن اضافه شد. شدت جذب محلول در طول‌موج ۶۰۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر- مدل Cary50 Varian، تعیین و با استفاده از منحنی استاندارد غلظت قندهای احیاکننده برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن‌تر محاسبه شد. به‌منظور اندازه‌گیری میزان پرولین، ۰/۰۲ گرم بافت گیاهی در ۱۰ میلی‌لیتر محلول سه درصد اسیدسولفوسالیسیلیک سائیده شد. عصاره حاصل به‌مدت پنج دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. به دو میلی‌لیتر از مایع رویی سانتریفیوژ شده، دو میلی‌لیتر معرف نین‌هیدرین و دو میلی‌لیتر اسیداستیک اضافه شد. مخلوط در حمام آبگرم قرار گرفت و بعد از خنک شدن، چهار میلی‌لیتر تولوئن به آن اضافه شد. با ثابت نگه‌داشتن مخلوط، دو لایه مجزا تشکیل شد که لایه رنگی فوقانی حاوی پرولین بود و میزان جذب در ۵۲۰ نانومتر قرائت شد. برای محاسبه مقدار پرولین از منحنی استاندارد پرولین استفاده و نتایج برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن‌تر محاسبه شد (۵).

با هدف سنجش میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشا، غلظت مالون‌دی‌آلدئید اندازه‌گیری شد. به این منظور ۰/۲ گرم بافت گیاهی با ۵ میلی‌لیتر اسیدتری‌کلرواستیک سائیده و عصاره حاصل به مدت پنج دقیقه سانتریفیوژ (۱۰۰۰۰ دور در دقیقه) شد. به یک میلی‌لیتر از محلول حاصل از سانتریفیوژ، چهار میلی‌لیتر اسیدتری‌کلرواستیک (دارای ۰/۵ درصد اسیدتیوباربیتوریک)، افزوده شد. مخلوط حاصل در حمام آبگرم (۹۵ درجه سانتی‌گراد) به مدت ۳۰ دقیقه حرارت داده شد و بعد از خنک شدن، به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ (۱۰۰۰۰ دور در دقیقه) شد. شدت جذب این محلول در طول‌موج ۵۳۲ نانومتر به‌وسیله اسپکتروفتومتر مدل Cary50 Varian، قرائت شد. همچنین جذب رنگیزه‌های غیراختصاصی در ۶۰۰ نانومتر قرائت و از آن کسر شد. سپس نتایج برحسب نانومول بر گرم وزن‌تر محاسبه شد (۵). برای اندازه‌گیری میزان پراکسیدهیدروژن، بافت گیاه در حمام یخ با اسیدتری-کلرواستیک ۰/۱ درصد سائیده شد. عصاره حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در سانتریفیوژ یخچال‌دار در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه قرار گرفت. سپس به ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول رویی، ۰/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰ میلی‌مولار و نیز یک میلی‌لیتر یدید پتاسیم یک مولار افزوده و جذب در طول‌موج ۳۹۰ نانومتر قرائت شد. مقدار پراکسیدهیدروژن با استفاده از ضریب خاموشی ۰/۲۸ مولار در سانتی‌متر محاسبه و برحسب

میکرومول بر گرم وزن‌تر گزارش شد (۳۲).

به‌منظور ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه، فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز و سوپراکسیددیسموتاز بررسی شد. برای بررسی فعالیت آنزیم پراکسیداز در ۴۷۰ نانومتر، مخلوط واکنش حاوی بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار، پراکسیدهیدروژن و گایاکول بود و واکنش با افزودن ۲۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی شروع شد. میزان جذب تتراگایاکول در ۴۷۰ نانومتر در لحظه آغاز واکنش، یک دقیقه بعد از افزودن عصاره آنزیمی قرائت شد. فعالیت آنزیم برحسب واحد آنزیم در مقدار پروتئین کل موجود در ۲۰ میکرولیتر عصاره گزارش شد (۸). جهت سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز مخلوط واکنش حاوی بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مول، آسکوربات ۰/۵ میلی‌مولار، H_2O_2 ۰/۱۵ میلی‌مولار، EDTA ۰/۱ میلی‌مولار و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. به‌دنبال اکسید شدن آسکوربات با آغاز واکنش آنزیمی، کاهش جذب در ۲۹۰ نانومتر، دو دقیقه پس از شروع واکنش نسبت به زمان آغاز واکنش محاسبه شد. با استفاده از تغییرات جذب در طول‌موج ۲۹۰ نانومتر، میزان آسکوربات برجای‌مانده، پس از دو دقیقه انجام واکنش آنزیمی محاسبه و برحسب واحد آنزیم در مقدار پروتئین کل موجود در ۵۰ میکرولیتر عصاره، ارائه شد (۸). برای سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز (SOD)، مخلوط واکنش نمونه‌ها شامل بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار، NBT ۰/۰۷۵ میکرو مولار، ۰/۱ میلی‌مولار Na-EDTA، ۷۵ میکرومولار ریبوفلاوین، ۱۳ میلی‌مولار متیونین و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود و با روشن شدن لامپ فلورسنت، واکنش در این عصاره‌ها شروع شد. میزان جذب کنترل در ۵۶۰ نانومتر نشان‌دهنده ۱۰۰ درصد احیای نوری NBT و نیمی از آن معادل یک واحد آنزیمی بود. اختلاف جذب نمونه‌ها و کنترل در ۵۶۰ نانومتر نشان‌دهنده مهار احیاء نوری NBT در حضور آنزیم SOD موجود در نمونه است. با استفاده از این اختلاف جذب، واحد آنزیمی محاسبه و فعالیت آنزیمی برحسب واحد آنزیم در مقدار پروتئین در ۵۰ میکرولیتر عصاره گزارش شد (۸).

غلظت آرسنیک در بافت اسفناج با استفاده از دستگاه جذب اتمی (مدل AA 240- varian) قرائت شد. بدین منظور، ابتدا جهت هضم اسیدی، در ابتدا نمونه‌های گیاهی ریشه و برگ به‌صورت جداگانه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد در دستگاه آون به مدت ۷۲ ساعت خشک شدند. سپس ۰/۲۵ گرم بافت خشک با ۵ سی‌سی اسید نیتریک غلیظ ۶۵ درصد حاوی اسیدکلریدریک غلیظ در لوله‌آزمایش پیرکس مخلوط و به مدت ۲۴ ساعت گذاشته شد، تا هضم اسیدی نمونه‌ها به‌خوبی صورت گیرید. پس‌ازاین مدت لوله‌های موردنظر به مدت یک تا سه ساعت حرارت داده شد تا بخارات اسیدی زرد رنگ از لوله‌ها خارج و محلول اسیدی شفاف و سفیدرنگ به‌دست آمد. در ادامه به هر لوله ۱۵ سی‌سی آب دیونایز اضافه شد و محتوی هر لوله با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره ۱ صاف شد. درنهایت با استفاده از یک بالن ژوژه ۲۵ سی‌سی، حجم نهایی محلول با استفاده از آب دیونایز به ۲۵ سی‌سی رسانیده شد. غلظت آرسنیک این محلول با استفاده از دستگاه جذب اتمی فوق‌الذکر قرائت شد. شایان توجه است میزان ماده خشک (زیست توده) اسفناج، در واحد گرم‌در بوته، اندازه‌گیری شد. در نهایت تجزیه واریانس داده‌ها با نرم‌افزار آماری SAS انجام و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد صورت گرفت.

نتایج

تجزیه واریانس اثر سالیسیلیک‌اسید و براسینواستروئید بر برخی صفات فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و بیوماس اسفناج و میزان تجمع آرسنیک در ریشه و ساقه این گیاه تحت شرایط تنش آرسنیک در قالب جدول ۱ ارائه‌شده است. همان‌گونه که نتایج این جدول نشان می‌دهد اثرات اصلی سالیسیلیک‌اسید، براسینواستروئید و آرسنیک و نیز اثرات متقابل دوگانه و سه‌گانه آن‌ها بر روی صفات اندازه‌گیری شده (به‌جز آنزیم

جدول ۱. تجزیه واریانس اثر سالیسیلیک‌اسید و براسینواستروئید بر برخی صفات فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و بیوماس اسفناج و میزان تجمع آرسنیک در ریشه و ساقه این گیاه تحت شرایط تنش آرسنیک

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات								
		وزن تر ریشه	وزن خشک ریشه	وزن تر ساقه	وزن خشک ساقه	وزن تر برگ	وزن خشک برگ	محتوای کلروفیل a	محتوای کلروفیل b	محتوای کلروفیل کل
تکرار	۳	۳۲۸^{ns}	۵۷۸^{ns}	۱۴۰۱^{ns}	۲۷۱^{ns}	۷۱/۳^{ns}	۱۰۱^{ns}	۲۰/۱^{ns}	۳۶۶^{ns}	۸۷۵^{ns}
سالیسیلیک‌اسید	۲	۸۴۲*	۱۰۰۸*	۱۸۸۲*	۵۷۰*	۱۱۱*	۱۸۲*	۸۴/۵**	۶۸۷*	۲۴۵۱**
براسینواستروئید	۲	۸۱۳*	۱۶۹۸**	۱۸۰۹*	۹۰۱**	۱۱۴*	۱۰۵*	۴۷/۳*	۱۰۰۲**	۱۶۸۷*
آرسنیک	۲	۱۴۶۵**	۱۸۰۱**	۲۱۸۵**	۵۹۱*	۱۷۸**	۲۸۵**	۸۰/۷**	۹۸۷**	۱۸۷۵*
سالیسیلیک‌اسید × براسینواستروئید	۴	۸۷۰*	۱۲۰۰*	۲۲۴۱**	۶۰۰*	۱۲۱*	۲۴۱**	۵۴/۵*	۵۷۹*	۱۵۳۴*
سالیسیلیک‌اسید × آرسنیک	۴	۱۴۰۱**	۱۱۳۵*	۱۸۰۴*	۸۸۱**	۱۰۱*	۱۸۴*	۴۴/۱*	۷۸۵*	۲۴۵۱**
براسینواستروئید × آرسنیک	۴	۱۳۱۲**	۱۳۴۲*	۱۶۸۷*	۵۸۹*	۱۰۹*	۱۶۷*	۴۰/۷*	۱۲۴۵**	۱۸۹۷*
سالیسیلیک‌اسید × براسینواستروئید × آرسنیک	۸	۱۳۲۴**	۱۷۵۴**	۱۷۶۱*	۸۷۶**	۱۱۲*	۱۶۱*	۶۵/۸**	۱۷۶۱**	۲۰۴۸**
خطا	۷۸	۶۵۴	۷۶۵	۱۴۲۱	۴۲۵	۸۷/۴	۱۳۲	۱۲۱	۳۸۷	۱۳۸۷
		۶۵/۲	۹۸۷	۱۸۷۲*	۷۰۵^{ns}	۶۰/۱^{ns}	۸۱/۳			

**،* و ns: به ترتیب اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک و پنج درصد و غیر معنی‌دار

آنتی‌اکسیدانی آسکوربات‌پراکسیداز) معنی دار بود.

پارامترهای تبادلات گازی (میزان فتوسنتز، سرعت تعرق و هدایت روزنه‌ای)

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که تنش فلز سنگین آرسنیک با غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار، به‌طور معنی‌دار به ترتیب کاهش ۳۷/۲ و ۶۶/۵ درصدی میزان فتوسنتز برگ اسفناج را در پی داشت. اثر سوء تنش آرسنیک بر میزان فتوسنتز اسفناج با کاربرد سالیسیلک‌اسید و براسینواستروئید تعدیل یافت. در هر دو شرایط تنش و عدم تنش آرسنیک و به‌ویژه در شرایط تنش، کاربرد تکی و یا توأم هورمون‌های گیاهی، تعدیل اثر تنش و افزایش معنی‌دار میزان فتوسنتز این گیاه را به‌همراه داشت و تأثیر کاربرد سالیسیلیک‌اسید+ براسینواستروئید بیشتر از اثر استفاده تکی هر کدام از این هورمون‌ها بود (جدول ۲). بر اساس نتایج مشخص شد که سرعت تعرق به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای تحت تنش آرسنیک کاهش یافت و این کاهش در تیمار آرسنیک ۱۰۰ میکرومولار بیشتر از آرسنیک ۵۰ میکرومولار بود. بااین‌حال، افت سرعت تعرق به‌طور معنی‌داری در بوته‌های اسفناجی که با هورمون‌های گیاهی تیمار شده بودند، در مقایسه با گیاهان تیمار نشده، کمتر بود (جدول ۲). همچنین هدایت روزنه‌ای به‌طور معنی‌داری به میزان ۱۳/۴ و ۲۶/۲ درصد به‌ترتیب تحت شرایط تنش آرسنیک ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار کاهش یافت. علاوه بر این، گیاهان تنش دیده با آرسنیک که همزمان به‌وسیله هورمون‌های گیاهی تیمار شده بودند، در مقایسه با گیاهان شاهد، هدایت روزنه‌ای بالاتری داشتند. درمجموع، تحت شرایط تنش آرسنیک و نیز شرایط عدم تنش، تأثیر پرایم بذر و نیز محلول‌پاشی بوته‌های اسفناج با براسینواستروئید ۰/۷۵ میکرومولار، براسینواستروئید ۰/۷۵ میکرومولار+سالیسیلیک‌اسید ۰/۵۰ میلی‌مولار و نیز براسینواستروئید ۰/۷۵ میکرومولار+سالیسیلیک‌اسید ۰/۷۵ میلی‌مولار در بهبود هدایت روزنه‌ای بیشتر از سایر تیمارها بود (جدول ۲).

تجمع اسمولیت‌ها در برگ (قندهای محلول و پرولین)

بر اساس نتایج به‌دست‌آمده مشخص شد که تنش ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار آرسنیک به‌ترتیب موجب افزایش ۱۲/۹ و ۳۶/۷ درصدی مقدار قندهای محلول برگ اسفناج شد. در شرایط عدم تنش، گیاهان تیمار شده با براسینواستروئید (۰/۵ و ۰/۷۵ میکرومولار)، سالیسیلیک‌اسید (۰/۵ و ۱ میلی‌مولار)، براسینواستروئید + سالیسیلیک اسید در مقایسه با گیاهان شاهد به‌طور معنی‌داری دارای مقدار قند محلول بیشتری بودند. در شرایط تنش آرسنیک، کاربرد تکی و یا توأم سالیسیلیک‌اسید و براسینواستروئید موجب افزایش معنی‌داری این پارامتر شد. اگرچه تأثیر کاربرد توأم این مواد بیشتر از استفاده تکی آن‌ها بود (جدول ۳). نتایج به‌دست‌آمده از این پژوهش نشان داد اگرچه کاربرد هورمون‌های رشد گیاهی تحت شرایط عدم تنش آرسنیک، هیچ‌گونه تأثیر معنی‌داری بر مقدار پرولین برگ نداشت، اما کاربرد توأم آن‌ها به‌طور قابل‌ملاحظه این پارامتر را تحت تأثیر قرار داد. در هر دو سطح آرسنیک ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار، مقدار پرولین برگ افزایش یافت. درهرحال، تحت این شرایط، گیاهان تیمار شده با هورمون‌های رشد گیاهی در مقایسه با گیاهان بدون تیمار، دارای میزان پرولین بیشتری بودند و تأثیر سالیسیلیک‌اسید+براسینواستروئید بیشتر از کاربرد تکی آن‌ها بود (جدول ۳).

ارزیابی پراکسیداسیون لیپیدهای غشا (پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و مالون دآلدئید (MDA))

در این تحقیق پراکسید هیدروژن و مالون دآلدئید به‌عنوان دو شاخص مهم برای ارزیابی پراکسیداسیون لیپیدهای غشا اندازه‌گیری شدند. نتایج به‌دست‌آمده نشان داد که اگرچه اعمال تنش آرسنیک ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار، افزایش پراکسید هیدروژن و مالون دآلدئید را در برگ اسفناج به‌همراه داشت، اما این افزایش در غلظت بالای آرسنیک به‌طور معنی‌دار بیشتر از غلظت پایین‌تر آرسنیک بود. در مقابل، کاربرد هورمون‌های رشد گیاهی به‌صورت تکی و ترکیبی موجب کاهش پراکسید

جدول ۲. تأثیر کاربرد سالیسیلیک اسید (SA) و براسینواستروئید (Br) بر میزان فتوسنتز، سرعت تعرق و هدایت روزنه‌ای اسفناج تحت تأثیر غلظت‌های مختلف آرسنیک.

آرسنیک (µM))	Br	میزان فتوسنتز ($\mu mol\ CO_2\ m^{-2}\ s^{-1}$)			سرعت تعرق ($mmol\ H_2O\ m^{-2}\ s^{-1}$)			هدایت روزنه‌ای ($mmol\ H_2O\ m^{-2}\ s^{-1}$)		
		SA ۰/۷۵ mM	SA ۰/۵ mM	SA ۰	SA ۰/۷۵mM	SA ۰/۵ mM	SA ۰	SA ۰/۷۵ mM	SA ۰/۵ mM	SA ۰
۰	۰	۱۵/۳^{b}	۱۶/۷^{a}	۱۶/۳^{ab}	۹/۳^{b}	۹/۳۲^{b}	۹/۲۱^{b}	۲۶۰^{b}	۲۶۱^{b}	۲۶۲^{b}
	۰/۵ µM	۱۶/۱^{ab}	۱۷/۰^{a}	۱۷/۳^{a}	۱۰/۱۱^{a}	۱۰/۲^{a}	۱۰/۲^{a}	۲۶۱^{b}	۲۵۹^{b}	۲۶۱^{b}
	۰/۷۵ µM	۱۷/۱^{a}	۱۷/۴^{a}	۱۷/۴^{a}	۱۰/۱۴^{a}	۱۰/۳^{a}	۱۰/۱^{a}	۲۷۴^{a}	۲۷۸^{a}	۲۷۵^{a}
۵۰	۰	۹/۶۱^{f}	۱۰/۶^{e}	۱۰/۵^{e}	۶/۱^{d}	۷/۱۴^{c}	۷/۴۸^{c}	۲۲۵^{e}	۲۳۳^{d}	۲۳۱^{d}
	۰/۵ µM	۱۰/۷^{e}	۱۲/۳^{cd}	۱۲/۷^{c}	۷/۴^{c}	۷/۵۶^{c}	۷/۶۶^{c}	۲۳۵^{d}	۲۳۴^{d}	۲۳۲^{d}
	۰/۷۵ µM	۱۱/۳^{de}	۱۳/۳^{c}	۱۳/۳^{c}	۷/۴^{c}	۷/۵۲^{c}	۷/۷۲^{c}	۲۴۹^{c}	۲۴۹^{c}	۲۴۸^{c}
۱۰۰	۰	۵/۱^{h}	۷/۳^{g}	۷/۷^{g}	۴/۸^{f}	۵/۲۱^{de}	۵/۱۶^{de}	۱۹۱^{h}	۲۰۷^{g}	۲۰۶^{g}
	۰/۵ µM	۶/۷^{gh}	۹/۴^{f}	۹/۶^{f}	۷/۱^{c}	۷/۱۸^{c}	۷/۱۸^{c}	۲۰۴^{g}	۲۰۶^{g}	۲۰۷^{g}
	۰/۷۵ µM	۷/۷^{g}	۹/۴^{f}	۹/۴^{f}	۷/۲^{c}	۷/۱۲^{c}	۷/۱۳^{c}	۲۱۶^{f}	۲۱۶^{f}	۲۱۶^{f}

برای هر صفت، حروف مشترک نشان‌دهنده عدم وجود تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد بر اساس آزمون دانکن است.

جدول ۳. تأثیر کاربرد سالیسیلیک اسید (SA) و براسینواستروئید (Br) بر محتوی پرولین و میزان کربوهیدرات‌های اسفناج تحت تأثیر غلظت‌های مختلف آرسنیک.

آرسنیک (µM)	Br	پرولین ($mg\ g^{-1}$ FW)			کربوهیدرات‌های محلول ($mg\ g^{-1}$ DW)		
		SA ۰/۷۵ mM	SA ۰/۵ mM	SA ۰	SA ۰/۷۵ mM	SA ۰/۵ mM	SA ۰
۰	۰	۲/۵۰^{g}	۲/۵۶^{g}	۲/۳۲g^{h}	۴۳/۱^{k}	۴۲/۱^{k}	۴۳/۱^{k}
	۰/۵ µM	۳/۱۱^{f}	۳/۰۸^{f}	۲/۶۴^{g}	۴۸/۰^{j}	۴۷/۱^{j}	۴۸/۱^{j}
	۰/۷۵ µM	۳/۱۵^{f}	۳/۱۵^{f}	۲/۹۴^{fg}	۵۱/۲^{i}	۴۷/۱^{j}	۴۷/۱^{j}
۵۰	۰	۵/۱۰^{d}	۵/۱۴^{d}	۴/۱۲^{e}	۵۷/۰^{h}	۵۷/۴^{h}	۵۲/۱^{i}
	۰/۵ µM	۵/۸۶^{bc}	۵/۸۵^{bc}	۵/۰۷^{d}	۶۶/۴^{f}	۶۳/۳^{fg}	۵۷/۶^{h}
	۰/۷۵ µM	۶/۰۴^{b}	۵/۸۸^{bc}	۵/۰۸^{d}	۶۵/۱^{f}	۶۲/۱^{fg}	۶۱/۴^{g}
۱۰۰	۰	۶/۳۰^{b}	۶/۱۰^{b}	۵/۵۴^{cd}	۷۱/۸^{e}	۶۷/۵^{f}	۵۸/۱^{h}
	۰/۵ µM	۷/۱۱^{a}	۷/۱۲^{a}	۶/۱۱^{b}	۸۴/۱^{a}	۸۳/۲^{a}	۷۴/۱^{d}
	۰/۷۵ µM	۷/۱۳^{a}	۷/۱۰^{a}	۶/۰۸^{b}	۸۵/۰^{a}	۸۳/۴^{a}	۷۸/۵^{c}

برای هر صفت، حروف مشترک نشان‌دهنده عدم وجود تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد بر اساس آزمون دانکن است.

هیدروژن و مالون دآلدئید شد. لازم به ذکر است که در رابطه با این پارامترها، استفاده ترکیبی براسینواستروئید + سالیسیلیک‌اسید اثر هم‌افزایی داشت (جدول ۴).

جدول ۴. تأثیر کاربرد سالیسیلیک اسید (SA) و براسینواستروئید (Br) بر میزان مالون دآلدئید و پراکسید هیدروژن برگ اسفناج تحت تأثیر غلظت‌های مختلف آرسنیک.

آرسنیک (µM)	Br	مالون دآلدئید (nmol g^{-1} FW)			پراکسید هیدروژن (µmol g^{-1} FW)			ماده خشک اسفناج (g/plant)		
		SA ۰/۷۵mM	SA ۰/۵ mM	SA ۰	SA ۰/۷۵mM	SA ۰/۵ mM	SA ۰	SA ۰/۷۵ mM	SA ۰/۵ mM	SA ۰
۰	۰	۵/۱۰^{g}	۵/۲۴^{g}	۵/۲۱^{g}	۱۱/۰^{h}	۱۱/۱^{h}	۱۱/۰^{h}	۱۸/۵^{a}	۱۸/۵^{a}	۱۷/۴^{b}
	۰/۵ µM	۵/۰۰^{gh}	۵/۱۰^{g}	۵/۰۰^{gh}	۱۱/۲^{h}	۱۱/۰^{h}	۱۱/۲^{h}	۱۸/۳^{a}	۱۸/۴^{a}	۱۷/۵^{b}
	۰/۷۵ µM	۴/۰۰^{h}	۴/۰۲^{h}	۴/۰۰^{h}	۱۰/۲^{h}	۱۰/۰^{h}	۱۰/۰^{h}	۱۸/۴^{a}	۱۸/۳^{a}	۱۷/۸^{ab}
۵۰	۰	۸/۱۰^{e}	۸/۵۲^{e}	۱۱/۳^{cd}	۱۹/۰^{e}	۱۹/۳^{e}	۲۵/۲^{c}	۱۵/۴^{d}	۱۵/۷^{cd}	۱۳/۱^{ef}
	۰/۵ µM	۷/۰۰^{ef}	۷/۰۱^{ef}	۸/۲^{e}	۱۶/۱^{f}	۱۷/۲^{f}	۱۹/۰^{e}	۱۶/۰^{c}	۱۵/۷^{cd}	۱۵/۸^{cd}
	۰/۷۵ µM	۶/۰۰f^{g}	۶/۰۱f^{g}	۷/۰^{ef}	۱۴/۳^{g}	۱۴/۲^{g}	۱۷/۰^{f}	۱۶/۱^{c}	۱۶/۰^{c}	۱۵/۸^{cd}
۱۰۰	۰	۱۴/۰^{b}	۱۴/۰^{b}	۱۷/۹^{a}	۲۹/۰^{b}	۲۹/۱^{b}	۳۵/۵^{a}	۱۳/۰^{f}	۱۲/۲^{fg}	۱۰/۱^{h}
	۰/۵ µM	۱۲/۲^{c}	۱۲/۴^{c}	۱۴/۰^{b}	۲۶/۱^{c}	۲۶/۰^{c}	۲۸/۱^{b}	۱۴/۲^{de}	۱۴/۲^{de}	۱۳/۱^{ef}
	۰/۷۵ µM	۱۰/۵^{d}	۱۰/۸^{d}	۱۲/۳^{c}	۲۲/۱^{d}	۲۲/۱^{d}	۲۵/۰^{c}	۱۵/۰^{d}	۱۵/۱^{d}	۱۴/۱^{e}

برای هر صفت، حروف مشترک نشان‌دهنده عدم وجود تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد بر اساس آزمون دانکن است.

زیست توده (ماده خشک) اسفناج

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد در شرایط عدم تنش فلز سنگین آرسنیک، کاربرد تکی و توام سالیسیلیک‌اسید و براسینواستروئید موجب بهبود رشد و درنتیجه افزایش ماده خشک اسفناج شد (جدول ۴). اعمال تنش آرسنیک ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار به‌ترتیب کاهش ۲۴/۹ و ۴۱/۹ درصدی ماده خشک اسفناج را به‌همراه داشت. کاربرد هورمون‌های گیاهی تحت شرایط تنش آرسنیک، به‌صورت جداگانه و یا توأم، موجب کاهش اثرات سوء ناشی از فلز سنگین آرسنیک و درنتیجه افزایش ماده خشک اسفناج در مقایسه با بوته‌های اسفناج بدون تیمار شد. شایان ذکر است بیشترین تأثیر مثبت در تیمارهای کاربرد همزمان براسینواستروئید+سالیسیلیک‌اسید مشاهده شد (جدول ۴).

فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز و آسکوربات پراکسیداز)

فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و سوپراکسیددیسموتاز در برگ اسفناج به‌عنوان سیستم دفاعی گیاه، تحت تأثیر تنش آرسنیک در مقایسه با شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش یافتند. در شرایط تنش آرسنیک، فعالیت پراکسیداز به‌میزان ۴۳/۶ و ۶۹/۸ درصد و نیز فعالیت سوپراکسیددیسموتاز به میزان ۲۲/۹ و ۳۷/۷ درصد به‌ترتیب در تنش ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار آرسنیک افزایش یافت (جدول ۵). تحت شرایط تنش و عدم تنش آرسنیک، کاربرد تکی و یا توأم هورمون‌های گیاهی، افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز و پراکسیداز را به‌همراه داشت و ماکسیمم مقدار آن در تیمارهای سالیسیلیک‌اسید+براسینواستروئید مشاهده شد (جدول ۵). لازم به ذکر است که کاربرد هورمون‌های رشد گیاهی در شرایط تنش و یا عدم تنش آرسنیک هیچ‌گونه تأثیری بر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز نداشت (جدول ۵).

غلظت آرسنیک در ریشه و برگ اسفناج

نتایج به‌دست آمده از پژوهش حاضر نشان داد غلظت آرسنیک در ریشه اسفناج بیشتر از برگ این گیاه بود (جدول ۶). تحت

جدول ۵. تأثیر کاربرد سالیسیلیک اسید و براسینواستروئید بر میزان فعالیت آنزیم‌های آسکوربات‌پراکسیداز، سوپراکسیددیسموتاز و پراکسیداز برگ اسفناج تحت تأثیر غلظت‌های مختلف آرسنیک.

آرسنیک (µM)	Br	آسکوربات پراکسیداز (U/mg protein)			سوپراکسیددیسموتاز (U/mg protein)			پراکسیداز (U/mg protein)		
		SA ۰/۷۵ mM	SA ۰/۵ mM	SA ۰	SA ۰/۷۵ mM	SA ۰/۵ mM	SA ۰	SA ۰/۷۵ mM	SA ۰/۵ mM	SA ۰
۰	۰	۳/۰۰^{ab}	۲/۸۹^{ab}	۳/۰۰^{ab}	۸/۳۲^{f}	۸/۰^{f}	۸/۱۴^{f}	۳۰/۷^{i}	۲۹/۱^{i}	۳۰/۱^{i}
	۰/۵µM	۳/۰۰^{ab}	۳/۰۶^{ab}	۲/۹۶^{ab}	۹/۴۱^{de}	۹/۰^{ef}	۹/۲۳^{de}	۲۹/۸^{i}	۲۹/۵^{i}	۳۱/۲^{i}
	۰/۷۵µM	۳/۰۱^{ab}	۳/۰۰^{ab}	۳/۰۰^{ab}	۱۰/۴^{d}	۱۰/۱^{d}	۱۰/۱^{d}	۳۴/۸^{h}	۳۴/۴^{h}	۳۰/۸^{i}
۵۰	۰	۳/۵۴^{a}	۳/۷۲^{a}	۳/۷۱^{a}	۱۱/۱^{cd}	۱۱/۳^{c}	۱۰/۰^{d}	۵۸/۳^{c}	۵۲/۳^{e}	۴۳/۳^{g}
	۰/۵ µM	۳/۸۸^{a}	۳/۸۷^{a}	۳/۴۴^{a}	۱۲/۱^{bc}	۱۲/۸^{ab}	۱۲/۲^{b}	۵۹/۵^{b}	۵۹/۱^{bc}	۵۶/۱^{d}
	۰/۷۵µM	۳/۵۵^{a}	۳/۴۵^{a}	۳/۵۴^{a}	۱۳/۵^{a}	۱۳/۵^{a}	۱۲/۸^{ab}	۵۹/۱^{bc}	۵۹/۹^{b}	۵۶/۴^{d}
۱۰۰	۰	۳/۷۵^{a}	۳/۸۸^{a}	۳/۷۸^{a}	۱۱/۴^{c}	۱۱/۱^{c}	۱۱/۲^{c}	۵۹/۸^{b}	۵۹/۴^{b}	۵۱/۲^{ef}
	۰/۵ µM	۳/۸۴^{a}	۳/۴۸^{a}	۳/۵۴^{a}	۱۲/۵^{b}	۱۲/۴^{b}	۱۲/۴^{b}	۶۳/۶^{a}	۶۳/۹^{a}	۶۰/۸^{b}
	۰/۷۵µM	۳/۹۱^{a}	۳/۸۵^{a}	۳/۸۵^{a}	۱۳/۷^{a}	۱۳/۱^{a}	۱۳/۴^{a}	۶۳/۹^{a}	۶۴/۲^{a}	۶۰/۵^{b}

برای هر صفت، حروف مشترک نشان‌دهنده عدم وجود تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد بر اساس آزمون دانکن است.

جدول ۶. تأثیر کاربرد براسینواستروئید (Br) و سالیسیلیک اسید (SA) بر میزان تجمع آرسنیک در برگ و ریشه اسفناج تحت شرایط تنش آرسنیک ۱۰۰ میکرومولار

تیمار	میزان آرسنیک برگ اسفناج (mg kg^{-1} dry)	میزان آرسنیک ریشه اسفناج (mg kg^{-1} dry)
۱۰۰ میکرومولار آرسنیک	۹/۳۶^{a}	۱۳/۳^{a}
۰/۵ میکرومولار Br	۷/۲۰^{b}	۱۱/۰^{b}
۰/۷۵ میکرومولار Br	۷/۱۵^{b}	۱۱/۱^{b}
۰/۵ میلی‌مولار SA	۷/۸۲^{b}	۱۱/۴^{b}
۰/۷۵ میلی‌مولار SA	۷/۳۵^{b}	۱۱/۴^{b}
۰/۵ میلی‌مولار SA+ ۰/۵ میکرومولار Br	۵/۱۴^{c}	۹/۳۱^{c}
۰/۵ میلی‌مولار SA+ ۰/۷۵ میکرومولار Br	۵/۷۱^{c}	۹/۱۲^{c}
۰/۷۵ میلی‌مولار SA+ ۰/۵ میکرومولار Br	۵/۰۰^{c}	۹/۲۸^{c}
۰/۷۵ میلی‌مولار SA+ ۰/۷۵ میکرو مولار Br	۳/۳۳^{d}	۷/۴۱^{d}

برای هر صفت، حروف مشترک نشان‌دهنده عدم وجود تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد بر اساس آزمون دانکن است.

شرایط تنش آرسنیک ۱۰۰ میکرومولار، پیش‌تیمار بذر اسفناج و نیز محلول‌پاشی بوته‌های این گیاه با ۰/۵۰ میلی‌مولار سالیسیلیک‌اسید، ۰/۷۵ میلی‌مولار سالیسیلیک‌اسید، ۰/۵۰ میکرومولار براسینواستروئید، ۰/۷۵ میکرومولار براسینواستروئید، سالیسیلیک‌اسید ۰/۵۰ میلی‌مولار+ براسینواستروئید ۰/۵۰ میکرومولار، سالیسیلیک‌اسید ۰/۵ میلی‌مولار+ براسینواستروئید ۰/۷۵ میکرومولار، ۰/۷۵ میلی‌مولار سالیسیلیک‌اسید+ براسینواستروئید ۰/۵۰ میکرومولار و نیز ۰/۷۵ میلی‌مولار سالیسیلیک‌اسید+ براسینواستروئید ۰/۷۵ میکرومولار، به‌ترتیب موجب کاهش ۱۶/۴، ۲۱/۴، ۲۳/۱، ۲۳/۶، ۴۵/۱، ۳۸/۹،

۴۶/۵ و ۶۴/۴ درصدی غلظت آرسنیک در برگ اسفناج در مقایسه با عدم کاربرد این هورمون‌ها شد (جدول ۶). همچنین اعمال این تیمارها به‌ترتیب موجب کاهش ۱۳/۹۸، ۱۳/۸۳، ۱۷/۳، ۱۶/۷، ۳۰/۰، ۳۱/۴، ۳۰/۲ و ۴۴/۳ درصدی غلظت آرسنیک در ریشه گیاه، شد (جدول ۶). در پژوهش حاضر نقش قابل‌ملاحظه‌تر کاربرد توأم هورمون‌های براسینواستروئید و سالیسیلیک‌اسید در کاهش تجمع آرسنیک در ریشه و برگ گیاه اسفناج، در مقایسه با کاربرد جداگانه این هورمون‌ها کاملاً مشهود بود (جدول ۶).

بحث

نتایج به‌دست آمده از پژوهش حاضر نشان داد که تنش آرسنیک به‌عنوان یک فلز سنگین، موجب اختلال در تبادلات گازی گیاه و کاهش سرعت فتوسنتز، تعرق و هدایت روزنه‌ای برگ (جدول ۲)، اختلال در پایداری غشا سلولی و درنتیجه پراکسیداسیون لیپیدهای غشا و افزایش میزان مالون دآلدئید و پراکسید هیدروژن (جدول ۴) شد. مشابه نتایج حاصل از پژوهش حاضر، اثرات منفی فلزات سنگین بر فرآیندهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی گیاهان توسط سایر محققان گزارش شده است (۱، ۲۹، ۳۳، ۳۵ و ۳۹). گیاهان در مواجه با تنش فلزات سنگین، گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) مانند سوپراکسید، پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و ... تولید می‌کنند (۱ و ۳۴). در حالت طبیعی بین میزان تولید ROS و فعالیت مکانیسم‌های از بین برنده ROS تعادل وجود دارد. ولی در شرایط تنش‌های غیر زنده مانند تنش فلزات سنگین، این تعادل به‌هم‌خورده و موجب ایجاد تنش اکسیداتیو در گیاهان می‌شود (۲۹ و ۳۶). گیاهان برای مقاومت در برابر تنش اکسیداتیو از سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی آنزیمی یا غیرآنزیمی استفاده می‌کنند (۱۹). بر اساس نتایج حاصل از پژوهش حاضر مشخص شد که در مواجهه با تنش آرسنیک، فعالیت سیستم آنتی‌اکسیدانی گیاه اسفناج، به‌عنوان یک سیستم دفاعی در برابر تنش اکسیداتیو ناشی از تنش فلز سنگین آرسنیک، افزایش یافته و درنتیجه به دنبال آن میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی از جمله سوپراکسیددیسموتاز، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز افزایش یافته است (جدول ۵).

سوپراکسیددیسموتاز یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در گیاهان است. این آنزیم به‌عنوان یک حفاظت کننده سلولی ایفای نقش می‌کند و سوپراکسید را به پراکسیدهیدروژن و اکسیژن مولکولی تبدیل می‌کند (۲۷). نتایج پژوهش حاضر نیز بیان‌کننده این موضوع بود به‌طوری‌که در گیاهان اسفناج رشد یافته تحت شرایط تنش آرسنیک، میزان فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانی سوپراکسیددیسموتاز به‌طور معنی‌داری در مقایسه با شاهد، افزایش یافت. فعالیت این آنزیم مقدار O_2^- و H_2O_2 را که سوبسترای واکنش Haber-Weiss می‌باشند را تنظیم نموده و درنتیجه میزان تولید رادیکال بسیار فعال و آسیب‌زای OH^- را کاهش می‌دهد (۳۰ و ۳۷). نتایج تحقیقات حاکی از آن است که آنزیم پراکسیداز دارای نقش فیزیولوژیکی و توالی نوکلئوتیدی متفاوت نسبت به سایر آنتی‌اکسیدان‌های شناخته شده، است. به‌دلیل توانایی این آنزیم آنتی‌اکسیدانی در اکسیداسیون گوایکول، این آنتی‌اکسیدان را به نام گوایکول پراکسیداز نیز می‌شناسند. آنزیم پراکسیداز از طریق تجزیه ایندول تری استیک اسید، در مصرف پراکسید هیدروژن نقش مؤثری دارد و باعث مقاومت گیاه در برابر تنش‌های محیطی می‌شود (۲۹ و ۳۳). به‌طور مشابه، نتایج حاصل از پژوهش حاضر نیز افزایش معنی‌دار این آنزیم آنتی‌اکسیدانی را تحت شرایط تنش فلز سنگین آرسنیک نشان داد (جدول ۵). در واقع به‌دنبال وقوع تنش فلزات سنگین، تنش اکسیداتیو در گیاه اتفاق می‌افتد. محققین مختلف گزارش دادند که ارتباطی قوی بین مقاومت گیاه به تنش فلزات سنگین و افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی وجود دارد (۱، ۲۹، ۳۳ و ۳۹). لازم به ذکر است نتایج پژوهش حاضر نیز تائید کننده همین موضوع بود (جدول ۵).

اصلی‌ترین علت اثرات تخریبی گونه‌های فعال اکسیژن، توانایی آنها برای شروع واکنش‌های زنجیره‌ای اتواکسیداتیو اسیدهای چرب غیر اشباع هستند که در نهایت منجر به

پراکسیداسیون لیپید و تخریب غشا می‌شوند (۱۷). در پژوهش حاضر نیز به‌دنبال تنش فلز سنگین آرسنیک، غلظت ROS ها از جمله H_2O_2 افزایش یافت و به‌دنبال آن غلظت مالون دآلدهید نیز زیاد شد که منجر به تخریب غشا شد (جدول ۴). غشا سلولی یکی از هدف‌های اولیه بسیاری از تنش‌های محیطی محسوب می‌شود و به‌عبارت‌دیگر حفظ یکپارچگی و ثبات غشا تحت شرایط تنش‌هایی محیطی از جمله نشانه‌های مقاومت گیاه به تنش است (۳). اندازه‌گیری محصولات نهایی پراکسیداسیون لیپیدها یکی از راه‌های تشخیص تنش اکسیداتیو ناشی از تنش‌های محیطی از جمله تنش فلزات سنگین، است. درنتیجه پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع، مالون دآلدئید (MDA) و سایر آلدئیدهای غیراشباع تولید می‌شوند که این ترکیبات ثانویه آلدئیدی حاصل از پراکسیداسیون لیپیدها به‌طورمعمول به‌عنوان شاخص تنش اکسیداتیو محسوب می‌شوند (۲۴). در پژوهش حاضر نیز به دنبال تنش آرسنیک، غلظت MDA در گیاهان اسفناج رشد یافته تحت شرایط تنش فلز سنگین آرسنیک افزایش یافت (جدول ۴). در همین راستا گزارش‌های متعدد نشان می‌دهد که تنش‌های محیطی موجب افزایش پراکسیداسیون لیپید و درنتیجه افزایش تولید مالون دآلدئید و نشت یونی شده است (۲۱ و ۲۵). نتایج به‌دست‌آمده از پژوهش حاضر بیانگر این موضوع بود که به‌عنوان یک سازوکار مقاومت به تنش، میزان اسمولیت‌های سازگار ازجمله میزان کربوهیدرات‌ها و پرولین افزایش یافت (جدول ۳). نقش این اسمولیت‌ها علاوه بر دخالت در تنظیم اسمزی، ممانعت از تولید رادیکال‌های آزاد، سم‌زدایی و جاروب کردن گونه‌های فعال اکسیژن، حفظ یکپارچگی غشا و ثبات پروتئین‌ها، آنزیم‌ها و ماکروملکول‌های داخل سلول است. علاوه بر این، اسمولیت‌ها ترکیبات سلولی را از آسیب ناشی از دست رفتن آب (دهیدراتاسیون) محافظت می‌کنند. ازاین‌رو اسمولیت‌ها را به‌عنوان محافظ اسمزی نیز معرفی می‌کنند. اسمولیت‌ها اغلب هیدروفیل بوده و جایگزین آب در سطح پروتئین‌ها، کمپلکس‌های پروتئینی یا غشاها می‌شوند و از این طریق به‌عنوان محافظ اسمزی نقش ایفا می‌کنند (۱۸ و ۲۱). نتایج تحقیقات نشان داد که دخالت در تنظیم اسمزی و موارد فوق‌الذکر، تنها نقش اسمولیت‌ها نیست. بلکه در مواقعی مسیری که باعث تولید یک اسمولیت خاص می‌شود، ممکن است مهم‌تر از تجمع آن اسمولیت باشد (۴، ۱۴ و ۳۹).

مشابه نتایج حاصل از پژوهش حاضر (جدول ۳)، سایر محققین گزارش داده‌اند که اسیدآمینه پرولین در پاسخ به تنش‌های مختلف محیطی، ازجمله تنش فلزات سنگین، در گیاهان تجمع می‌یابد (۳۴ و ۳۵). پرولین علاوه بر نقش خود به‌عنوان اسمولیت در تنظیم اسمزی، در جاروب کردن رادیکال‌های آزاد اکسیژن، ثبات بخشیدن به غشاهای سلولی، پروتئین‌ها و DNA، تنظیم pH سلول، حفظ پتانسیل ردوکس سلول و حفظ تعادل $NADP^+/NADPH$، حفاظت از دستگاه فتوسنتزی و نیز مهار تولید اتیلن ایفای نقش می‌کند. شایان توجه است به‌جز موارد فوق‌الذکر پرولین به‌عنوان منبع نیتروژن، کربن و انرژی در طول دوره بهبودی بعد از تنش در گیاه است (۱ و ۲۹). مشابه نتایج پژوهش حاضر (جدول ۳)، افزایش تجمع مواد قندی در گیاه در مواجهه با تنش‌های مختلف محیطی گزارش‌شده است (۱، ۴، ۲۹، ۳۳ و ۳۹). افزایش غلظت قندها علاوه بر اینکه موجب منفی‌تر شدن پتانسیل اسمزی در سیتوپلاسم می‌شوند، به جداسازی Na^+ در واکوئول نیز کمک نموده و موجب تنظیم اسمزی می‌شوند. علاوه بر این، کربوهیدرات‌ها به‌عنوان محافظ اسمزی غشاها و پروتئین‌ها می‌توانند عمل نموده و موجب جاروب کردن رادیکال‌های آزاد اکسیژن شوند (۲۷). در شرایط تنش اکسیداتیو، کربوهیدرات‌های غیر احیاکننده در سطح پروتئین‌ها و غشا متراکم شده و با اتصال سرقطبی این مولکول‌ها با مولکول‌های آب، یک‌لایه آب در اطراف خود ایجاد نموده و درنتیجه مانع تخریب غشا می‌شوند (۷ و ۹). نتایج پژوهش حاضر بیانگر آن بود که کاربرد هورمون‌های گیاهی سالیسیلیک اسید و براسینواستروئید در شرایط تنش آرسنیک، باعث کاهش اثرات سوء ناشی از این تنش شد. به‌طوری‌که کاربرد این هورمون‌ها،

تحت شرایط تنش آرسنیک، باعث بهبود و حفظ تبادلات گازی گیاه و افزایش سرعت فتوسنتز، تعرق و هدایت روزنه‌ای برگ اسفناج (جدول ۲)، حفظ پایداری غشا سلولی و درنتیجه کاهش پراکسیداسیون لیپیدهای غشا، کاهش میزان مالون دآلدئید و پراکسیدهیدروژن (جدول ۴) شد. همچنین افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را به دنبال داشت (جدول ۵). در راستای تائید نتایج از پژوهش حاضر، اگرچه تأثیر مثبت کاربرد سالیسیلیک‌اسید، براسینواستروئید در تعدیل اثرات سوء فلزات سنگین (۷، ۱۴، ۱۷، ۳۱ و ۳۷) گزارش شده است، اما در زمینه کاربرد همزمان هورمون‌های گیاهی (سالیسیلیک‌اسید و براسینواستروئید) کمتر گزارشی منتشر شده است. بر اساس نتایج حاصل از پژوهش حاضر مشخص شد که استفاده همزمان از هورمون‌های گیاهی، تأثیر بیشتری در مقایسه با کاربرد تکی هر کدام از این هورمون‌ها بر بهبود فرایندهای فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و زیست توده اسفناج داشت. در تحقیقی بر گیاه نخود، مشخص شد که سالیسیلیک اسید با حفظ فعالیت فتوشیمیایی غشاهای کلروپلاستی و واکنش‌های کربوکسیلاسیون در فتوسنتز، موجب کاهش تنش اکسیداتیو ایجاد شده توسط تنش کادمیوم شده است (۲۶). مشابه نتایج پژوهش حاضر، گزارش شده است که براسینواستروئیدها به‌عنوان هورمون‌های گیاهی استروئیدی نقش بسیار مهمی در رشد و نمو گیاهی و نیز کاهش اثرات مخرب فلزات سنگین دارند (۷، ۱۴ و ۱۷). در همین راستا گزارش شده است که کاربرد سالیسیلیک‌اسید موجب کاهش اثرات مهاری فلزات سنگین سرب و جیوه روی جوانه‌زنی و رشد برنج و درنتیجه افزایش وزن تر و خشک ریشه و ساقه این گیاه شد (۱۲).

در پژوهش حاضر مشخص شد کاربرد هورمون‌های گیاهی سالیسیلیک‌اسید و براسینواستروئید موجب کاهش تجمع آرسنیک در ریشه و برگ اسفناج شد (جدول ۶). با توجه به اینکه ریشه نخستین اندام گیاه است که در مواجه با فلزات سنگین در خاک قرار می‌گیرد، بنابراین آرسنیک اغلب در ریشه گیاه تجمع می‌یابد. با این وجود به بخش هوایی گیاه نیز منتقل می‌شود (۷، ۱۴ و ۱۷). مقاومت به فلزات سنگین از طریق انحصار انتخابی و جذب پایین‌تر یا خروج فعال از ریشه‌ها (از طریق مکانیسم‌هایی که به میزان پایین‌تر آرسنیک سیتوپلاسمی منجر می‌شود)، حاصل می‌شود (۱۷). نتایج بررسی‌ها نشان داد که اثر برهم‌کنش آرسنیک و سالیسیلیک‌اسید بر مقدار تجمع آرسنیک در اندام هوایی گیاه دارویی بابونه به این صورت بود که تیمار با سالیسیلیک‌اسید باعث کاهش تجمع آرسنیک در بخش هوایی شده است (۱۰). لازم به ذکر است از جمله مکانیسم‌های حفاظتی سالیسیلیک‌اسید در گیاهان رشد یافته تحت شرایط تنش فلزات سنگین، کنترل میزان جذب و نیز انتقال فلز سنگین از طریق ریشه گیاه است (۲۳ و ۳۴). در همین راستا، نتایج تحقیقات بیانگر آن است که کاربرد هورمون‌های گیاهی استروئیدی، براسینواستروئیدها، موجب کاهش جذب و نیز انتقال فلزات سنگین از ریشه به اندام هوایی گیاه می‌شود که درنتیجه کاهش تجمع فلزات سنگین در گیاه را به دنبال دارد (۲، ۶، ۹، ۱۷، ۲۰ و ۳۷). در همین زمینه، تأثیر مثبت براسینواستروئیدها در کاهش جذب و تجمع فلز سنگین کادمیوم در گیاه کلزا گزارش شده است (۱۲). به‌علاوه، نتایج تحقیقات دیگر حاکی از کاهش غلظت کادمیوم در گیاه گوجه‌فرنگی، در اثر کاربرد براسینواستروئید است (۱۱). اگرچه نتایج پژوهش حاضر حاکی از آن بود که پرایم بذر و محلول‌پاشی بوته‌ها با سالیسیلیک‌اسید و براسینواستروئید کاهش تجمع آرسنیک در ریشه و برگ اسفناج را به‌همراه داشت و کاربرد این تنظیم کننده‌ها موجب کاهش انتقال فلز سنگین آرسنیک از ریشه به برگ گیاه شد، اما مکانیسم‌های فیزیولوژیکی و مولکولی چگونگی تاثیر تنظیم کننده‌ها بر میزان انتقال و جذب آرسنیک مورد ارزیابی قرار نگرفت. بنابراین پیشنهاد می‌شود در ادامه این پژوهش و نیز در مطالعات تحقیقاتی مشابه، این موضوع مورد بررسی و تحقیق قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

در یک نتیجه‌گیری کلی می‌توان چنین بیان داشت که تحت

شرایط تنش فلز سنگین آرسنیک، کاربرد هورمون‌های رشد گیاهی سالیسیلیک‌اسید و براسینواستروئید به‌صورت پرایم بذر و محلول‌پاشی بوته، از طریق بهبود تبادلات گازی، حفظ پایداری غشا سلولی و نیز افزایش فعالیت سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی گیاه، موجب افزایش مقاومت اسفناج به این فلز سنگین شد و درنتیجه افزایش ماده‌خشک بوته‌های اسفناج را به دنبال داشت. شایان توجه است تأثیر کاربرد و استفاده توأم هورمون‌های گیاهی سالیسیلیک‌اسید و براسینواستروئید، بیشتر از کاربرد تکی هر کدام از این هورمون‌ها بود. همچنین نتایج پژوهش حاضر نشان داد استفاده توأم از سالیسیلیک‌اسید و براسینواستروئید، در مقایسه با کاربرد تکی هر کدام از آن‌ها، در کاهش تجمع آرسنیک در ریشه و برگ اسفناج تأثیر قابل‌ملاحظه‌تری داشتند.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از مرکز تحقیقات تغذیه دانشگاه علوم پزشکی شیراز بابت حمایت‌های مالی جهت اجرای طرح بـا شـماره ۹۹-۰۱-۲۳۵۶۳-۸۷ تقدیر به‌عمل می‌آید.

منابع مورد استفاده

1. Ahmad, A., W. U. Khan, A. Ali Shah, N. A. Yasin, S. Naz and A. Ali. 2021. Synergistic effects of nitric oxide and silicon on promoting plant growth, oxidative stress tolerance and reduction of arsenic uptake in *Brassica juncea*. *Chemosphere* 262: 128384.
2. Amorim-Silva, V., A. Garcia-Moreno, A. G. Castillo, N. Lakhssassi, A. Esteban Del Valle, J. Perez-Sancho, Y. Li, D. Pose, J. Perez-Rodriguez, J. Lin, V. Valpuesta, O. Borsani, C. Zipfel, A. P. Macho and M. A. Botella. 2019. TTL proteins scaffold brassinosteroid signaling components at the plasma membrane to optimize signal transduction in arabidopsis. *Plant Cell* 31: 1807-1828.
3. Ari, Y., F. Sam, H. Siddiqui, A. Bajguz and S. Hayat. 2020. Salicylic acid in relation to other phytohormones in plant: A study towards physiology and signal transduction under challenging environment. *Environmental and Experimental of Botany* 175: 104040.
4. Bartwal, A. and S. Arora. 2020. Brassinosteroids: Molecules with Myriad Roles. Springer Cham.
5. Bates, L. S., R. P. Waldren and I. D. Teare. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil* 39: 205-207.
6. Belkhadi, A., H. Hediji, Z. Abbes, I. Nouairi, Z. Barhoumi, M. Zarrouk, W. Chaibi and W. Djebali. 2010. Effects of exogenous salicylic acid pre-treatment on cadmium toxicity and leaf lipid content in *Linum usitatissimum* L. *Ecotoxicology* and *Environmental Safety* 10: 1-8.
7. Bhardwaj, S., D. Sharma, M. Pujari and S. Jan. 2020. Brassinosteroids mediated plant responses to heavy metal stress. *Plant Archives* 20: 85-97.
8. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
9. Dos Santos, L. R., B. R. S. da Silva, T. Pedron, B. Batista, L. da Silva and A. K. Lobato. 2020. 24-Epibrassinolide improves root anatomy and antioxidant enzymes in soybean plants subjected to zinc stress. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 20: 105-124.
10. Fazelian, N. and Esrar, Z. 2011. The Effect of arsenic and salicylic acid iteraction on the growth and some physiological of *Matricaria recutita* L. Plant Biology 8: 12-1.
11. Hasan, S. A., S. Hayat and A. Ahmad. 2011. Brassinosteroids protect photosynthetic machinery against the cadmium induced oxidative stress in two tomato cultivars. *Chemosphere* 84: 1446-1451.
12. Hayat. S., B. Ali and S. Aiman Hasan. 2007. Brassinosteroid enhanced the level of antioxidants under cadmium stress in *Brassica juncea*. *Environmental and Experimental Botany* 60: 33-41.
13. Hosseinpur feyzi, M., M. Mosaferi, S. Dastgiri, Sh. Zolali, N. Poladi and P. Azarfam. 2007. The prevalence of health problems in the *Qopuz village* of East Azerbaijan and its relation with arsenic levels in drinking water. *Iranian journal Epidemiology* 3: 21-27. (In Farsi).
14. Kapoor, D., S. Bhardwaj and S. Gautam. 2022. Brassinosteroids in plant nutrition and heavy metal tolerance. *ResearchGate* 23: 217-235.
15. Karimi. N., S. M. Ghaderian, H. Marofi and H. Schat. 2010. Analysis of arsenic in soil and vegetation of a contaminated area in Zarshuran, Iran, identifies two angiosperms arsenic hyperaccumulators. *International Journal of Phytoremediat* 12: 159-173.

16. Karimi Nezhad, M. N., M. Ghahroudi, M. Tali, H. Mahmoudi and E. Pazira. 2010. Spatial variability of As and Cd concentrations in relation to land use, parent material and soil properties in topsoil's of northern Ghorveh, Kurdistan Province, Iran. *World Applied Sciences Journal* 11: 1105-1113.
17. Kour, J., S. K. Kohli, K. Khanna, P. Bakshi, P. Sharma, A. D. Singh, M. Ibrahim, K. Devi, N. Sharma, P. Ohri, M. Skalicky, M. Brestic, R. Bhardwaj, M. Landi and A. Sharma. 2021. Brassinosteroid signaling, crosstalk and, physiological functions in plants under heavy metal stress. *Frontiers in Plant Science* 12: 608061.
18. Li, A., X. Sun and L. Liu. 2022. Action of salicylic acid on plant growth. *Frontiers in Plant Science* 13: 878076.
19. Liu, C., J. Guo, Y. Cui, T. Lu, X. Zhang and G. Shi. 2011. Effects of cadmium and salicylic acid on growth, spectral reflectance and photosynthesis of castor bean seedlings. *Plant Soil* 344: 131-141.
20. Maghsoudi, K., M. J. Arvin and M. Ashraf. 2019. Mitigation of arsenic toxicity in wheat by the exogenously applied salicylic acid, brassinosteroid and silicon. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 32: 212-301.
21. Maqsood, M. F., M. Shahbaz, U. Zulfiqar, R. U. Saman, A. Rehman, N. Naz, M. Akram and F. U. Haider. 2023. Enhancing wheat growth and yield through salicylic acid-mediated regulation of gas exchange, aAntioxidant defense, and osmoprotection under salt stress. *Stresses* 3: 372-386.
22. Min, K. and S. R. Lee. 2021. Exogenous salicylic acid alleviates freeze-thaw injury of cabbage (*Brassica oleracea* L.) leaves. *Sustainability* 13: 11437.
23. Mohamed, H. E. and A. M. Hassan. 2019. Role of salicylic acid in alleviating cobalt toxicity in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. *Journal of Agricultural of Science* 11: 142-150.
24. Mostofa, M. G., M. Rahman, M. Ansary, M. Uddin, M. Fujita and L. S. P. Tran. 2019. Interactive effects of salicylic acid and nitric oxide in enhancing rice tolerance to cadmium stress. *International Journal of Molecular Sciences* 20: 5798.
25. Naeem, M., A. Basit, I. Ahmad, H. I. Mohamed and H. Wasila. 2020. Effect of salicylic acid and salinity stress on the performance of tomato plants. *Healthy Plants* 72: 393-402.
26. Popova, L. P., L. T. Maslenkova, R. Y. Yordanova, A. P. Ivanova, A. P. Krantev, G. Szalai and T. Janda. 2009. Exogenous treatment with salicylic acid attenuates cadmium toxicity in pea seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry* 47: 224-231.
27. Rattan, A., D. Kapoor, N. Kapoor, R. Bhardwaj and A. Sharma. 2020. Brassinosteroids regulate functional components of antioxidative defense system in salt stressed maize seedlings. *Journal of Plant Growth Regulation* 10: 1-11.
28. Saddiq, M. S., S. Iqbal, M. B. Hafeez, A. M. H. Ibrahim, A. Raza, E. M. Fatima, H. Baloch, P. Woodrow and L. F. Ciarmiello. 2021. Effect of salinity stress on physiological changes in winter and spring wheat. *Agronomy* 11: 1193.
29. Samet, H. 2020. Alleviation of cobalt stress by exogenous sodium nitroprusside in iceberg lettuce. *Chilean Journal of Agricultural Research* 80: 161-170.
30. Sharma, P., M. Ramakrishnan, K. Khanna, M. Landi, R. Prasad, R. Bhardwaj and B. Zheng. 2022. Brassinosteroids and metalloids: regulation of plant biology. *Journal of Hazardous Materials* 42: 137-145.
31. Tripathi, P., R. D. Tripathi, R. P. Singh, S. Dwivedi, D. Goutam, M. Shri, P. K. Trivedi and D. Chakrabarty. 2013. Silicon mediates arsenic tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) through lowering of arsenic uptake and improved antioxidant defense system. *Ecological Engineering* 52: 96–103.
32. Velikova, V., I. Yordanov and A. Edreva. 2000. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: Protective role of exogenous poly-amines. *Plant Science* 151: 59-66.
33. Wang, K., Y. Wang, Y. Wan, Z. Mi, Q. Wang and Q. Wang. 2021. The fate of arsenic in rice plants (*Oryza sativa*): Influence of different forms of selenium. *Chemosphere* 264: 128417.
34. Wang, Y. Y., Y. Wang, G. Z. Li and L. Hao. 2019. Salicylic acid-altering arabidopsis plant response to cadmium exposure: Underlying mechanisms affecting antioxidation and photosynthesis-related processes. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 169: 645-653.
35. Wei, L., M. Zhang, S. Wei, J. Zhang, C. Wang and W. Liao. 2020. Roles of nitric oxide in heavy metal stress in plants: Cross-talk with phytohormones and protein s-nitrosylation. *Environmental Pollution* 259: 113943.
36. Wei, T., X. Lv, H. Jia, L. Hua, H. Xu, R. Zhou, J. Zhao, X. Ren and J. Guo. 2018. Effects of salicylic acid, Fe (II) and plant growth-promoting bacteria on Cd accumulation and toxicity alleviation of Cd tolerant and sensitive tomato genotypes. *Journal of Environmental Management* 214: 164-171.
37. Wu, C., F. Li, H. Xu, W. Zeng, R. Yu and X. Wu. 2019. The potential role of brassinosteroids (BRs) in alleviating antimony (Sb) stress in Arabidopsis thaliana. *Plant Physiology and Biochemistry* 141: 51-59
38. Zhang, Z. J., H. Z. Li, W. J. Zhou, Y. Takeuchi and K. Yoneyama. 2006. Effect of 5-aminolevulinic acid on development and salt tolerance of potato (*Solanum tuberosum* L.) microtubers in vitro. *Plant Growth Regulation* 49: 27-34.
39. Zhou, P., M. Adeel, N. Shakoor, M. Guo, Y. Hao and I. Azeem. 2021. Application of nanoparticles alleviates heavy metals stress and promotes plant growth: An overview. *Nanomaterials* 11: 26-38.

Journal of Crop Production and Processing
Vol. 14, No. 1, Spring 2024, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran.

Evaluation of the Effect of Salicylic Acid and Brassinosteroid on Some Physiological Traits and Arsenic Accumulation in Spinach under Arsenic Stress Conditions

K. Maghsoudi[1], E. Ashrafi Dehkordi[2] and S. M. Mazloomi[3*]

(Received: July 25-2023; Accepted: December 09-2023)

Abstract

With the aim of evaluating the effects of salicylic acid and brassinosteroid application on some physiological traits and arsenic accumulation in spinach under arsenic stress conditions, an experiment was conducted in a factorial experiment in the form of a randomized complete block design with four replications in the year 2022 in the Nutrition Research Center, Department of Food Hygiene and Quality Control, School of Nutrition and Food Sciences, Shiraz University of Medical Sciences, Iran. The experimental factors included salicylic acid (0, 0.5, and 0.75 mM), brassinosteroid (0, 0.5, and 0.75 µM), and arsenic stress (0, 50, and 100 µM). Arsenic stress, especially at 100 µM, reduced the net photosynthetic rate, transpiration rate, stomatal conductance of spinach leaves and biomass. Arsenic stress increased the concentration of malondialdehyde, hydrogen peroxide, osmolytes, as well as antioxidant enzymes activities in spinach plants. Application of brassinosteroid and salicylic acid significantly increased activities of antioxidant enzymes (peroxidase, ascorbate peroxidase, and superoxide dismutase), osmolytes accumulation (carbohydrates and proline) and spinach biomass; in contrast, application of brassinosteroid and salicylic acid decreased the concentration of malondialdehyde and hydrogen peroxide in spinach plants under arsenic stress conditions. Arsenic accumulation was higher in spinach roots than in leaves. Under 100 µM arsenic stress, the application of different concentrations of salicylic acid and brassinosteroid, individually and in combination, significantly reduced arsenic accumulation in spinach, with the highest positive effect being observed in the treatment of 0.75 mM salicylic acid + 0.75 µM brassinosteroid. In conclusion, brassinosteroid and salicylic acid application increased the tolerance of spinach plants against arsenic stress by improving gas exchange, activity of antioxidant enzymes, accumulation of osmolytes, stability of the membranes, and as a result plant biomass; the positive effects of brassinosteroid and salicylic acid together were greater than that of brassinosteroid or salicylic acid applied separately.

Keywords: Plant growth regulator, Photosynthesis, Stomatal conductance, Osmolytes

1. Postdoc at Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran And Researcher of Nutrition Research Center, Department of Food Hygiene and Quality Control, School of Nutrition and Food Sciences, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.
2 And 3. Researcher and Professor, Respectively, Nutrition Research Center, Department of Food Hygiene and Quality Control, School of Nutrition and Food Sciences, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.
*: Corresponding Author, Email: smmazloomi@gmail.com