

ارزیابی تأثیر سالیسیلیک‌اسید و براسینواستروئید بر برخی پارامترهای فیزیولوژیکی 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*}

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

۳- استاد مرکز تحقیقات تغذیه، دانشکده تغذیه و علوم غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز. ایران

* نویسنده مسئول: smmazloomi@gmail.com

چکیده

با هدف ارزیابی تأثیر سالیسیلیک‌اسید و براسینواستروئید بر برخی صفات فیزیولوژیکی و میزان تجمع آرسنیک در اسفناج تحت شرایط تنش آرسنیک، آزمایشی به صورت 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، ۵/۵ و ۰/۷۵ میلی‌مولار)، براسینواستروئید (۰، ۵/۵ و ۰/۷۵ میکرومولار) و تنش آرسنیک (۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار) بودند. تنش آرسنیک، به ویژه تنش ۱۰۰ میکرومولار، موجب اختلال در تبادلات گازی و کاهش سرعت فتوسنتز، تعرق، هدایت روزنه‌ای برگ و زیست‌توده اسفناج شد. در مواجهه با تنش آرسنیک میزان مالون‌دی‌آلدئید، پراکسید هیدروژن، غلظت اسمولیت‌ها، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در اسفناج افزایش یافت. کاربرد براسینواستروئید و سالیسیلیک‌اسید به طور معنی‌داری موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (پراکسیداز، آسکوبات‌پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز)، تجمع اسمولیت‌ها (کربوهیدرات‌ها و پرولین) و میزان ماده خشک اسفناج و در مقابل کاهش میزان مالون‌دی‌آلدئید و پراکسید هیدروژن در اسفناج گردید. تجمع آرسنیک در ریشه اسفناج بیشتر از برگ بود. در شرایط تنش آرسنیک ۱۰۰ میکرومولار، کاربرد سالیسیلیک‌اسید و براسینواستروئید به صورت 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. به طور کلی، 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 در نهایت بیوماس اسفناج در مقایسه با شاهد افزایش یافت. از طرفی، کاربرد این تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی موجب کاهش تجمع آرسنیک در اسفناج گردید. در مجموع می‌توان بیان داشت تأثیر 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 در نتیجه بهبود رشد این گیاه، قابل ملاحظه‌تر بود.

واژه‌های کلیدی: تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، فتوستنتز، هدایت روزنه‌ای، اسمولیت‌ها.

مقدمه

در بسیاری از نقاط جهان، آلودگی خاک به فلزات سنگین یکی از مهم‌ترین مشکلات زیست‌محیطی می‌باشد. در واقع فلزات سنگین تحت عنوان فلزاتی با وزن مخصوص بیشتر از پنج گرم بر سانتیمتر مکعب معرفی شده‌اند (۳۹). دوام طولانی مدت فلزات سنگین در خاک، موجب انباشته شدن این فلزات در زنجیره غذایی و در نتیجه 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 می‌باشد. آلودگی آرسنیک در آب، خاک، هوا و زنجیره غذایی به دلیل 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 ۰/۱ 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 به دلیل 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 فرایندهای فیزیولوژیک اساسی از جمله فتوستنتز، تنفس سلولی، روابط آب و گیاه و متابولیسم نیتروژن می‌باشد. این اثرات در سطح سلولی و مولکولی با خسارات اکسیداتیو موجب افزایش پراکسیداسیون

نشریه تولید و فراوری محصولات زراعی و باغی

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 در نتیجه 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 می‌باشند (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، غلظت‌های 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 می‌باشد. 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 به دنبال آن آرسنیک در بافت بدن حیواناتی که این گیاهان را استفاده می‌کنند، تجمع می‌یابد. در نهایت 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 از جمله کردستان، زنجان، آذربایجان شرقی و خراسان گزارش شده 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 در نتیجه موجب آلودگی زیست‌محیطی، تجمع آلودگی در خاک و به دنبال آن انتقال فلزات سنگین موجود در پساب به محصولات تولیدی می‌گردد. لذا بررسی راهکاری برای کاهش تجمع فلزات سنگین از جمله آرسنیک در محصولات کشاورزی الزامی به نظر می‌رسد.

سالیسیلیک اسید به‌عنوان یک هورمون رشد گیاهی، در واقع یک ترکیب فنلی می‌باشد که با داشتن خاصیت آنتی‌اکسیدانی در تنظیم فرایندهای 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 می‌باشد (۲۳، ۲۴، ۳۴ و ۳۶). شایان توجه است براسینواستروئیدها نیز هورمون‌های استروئیدی با منشأ طبیعی و سازگار با محیط‌زیست می‌باشند 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

نشریه تولید و فراوری محصولات زراعی و باغی

معنی داری افزایش می دهند (۴، ۷، ۹، ۱۴، ۱۷، ۳۰ و ۳۷). با وجود اینکه نتایج برخی تحقیقات نشان می دهد کاربرد سالیسیلیک اسید و براسینواستروئید، کاهش تجمع فلزات سنگین در اندام های مختلف گیاهان را در پی دارد (۷، ۱۷، ۲۱، ۲۵ و ۲۸)، اما در رابطه با کاربرد توأم هورمون های رشد گیاهی سالیسیلیک اسید 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 می باشد، بنابراین در پژوهش حاضر تأثیر استفاده از براسینواستروئید و سالیسیلیک اسید به عنوان یک راه کار جهت کاهش میزان تجمع فلز سنگین آرسنیک در گیاه اسفناج، مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش ها

این تحقیق با هدف ارزیابی اثر کاربرد تنظیم کننده های رشد گیاهی سالیسیلیک اسید (SA) و براسینواستروئید (BR) به صورت پرایمینگ بذر و محلول پاشی، بر برخی پارامترهای فیزیولوژیکی و میزان تجمع فلز سنگین آرسنیک در اسفناج رشد یافته تحت شرایط تنش فلز سنگین آرسنیک، به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک های کامل تصادفی با چهار تکرار در مرکز تحقیقات تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی شیراز در سال ۱۳۹۹ به اجرا درآمد. تیمارهای آزمایشی شامل غلظت های مختلف SA (۰، ۵/۵ و ۰/۷۵ میلی مولار)، BR (۰، ۵/۵ و ۰/۷۵ میکرومولار) و آرسنیک (۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار) بودند. بذرهاى 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 سانتی گراد در غلظت های ۵/۵ و ۰/۷۵ میلی مولار SA و ۵/۵ و ۰/۷۵ میکرومولار BR خیسانده شدند. لازم به ذکر است در کنار غلظت های فوق الذکر از آب مقطر نیز به عنوان شاهد استفاده شد. جهت تهیه خاک، در ابتدا از خاک مزرعه غیر آلوده به فلزات سنگین، از عمق سی سانتیمتری خاک به طور کاملاً تصادفی، نمونه خاک تهیه و آنالیز شد. بر اساس نتایج آنالیز مشخص گردید که مقدار آرسنیک در خاک موردنظر کمتر از حد بحرانی بود. برای اعمال تیمار فلز سنگین آرسنیک در خاک، از نمک سدیم آرسنات ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) استفاده شد. به این صورت که غلظت های مختلف نمک سدیم آرسنات (۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار) در لایه های مختلف خاک پاشیده شد و از این طریق خاک به فلز سنگین آرسنیک آلوده شد. باهدف اینکه برهمکنش های آلاینده و خاک تا حد امکان تکوین یابد و شرایط آلودگی طبیعی تر گردد، خاک آلوده شده به آرسنیک تا حد ظرفیت زراعی مزرعه آبیاری گردید. سپس خاک آلوده به مدت یک ماه در شرایط فوق الذکر نگهداری شد (با هدف اطمینان پیدا کردن از برقراری تعادل بین آرسنیک با خاک).

نشریه تولید و فراوری محصولات زراعی و باغی

جهت کاشت گلدان‌های پنج کیلوگرمی با خاک آلوده شده با غلظت‌های مختلف آرسنیک پر شدند و سپس بذره‌های پرآیم 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 پرآیم شده بودند، گیاهان اسفناج نیز با همان ترکیب محلول‌پاشی شدند، بنابراین بین تیمارهای آزمایشی در مراحل پرآیم بذر و محلول‌پاشی بوته‌ها عملاً تداخلی ایجاد نشد.

پارامترهای تبادلات گازی شامل سرعت فتوسنتز، سرعت تعرق و هدایت روزنه‌ای با استفاده از دستگاه فتوسنتز متر (CI-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 $1800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 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 گردید. شدت جذب محلول در طول موج ۶۰۰ نانومتر با اسپکتروفوتومتر-مدل Cary50 Varian، تعیین و با استفاده از منحنی استاندارد غلظت فندهای احیاکننده محاسبه 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 سانتریفیوژ گردید. 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 گردید 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 گردید (۵).

نشریه تولید و فراوری محصولات زراعی و باغی

باهدف سنجش میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشا، غلظت مالوندی‌آلدئید اندازه‌گیری گردید. به این منظور ۰/۲ گرم بافت گیاهی با ۵ میلی‌لیتر اسیدتری‌کلرواستیک سائیده و عصاره حاصل به مدت پنج دقیقه سانتریفیوژ (۱۰۰۰۰ دور) شد. به یک میلی‌لیتر از محلول حاصل از سانتریفیوژ، چهار میلی‌لیتر اسیدتری‌کلرواستیک (دارای ۰/۵ درصد اسیدتیوباربیتریک)، افزوده شد. مخلوط حاصل در حمام آبگرم (۹۵ درجه سانتی‌گراد) به مدت ۳۰ دقیقه حرارت دید و بعد از خنک شدن، به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ (۱۰۰۰۰ دور) شد. شدت جذب این محلول در طول موج ۵۳۲ نانومتر به وسیله 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 پراکسید هیدروژن، بافت گیاه در حمام یخ با اسیدتری‌کلرواستیک ۰/۱٪ سائیده شد. عصاره حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در سانتریفیوژ یخچال‌دار در ۱۰۰۰۰ دور 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 طول موج ۳۹۰ نانومتر قرائت شد. مقدار پراکسید هیدروژن با استفاده از ضریب خاموشی ۰/۲۸ مولار در سانتی‌متر محاسبه و برحسب میکرومول بر گرم وزن‌تر گزارش گردید (۳۲).

به‌منظور ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه، فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز و سوپراکسیددیسموتاز بررسی گردید. برای بررسی فعالیت آنزیم پراکسیداز در ۴۷۰ نانومتر، مخلوط واکنش حاوی بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار، پراکسید هیدروژن و گایاکول بود و واکنش با افزودن ۲۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی شروع گردید. میزان جذب تراگایاکول 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 آسکوربات پراکسیداز 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 گردید. با استفاده از تغییرات جذب در طول موج 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 ریوفلاوین، 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

نشریه تولید و فراوری محصولات زراعی و باغی

نشان‌دهنده ۱۰۰ درصد احیای نوری NBT و نیمی از آن معادل یک واحد آنزیمی می‌باشد. اختلاف جذب نمونه‌ها و کنترل در ۵۶۰ نانومتر نشان‌دهنده مهار احیاء نوری NBT در حضور آنزیم SOD موجود در نمونه می‌باشد. با استفاده از این اختلاف جذب، واحد آنزیمی محاسبه 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 به صورت 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٪ حاوی اسیدکلریدریک غلیظ در لوله‌آزمایش پیرکس مخلوط و به مدت ۲۴ ساعت گذاشته شد، تا هضم اسیدی نمونه‌ها به‌خوبی صورت گیرد. پس‌از این 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 به دست 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 گردید. 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 ارائه شده 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 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 ۳۷/۲۳ و ۶۶/۴۹ درصدی میزان فتوسنتز برگ اسفناج را در پی داشت. اثر سوء تنش آرسنیک بر میزان فتوسنتز اسفناج با کاربرد سالیسیلیک‌اسید 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 به همراه داشت و تأثیر کاربرد سالیسیلیک‌اسید+ براسینواستروئید بیشتر از

نشریه تولید و فراوری محصولات زراعی و باغی

اثر استفاده تکی هر کدام از این هورمون‌ها بود (جدول ۲). بر اساس نتایج مشخص گردید که سرعت تعرق به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای تحت تنش آرسنیک کاهش یافت و این کاهش در تیمار آرسنیک ۱۰۰ میکرومولار بیشتر از آرسنیک ۵۰ میکرومولار بود. باین‌حال، 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 ۱۳/۴۲ و ۲۶/۲۵ درصد به ترتیب 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. در مجموع، 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 ۰/۵ 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 گردید که تنش ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار آرسنیک به ترتیب موجب افزایش ۱۲/۸۹ و ۳۶/۶۷ درصدی مقدار قندهای محلول برگ اسفناج گردید. در شرایط عدم تنش، گیاهان تیمار شده با براسینواستروئید (۰/۵ و ۰/۷۵ میکرومولار)، سالیسیلیک‌اسید (۰/۵ و ۱ میلی‌مولار)، براسینواستروئید + سالیسیلیک‌اسید 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 گردید. 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 قابل‌ملاحظه‌ای این پارامتر را تحت تأثیر قرار داد. در هر دو سطح آرسنیک ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار، مقدار پرولین برگ افزایش یافت. در هر حال، 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 (H₂O₂) 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 به همراه داشت، اما این افزایش در غلظت بالای آرسنیک به‌طور معنی‌دار بیشتر از غلظت پایین‌تر آرسنیک بود. در

نشریه تولید و فراوری محصولات زراعی و باغی

مقابل، کاربرد هورمون‌های رشد گیاهی به صورت تکی و ترکیبی موجب کاهش پراکسید هیدروژن و مالون دآلدئید گردید. لازم به ذکر است که در رابطه با این پارامترها، استفاده ترکیبی براسینواستروئید + سالیسیلیک‌اسید اثر هم‌افزایی داشت (جدول ۴).

زیست توده (ماده خشک) اسفناج: نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد در شرایط عدم تنش فلز سنگین آرسنیک، کاربرد تکی و توأم سالیسیلیک‌اسید و براسینواستروئید موجب بهبود رشد و در نتیجه افزایش ماده خشک اسفناج شد (جدول ۴). اعمال تنش آرسنیک ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار به ترتیب کاهش ۲۴/۹۵ و ۴۱/۹۶ درصدی ماده خشک اسفناج را به همراه داشت. کاربرد هورمون‌های گیاهی تحت شرایط تنش آرسنیک، به صورت جداگانه و یا توأم، موجب کاهش اثرات سوء ناشی از فلز سنگین آرسنیک و در نتیجه 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 سوپراکسید دیسموتاز در برگ اسفناج به عنوان سیستم دفاعی گیاه، تحت تأثیر تنش آرسنیک در مقایسه با شاهد به طور معنی‌داری افزایش یافتند. در شرایط تنش آرسنیک، فعالیت پراکسیداز به میزان ۴۳/۶۸ و ۶۹/۸۵ درصد و نیز فعالیت سوپراکسید دیسموتاز به میزان ۲۲/۹۹ و ۳۷/۷۱ درصد به ترتیب 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 آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و پراکسیداز را به همراه 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 به دست آمده از پژوهش حاضر نشان داد غلظت آرسنیک در ریشه اسفناج بیشتر از برگ این گیاه بود (جدول ۶). تحت شرایط تنش آرسنیک ۱۰۰ میکرومولار، پیش تیمار بذر اسفناج و نیز محلول‌پاشی بوته‌های این گیاه با ۵۰ میلی‌مولار سالیسیلیک‌اسید، ۷۵ میلی‌مولار سالیسیلیک‌اسید، ۵۰ میلی‌مولار سالیسیلیک‌اسید، ۵۰ میکرومولار براسینواستروئید، ۷۵ میلی‌مولار براسینواستروئید، سالیسیلیک‌اسید ۵۰ میلی‌مولار + براسینواستروئید ۵۰ میلی‌مولار، سالیسیلیک‌اسید ۵۰ میلی‌مولار + براسینواستروئید ۷۵ میلی‌مولار، ۷۵ میلی‌مولار سالیسیلیک‌اسید + براسینواستروئید ۵۰ میلی‌مولار و نیز ۷۵ میلی‌مولار سالیسیلیک‌اسید + براسینواستروئید ۷۵ میلی‌مولار، به ترتیب موجب کاهش ۱۶/۴۵، ۲۱/۴۷، ۲۳/۰۷، ۲۳/۶۱، ۴۵/۰۸، ۳۸/۹۹، ۴۶/۵۸ و ۶۴/۴۲ درصدی غلظت آرسنیک در برگ اسفناج در مقایسه با عدم کاربرد این هورمون‌ها شد (جدول ۶).

همچنین اعمال این تیمارها به ترتیب موجب کاهش ۱۳/۹۸، ۱۳/۸۳، ۱۷/۲۹، ۱۶/۶۹، ۳۰/۰۰، ۳۱/۴۲، ۳۰/۲۲ و ۴۴/۲۸ درصدی غلظت آرسنیک در ریشه گیاه، گردید (جدول ۶). در پژوهش حاضر نقش قابل ملاحظه‌تر 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 بدست آمده از پژوهش حاضر نشان داد که تنش آرسنیک به عنوان 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 در نتیجه پراکسیداسیون لیپیدهای غشا و افزایش میزان مالون دآلدئید و پراکسید هیدروژن (جدول ۴) گردید. مشابه نتایج حاصل از پژوهش حاضر، اثرات منفی فلزات سنگین بر روی فرایندهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی گیاهان توسط سایر محققان گزارش شده است (۱)، ۲۹، ۳۳، ۳۵ و ۳۹). گیاهان در مواجهه 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 به هم خورده و موجب ایجاد تنش اکسیداتیو در گیاهان می‌شود (۲۹ و ۳۶). گیاهان برای مقاومت در برابر تنش اکسیداتیو از سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی آنزیمی یا غیر آنزیمی استفاده می‌کنند (۱۹). بر اساس نتایج حاصل از پژوهش حاضر مشخص گردید در مواجهه با تنش آرسنیک، فعالیت سیستم آنتی‌اکسیدانی گیاه اسفناج، به عنوان یک سیستم دفاعی در برابر تنش اکسیداتیو ناشی از تنش فلز سنگین آرسنیک، افزایش یافته و در نتیجه 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 به عنوان یک حفاظت کننده سلولی ایفای نقش می‌کند و سوپراکسید را به پراکسید هیدروژن و اکسیژن مولکولی تبدیل می‌کند (۲۷). نتایج پژوهش حاضر نیز بیان‌کننده این موضوع بود به طوری که در گیاهان اسفناج رشد یافته تحت شرایط تنش آرسنیک، میزان فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانی سوپراکسیددیسموتاز به طور معنی داری 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 در نتیجه میزان تولید رادیکال بسیار فعال و آسیب‌زای OH^\cdot 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 آنٹی‌اکسیدان‌های شناخته شده، است. به دلیل توانایی این آنزیم آنٹی‌اکسیدانی در اکسیداسیون گوایکول، این آنٹی‌اکسیدان 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 آنٹی‌اکسیدانی را تحت شرایط تنش فلز سنگین آرسنیک نشان داد (جدول ۵). در واقع به دنبال 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 آنٹی‌اکسیدانی 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 می‌باشد که در نهایت منجر به پراکسیداسیون لیپید و تخریب غشا می‌شود (۱۷). در پژوهش حاضر نیز به دنبال تنش فلز سنگین آرسنیک، غلظت ROS ها از جمله H_2O_2 افزایش یافت و به دنبال آن غلظت مالون دی‌آلدئید نیز زیاد شد که منجر به تخریب غشا گردید (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، می‌باشد. در نتیجه پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع، مالون دآلدئید (MDA) و سایر آلدئیدهای غیراشباع تولید می‌گردند که این ترکیبات ثانویه آلدئیدی حاصل از پراکسیداسیون لیپیدها به‌طورمعمول به عنوان 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 در نتیجه افزایش تولید مالون دآلدئید و نشت یونی گردیده است (۲۱، ۲۵). نتایج به‌دست‌آمده از پژوهش حاضر بیانگر این موضوع بود که به‌عنوان یک سازوکار مقاومت به تنش، میزان اسمولیت‌های سازگار از جمله 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 ماکرومولکول‌های داخل سلول است. علاوه بر این، اسمولیت‌ها ترکیبات سلولی را از آسیب ناشی این مقاله نهایی نیست و پس از ویراستاری تغییراتی خواهد داشت.

نشریه تولید و فراوری محصولات زراعی و باغی

از دست رفتن آب (دهیدراتاسیون) محافظت می‌کند. از این رو اسمولیت‌ها را به‌عنوان محافظ اسمزی نیز معرفی می‌کنند. اسمولیت‌ها اغلب هیدروفیل بوده و جایگزین آب در سطح پروتئین‌ها، کمپلکس‌های پروتئینی یا غشاها شده 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 اسیدآمینو پرولین در پاسخ به تنش‌های مختلف محیطی از جمله 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 می‌باشد (۱ و ۲۹). مشابه نتایج پژوهش حاضر (جدول ۳)، افزایش تجمع مواد قندی در گیاه در مواجهه با تنش‌های مختلف محیطی گزارش شده است (۱، ۴، ۲۹، ۳۳ و ۳۹). افزایش غلظت قندها علاوه بر اینکه موجب منفی‌تر شدن پتانسیل اسمزی در سیتوپلاسم می‌شود، به جداسازی Na^+ در واکوئول نیز کمک نموده و موجب تنظیم اسمزی می‌شود. علاوه بر این، کربوهیدرات‌ها به‌عنوان محافظ اسمزی غشاها و پروتئین‌ها می‌توانند عمل نموده و موجب جاروب کردن رادیکال‌های آزاد اکسیژن گردند (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 در نتیجه مانع تخریب غشا می‌گردند (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 گردید. 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 در نتیجه کاهش پراکسیداسیون لیپیدهای غشا، کاهش میزان مالون دآلدئید و پراکسیدهدروژن (جدول ۴) گردید. همچنین افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را به دنبال داشت (جدول ۵). در راستای تأیید نتایج از پژوهش حاصل، اگرچه تأثیر مثبت کاربرد سالیسیلیک اسید، براسینواستروئید در تعدیل اثرات سوء فلزات سنگین (۷، ۱۴، ۱۷، ۳۱ و ۳۷) گزارش شده است، اما در زمینه کاربرد هم‌زمان هورمون‌های گیاهی (سالیسیلیک اسید و براسینواستروئید) کمتر گزارشی

منتشر شده است. بر اساس نتایج حاصل از پژوهش حاضر مشخص گردید استفاده هم‌زمان از هورمون‌های گیاهی، تأثیر بیشتری در مقایسه با کاربرد تکی هر کدام از این هورمون‌ها بر روی بهبود فرایندهای فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و زیست توده اسفناج داشت. در تحقیقی بر روی گیاه نخود، مشخص گردید 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 به عنوان 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 در نتیجه افزایش وزن تر و خشک ریشه و ساقه این گیاه گردید (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 مواجهه 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 می‌گردد)، 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 گردیده 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 می‌گردد که در نتیجه 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 می‌باشد (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 به همراه داشت و کاربرد این تنظیم‌کننده‌ها موجب کاهش انتقال فلز سنگین آرسنیک از ریشه به برگ گیاه گردید، اما مکانیسم‌های فیزیولوژیکی و مولکولی چگونگی تأثیر این مقاله نهایی نیست و پس از ویراستاری تغییراتی خواهد داشت.

تنظیم کننده‌ها بر میزان انتقال و جذب آرسنیک مورد ارزیابی قرار نگرفت. بنابراین پیشنهاد می‌گردد 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 به صورت 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 گردید و در نتیجه افزایش ماده خشک 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 قابل ملاحظه‌تری داشتند.

سپاسگزاری

بدین وسیله از مرکز تحقیقات تغذیه دانشگاه علوم پزشکی شیراز بابت حمایت‌های مالی جهت اجرای طرح با شماره ۹۹-۰۱-

۲۳۵۶۳-۸۷ تقدیر به عمل می‌آید.

منابع

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. In book: *Co-Evol. Sec. Metabol* pp: 869-895.
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 interaction 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.
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*.
21. Maqsood, M. F., M. Shahbaz, U. Zulfiqar, R. U. Saman, A. Rehman, N. Naz, M. Akram and Haider, F. U. 2023. Enhancing Wheat Growth and Yield through Salicylic Acid-Mediated Regulation of Gas Exchange, Antioxidant 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* 424.
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.

Evaluation the effect of salicylic acid and brassinosteroid on some physiological traits and arsenic accumulation in spinach under arsenic stress conditions

Kobra Maghsoudi¹, Elham Ashrafi Dehkordi² and Seyed Mohammad Mazloomi^{3*}

1-Graduate University of Advanced Technology, Kerman. And Researcher, Nutrition Research Center, Department of Food Hygiene and Quality Control, School of Nutrition and Food Sciences, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran. 2- Researcher, Nutrition Research Center, Department of Food Hygiene and Quality Control, School of Nutrition and Food Sciences, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran. 3- Professor, Nutrition Research Center, Department of Food Hygiene and Quality Control, School of Nutrition and Food Sciences, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.

*Corresponding author: smmazloomi@gmail.com

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. The experimental factors included salicylic acid (0, 0.5, and 0.75 mM), brassinosteroid (0, 0.5, and 0.75 μ M), and arsenic stress (0, 50, and 100 μ M). Arsenic stress, especially at 100 μ M, reduced photosynthetic rate, transpiration, stomatal conductance of spinach leaves and biomass. Arsenic stress increased amount of malondialdehyde, hydrogen peroxide, osmolyte concentrations, as well as antioxidant enzyme activities in spinach plants. Application of brassinosteroid and salicylic acid significantly increased activities of antioxidant enzymes (peroxidase, ascorbate peroxidase, and superoxide dismutase), osmolyte accumulation (carbohydrates and proline) and spinach biomass; in contrast, application of brassinosteroid and salicylic acid decreased the levels of malondialdehyde and hydrogen peroxide in spinach plants under arsenic stress conditions. Arsenic accumulation was higher in spinach roots than in leaves. Under 100 μ M 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 observed in the treatment of 0.75 mM salicylic acid + 0.75 μ M brassinosteroid. Overall, concluded that brassinosteroid and salicylic acid application increased the tolerance of spinach plants against arsenic stress by improving gas exchange, increasing the activity of antioxidant enzymes, increasing the accumulation of osmolytes, maintaining the stability of the membrane and in resulted increasing biomass; however, 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.

پایان کار

نشریه تولید و فراوری محصولات زراعی و باغی

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

| میانگین مربعات | | | | | | | | | | | | | درجه آزادی | منابع تغییرات |
|---------------------|---------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|---------------------|----------------------|---------------------|------------------------|----------------------|----------------------|------------|--|
| میزان آرسنیک ریشه | میزان آرسنیک برگ | پراکسیداز | سوپراکسید دیسموتاز | آسکوربات پراکسیداز | ماده خشک | پراکسید هیدروژن | مالون دالدئید | کربوهیدرات‌های محلول | پروتئین | هدایت روزنای | سرعت تورق | میزان فنولستر | | |
| ۵۳/۰۱ ^{NS} | ۶۰/۱۱ ^{NS} | ۷۰۵/۶۳ ^{NS} | ۸۷۵/۴۳ ^{NS} | ۸۱/۷۸ ^{NS} | ۱۰۱/۴۵ ^{NS} | ۳۶۶/۰۸ ^{NS} | ۲۰/۱۱ ^{NS} | ۲۷۱/۲۸ ^{NS} | ۷۱/۳۵ ^{NS} | ۱۴۰/۱/۶۵ ^{NS} | ۵۷۸/۲۸ ^{NS} | ۳۲۸/۵۴ ^{NS} | ۳ | تکرار |
| ۱۰۰/۶۴* | ۹۱/۵۴* | ۱۵۴۲/۲۷* | ۲۴۵۱/۳۸** | ۱۲۸/۶۵ ^{NS} | ۱۸۲/۱۴* | ۶۸۷/۳۶* | ۸۴/۵۴** | ۵۷۰/۴۵* | ۱۱۱/۶۴* | ۱۸۸۲/۶۸* | ۱۰۰۸/۵۸* | ۸۴۲/۶۴* | ۲ | سالیسیلیک اسید |
| ۱۸۷/۴۷** | ۹۰/۰۷* | ۲۴۱۰/۸۵** | ۱۶۸۷/۱۸* | ۹۷/۳۱ ^{NS} | ۱۰۹/۱۲* | ۱۰۰۲/۵۶** | ۴۷/۳۸* | ۹۰۱/۶۴** | ۱۱۴/۳۵* | ۱۸۰۹/۴۸* | ۱۶۹۸/۳۶** | ۸۱۳/۷۳* | ۲ | براسینواستروئید |
| ۹۹/۳۶* | ۱۱۰/۳۶** | ۱۳۶۸/۶۱* | ۱۸۷۵/۵۲* | ۹۱/۴۱ ^{NS} | ۲۸۵/۶۳** | ۹۸۷/۷۶** | ۸۰/۷۸* | ۵۹۱/۸۴* | ۱۷۸/۷۸** | ۲۱۸۵/۷۲** | ۱۸۰۱/۱۲** | ۱۴۶۵/۳۸** | ۲ | آرسنیک |
| ۱۰۸/۳۴* | ۹۰/۰۹* | ۲۰۰۰/۰۱** | ۱۵۳۴/۳۷* | ۹۸/۴۸ ^{NS} | ۲۴۱/۴۱** | ۵۷۹/۰۸* | ۵۴/۵۲* | ۶۰۰/۳۲* | ۱۲۱/۷۸* | ۲۲۴۱/۱۸** | ۱۲۰۰/۳۶* | ۸۷۰/۱۰* | ۴ | سالیسیلیک اسید* براسینواستروئید |
| ۱۳۵/۰۸** | ۱۳۱/۲۵** | ۱۳۱۰/۵۲* | ۲۴۵۱/۵۴** | ۱۰۰/۹۵ ^{NS} | ۱۸۴/۴۸* | ۷۸۵/۱۳* | ۴۴/۱۲* | ۸۸۱/۷۵** | ۱۰۱/۵۸* | ۱۸۰۴/۷۳* | ۱۱۳۵/۷۴* | ۱۴۰۱/۶۴** | ۴ | سالیسیلیک اسید* آرسنیک |
| ۲۱۲/۴۱** | ۹۷/۳۲* | ۲۸۷۴/۷۸** | ۱۸۹۷/۳۹* | ۱۱۲/۷۵ ^{NS} | ۱۶۷/۳۹* | ۱۲۴۵/۷۱** | ۴۰/۷۵* | ۵۸۹/۱۴* | ۱۰۹/۳۵* | ۱۶۸۷/۴۱* | ۱۳۴۲/۶۴* | ۱۳۱۲/۴۵** | ۴ | براسینواستروئید* آرسنیک |
| ۲۰۷/۵۲** | ۱۰۱/۵۲** | ۱۸۷۲/۳۵* | ۲۰۴۸/۹۱** | ۷۸/۴۲ ^{NS} | ۱۶۱/۸۸* | ۱۷۶۱/۸۵** | ۶۵/۸۷** | ۸۷۶/۴۵** | ۱۱۲/۳۶* | ۱۷۶۱/۴۵* | ۱۷۵۴/۸۹** | ۱۳۲۴/۱۵** | ۸ | سالیسیلیک اسید* براسینواستروئید* آرسنیک |
| ۸۱/۳۶ | ۶۵/۲۳ | ۹۸۷/۴۵ | ۱۳۸۷/۶۴ | ۱۳۲/۳۱ | ۱۲۱/۳۵ | ۳۸۷/۷۸ | ۳۲/۵۴ | ۴۲۵/۶۴ | ۸۷/۴۴ | ۱۴۲۱/۳۵ | ۷۶۵/۸۱ | ۶۵۴/۲۳ | ۷۸ | خطا |

NS: * و ** به ترتیب اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۱٪، ۵٪ و غیر معنی دار

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

| هدایت روزنه‌ای (mmol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹) | | | سرعت تعرق (mmol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹) | | | میزان فتوسنتز (μmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹) | | | Br | آرسنیک (μM) |
|--|---------------------|---------------------|---|--------------------|--------------------|--|---------------------|---------------------|---------|----------------|
| 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 | | |
| ۲۶۲/۳۲ ^b | ۲۶۱/۰۷ ^b | ۲۶۰/۱۲ ^b | ۹/۲۱ ^b | ۹/۳۲ ^b | ۹/۳۲ ^b | ۱۶/۳۲ ^{ab} | ۱۶/۶۸ ^a | ۱۵/۳۱ ^b | . | . |
| ۲۶۱/۲۲ ^b | ۲۵۹/۲۲ ^b | ۲۶۱/۳۴ ^b | ۱۰/۲۲ ^a | ۱۰/۲۱ ^a | ۱۰/۱۱ ^a | ۱۷/۳۱ ^a | ۱۷/۰۲ ^a | ۱۶/۱۵ ^{ab} | ۰/۵ μM | . |
| ۲۷۵/۶۶ ^a | ۲۷۸/۴۵ ^a | ۲۷۴/۴۲ ^a | ۱۰/۱۰ ^a | ۱۰/۳۰ ^a | ۱۰/۱۴ ^a | ۱۷/۴۱ ^a | ۱۷/۴۱ ^a | ۱۷/۱۱ ^a | ۰/۷۵ μM | . |
| ۲۳۱/۲۰ ^d | ۲۳۳/۵۶ ^d | ۲۲۵/۲۱ ^e | ۷/۴۸ ^c | ۷/۱۴ ^c | ۶/۱۰ ^d | ۱۰/۵۳ ^e | ۱۰/۶۵ ^e | ۹/۶۱ ^f | . | . |
| ۲۳۲/۱۸ ^d | ۲۳۴/۱۰ ^d | ۲۳۵/۰۸ ^d | ۷/۶۶ ^c | ۷/۵۶ ^c | ۷/۴۲ ^c | ۱۲/۷۸ ^c | ۱۲/۳۶ ^{cd} | ۱۰/۶۸ ^e | ۰/۵ μM | ۵۰ |
| ۲۴۸/۸۸ ^c | ۲۴۹/۸۹ ^c | ۲۴۹/۸۹ ^c | ۷/۷۲ ^c | ۷/۵۲ ^c | ۷/۴۲ ^c | ۱۳/۳۱ ^c | ۱۳/۳۶ ^c | ۱۱/۳۴ ^{de} | ۰/۷۵ μM | . |
| ۲۰۶/۸۷ ^g | ۲۰۷/۳۲ ^g | ۱۹۱/۸۳ ^h | ۵/۱۶ ^{de} | ۵/۲۱ ^{de} | ۴/۸۵ ^f | ۷/۷۴ ^g | ۷/۳۱ ^g | ۵/۱۳ ^h | . | . |
| ۲۰۷/۲۳ ^g | ۲۰۶/۴۵ ^g | ۲۰۴/۱۱ ^g | ۷/۱۸ ^c | ۷/۱۸ ^c | ۷/۱۰ ^c | ۹/۶۷ ^f | ۹/۴۵ ^f | ۶/۷۴ ^{gh} | ۰/۵ μM | ۱۰۰ |
| ۲۱۶/۹۲ ^f | ۲۱۶/۱۲ ^f | ۲۱۶/۶۵ ^f | ۷/۱۳ ^c | ۷/۱۲ ^c | ۷/۲۲ ^c | ۹/۴۲ ^f | ۹/۴۱ ^f | ۷/۷۷ ^g | ۰/۷۵ μM | . |

برای هر صفت، حروف مشترک نشان‌دهنده عدم وجود تفاوت معنی‌دار در سطح ۵٪ بر اساس آزمون دانکن می‌باشد.

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

| کربوهیدرات‌های محلول (mg g ⁻¹ DW) | | | پرولین (mg g ⁻¹ FW) | | | Br | آرسنیک (μM) |
|---|---------------------|--------------------|-----------------------------------|--------------------|--------------------|---------|----------------|
| SA ۰ | SA ۰/۵ mM | SA ۰/۷۵ mM | SA ۰ | SA ۰/۵ mM | SA ۰/۷۵ mM | | |
| ۴۳/۱۲ ^k | ۴۲/۱۱ ^k | ۴۳/۱۱ ^k | ۲/۳۲ ^{gh} | ۲/۵۶ ^g | ۲/۵۰ ^g | . | . |
| ۴۸/۱۰ ^j | ۴۷/۱۰ ^j | ۴۸/۰۳ ^j | ۲/۶۴ ^g | ۳/۰۸ ^f | ۳/۱۱ ^f | ۰/۵ μM | . |
| ۴۷/۱۰ ^j | ۴۷/۱۲ ^j | ۵۱/۲۱ ⁱ | ۲/۹۴ ^g | ۳/۱۵ ^f | ۳/۱۵ ^f | ۰/۷۵ μM | . |
| ۵۲/۱۲ ⁱ | ۵۷/۴۵ ^h | ۵۷/۰۲ ^h | ۴/۱۲ ^e | ۵/۱۴ ^d | ۵/۱۰ ^d | . | . |
| ۵۷/۶۵ ^h | ۶۳/۳۲ ^{fg} | ۶۶/۴۱ ^f | ۵/۰۷ ^d | ۵/۸۵ ^{bc} | ۵/۸۶ ^{bc} | ۰/۵ μM | ۵۰ |
| ۶۱/۴۵ ^g | ۶۲/۰۸ ^{fg} | ۶۵/۱۶ ^f | ۵/۰۸ ^d | ۵/۸۸ ^{bc} | ۶/۰۴ ^b | ۰/۷۵ μM | . |
| ۵۸/۱۴ ^h | ۶۷/۵۱ ^f | ۷۱/۸۰ ^e | ۵/۵۴ ^{cd} | ۶/۱۰ ^b | ۶/۳۰ ^b | . | . |
| ۷۴/۱۲ ^d | ۸۳/۲۱ ^a | ۸۴/۱۴ ^a | ۶/۱۱ ^b | ۷/۱۲ ^a | ۷/۱۱ ^a | ۰/۵ μM | ۱۰۰ |
| ۷۸/۵۳ ^c | ۸۳/۴۱ ^a | ۸۵/۰۰ ^a | ۶/۰۸ ^b | ۷/۱۰ ^a | ۷/۱۳ ^a | ۰/۷۵ μM | . |

برای هر صفت، حروف مشترک نشان‌دهنده عدم وجود تفاوت معنی‌دار در سطح ۵٪ بر اساس آزمون دانکن می‌باشد.

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

| ماده خشک اسفناج (گرم در بوته) | | | پراکسید هیدروژن ($\mu\text{mol g}^{-1}$ FW) | | | مالون دآلدئید (nmol g ⁻¹ FW) | | | Br | آرسنیک (μM) |
|----------------------------------|---------------------|--------------------|---|--------------------|--------------------|--|--------------------|--------------------|--------------------|-----------------------------|
| SA ° | SA °/۵ mM | SA °/۷۵ mM | SA ° | SA °/۵ mM | SA °/۷۵ mM | SA ° | SA °/۵ mM | SA °/۷۵ mM | | |
| ۱۷/۴ ^b | ۱۸/۵ ^a | ۱۸/۵ ^a | ۱۱/۰۲ ^h | ۱۱/۱۰ ^h | ۱۱/۰۰ ^h | ۵/۲۱ ^g | ۵/۲۴ ^g | ۵/۱۰ ^g | ° | ° |
| ۱۷/۵ ^b | ۱۸/۴ ^a | ۱۸/۳ ^a | ۱۱/۲۵ ^h | ۱۱/۰ ^h | ۱۱/۲۱ ^h | ۵/۰۰ ^{gh} | ۵/۱۰ ^g | ۵/۰۰ ^{gh} | °/۵ μM | |
| ۱۷/۸ ^{a,b} | ۱۸/۳ ^a | ۱۸/۴ ^a | ۱۰/۰ ^h | ۱۰/۰۲ ^h | ۱۰/۲۲ ^h | ۴/۰۰ ^h | ۴/۰۲ ^h | ۴/۰۰ ^h | °/۷۵ μM | |
| ۱۳/۰۶ ^{ef} | ۱۵/۷ ^{cd} | ۱۵/۴ ^d | ۲۵/۲۳ ^c | ۱۹/۳۲ ^c | ۱۹/۰۴ ^c | ۱۱/۳۲ ^{cd} | ۸/۵۲ ^c | ۸/۱۰ ^c | ° | ۵° |
| ۱۵/۸ ^{cd} | ۱۵/۷ ^{cd} | ۱۶/۰۲ ^c | ۱۹/۰۰ ^e | ۱۷/۲۳ ^f | ۱۶/۱۲ ^f | ۸/۲۱ ^e | ۷/۰۱ ^{ef} | ۷/۰۰ ^{ef} | °/۵ μM | |
| ۱۵/۸ ^{cd} | ۱۶/۰۱ ^c | ۱۶/۱۰ ^c | ۱۷/۰۱ ^f | ۱۴/۲۵ ^g | ۱۴/۳۲ ^g | ۷/۰۰ ^{ef} | ۶/۰۱ ^{fg} | ۶/۰۰ ^{fg} | °/۷۵ μM | |
| ۱۰/۱۰ ^h | ۱۲/۲۴ ^{fg} | ۱۳/۰۱ ^f | ۳۵/۵۴ ^a | ۲۹/۱۲ ^b | ۲۹/۰۰ ^b | ۱۷/۹۵ ^a | ۱۴/۰۰ ^b | ۱۴/۰۰ ^b | ° | ۱۰۰ |
| ۱۳/۱۰ ^{ef} | ۱۴/۲ ^{de} | ۱۴/۲ ^{de} | ۲۸/۱۰ ^b | ۲۶/۰۰ ^c | ۲۶/۱۱ ^c | ۱۴/۰۱ ^b | ۱۲/۴۵ ^c | ۱۲/۲۰ ^c | °/۵ μM | |
| ۱۴/۱۰ ^e | ۱۵/۱۰ ^d | ۱۵/۰۴ ^d | ۲۵/۰۰ ^c | ۲۲/۰۸ ^d | ۲۲/۱۰ ^d | ۱۲/۳۲ ^c | ۱۰/۸۵ ^d | ۱۰/۵۴ ^d | °/۷۵ μM | |

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

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

| پراکسیداز (U/mg protein) | | | سوپراکسیددیسموتاز (U/mg protein) | | | آسکوربات پراکسیداز (U/mg protein) | | | Br | آرسنیک (μM) |
|-----------------------------|---------------------|---------------------|-------------------------------------|---------------------|---------------------|--------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-----------------------------|
| SA ° | SA °/۵ mM | SA °/۷۵ mM | SA ° | SA °/۵ mM | SA °/۷۵ mM | SA ° | SA °/۵ mM | SA °/۷۵ mM | | |
| ۳۰/۱۵ ⁱ | ۲۹/۰۵ ⁱ | ۳۰/۷۸ ⁱ | ۸/۱۴ ^f | ۸/۰۰ ^f | ۸/۳۲ ^f | ۳/۰۰ ^{ab} | ۲/۸۹ ^{ab} | ۳/۰۰ ^{ab} | ° | |
| ۳۱/۲۴ ⁱ | ۲۹/۰۵ ⁱ | ۲۹/۸۷ ⁱ | ۹/۲۳ ^{de} | ۹/۰۲ ^{ef} | ۹/۴۱ ^{de} | ۲/۹۶ ^{ab} | ۳/۰۶ ^{ab} | ۳/۰۰ ^{ab} | °/۵ μM | ° |
| ۳۰/۸۴ ⁱ | ۳۴/۴۵ ^h | ۳۴/۸۱ ^h | ۱۰/۱۱ ^d | ۱۰/۱۰ ^d | ۱۰/۴۲ ^d | ۳/۰۰ ^{ab} | ۳/۰۰ ^{ab} | ۳/۰۱ ^{ab} | °/۷۵ μM | |
| ۴۳/۳۲ ^g | ۵۲/۲۸ ^e | ۵۸/۲۸ ^c | ۱۰/۰۱ ^d | ۱۱/۳۲ ^c | ۱۱/۰۸ ^{cd} | ۳/۷۱ ^a | ۳/۷۲ ^a | ۳/۵۴ ^a | ° | |
| ۵۶/۱۰ ^d | ۵۹/۱۵ ^{bc} | ۵۹/۵۵ ^b | ۱۲/۲۵ ^b | ۱۲/۸۱ ^{ab} | ۱۲/۰۹ ^{bc} | ۳/۴۴ ^a | ۳/۸۷ ^a | ۳/۸۸ ^a | °/۵ μM | ۵° |
| ۵۶/۴۳ ^d | ۵۹/۸۹ ^b | ۵۹/۱۶ ^{bc} | ۱۲/۸۱ ^{ab} | ۱۳/۵۱ ^a | ۱۳/۵۴ ^a | ۳/۵۴ ^a | ۳/۴۵ ^a | ۳/۵۵ ^a | °/۷۵ μM | |
| ۵۱/۲۱ ^{ef} | ۵۹/۴۰ ^b | ۵۹/۸۴ ^b | ۱۱/۲۱ ^c | ۱۱/۱۴ ^c | ۱۱/۴۱ ^c | ۳/۷۸ ^a | ۳/۸۸ ^a | ۳/۷۵ ^a | ° | |
| ۶۰/۸۳ ^b | ۶۳/۹۲ ^a | ۶۳/۶۵ ^a | ۱۲/۴۲ ^b | ۱۲/۴۱ ^b | ۱۲/۵۶ ^b | ۳/۵۴ ^a | ۳/۴۸ ^a | ۳/۸۴ ^a | °/۵ μM | ۱۰۰ |
| ۶۰/۵۰ ^b | ۶۴/۲۱ ^a | ۶۳/۸۹ ^a | ۱۳/۴۱ ^a | ۱۳/۱۵ ^a | ۱۳/۷۸ ^a | ۳/۸۵ ^a | ۳/۸۵ ^a | ۳/۹۱ ^a | °/۷۵ μM | |

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

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

| میزان آرسنیک ریشه اسفناج (mg kg^{-1}) | میزان آرسنیک برگ اسفناج (mg kg^{-1}) | تیمار |
|---|--|---|
| (dry) | (dry) | |
| ۱۳/۳ ^a | ۹/۳۶ ^a | ۱۰۰ میکرومولار آرسنیک |
| ۱۱/۰۰ ^b | ۷/۲۰ ^b | ۰/۵ میکرومولار Br |
| ۱۱/۰۸ ^b | ۷/۱۵ ^b | ۰/۷۵ میکرومولار Br |
| ۱۱/۴۴ ^b | ۷/۸۲ ^b | ۰/۵ میلی مولار SA |
| ۱۱/۴۶ ^b | ۷/۳۵ ^b | ۰/۷۵ میلی مولار SA |
| ۹/۳۱ ^c | ۵/۱۴ ^c | ۰/۵ میلی مولار SA + ۰/۵ میکرومولار Br |
| ۹/۱۲ ^c | ۵/۷۱ ^c | ۰/۵ میلی مولار SA + ۰/۷۵ میکرومولار Br |
| ۹/۲۸ ^c | ۵/۰۰ ^c | ۰/۷۵ میلی مولار SA + ۰/۵ میکرومولار Br |
| ۷/۴۱ ^d | ۳/۳۳ ^d | ۰/۷۵ میلی مولار SA + ۰/۷۵ میکرومولار Br |

برای هر صفت، حروف مشترک نشان دهنده عدم وجود تفاوت معنی دار در سطح پنج درصد بر اساس آزمون دانکن می باشد.