مقاله پژوهشی

نشریه فیزیولوژی محیطی گیاهی، سال شانزدهم، شماره ۶۳، پاییز ۱۴۰۰ / صفحات: ۱۵-۱
Doi: 10.30495/iper.2021.679546 ***Dor: 20.1001.1.76712423.1400.16.63.6.8***

بررسی الگوی پروتئینی، سنجش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و میزان انباشتگی کادمیوم در گیاه آفتابگردان (*Helianthus annuus* L.) تحت تیمار کادمیوم و اسید سالیسیلیک

سکینه مرادخانی*

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه پیام نور(مرکز خوی) ، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۲/۰۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۵/۰۵

چکیده

در این تحقیق اثر برهم کنش کادمیوم به‌عنوان یک فلز سنگین و اسید سالیسیلیک به‌عنوان یک ماده آنتی‌اکسیدان و ضد تنش در گیاه آفتابگردان بررسی شد. بذرها پس از ضدعفونی با محلول هیپوکلریت سدیم یک درصد و شستشو با آب مقطر در گلدان‌های حاوی خاک ماسه در اتاق کشت، با دمای ۳٤ درجه سانتی‌گراد در روز و ۲۵ درجه سانتی‌گراد در شب و فتوپریود ١٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند. این پژوهش به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار در شرایط گلخانه ای انجام شد. گیاهان در مرحله دو برگی هر هفته در معرض تیمار کادمیوم (غلظت‌های ۰، ۵۰ ، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرومولار) قرارگرفتند. یک هفته پس از پایان تیمار کادمیوم، برگ گیاهان با اسید سالیسیلیک (غلظت‌های ۰، ۲۵۰، ۵۰۰ میکرومولار) اسپری شدند. بعد از برداشت، میزان کادمیوم در ریشه و اندام هوایی اندازه گیری شد. سپس سنجش آنزیم‌های آنتی اکسیدان انجام گرفت. پروتئین کل نمونه‌های برگی استخراج و بررسی الگوی تغییرات پروتئینی با استفاده از سیستم الکتروفورز به روش SDS-PAGE انجام شد. غلظت کادمیوم در ریشه و اندام هوایی با افزایش کادمیوم و اسید سالیسیلیک، افزایش یافت. فعالیت کاتالاز با افزایش میزان کادمیوم، کاهش و با افزایش اسید سالیسیلیک کاهش بسیار جزئی یافت. فعالیت آنزیم‌های سوپر اکسید دیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز با افزایش کادمیوم، افزایش و با افزایش اسید سالیسیلیک کاهش یافت. الکتروفورز پروتئین‌های برگ تحت تیمارهای کادمیوم و اسید سالیسیلیک نشان دهنده اختلافاتی در شدت نقاط پروتئینی برگ نسبت به گیاهان شاهد بود، به طوری که بیان برخی از پروتئین‌ها افزایش یا کاهش یافت. مطابق با نتایج این تحقیق تیمار کادمیوم و اسید سالیسیلیک میزان غلظت کادمیوم، فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان و الگوی پروتئین‌های برگ آفتابگردان را تغییر داد.

واژه‌های کلیدی: آسکوربات پراکسیداز، اسید سالیسیلیک، آفتابگردان (*Helianthus annuus* L.)، الکتروفورز، انباشتگی کادمیوم، پروتئین، سوپر اکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون ردوکتاز

مقدمه

آلودگی خاک با فلزات سنگین به یکی از مشکلات زیست محیطی عمده در جوامع بشری تبدیل شده است (Motesharezadeh et al., 2010). وجود مقادیر زیاد فلزات سنگین در خاک، فعالیت‌های زیستی و حاصلخیزی خاک را کاهش داده و در نتیجه باعث کاهش عملکرد، افت کیفیت محصولات و افزایش غلظت آنها در تولیدات کشاورزی می شود که برای سلامتی انسان یا دام مصرف کننده خطرناک می باشد (Das et al., 1998). در بین فلزات سنگین،

*نویسنده مسئول: moradkhani544@yahoo.com

کادمیم (Cd) دارای اهمیت ویژه ای است. کادمیوم عنصری غیرضروری و سمی برای گیاهان است که از طریق فرایندهای صنعتی، کودهای فسفاتی و رسوبات جوی وارد خاک‌های کشاورزی می شود. به سهولت از طریق ریشه گیاهان جذب می شود و سمیت آن برای گیاه ۲۰- ۲ برابر سایر فلزات سنگین می باشد و با غلظت‌هایی که برای زنجیره غذایی خطرناک است، در گیاه اندوخته می شود و از مهم ترین آلاینده‌های سمی برای انسان، حیوانات و گیاهان است (Wagner, 1993). تجمع کادمیم در بافت‌های گیاهی سبب آسیب‌های سلولی و بافتی می شود. کادمیوم میل ترکیبی شدیدی با گروه‌های سولفیدریل، هیدروکسیل و لیگاندهای حاوی نیتروژن دارد. در نتیجه این عنصر بسیاری از آنزیم‌های مهم را غیر فعال کرده که منجر به اختلال در فتوسنتز، تنفس، رشد و سایر فرایندهای متابولیک در گیاه می گردد (Torres et al., 2000).

یکی از روش‌های سمیت زدایی و کاهش مواد سمی از جمله فلزات سنگین در محیط‌های آلوده استفاده از گیاهان بیش انباشته گر است. در این فناوری با کشت گیاهان مناسب، نسبت به جذب فلز توسط گیاه و برداشت بخش هوایی گیاه و خارج کردن آن اقدام می‌شود (Lasat, 2002). امروزه شناسایی گیاهان بیش انباشته گر کادمیوم اهمیت بسیاری دارد، زیرا علاوه بر جنبه‌های زیست شناسی و مطالعات فیزیولوژیک، می توان از این گیاهان برای مطالعات اکولوژیک و بررسی شرایط تکامل این گیاهان و بررسی ژن‌های مؤثر در مقاومت به کادمیوم استفاده کرد. همچنین، بررسی مقادیر عناصر موجود در خاک و گیاهان رشد یافته در خا ک‌های آلوده، اطلاعات مهمی را برای کمک به فهم مکانیسم‌های فیزیولوژیک مقاوم به تنش‌های موجود در این خاک‌ها، فراهم می‌کند (Reeves et al., 2001).

آفتابگردان به دلیل رشد سریع و زیست توده بالا، گیاهی مناسب جهت جذب فلزات سنگین از خاک مناطقی که شدیداً به این فلزات آلوده هستند، به شمار می‌رود اما با توجه به سمیت بالا در این مناطق احتمال استقرار ضعیف گیاهان کاشته شده پیش بینی می شود و در نتیجه موجب کاهش کارایی فناوری گیاه پالایی می‌گردد (Jadia and Fulekar, 2008).

به نظر می‌رسد که گیاهان با مکانیسم‌های پیچیده‌ای در سطح کل گیاه، سطح سلولی و یا مولکولی به تنش پاسخ می‌دهند و در مواجه با تنش‌های زیستی و غیرزیستی دچار تغییرات بیوشیمیایی می‌شوند (Shi et al., 2009). یکی از اولین تغییرات بیوشیمیایی و سریع‌ترین پاسخ‌های دفاعی در گیاهان، تشکیل انواع گونه‌های اکسیژن فعال (ROS, Reactive oxygen species) و رادیکال‌های آزادی مانند سوپراکسید (O_2^-) و پراکسید هیدروژن H_2O_2 می‌شود (Shi et al., 2009). مکانیسم‌های حفاظتی آنتی‌اکسیدانتی در گیاهان برای مقابله با تنش اکسیداتیو و رادیکال‌های آزاد اکسیژن شامل القای چندین آنزیم آنتی‌اکسیدانی همانند کاتالاز (CAT, Catalase)، سوپراکسید دیسموتاز (SOD, Superoxidedismutase)، آسکوربات پراکسیداز (APX, Ascorbate peroxidase)، گلوتاتیون ردوکتاز (GR, Glutathione reductase) و دیگر سیستم‌های آنتی اکسیدانی می باشد (Deponte, 2013).

سوپراکسید دیسموتازها به عنوان اولین خط دفاعی در تبدیل رادیکال سوپراکسید به پراکسید هیدروژن عمل می‌کنند. در مرحله بعد پراکسید هیدروژن توسط آنزیم آسکوربات پراکسیداز در چرخه آسکوربات- گلوتاتیون در سیتوپلاسم یا دیگر بخش‌های سلول، از بین می‌رود. آنزیم پراکسیداز نقش مهمی در جاروب

کردن پراکسید هیدروژن دارد که این عمل با کمک اسید آسکوربیک به عنوان دهنده الکترون برای احیای پراکسید هیدروژن و تبدیل آن به آب انجام می‌گیرد (Romero-Puertas et al., 2007). کاتالاز آنزیم آنتی‌اکسیدان دیگری است که فعالیت آن پراکسید هیدروژن تولید شده در مسیرهای تنفس نوری داخل پراکسیزوم‌ها را مهار می‌کند و آن را تبدیل به آب می‌کند. گلوتاتیون ردوکتاز در سیتوپلاسم و کلروپلاست وجود دارد و با استفاده از NADPH، گلوتاتیون اکسید شده (GSSG) را به گلوتاتیون احیا شده (GSH) تبدیل می کند. گلوتاتیون احیا شده برای بسیاری از عملکردهای سلولی مورد نیاز است و باید دوباره تولید شود (Wang et al., 2006). از مکانیسم‌های دیگری که گیاهان ایجاد کرده اند تا از آسیب‌های ایجاد شده به وسیله کادمیوم ممانعت کنند، در ارتباط با تولید برخی مولکول‌های علامت رسان تنش، از جمله جاسمونات، اتیلن و ترکیب فنلی اسید سالیسیلیک (SA) است (Popova et al., 2009). اسید سالیسیلیک، یک ترکیب فنولی ساده است که نقش اساسی در تنظیم رشد و نمو گیاه و پاسخ گیاه به تنش محیطی دارد. از سوی دیگر، اسیدسالیسیلیک امروزه به عنوان یک مولکول کلیدی موثر در القای بیان ژن‌های PR (Pathogenesis-related protein) در طی پاسخ‌های دفاعی گیاه در نظر گرفته می شود و به عنوان یک مولکول علامت رسان مهم در پاسخ‌های گیاه به تنش‌های متعدد زیستی و غیر زیستی مانند تنش دمای پایین و بالا، ازن، اشعه UV، خشکی، شوری، علف کش‌ها و فلزات سنگین، دخالت دارد (Krantev et al., 2006). این مولکول، اثرات زیان آور اعمال شده توسط فلزات سنگین را کاهش می دهد. احتمال می رود SA بتواند با کادمیوم تشکیل یک کمپلکس داده و تعادل کادمیوم را در گیاه ایجاد کند (Metraux, 2001). این ماده با تأثیر بر آنزیم‌هایی مانند کاتالاز و پراکسیداز و تنظیم کننده‌های اسمزی مانند پرولین و گلیسین بتائین آثار ناشی از تنش‌ها را کاهش می‌دهد (Senaranta et al., 2002).

کاربرد تنظیم کننده‌های رشد به صورت برون زا، در بسیاری از موارد در کاهش آثار تنش‌ها مؤثر بوده است. مطالعات نشان می دهند که پیش تیمار اسید سالیسیلیک، سمیت کادمیوم موجود در جو (Metwally et al., 2003) و گیاهان ذرت را کاهش می‌دهد (Pal et al., 2002). همچنین این ترکیب، سنتز پروتئین‌های HSP (Heat Shock Protein) و فعال سازی برخی از پروتئین‌های کینازی را در کشت‌های تعلیقی مایع در گیاه توتون، تحت شرایط تنش اسمزی، القا می‌نماید(Burkhanova et al., 1999).

هدف از این مطالعه، بررسی تاثیر اسید سالیسیلیک در انباشتگی کادمیوم در گیاه آفتابگردان، سنجش آنزیم‌های آنتی اکسیدان و تغییرات الگوی پروتئین‌های برگ گیاه به روش SDS-PAGE تحت تنش کادمیوم می‌باشد. الکتروفورز ژل پلی اکریل آمید، روشی رایج و مهم در آزمایشگاه‌های تحقیقاتی جهت تعیین وزن ملکولی پروتئین‌ها می باشد. بنابراین، در این تحقیق، با توجه به خواص آنتی اکسیدان و نقش شبه هورمونی اسید سالیسیلیک، نقش این ترکیب بر تعدیل اثرات منفی تنش کادمیوم روی گیاه آفتابگردان مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

شرایط کشت گیاهان: بذرهای آفتابگردان رقم اوروفلور (Euroflor) از مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی شهرستان خوی تهیه شد. پس از ضدعفونی با محلول هیپوکلریت سدیم یک درصد، با آب مقطر شسته شدند و در گلدان‌های حاوی خاک ماسه در اتاق کشت، کاشته شدند. ابتدا خاک ماسه جهت حذف مواد موجود در خاک به خصوص بی

کربنات‌ها به مدت ۷۲ ساعت در HCL قرارداده شد. پس از شستشوی ماسه با آب مقطر (تا رسیدن به PH درحدود ۷/۲) و خشک کردن، خاک ماسه ای در گلدان‌ها ریخته شد. گلدان‌ها در شرایط محیط با دمای ۳٤ درجه سانتی‌گراد در روز و ۲۵ درجه سانتی‌گراد در شب و فتوپریود ۱٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند.

این پژوهش به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار(مجموعاً ٤۵ گلدان) در شرایط گلخانه ای انجام شد. گیاهان یک هفته پس از کاشت و با ظهور برگ‌های لپه ای، هر هفته یکبار با محلول هوگلند تغذیه شدند. گیاهان آفتابگردان وقتی به مرحله دو برگی رسیدند، ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول کلرید کادمیوم (شاهد، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرومولار) هر هفت روز به خاک گلدان‌های حاوی گیاهان ریخته شد(ابتدا قبل از شروع تیماردهی کادمیوم، ۹ گلدان به عنوان شاهد یا غلظت صفر کنار گذاشته شد، اولین تیمار ۵۰ میکرومولار در مرحله دو برگی برای ۳٦ گلدان اعمال شد. هفته دوم تیمار۱۰۰ میکرومولار برای ۲۷ گلدان، تیمار ۱۵۰ میکرومولار برای ۱۸ گلدان، تیمار ۲۰۰ میکرومولار برای ۹ گلدان اعمال شد). یک هفته پس از اتمام تیمار کادمیوم، تیمار با اسید سالیسیلیک (شاهد، ۲۵۰، ۵۰۰ میکرومولار) به‌صورت افشانه کردن برگی انجام شد. هفته اول، ابتدا قبل از شروع تیماردهی با اسید سالیسیلیک، از هر گروه تیمار کادمیوم (شاهد، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرومولار) ۳ گلدان به‌عنوان گروه‌های شاهد اسید سالیسیلیک کنار گذاشته شد (۱۵ گلدان). سپس برگ‌های گیاهان ۳۰ گلدان باقی مانده با اسید سالیسیلیک ۲۵۰ میکرومولار اسپری شدند و هفته دوم برگ‌های گیاهان ۱۵ گلدان با اسید سالیسیلیک۵۰۰ میکرومولار اسپری شدند. یک هفته پس از پایان آخرین تیماردهی، بوته‌ها برداشت شدند.

اندازه‌گیری غلظت کادمیم ریشه و اندام هوایی: بعد از برداشت گیاهان که تحت تیمار کادمیوم و اسید سالیسیلیک قرار گرفته بودند، بخش هوایی و ریشه گیاه به‌طور جداگانه برداشت و در آون با دمای ٦۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ٤۸ ساعت خشک شدند. یک گرم از نمونه، توزین و در کوره الکتریکی خاکستر شد. عصاره گیری با اضافه نمودن ۱۰ میلی‌لیتر کلریدریک اسید ۲ مولار و عبور دادن محلول از کاغذ صافی واتمن ٤۲ انجام گرفت (Westerman, 1990). در عصاره به‌دست آمده، میزان انباشتگی کادمیم در بخش هوایی و ریشه گیاهانی که تحت تیمار کادمیوم و اسید سالیسیلیک قرار گرفته بودند، با دستگاه جذب اتمی (مدل Avian, AA20) اندازه‌گیری شد.

سنجش فعالیت آنزیم‌ها

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT): فعالیت آنزیم کاتالاز بر اساس کاهش جذب پراکسید هیدروژن (H_2O_2) در۲٤۰ نانومتر اندازه گیری شد. عصارهٔ آنزیمی پس از پودر شدن نمونه‌ها در ازت مایع، در بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار (pH=۷) استخراج شده و به‌مدت ۱۰ دقیقه در g ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ گردید. برای سنجش فعالیت آنزیم غلظت مناسبی از عصاره به محلول واکنش شامل بافر فسفات۵۰ میلی‌مولار (pH=۷)، ۱۰ میلی‌مولار از H_2O_2 افزوده شده و تغییرات جذب به مدت دو دقیقه توسط اسپکتروفتومتر مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. در نهایت فعالیت آنزیم بر اساس ضریب خاموشی H_2O_2 (mM-1 cm-1 ۰/۰٤۱۱) بر حسب میکرومول پراکسیدهیدروژن / میلی‌گرم پروتئین/ دقیقه محاسبه گردید (Simon et al., 1974).

سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD): فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز بر اساس درصد ممانعت از احیای نیتروبلوتترازولیوم (NBT) به

ترکیب ارغوانی رنگ دیفورمازان بوسیلهٔ رادیکال سوپراکسید ($O_2^{\bullet-}$) حاصل از فتولیز ریبوفلاوین، توسط آنزیم موجود در عصاره مورد اندازه‌گیری قرار گرفت (Giannopolitis and Ries, 1977). نمونه‌ها بلافاصله پس از برداشت، در ازت مایع، پودر شده و عصارهٔ آنزیمی در بافر ۲۵ میلی‌مولار از هیدروکسی اتیل‌پیپرازین اتان سولفونیک اسید (HEPES) با Ph=۷/۸ و حاوی اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (EDTA) با غلظت ۰/۱ میلی‌مولار استخراج شد. عصاره‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۵۰۰۰g سانتریفوژ شده و روشناور برای سنجش فعالیت مورد استفاده قرار گرفت. ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره به یک میلی لیتر از محلول واکنشی شامل ۲۵ میلی‌مولار HEPES با pH =۷/٦ ، ۰/۱ میلی‌مولار EDTA، ۵۰ میلی‌مولار Na_2CO_3 (pH=۱۰/۲)، ۱۲ میلی‌مولار L – متیونین، ۷۵ میکرومولار NBTو ۱ میکرومولار ریبوفلاوین اضافه شده و مخلوط حاصل به مدت ۲۰ دقیقه در شدت نور ۸۰۰۰ لوکس به منظور انجام واکنش قرار گرفت. برای تهیه نمونه‌های شاهد، مخلوط فوق بدون افزودن عصارهٔ آنزیمی تهیه گردید و جذب نمونه‌ها در ٥٦٠ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد. یک واحد فعالیت آنزیم بر اساس غلظت پروتئین آنزیمی لازم برای القای ۵۰ درصد ممانعت از احیای NBT در مقایسه با نمونه‌های شاهد بدون عصارهٔ آنزیمی محاسبه شده و به صورت واحد / میلی‌گرم پروتئین بیان گردید.

سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX): برای سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز، مخلوط واکنش شامل ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره گیاه، بافر سیترات- فسفات ۲۵۰ میلی‌مولار (pH=۷)، آب اکسیژنه ۱/۲ میلی‌مولار، اسید آسکوربیک ۰/۵ میلی‌مولار و EDTA ۰/۱ میلی‌مولار، طوری که حجم نهایی ۲ میلی لیتر باشد، کاملاً مخلوط گردید. واکنش با اضافه کردن ۵ میکرولیتر آب اکسیژنه ۳۰ درصد به مخلوط واکنش شروع شد. جذب نور در طول ۲۹۰ نانومتر به مدت ۲ دقیقه با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. فعالیت آنزیم بر اساس واحد آنزیمی به ازای هر میلی‌گرم پروتئین برای تمام نمونه‌ها محاسبه و بیان گردید (Dazy et al., 2018).

سنجش فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتار (GR): ابتدا ۰/۱ گرم برگ نمونه درهاون چینی به وسیله نیتروژن مایع کاملاً پودر شده و سپس یک میلی لیتر بافر ۱۰۰ میلی‌مولار فسفات پتاسیم (pH=۷) حاوی دو میلی‌مولار EDTA به آن اضافه گردید. پس از یکنواخت کردن محلول به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ و سپس ۵۰ میکرولیتر از آن محلول رویی شناور برای اندازه گیری فعالیت آنزیم برداشت شد. مخلوط واکنش شامل بافر فسفات پتاسیم ۲۰۰ میلی‌مولار (pH=۷/۵)، گلوتاتیون اکسیدشده (GSSG) ۵۰۰ میکرومولار، NADPH ۵۰ میکرومولار، $MgCl_2$ ۱/۵ میلی‌مولار، Na_2EDTA ۰/۲ میلی‌مولار و ۵۰ میکرولیتر عصاره استخراج شده بود. پس از اضافه کردن آنزیم، مخلوط واکنش کاملاً به هم زده شد سپس کاهش جذب در طول موج ۳٤۰ نانومتر به‌مدت ۱۲۰ ثانیه توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. میزان NADPH مصرف شده با استفاده از ضریب خاموشی (ε= ٦/۲۲ Mm^{-1} cm^{-1}) محاسبه گردید. فعالیت آنزیم بر حسب واحد در دقیقه به ازای هر میلی‌گرم پروتئین بیان شد (Arora et al., 2002).

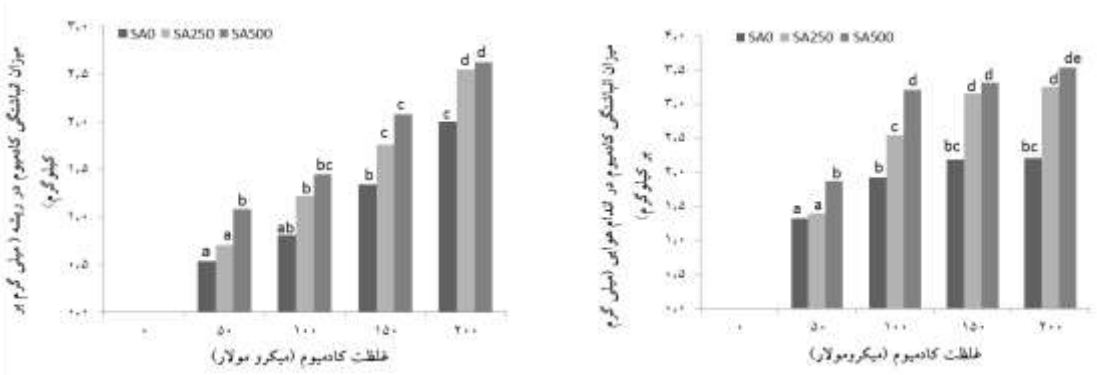
استخراج پروتئین‌های محلول برای انجام الکتروفورز: بر روی ۰/۱ گرم بافت تر، ۰/۸ میلی‌لیتر از بافر تریس- بوریک و ۰/۸ میلی‌لیتر ساکارز ٤۰ درصد اضافه گردید. نمونه له شده به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد. محلول رویی به‌عنوان عصاره پروتئینی استفاده گردید (Laemmli, 1970). در این تحقیق از ژل جدا کننده ۱۰ درصد و ژل

متراکم کننده ٦ ٪ با ترکیبی از بیس‌اکریل‌آمید: اکریل‌آمید، tris-HCl، SDS 20%، آب مقطر، APS 10%، TEMED استفاده گردید. برای آماده سازی عصاره‌های پروتئینی، نمونه‌های پروتئینی (به نسبت ۱:۱) با بافر نمونه (tris-HCl 1M، SDS 20%، گلیسرول، β – مرکاپتو اتانول، آبی بروموفنل) ترکیب و به مدت ۵ دقیقه جوشانده و ورتکس شدند. سپس به روی یخ منتقل شدند تا سرد شوند و با دور g ۵۱۵ به‌مدت ۱ دقیقه سانتریفوژ و در یخچال نگهداری شدند (Laemmli, 1970). سپس نمونه‌ها در چاهک‌ها تزریق گردید. الکتروفورز، با ولتاژ ۱۳۰ ولت به‌مدت ۱۵ دقیقه و با ولتاژ ۱۵۰ ولت به‌مدت ۸۰ دقیقه انجام گرفت. بعد از الکتروفورز، رنگ آمیزی ژل با آبی کوماسی انجام گرفت (٤ ساعت). سپس رنگ بری آن توسط محلول رنگ بر (متانول، اسیداستیک گلاسیال و آب مقطر) تا روشن شدن زمینه ژل ادامه یافت (Reed et al.,1998). عکس برداری از ژل در نور معمولی انجام شد. با اندازه‌گیری میزان حرکت رنگ بروموفنل و هر نوار پروتئینی از ابتدای ژل جدا کننده، حرکت نسبی (Relative Motion :Rm) هر پروتئین محاسبه شد. با استفاده از Rm پروتئین‌های استاندارد با وزن ملکولی معین، وزن ملکولی پروتئین‌های نمونه تعیین شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با آزمون ANOVA با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS V.18 انجام شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن و رسم نمودارها با استفاده از نرم افزار Excel انجام گرفت.

نتایج

غلظت کادمیم ریشه: اثر غلظت‌های مختلف کادمیم و اثر متقابل کادمیم و اسید سالیسیلیک بر میزان انباشتگی کادمیم در ریشه آفتابگردان در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد ($P< 0.01$). با افزایش غلظت کادمیوم و اسید سالیسیلیک، میزان این پارامتر نیز افزایش یافت. به طوری که در گیاهان تیمار شده با کادمیوم بدون اسید سالیسیلیک، میزان انباشتگی کادمیوم در ریشه به موازات افزایش غلظت کادمیوم تا ۲۰۰ میکرومولار افزایش یافت. بیشترین افزایش انباشتگی کادمیوم در ریشه مربوط به تیمار توأم (کادمیوم ۲۰۰ میکرومولار + اسید سالیسیلیک ۵۰۰ میکرومولار) بود (شکل ۱).

غلظت کادمیم اندام هوایی: اثر متقابل کادمیم و اسید سالیسیلیک بر میزان انباشتگی کادمیم در اندام هوایی آفتابگردان، در سطح احتمال یک درصد معنی دار شد ($P< 0.01$). غلظت کادمیم اندام هوایی با افزایش میزان کادمیم در خاک افزایش یافت. همچنین گیاهانی تیمار شده با اسید سالیسیلیک غلظت بیشتری از این فلز را در خود انباشته کردند. بیشترین افزایش انباشتگی کادمیوم در اندام هوایی مربوط به تیمار توأم کادمیوم ۲۰۰ میکرومولار + اسید سالیسیلیک ۵۰۰ میکرومولار بود (شکل ۱).



شکل ۱: مقایسه تاثیر بر هم کنش غلظت‌های مختلف کلرید کادمیوم اسید سالیسیلیک بر میزان انباشتگی کادمیوم در ریشه و اندام هوایی آفتابگردان به روش دانکن در سطح احتمال ۵ درصد.

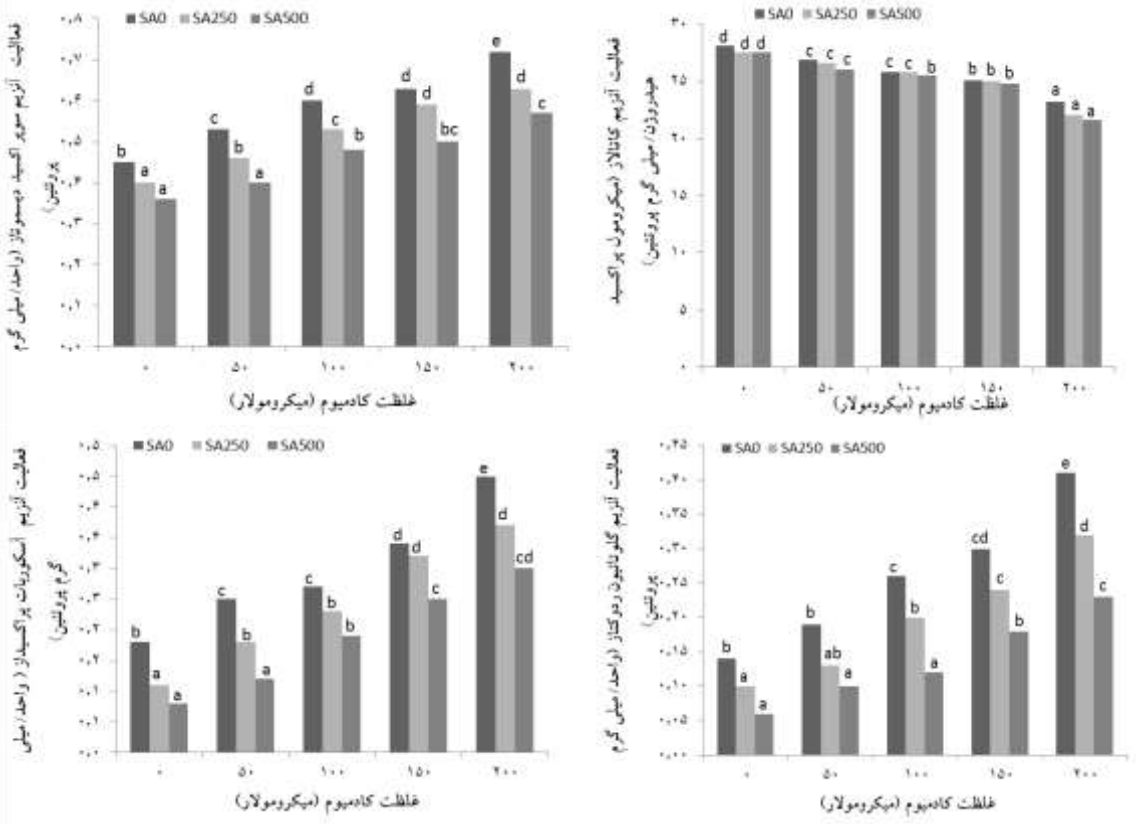
نتایج سنجش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان

نتایج سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز: اثر متقابل کادمیم و اسید سالیسیلیک بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در آفتابگردان، در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد (P<0.01). در تیمار گیاهان با غلظت‌های مختلف کادمیوم و اسید سالیسیلیک، با افزایش غلظت کادمیوم از میزان فعالیت آنزیم کاتالاز کاسته شد. اسید سالیسیلیک تأثیر چندانی بر روی فعالیت کاتالاز نداشت (باعث کاهش جزئی فعالیت آنزیم کاتالاز شد). کمترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز برگ آفتابگردان در تیمار توام کادمیوم ۲۰۰ میکرومولار و اسید سالیسیلیک ۵۰۰ میکرومولار (۱۳/۸۷ درصد کاهش نسبت به گیاهان شاهد) بود (شکل ۲).

نتایج سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز: اثر متقابل کادمیم و اسید سالیسیلیک بر میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در آفتابگردان، در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد (P<0.01). در تیمار گیاهان با غلظت‌های مختلف کادمیوم و اسید سالیسیلیک، با افزایش غلظت کادمیوم، میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز افزایش یافت. افزایش غلظت اسید سالیسیلیک باعث کاهش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز شد. کمترین میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در غلظت ۵۰۰ میکرومولار اسید سالیسیلیک، بدون حضور کادمیوم (۲۰ درصد کاهش نسبت به گیاهان شاهد) بود. بیشترین میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در غلظت ۲۰۰ میکرومولار کادمیوم بدون حضور اسید سالیسیلیک (٦٠ درصد افزایش نسبت به گیاهان شاهد) بود (شکل ۲).

نتایج سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز: اثر متقابل کادمیم و اسید سالیسیلیک بر میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در آفتابگردان، در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد (P<0.01). در تیمار گیاهان با غلظت‌های مختلف کادمیوم و اسید سالیسیلیک، با افزایش غلظت کادمیوم، میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز افزایش یافت. افزایش غلظت اسید سالیسیلیک باعث کاهش فعالیت آسکوربات پراکسیداز شد. کمترین میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در غلظت ۵۰۰ میکرومولار اسید سالیسیلیک، بدون حضور کادمیوم (۵۵/۵ درصد کاهش نسبت به گیاهان شاهد) بود. بیشترین میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در غلظت ۲۰۰ میکرومولار کادمیوم بدون حضور اسید سالیسیلیک (۱۵۰ درصد افزایش نسبت به گیاهان شاهد) بود (شکل ۲).

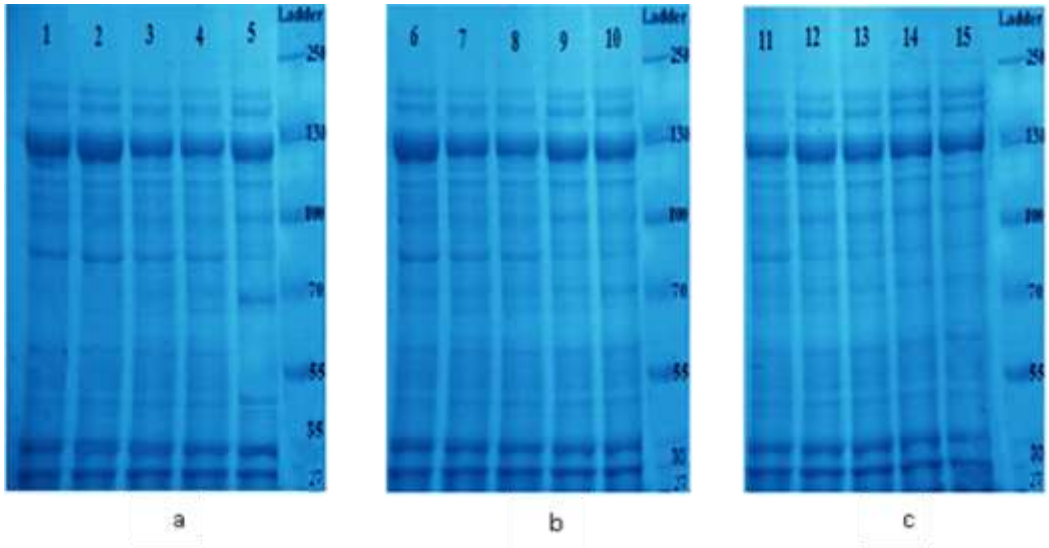
نتایج سنجش فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتار: اثر متقابل کادمیم و اسید سالیسیلیک بر میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتار در آفتابگردان، در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد (P<0.01). در تیمار گیاهان با غلظت‌های مختلف کادمیوم و اسید سالیسیلیک، با افزایش غلظت کادمیوم، میزان فعالیت گلوتاتیون ردوکتار افزایش یافت. افزایش غلظت اسید سالیسیلیک باعث کاهش فعالیت گلوتاتیون ردوکتار شد. کمترین میزان فعالیت گلوتاتیون ردوکتار در غلظت ۵۰۰ میکرومولار اسید سالیسیلیک، بدون حضور کادمیوم (۵۷/۱٤ درصد کاهش نسبت به گیاهان شاهد) بود. بیشترین میزان فعالیت گلوتاتیون ردوکتار در غلظت ۲۰۰ میکرومولار کادمیوم بدون حضور اسید سالیسیلیک (۱۹۲/۸۵ درصد افزایش نسبت به گیاهان شاهد) بود (شکل ۲).



شکل ۲: مقایسه فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، سوپر اکسید دیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز در تیمار توام کلرید کادمیوم و اسید سالیسیلیک به روش دانکن در سطح احتمال ۵ درصد.

نتایج حاصل از الکتروفورز پروتئین‌ها: برای بررسی نتایج حاصل از الکتروفورز پروتئین‌ها باید وزن مولکولی هر نوار تشکیل شده بر روی ژل الکتروفورز مشخص شود. وزن مولکولی نوارهای پروتئینی با توجه به استانداردهای وزن مولکولی پروتئین خالص برآورد شد. مطالعهٔ الکتروفورزی عصاره‌های پروتئینی برگ گیاه آفتابگردان به روش SDS-PAGE نشان داد که در پاسخ به تیمارهای کادمیوم و اسید سالیسیلیک، پلی پپتیدهایی حذف شدند، افزایش یافتند یا پدیدار شدند. به موازات افزایش غلظت کادمیوم تا ۲۰۰ میکرومول در لیتر، نوار پروتئینی۲۷، ۳۳، ٤٥ و ۷۰ کیلو دالتونی با شدت بیشتری پدیدار شد (شکل ۳).

به موازات افزایش تنش کادمیوم کاهش در شدت پدیدار شدن نوار پروتئینی با گسترهٔ وزن ملکولی ٥٦ کیلو دالتون مشاهده شد، در حالی که اسید سالیسیلیک تأثیر چندانی بر روی آن نداشت. با اعمال تیمار اسید سالیسیلیک در گیاهان آفتابگردان تحت تیمار کادمیوم، تغییراتی در نوارهای پروتئینی مشاهده شد. به این ترتیب که با افزایش غلظت اسید سالیسیلیک، کاهش در شدت ظهور نوار پروتئینی با گسترهٔ وزن ملکولی ۷۰ کیلو دالتون مشاهده شد. همچنین نتایج حاصل از الکتروفورز پروتئین‌های برگ گیاه آفتابگردان نشان داد که با افزایش غلظت اسید سالیسیلیک تا ۵۰۰ میکرومول در لیتر، نوارهای پروتئینی با گستره وزن ملکولی۲۷، ۳۳ و ٤٥ کیلو دالتون، کم رنگ تر پدیدار شدند (شکل ۳).



شکل۳: نتایج حاصل از الکتروفورز پروتئین‌های برگ گیاه آفتابگردان. a؛ ستون‌های شماره ۱ تا ۵ ژل به‌ترتیب مربوط به غلظت‌های ۰، ۵۰ ،۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرومولار کادمیوم بدون تیمار اسید سالیسیلیک (صفر میکرومولار) است. b ؛ ستون‌های شماره ٦ تا ۱۰ به ترتیب مربوط به غلظت‌های ۰، ۵۰ ،۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرومولار کادمیوم در حضور غلظت ۲۵۰ میکرومولار اسید سالیسیلیک است.c ؛ ستون‌های شماره ۱۱ تا ۱۵ به ترتیب مربوط به غلظت‌های ۰، ۵۰ ،۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرومولار کادمیوم در حضور غلظت ۵۰۰ میکرومولار اسید سالیسیلیک است.

بحث

میزان انباشتگی کادمیوم در گیاه: بررسی مقدار کادمیوم انباشته شده در بخش هوایی و ریشه گیاه آفتابگردان نشان داد که با افزایش تیمار کادمیوم، میزان انباشته کردن این عنصر توسط گیاه افزایش یافت. مقدار کادمیوم انباشته شده در بخش هوایی نسبت به ریشه بیشتر بود. نتایج مشابه توسط Rosa و همکاران (۲۰۰٤) در گیاه *Salsola kali* و Wojcik و همکاران (۲۰۰۵) در گیاه *Thlaspi caerulescens* به دست آمد. **همچنین** Mohtadi و Hoshyari (۲۰۱٦) گزارش کردند که مقدار کادمیوم انباشته شده در بخش هوایی گیاه *M. flavida* نسبت به ریشه بیشتر بود. بر این اساس کادمیوم توانایی قابل ملاحظه ای در انتقال از ریشه به اندام هوایی نشان داد (Motesharezadeh et al., 2010). همچنین Lu و همکاران (۲۰۰۸) مشاهده کردند که میزان انتقال کادمیوم در آوندهای چوبی از ریشه به ساقه گیاه *Sedum alfredii* بسیار بالا بود که این عمل در گیاهان بیش انباشته گردیده می شود. پس مشاهده انباشتگی زیاد کادمیوم در گیاه آفتابگردان به عنوان یک گیاه بیش انباشته گر، طبیعی به نظر می رسد. همچنین نتایج آزمایشات ما نشان داد، گیاهان تحت تیمار اسید سالیسیلیک غلظت بیشتری از این فلز را در خود انباشته کردند و در حضور اسید سالیسیلیک مقدار کادمیوم انباشته شده در بخش هوایی گیاه نسبت به ریشه بیشتر بود. نتیجه مشابه توسط Gondor و همکاران (۲۰۱٦) به دست آمده است. در سمی ترین غلظت کادمیم، اسید سالیسیلیک موجب افزایش غلظت کادمیم ریشه شد که دلیل آن را می توان به کاهش سمیت کادمیم توسط آن نسبت داد. اسید سالیسیلیک باعث تغییر در تعادل هورمون و غیر فعال سازی یون کادمیم و حذف این فلز از فرآیندهای متابولیکی و کاهش سمیت کادمیم با وجود افزایش غلظت آن می‌گردد (McDonald, 2000).

Khosravi(۲۰۱۰) گزارش داد که گیاه آفتابگردان می‌تواند به‌عنوان یک گیاه بیش اندوز در خاک‌های آلوده مورد استفاده قرار گیرد و تأثیر تیمارها بر افزایش مقدار فاکتور انتقال بیانگر تأثیر مثبت آنها بر افزایش کارآیی گیاه پالایی می باشد. با توجه به نتایج این تحقیق، گیاه آفتابگردان دارای مقاومت و قابلیت جذب و انباشتگی نسبتاً بالایی برای کادمیوم است که می تواند به علت مقاومت نسبتاً بالا و ژنتیکی این گیاه نسبت به کادمیوم باشد. نتایج مشابه توسط Eftekhar و همکاران (۲۰۱۹) در گیاه آفتابگردان (رقم رکورد) به دست آمد. Baker و همکارانش (۱۹۹٤) وجود این مقاومت ژنتیکی را برای چند گونه *Thlaspi* گزارش کردند.

سنجش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان: نتایج مطالعات ما نشان داد که مقدار آنزیم کاتالاز تحت تیمار کادمیوم کاهش یافت، اما مقادیر آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز افزایش یافت. Gallego و همکاران (۱۹۹٦) بیان کردند که کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز توسط کادمیوم می تواند ناشی از حمله گونه‌های اکسیژن القا شده توسط یون فلزی باشد. Leon و همکاران (۲۰۰۲) گزارش کردند که کاهش فعالیت کاتالاز می‌تواند در اثر اکسید شدن آن توسط کادمیوم باشد. تحقیقات نشان داده است که یک ارتباط قوی بین تحمل به تنش‌های اکسیداتیو که به دلیل تنش‌های محیطی ایجاد می شود و افزایش در غلظت آنزیم‌های آنتی اکسیدان در گیاهان فتوسنتزکننده وجود دارد (Mittler, 2002).

پژوهش‌ها نشان داده است که تغییر در بیان یا فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان می‌تواند گام مهمی در فعال سازی سیستم دفاعی گیاه در مواجه با عوامل تنش باشد. زیرا فعالیت سیستم آنتی اکسیدانی آنزیمی باعث کاهش رادیکال‌های آزاد اکسیژن و تنش اکسیداتیو شده و در نهایت موجب حفظ سلول در برابر تنش می‌شود (Peluffo et al., 2010).

آسکوربات پراکسیدار و سوپر اکسید دیسموتاز از آنزیم‌های آنتی اکسیدان می باشند که در فرایند تبدیل آنیون سوپر اکسید به پراکسید هیدروژن نقش دارند. در گیاه برنج مشاهده شده است که افزایش پراکسیدهیدروژن در شرایط تنش، باعث افزایش بیان ژن‌های آسکوربات پراکسیداز شده است. در گیاه آرابیدوپسیس نیز افزایش پراکسیدهیدروژن تحت تأثیر نور زیاد، سبب تغییراتی در انتقال الکترون در پلاستوکینون شد که احتمالاً این تغییر سبب القای ژن‌های مرتبط با آن می شود (Shigeru et al., 2002). نتایج مشابه توسط Cho و Sohn (2004) در گیاه *Arabidopsis thaliana* L. به دست آمد.

گلوتایتون ردوکتاز مسئول تبدیل گلوتاتیون اکسید شده (GSSG) به گلوتاتیون احیا شده (GSH) و حفظ نسبت بالای GSSG به GSH است. افزایش گلوتایتون ردوکتاز نسبت $NADP^+$/ NADPH را افزایش می‌دهد و به همین دلیل مقدار $NADP^+$ در دسترس به‌عنوان گیرنده نهایی الکترون در واکنش‌های نوری فتوسنتز افزایش می‌یابد و در نتیجه احتمال انتقال الکترون به اکسیژن و تولید رادیکال سوپر اکسید، پراکسید و هیدروکسیل را کاهش می دهد (Wang et al., 2006). نتایج مشابه از افزایش گلوتایتون ردوکتاز در اثر تیمار کادمیوم در عدس (Barandeh et al., 2014) و *Brassica juncea Triticum aestivum* (Eyidogan and Oz., 2005) مشاهده شد.

طبق نتایج بدست آمده اسید سالیسیلیک تأثیر چندانی بر روی فعالیت کاتالاز نداشت. در گیاهان دیگر، از قبیل گیاه برنج نیز نتایج مشابهی گزارش شده است (Jing et al., 2007). اسید سالیسیلیک باعث افزایش فعالیت سایر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان شد. در مطالعه ای که روی تیپ وحشی و جهش یافته

Arabidopsis صورت گرفت، سالیسیلیک اسید به عنوان برطرف کننده آسیب‌های اکسیداتیو معرفی شد (Metwally et al., 2003).

الکتروفورز پروتئین‌ها: مطالعهٔ الکتروفورزی عصاره‌های پروتئینی برگ آفتابگردان به روش SDS-PAGE نشان داد که تحت تنش کادمیوم نوار پروتئینی ٥٦ کیلو دالتونی که احتمالاً متعلق به آنزیم کاتالاز است، کم رنگ تر پدیدار شد. تیمار گیاه آفتابگردان با کادمیوم منجر به کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز و کاهش بیان پروتئین‌های مربوط به آن می‌شود. این نتایج نشان می‌دهند که کادمیم می‌تواند تغییرات پس از ترجمه پروتئین کاتالاز را پیش ببرد. اکسیدشدن کاتالاز که به‌عنوان نتیجه‌ای از تیمار کادمیوم است و پروتئین اکسیده شده که می‌تواند هدف پروتئاز ویژه پراکسی زوم باشد توسط Leon و همکاران (۲۰۰۲) گزارش شده است و می‌تواند کاهش فعالیت کاتالاز و محتوای پروتئین را توضیح دهد. نتایج مشابهی در گیاهان دیگر از قبیل گیاه نخود توسط Romero-Puertas و همکاران (۲۰۰۷) و در فلفل دلمه توسط Leon و همکاران (۲۰۰۲) به‌دست آمده‌اند. فعالیت کاتالاز تحت تیمار اسید سالیسیلیک کاهش بسیار جزئی داشت. در گیاهان دیگر، از قبیل گیاه برنج نیز نتایج مشابهی گزارش شده است (Jing et al., 2007).

همچنین نوار پروتئینی با وزن ملکولی ۷۰ کیلو دالتون، در این تیمارها، با شدت بیشتری پدیدار گردید. این پروتئین‌ها ممکن است در ارتباط با پروتئین‌های شوک گرمازا باشند. پروتئین‌های شوک گرمایی ضمن تنش‌های گرمایی، شوری، سرما و تنش فلزات سنگین پدیدار شده و به‌عنوان مولکول‌های چاپرونی عمل کرده و از تجمع پروتئین‌های دیگر جلوگیری نموده و در حفظ مارپیچ پروتئین‌ها در هنگامی که درجهٔ حرارت افزایش می‌یابد نقش بسزایی دارند (Snyman and Cronje, 2008).

همچنین در پروفایل پروتئینی گیاه آفتابگردان تحت تنش کادمیوم، نوارهای پروتئینی با گسترهٔ وزن ملکولی ۲۷، ۳۳ و ٤٥ کیلو دالتون، با شدت بیشتری پدیدار گردیدند. احتمالاً این نوارهای پروتئینی به‌ترتیب، مربوط به آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز باشند (Yannarelli et al., 2007). در گیاهان دیگر، از قبیل گیاه نخود، نتایج مشابهی به دست آمده است (Romero-Puertas et al., 2007). نتایج تحقیق Choو Sohn (۲۰۰٤) نشان داد که گیاهان وقتی در معرض کادمیم باشند، دارای فعالیت‌های بالاتری از سوپراکسید دیسموتاز و آنزیم‌های در ارتباط با حذف H_2O_2، مثل آسکوربات پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز می‌باشند که این امر سبب انباشتگی کمتر H_2O_2 در گیاهان مقاوم به کادمیم می‌شود. از نتایج این مقاله می‌توان دریافت که کادمیوم بر رشد و متابولیسم گیاهان تأثیر گذاشته، همچنین سبب تغییرات مهمی در بیان ژن‌های گیاهان می‌گردد و در نهایت به تجمع یا کاهش متابولیت‌های مهمی منجر می‌گردد که در اثر عدم توازن در پروتئین‌های سلولی به وجود می‌آیند. این تغییرات در جهت برقراری مجدد هومئوستازی گیاه و مقاومت در برابر تنش کادمیوم است.

با افزایش تیمار اسید سالیسیلیک ضمن تنش کادمیوم تغییری در نوار پروتئینی ٥٦ کیلو دالتونی که مربوط به آنزیم کاتالاز است، مشاهده نشد. نوار پروتئینی با وزن ملکولی ۷۰ کیلو دالتون که مربوط به پروتئین‌های شوک گرمازا می‌باشد. در این تیمارها، کم رنگ تر پدیدار گردید. همچنین با افزایش غلظت اسید سالیسیلیک، نوارهای پروتئینی با گسترهٔ وزن ملکولی ۲۷، ۳۳ و ٤٥ کیلو دالتون، کم رنگ تر پدیدار شدند که به‌ترتیب، مربوط به آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز

می‌باشند (Yannarelli et al., 2007). در پژوهش حاضر با توجه به نتایج به دست آمده، به نظر می رسد کاربرد اسید سالیسیلیک سبب کاهش مقدار آنزیم کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز گردیده است، می‌توان نتیجه گرفت که ممکن است این ماده از طریق تولید ترکیبات آنتی‌اکسیدان فنولیک، به‌طور مستقیم در از بین بردن رادیکال‌های آزاد نقش داشته و با پاکسازی این گونه‌های فعال و کاهش اثرات تنش، از افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان کاتالاز و سوپراکسید و همچنین دیسموتاز جلوگیری می کند (Dolatabadian et al., 2008). مطالعات انجام شده توسط Padash و همکاران (۲۰۱۶) نشان داد که اسید سالیسیلیک باعث کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاه ریحان شد. همچنین در مطالعه‌ای که روی تیپ وحشی و جهش یافته *Arabidopsis* انجام گرفت، اسید سالیسیلیک به عنوان برطرف کننده آسیب‌های اکسیداتیو معرفی شد (Metwally et al., 2003). بنابراین، احتمالا اسید سالیسیلیک با تأثیر بر سیستم دفاع آنتی اکسیدانی گیاه آفتابگردان، علاوه بر کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان با ممانعت از انتقال کادمیوم جذب شده از خاک به اندام هوایی نیز، موجب کاهش قابل ملاحظه آسیب اکسیداتیو ناشی از تنش کادمیوم در گیاه آفتابگردان گردید. از این رو می توان پیشنهاد نمود که مصرف این ماده در گیاهان در معرض تنش کادمیوم، عاملی برای رفع یا کاهش اثرات تنش می باشد.

نتیجه‌گیری نهایی

نتایج این تحقیق نشان داد در رقم اوروفلور آفتابگردان با افزایش تیمار کادمیوم، میزان انباشته شدن این عنصر توسط گیاه افزایش یافت. مقدار کادمیوم انباشته شده در بخش هوایی نسبت به ریشه بیشتر بود. در سمی ترین غلظت کادمیم، اسید سالیسیلیک موجب افزایش غلظت کادمیم ریشه شد که دلیل آن را می توان به کاهش سمیت کادمیم توسط آن نسبت داد. در نتیجه کاهش سمیت کادمیم، ریشه توانسته غلظت بالاتری از این فلز را در خود انباشته کند و به بخش هوایی منتقل کند. کادمیوم و اسیدسالیسیلیک باعث تغییرات آنزیم‌های آنتی اکسیدان شدند با توجه به نتایج این تحقیق، گیاه آفتابگردان دارای مقاومت و قابلیت جذب و انباشتگی نسبتاً بالایی برای کادمیوم است که می‌تواند به علت مقاومت نسبتاً بالا و ژنتیکی این گیاه نسبت به کادمیوم باشد.

References

Arora, A., Sairam, R.K. and Srivastava, G.C. (2002). Oxidative stress and antioxidant system in plants. Plant Physiology. 82: 1227-1237.

Baker, A.J.M., Reeves, R.D. and Hajar, A.S.M. (1994). Heavy metal accumulation and tolerance in British populations of the metallophyte *Thlaspi caerulescens* J. & C. Presl. (*Brassicaceae*). New Phytologist. 127: 61-68.

Barandeh, F., Kavousi, H.R., Pourseyedi, S.H. (2014). Activity of antioxidant enzymes, PAL and prolin content of lentil seedlings under cadmium stress. 1th Conference on New Finding in Environment and Agriculture Ecosystems. Tehran, Iran

Burkhanova E.A., Fedina A.B. and Kulaeva O.N. (1999). Effect of salicylic acid and 2, 5-oligodenylates on protein synthesis in tobacco leaves under heat shock conditions: a comparative study. Russ Journal Plant Physiol. 46:16-22.

Cho, U.H. and Sohn, J.Y. (2004). Cadmium-induced changes in antioxidative systems, hydrogen peroxide content and lipid peroxidation in *Arabidopsis thaliana* L. Journal of Plant Biology. 47(3): 262-269.

Das, P., Samantary, S. and Rout, R. (1998). Studies on cadmium toxity in plants: A review. Environ Pollut. 98: 29-36.

Dazy, M., Jung, V., Ferard, J. and Masfaraud, J. (2008). Ecological recovery of vegetation on a coke-factory soil: Role of plant antioxidant enzymes and possible implication in site restoration. Chemosphere. 74: 57-63.

Deponte, M. (2013). Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. Biochimica et Biophysica Acta, 1830: 3217–3266.

Dolatabadian, A., Modares sanavi, S.A.M. and Etemadi, F. (2008). Effects of salicylic acid pretreatment on wheat seeds germination under salt stress. Iranian Journal of Biology. 3 (21): 692-702.

Eftekhar, N., Fallah, S., Abbasi Sooraki, A., Khodaverdiloo, H. And Rahimi, A. (2019). Effect of salicylic acid and potassium nitrate pretreatment on enhancing the sunflower tolerance in contaminated soils with cadmium. Iranian Journal of Seed Science and Research. 6(2): 161-175.

Esterbauer, H. and Grill, D. (1978). Seasonal variation of glutathione and glutathione reductase in needles of *Picea abies.* Plant Physiology. 61: 119-121.

Eyidogan, F., Oz, M.T. (2005). Effect of salinity on antioxidant responses of chickpea seedlings.

Acta Physiology Plant. 29: 485–493.

Gallego, S.M., Benavides, M.P. and Tomaro, M.L. (1996). Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress. Plant Science. 121: 151–159.

Giannopolitis, C.N. and Ries, S.K. (1977). Superoxide dismutase: occurrence in higher plants. Plant Physiology. 59: 309–314.

Gondor, O.K., Pal, M., Darko, E., Janda, T. and Szalai, G.(2016). Salicylic Acid and Sodium Salicylate Alleviate Cadmium Toxicity to Different Extents in Maize (*Zea mays* L.). Plos One. 11(8):1-18.

Jadia, C.H. and Fulekar, M.H. (2008). The application of vermicompost to remove zinc, cadmium, copper, nickel and lead by sunflower plant. Environmental Engineering and Management Journal. 7: 547-558.

Jing, C., Cheng, Z., Li-Ping, L., Zhong-Yang, S. and Xue-Bo, P. (2007). Effects of exogenous salicylic acid on growth and H_2O_2-metabolizing enzymes in rice seedlings under lead stress. Journal of Environmental Sciences. 19: 44-49.

Khosravi, F. (2010). The effect of different doses of potassium on phytoremediation of soil contaminated with cadmium. Journal of Agriculture. 90:57-64.

Krantev, A., Yordanova, R. and Popova, L. (2006). Salicylic acid decreases Cd toxicity in maize plants.Gen.Appl. Plant Physiology. Special Issue: 45-52.

Laemmli, U.K. (1970). Cleaving of the structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature (London). 227: 680- 685.

Lasat, M.M. (2002). Phytoexteraction of toxic metals: A review of biological mechanisms. Journal of Environmental Quality. 31:109-120.

Leon, A.M., Palma, J.M., Corpas, F.J., Gomez, M., Romero-Puertas, M.C., Chatterjee, D., Mateos, R.M., Del Rio, L.A. and Sandalio, L.M. (2002). Antioxidative enzymes in cultivars of pepper plants with different sensitivity to cadmium. Plant Physiology and Biochemistry. 40: 813-820.

Lu, L.L., Tian, S.K., Yang, X.E., Wang, X.C., Brown, P., Li, T.Q. and He, Z.L.,(2008). Enhanced root-to-shoot translocation of cadmium in the hyperaccumulating ecotype of *Sedum alfredii*. Journal of Experimental Botany . 59(11): 3203–3213.

McDonald, M.B. (2000). Seed priming. In: Seed Technology and Biological Basis, M. Black and J. D. Bewley (Eds.), Sheffield Academic Press. England: 287-325.

Metraux, J.P. (2001). Systemic acquired and salicylic acid: current state of knowledge. European Journal of Plant Pathology. 107:13-18.

Metwally, A., Finkermeier, I., Georgi, M. and Dietz, K.J. (2003). Salicylic acid alleviates the cadmium toxicity in barley seedlings. Plant Physiology.132: 272-281.

Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends in Plant Science. 7: 405-410.

Mohtadi, A. and Hoshyari, S. (2016). Study of cadmium and zinc interaction in *Matthiola flavida* Boiss. Journal of Plant Research. 29(1):210-220.

Motesharezadeh, B., Savaghebi-Firoozabadi, G.R., Mirseyed Hosseini, H. and Alikhani, H.A. (2010). Study of the enhanced phytoextraction of cadmium in a calcareous soil. International Journal of Environmental Research.4(3): 525-532.

Padash, A., Ghanbari, A., Sirus Mehr, A. and Asgharipoor, M. (2016). Effect of salicylic acid on resistance of Ocimum plant to Pb toxicity. Iranian Plant Biology. 27 (8): 17-32.

Pal, M., Szalai, G., Horvath, E., Janda, T. and Paldi, E. (2002). Effect of salicylic acid during heavy metal stress. Proc. 7th Hungarian Congress of Plant Physiol. Szeged, Hungarian. 46: 119-120.

Peluffo, L., Lia, V., Troglia, C., Maringolo, C., Norma, P., Escande, A., Hopp, H.E., Lytovchenko, A., Fernie, A.R., Heinz, R. and Carrari, F. (2010). Metabolic profiles of sunflower genotypes with contrasting response to Sclerotinia sclerotiorum infection. Phytochemistry. 71: 70–80.

Popova, L., Maslenkova, L., Yordanova, R., Krantev, A., Szalai, G. and Janda, T.(2008). Salicylic acid protects photosynthesis against cadmium toxicity in pea plants. Gen. Appl. Plant Physiology. Special Issue. 34 (3-4): 133-148.

Reed, R., Holmes, D., Weyers, J. and Jones, A. (1998). Practical skills in biomolecular sciences. pp. 103-108. Longman, Hongkong.

Reeves, R.D., Kruckeberg, A.R., Adiguzel, N. and Kramer, U. (2001). Studies on the flora of serpentine and other metalliferous areas of western Turkey. South African Journal of Science. 97: 513-517.

Romero-Puertas, M.C., Corpas, F.J., Rodriguez-Serrano, M., Gomez, M., Sandalio, L.M. and Del Rio, L.A. (2007). Differential expression and regulation of antioxidative enzymes by cadmium in pea plants. Journal of Plant Physiology. 164: 1346-1357.

Rosa, G., Peralta-Videa, J.R., Montes, M., Parsons, J.G., Cano-Aguilera, I. and Gardea-Torresdey, J.L. (2004). Cadmium uptake and translocation in tumbleweed (*Salsola kali*), a potential Cd-hyperaccumulator desert plant species: ICP/OES and XAS studies. Chemosphere. 55: 1159-1168.

Senaranta, T., Touchell, D., Bumm, E. and Dixon, K. (2002). Acetylsalicylic (aspirin) and salicylic acid induce multiple stress tolerance bean and tomato plants. Plant Growth Regulation. 30: 157-161.

Shi, G.R., Cai, Q.S., Liu, Q.Q. and Wu, L. (2009). Salicylic acid-mediated alleviation of cadmium toxicity in hemp plants in relation to cadmium uptake, photosynthesis and antioxidant enzymes. Acta Physiologiae Plantarum. 31: 969-977.

Shigeru, S., Takahiro, I., Masahiro, T., Yoshiko, M., Toru, T., Yukinori, Y. and Kazuya, Y. (2002). Regu1ation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. Journal of Experimental Botany. 5: 1305–1319.

Simon, L.M., Fatrai, Z., Jonas, D.E. and Matkovics, B. (1974). Study of peroxide metabolism enzymes during the development of *Phaseolus vulgaris*. Plant Biochemistry and Physiology. 166: 387–392.

Snyman, M. and Cronje, M.J. (2008). Modulation of heat shock factors accompanies salicylic acid-mediated potentiation of Hsp70 in tomato seedlings. Experimental Botany. 59(8): 2125-2132.

Torres, E., Cid, A., Herrero, C. and Abalde. J. (2000). Effect of cadmium on growth, ATP content, carbon fixation and ultra structure in the marine diatom

Phaeodactylum tricornutum Bohlin. Water, Air, Soil Pollution. 117: 1-14.

Wagner, G. J. (1993). Accumulation of cadmium in crop plants and its consequences to human health. Advances in Agronomy. 51: 173-212.

Wang, J.w., Zheng, L.P. and Tan, R.X. (2006). Involvement of nitric oxide in oxidative burst phenylalanine ammonia-lyase activation and taxol production induced by low- energy ultrasound in Taxus yannanensiscell suspension cultures. Nitric Oxide Biology and Chemistry. 15: 351-358.

Westerman, R.E.L. (1990). Soil testing and plant analysis. SSSA, Madison, Wisconsin, USA.

Wojcik, M., Vangronsveld, J. and Tukiendorf, A. (2005). Cadmium tolerance in *Thlaspi caerulescens:* Growth parameters, metal accumulation and phytochelatin synthesis in response to cadmium. Environmental and Experimental Botany. 53: 151-161.

Yannarelli, G.G., Fernandez-Alvarez, A.J., Santa-Cruz, D.M. and Tomaro, M.L. (2007). Glutathione reductase activity and isoforms in leaves and roots of wheat plants subjected to cadmium stress. Phytochemistry. 68: 505–512.

Journal of Plant Environmental Physiology, Serial 63, 16th year, Number 3, Autumn 2021
Doi: 10.30495/iper.2021.679546
Dor: 20.1001.1.76712423.1400.16.63.6.8

Study of protein pattern, antioxidant enzymes and accumulation of cadmium in sunflower (*Helianthus annuus* L.) treated with cadmium and salicylic acid

Sakineh Moradkhani*
Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Payame Noor University (Khoy Center), Iran

Received date: 2020/04/26 Accepted date: 2020/07/26

Abstract

In order to investigate the interaction effects of cadmium as a heavy metal and salicylic acid as an antioxidant and anti-stress substance on sunflower plants, sunflower seeds were washed with distilled water after disinfection with 1% sodium hypochlorite solution and were planted in pots containing sandy soil in a growth chamber with a temperature of 34 ℃ during the day and 25 ℃ at night, and 16/8 hours of light/dark photoperiod. This research was performed as a factorial completely randomized design with four replications under greenhouse conditions. Sunflower plants were exposed to cadmium chloride treatment (0, 50, 100, 150 and 200 µM) at two-leaf stage on a weekly basis. One week after cadmium treatment, plant leaves were sprayed with salicylic acid (0, 250 and 500 µM). After harvesting the plants, cadmium concentrations in roots and shoots were measured. Then, antioxidant enzymes were assayed. Total protein content of leaf samples was extracted and the pattern of leaf protein changes was investigated by SDS-PAGE electrophoresis. Cadmium concentration in roots and shoots increased with increasing cadmium and salicylic acid treatment. Catalase enzyme activity decreased with increasing cadmium concentration, and salicylic acid had a very small effect on its activity. The activity of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, and glutathione reductase enzymes increased with increasing cadmium concentration while increasing salicylic acid concentration reduced the activity of these enzymes. Leaf protein electrophoresis under cadmium and salicylic acid treatments showed differences in leaf protein intensity compared with control plants. The expression of some proteins was increased or decreased in the treated plants. Therefore, cadmium and salicylic acid treatments made changes in the amount of cadmium uptake, antioxidant enzymes activity, and the pattern of sunflower leaf proteins.

***Keywords*:** Ascorbate peroxidase, Cadmium accumulation, catalase, Electrophoresis, Glutathione reductase, Protein, Salicylic acid, Sunflower (*Helianthus annuus* L.), superoxide dismutase.

*Corresponding author; moradkhani544@yahoo.com