Journal of Plant Environmental Physiology
ISSN: 7671-2423 (Print), 2783-4689 (Online) http://ecophysiologi.gorganiau.ac.ir

Doi: 10.30495/iper.2022.690252
Dor: 20.1001.1.24237671.1401.17.66.7.2

The effects of gibberellic acid on certain physiological parameters in alfalfa (*Medicago sativa* L.) under cadmium stress

Farzaneh Najafi[1], Zeinab Taghizadeh[2]*

[1] Department of plant physiology, Faculty of biological sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran, Email: f_najafi@yahoo.com
[2] Department of plant physiology, Faculty of biological sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran, Email: Z.taghizadeh66@yahoo.com

Serial 66, 17th year, Number 2, Summer 2022 (163-175)

Article type:
Research Full Paper

Article history
Received: 2021/06/09
Revised: 2021/08/27
Accepted: 2021/09/22

Keywords
Oxidative stress
Heavy metals
Gibberllins
Medicago sativa

Abstract

Alfalfa is one of the most important forage corps in the world. The *Medicago* plant is a major genus from the fabaceae. High concentration of heavy metals in soil is one of the most important problems in the environment. Cadmium is a heavy metal that can cause oxidative stress in plant cells. In this research effects of different concentrations of cadmium (0, 25 and 50 µM) and gibberellic acid (0, 5 and 10 µM) were investigated on certain physiological parameters in *Medicago sativa* L. Alfalfa seeds were sterilized and cultured in pots containing sand which were irrigated with Hoagland nutrient solution. plants were treated with cadmium chloride and gibberellin 22 - old day. after twenty two days Plants were harvested to assay some physiological parameters. All treatments were conducted with four replications. Experiment results showed that increasing cadmium chloride concentration in Hoagland nutrient solution, decreased growth parameters and pigment contents and GPX activity. But, but proline contents, SOD and CAT activties in roots and leaves of plants increased. by additionof gibberellin concentrations. It is concluded that gibberellic acid could alleviate the adverse effects of stress cadmium chloride in *Medicago sativa* L.

Please cite this article as Najafi, F., Taghizadeh, Z. 2022. The effects of gibberellic acid on certain physiological parameters in alfalfa (*Medicago sativa* L.) under cadmium stress. 65(2): 163-175.

© 2022. All Rights Reserved

نشریه فیزیولوژی محیطی گیاهی
شاپا: (چاپی) ۲۴۲۳-۷۶۷۱ (آنلاین) ۴۶۸۹-۲۷۸۳، http://ecophysiologi.gorganiau.ac.ir
Doi: 10.30495/iper.2022.690252
Dor: 20.1001.1.24237671.1401.17.66.7.2
دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان

بر همکنش جیبرلیک اسید وکلرورکادمیوم برروی برخی از پارامترهای فیزیولوژیکی گیاه یونجه (*Medicago sativa* L.)

فرزانه نجفی[۱]، زینب تقی‌زاده[۲]*

[۱]گروه فیزیولوژی گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران، رایانامه: f.najafi@khu.ac.ir
[۲]گروه فیزیولوژی گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران، رایانامه: z.taghizadeh66@yahoo.com

سال هفدهم، شماره ۶۶، تابستان ۱۴۰۱ / صفحات: ۱۷۵-۱۶۳

نوع مقاله:
مقاله کامل علمی-پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۳/۱۹
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۰۶/۰۵
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۶/۳۱

واژه‌های کلیدی:
جیبرلین‌ها
تنش اکسیداتیو
فلزات سنگین
آنزیم‌ها
پارامترهای رشد

چکیده

آلودگی خاک‌ها به فلزات سنگین می تواند باعث مشکلات عمده زیست محیطی گردد. کادمیوم به عنوان یکی از فلزات سنگین در گیاهان تنش اکسیداتیو ایجاد می کند و برای کاهش اثرات زیان آور تنش فلزات سنگین می توان از ترکیبات مختلفی استفاده کرد. در این تحقیق اثر غلظت‌های مختلف کادمیوم کلرید (۰، ۲۵ و ۵۰ میکرومولار) و هورمون جیبرلیک اسید (صفر، ۵ و ۱۰ میکرومولار) بر روی برخی پارامترهای فیزیولوژیکی گیاه یونجه مورد بررسی قرار گرفت. بذرهای استریل گیاه یونجه به گلدان‌های حاوی ماسه مرطوب و استریل شده منتقل شدند که با محلول هوگلند کامل آبیاری گردیدند. سپس گیاهان ۲۲ روزه تحت تیمارهای مختلف کلرورکادمیوم و جیبرلیک اسید قرار گرفتند. پس از تیماردهی(هرسه روز یک بار) گیاهان به منظور انجام برخی آنالیزهای فیزیولوژیکی برداشت شدند. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت کلرورکادمیوم در محلول غذایی هوگلند پارامترهای رشد، محتوای رنگیزه‌ها، میزان پروتئین کل و فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز کاهش یافتند، درحالی که مقدار پرولین، فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز افزایش پیدا کردند. در گیاهان تحت تیمار همزمان جیبرلیک اسید و کلرورکادمیوم در مقایسه با گیاهان تحت تیمار کلرورکادمیوم پارامترهای رشد، محتوای رنگیزه‌ها، میزان پروتئین کل افزایش نشان داد اما فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و مقدار پرولین کاهش یافت. نتایج اثر بهبود دهنده جیبرلین را نشان داد که موجب افزایش مقاومت گیاه یونجه به تنش کادمیوم شد.

استناد: نجفی، ف.، تقی‌زاده، ز. (۱۴۰۱). بر همکنش جیبرلیک اسید وکلرورکادمیوم برروی برخی از پارامترهای فیزیولوژیکی گیاه یونجه (*Medicago sativa* L.). *نشریه فیزیولوژی محیطی گیاهی*، ۶۵ (۲)، ۱۷۵-۱۶۳.

مقدمه

به دلیل افزایش فعالیت‌های صنعتی از اواخر قرن ۱۹ و اوایل قرن ۲۰، آلودگی‌های ناشی از فلزات سنگین به‌طور وسیعی در دنیا گسترش یافته است (Yang et al., 1996). کادمیوم عنصری غیر ضروری و سمی برای گیاهان محسوب می‌شود. این عنصر اثرات فیزیولوژیک و مورفولوژیکی متعددی بر گیاهان دارد (Ghaderian and Hajiani, 2010) و به‌دلیل سمیت بالا اثری بازدارنده بر روی رشد و نمو گیاهان دارد. میزان کادمیوم موجود در محیط زیست بستگی به فعالیت نیروگاه‌های برق، سیستم‌های حرارتی، فعالیت‌های صنعتی و ترافیک شهری دارد. آلودگی کادمیوم به دلیل سمیت بالا و حلالیت بالای آن در آب است. منبع اصلی کادمیوم ورودی به محیط آبی شامل فاضلاب‌های خانگی و صنعتی می‌باشد (Benavides and Gallego, 2005). این عنصر همیشه بصورت یون دو ظرفیتی در خاک بوده است و جذب آن بستگی به شرایط خاک از جمله pH، ساختار خاک، ماده آلی خاک و ترکیبات شیمیایی موجود در خاک دارد. کادمیوم در طبیعت بیشتر در سنگ‌های معدنی همراه با روی یافت می شود. نمک‌های کادمیوم ازطریق فعالیت‌های مختلف بشر وارد خاک شده و به راحتی از طریق ریشه گیاهان جذب می گردد و اثرات فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی متعددی بر گیاهان می‌گذارد (Ghaderian and Hajiani, 2010).

کاربرد هورمون‌های گیاهی در دهه اخیر با توجه به گسترش کشاورزی پایدار مورد توجه قرار گرفته است و از این رو باید در مدیریت تلفیقی گیاهان زراعی مورد تحقیق قرار گیرد (Sarwar et al., 2017). هورمون‌های گیاهی در پاسخ گیاهان به تنش‌های محیطی ایفای نقش می‌کنند. جیبرلین نقش حیاتی در سم زدایی فلزات سنگین و مقاومت به تنش مختلف از طریق بهبود رشد گیاه، بیوسنتز رنگیزه‌های کلروفیلی، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان و کاهش پراکسیداسیون لیپیدها دارند (Lee et al., 2001). جیبرلیک اسید باعث افزایش کلسیم گیاه شده و نقش مهمی در سم زدایی سلولی دارد (Lee et al., 2001). محققان بیان کردند که استفاده از اسید جیبرلیک نیز معمولا باعث افزایش رشد و سیستم ریشه گسترده می‌شود. علاوه بر این، تحمل به تنش‌های غیر زیستی را افزایش می‌دهد (Abbasi et al., 2022). جیبرلین‌ها به طور تجاری از کشت‌های قارچی به دست می‌آیند و محصول طبیعی و خالص شده‌ای است که در گیاهان به کار می‌روند. اسید جیبرلیک بهترین نوع شناخته شده از بین انواع این هورمون است که می‌توان به مقدار زیاد به دست آورد (Maleki et al., 2020).

گیاهان علوفه‌ای جزء مهمی از جیره علف خواران را تشکیل می‌دهند و در این میان خانواده لگوم‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. از این خانواده، گیاه یونجه از اهمیت بیشتری برخوردار است زیرا به تثبیت بیولوژیکی نیتروژن در خاک کمک کرده و بدین‌ترتیب نقش و میزان نیاز به کودهای نیتروژن دار را کم می‌کند. یکی از خصوصیات مهم یونجه، کیفیت بالایی تغذیه‌ای آن برای حیوانات است. گیاه یونجه حاوی ۲۲-۱۵ درصد پروتئین خام بوده و منبع خوبی برای تامیین ویتامین‌ها و مواد معدنی محسوب می‌شود. این گیاه دارای درصد بالایی از ویتامین‌ها شامل ویتامین‌های گروه K, E, C, B و همچنین β-کاروتن بوده و به همین دلیل به‌عنوان مکمل غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Colodny and Montgomery, 2001). گزارش‌های متعددی وجود دارد که فلزات سنگین میزان هورمون‌ها را تغییر می‌دهند و کاربرد هورمون‌ها در این گیاهان تحت تنش فلزات سنگین سبب کاهش سمیت این فلزات

می‌گردد (Moya et al., 1995). تحقیقات مشابهی روی گیاه باقلا (Siddiqui and Al-whaibi, 2010)، برنج (Al-Rumaih and Muna, 2003) و سویا انجام شده است.

نظر به اهمیت گیاه یونچه به عنوان علوفه و منبع غنی پروتئین برای گیاه خواران و افزایش خاک‌های آلوده به عناصر سنگین این مطالعه در جهت معرفی روشی برای کاهش اثرات مخرب این عناصر و افزایش راندمان تولید علوفه و کاهش خسارات وارده بر کشاورز انجام گرفته است.

مواد و روش‌ها

بذرهای گیاه یونجه (*Medicago sativa* L.) از اداره منابع طبیعی و آبخیزداری استان اردبیل، شهرستان مشگین شهر تهیه و با هیپوکلریت سدیم ۵٪ به‌مدت ۸ دقیقه ضد عفونی شدند سپس بذرها چندین بار با آب مقطر شستشو داده شدند. پس از این مرحله تعداد بیست عدد بذر در درون ظروف پتری سترون حاوی یک لایه کاغذ صافی قرار داده شدند شش روز پس از جوانه زنی، گیاهک‌ها به گلدان انتقال داده شدند گیاهک‌ها پس از ابیاری با محلول هوگلند کامل (Hoagland and Arnon, 1950) به‌مدت ۲۲ روز تحت تیمارهای کادمیوم کلرید درسه غلظت (۰، ۲۵ و ۵۰ میلی‌مولار) و جیبرلیک اسید در سه سطح (۰، ۵ و۱۰ میکرومولار) به محیط کشت اضافه شدند. بیست و دو روز پس از تیماردهی گیاهان به منظور انجام سنجش‌های مورد نظر برداشت شدند.

سنجش پارامترهای مربوط به رشد گیاه: بلافاصله بعد از برداشت وزن تر ریشه و اندام هوایی اندازه گرفته شد و وزن خشک اندام‌های گیاهی پس از ۲٤ ساعت قرار گرفتن در آون در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد سنجیده شد (Evan and Hughes, 1962).

سنجش رنگیزه‌های فتوسنتزی: به‌منظور سنجش میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی، ابتدا برگ‌های سوم توسعه یافته از گیاه جداسازی شده و در استون ۸۰ درصد در داخل‌هاون چینی به صورت همگن در آمدند سپس از کاغذ صافی واتمن شماره ۲ عبور داده وجذب محلول بدست آمده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر، در طول موج‌های ٤٧٠، ٦٤٦/٨ و ٦٦٣/٢ نانومتر خوانده شد. از استون ۸۰ درصد به‌عنوان محلول شاهد برای تنظیم دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده شد و غلظت کلروفیل‌ها و کاروتنوئیدها بر حسب میلی‌گرم در گرم وزن تر محاسبه گردید (Lichtenthaler, 1987).

سنجش پروتئین: ۰/۰۵ گرم از بافت تر گیاه در محیط سرد توسط ۲ میلی‌لیتر بافر فسفات با pH ٦/٨ ساییده شد و به‌مدت ۱۵ دقیقه در ١٦٠٠٠g و دمای ٤ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. فاز رویی برای سنجش پروتئین کل، فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، کاتالاز و سوپراکسیددیسموتاز استفاده شد. ۳۰۰ میکرولیتر از هر نمونه برداشته و به آن ۵ میلی‌لیتر معرف برادفورد اضافه شد و جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. برای تهیه‌ی منحنی استاندارد و محاسبه غلظت پروتئین نمونه‌ها از سرم آلبومن گاوی یک میکروگرم بر میکرولیتراستفاده شد. بعد از انتقال نمونه‌ها به فالکون به هر کدام پنج میلی‌لیتر معرف برادفورد اضافه شد. جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. نمودار استاندارد بر اساس جذب نمونه‌ها تهیه شد و مقدار پروتئین نمونه‌ها با استفاده از نمودار استاندارد به ازای میلی‌گرم در گرم وزن تر ماده گیاهی بیان شد (Bradford, 1976).

سنجش پرولین: ابتداء برگ تازه ای گیاه را پس از توزین با اسید سولفوسالیسیلیک سه درصد به صورت هموژن در آورده و همگن‌های بدست آمده به فالکون

۱۵ میلی‌لیتری منتقل شده سپس با اسید سولفوسالیسیلیک سه درصد حجم آن‌ها به ۱۰ میلی‌لیتر رسانیده شد و با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره دو صاف گردید. دو میلی‌لیتر از عصاره حاصل، دو میلی‌لیتر معرف نین هیدرین و دو میلی‌لیتر اسید استیک خالص را در یک لوله آزمایش مخلوط کرده و به مدت یک ساعت جوشانیده شدند، جهت توقف واکنش نمونه‌ها سریعا به ظرف محتوی آب و یخ منتقل شدند(به مدت ۲۰ دقیقه) سپس به هر نمونه چهار میلی‌لیتر تولوئن اضافه شد و مخلوط گردید. در نهایت جذب بخش رویی در طول موج ۵۲۰ نانومترخوانده شد. غلظت پرولین نمونه‌ها با استفاده از منحنی استاندارد پرولین براساس میکروگرم بر گرم وزن تر ارزیابی گردید (Bates et al., 1973).

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز: میزان فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) با ثبت کاهش مقدار پراکسید هیدروژن در ۲۴۰ نانومتر انجام شد. مخلوط واکنش شامل بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی مولار (pH 6.8)، پراکسید هیدروژن ۱۵ میلی‌مولار بود. واکنش با افزودن مقدار مناسب عصاره ی آنزیمی در حجم نهایی سه میلی‌لیتر آغاز گردید. تغییرات جذب در ۲۴۰ نانومتر به مدت سه دقیقه ثبت شد. سپس فعالیت آنزیم به صورت تغییرات جذب در دقیقه به ازای هر گرم وزن تربیان گردید (Dazy et al., 2008).

سنجش فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز: فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز (GPX)، به‌عنوان نمونه‌ای ازانواع پراکسیدازها مورد ارزیابی قرار گرفت. محیط واکنش شامل بافر فسفات پتاسیم ۲۵ میلی‌مولار (pH 6.8)، پراکسید هیدروژن ۴۰ میلی مولار و گایاکول ۲۰ میلی‌مولار بود. واکنش با افزودن مقدار مناسب عصاره ی آنزیمی در حجم نهایی سه میلی‌لیتر آغاز گردید. افزایش جذب نور به وسیله تشکیل تترا گایاکول در طول موج ۴۷۰ نانومتر به مدت سه دقیقه تثبیت شد. سپس فعالیت آنزیم به صورت تغییرات جذب در دقیقه به ازای هر گرم وزن تر بیان گردید (Dazy et al., 2008).

سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز: برای سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز ابتدا بافر ۵۰ میلی مولار با pH ۷/۵ تهیه شد جهت تهیه مخلوط واکنش برای سنجش فعالیت آنزیم شامل بافرفسفات ۵۰ میلی‌مولار، EDTA ۰/۱ میلی‌مولار، (MTT) ۷۵ میکرومولار، متیونین ۱۳ میلی‌مولار، ریبوفلاوین ۴ میکرومولار بود. قبل از اضافه کردن مواد، دور ظرف با فویل پوشانده شد تا از جذب نور جلو گیری شود. از هر نمونه ۱۰۰ میکرولیتر عصاره برداشته و در لوله آزمایش ریخته و ۳ میلی‌لیتر از مخلوط واکنش فوق به آن اضافه شد. سپس به‌مدت ۱۵ دقیقه لوله‌ها را در زیر نور فلورسنت (۴۰ وات) با فاصله ۵۰ سانتی‌متری قرار داده، در هر بار سنجش در کنار لوله‌های حاوی عصاره، یک لوله به‌عنوان شاهد روشنایی زیر نور فلورسنت قرار داده شد. این شاهد روشنایی حاوی ۲ میلی‌لیتر مخلوط واکنش و فاقد عصاره است. جذب آن نیز به همراه دیگر نمونه‌ها در طول موج ۵۶۰ نانومترخوانده شد. برای صفر کردن دستگاه از مخلوط واکنش که نور ندیده استفاده شد. اختلاف جذب نمونه‌ها و شاهد روشنایی، مهار احیا نوری MTT در حضور آنزیم SOD موجود در نمونه‌ها را نشان می دهد. فعالیت آنزیم SOD بر اساس واحد آنزیمی به ازای هر میلی گرم پروتئین برای تمام نمونه‌ها محاسبه گردید (Giannopolitis and Ries,1997).

محاسبات آماری: محاسبات آماری در این مطالعه بر اساس آنالیز واریانس دو عاملی با استفاده از نرم افزار SPSS ویرایش ۱۶ و در سطح احتمال $P<0/05$ و آزمون دانکن انجام شد. برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel استفاده شد.

نتایج

در این بررسی پارامترهای مختلف رشد مانند وزن تر و خشک ریشه و اندام‌های هوایی، طول ریشه و اندام‌های هوایی، سطح برگ، محتوای کلروفیل‌ها و کاروتنوئیدها در اثرتیمار کلرور کادمیوم کاهش یافت و با افزودن جیبرلیک اسید، شاخص‌های مختلف رشد مانند وزن تر ریشه و اندام‌های هوایی ، وزن خشک ریشه و اندام‌های هوایی، طول ریشه و طول اندام‌های هوایی و سطح برگ افزایش نشان داد (جدول‌های ۱ تا ۳).

جدول ۱: اندازه‌گیری طول ساقه، طول ریشه، سطح برگ، وزن تر برگ و وزن خشک برگ در تیمارهای مختلف کلرورکادمیوم و جیبرلین در گیاه یونجه.

$Cdcl_2$ (میکرو مولار)	GA_3 (میکرومولار)	وزن تر برگ (گرم)	وزن خشک برگ (گرم)	سطح برگ (دسی مترمربع)	طول ریشه (سانتی‌متر)	طول ساقه (سانتی‌متر)
	۰	۰/۰۵ ± ۰/۰۰۳^{a}	۰/۰۰۸ ±/۰۰۶^{a}	۰/۰۱۶±۰/۰۰۲ ^{ab}	۸/٤٦ ۰±/۳٤^{b}	۹/۸ ± ۰/۱۰۸^{bc}
۰	۵	۰/۰۵۵ ± ۰/۰۰۳^{a}	۰/۰۰۸ ±/۰۰۳^{a}	۰/۰۲ ± ۰/۰۰٦^{ab}	۹/٤۷ ± ۰/۳۱۹^{abc}	۱۱/ ±۵ ۰/۱۹^{a}
	۱۰	۰/۰۵۵ ± ۰/۰۰۲^{a}	۰/۰۰۸ ±/۰۰۰۹^{a}	۰/۰۲ ± ۰/۰۰۱^{a}	۹/۸۷ ± ۱/۱۲ ^{ab}	۱۱/٦ ± ۰/٦٤۳^{a}
	۰	۰/۰٤ ± ۰/۰۰۲^{b}	۰/۰۰٦ ±/۰۰۰۳ ^{b}	۰/۰۱ ± ۰/۰۰٤ ^{cd}	۸/۲۱ ± ۰ /۰۹ ^{cd}	۹/۲± ۰/۳۷ ^{cd}
۲۵	۵	۰/۰٤۵±۰/۰۰۰۷^{ab}	۰/۰۰٦ ±/۰۰۰۱ ^{b}	۰/۰۲ ± ۰/۰۰۳^{bc}	۹/۲۹ ± ۰/۱۸ ^{abcd}	۹/٤ ± ۰/٤ ^{b}
	۱۰	۰/۰٤٦ ± ۰/۰۰۳^{b}	۰/۰۰٦ ±/۰۰۰۳ ^{b}	۰/۰۲ ± ۰/۰۰۱^{bc}	۱۰/۲ ± ۰/۲۳٦^{a}	۱۰/۵ ± ۰/٤٤۲^{ab}
	۰	۰/۰۳۸ ±۰/۰۰۳^{b}	۰/۰۰٦ ±/۰۰۰٦ ^{b}	۰/۰۱٦±۰/۰۹^{d}	۷/۹۸ ± ۰/۳٤۱ ^{d}	۸/٦۱± ۰/۲۵۱ ^{d}
۵۰	۵	۰/۰٤۱ ± ۰/۰۰۷^{b}	۰/۰۰٦ ±/۰۰۰۵ ^{b}	۰/۰۰۳ ۰/۰۱۷ ±^{cd}	۸/٤۸ ± ۰/۳۰٤ ^{bcd}	۸/۰۸ ± ۰/۲۳٤ ^{cd}
	۱۰	۰/۰٤۲± ۰/۰۰۳^{b}	۰/۰۰٦ ±/۰۰۰٤ ^{b}	۰/۰۱۹ ± ۰/۰۰۲^{bc}	۹/۵۸ ± ۰/۲۰۸ ^{abc}	۸/۹۳± ۰/۳۰۸ ^{cd}

داده‌ها $\bar{X} \pm SE$ را نشان می‌دهند. حروف غیرمشابه نشان‌دهنده تفاوت معنی دار در سطح p <۰/۰۵ است.

جدول ۲: اندازه گیری وزن تر ساقه، وزن خشک ساقه، وزن تر ریشه و وزن خشک ریشه در تیمارهای مختلف کلرورکادمیوم و جیبرلین در گیاه یونجه.

$CdCl_2$ (میکرومولار)	GA_3 (میکرومولار)	وزن خشک ریشه (گرم)	وزن تر ریشه (گرم)	وزن خشک ساقه (گرم)	وزن تر ساقه (گرم)
	۰	۰/ ±۰۰۲۳ ۰/۰۰۰۲ ^{cd}	۰/۰۱۷ ± ۰/۰۰۱۵ ^{a}	۰/۰۰۷ ± ۰/۰۰۰۸ ^{ab}	۰/۰۵۵± ۰/۰۰٤ ^{abc}
۰	۵	۰/۰۳٤ ± ۰/۰۰۲۳^{b}	۰/۰۱۹ ± ۰/۰۰۱ ^{a}	۰/۰۰۸ ± ۰/۰۰۰۰۹۸ ^{a}	۰/۰۵٦± ۰/۰۰۲ ^{ab}
	۱۰	۰/۰۰٤ ± ۰/۰۰۰۳ ^{a}	۰/۰۲۱ ± ۰/۰۰۰۹ ^{a}	۰/۰۰۸ ± ۰/۰۰۰٦ ^{a}	۰/۰٦ ± ۰/۰۰۳ ^{a}
	۰	۰/۰۰۱۷ ± ۰/۰۰۰۲ ^{e}	۰/۰۰۹۷ ± ۰/۰۰۱ ^{b}	۰/۰۰۰٤ ± ۰/۰۰٦ ^{b}	۰/۰٤۹ ± ۰/۰۰۱ ^{cd}
۲۵	۵	۰/۰۰۲ ± ۰/۰۰۰۳^{c}	۰/۰۰۹۸ ± ۰/۰۰۰۸^{b}	۰/۰۰۰٦ ± ۰/۰۰۰۵ ^{b}	۰/۰٤ ± ۰/۰۰۲ ^{bcd}
	۱۰	۰/۰۰۳٤± ۰/۰۰۰۱۸ ^{b}	۰/۰۰۱۱ ± ۰/۰۰۰۵ ^{b}	۰/۰۰۰٤ ± ۰/۰۰٦ ^{b}	۰/۰٤۹ ± ۰/۰۰۳ ^{bcd}
	۰	۰/۰۰۱۵ ± ۰/۰۰۰٤ ^{e}	۰/۰۰۹ ± ۰/۰۰۰۲ ^{b}	۰/۰۰٦ ± ۰/۰۰۰٤ ^{b}	۰/۰٤٤ ± ۰/۰۰۰٦ ^{d}
۵۰	۵	۰/۰۰۲ ± ۰/۰۰۰۳ ^{d}	۰/۰۰۹ ± ۰/۰۰۰٤ ^{b}	۰/۰۰٦ ± ۰/۰۰۰۲ ^{b}	۰/۰٤٤ ± ۰/۰۰۲ ^{d}
	۱۰	۰/۰۰۲ ± ۰/۰۰۰۰٦ ^{cd}	۰/۰۱ ± ۰/۰۰۳ ^{b}	۰/۰۰٦ ± ۰/۰۰۰۳ ^{b}	۰/۰٤۵ ± ۰/۰۰۵ ^{d}

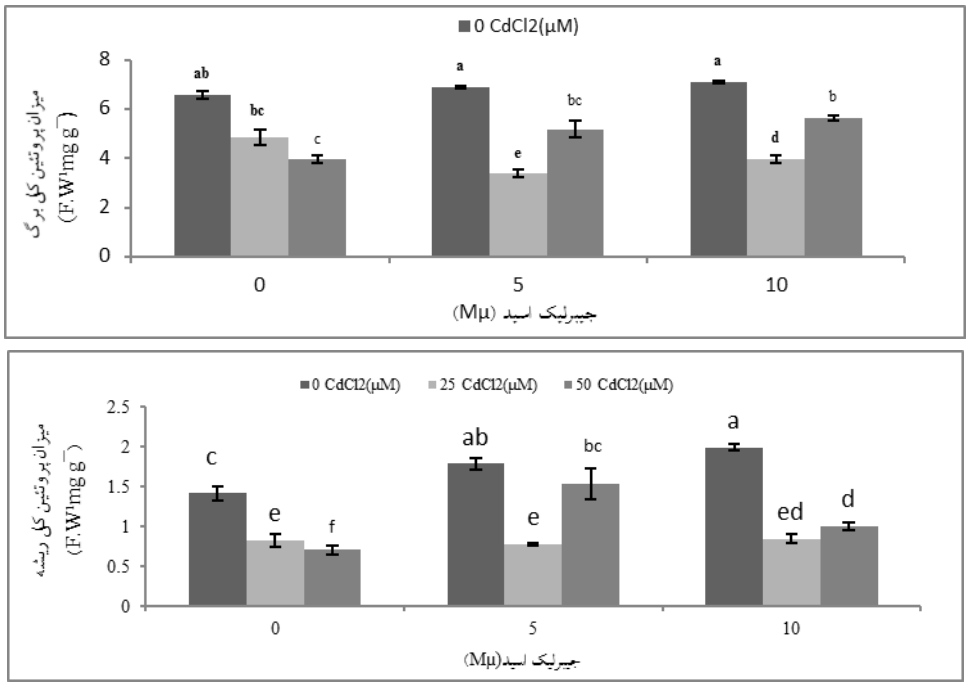
داده‌ها $\bar{X} \pm SE$ را نشان می‌دهند. حروف غیرمشابه نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح p <۰/۰۵ است.

جدول ۳: میزان کلروفیل *a*، کلروفیل *b*، کلروفیل کل (*a+b*) و کاروتنوئیدها در تیمارهای مختلف کلرورکادمیوم و جیبرلین در گیاه یونجه.

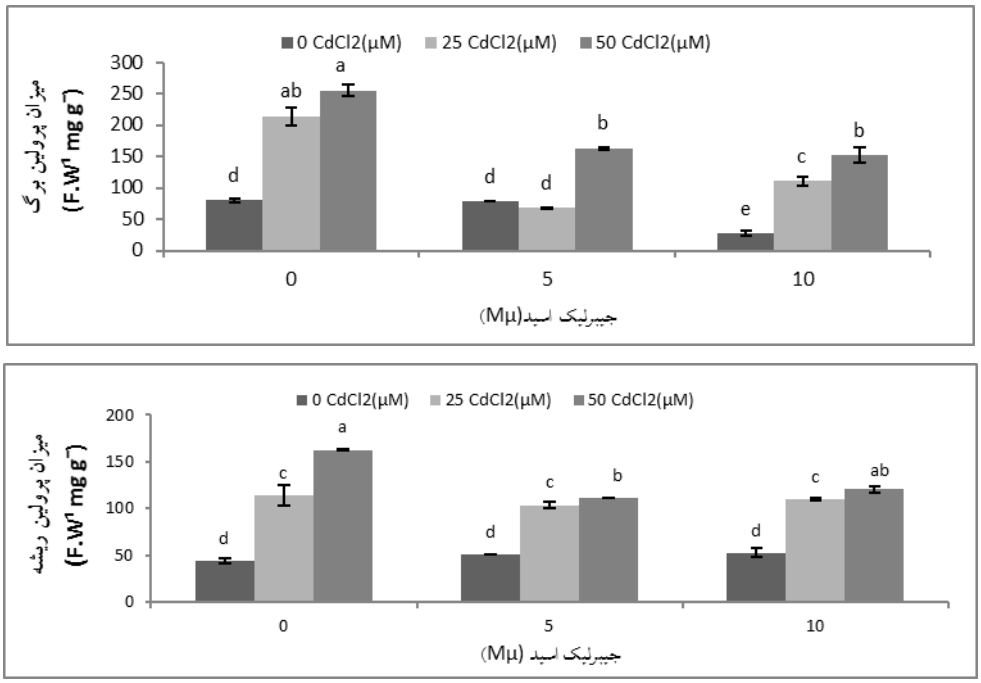
$CdCl_2$ (میکرومولار)	GA_3 (میکرومولار)	کاروتنوئیدها (میلی‌گرم بر گرم وزن تر)	کلروفیل کل(*a+b*) (میلی‌گرم بر گرم وزن تر)	کلروفیل *b* (میلی‌گرم بر گرم وزن تر)	کلروفیل *a* (میلی‌گرم بر گرم وزن تر)
۰	۰	۰/۰۲۵۱ ± ۰/۰۱ b	۲/۰۹ ± ۰/۰۳۹ c	۰/۶۷۸ ± ۰/۰۳ abc	۱/۴۶۷ ± ۰/۰۴۲ c
	۵	۰/۳۰۶ ± ۰/۰۰۹ b	۲/۳۱ ±/۰۴۳ ab	۰/۷۱۱ ± ۰/۰۰۷ ab	۱/۶۰۲ ± ۰/۰۳۷ b
	۱۰	۰/۳۱۲ ± ۰/۰۱۱ a	۲/۴۱± ۰/۰۴۹ a	۰/۷۲۳ ± ۰/۰۱۹۹ ab	۱/۶۹ ± ۰/۰۳۴ a
۲۵	۰	۰/۲۱۷ ± ۰/۱۷۷ bc	۱/۹۷± ۰/۵۲۸ cd	۰/۶۲۶ ± ۰/۰۴۳ bc	۱/۳۴ ± ۰/۰۳۷ d
	۵	۰/۲۱۷ ± ۰/۰۰۷ bc	۲/۷۲± ۰/۰۰۶ c	۰/۷۰۱ ± ۰/۰۰۶ ab	۱/۳۷ ± ۰/۰۱۰ d
	۱۰	۰/۲۴۷ ± ۰/۰۰۹ b	۲/۲۴± ۰/۰۳۹ b	۰/۷۷۲ ± ۰/۰۳۲ a	۱/۴ ± ۰/۰۹۲ c
۵۰	۰	۰/۲۰۸ ± ۰/۰۰۹ c	۱/۹۰± ۰/۰۰۸ a	۰/۶۰۱ ± ۰/۰۰۵ ab	۱/۳ ± ۰/۰۰۴ d
	۵	۰/۲۳۶ ± ۰/۱۹ bc	۲/۰۳± ۰/۰۲۹ ab	۰/۷۴۷ ± ۰/۰۱۹ a	۱/۵۷ ± ۰/۰۲ b
	۱۰	۰/۲۵ ± ۰/۰۹۵ b	۲/۳۷۳± ۰/۰۳۲ a	۰/۷۷۹ ± ۰/۰۱۵ a	۱/۶ ± ۰/۰۱۹ b

داده‌ها $\bar{X} \pm SE$ را نشان می‌دهند. حروف غیرمشابه نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح P<۰/۰۵ است.

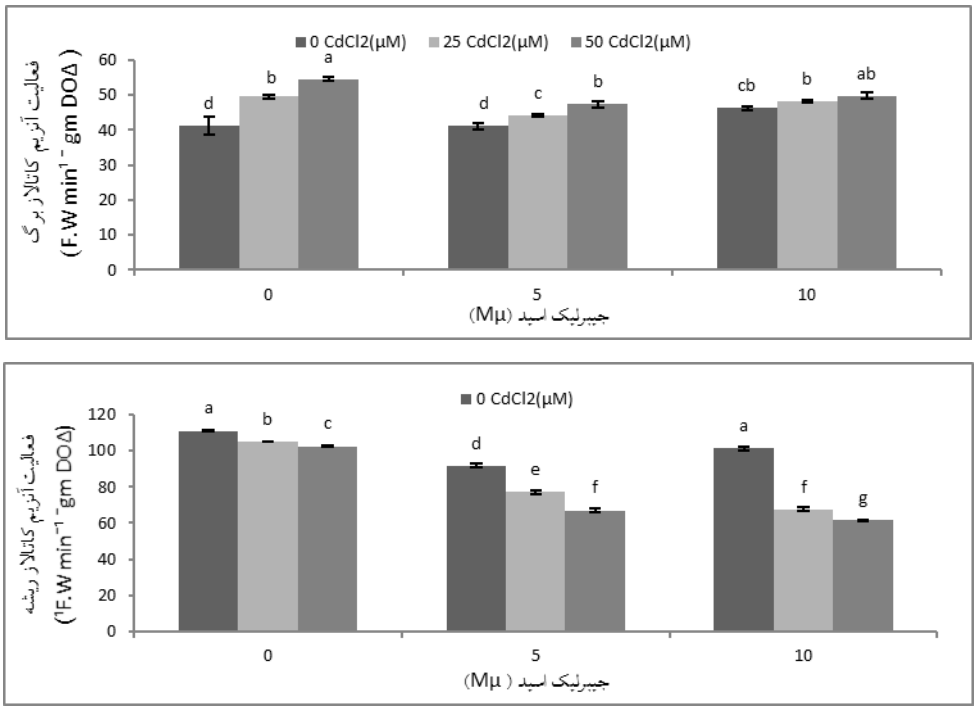
در این بررسی مقدار پروتئین کل وفعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در برگ و ریشه و کاتالاز در ریشه در اثرتیمار کلرور کادمیوم کاهش و میزان کاتالاز در برگ‌ها و سوپراکسید دیسموتاز در ریشه‌ها و برگ‌ها افزایش نشان دادند، در حالی که در تیمارهای همزمان جیبرلین و کلرورکادمیوم به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (شکل‌های ۱ تا ۵).



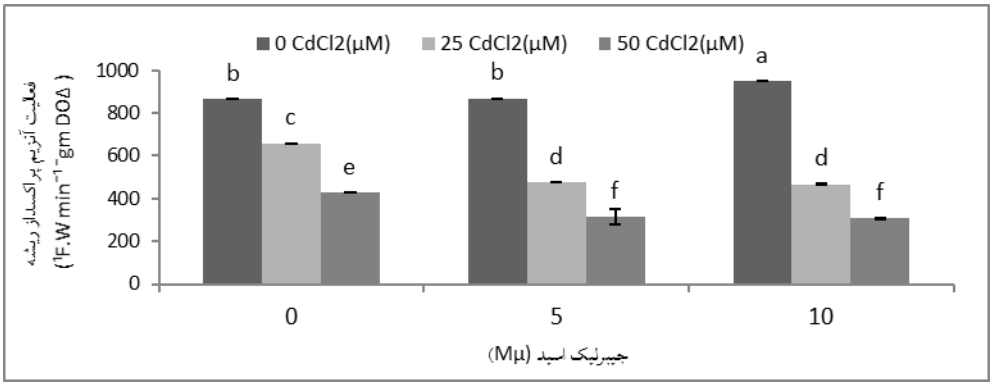
شکل ۱: اثر متقابل کلرورکادمیوم و جیبرلین بر تغییرات میزان پروتین کل برگ و ریشه در گیاه یونجه. داده‌ها $\bar{X} \pm SE$ را نشان می‌دهند . حروف غیرمشابه نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح P<۰/۰۵ است.

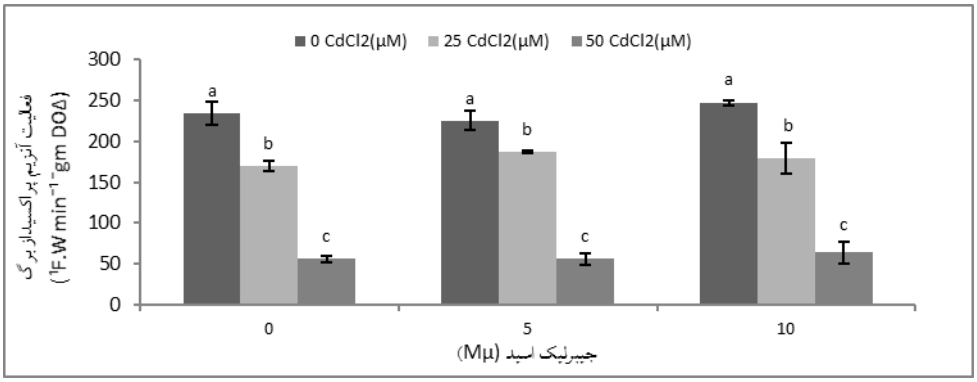


شکل ۲: اثر متقابل کلرورکادمیوم و جیبرلین بر تغییرات میزان پرولین کل برگ و ریشه در گیاه یونجه. داده‌ها $\bar{X} \pm SE$ را نشان می‌دهند. حروف غیرمشابه نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح P<۰/۰۵ است.

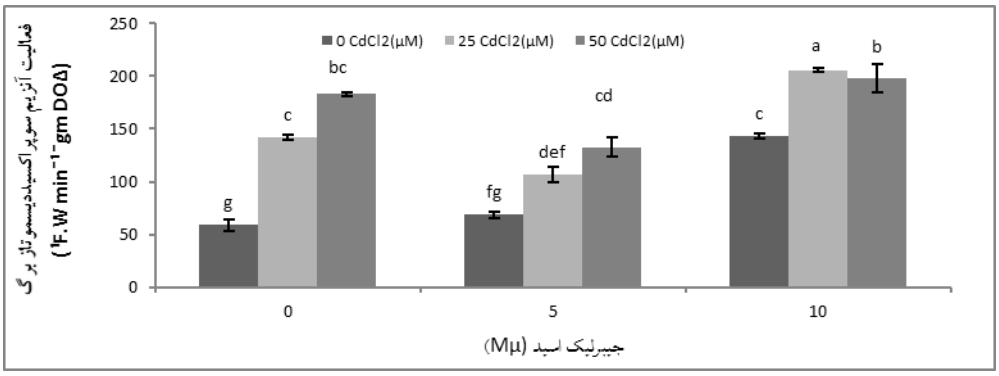


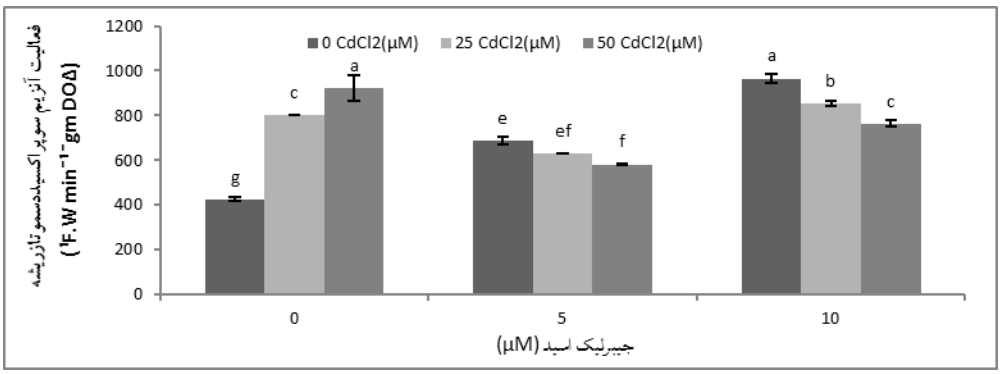
شکل ۳: اثر متقابل کلرورکادمیوم و جیبرلین بر تغییرات میزان فعالیت آنزیم کاتالاز برگ و ریشه در گیاه یونجه. داده‌ها $\bar{X} \pm SE$ را نشان می‌دهند. حروف غیرمشابه نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح P<۰/۰۵ است.





شکل ٤: اثر متقابل کلرورکادمیوم و جیبرلین بر تغییرات میزان فعالیت آنـزیم پراکسـیداز بـرگ و ریشـه در گیـاه یونجـه. داده‌هـا $\bar{X} \pm SE$ را نشان می‌دهند. حروف غیرمشابه نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح P<۰/۰۵ است.





شکل ٥: اثر متقابل کلرورکادمیوم و جیبرلین برتغییرات میزان آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز برگ و ریشه در گیاه یونجه. داده‌ها $\bar{X} \pm SE$ را نشان می‌دهند. حروف غیرمشابه نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح P<۰/۰۵ است.

بحث

کاهش رشد مشاهده شده در گیاهان تحت تیمار کادمیوم، می‌تواند بدلیل آسیب اکسیداتیو و تخرب لیپیدهای غشایی، پروتئین‌ها، رنگیزه‌ها و اسید نوکلئیک باشد، که در نهایت به مرگ گیاه منجر شود (Hegedus et al., 2001). همچنین کادمیوم بیوسنتز کلروفیل را با مهار فعالیت آنزیم پروتوکلروفیلید ردوکتاز از طریق واکنش با گروه تیولی پروتئین و افزایش فعالیت آنزیم‌های درگیر در تخریب کلروفیل کاهش می‌دهد (Van Assche and Clijsters, 1990)، مهمترین علت کاهش میزان کاروتنوئیدها نیز می‌تواند افزایش تولید گونه‌های اکسیژن فعال و در نتیجه ایجاد تنش اکسیداتیو در گیاه باشد (Mishra Srivastava, 2006). کاهش میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز نشان می‌دهد که سمیت زدائی پراکسید هیدروژن توسط این آنزیم در شرایط سمیت کادمیوم کافی نیست و کاهش فعالیت آنزیم پراکسیداز تحت تنش کلرورکادمیوم توسط Shi و همکاران (۲۰۱۰) نیز بر روی گیاه گلرنگ گزارش شده است. کاهش میزان پروتئین می تواند به دلیل افزایش فرایندهای تخریب کننده ی پروتئین‌ها و افزایش فعالیت آنزیم‌های پروتئاز باشد (Palma et al., 2002)، همچنین کادمیوم سبب افزایش غلظت یون آمونیوم با برهم زدن تعادل آمونیوم بافت‌های گیاه و مهار فعالیت آنزیم‌های گلوماتامات سنتاز و گلوتامین سنتاز گردد، که این امر سبب کاهش پروتئین محلول می گردد (Chaffei et al., 2003). در واقع کادمیوم با مهار جذب نیترات سبب کمبود ازت در گیاه شده و به همین دلیل تجزیه و کاهش پروتئین‌های محلول راهی برای جبران این کمبود است. افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز بدلیل فعالیت گونه‌های فعال اکسیژن که آسیب جدی به متابولیسم سلول و آسیب اکسیداتیو به لیپیدها و نوکلئیک اسیدها وارد می کند، زیرا غلظت درونی اکسیژن در هنگام فتوسنتز بالاست و در نتیجه کلروپلاست‌ها تمایل به تولید گونه‌های فعال اکسیژن بیشتری دارند. گیاهان حاوی انواع آنتی اکسیدان‌ها بوده و سلول‌ها را در برابر اثرات سمی گونه‌های فعال اکسیژن حفاظت می کنند. متالوآنزیم سوپراکسیددیسموتاز، سوپراکسید را به هیدروژن پراکسید تبدیل می کند و کاتالاز و انواع پراکسیداز تجزیه هیدروژن پراکسید را کاتالیز می کنند (Adams, 2003). آنزیم کاتالاز حساس به رادیکال-های سوپراکسید است و بنابراین افزایش سطوح آن‌ها در ریشه تحت تنش کادمیوم ممکن است باعث غیرفعالسازی آنزیم شود (Cakmak, 2000. کاهش فعالیت این آنزیم ممکن است با تجزیه‌ای که به‌وسیله پروتئازهای القا شده به‌وجود آمده، مرتبط باشد (Sandalio et al., 2001). همچنین این کاهش فعالیت احتمالاً در نتیجه اثر مضر تولید بیش از حد ROS یا مشتقات سمی ROS باشد (Chen et al., 2010). به‌طور آشکار فعالیت کاهش‌یافته کاتالاز به‌وسیله افزایش فعالیت آنزیم‌های تجزیه‌کننده دیگر جبران می‌شود (Mishra et al., 2006).

تحقیقات نشان داده است عناصر سنگین تولید هورمون‌های رشد را مهار کرده و باعث افزایش سنتز هورمون‌های مهار کننده رشد می‌شود که با افزوده شدن جیبرلین رشد افزایش می‌یابد (Thien Q et al., 2021). دلیل افزایش پارامترهای رشد در حضور جیبرلین رشد طولی اندام‌ها با تحریک رشد یاخته ای، تقسیم یاخته ای و فعالیت برخی از آنزیم‌های دیواره می باشد همچنین، این هورمون در سست شدن دیواره سلولی مورد نیاز برای طویل شدن سلول وگسترش ریشه چه دخالت دارد (Azevedo, 2003). جیبرلین جذب کلسیم را افزایش داده و در مقاومت گیاه به شرایط تنشی بوسیله تنظیم متابولیسمی آنتی اکسیدان‌ها و کاهش پراکسیداسیون لیپیدهای غشای

سلولی نقش دارد بدین ترتیب سبب بهبود رشد گیاه می‌گردد (Khan et al., 2003). جیبرلین تخریب کلروفیل را به تاخیر انداخته و سبب افزایش میزان نیتروژن برگ‌ها می گردد ، همچنین جیبرلین در به تاخیر انداختن تخریب ساختمان کلروپلاست نقش دارد (Abd and Sharaf, 2009).

گیاهان تیمار شده با جیبرلین و کلرورکادمیوم میزان پراکسیداسیون لیپیدی پایینی نشان دادند که این می تواند بدلیل انباشت پرولین باشد (Manzer et al., 2010) زیرا جیبرلین سبب کاتالیز تبدیل ATP به cAMP می‌شود که سبب القا بافت‌های هدف از طریق دریافت پیام هورمون بوسیله تاثیر بر روی فرآیندهای رونویسی منتهی به تحریک بیوسنتز پروتئین‌ها می‌گردد محققین زیادی افزایش میزان پروتئین کل را تحت تیمار جیبرلین در گیاهان مختلف از جمله لوبیا، باقلا و آفتابگردان گزارش کرده‌اند (Abd and Sharaf, 2009). همچنین گزارش شده است که جیبرلیک اسید با تاثیر مثبت بر جذب مواد معدنی در تامین کوفاکتورهای ضروری در آنزیم‌های آنتی اکسیدان نقش اساسی ایفا نموده و از این طریق در افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان نقش دارند (Panou-Philtheou et al., 2002). کاربرد جیبرلین در شرایط تنش موجب کاهش مقاومت روزنه ای شده و در نتیجه فتوسنتز ادامه یافته و تولید رادیکال‌های آزاد به حداقل می رسد و از ایجاد تنش‌های ثانوی مثل تنش اکسیداتیو که باعث تخریب پروتئین‌هاست جلوگیری می شود. از طرفی جیبرلین گیاه را به استفاده از آب در دسترس تحریک می‌کند (Hayssam et al., 2012) و با افزایش میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان سبب افزایش ظرفیت مکانیسم‌های سم زدایی گیاه و افزایش مقاومت به فلزات سنگین می شود و افزایش میزان پرولین سبب افزایش مقاومت گیاه به شرایط کمبود آب القا شده بوسیله تنش کادمیوم در گیاه می گردد که یک مکانیسم سازگاری به تنش کادمیوم در گیاه یونجه می‌باشد.

نتیجه‌گیری

به‌طورکلی نتایج اثر متقابل جیبرلین و کادمیوم در گیاه یونجه حاکی از تعدیل اثرات کلرورکادمیوم با استفاده از این هورمون است. احتمالا جیبرلین با آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از کادمیوم موجب کاهش اثرات سمی کادمیوم بر رشد، محتوای پروتئینی و جذب عناصر ضروری در گیاه یونجه شده است. بنابراین می توان جهت مقابله با اثرات تخریبی عناصر سنگین از هورمون‌های محرک رشد استفاده کرد. به‌طور کلی می توان اظهارکرد کاربرد جیبرلین می‌تواند شرایط منفی حاصل از تنش کادمیوم را کاهش دهد و فعالیت‌های آنزیمی گیاه را بهبود ببخشد.

References

1. **Abbasi, A., Maleki, A., babaei, F., safari, H. and rangin, A. (2022).** The effect of zinc sulfate and gibberellic acid on gas exchange and white bean (Phaseolus vulgaris)performance under drought stress. Journal of Plant Environmental Physiology.65(1): 1-19.
2. **Abd El-Monem, M. and Sharaf, I.I. (2009).** Role of gibberellic acid in abolishing the detrimental effects of Cd and Pb on broad and lupin plants. Res Journals of Agricultural and Biological Sciences Iran. 5: 668-673.
3. **Adams, B. (2003).** Linking the xanthophyll cycle with thermal energy dissipation. Photosynthesis Research 76: 73–80, 2003.
4. **Azevedo, A.M. (2003).** Horseradish peroxidase: a valuable tool in biotechnology. Biotechnol. Annual Reviews. 9:199-247.
5. **Bates, L.S., Waldren, R.P. and Teare, I.D.(1973).** Rapid determination of free

proline for water-stress studies. Plant and Soil .39:205–207.

6. **Benavids, M.P., Gallego, S.M. and Tomaro, M.L. (2005).** Cadmuim toxicity in plants. Braz. Journal Plant Physiology. 17: 21-34.
7. **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.
8. **Cance, B. and Maehly, C. (1995).** Assay of catalase and peroxidase, Methods in Enzymes. 11:764-775.
9. **Cakmak, I. (2000).** Possible roles of zinc in protecting plant cells from damage by reactive oxygen species. New Phytology, 146: 185-205
10. **Chaffei ,C.,Gouia, H. and Ghorbel, M.H.(2003).** Nitrogen metabolism in tomato plants under cadmium stress. Plant Nutrition.26:1617-1634.
11. **Chen, X., Wang, J., Shi, Y., Zhao, M.Q. and Chi, G.Y. (2011).** Effects of cadmium on growth and photosynthetic activities in pakchoi and mustard. Botanical Studies, 52: 41-46.
12. **Colodny, L.R., J, A.M. and Montgomery, A. (2001).** Houston M. The role of esterin processed alfalfa saponins in reducing cholesterol. Nutraceutical Association. 3: 6–15.
13. **Dazy, M., Jung, V. and Masfaraud, I. (2008).** Ecological recovery of vegetation on a coke-factory soil: role of plant anti oxidant enzymes and possible implication in site restoration. Chemosphere. 74: 57-63.
14. **Evans, G.C. and Hughes, A.P. (1962).** Plant growth and the aerial environment on the computation of unite leaf rate. New Phytologyst. 61,322-327.
15. **Ghaderian, S.M. and Jamali Hajiani, N. (2010).** Tolerance ,uptake and accumulation of cadmium in Matthiola chenopodiifolia Fisch and C.A. Mey (*Brassicaceae).* Plant Biology, 1389:87-98 .
16. **Giannopolitis, C.N. and Ries, S.K. (1977).** Superoxide dismutase Occurrence in higher plant. Plant Physiology, 59: 309-314.
17. **Hayssam, M., Manzer, A., Siddiqui, H., Mohammed, O. Mohamed, H., Al-Whaibi., Ahmed, M. and Abdullah, Al-Amri. (2012).** Effects of gibberellic acid on growth and photosynthetic pigments of *Hibiscus sabdariffa* L. under salt stress. African Journal of Biotechnology. 11: 800-804.
18. **Hegedus, A., Eradei, S. and Horvath, G. (2001).** Comparative studies of H_2O_2 detoxifying enzyme in green and greening barely seedling cadmium stress. Plant science. 160: 1085-1093.
19. **Hoagland, D.R and Arnon, D.I. (1950).** The water culture method for growing plants without soil. California Agricultural Experiment Station, Circular - 347.
20. **Khan, M.M., Gautam C., Mohamad, F., Siddiqui, M.H., Naeem, M. and Khan, M.N. (2006).** Effect of gibberellic Acid Spray on Performance of Tomato. Turkish Journal of Biology, 30: 11-16.
21. **Lee, D H., Kim, Y.S. and Lee, C.B. (2001).** The induction responses of the antioxidant enzymes by salt stress in the rice (*Oryza sativa* L.). Journal Plant Physiology. 158: 737-745.
22. **Lichenthaler, H.K. (1987).** Chlorophyll and carotenoid: Pigment of Photosynthetic Biomembranes, Methods in Enzymology.148: 350-382.
23. **Maleki, A., Fathim, A. and Bahamin, S. (2020).** The effect of gibberehhin hormone on yield, growth indces, and biochemical traits of corn (*Zea Mays* L.) under drought stress. Journal of Iranian Plant Eco Physiological Research, 15(59): 1-16.
24. **Manzer, H., Siddiqui, M.H., Whaibi, A. and Mohammed, O.B. (2010).** Interactive effect of calcium and gibberellin on nickel tolerance in relation to antioxidant systems in *Triticum aestivum* L.. Journal Protoplasma. 248: 503-511.
25. **Mishra, S. and Srivastava, S. (2006).** Phytochelatin synthesis and response of antioxidant during cadmium stress in *Bacopa monnieri* L. Plant physiology Biochemistry.44: 25-37.
26. **Palma, J.M., Sandalio, L.M. and Corpas, F. (2002).** Plant proteases

protein degradation and oxidative stress:role of peroxisomes. Plant Physiology Biochemistry.40:521-530 .

27. **Panou-Philtheou, H., Koukourikoupetridou, M., Bosabalidis, A. and Karataglis, S. (2002).** Relation of endogenousand applied gibberellins to growth and accumulation of essential elements in aregano plants grown in copper rich soils. Advances in Horticultural Science.16:63-71.
28. **Sandalio, L.M., Dalurzo, H.C. and Gomez, M. (2001).** Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. Exprimental Botany. 52: 2115-2126.
29. **Shi, G., Liu, C., Cai, Q., Liu, Q. and Hou, C. (2010).** Cadmium Accumulation and Tolerance of Two Safflower Cultivars in Relation to Photosynthesis and Antioxidantive Enzymes. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology.85:256–263.
30. **Thien, Q., Nguyen., V., Sesin. A., Kisiala, N. and Emery, R.J. (2021).** Phytohormonal Roles in Plant Responses to Heavy Metal Stress: Implications for Using Macrophytes in Phytoremediation of Aquatic Ecosystems. Environmental Toxicology and Chemistry, 40(1): 7–22.
31. **Van Assche, F. and Clijsters, H. (1990).** Effect of metals on enzyme activity in plants. Plants Cell Environment. 13: 195-206.
32. **Yang, X., Baligor, V.C., Mantest, D.C. and Clark, R.B. (1996).** Plant tolerance to Nickel toxicity: Influx, transport and accumulation of Nickel in four species. Journal of Nutrition. 19:73-85.