DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.2.15.1

اثر EDTA بر برخی خصوصیات فیزیولوژیکی سلمک اورشلیمی (*Chenopodium botrys* L.) تحت تنش کادمیوم

زهره شیرخانی

ایران، تهران، دانشگاه خوارزمی، دانشکده علوم زیستی، گروه علوم گیاهی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۲/۱۳

چکیده

کادمیوم یکی از آلاینده‌های اصلی خاک است. کاربرد EDTA در خاک یک استراتژی برای افزایش گیاه‌پالایی فلزات سنگین است، اما چنین کلات‌کننده‌هایی معمولا باعث سمیت گیاهی و عوارض جانبی می‌شوند. بنابراین، هدف مطالعه حاضر بررسی اثرات کاربرد EDTA بر ویژگی‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی سلمک اورشلیمی تحت سطوح تیماری مختلف کادمیوم در خاک بود. دراین پژوهش، اثر EDTA (صفر، ۳، ۶ و ۱۲ میلی‌مول در کیلوگرم) بر مقدار کادمیوم جذب شده توسط بافت‌های گیاهی، محتوای نسبی آب برگ، شاخص پایداری غشا، محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی، محتوای کربوهیدرات‌های محلول، محتوای پروتئین کل و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و الگوی پروتئین بذر سلمک اورشلیمی تحت تنش کادمیوم (صفر، ۷۵، ۱۵۰ و ۲۲۵ میلی‌گرم در کیلوگرم) بررسی شد. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که افزودن EDTA به خاک، غلظت کادمیوم اندام‌های هوایی و ریشه سلمک اورشلیمی تحت تیمار کادمیوم را افزایش داد. کاربرد EDTA باعث کاهش محتوای نسبی آب برگ، شاخص پایداری غشا و افزایش محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی و کربوهیدرات‌های محلول شد. همچنین تغییرات در الگوی پروتئین بذر، افزایش محتوای پروتئین کل و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در گیاهان تیمار شده با کادمیوم و EDTA مشاهده شد که نشان می‌دهد این تیمار در کاهش تنش اکسیداتیو در سلمک اورشلیمی تحت تیمار Cd مفید بوده است. بر اساس نتایج، سلمک اورشلیمی گیاهی مناسب برای گیاه‌پالایی خاک‌های آلوده به کادمیوم است. علاوه‌براین، EDTA می‌تواند نقش مهمی در حذف این فلز از طریق انتقال آن از خاک به گیاه داشته باشد.

واژه های کلیدی: تنش اکسیداتیو، تنش فلزات سنگین، عامل کلات‌کننده، گیاه‌پالایی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۲۱-۸۸۳۲۹۲۲۰-۳، پست الکترونیکی: z.shirkhani@khu.ac.ir

مقدمه

آلودگی فلزات سنگین ناشی از فعالیت‌های مختلف انسانی به دلیل سمیت، عدم تجزیه و تجمع زیستی، خطر زیادی را بر محیط‌زیست و سلامت انسان تحمیل می‌کند (۳۲). کادمیوم (Cd)، به‌عنوان یک فلز سنگین شناخته شده، در بافت‌های موجودات زنده انباشته می‌شود و حتی در غلظت‌های کم اثرات سمی دارد (۵۱). انواع مختلفی از روش‌های شیمیایی، فیزیکی و زیستی همانند گیاه‌پالایی برای پاکسازی خاک‌های آلوده وجود دارد (۲۹). گیاه‌پالایی به‌معنای استفاده از گیاهان برای حذف آلاینده‌های مختلف از مکان‌های آلوده، به‌عنوان یک فناوری مقرون به‌صرفه در نظر گرفته می‌شود که می‌تواند برای حذف برخی از فلزات سنگین به‌کار رود (۴۸). در گیاه‌پالایی خاک‌های آلوده به فلزات سنگین، از گیاهان انباشته کننده استفاده می‌شود. چنین گیاهانی می‌توانند فلزات را چندین برابر بیشتر از گونه‌های دیگر انباشته کنند (۵۰).

با توجه به محدودیت‌های گیاه‌پالایی، اخیراً، چندین استراتژی مانند تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی (۲، ۳۹و۵۳)،

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.2.15.1

عوامل کلات‌کننده (۲۷و۴۰)، بیوپلیمرها (۴۱) و ترکیبات آلی (۴) برای جذب غلظت‌های بسیار بیشتر فلزات سنگین توسعه یافته‌اند. یکی از روش‌های متداول برای افزایش کارایی گیاه‌پالایی استفاده از کلات‌کننده‌های مصنوعی مانند اتیلن‌دی‌آمین‌تترااستیک‌اسید (EDTA) است (۲۷). مولکول EDTA یک لیگاند شش دندانه‌ای است و شش مکان بالقوه برای پیوند با یون‌های فلزی دارد که شامل چهار گروه کربوکسیل و دو گروه آمین می‌باشد. علاوه‌براین خصوصیت آنیونی EDTA بر تثبیت و تحکیم کمپلکس کمک می‌کند. به‌خصوص چهار اکسیژن کربوکسیلات می‌توانند جاذبه الکترواستاتیکی قوی با کاتیون فلزات ایجاد کنند (۱۵).

عوامل کلات‌کننده میل ترکیبی زیادی با کاتیون‌های فلزی مختلف داشته و به آسانی به‌صورت یک کمپلکس کلات-فلز از ریشه‌های گیاه به سمت اندام‌های هوایی جابجا می‌گردند. بنابراین عوامل کلات‌کننده به‌طور همزمان جذب و جابجایی فلزات سنگین را افزایش می‌دهند و از طرف دیگر، به‌واسطه‌ی تشکیل کمپلکس با یون‌های فلزی قادر به کاهش سمیت کاتیون‌های فلزی آزاد در گیاه نیز می‌باشند (۴۶).

در مطالعه‌ای که به منظور بررسی اثر EDTA و کادمیوم بر دو گونه *Brasica carinata* و *B. juncea* انجام گرفت مشخص شد که کاربرد EDTA سبب افزایش معنی‌دار ارتفاع، وزن تر و خشک اندام هوایی، طول ریشه، وزن تر و خشک ریشه و تجمع فلزات سنگین در هر دو گونه شد (۲۰). در پژوهش دیگر اثرات کادمیوم، کروم، مس، نیکل و سرب به صورت جداگانه و با استفاده همزمان از EDTA در محلول غذایی هوگلند بر اطلسی بررسی شد. نتایج نشان‌دهنده جذب بیشتر کادمیوم، کروم، نیکل و سرب در قسمت‌های هوایی، و مس در ریشه‌ها بود که با به‌کارگیری EDTA این میزان افزایش یافت. این جذب با تغییراتی در شاخص‌های بیوشیمیایی از جمله افزایش مالون‌دی‌آلدهید (MDA)، محتوای H_2O_2 و نشت الکترولیت همراه بود (۲۳). محمدی و همکاران (۲۰۲۱)(۳۱) نشان دادند که استفاده از EDTA اثرات سمی جیوه را با تغییر در ترکیبات فنلی، کلات شدن با جیوه و کده‌بندی مناسب آن بهبود می‌بخشد. نتایج مطالعات بر روی گندم و کاهوکلش نشان داد که کاربرد EDTA حلالیت سرب و کادمیوم را در محلول خاک افزایش داده و منجر به افزایش جذب سرب در کاهو-کلش و دانه گندم و کادمیوم در کاهوکلش گردید (۷).

برای این مطالعه سلمک اورشلیمی انتخاب شد. این گونه گیاهی مقاوم به تنش‌های محیطی و دارای سیستم ریشه‌ای گسترده و زیست‌توده مناسب است. سلمک اورشلیمی گیاهی یکساله متعلق به تیره اسفناج (Chenopodiaceae) است. این گونه به ارتفاع ۴۰ سانتی‌متر، افراشته، پوشیده از کرک‌های غده‌ای معطر است. پراکندگی این گونه در ایران شمال، شمال‌غرب، غرب، مرکز، شمال‌شرق و جنوب شرق کشور است (۱). در مطالعات قبلی نشان داده شده است که این گونه می‌تواند به‌عنوان گیاه انباشته کننده کادمیوم مورد استفاده قرار گیرد (۲۸). همچنین به خوبی ثابت شده است که EDTA انتقال فلزات سنگین را در ریشه و ساقه گیاهان افزایش می‌دهد (۴۰)، اما هیچ مدرکی وجود ندارد که آیا استفاده از این عامل کلات‌کننده می‌تواند برای سلمک اورشلیمی عوارض جانبی به همراه داشته باشد یا خیر، از این رو در این مطالعه اثر کادمیوم و EDTA بر خصوصیات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی سلمک اورشلیمی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

انتخاب بذر و آماده کردن محیط کشت: بذرهای *Chenopodium botrys* L. (سلمک اورشلیمی، درمنه ترکی) در سینی‌های مخصوص کشت حاوی کوکوپیت و پرلیت کاشته شدند. بعد از جوانه‌زنی دانه‌رست‌های سالم در مرحله۳-۲ برگ حقیقی به گلدان‌هایی با ارتفاع ۲۱ سانتی‌متر و قطر ۲۰ سانتی‌متر حاوی ۴ کیلوگرم خاک

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.2.15.1

منتقل شدند. تراکم کشت برای هر گلدان یک بوته در نظر گرفته شد. گلدان‌ها در گلخانه‌ی تحقیقاتی با میانگین دمای ۵±۲۵ درجه‌ی سانتیگراد، شدت نور ۸۵ میلی‌مول بر متر مربع در ثانیه و رطوبت نسبی ۶۵ درصد قرار گرفتند.

مشخصات اولیه خاک: قبل از انتقال نمونه‌ها به خاک، خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک تعیین و اندازه‌گیری شد (۴۳). مشخصات خاک در جدول ۱ ارائه شده است.

جدول ۱- برخی از خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک مورد آزمایش

بافت	لومی
شن (درصد)	۲۸/۳۹
سیلت (درصد)	۴۴/۵۶
رس (درصد)	۱۶/۱۶
pH	۷/۵۲
T.n.v (درصد)	۱۰
هدایت الکتریکی(دسی‌زیمنس برمتر)	۰/۰۸
ماده آلی (درصد)	۱/۱۰
پتاسیم قابل دسترس (میلی‌گرم در کیلوگرم)	۱۸۸
فسفر قابل دسترس (میلی‌گرم در کیلوگرم)	۱۹/۶

تیمار کادمیوم و EDTA: در این آزمایش خاک خشک به‌طور دستی با کلریدکادمیوم (Merck, Germany) آلوده گردید. برای این منظور کلریدکادمیوم به صورت پودر با خاک مخلوط شده و از یک الک با قطر ۲ میلی‌متر عبور داده شد و برای مدت دو هفته در شرایط گلخانه به‌منظور متعادل‌سازی نگهداری گردید. در این مطالعه از ۴ سطح کلریدکادمیوم (صفر، ۷۵، ۱۵۰ و ۲۲۵ میلی‌گرم در کیلوگرم) استفاده شد (۴۰). برای بررسی میزان آب‌شوئی کادمیوم، از گلدان‌های حاوی خاک و فاقد گیاه استفاده شد. با توجه به ناچیز بودن مقدار آب‌شویی و عدم اختلاف معنی‌دار با گروه‌های تیماری نتایج در آنالیزهای آماری اعمال نگردید.

به منظور بررسی اثر عامل کلات‌کننده مصنوعی بر گیاه‌پالایی چهار غلظت EDTA (صفر، ۳، ۶ و ۱۲ میلی‌مول در کیلوگرم) به خاک گلدان‌ها با چهار سطح کادمیوم (صفر، ۷۵، ۱۵۰ و ۲۲۵ میلی‌گرم در کیلوگرم) اضافه شد (۴۰).

سنجش کادمیوم کل خاک: به منظور سنجش کادمیوم، نمونه‌های خاک (۳ گرم) به مدت ۱۶ ساعت در ظروف شیشه‌ای و در دمای آزمایشگاه با مخلوطی از اسیدهیدروکلریک (۳۷ درصد) و اسیدنیتریک (۷۰ درصد)، به ترتیب به میزان ۲۱ و ۷ میلی‌لیتر، قرار گرفتند. پس از آن، نمونه‌ها در دمای ۱۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت زیر هود هضم شدند. سپس سوسپانسیون تهیه شده، فیلتر و با اسیدنیتریک (۰/۵ مولار) رقیق و به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. نمونه‌ها تا زمان آنالیز کادمیوم در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. غلظت کادمیوم کل با استفاده از دستگاه جذب اتمی (Varian Spectra AA220FS) قرائت شد (۳۴).

سنجش کادمیوم در بافت‌های گیاهی: بافت‌های گیاهی به دقت با آب شهری و آب دیونیزه شسته و در دمای ۷۰ درجه توسط آون خشک گردیدند. به‌منظور تعیین غلظت کادمیوم بافت گیاهی، به پودر خشک ریشه و اندام‌های هوایی اسیدنیتریک غلیظ افزوده شد. نمونه‌ها به مدت یک ساعت در دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد در حمام آب گرم قرار گرفتند. سپس آب‌اکسیژنه ۲۰ درصد به آن‌ها افزوده شد، نمونه‌ها پس از سرد شدن، صاف و با آب مقطر به

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.2.15.1

حجم ۵۰ میلی‌لیتر رسانده شدند. غلظت کادمیوم توسط دستگاه جذب اتمی اندازه‌گیری گردید (۴۴).

محاسبه فاکتورهای تجمع زیستی (BCF) و انتقال (TF): فاکتورهای تجمع زیستی (Bioconcentration Factor) و انتقال (Translocation factor) برای تعیین بازده گیاه‌پالایی کادمیوم محاسبه گردیدند. فاکتور تجمع زیستی عبارتست از غلظت فلزات سنگین در ریشه (میلی‌گرم در کیلوگرم) نسبت به غلظت فلزات سنگین در خاک (میلی‌گرم در کیلوگرم). فاکتور انتقال نسبت غلظت فلز در اندام هوایی (میلی‌گرم در کیلوگرم) به غلظت فلز در ریشه (میلی‌گرم در کیلوگرم) می‌باشد (۵۲).

تعیین شاخص پایداری غشا سلول (MSI): کادمیوم با تغییر در ترکیبات لیپیدی عمکلرد غشا را دستخوش تغییر می‌کند. به منظور بررسی اثر کادمیوم بر غشا، شاخص پایداری غشا بر اساس میزان هدایت الکتریکی حاصل از نشت یون‌ها از سلول‌های برگ به درون آب دیونیزه اندازه-گیری شد. ۰/۱ گرم برگ تازه در ۱۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه غوطه‌ور گردید، سپس در حمام آب گرم در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد و پس از طی این زمان هدایت الکتریکی نمونه‌ها به کمک ECمتر اندازه‌گیری شد. گروه دوم از نمونه‌ها در حمام آب گرم به مدت ۳۰ دقیقه و در دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد قرار داده شده و پس از رسیدن به دمای اتاق، هدایت الکتریکی آن‌ها اندازه‌گیری شد. در نهایت اعداد حاصله در فرمول زیر جایگذاری و شاخص پایداری غشا سلول محاسبه گردید (۳۷).

$$MSI\ (Membrane\ stability\ index) = (1- EC1/EC2)100$$

EC1: هدایت الکتریکی نمونه‌های آزمایشی در زمان ۱۰ دقیقه

EC2: هدایت الکتریکی نمونه‌های آزمایشی در زمان ۳۰ دقیقه

سنجش محتوای نسبی آب بافت (RWC): کاهش محتوای نسبی آب بافت سبب کاهش پایداری غشا می-گردد. بدین منظور از آخرین برگ نمو یافته همه گروه‌های تیماری و شاهد برای سنجش محتوای نسبی آب بافت نمونه‌برداری صورت گرفت. وزن تر نمونه‌ها بلافاصله اندازه‌گیری و سپس تمامی نمونه‌ها در آب مقطر به مدت ۲۴ ساعت در یخچال و در دمای چهار درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از ۲۴ ساعت، وزن اشباعی برگ‌ها اندازه‌گیری و برگ‌ها مجدداً به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد در آون قرار داده شدند. وزن خشک هر نمونه اندازه‌گیری شد. با قرار دادن اعداد حاصل از توزین در فرمول زیر، مقدار نسبی آب بافت محاسبه گردید (۷).

$$RWC\ (Relative\ water\ content) = ((Wf-Wd) / (Wt-Wd)) \times 100$$

Wf: وزن تازه

Wd: ورن خشک

Wt: وزن اشباع

سنجش رنگیزه‌های فتوسنتزی: به منظور سنجش محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی از استون ۸۰ درصد استفاده شد. سنجش در مرحله زایشی گیاه انجام شد. میزان جذب در طول موج‌های ۶۴۶/۸، ۶۶۳/۲ و ۴۷۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (مدلBiowave II انگلستان) ثبت گردید. میزان کلروفیل a، b، کلروفیل کل و کاروتنوئیدها در هر یک از نمونه‌ها با استفاده از فرمول‌های زیر بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر محاسبه گردید (۲۷):

$$C_a = ۱۲/۲۵A_{۶۶۳/۲} - ۲/۷۹A_{۶۴۶/۸}$$

$$C_b = ۲۱/۵۰A_{۶۴۶/۸} - ۵/۱۰A_{۶۶۳/۲}$$

$$Tchl = C_a + C_b$$

$$C_{x+c} = (۱۰۰۰A_{۴۷۰} - ۱/۸۲C_a - ۸۵۲/۰۲C_b)/۱۹۸$$

C_a: غلظت کلروفیل a

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.2.15.1

C_b: غلظت کلروفیل b

Tchl: کلروفیل کل

C_{x+c}: غلظت کاروتنوئیدها

سنجش کربوهیدرات‌های محلول: سنجش قندهای محلول با استفاده از روش فنل- اسیدسولفوریک انجام گرفت. ۰/۱ گرم از برگ خشک در ۱۰ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد ریخته شد و پس از یک هفته، ۰/۵ میلی‌لیتر از بخش رویی محلول با آب مقطر به حجم ۲ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس ۱ میلی‌لیتر فنل ۵ درصد اضافه و مخلوط خوب بهم زده شد و در ادامه به آن ۵ میلی‌لیتر اسیدسولفوریک غلیظ اضافه گردید. حدود نیم ساعت پس از خنک شدن کامل محلول، جذب آن توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۸۵ نانومتر خوانده شد. برای اندازه‌گیری مقدار قند از منحنی استاندارد تهیه شده از گلوکز استفاده گردید (۲۴).

استخراج عصاره پروتئینی: جهت استخراج عصاره پروتئینی از برگ تر گیاه و بافر فسفات (۶ pH) استفاده شد. نمونه برگ تا مرحله همگن‌سازی سائیده شد. بعد از ۱۰ دقیقه با دستگاه سانتریفیوژ (Sigma, 1-16 k; Germany) با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه، سانتریفیوژ و محلول رویی برداشته شد.

سنجش محتوای پروتئین کل: سنجش کمی پروتئین‌ها با استفاده از روش برادفورد انجام گرفت. پنج میلی‌لیتر معرف برادفورد به ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره پروتئینی در لوله آزمایش اضافه شد و مخلوط به سرعت ورتکس گردید. جذب نمونه‌ها پس‌از ۲۵ دقیقه با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول‌موج ۵۹۵ نانومتر خوانده‌شد. محتوای پروتئین کل بر اساس میلی‌گرم بر گرم وزن تر نمونه با استفاده از منحنی استاندارد سرم آلبومین گاوی (BSA) گزارش گردید (۹).

سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز: فعالیت آنزیم پراکسیداز (POX) در برگ‌ها با استفاده از گایاکول به‌عنوان سوبسترا تخمین زده شد. مخلوط واکنش حاوی ۰/۰۵ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی، ۰/۹۵ میلی‌لیتر بافر استات (۰/۱ مولار، ۴/۶ pH)، ۱ میلی‌لیتر آب‌اکسیژنه (۱۶ میلی‌مولار) و ۱ میلی‌لیتر محلول گایاکول (۱۵ میلی‌مولار) تهیه شد. جذب نوری محلول در طول موج ۴۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری گردید (۲۶). در نهایت فعالیت آنزیم برحسب واحد جذب در دقیقه به ازای هر میلی‌گرم پروتئین در گرم وزن تر نمونه محاسبه گردید.

فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز: فعالیت آنزیم پلی‌فنل-اکسیداز (PPO) با تغییرجذب در طول موج ۴۳۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. مخلوط واکنش شامل بافر فسفات ۲۰۰ میلی‌مولار (۶/۸ pH)، پیروگالول ۱۰ میلی‌مولار و عصاره آنزیمی بود (۳۵). فعالیت آنزیم برحسب واحد جذب در دقیقه به ازای هر میلی‌گرم پروتئین در گرم وزن تر نمونه محاسبه گردید.

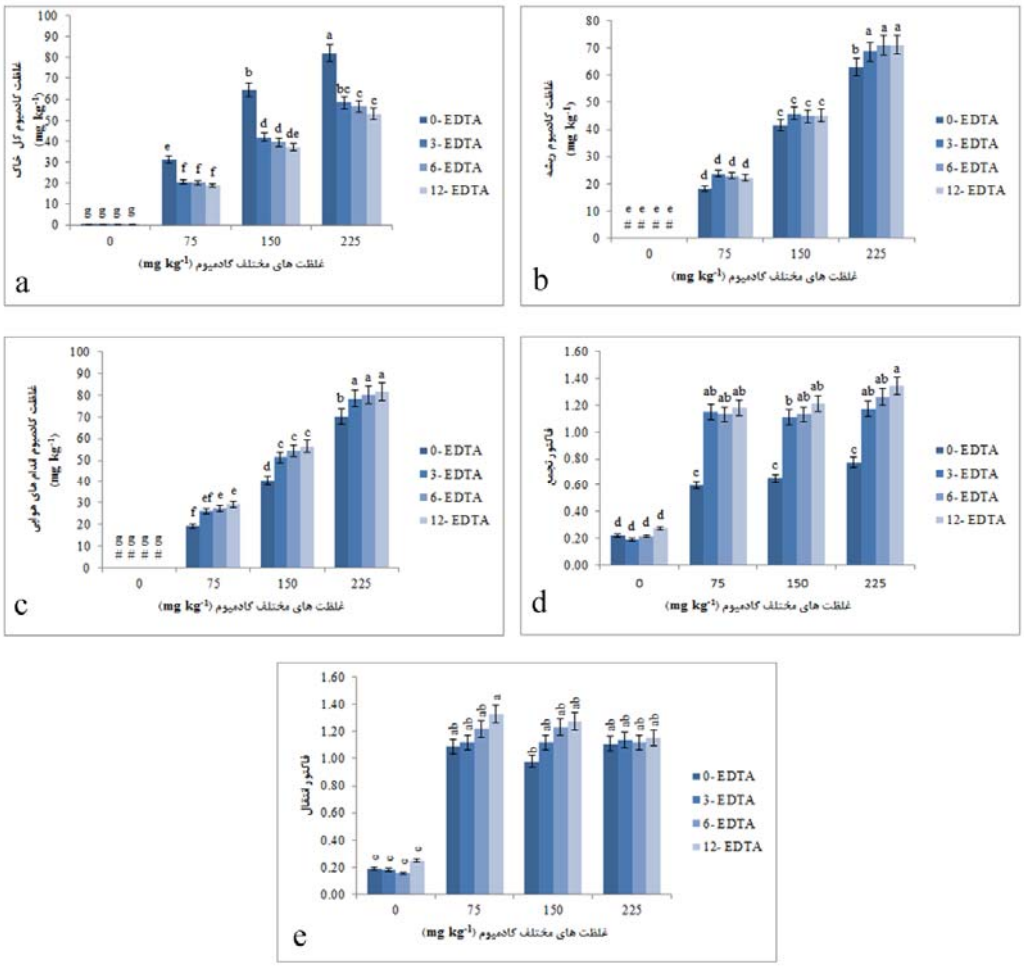
مطالعه پروتئین‌های بذر به روش الکتروفورز: الکتروفورز پروتئین‌های بذر روی ژل پلی‌اکریل‌آمید (۱۲ درصد) در حضور دودسیل سولفات انجام گرفت. برای استخراج پروتئین بذر از بافر فسفات‌سدیم (۷ pH) به نسبت ۵ :۱ (W/V) استفاده شد. عصاره پروتئینی استخراج شده با بافر نمونه به نسبت ۱ به ۳ مخلوط گردید و در حمام آب گرم به مدت ۵ دقیقه حرارت داده شد. پس از اتمام الکتروفورز، رنگ‌آمیزی ژل با رنگ کوماسی‌برلیانت‌بلو R_{250} صورت گرفت. برای انجام الکتروفورز از دستگاه الکتروفورز کمپانی Bio- Rad (USA) استفاده شد الکتروفورز با ولتاژ ثابت ۱۱۰ ولت انجام گرفت. پس از چند مرحله رنگ‌بری ژل، با استفاده از اسکنر از آن عکس تهیه و تغییرات باندها مورد مطالعه و مقایسه گردید (۱۷).

بررسی‌های آماری: در این مطالعه، تمام محاسبات آماری با حداقل۳ تکرار با استفاده از نرم‌افزار SAS (version 9.1) توسط آزمون مقایسه‌ای دانکن به صورت آزمایش فاکتوریل و در قالب طرح پایه کاملا تصادفی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.2.15.1

نتایج

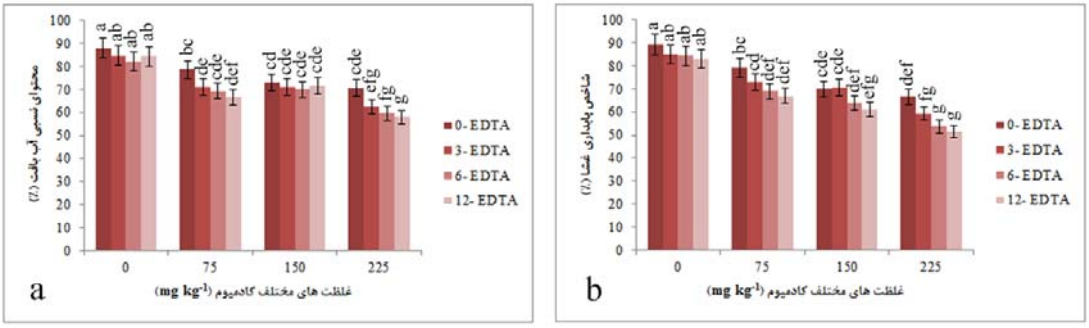
اثر EDTA بر جذب و انتقال کادمیوم: افزودن EDTA (۳، ۶ و ۱۲ میلی‌مول در کیلوگرم) به‌عنوان یک کلات کننده، باعث کاهش معنی‌دار ($P \leq ۰/۰۱$) غلظت کادمیوم کل باقیمانده در خاک شد (شکل ۱ a). در مقابل، استفاده از EDTAبه‌طور معنی‌داری باعث افزایش غلظت کادمیوم در ریشه (در غلظت ۲۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم کادمیوم) و اندام‌های هوایی گیاهان تحت تیمار با کادمیوم گردید ($P \leq ۰/۰۱$). با افزایش غلظت EDTA، تجمع کادمیوم در ریشه و اندام‌های هوایی افزایش یافت. با کاربرد ۱۲ میلی-مول در کیلوگرم EDTA (12-EDTA) در تیمار ۲۲۵ میلی-گرم در کیلوگرم کادمیوم، مقدار جذب کادمیوم در ریشه و اندام هوایی به ۷۱/۱۸ و ۸۱/۶۸ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن خشک رسید که این مقدار در گروه شاهد (تیمار ۲۲۵ میلی‌گرم در کیلوگرم کادمیوم) به ترتیب ۷۰/۲۷ و ۶۳/۰۲ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن خشک بود (شکل ۱ b و c). با توجه به تجزیه و تحلیل داده‌ها، BCF و TF در گروه‌های تحت تیمار با EDTA افزایش یافت (شکل ۱ d و e). تیمار ۱۲ میلی‌مول در کیلوگرم EDTA بالاترین میزان BCF (۱/۳۴) و TF (۱/۳۳) را در میان تمام تیمارها دارا بود. در فاکتور تجمع و انتقال بین سطوح مختلف EDTA اختلاف آماری معنی‌دار وجود ندارد.



شکل ۱- اثر EDTA بر جذب و انتقال کادمیوم در سلمک اورشلیمی. (a) غلظت کادمیوم کل باقیمانده در خاک؛ (b) غلظت کادمیوم در ریشه؛ (c) غلظت کادمیوم در اندام‌های هوایی؛ (d) فاکتور تجمع و (e) فاکتور انتقال. هر ستون معرف میانگین ۳ تکرار است. حروف متفاوت نمایانگر گروه‌های با تفاوت آماری معنی‌دار است. # نشان‌دهنده‌ی مقادیر کمتر از ۰/۲ میلی‌گرم در کیلوگرم است.

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.2.15.1

اثر EDTA بر محتوای نسبی آب بافت و شاخص پایداری غشاء: تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از آزمون مقایسه‌ای دانکن نشان داد که اثر EDTA بر سنجش محتوای نسبی آب بافت و شاخص پایداری غشاء در گیاهان تحت تیمارهای مختلف کادمیوم معنی‌دار است ($P \leq ۰/۰۱$). بالاترین میزان افزایش محتوای نسبی آب بافت و شاخص پایداری غشاء (به ترتیب ۸۸ و ۸۹/۳۳ درصد) در گروه شاهد و کمترین میزان (به ترتیب ۵۸/۰۰ و ۵۱/۶۶ درصد) در گروه تیماری ۲۲۵ میلی‌گرم در کیلوگرم کادمیوم و ۱۲ میلی‌مولار EDTA مشاهده شد (شکل ۲ a و b).



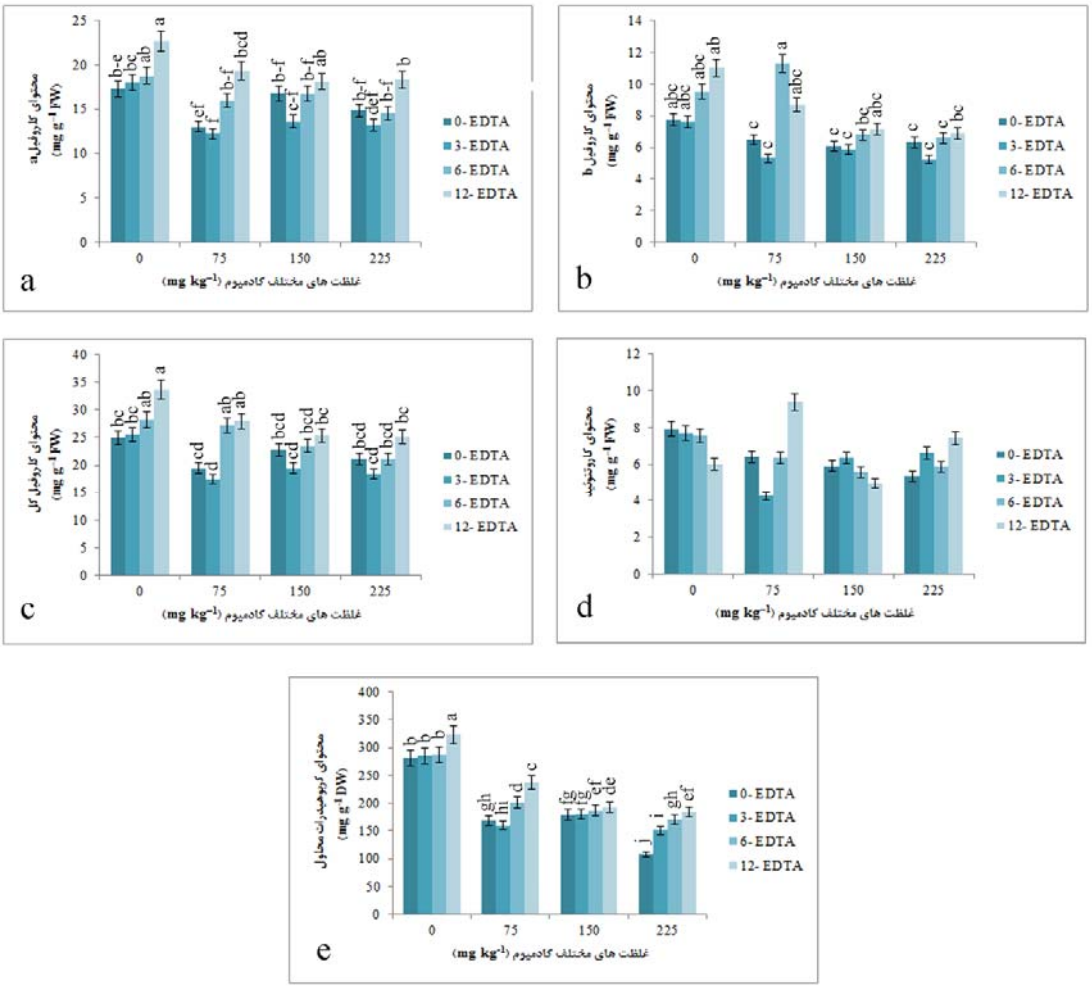
شکل ۲- اثر EDTA بر محتوای نسبی آب بافت و شاخص پایداری غشا در سلمک اورشلیمی تحت تیمار کادمیوم. (a) محتوای نسبی آب بافت (درصد) و (b) شاخص پایداری غشا (درصد). هر ستون معرف میانگین ۳ تکرار است. حروف متفاوت نمایانگر گروه‌های با تفاوت آماری معنی‌دار است.

اثر EDTA بر محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی: بررسی‌های آماری نشان داد که تحت تیمار EDTA افزایش در محتوای کلروفیل a و کلروفیل کل در سطح احتمال ($P \leq ۰/۰۱$) و افزایش در محتوای کلروفیل b در سطح احتمال ($P \leq ۰/۰۵$) معنی‌دار می‌باشد. EDTA بر محتوای کاروتنوئیدها بی‌اثر بود. محتوای کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل کل در تیمار ۲۲۵ میلی‌گرم در کیلوگرم کادمیوم و ۱۲ میلی‌مول در کیلوگرم EDTA به ترتیب ۱۸/۳۳، ۶/۸۸ و ۲۵/۲۱ میلی‌گرم در گرم وزن تر رسید که این مقدار در نمونه‌های شاهد (تیمار ۲۲۵ میلی‌گرم در کیلوگرم کادمیوم) به ترتیب ۱۴/۸۷، ۶/۳۱ و ۲۱/۱۷ میلی‌گرم در گرم وزن تر بود (شکل ۳ a-d).

اثر EDTA بر محتوای کربوهیدرات‌های محلول: آنالیز داده‌های به‌دست آمده از سنجش محتوای کربوهیدرات‌های محلول سلمک اورشلیمی نشان داد که اثر EDTA در حضور کادمیوم بر افزایش محتوای کربوهیدرات‌های محلول در سطح احتمال ($P \leq ۰/۰۱$) معنی‌دار بوده است. افزایش محتوای کربوهیدرات‌های محلول در نمونه تحت تیمار ۷۵ میلی‌گرم در کیلوگرم کادمیوم و ۱۲ میلی‌مول در کیلوگرم EDTA، ۴۳/۵۱ درصد بود (شکل ۳ e).

اثر EDTA بر محتوای پروتئین کل و فعالیت آنزیمی: نتایج آنالیزهای آماری نشان داد که اثر EDTA بر محتوای پروتئین کل، فعالیت آنزیم پراکسیداز و پلی‌فنل‌اکسیداز در حضور کادمیوم معنی‌دار بود ($P \leq ۰/۰۱$). محتوای پروتئین کل در برگ سلمک اورشلیمی که تحت تیمار با ۷۵ میلی‌گرم در کیلوگرم کادمیوم و ۱۲ میلی‌مول در کیلوگرم EDTA بود ۱/۷۴ بار نسبت به گروه شاهد (تحت تیمار با ۷۵ میلی‌گرم در کیلوگرم کادمیوم) افزایش یافت. اختلاف آماری معنی‌دار بین محتوای پروتئین کل در سطوح مختلف EDTA وجود نداشت. کمترین مقدار پروتئین کل در تیمار صفر کادمیوم (۰/۷۶ میلی‌گرم بر گرم وزن تر برگ) و بیشترین مقدار آن در تیمار ۲۲۵ میلی‌گرم در کیلوگرم کادمیوم و ۱۲ میلی‌مول در کیلوگرم EDTA (۵/۲۰ میلی‌گرم بر گرم وزن تر برگ) مشاهده شد (شکل ۴ a).

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.2.15.1



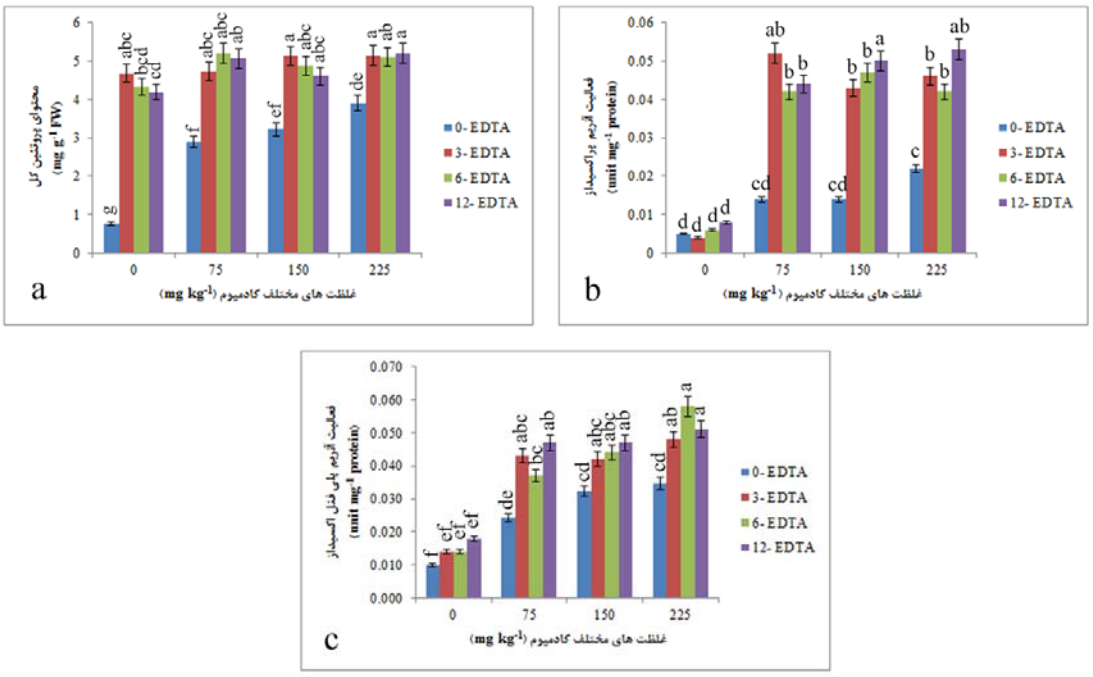
شکل ۳- اثر EDTA بر محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی و محتوای کربوهیدرات‌های محلول در سلمک اورشلیمی تحت تیمار کادمیوم. (a) محتوای کلروفیل a؛ (b) محتوای کلروفیل b؛ (c) محتوای کلروفیل کل؛ (d) محتوای کاروتنوئید و (e) محتوای کربوهیدرات‌های محلول. هر ستون معرف میانگین ۳ تکرار است. حروف متفاوت نمایانگر گروه‌های با تفاوت آماری معنی‌دار است.

فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و پلی‌فنل‌اکسیداز در همه‌ی گروههای تحت تیمار کادمیوم و EDTA افزایش معنی‌دار یافت. بالاترین مقدار فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز (۰/۰۵۳ واحد جذب در دقیقه به ازای هر میلی‌گرم پروتئین) و پلی-فنل‌اکسیداز (۰/۰۵۸ واحد جذب در دقیقه به ازای هر میلی‌گرم پروتئین) به ترتیب در گروه‌های ۲۲۵ میلی‌گرم در کیلوگرم کادمیوم و ۱۲ میلی‌مول در کیلوگرم EDTA و ۲۲۵ میلی‌گرم در کیلوگرم کادمیوم و ۶ میلی‌مول در کیلوگرم EDTA مشاهده شد. کمترین مقدار فعالیت آنزیم-های پراکسیداز (۰/۰۰۵ واحد جذب در دقیقه به ازای هر میلی‌گرم پروتئین) و پلی‌فنل‌اکسیداز (۰/۰۱ واحد جذب در دقیقه به ازای هر میلی‌گرم پروتئین) در گروه تیماری فاقد کادمیوم و EDTA گزارش شد (شکل ۴ b و c).

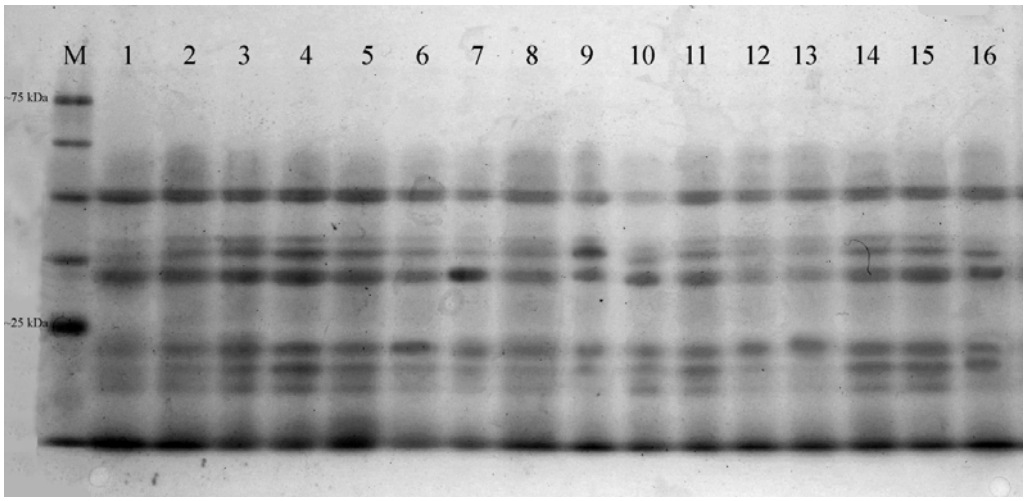
اثر EDTA بر الگوی پروتئین بذر: بررسی الگوی پروتئینی بذر سلمک اورشلیمی تغییر در میزان پروتئین بذر در نمونه‌های تیمار شده با کادمیوم و EDTA نسبت به گروه‌های شاهد را نشان داد. نتایج نشان داد که تراکم و غلظت باندهای پروتئینی در نمونه‌های تیماری شده با کادمیوم بیشتر از نمونه شاهد بود. افزایش در میزان پروتئین بذر در گروههای تحت تیمار کادمیوم و EDTA نسبت به

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.2.15.1

گروه‌های تیماری با کادمیوم مشاهده شد. این افزایش به صورت افزایش در تراکم، غلظت و همچنین تعداد باند بود (شکل ۵).



شکل ۴- اثر EDTA بر محتوای پروتئین کل و فعالیت آنزیمی در سلمک اورشلیمی تحت تیمار کادمیوم. (a) محتوای پروتئین کل؛ (b) فعالیت آنزیم پراکسیداز و (c) فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز. هر ستون معرف میانگین ۳ تکرار است. حروف متفاوت نمایانگر گروه‌های با تفاوت آماری معنی‌دار است.



شکل ۵- مقایسه نیمرخ الکتروفورزی پروتئین‌های بذر سلمک اورشلیمی در گروه‌های تحت تیمار کادمیوم و EDTA. M: مارکر پروتئینی؛ 1، 0-Cd + 0-EDTA؛ 2، 0-Cd + 3-EDTA؛ 3، 0-Cd + 6-EDTA؛ 4، 0-Cd + 12-EDTA؛ 5، 75-Cd + 0-EDTA؛ 6، 75-Cd + 3-EDTA؛ 7، 75-Cd + 6-EDTA؛ 8، 75-Cd + 12-EDTA؛ 9، 150-Cd + 0-EDTA؛ 10، 150-Cd + 3-EDTA؛ 11، 150-Cd + 6-EDTA؛ 12، 150-Cd + 12-EDTA؛ 13، 225-Cd + 0-EDTA؛ 14، 225-Cd + 3-EDTA؛ 15، 225-Cd + 6-EDTA؛ 16، 225-Cd + 12-EDTA.

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.2.15.1

بحث و نتیجه گیری

وجود سطوح بالای فلزات سنگین در محیط‌زیست به دلیل سمیت بالا و تمایل به انباشته‌سازی در محیط‌زیست و پایداری در اکوسیستم یک تهدید بالقوه برای سلامت انسان و اکوسیستم‌ها است (۴۵). جهت ارزیابی توان گیاه‌پالایی و بهبود توان گیاه‌پالایی سلمک اورشلیمی از سطوح مختلف کادمیوم به صورت تیمار خاک همراه با EDTA به‌عنوان یک کلات کننده مصنوعی استفاده شد. EDTA یک کلات-کننده شش دندانه است که توانایی اتصال به یون‌های فلزی را از طریق گروه‌های کربوکسیل و آمین دارد (۱۸).

در تحقیق حاضر غلظت کادمیوم در حضور EDTA در بافت‌های گیاهی افزایش پیدا کرد؛ این نتیجه در مطالعه بر روی *Helianthus annuus* نیز مشاهده شده است. در این مطالعه مشخص گردید که EDTA سبب افزایش حلالیت فلز در خاک و به دنبال آن افزایش غلظت در بافت‌های *H. annus* شده است (۴۷). مهم‌ترین دلیل در افزایش جذب کادمیوم می‌تواند مربوط به اثر افزایشی EDTA بر روی حلالیت کادمیوم باشد (۲۱). در واقع وجود پیوندهای آلی-فلزی در ترکیبات کلات و فلزات سبب می‌شود فلزات کمتر در معرض کلوئیدها، هیدروکسیدها و اکسیدها قرار گرفته و مانع از رسوب و تثبیت آن‌ها در خاک شوند. از طرفی کلات‌ها توسط ریشه‌ی گیاهان قابل جذب بوده و می‌توانند فلزات را از فاز جامد و غیرمحلول به فازهای تبادلی انتقال داده و در نهایت میزان جذب توسط گیاهان را افزایش دهند (۱۰). همچنین مشخص شده که کمپلکس-های کلات- فلز می‌توانند از طریق شکاف‌های اندودرمی ریشه و نوار کاسپاری وارد ریشه شده، به سرعت به اندام-های هوایی منتقل گردند (۶). مطالعات نشان داده است که EDTA تشکیل کمپلکس فلزی می‌دهد که باعث افزایش و تسهیل تحرک فلز در گیاه می‌شود، در نتیجه افزایش انتقال فلز از ریشه به اندام‌های هوایی امکان‌پذیر می‌گردد (۳۰و۴۸). نتایج مشابه در گیاهان دیگر برای فلزات سنگین از جمله کادمیوم گزارش شده است (۱۱و۱۲). در این مطالعات محققین به این نتیجه رسیدند که گیاه‌پالایی به کمک مواد شیمیایی یکی از روش‌های سودمند، مؤثر و پایدار برای زیست‌پالایی است. بر اساس نتایج پژوهش حاضر و نتایج مطالعات قبلی می‌توان نتیجه‌گیری کرد که EDTAیک کلات‌کننده غیرسمی است که می‌تواند با افزایش حلالیت و دسترس‌پذیری فلزات در خاک توانایی زیست‌پالایی گیاهان را افزایش دهد.

در این مطالعه نشان داده شد که EDTA سبب کاهش محتوای نسبی آب بافت و شاخص پایداری غشا سلمک اورشلیمی در حضور کادمیوم می‌شود. تجمع پرولین و آمینواسیدهای آزاد در پاسخ به تنش کادمیوم، دلیل مناسبی برای کاهش در میزان نسبی آب بافت و به‌وجود آوردن خشکی فیزیولوژیک در گیاه است (۶). تحقیقات نشان داده که EDTA سبب سیال شدن و خروج اجزا لیپیدی غشا و در نتیجه از بین رفتن پایداری غشا، کاهش محتوای آب و لیز سلول می‌گردد (۳۸). در مطالعه اثر سرب و EDTA بر روی *H. annus* مشخص شد که سرب یا EDTA به تنهایی اثر کاهشی و به‌کارگیری هر دو با یکدیگر در برخی غلظت‌ها و ارقام اثر افزایشی بر محتوای آب بافت دارد که در تطابق با پژوهش حاضر نمی‌باشد (۳۳).

انواع مختلفی از رنگیزه‌ها مانند کلروفیل، گزانتوفیل، کاروتنوئیدها و غیره در گیاهان وجود دارد. کلروفیل‌ها فراوان‌ترین و مهم‌ترین رنگیزه‌ها در گیاهان عالی هستند. در این تحقیق کاهش در مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی و در نتیجه کربوهیدرات‌های محلول در اثر تیمار کادمیوم مشاهده شد. در اثر کاربرد EDTA، محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی و کربوهیدرات‌های محلول تحت شرایط تنش در سلمک اورشلیمی افزایش یافت. در مطالعات قبلی اثر افزایشی EDTA بر محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی گیاهان تحت تیمار فلزات سنگین گزارش شده است (۱۹، ۲۲ و ۲۳) که در راستای مطالعه حاضر است. کمپلکس فلز-

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.2.15.1

کلات‌کننده قادر به نفوذ در غشاهای گیاه نیست، از این رو کلات‌کننده‌ها تحرک فلز و سپس سمیت آن را کاهش می‌دهند (۳۶).

هنگامی‌که فلزات سنگین جذب می‌شوند، گیاه از مکانیسم-های دفاعی مختلف که بتواند با سمیت فلزات مواجه شود استفاده می‌کند. تحریک فرآیندهای کنترل‌کننده اثرات سمی ROS (آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی) و تولید پروتئین‌های تنشی از جمله این مکانیسم‌ها می‌باشد. این مکانیسم‌ها به گیاهان کمک می‌کند تا آسیب‌های ناشی از تنش اکسیداتیو را کاهش دهند و سلول‌ها حالت احیا خود را حفظ کنند (۳۹). مشخص شده است که پروتئین‌ها به‌طور مستقیم در پاسخ‌های گیاه به تنش‌ها شرکت می‌کنند و سازگاری گیاه با تنش فلزات سنگین همراه با تغییرات پروتئوم است (۴۲). فعال شدن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، یک استراتژی دفاعی طبیعی برای کنترل محتوای ROS با توجه به نیازهای متابولیکی سلول‌ها در یک زمان خاص است. فعال‌سازی این آنزیم‌ها تحت تنش فلزات سنگین به خوبی شناخته شده و در گیاهان مختلف گزارش شده است. در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی با توجه به غلظت کادمیوم، اندام مورد استفاده و سن گیاه کاهش یا افزایش مشاهده شده است (۱۳ و ۱۶). تغییر در الگوی پروتئین بذر، افزایش محتوای پروتئین و افزایش فعالیت آنزیمی تحت تیمار کادمیوم و EDTA نسبت به گروه شاهد نشان می‌دهد که آسیب‌های ناشی از تنش کادمیوم با استفاده از EDTA کاهش یافته است. افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی بعد از افزودن EDTA به خاک آلوده نسبت به گروه شاهد در مطالعات قبلی گزارش شده است (۱۲و۱۴). همچنین تغییرات در الگوهای پروتئینی (SDS-PAGE) و افزایش تراکم باندها و تشکیل باندهای جدید در گیاهانی که تحت تأثیر آلودگی‌های محیط‌زیست قرار دارند نشان داده شده است (۳).

نتیجه‌گیری کلی: نتایج نشان داد که سلمک اورشلیمی دارای پتانسیل گیاه‌پالایی خاک‌های آلوده به کادمیوم است. این مطالعه همچنین نشان داد که EDTA می‌تواند به‌عنوان استراتژی خوبی برای افزایش گیاه‌پالایی کادمیوم در خاک-های آلوده در نظر گرفته شود. غلظت کادمیوم در بافت گیاهی در معرض ۲۲۵ میلی‌گرم در کیلوگرم کادمیوم و ۱۲ میلی‌مول در کیلوگرم EDTA، تقریباً ۱/۲۹ برابر بیشتر از گروه تیمار شده با ۲۲۵ میلی‌گرم در کیلوگرم کادمیوم بود. نتایج نشان داد که افزودنEDTA به خاک آلوده می‌تواند با تأثیر بر محتوای پروتئین و فعالیت آنزیمی، آسیب‌های ناشی از تنش کادمیوم را در سلمک اورشلیمی کاهش دهد.

سپاسگزاری

نویسنده این مقاله بر خود لازم می‌داند از آقای دکتر عبدالکریم چهرگانی‌راد و آزمایشگاه زیست‌شناسی سلولی دانشگاه بوعلی‌سینا همدان بابت حمایت‌های صورت گرفته در انجام این پژوهش قدردانی نماید.

منابع

۱- اسدی، م. (۱۳۸۰). فلور ایران، شماره ۳۸، تیره اسفناج، چغندر (Chenopodiaceae). انتشارات موسسه تحقیقات، جنگل‌ها و مراتع.

۲- حیدری، م.، اسمعیل‌زاده بهابادی، ص.، سنگتراش، م. ح. (۱۴۰۰). بررسی اثر سالیسیلیک‌اسید بر رشد، شاخص‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه دارویی بادرنجبویه (*Melissa officinalis* L.) تحت تنش کادمیوم. مجله پژوهشهای گیاهی (مجله زیست-شناسی ایران)، جلد ۳۴، شماره ۴، صفحه ۶۹۴-۷۰۷.

۳- شیرخانی، ز.، چهرگانی‌راد، ع.، محسن زاده، ف.، غلامی، م. (۱۴۰۰). اثر تیمار برگی کادمیوم بر ویژگی‌های ریخت‌شناختی، فیزیولوژیکی و تکوین گامتوفیت نر و ماده در درمنه‌خزری (*Artemisia annua*). مجله سلول و بافت، دوره ۱۲، شماره ۱، صفحه ۵۳-۷۱.

۴- علیخانی، ع.، تقی‌زاده، م. ارزیابی اثر اسید هیومیک بر رشد و توان انباشت چمن اسپورت طی تنش کادمیوم. مجله پژوهشهای گیاهی (مجله زیست‌شناسی ایران)، آماده انتشار.

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.2.15.1

۵- میرخانی، ر. (۱۴۰۰). تاثیر استفاده از EDTA بر قابلیت جذب سرب و کادمیوم توسط کادمیوم. مجله تحقیقات آب و خاک ایران، دوره ۵۲ ، شماره ۵، صفحه ۱۳۸۳-۱۳۹۴.

6- Ali, B., Rani, I., Hayat, S., & Ahmad, A. (2007). Effect of 4-Cl-indole-3-acetic acid on the seed germination of *Cicer arietinum* exposed to cadmium. Acta Botanica Croatica, 66(1), 57-65.

7- Barr, H., & Weatherley, P. E. (1962). A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficit in leaves. Australian Journal of Biological Sciences, 15(3), 413-428.

8- Bell, P., Chaney, R., & Angle, J. (1991). Free metal activity and total metal concentrations as indices of micronutrient availability to barley [*Hordeum vulgare* (L.)'Klages']. Iron Nutrition and Interactions in Plants, 130(1-2), 51-62.

9- 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(1-2), 248-254.

10- Chigbo, C., & Batty, L. (2013). Effect of EDTA and citric acid on phytoremediation of Cr-B [a] P-co-contaminated soil. Environmental Science and Pollution Research, 20(12), 8955-8963.

11- Ebrahimi, M. (2014). Effect of EDTA and DTPA on phytoremediation of Pb-Zn contaminated soils by *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh and effect on treatment time. Desert, 19(1), 65-73.

12- Farid, M., Ali, S., Shakoor, M. B., Bharwana, S. A., Rizvi, H., Ehsan, S., . . . Hannan, F. (2013). EDTA assisted phytoremediation of cadmium, lead and zinc. International Journal of Agronomy and Plant Production, 4(11), 2833-2846.

13- Gallego, S., Benavides, M., & Tomaro, M. (1999). Effect of cadmium ions on antioxidant defense system in sunflower cotyledons. Biologia Plantarum, 42(1), 49-55.

14- Geebelen, W., Vangronsveld, J., Adriano, D. C., Van Poucke, L. C., & Clijsters, H. (2002). Effects of Pb EDTA and EDTA on oxidative stress reactions and mineral uptake in *Phaseolus vulgaris*. Physiologia Plantarum, 115(3), 377-384.

15- Grcman, H. S., Velikonja-Bolta, D., Vodnik, B., & Kos, D. L. (2001). EDTA enhaced heavy metal phytoextraction: Metal accumulation, leaching and toxicity. Plant Soil, 235,105–114.

16- Groppa, M. a. D., Tomaro, M. a. L., & Benavides, M. a. P. (2001). Polyamines as protectors against cadmium or copper-induced oxidative damage in sunflower leaf discs. Plant Science, 161(3), 481-488.

17- Hames, B. D. (1998). Gel electrophoresis of proteins: a practical approach (Vol. 197): OUP Oxford.

18- Hancke, C., & Flytlie, K. (1993). Benefits of EDTA chelation therapy in arteriosclerosis: a retrospective study of 470 patients. Journal of Advancement in Medicine, 6(3), 161.

19- Heerema, R. J., VanLeeuwen, D., Thompson, M. Y., Sherman, J. D., Comeau, M. J., & Walworth, J. L. (2017). Soil-application of Zinc-EDTA increases leaf photosynthesis of immature 'Wichita'pecan trees. Journal of the American Society for Horticultural Science, 142(1), 27-35.

20- Iqbal, M., Bakht, J., Shafi, M., & Ullah, R. (2012). Effect of heavy metal and EDTA application on heavy metal uptake and gene expression in different *Brassica* species. African journal of biotechnology, 11(30), 7649-7658.

21- Kayser, A., Wenger, K., Keller, A., Attinger, W., Felix, H., Gupta, S., & Schulin, R. (2000). Enhancement of phytoextraction of Zn, Cd, and Cu from calcareous soil: the use of NTA and sulfur amendments. Environmental Science & Technology, 34(9), 1778-1783.

22- Kaur, L., Sharma, S., & Gadgil, K. (2019). Response of Indian mustard (*Brassica juncea arawali*) plants under nickel stress with special reference to nickel phytoextraction potential. EQA-International Journal of Environmental Quality, 34, 17-33.

23- Khan, A. H. A., Butt, T. A., Mirza, C. R., Yousaf, S., Nawaz, I., & Iqbal, M. (2019). Combined application of selected heavy metals and EDTA reduced the growth of *Petunia hybrida* L. Scientific reports, 9(1), 1-12.

24- Kochert, G. (1978). Carbohydrate determination by the phenol-sulfuric acid method. Handbook of phycological methods, 2, 95-97.

25- Lichtenthaler, H. K., & Buschmann, C. (2001). Chlorophylls and carotenoids: Measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. *Current protocols in food analytical chemistry*, F4.3.1-F4.3.8. https://doi.org/10.1002/0471142913.faf0471140403s0471142901.

26- Liu, W., Fang, J., Zhu, W. M., & Gao, P. J. (1999). Isolation, purification and properties of the peroxidase from the hull of *Glycine max* var

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.2.15.1

HH2. Journal of the Science of Food and Agriculture, 79(5), 779-785.

27- Luo, C., Shen, Z., Li, X., & Baker, A. J. (2006). Enhanced phytoextraction of Pb and other metals from artificially contaminated soils through the combined application of EDTA and EDDS. Chemosphere, 63(10), 1773-1784.

28- Mazharia, M., & Homaeed, M. (2012). Annual halophyte *Chenopidium botrys* can phytoextract cadmium from contaminated soils. Journal of Basic and Applied Science Research, 2, 1415-1422.

29- McEldowney, S., Hardman, D. J., & Waite, S. (1993). Pollution: ecology and biotreatment: 322, Longman Scientific & Technical.

30- Meers, E., Ruttens, A., Hopgood, M., Samson, D., & Tack, F. (2005). Comparison of EDTA and EDDS as potential soil amendments for enhanced phytoextraction of heavy metals. Chemosphere, 58(8), 1011-1022.

31- Mohammadi, S., Pourakbar, L., Moghaddam, S. S., & Popović-Djordjević, J. (2021). The effect of EDTA and citric acid on biochemical processes and changes in phenolic compounds profile of okra (*Abelmoschus esculentus* L.) under mercury stress. Ecotoxicology and Environmental Safety, 208, 111607.

32- Pérez-Marín, A., Ballester, A., González, F., Blázquez, M., Muñoz, J., Sáez, J., & Zapata, V. M. (2008). Study of cadmium, zinc and lead biosorption by orange wastes using the subsequent addition method. Bioresource technology, 99(17), 8101-8106.

33- Prachayasittikul, V., Isarankura-Na-Ayudhya, C., Tantimongcolwat, T., Nantasenamat, C., & Galla, H.-J. (2007). EDTA-induced membrane fluidization and destabilization: biophysical studies on artificial lipid membranes. Acta biochimica et biophysica Sinica, 39(11), 901-913.

34- Pueyo, M., Sastre, J., Hernandez, E., Vidal, M., Lopez-Sanchez, J., & Rauret, G. (2003). Prediction of trace element mobility in contaminated soils by sequential extraction. Journal of Environmental Quality, 32(6), 2054-2066.

35- Raymond, J., Rakariyatham, N., & Azanza, J. (1993). Purification and some properties of polyphenoloxidase from sunflower seeds. Phytochemistry, 34(4), 927-931.

36- Ruley, A. T., Sharma, N. C., Sahi, S. V., Singh, S. R., & Sajwan, K. S. (2006). Effects of lead and chelators on growth, photosynthetic activity and Pb uptake in *Sesbania drummondii* grown in soil. Environmental pollution, 144(1), 11-18.

37- Sairam, R. (1994). Effect of moisture-stress on physiological activities of two contrasting wheat genotypes. Indian Journal of Experimental Biology, 32, 594-594.

38- Saleem, M. H., Ali, S., Kamran, M., Iqbal, N., Azeem, M., Tariq Javed, M., ... & M Abdel-Daim, M. (2020). Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) mitigates the toxic effect of excessive copper concentrations on growth, gaseous exchange and chloroplast ultrastructure of *Corchorus capsularis* L. and Improves copper accumulation capabilities. Plants, *9*(6), 756.

39- Shahid, M., Dumat, C., Khalid, S., Niazi, N. K., & Antunes, P. M. (2016). Cadmium bioavailability, uptake, toxicity and detoxification in soil-plant system. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 241, 73-137.

40- Shirkhani, Z., Chehregani Rad, A., Gholami, M., & Mohsenzadeh, F. (2018). Phytoremediation of Cd-contaminated Soils by *Datura stramonium* L. Toxicology and Environmental Health Sciences, 10(3), 168-178.

41- Shirkhani, Z., Rad, A. C., & Mohsenzadeh, F. (2021). Improving Cd-phytoremediation ability of *Datura stramonium* L. by Chitosan and Chitosan nanoparticles. Biologia, 76, 2161-2171.

42- Singh, S., Parihar, P., Singh, R., Singh, V. P., & Prasad, S. M. (2016). Heavy metal tolerance in plants: role of transcriptomics, proteomics, metabolomics, and ionomics. Frontiers in plant science, 6. doi: https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01143

43- Sparks, D. L., Page, A. L., Helmke, P. A., Loeppert, R. H. (Eds.). (2020). Methods of soil analysis. Part 3: Chemical methods (Vol.14), John Wiley & Sons.

44- Stingu, A., Volf, I., & Popa, V. I. (2009). Study of copper and cadmium accumulation by bean. Environmental Engineering and Management Journal, 5, 1247-1252.

45- Su, Y., & Liang, Y. (2015). Foliar uptake and translocation of formaldehyde with Bracket plants (*Chlorophytum comosum*). Journal of hazardous materials, 291, 120-128.

46- Tandy, S., Schulin, R., & Nowack, B. (2006). The influence of EDDS on the uptake of heavy metals in hydroponically grown sunflowers. Chemosphere, 62(9), 1454-1463.

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.2.15.1

47- Tassi, E., Pouget, J., Petruzzelli, G., & Barbafieri, M. (2008). The effects of exogenous plant growth regulators in the phytoextraction of heavy metals. Chemosphere, 71(1), 66-73.

48- Turgut, C., Pepe, M. K., & Cutright, T. J. (2004). The effect of EDTA and citric acid on phytoremediation of Cd, Cr, and Ni from soil using *Helianthus annuus*. Environmental pollution, 131(1), 147-154.

49- Vithanage, M., Dabrowska, B. B., Mukherjee, A. B., Sandhi, A., & Bhattacharya, P. (2012). Arsenic uptake by plants and possible phytoremediation applications: a brief overview. Environmental chemistry letters, 10(3), 217-224.

50- Weerakoon, S., & Somaratne, S. (2010). Phytoextractive potential among mustard (*Brassica juncea*) genotypes in Sri Lanka. Ceylon Journal of Science (Biological Sciences), 38(2), 85-93.

51- Xu, P., & Wang, Z. (2014). A comparison study in cadmium tolerance and accumulation in two cool-season turfgrasses and *Solanum nigrum* L. Water, Air, & Soil Pollution, 225(5), 1-9.

52- Yoon, J., Cao, X., Zhou, Q., & Ma, L. Q. (2006). Accumulation of Pb, Cu, and Zn in native plants growing on a contaminated Florida site. Science of The Total Environment, 368(2), 456-464.

53- Zhao, Y., Peralta-Videa, J. R., Lopez-Moreno, M. L., Ren, M., Saupe, G., & Gardea-Torresdey, J. L. (2010). Kinetin increases chromium absorption, modulates its distribution, and changes the activity of catalase and ascorbate peroxidase in Mexican Palo Verde. Environmental Science & Technology, 45(3), 1082-1087.

The effect of EDTA on some physiological characteristics of *Chenopodium botrys* L. under Cd stress

Shirkhani Z.

Dept. of Plant Sciences, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

Cadmium (Cd) is one of the main soil contaminants. Applying EDTA to soil is a strategy to increase the heavy metal phytoremediation, but such chelators usually cause phytotoxicity and side effects. Therefore, the aim of this present study was to evaluate the effects of EDTA application on physiological and biochemical characteristics of *Chenopodium botrys* L. under different levels of Cd treatment in soil. In this study, the effect of EDTA (0, 3, 6 and 12 mmol kg^{-1}) on the amount of cadmium absorbed by plant tissues, leaf relative water content, membrane stability index, photosynthetic pigments content, soluble carbohydrate content, total protein content and antioxidant enzyme activity and seed protein pattern of *C. botrys* were examined under Cd stress (0, 75, 150 and 225 mg kg^{-1}). The results of this study showed that the addition of EDTA to the soil increased the concentration of Cd in shoot and roots of *C. botrys*. The application of EDTA reduced the leaf relative water content, membrane stability index and increased the photosynthetic pigments content and soluble carbohydrates content. Also changes in seed protein pattern, beside increase in total protein content and activity of antioxidant enzymes were observed in plants treated by Cd and EDTA, suggesting that this treatment was helpful in reducing of oxidative stress in *C. botrys* under Cd treatment. Based on the results, *C. botrys* is suitable for phytoremediation of soil contaminated with Cd. In addition, EDTA can play a significant role in removing this metal through transferring it from the soil to the plant.

Key words: chelating agent, heavy metal stress, oxidative stress, phytoremediation