نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۷، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۲، ص. ۳۶۶-۳۵۹
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

Journal of Horticultural Science
Vol. 27, No. 4, Winter 2014, P. 359-366
ISSN: 2008 - 4730

اثر سمیت کادمیم بر تغییر میزان شاخص‌های پرولین و آنتی‌اکسیدان‌ها در کاهو (*Lactuca sativa* L.)

مریم حقیقی[1*] - محسن کافی[2]

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۹/۲۸
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۵/۲۷

چکیده

اطلاعات در مورد اثر سمیت فلزات سنگین بر تغییرات فیزیولوژی و بیوتکنولوژی کاهو محدود است. به این منظور آزمایش به صورت طرح کاملاً تصادفی با ۷ تکرار جهت بررسی اثرات کادمیم بر تغییرات فیزیولوژی کاهو انجام شد. کادمیم با ۳ غلظت صفر، ۲ و ۴ میلی‌گرم در لیتر به محلول غذایی در کشت هیدروپونیک اضافه شد. نتایج این آزمایش نشان داد که ایجاد تنش کادمیم و افزایش غلظت آن با افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدان‌ها (پرکسیداز و سوپراکسیددیسموتاز) و پرولین همراه است. کادمیم در بافت گیاه تجمع یافته و وزن تر و اسید ارگانیک گیاه را کاهش می‌دهد. به طور متوسط غلظت‌های ۲ و ۴ میلی‌گرم در لیتر کادمیم به ترتیب پرکسیداز را ۸ و۵۳ درصد افزایش داد و فعالیت سوپراکسیددیسموتاز را ۶۶ و ۱۰۶ درصد و غلظت پرولین را ۳۹ و ۱۱۹ درصد بالا برد در صورتی که پروتئین کل گیاه را ۲۵ و ۵ درصد نسبت به شاهد کاهش می‌دهد. اثرات سمی افزایش کادمیم با گذشت زمان بر روی کلروفیل و فتوسنتز متفاوت بود و فتوسنتز بیشتر از کلروفیل با گذشت زمان تحت تنش کادمیم کاهش یافت.

واژه‌های کلیدی: پرولین، پروتئین، کادمیم، کاهو، آنتی‌اکسیدان

مقدمه

آلودگی محیط زیست و افزایش روند تخریب اکوسیستم‌های طبیعی از جمله خاک که جهان کنونی با آن روبه روست ناشی از برخورد غیرمسوولانه انسان با محیط زیست و استفاده نامناسب از منابع پایه است. رشد روز افزون جمعیت و نیاز به تامین غذا، استفاده هر چه بیشتر از نهاده‌های کشاورزی مانند کودهای شیمیایی را برای دستیابی به بالاترین عملکرد در واحد سطح اجتناب ناپذیر کرده است. کادمیم یکی از مهمترین فلزات سنگین آلاینده خاک به شمار می‌آید که از منابع متعددی وارد خاک می‌شود. کودهای فسفره از مهمترین منابع آلودگی خاک‌های زراعی به کادمیم است. زیرا سنگ فسفاته که برای ساخت کود فسفاته استفاده می‌شود دارای کادمیم زیادی (۱۰ تا ۹۸۰ میلی‌گرم در کیلوگرم) است. بنا بر گزارش‌های موجود، تولید کودهای فسفره در سال ۱۹۹۵ در سطح ۴۰ کشور جهان ۱۳۱ میلیون تن بوده است که با فرض مقدار متوسط ۲۰ میلی‌گرم کادمیم در کیلوگرم کود، تنها از این طریق بالغ بر ۲۶۰۰ تن کادمیم به اراضی کشاورزی اضافه شده است (۵۴). از طرفی تحقیقات نشان می‌دهد، سبزی‌های برگی مانند کاهو، اسفناج، کرفس و کلم به سمیت کادمیم بسیار حساس هستند. طبق آزمایشات دیویس و اسمیت (۱۴ و ۲۴) حساس‌ترین گیاهان به سمیت و تجمع کادمیم به ترتیب، اسفناج، سویا، شاهی، کاهو، ذرت، هویج، شلغم، لوبیا، گندم، تربچه، گوجه فرنگی، کدو، کلم و برنج می‌باشند. این دانشمندان نشان دادند که در کاهو بیشترین کادمیم در برگ‌ها یعنی بخش خوراکی تجمع می‌یابد، در نتیجه تهدید سمیت کادمیم بر سلامتی انسان از طریق مصرف کاهو قابل توجه است.

گزارشاتی در خصوص اثر کادمیم بر رشد گیاهان وجود دارد کادمیم باعث کاهش رشد طولی ریشه و ساقه و وزن خشک آنها می‌شود که منجر به محصول کمتر در خردل می‌شود (۱). در اسفناج کادمیم باعث کاهش وزن خشک گیاه شد (۱۵).

افزایش کادمیم در خاک با اختلالات فیزیولوژیکی زیادی مانند جلوگیری از جوانه‌زنی بذر، کاهش رشد به ویژه رشد ریشه، اختلال در جذب مواد معدنی و متابولیسم کربوهیدرات‌ها در گیاهان همراه است و در نتیجه اثرات شدید بر روی زیست توده همراه است (۵۸ و ۲۵). کاهش زیست توده پی‌آمد مستقیم کاهش سنتز کلروفیل و فتوسنتز می‌باشد (۳۵). از طرف دیگر اثرات سمیت کادمیم بر فتوسنتز بیش از

۱- استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان
(*- نویسنده مسئول: Email: mhaghighi@cc.iut.ac.ir)
۲- استاد گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران

Archive of SID
www.SID.ir

کاهش کلروفیل است (۳۸ و ۵۳). بنابراین سمیت کادمیم در کاهو تا غلظت‌های بالای کادمیم نشانه های مورفولوژیکی خاصی در پی ندارد.

در اثر شرایط تنش، اکسیژن فعال افزایش می‌یابد. اکسیژن فعال در گیاه از طریق فرآیندهای اکسیدکنندگی محتویات سلول، اثرات مخرب جدی بر گیاه می‌گذارد (۹ و ۴۱). گیاه دارای مکانیزم‌های متفاوتی جهت حذف یا کاهش این ترکیبات مخرب می‌باشد که در سطوح مختلف تنش وارده، ظاهر می‌شود (۲۱ و ۳۵). یکی از این سیستم‌های تدافعی، آنتی‌اکسیدان‌های پرکسیداز و سوپراکسید-دیسموتاز است که رادیکال‌های آزاد را به پراکسید هیدرژن تبدیل می‌کند. پراکسید هیدرژن توسط پرکسیداز تبدیل به آب می‌شود. فعالیت این آنزیم‌ها در مواجه با تنش‌های محیطی افزایش می‌یابد و از این طریق مقاومت گیاه را به این شرایط تغییر می‌دهد (۲، ۳۴ و ۴۵). از طرفی اسید آمینه پرولین تحت شرایط نامطلوب محیطی در گیاه تجمع می‌یابد (۵). پرولین در محدوده وسیعی از گونه‌های گیاهی تحت تنش‌های مختلفی چون خشکی، شوری، دما و نور زیاد، تجمع می‌یابد (۵ و ۳۱) نقش پرولین در تنش جلوگیری از تخریب آنزیم‌ها (۴۶)، جلوگیری از تجزیه ماکرومولکول‌ها (۴۳) و دخالت در حفظ استحکام دیواره سلولی (۳۳) و پاکسازی هیدروکسیل‌های تولیدی تحت تنش در گیاه (۵۵ و ۶۲) است. چنین اثراتی نیز در گیاه تحت تنش کادمیم گزارش شده است (۴۸).

تحقیقات نشان می‌دهد سلول‌های گیاه زمانی‌که تحت هر نوع تنش محیطی (گرما، فلزات سنگین، شوری و ...) قرار می‌گیرند، شروع به ساخت پروتئین‌های تنش[1] می‌کند. این پروتئین‌ها انواع مختلف دارند انواع hsp100، hsp90، hsp70 ، hsp60 با وزن مولکولی بالا به مقدار فراوان در گیاهان مختلف مشاهده شده است (۵۷ و ۵۹). انواع پروتئین‌هایی با وزن مولکولی کمتر حدود ۱۷۰۰۰ تا ۳۰۰۰۰ کیلو دالتون و نوع سوم به نام Ubiquitin (فقط ۷۶ اسید آمینه) که دارای قدرت حفاظت‌کنندگی بالا است نیز درگیاهان وجود دارد (۲۲). متاسفانه نقش و عمل گروه آخر (Ubiquitin) که در گیاهان نسبت به سایر یوکاریوتها رایج‌تر است، هنوز به طور کامل شناخته نشده است. DNA سلول‌های تحت استرس کادمیم تولید نسخه‌های mRNA می‌کند که ساخت پروتئین‌های تنش را کنترل می‌کند (۱۴، ۱۷ و ۴۴). در کشت سلولی *Lycopersicon peruvianum* که در معرض کادمیم قرار گرفته بود مقادیر قابل توجهی hsp70 تولید شد که به پلاسمالمای غشای میتوکندری و شبکه اندپلاسمی متصل بود (۳۶). پس از اینکه کادمیم باعث تغییر شکل و تغییر شکل پروتئین-های سلول شد hsp70 افزایش یافت. این پروتئین و به ویژه Ubiquitin تمایل زیادی به چسبیدن به پروتئین‌های دفرمه دارند و به آنها کمک می‌کنند تا پروتئین‌ها شکل اصلی خود را دوباره پیدا کنند، این کار را از طریق استقرار مجدد پروتئین‌های نا فرم به غشاهای سلولی مناسب انجام می‌گیرد (۲۵). اختلال در فعالیت پروتئین‌های تنش Ubiquitin باعث نکروزه شدن برگ‌های تنباکو شد (۶). افزایش پروتئین‌های تنش تحت تاثیر افزایش کادمیم در محیط کشت لاین‌های مقاوم لوبیا *Phaseolus vulgaris* (۳۲)، تاتوره *Datura innoxia* (۲۸)، تنباکو *Nicotiana plumbaginifolia* (۱۹)، و برنج *Oryza sativa* (۴۰ و ۴۲) گزارش شده است. نتیجه گیری کلی از تحقیقات فوق نشان داد که پروتئین‌های تنش فقط در غلظت‌های بالای کادمیم و یا در ارقام متحمل ظهور می‌یابد. این پروتئین‌ها صدمات وارده به سایر پروتئین-های سلول و غشای سلولی را تقلیل داده و یا ترمیم می‌کنند (۲۹ و ۳۹).

آزمایش حاضر به بررسی اثر افزایش غلظت کادمیم بر روی گیاه کاهو و تغییر فعالیت آنتی اکسیدان‌های (پرکسیداز و سوپراکسید-دیسموتاز)، محتوای پرولین، پروتئین، ارگانیک اسید، کلروفیل، وزن و فتوسنتز پرداخته است.

مواد و روش‌ها

شرایط کشت و تیمارهای آزمایشی

بذرهای کاهو رقم ایتالیا (*Lactuca sativa* var Italy) در مخلوط ورمیکولیت/پرلیت (۱/۲ v/v) کاشته شد. سپس نشاهایی که ۳-۲ برگ داشتند به سیستم هیدروپونیک شامل گلدان‌هایی با مخلوط پیت/پرلیت (۱/۱ v/v) منتقل گردید. گلدان‌ها در گلخانه نگهداری شدند و با محلول غذایی هوگلند محتوی کادمیم به صورت $CdCl_2$ در سه غلظت صفر، ۲، ۴ میلی‌گرم در لیتر تیمار شدند. اسیدیته محلول توسط سود و اسید کلریدریک حدود ۶ تنظیم گردید. آزمایش به صورت طرح کاملاً تصادفی با ۷ تکرار در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه جه جیانگ[2] چین انجام گردید. داده ها با نرم افزار MSTAT-C و SAS آنالیز گردید و میانگین‌ها با روش دانکن در سطح ۰/۰۵ مقایسه شدند.

نمونه‌برداری و اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌ها

دومین برگ کاملاً رشد کرده کاهو برای استخراج آنزیم‌ها ۶ روز پس از تیماردهی انتخاب شد و در کیسه پلاستیکی در فلاسک یخ به آزمایشگاه منتقل شد. نیم گرم نمونه برگ بعد از شستن با آب دیونیزه همراه ۵ میلی لیتر بافر فسفاته با غلظت ۰/۵ مول بر لیتر شامل (۵۰ میکرومول فسفات، ۱ درصد (وزنی/حجمی) از BSA، ۰/۰۵درصد (وزنی/حجمی) ازمرکاپتواتانول[3]، ۱ درصد (وزنی/حجمی) از

1- Heat shock proteins (hsps, hsc)

2- Zhejiang

3- Mercaptoethanol

Archive of SID

www.SID.ir

اسکوربات[1] با اسیدیته ۷/۸ در هاون در مجاورت یخ ۴ درجه سانتی‌گراد کاملاً له شد. مخلوط حاصل با دور ۱۲۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ گردید. عصاره بالایی لوله آزمایش برای سنجش آنزیم به آرامی جدا شد.

سنجش سوپراکسیددیسموتاز طبق روش بیچامپ و فریدوویچ (۹) با تغییراتی انجام شد. سه میلی لیتر محلول سنجش شامل ۵۰ میکرو مول بافر فسفاته با اسیدیته ۷/۸، ۹/۹ میکرومول از ماده متیونین[2]، ۵/۷ میکرو مول نیترو تترازولیوم بلوکلراید(NBT)[4]، ۰/۰۰۴۴ (وزنی/حجمی) از ریبوفلاوین[5] و ۰/۰۲۵ (وزنی/حجمی) از Triton X-100 به عصاره اضافه گردید. میزان فعالیت , بر حسب تغییر NBT در برابر نور توسط اسپکتروفتومتر در ۵۶۰ نانومتر اندازه گیری شد. یک واحد فعالیت سوپراکسیددیسموتاز معادل ۵۰ درصد ممانعت از تغییر رنگ NBT در برابر نور بیان می‌شود.

سنجش پرکسیداز بر طبق روش کاندلی و اسکاندالویز (۱۱) با یکسری تغییرات انجام شد. محلول واکنش شامل ۵۰ میلی مول بافر فسفاته پتاسیم، ۱درصد (وزنی/حجمی) گویکول[3]، ۰/۰۴ (حجمی/حجمی) پراکسید هیدروژن[4] با اسیدیته ۶/۱ تهیه شد. سپس ۱۷۰۰ میکرولیتر محلول واکنش به ۱۰۰ میکرولیتر عصاره گیاهی اضافه شد. جذب نور به علت اکسید شدن گویکول افزایش می‌یابد که میزان جذب توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در ۴۷۰ نانومتر سنجیده می‌شود. میزان آنزیم بر اساس مقدار گویکولی که در دقیقه اکسید می‌شود، بیان می‌شود.

اندازه‌گیری کادمیم برگ‌ها

میزان کادمیم برگ‌ها پس از خاکستر شدن در دمای ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ ساعت و افزودن اسید کلریدریک ۱ نرمال به کمک دستگاه ICP[5] اندازه گیری شد.

اندازه‌گیری اسید آلی

برای تعیین میزان اسید آلی کل برگ‌های گیاه همراه با آب مقطر له نموده و مقداری کائولن به آن اضافه می‌شود. سپس آن را به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسانده و با کاغذ صافی، صاف می‌شود. ۲۰ میلی لیتر از عصاره حاضر همراه چند قطره فنل فتالئین با سود ۰/۱ نرمال تیتره می‌شود، عمل تیتراسیون روی همزن مغناطیسی تا رسیدن به pH= ۸ انجام می‌شود و این طریق میزان اسید آلی کل محاسبه می‌شود (۲).

1- Ascorbate
2- L- methionine
4- Nitro tetrazolium blue chlorid (NBT)
5- Riboflavin
3- Guaiacol
4- H2o2
5- Inductively Coupled Plasma

اندازه‌گیری فتوسنتز و کلروفیل برگ

دستگاه پرتابل سنجش فتوسنتز (LI, 6100 شرکت لای کور، ایالات متحده آمریکا) در دو نوبت (۶ و ۱۲ روز پس از شروع آزمایش) مورد استفاده قرار گرفت. از برگ‌های میانی کاملاً توسعه یافته، برای هر تیمار استفاده شد و نرخ فتوسنتز خالص (میکرومول دی اکسید کربن بر متر مربع بر ثانیه) اندازه‌گیری شد. میزان کلروفیل برگ توسط دستگاه کلروفیل‌سنج[6] (مدل ۵۰۲ ساخت شرکت مینولتا، ژاپن) هر روز اندازه‌گیری شد و میانگین نتایج در ۲ زمان ۶ و ۱۲ روز پس از شروع آزمایش گزارش شد (۲۰).

اندازه‌گیری پرولین

میزان پرولین بر اساس روش بیتس و همکاران (۶۳) از طریق سنجش مقدار محصول رنگی حاصل از واکنش پرولین با نین هیدریک اسید[7] پس از ۱۲ روز به دست آمد. میزان جذب در طول موج ۵۲۰ نانومتر به کمک اسپکتروفتومتر خوانده شد. مقدار پرولین به کمک منحنی استاندارد از پیش آماده شده محاسبه شد و به صورت میکرومول بر گرم وزن تر بیان شد.

اندازه‌گیری پروتئین کل

میزان پروتئین کل بر اساس تغییر رنگ توسط کوماسی بریلیانت-بلو[8] به دست آمد. محلول واکنش شامل ۰/۰۵ گرم کوماسی بریلیانت-بلو بود که در ۲۵ میلی لیتر اتانول ۹۵٪ و ۵۰ میلی لیتر اسید فسفریک ۸۵٪ حل شد. سپس به کمک آب مقطر به حجم نهایی ۵۰۰ میلی لیتر رسانده شد. برای سنجش میزان پروتئین کل، ۱۵ میکرولیتر از عصاره نمونه به ۳ میلی لیتر از محلول واکنش افزوده شد و جذب در اسپکتروفتومتر مشابهی در طول موج ۵۹۵ نانومتر قرائت شد. میزان نهایی پروتئین کل از منحنی استاندارد رسم شده به کمک پروتئین خالص آلبومین بووین[9] به دست آمد.

نتایج و بحث

وزن خشک، تر و جذب کادمیم توسط کاهو

جدول تجزیه واریانس اثر کادمیم بر صفات اندازه‌گیری شده کاهو در جدول ۱ آمده است و اثر افزایش کادمیم به محلول غذایی بر روی میانگین کلیه صفات اندازه‌گیری شده در جدول ۲ آورده شده است.

6- SPAD
7- Ninhydric acid
8- Coomassie brilliant blue
9- Albumin bovine

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر کادمیم در محیط کشت بر برخی خصوصیات کاهو رقم ایتالیا

منابع تغییرات	درجه آزادی	پروتئین	وزن خشک	محتوای کادمیم برگ	وزن تر	کلروفیل در روز ۱۲	کلروفیل در روز ٦	فتوسنتز در روز ۱۲	فتوسنتز در روز ٦	اسید آلی	پرولین	سوپر اکسید دسموتاز
کادمیوم	۲	۰.۰۲	۰*	۱۲۵۶.۰۶*	۵۲۷.۶۶*	۳۳۸.۱۳*	۱۷.۹۷*	۰.۱۴ns	۱۲.۳۸*	۰.۰۱*	۰.۱۷*	۷۵۱۸.۲۶*
خطا		۰.۰۲	۰	۱۷.۳۹	۷۸.۲۵	۲۱.۸۵	۵.۲۱	۰.۰۴	۷۴	۰	۰.۱۳	۶۳۱.۵۲
CV		۱۱.۸۷	۸.۴۸	۲۰.۲۴	۸.۷۷	۲۷.۳۱	۷.۹۹	۱۴.۱۳	۱۴.۸۴	۳۴.۶۹	۶.۴۴	۸.۹۷
درجه آزادی خطا		۱۵	۱۵	۹	۹	۱۰۰	۱۷	۲۶	۲۶	۲۷	۹	۲۷

**- معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد، *: معنی‌دار درسطح احتمال ۵ درصد و Ns: غیر معنی‌دار

وزن خشک اندام هوایی گیاهان تیمار شده با کادمیم تفاوت معنی‌داری را با شاهد نشان داد. وزن خشک اندام هوایی گیاهان در غلظت‌های ۲ و ۴ میلی‌گرم در لیتر کادمیم به ترتیب ۱۳/۵ و ۳۰/۱۴ درصد نسبت به شاهد کاهش داشت و همبستگی منفی معنی‌داری در سطح ۰/۹۹ = R^2 با رابطه $Y= - 0.0588X+6.77$ بین سطوح مختلف کادمیم و وزن خشک اندام هوایی مشاهده شد، در حالی‌که تغییر معنی‌داری در وزن خشک ریشه نسبت به شاهد دیده نشد (داده ها نشان داده نشده است). وزن تر اندام هوایی کاهو تحت تاثیر افزایش کادمیم به محلول غذایی قرار گرفت که در غلظت‌های ۲ و ۴ میلی‌گرم در لیتر کادمیم به ترتیب ۱۹ و ۴۲ درصد نسبت به شاهد بود. رابطه رگرسیونی منفی ۰/۹۳ = R^2، اثر افزایش غلظت کادمیم بر کاهش وزن گیاه را نشان داد. نتایج مشابه در کاهش وزن گیاه ناشی از کاربرد کادمیم توسط شاه و همکاران (۴۸) در گیاه برنج و استمان (۳۷) در کاهو کاهش در وزن گیاه را نیز گزارش شده است.

میزان جذب کادمیم توسط گیاه با افزایش غلظت کادمیم در محلول غذایی به طور معنی‌داری افزایش داشته است. میزان جذب کادمیم در غلظت‌های ۲ و ۴ میلی‌گرم در لیتر به ترتیب ۳۵ و ۵۴ میلی‌گرم در گرم وزن خشک بوده است. اریکسون (۱۸) رابطه مثبت معنی‌داری بین میانگین کادمیم قابل جذب توسط برگ‌ها و غلظت کادمیم در محلول غذایی در گندم، استمان (۳۷) در کاهو اندرسون و بینگ فوری (۳) در سایر گیاهان مشاهده کردند. بطور مشابه در این تحقیق دیده شد که بیشترین میزان جذب کادمیم در غلظت ۴ میلی‌گرم در لیتر کادمیم بود و این مقدار جذب کادمیم در غلظت مذکور، ۵۴ درصد بیشتر از غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر بود.

فعالیت پرکسیداز و سوپراکسیددیسموتاز

فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی پرکسیداز و سوپراکسیددیسموتاز در برگ‌های کاهو به طور معنی‌داری با افزایش غلظت کادمیم به ویژه در غلظت ۴ میلی‌گرم بر لیتر کادمیم افزایش یافت (جدول ۱) به طور متوسط در غلظت‌های ۲ و ۴ میلی‌گرم در لیتر کادمیم فعالیت پرکسیداز ۸ و ۵۳ درصد نسبت به شاهد افزایش نشان داد وفعالیت سوپراکسید دیسموتاز ۰/۶ و ۱/۰۶ برابر نسبت به شاهد افزایش یافتند.

جدول ۲- اثر کادمیم در محیط کشت بر برخی خصوصیات کاهو رقم ایتالیا

صفات اندازه گیری شده	غلظت کادمیم در محیط کشت (mg/l) ۰	۲	٤
وزن خشک اندام هوایی(g)	۶/۷۳۵a	۵/۸۲۵b	۴/۷۰۵c
وزن تر(g)	۹۶/۳۷۵ a	۷۸/۰۱ b	۵۵/۲۸۵ c
محتوای کادمیم برگ	۰/۷ c	۳۵/۳ b	۵۴/۰ a
پراکسیداز (U g^{-1} W)	۵/۵۸ b	۶/۰۳ b	۸/۵۹ a
سوپر اکسید دسموتاز(U g^{-1} W)	۱۵۶/۵۶ c	۲۵۹/۹ b	۳۲۴/۰۷ a
پرولین(µmol /fw)	۰/۳۶c	۰/۵۱ab	۰/۸۰a
اسید آلی%	۰/۱۷ a	۰/۱۴ ab	۰/۱۲ b
پروتئین(µg g^{-1})	۰/۹۹a	۰/۷۳b	۰/۹۴ab
فتوسنتز در روز ۶ (µmol CO_2 m^{-2} s^{-1})	۱۵/۳۱ b	۱۳/۴۲ ab	۱۲/۲۵ a
فتوسنتز در روز ۱۲ (µmol CO_2 m^{-2} s^{-1})	۵/۸۸ a	۴/۳۶ a	۵/۳۴ a
کلروفیل در روز ۶ (SPAD value)	۲۹/۹۲ a	۲۸/۶۵ ab	۲۷/۱۰ b
کلروفیل در روز ۱۲(SPAD value)	۲۱/۹۳ a	۱۷/۵۶ b	۱۱/۸۴ c

† در هر سطر، میانگین هایی که دارای حروف مشترک هستند ،در سطح ۵٪ آزمون دانکن اختلاف معنی داری ندارند.

Archive of SID

www.SID.ir

میزان فعالیت پرکسیداز تا ۸/۵۹ و سوپراکسیددیسموتاز تا ۳۲۴/۰۷ واحد به ازای گرم وزن تر در بالاترین تیمار کادمیم افزایش یافت. بین فعالیت پرکسیداز و سطوح مختلف کادمیم همبستگی مثبت معنی‌داری با فرمول Y=0.7838X+5.02 و R^2=۰/۹۵ و بین فعالیت سوپراکسیددیسموتاز و سطوح مختلف کادمیم همبستگی مثبت با R^2=۰/۹۵ و فرمول Y=42.857X+127.19 در سطح ۵ درصد معنی دار بود. در این آزمایش افزایش سوپراکسیددیسموتاز و پرکسیداز تحت تاثیر تنش، افزایشی و مشابه یکدیگر در تیمارهای مختلف بود. رابطه مثبت معنی‌داری بین افزایش فعالیت پرکسیداز و سوپراکسیددیسموتاز تحت تاثیر تیمارهای مختلف کادمیم در سطح ۵ درصد با R^2 =۰/۸۳ این روند مشابه را نشان داد. سلول‌های گیاهی سیستم تدافعی علیه اکسیژن فعال دارند که از آن جمله فعال شدن آنزیم‌های پرکسیداز و سوپراکسیددیسموتاز هستند. در این آزمایش نیز مشاهده شد سمیت کادمیم با افزایش فعالیت پرکسیداز و سوپراکسیددیسموتاز جهت مقابله با رادیکال‌های آزاد در اثر تنش کادمیم همراه است. نتایج مشابهی توسط سایر محققین به دست آمده است (۳۷، ۳۸ و ۴۷). طبق نتایج حاصله توسط باولر (۱۰)، حساس‌ترین آنزیم به این تنش محیطی است (۵۷) که فعالیت این آنزیم در اثر افزایش رادیکال‌های آزاد، افزایش می‌یابد افزایش فعالیت این آنزیم در آزمایش فوق نیز مشاهده شد.

تغییرات پروتئین، پرولین و اسید آلی

آلودگی گیاه با کادمیم باعث افزایش معنی‌داری در میزان پرولین تولید شده در کاهو در سطح ۵ درصد شد. با کاربرد کادمیم با غلظت ۲ و ۴ میلی‌گرم در لیتر در محیط کشت کاهو میزان پرولین گیاه به میزان ۰/۳۹ و ۱/۱۹ برابر افزایش یافت. رابطه مثبت معنی‌داری (R^2= ۰/۹۹)، بین افزایش پرولین و افزایش غلظت کادمیم محلول غذایی دیده شد. نتاج مشابهی در گیاهان مختلفی چون آفتابگردان، انبه و لوبیا افزایش پرولین تحت تنش را گزارش کرده اند (۱۳، ۴۹ و ۶۳). تنش‌ها، از جمله تنش کادمیم، با سرعت بخشیدن به پیری برگ، میزان پرولین را افزایش می‌دهد. مودان و همکاران (۳۰) نیز اثر پیری برگ بر افزایش پرولین را در *Brassica juncea* تحت تنش شوری نشان دادند. اتیل و ساردهی، شاه و دابی (۴۸) دلیل افزایش پرولین در گیاه تیمار شده با کادمیم را تلاش برای حفظ اسیدیته سیتوزولی و یا راهی برای حفاظت آنزیمی گیاهان تحت تنش توسط این اسید آمینه اعلام داشتند. اسکات و همکاران (۴۹)، کاسترو (۲۶) و بارسلو (۷) دلیل افزایش پرولین تحت تیمار کادمیم در گیاه *Silene vulgaris* را کمبود آب موثر از تنش کادمیم، نه اثر مستقیم کادمیم بر این اسید آمینه دانستند. کاستا و مورال (۱۳) در کاهوهای تیمار شده با کادمیم افزایش پرولین را مشاهده نکردند. هر چند در سایر اسیدهای آمینه از قبیل آسپاراژین و متیونین و لیزین افزایش مشاهده شد (۲۶). در پژوهش حاضر افزایش پرولین در اثر افزایش کادمیم به محلول غذایی مشاهده شد، اما سایر اسید آمینه‌ها به تفکیک اندازه‌گیری نشد. با توجه به افزایش پروتئین کل در غلظت ۴ میلی‌گرم بر لیتر کادمیم احتمال افزایش سایر اسید آمینه‌ها غیر از پرولین وجود دارد (۲۶).

افزایش پرولین در اغلب تنش‌ها مانند تنش کم آبی در گیاه ایجاد می‌شود. پی آمد این تغییرات فیزیولوژیکی در گیاه افزایش اسیدهای آلی و قند در گیاه است (۱۲). این گزارش با نتایج حاصل در این تحقیق در تضاد است زیرا همانطور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود. کادمیم باعث کاهش میزان اسیدهای آلی می‌شود. دلیل احتمالی این تناقض اولاً به خاطر تفاوت در نوع اسید آلی موجود در گونه‌های مختلف و مکانیزم تولید آنها و دوماً به خاطر نوع و شدت تنش وارده بر گیاه است که از روش‌های مختلف بر متابولیسم گیاه اثر می‌گذارد.

میزان کاهش پروتئین در غلظت ۲ میلی‌گرم بر لیتر کادمیم بیشتر از ۴ میلی‌گرم بر لیتر آن است یعنی با افزایش غلظت کادمیم محلول غذایی میزان پروتئین کل ابتدا کاهش و سپس افزایش می‌یابد به طوری‌که میزان پروتئین در غلظت ۴ میلی‌گرم بر لیتر کادمیم نسبت به ۲ میلی‌گرم بر لیتر آن ۲۲ درصد افزایش دارد.

در کاهو در غلظت بالاتر (۴ میلی‌گرم بر لیتر) کادمیم میزان پروتئین کل نسبت به غلظت کمتر آن (۲ میلی‌گرم بر لیتر) افزایش داشت که احتمالاً به افزایش پروتئین‌های تنش در کنار افزایش سایر آنزیم‌ها یا آنتی‌اکسیدانی مربوط می‌شود. همانطور که ذکر شد، آنزیم-های آنتی‌اکسیدانی نیز در غلظت ۴ میلی‌گرم بر لیتر کادمیم نسبت به غلظت ۲ میلی‌گرم بر لیتر آن افزایش چشمگیری داشت. اما از آنجایی که کاهو گیاهی حساس به تنش کادمیم است با وجود افزایش این پروتئین‌ها توان مقاومت نداشته و پس از گذشت زمان وزن، فتوسنتز و کلروفیل کاسته شد.

تغییرات فتوسنتز و کلروفیل

با افزایش غلظت کادمیم میزان فتوسنتز پس از ۶ روز کاهش داشت اما در روز ۱۲ تغییر معنی داری در ۲ غلظت کادمیم دیده نشد اما با افزایش طول مدت تیمار (۱۲ روز) کادمیم نیز میزان فتوسنتز و کلروفیل در هر دو غلظت ۲ و ۴ میلی‌گرم بر لیتر نسبت به روز ۶ (مشاهده شده در تجزیه مرکب داده‌ها که آورده نشده است) کاهش داشت، به ویژه این کاهش در غلظت‌های بالاتر کادمیم بیشتر بود. میزان فتوسنتز در روز ۱۲ نسبت به ۶ به میزان ۵۱ و ۷۱ درصد کاهش یافت. رابطه منفی معنی‌داری بین میزان کادمیم و فتوسنتز در سطح ۵ درصد وجود دارد. یکسان بودن روند تغییرات فتوسنتز در هر دو زمان در تیمارهای مختلف با رابطه مثبت معنی‌داری ثابت شد.

Archive of SID

www.SID.ir

زمانی که گیاهچه‌ها با کادمیم مواجه شدند میزان کلروفیل پس از ۶ و ۱۲ روز کاهش یافت (جدول ۱). اما بر خلاف فتوسنتز گذشت زمان بر میزان کلروفیل اثر معنی‌داری نداشت اما کلروفیل تحت تاثیر افـزایش غلظت کادمیم کاهش بیشتری تا فتوسنتز داشت و در غلظت‌های ۲ و ۴ میلی‌گرم بر لیتر کادمیم به طور متوسط در هر دو زمـان بـه ترتیـب ۱۲ و ۲۷ درصد نسبت به شاهد کاهش داشت. رابطه منفی معنی‌داری بین میزان کلروفیل و غلظت کادمیم در بستر با R^2=۰/۷۹ پـس از ۶ روز به دست آمد. بیشترین میزان کاهش کلروفیل مانند فتوسنتز تحت تاثیر ۴ میلی‌گرم بـر لیتـر کـادمیم بـود. در هـر دو زمـان ۶ و ۱۲ روز تغییرات فتوسنتز در تیمارهای مختلف تقریبا یکسان بود. با رویـارویی گیاه با کادمیم میزان کلروفیل برگ کاهش یافت (جدول ۱). بر خلاف میزان فتوسنتز، کادمیم باعث تغییرات عمـده‌ای در کلروفیـل در طـی زمان نشد.

تحقیقات اولیه کاهش قابل توجهی را در میـزان فتوسـنتز تحـت تاثیر کادمیم در گونه های مختلـف نشـان داده اسـت (۱۰، ۴۸، ۵۲ و ۵۳). کادمیم از جنبه‌های مختلف بر فتوسنتز اثر دارد این اثرات مخرب بر بیوسنتز کلروفیل، فعالیت‌های بیوشیمیایی فتوسـنتز (۵۳) و فعالیـت آنزیمی چرخه کلـوین (۷، ۶۰، ۶۱ و ۲۷) مـی‌باشـد. کـاهش ۵۱ و ۷۱ درصدی فتوسنتز در روز ۱۲ نسـبت بـه روز ۶ در غلظـت‌هـای ۲ و ۴ میلی‌گرم بر لیتر کادمیم، نشان دهنده اثر مخرب کادمیم بر این پدیده است که احتمالاً ناشی از تخریب کلروفیل و کاهش میزان سطح برگ گیاه (داده‌ها نشان داده نشده است) در این مدت می‌باشـد (۸، ۴۶، ۵۰ و ۵۱) روند کاهش فتوسنتز می‌توانـد بـه دلیـل کـاهش کلروفیـل در تیمارهای مشابه در هر دو زمـان ۶ و ۱۲ روز باشـد. میـزان فتوسـنتز بیش از میزان کلروفیل گیاه تحت تاثیر زمان قرار گرفته است. مثلاً در روز ۱۲ میزان کلروفیل ۳۸ درصد و میزان فتوسـنتز ۷۱ درصـد تحـت تیمار ۴ میلی‌گرم بر لیتر کادمیم کـاهش داشـت. بنـابراین عـلاوه بـر اثرات سوء کادمیم بر کلروفیل، کادمیم بـر فراینـدهای بیوشـیمیایی و آنزیمی چرخه های فتوسنتزی نیز اثر کـرده و از ایـن طریـق نیـز بـه کاهش بیشتر فتوسنتز منجر شده است. نتایج مشابه در نخـود فرنگـی نیز کاهش میزان فتوسنتز با گذشت زمان پس از ۱۲ روز را تایید می-کند (۲۷). در پژوهش‌هایی که بر روی لوبیا (۴۰) و نخود فرنگی (۲۷)، نیز کاهش شدید فتوسنتز در طول زمان را به دلیل اثرات غیر مستقیم کادمیم بر تبادلات گازی گیاه دانسـتند. کـاهش معنـی‌دار فتوسـنتز و کلروفیل با افزایش غلظت کادمیم نیز در گیاهان نـامبرده و همچنـین در این آزمایش در کاهو ($P < 0.05$) مشاهده شد.

نتیجه‌گیری کلی

به طور کلی نتایج این آزمایش نشان می‌دهد که آنتی‌اکسیدان‌ها شاخص‌های حساس‌تری برای نشان دادن اثر سمیت کـادمیم نسـبت به تغییرات وزن، فتوسنتز و کلروفیـل هسـتند. از آنجـایی کـه تجمـع کادمیم در گیاه با نشانه هـای مورفولـوژیکی کمـی همـراه اسـت لـذا سمیت کادمیم در گیاهان قابل مشاهده نیسـت از آنجـایی کـه مقـدار کادمیم در گیاه جهت مصرف انسان نباید از ۰/۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم تجاوز کند بنابراین مصرف این کاهوها سلامت بشر را تهدید می‌کنـد. حتی با وجود آنتی اکسیدانها برای حفاظت گیـاه در برابـر ایـن تـنش محیطی، میزان کادمیم تجمع یافته در گیاه بالا است و خطر این آلوده کننده‌ها همچنان باقی است و با توجه به تکمیل شدن ظرفیت جـذب این آنتی اکسیدان‌ها برای رادیکال‌های آزاد و همچنـین اثـر تجمعـی این فلزات سنگین در اندامهای گیاهی، وجود کادمیم در بافت گیـاهی همچنان تهدیدکننده سلامت بشر است.

سپاسگزاری

این پژوهش در دانشگاه ججیانـگ (Zhejiang) چـین و حمایـت مالی یونسکو انجام شده است که به این وسیله سپاسگزاری می‌گردد. همچنین از خانم پروفسور فانگ که اینجانب را در اجرای این پژوهش یاری نمودند، سپاسگزارم.

منابع

1- Ahmad P., Ozturk M., et al. 2012. Oxidative damage and antioxidants induced by heavy metal stress in two cultivars of mustard (*Brassica juncea* L.) plants. Fresen Environ Bull, 21(10): 2953-2961.
2- Albertina X., Leonardo R.R., Miguel A.V., Sylvie C., Jean-Franc and Claudemir F. 2006. Cadmium phytotoxicity: Quantitative sensitivity relationships between classical endpoints and antioxidative enzyme biomarkers. ScioTotal Environ, 357:120-127.
3- Andersson A., and Bingefors S. 1985. Trends and annual variations in Cd concentration in grain of winter wheat. Acta Agriculture Scandinavia, 35: 339-344.
4- Ascencio C.L., and Cedeno-Maldonado A. 1979. Effects of cadmium on carbonic anhydrase and activities dependent on electron transport of isolated chloroplasts. J. Agric. Univ. Puerto Rico, 63. 195-201.
5- Aspinall D., and Paleg L.G. 1981. Proline accumulation: physiological aspects, in: L.G. Paleg, D. Aspinall (Eds.), The Physiology and Biochemistry of Drought Resistance in Plants, Academic Press, Sydney, pp. 205-241.
6- Bachmair A., Becker F., Masterson R.V., and Schell J. 1990. Perturbation of the Ubiquitin system causes leaf

Archive of SID

www.SID.ir

curling, vascular tissue alterations and necrotic lesions in a higher plant. EMBO J, 9: 4543-4549.
7- Barcelo J., and Poschenreider C. 1990. Plant water relations as affected by heavy metals: a review. J.Pl. Nutr, 13: 1-37.
8- Baszynski T., Wajda L., Wolinska D., Krupa Z., and Tukendorf A. 1980. Photosynthetic activities of cadmium treated tomato plants, Physiol. Plant, 48: 365-370.
9- Beauchamp I.F. 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels, Anal. Biochem, 44: 151-155.
10- Bowler C., Van Camp W., Van Montagu M., and lnze D. 1994. Superoxide dismutase in plants. CRC Cril Rev Plant Sci, 13: 199-218.
11- Chandlee J.M., and Scandalios J.G. 1984. Analysis of variants affecting the Catalase development program in *maize scutellum* Theor. Appl. Genet, 69: 71-77.
12- Claussen W. 2002. Growth, water use efficiency, and proline content of hydroponically grown tomato plants as affected by nitrogen source and nutrient concentration. Plant Soil, 247: 199-209.
13- Costa G. and Morel J. 1994. Water relations, gas exchange and amino acid content in Cd treated lettuce. Plant Physiol. Biochem, 32: 561-570.
14- Czarnecka E., Edelman L., Schoffl F., and Key J.L. 1984. Comparative analysis of physical stress responses in soybean seedlings using cloned heat shock cDNAs. Plant Mol. Biol, 3: 45-58.
15- Dalir, N., Karimian N., et al. 2013. Chemical forms of cadmium in a calcareous soil treated with different levels of phosphorus and cadmium and planted to spinach. Archives Agron Soil Scien, 59(4): 559-571.
16- Davis R.D., and Calton-Smith C. (Eds), 1980. Crops as Indicators of the Significance of Contamination of Soil by Heavy Metals. WRC, Stevenage TR. 140.
17- Edelman L., Czarnecka E., and Key J.L. 1988. Induction and accumulation of heat shock-specific poly (A^-) RNAs and proteins in soybean seedlings during arsenite and cadmium treatments. Plant Physiol, 86: 1048-1056.
18- Eriksson J.E. 1990. Factors influencing adsorption and plant uptake of Cd from agricultural soils. Swedish University of Agricultural Science, Department of Soil Science, Reports and Dissertations.
19- Fenik S.I., Solodushko V.G., Trofimyak T.B, and Blume Y.B. 1997. Cadmium-tolerance in *Nicotiana plumbaginifolia* depends on synthesis of both phytochelatin and cadmium binding proteins. J. Exp. Bot, 48: 99.
20- Fisher R.A., Rees D., Sayre K.D., Lu Z.M., Candon A.G., and Saavedra A.L. 1998. Wheat yield progress associated with higher stomatal conductance and photosynthetic rate, and cooler canopies. Crop Sci, 38: 1467-1475.
21- Goering M., Waalkes P., Klaassen C.D., In: R.A. Goyer, M.G. Cherian (Eds.). Handbook of Experimental pharmacology, Vol. 115, Toxicology of Metals, Biochemical Effects, Springer, New York,1994, pp. 189-214.
22- Hershko A. 1988. Ubiquitin mediated protein degradation. J. Biol. Chem, 263: 15237–15240.
23- Jungmann J., Reins H.A., Schobert C., and Jentsch S. 1993. Resistance to cadmium mediated by ubiquitin dependent proteolysis. Nature, 361: 369-371.
24- Kabata- pendias A., and Pendias H. 1992. Elements of group II. In: Trace elements in soils and plants. 2 nd Edition, CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor London, 131-140.
25- Kaschel, Arno et al. 2002. Cadmium Binding by Fractions of Dissolved Organic Matter and Humic Substances from Municipal Solid Waste Compost J. Environ. Qual, 31:1885-1892.
26- Kastori R., Petrovic M., and Petrovic N. 1992. Effect of excess lead, cadmium, copper and zinc on water relations in sun flower. J.Plant Nutr, 15: 2427 2439.
27- Lakshaman K.C., and Sawhney S.K. 1999. Photosynthetic activities of *Pisum sativum* seedlings grown in presence of cadmium Plant Physiol. Biochem, 37 (4): 297-303.
28- Leita L., Contin M., and Maggioni A. 1991. Distribution of cadmium and induced Cd-binding proteins in roots, stems and leaves of *Phaseolus vulgaris*. Plant Sci, 77: 139-147.
29- Lin C.Y., Chen M.Y., and Key J.L. 1985. Solute leakage in soybean seedlings under various heat shock regimes. Plant Cell Physiol, 26: 1493-1498.
30- Madan S.H., Nainawatee S., Jain S., Jain R.K., Malik M.S., and Chowdhury J.B. 1994. Leaf-position dependent changes in proline, pyrroline-5-carboxylate reducrase activity and water relations under salt stress in genetically stable salt-tolerant somaclones of *Brassica juncea* L. Plant Soil, 163: 151-156.
31- Mansour M.M.F. 2000. Nitrogen containing compounds and adaptation of plants to salinity stress. Biol. Plant, 43: 491-500.
32- Marchetti S., and Leita L. 1995. Risposta sporofiticae gametofitica allo stress da cadmio in Pisum sativum. In: Atti XXXIX Convegno Annuale Societa Italiana di Genetica Agraria,Vasto Marina, Italy, pp. 207-208.
33- Mazhoudi A., Chaoui M.H., and Ghorbal E.E. 1997. Response of antioxidant enzymes to excess copper in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.), Plant Sci, 127: 129-137.
34- McKenna I.M., Chaney R.L., and Williams F.M. 1993. The effects of cadmium and zinc interactions on the accumulation and tissue distribution of zinc and cadmium in lettuce and spinach. Environmental Pollution, 79: 113-120.

Archive of SID

www.SID.ir

35- Mesut Cimrin K., and Yilmaz I. 2005. Humic acid applications to lettuce do not improve yield but do improve phosphorus availability. Acta Agr Scand B-Soil &Plant, 55: 58-63.
36- Neumann D., Lichtenberger O., Gunther D., Tschiersch K., and Nover L. 1994. Heat-shock proteins induce heavy-metal tolerance in higher plants. Planta, 194: 360-367.
37- Östman, G. 1996. Salix förmaga att ta upp kadmiumen fältstudie. Swedish University of Agricultural Science, Department of Ecology and Environmental research, Section of Short Rotation Forestry, Report. 55: 71-73.
38- Padmaja K., Prasad D.D.K., and Prasad A.R.K. 1990. Inhibition of chlorophyll synthesis in *Phaseolus vulgaris* seedlings by cadmium acetate. Photosynthetica, 24: 399-405.
39- Panaretou B., and Piper P.W. 1992. The plasma membrane of yeast acquires a novel heat shock protein (hsp30) and displays a decline in proton-pumping ATPase levels in response to both heat shock and the entry to stationary phase. Eur. J. Biochem, 206: 635-640.
40- Prasad M.N.V. 1997. Trace metals. In: Prasad, M.N.V. (Ed.). Plant Ecophysiology. Wiley, New York, pp. 207-249.
41- Perl-Treves R., and Galun E. 1991. The tomato Cu, Zn superoxide dismutase genes are developmentally regulated and response to light and stress. Plant Mol Biol, 745-760.
42- Reddy G., and Prasad M.N.V. 1995. Cadmium-induced protein phosphorilation changes in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. J. Plant. Physiol, 145: 67-70.
43- Schobert B., and Tschesche H. 1978. Unusual solution properties of proline and its interaction with proteins. Biochim. Biophys Acta, 541: 270-277.
44- Schoffl F., and Key J.L. 1982. An analysis of mRNAs for a group of hsp of soybean using cloned DNAs. J. Mol. Appl. Genet, 1: 301-314.
45- Santandrea G., Pandolfini T., and Bennici A. 2000. Physiological characterization of Mn-tolerant tobacco plants selected by in vitro culture. Plant Sci, 150: 163-177.
46- Sawhney V., Sheoran I.S., and Singh R. 1990. Nitrogen fixation, photosynthesis and enzymes of ammonia assimilation and ureide biogenesis in nodules of mung bean (*Vigna radiata*) grown in presence of cadmium. Indian J. Exp. Biol, 28: 883 886.
47- Scandialos J.C. 1993. Oxygen stress and superoxide dismutases. Plant physiol, 101: 7-12.
48- Shah K., Kumar R.G., Verma S. and Dubey R.S. 2001. Effect of cadmium on lipid peroxidation, superoxideanion generation and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. Plant Sci, 161: 1135-1144.
49- Schat H., Sharma S.S., and Vooijs R. 1997. Heavy metal induced accumulation of free proline in metal tolerant and a non-tolerant ecotype of *Silene vulgaris*. Physiol. Plant, 101: 477-482.
50- Sheoran I.S., Agarwal N., and Singh R.1990. Effect of cadmium and nickel on in vivo carbon dioxide exchange rate of pigeon pea (*Cajanus cajan* L.). Plant Soil, 129: 243-249.
51- Sheoran I.S., Agarwal N., and Singh R. 1990a. Effect of cadmium and nickel on in vivo carbon dioxide exchange rate of pigeon pea (*Cajanus cajan* L.). Plant Soil, 129: 243-49.
52- Skorzynska E., Bednara J., and Baszynski T. 1995. Some aspects of runner bean plant response to cadmium at different stages of the primary leaf growth. Acta Soc. Bot. Pol, 64: 165-170.
53- Sepehri M., Saleh Rastin N., and Alikhani H. 1385. Effect of soil pollution on fixation of Nitrogen on *Sinorizobium meliloti*. J scien & tech of agric & nat scien, 10: 153.
54- Van Assche F., and Clijsters H. 1990. Effects of metals on enzyme activity in plants. Plant Cell Environ, 13: 195-206.
55- Van Camp W., Bowler C., Villarroel R., Tsang EWT., and Van Montagu M. 1990. Characterization of iron superoxide dismutase cDNAs from plants obtained by genetic complement &ion in Escherichia coli. Proc Nat/ Acad Sci USA. 87: 9903-9907.
56- Vierling E. 1991. The roles of heat shock proteins in plants. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol, 42: 579-620.
57- Wagner G.J. 1993. Accumulation of cadmium in crop plants and its consequences to human health. Adv. Agron, 51: 173-212.
58- Waters E.R., Lee G.J., and Vierling E. 1996. Evolution, structure and function of the small heat-shock proteins in plants. J. Exp. Bot, 47: 325-338.
59- Weigel H.J. 1985. Inhibition of photosynthetic reactions of isolated intact chloroplast by cadmium. J. Plant Physiol, 119: 179-189.
60- Weigel H.J. 1985. The effect of Cd^{2+} on photosynthetic reactions of mesophyll protoplasts. Physiol. Plant. 63: 192-200.
61- Yi T.H. and Ching H.K. 2003. Changes in protein and amino acid contents in two cultivars of rice seedlings with different apparent tolerance to cadmium. Plant Growth Regul, 40: 147-155.
62- Zhang F., Li X., Wang C. and Shen Z. 2000. Effect of cadmium on antoxidation rate of tissue and inducing accumulation of free proline in seedlings of mung bean. J. Plant Nutr, 23: 356-368.
63- Zbates L.S., Waldren R.P. and Teare L.D. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant and Soil, 39: 205-207.

Archive of SID

www.SID.ir