

تأثیر تنش فلز کادمیوم بر برخی صفات مورفولوژیک و فیزیولوژیک گیاه داروئی ماریتیغال (*Silybum marianum*)

ثریا پورتبیزی^۱، شهرام پورسیدی^{۲*}، روح‌اله عبدالشاهی^۱ و نازی نادرنژاد^۳

^۱گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، ^۲گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی،

دانشگاه شهید باهنر کرمان، ^۳گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید باهنر، کرمان

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۴/۲۱، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۵/۱۲/۲۴)

چکیده

کادمیوم یکی از فلزات سنگین است که در گیاهان تنش اکسیداتیو ایجاد می‌کند. در این پژوهش که در سال ۹۵-۹۴ در دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید باهنر کرمان انجام شد، اثر سمیت این فلز بر گیاه داروئی ماریتیغال مورد بررسی قرار گرفت. تأثیر چهار تیمار کلرید کادمیوم (صفر (شاهد)، ۳۰۰، ۶۰۰ و ۹۰۰ میکرومولار) بر گیاه ماریتیغال با استفاده از یک طرح کاملاً تصادفی با پنج تکرار بررسی گردید. نتایج محاسبه شاخص تنش تحمیل شده، شدت تنش وارد بر گیاه را در سطوح مختلف تیمار تایید کرد. کاهش وزن خشک اندام هوایی، سطح برگ، مقدار کلروفیل a و کلروفیل کل در غلظت ۹۰۰ میکرومولار معنی‌دار بود. کلروفیل b برگ‌ها در هر سه سطح تنش در مقایسه با شاهد، به طور معنی‌داری کاهش یافت. با این حال محتوای کاروتنوئید تغییر معنی‌داری نشان نداد. غلظت مالون دآلدئید، محتوای آنتوسیانین، ترکیبات فنلی کل و فلاونوئیدها در سطح ۹۰۰ میکرومولار کادمیوم افزایش یافت. میزان پروتئین کل در سطح ۹۰۰ میکرومولار، کاهش و میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیااز، گلوکاتایون ردوکتاز و آسکوربات پراکسیداز در این سطح نسبت به شاهد افزایش معنی‌دار نشان داد. نتایج تایید کرد این گیاه داروئی دارای مکانیسم‌های متفاوت فیزیولوژیک و بیوشیمیایی جهت کاهش خسارت ناشی از تنش کادمیوم است. سنجش غلظت یون کادمیوم در بافت برگ و ریشه با استفاده از روش جذب اتمی نشان داد که غالب کادمیوم در برگ این گیاه تجمع و مقدار کمی در ریشه باقی می‌ماند که می‌تواند ماریتیغال را به عنوان گزینه مناسبی جهت مطالعات گیاه‌پالایی معرفی نماید.

واژه‌های کلیدی: آنزیم آنتی‌اکسیدان، تنش کادمیوم، ماریتیغال، گیاه‌پالایی

مقدمه

معیارهای کنترل کیفیت گیاهان دارویی و محصولات فرآوری‌شده آن‌ها می‌باشند و ممکن است با تحت تأثیر قراردادن مسیر زیست‌ساختی متابولیت‌های ثانویه، باعث تغییرات قابل توجه در کمیت و کیفیت این متابولیت‌ها شوند. با توجه به افزایش استفاده از کودهای شیمیایی، سموم و آفت‌کش‌های مختلف برای افزایش عملکرد محصولات

در سال‌های اخیر استفاده از داروهای گیاهی به‌طور چشم‌گیری در سراسر جهان افزایش یافته است، از این‌رو سلامت و کیفیت مواد خام گیاهان دارویی و محصولات فرآوری‌شده آنها یکی از نگرانی‌های عمده سازمان بهداشت جهانی است. آلودگی‌های زیست‌محیطی، از جمله فلزات سنگین یکی از

* نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: spseyedi@gmail.com

افزایش تحمل در برابر تنش ضرورت دارد. از این رو این تحقیق با هدف بررسی پارامترهای مورفولوژیک و فیزیولوژیک در شرایط تنش ناشی از افزایش فلز کادمیوم انجام شده است.

مواد و روش‌ها

بذرهای گیاه ماریتیغال از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه گردید و پس از ضدعفونی با هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد به مدت ۱۰ دقیقه، به کمک آب مقطر چندین بار شستشو داده شد. بذرهای ضدعفونی شده، طبق مطالعات نبئی و همکاران (۱۳۹۳) جهت تسریع در جوانه زنی با نیترات پتاسیم ۲٪ به مدت ۲۴ ساعت تیمار و سپس در گلدان حاوی کوکوپیت در قفسه نوری کشت گردیدند. پس از یک هفته آبیاری با آب مقطر و سبز شدن گیاهچه‌ها، به مدت دو هفته از محلول کامل غذایی جهت آبیاری استفاده شد. بعد از آن آبیاری توسط محلول‌های حاوی ۹۰۰ و ۶۰۰، ۳۰۰، ۰ میکرومولار کلرید کادمیوم به مدت دو هفته انجام شد. پس از طی مرحله سه‌برگی، گیاهان از گلدان خارج و وضعیت رویشی ریشه‌ها بررسی شد و سپس اندام‌های مختلف گیاه شامل ریشه و برگ جدا و نمونه‌ها در نیتروژن مایع منجمد و تا زمان اندازه‌گیری پارامترها در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

برای اندازه‌گیری وزن خشک (Laiye et al., 2003)، برگ‌ها در آون در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت قرار گرفت. پس از خشک شدن نمونه‌ها توزین شد. برای مقایسه سطح برگ (سلطانی و همکاران، ۱۳۸۵) گیاه شاهد با گیاهان تحت تیمار، از برگ‌های جدا شده، کپی کاغذی تهیه گردید. سپس وزن کپی مورد نظر با ترازو اندازه‌گیری شد. یک سانتیمتر مربع از کادر کاغذ نیز جدا وزن و با محاسبه نسبت وزن برگ به وزن یک سانتیمتر مربع از کاغذ، سطح هر برگ محاسبه و مقایسه شد. در این روش می‌بایست حتماً از یک جنس کاغذ استفاده گردد و دقت زیادی در بریدن شکل برگ‌ها از روی کاغذ انجام شود، در این صورت روشی بسیار دقیق می‌باشد.

اندازه‌گیری مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی برگ شامل کلروفیل a، b، کلروفیل کل و کاروتنوئیدها با استفاده از روش

کشاورزی از یک طرف و توسعه شهرنشینی و فعالیت‌های صنعتی از سوی دیگر، ممکن است در مواردی این عناصر در گیاهان دارویی انباشته شوند (عسکری لجایر و همکاران، ۱۳۹۳). در بین فلزات سنگین، به کادمیوم توجه ویژه‌ای شده چرا که طبق مطالعات نورانی‌آزاد و کفیل‌زاده (۱۳۹۰) به‌راحتی به وسیله ریشه گیاه جذب می‌شود و سمیت آن تا ۲۰ برابر بیشتر از سایر فلزات سنگین است. گزارش شده است که این فلز سبب کلروز و نکروز برگ‌ها می‌شود (Singh and Myhr, 1998). کادمیوم اگرچه برای رشد گیاه ضروری نیست، اما به‌راحتی از طریق پوست ریشه جذب و سپس از راه سیمپلاستی یا آپوپلاستی وارد بافت چوب می‌شود. مطالعات Sanita و Gabbrielli (۱۹۹۹) نشان داد گیاهان برای حفاظت در برابر تنش اکسیداتیو حاصل از سمیت غلظت‌های بالای کادمیوم مجهز به یک سیستم جاروب‌کننده رادیکال‌های آزاد می‌باشند. این سیستم شامل آنزیم‌های آنتی‌اکسیداسیون مانند کاتالاز و نیز سیستم آنتی‌اکسیدانی غیر آنزیمی می‌باشد. سمیت کادمیوم در اثر افزایش این عنصر به محیط رشد گیاه به شکل‌های مختلف دیده شده است که شامل کاهش عملکرد، کاهش رشد ریشه و برگ، بازدارندگی فعالیت برخی آنزیم‌ها، تولید موتازن‌ها، کاهش سطح برگ و ماده خشک گیاه می‌شود. مطالعات گوناگون از جمله آزمایشات Hegedus و همکاران (۲۰۰۱) روی تاثیر کادمیوم بر مقدار کلروفیل کل، کلروفیل a، b و کاروتنوئیدها در گیاهان عالی و نیز مطالعات Ramos و همکاران (۲۰۰۲) در بررسی تجمع کادمیوم موید اهمیت موضوع است. گیاه ماریتیغال متعلق به تیره آستراسه (Asteraceae)، گیاهی دارویی است که در مناطق مختلف کشور ایران از جمله چالوس، گنبدکاووس، بابل، دشت مرغان، کرمانشاه، خوزستان و جهرم به صورت خودرو می‌روید (صرامی و همکاران، ۱۳۹۱). مطالعات Gupa (۲۰۰۳) نشان می‌دهد از این گیاه ماده‌ای به نام سیلی مارین با خواص درمانی فراوان استخراج شده که میزان آن در بذر نسبت به سایر اندام‌های گیاه بیشتر است. شناخت اثرات تنش‌های مختلف روی فیزیولوژی گیاهان دارویی برای آگاهی از مکانیسم‌های مقاومت و بقای گیاهان به منظور

موج ۵۳۲ خوانده شد. جذب بقیه رنگیزه‌های غیر اختصاصی در طول موج ۶۰۰ نانومتر تعیین و از این مقدار کسر گردید. نتایج حاصل از اندازه‌گیری بر حسب میکرومول بر گرم وزن تر محاسبه گردید. سنجش میزان آنتوسیانین بر اساس روش Wagner (۱۹۸۷) انجام شد. ۰/۱ گرم از بافت برگ را در هاون چینی با ۱۰ میلی‌لیتر متانول اسیدی (متانول خالص و کلریدریک‌اسید خالص) به نسبت (۱:۹۹) کاملاً ساییده و عصاره در لوله‌های آزمایش سر پیچ‌دار ریخته شد و به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتیگراد قرار گرفت. سپس به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید و جذب محلول بالایی در طول موج ۵۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و نتایج بر حسب میلی‌مولار بر گرم وزن تر بافت ارائه گردید. سنجش فلاونونوئیدهای کل با روش اندازه‌گیری آلومینیوم کلراید کالریتری Zhishen و همکاران (۱۹۹۹) انجام شد. ۰/۱ گرم از بافت برگ در ۱۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰٪ به خوبی ساییده شد و عصاره حاصل در دور ۱۲۰۰۰g سانتریفیوژ گردید. محلول روئی جهت مراحل بعدی استفاده شد. ۵۰۰ میکرولیتر از عصاره برداشته و با آب مقطر به حجم ۵ میلی‌لیتر رسانده شد. ۳۰۰ میکرولیتر سدیم‌نیتريت ۵ درصد و بعد از ۵ دقیقه، ۶۰۰ میکرولیتر کلرید آلومینیوم ۱۰ درصد به محلول اضافه شد. بعد از ۶ دقیقه، ۲ میلی‌لیتر هیدروکسید سدیم ۱ مولار به همراه ۲ میلی‌لیتر آب مقطر به محلول اضافه گردید. شدت جذب محلول در طول موج ۵۱۰ نانومتر خوانده شد. برای محاسبه غلظت فلاونونوئید کل با استفاده از روتین منحنی استاندارد رسم گردید و غلظت فلاونونوئیدهای کل بر حسب میلی‌گرم روتین در ۱۰۰ گرم وزن تر ارائه شد.

محتوای فنلی کل با استفاده از روش Sonald و Laima (۱۹۹۹) اندازه‌گیری شد. ۰/۱ گرم از اندام هوایی گیاه را در ۵ میلی‌لیتر اتانول ۹۶ درصد ساییده و به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی نگهداری شد. سپس به یک میلی‌لیتر محلول رویی ۱ میلی‌لیتر اتانول ۹۵٪ اضافه گردید و با آب مقطر دوبار تقطیر شده به حجم ۵ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر معرف فولین ۵۰٪ و ۱ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۵٪ به آن اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت ۱ ساعت در تاریکی نگهداری شد و

Lichtenthaler (۱۹۸۷) انجام شد. ۰/۲ گرم از برگ‌های فریز شده با ۱۵ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد سائیده شد و پس از صاف کردن جذب آنها با اسپکتروفتومتر در طول موج‌های ۶۴۶/۸، ۶۶۳/۲۰ و ۴۷۰ نانومتر خوانده شد و غلظت رنگیزه‌ها بر حسب میکروگرم بر گرم وزن تر محاسبه گردید. غلظت بر حسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره گیاهی تعیین و سپس نتایج بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر بافت محاسبه شد.

$$\text{Chl a} = 12/25 A_{663.2} - 2/79 A_{646.8}$$

$$\text{Chl b} = 21/21 A_{646.8} - 5/1 A_{663.2}$$

$$\text{Chl T} = \text{chl a} + \text{chl b}$$

$$\text{Car} = (1000 A_{470} - 1/8 \text{chl a} - 85/0.2 \text{chl b}) / 198$$

در این رابطه Chl a، Chl b، Chl T و Car به ترتیب کلروفیل a، b، کل و کاروتنوئید می‌باشند.

شاخص میزان تنش تحمل‌شده (Tolerance stress Index):

Ti: نسبت و معیاری برای مقایسه وزن خشک کل، بخش هوایی و ریشه گیاهان تحت تنش با تیمار شاهد می‌باشد و فاقد واحد است. این شاخص در واقع شدت تنش وارد بر گیاه را نشان می‌دهد. در این تحقیق شاخص وارده به اندام هوایی با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (Ewaise, 1997):

$$Ti = \frac{Yp - Ys}{Yp}$$

Yp = وزن ماده خشک اندام هوایی در شرایط بدون تنش

Ys = وزن ماده خشک اندام هوایی در شرایط تنش

اندازه‌گیری مالون‌دالدهید (MDA) به روش Heath و

Packer (۱۹۶۹) انجام شد. طبق این روش ۰/۲ گرم از بافت برگ فریزشده، با ۵ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک‌اسید (TCA) ۰/۱ درصد سائیده شد. عصاره حاصل با سانتریفیوژ به مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰g سانتریفیوژ شد. به یک میلی‌لیتر از محلول روئی حاصل از سانتریفیوژ، ۴ میلی‌لیتر محلول تری‌کلرواستیک‌اسید (TCA) ۲۰ درصد که حاوی ۰/۵ درصد تیوباربیتوریک‌اسید (TBA) بود، اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد در حمام آب‌گرم حرارت داده شده سپس بلافاصله در یخ سرد شد و دوباره مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰g سانتریفیوژ گردید. شدت جذب این محلول با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول

آسکوربات ۰/۵ میلی مولار، ۳۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۱۵ میلی مولار، ۳۰ میکرولیتر EDTA ۱۰ میلی مولار و ۱۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. با شروع واکنش آنزیمی و به دنبال اکسید شدن آسکوربات، جذب در طول موج ۲۹۰ نانومتر، دو دقیقه پس از شروع واکنش نسبت به زمان شروع واکنش در بازه‌های زمانی یک دقیقه‌ای خوانده و فعالیت آنزیم بر حسب واحد آنزیم در مقدار پروتئین کل (میلی گرم) گزارش شد.

جهت اندازه گیری فعالیت آنزیم گلوکاتایون ردوکتاز (GR) به وسیله اکسیداسیون NADPH از روش Foyer و Halliwell (۱۹۷۶) استفاده شد. در این روش مخلوط واکنش با حجم کل ۳ میلی لیتر حاوی ۲/۴۰۰ میلی لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی مولار (PH= ۷/۸)، ۳۲/۸۳ میلی گرم گلوکاتایون اکسید شده (GSSG)، ۰/۵ میلی مولار، ۱۰۰ میکرولیتر NADPH ۰/۱ میلی مولار، ۰/۰۷۵ گرم EDTA ۲ میلی مولار و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. واکنش با اضافه کردن NADPH شروع شد. جذب نمونه‌ها به مدت ۳ دقیقه در طول موج ۳۴۰ نانومتر خوانده شد. سنجش غلظت یون کادمیوم در گیاه در بافت ریشه و برگ با استفاده از روش جذب اتمی انجام شد. بافت خشک گیاهی در کوره با دمای ۵۰۰ درجه سانتی گراد سوزانده شد و در ۱۰ سی سی اسید هیدروکلریدیک ۲ نرمال ریخته شد. سپس محلول حاصل گرم گردید تا بخارات اسیدی از محلول خارج شود. بعد از آن حجم محلول را به ۱۰۰ میلی لیتر رسانده و از کاغذ صافی عبور داده شد. از محلول به دست آمده برای سنجش غلظت با استفاده از دستگاه طیف نگار جذب اتمی Spectra AA مدل Atomic Absorption Spectrometer استفاده شد.

تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از مراحل مختلف این تحقیق با استفاده نرم افزار آماری SAS و تجزیه واریانس ANOVA انجام و برای مقایسه اثر غلظت‌های مختلف کادمیوم بر پارامترهای مورد بررسی از آزمون دانکن و ضریب اطمینان ۹۵٪ استفاده شد.

نتایج

سپس جذب هر نمونه در طول موج ۷۲۵ نانومتر خوانده شد و با استفاده از منحنی استاندارد غلظت ترکیبات فنلی کل بر حسب میلی گرم بر گرم وزن تر محاسبه گردید.

فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL) با استفاده از روش Hahlbrock و Ragg (۱۹۷۵) ۳۰۰ میلی گرم از بافت برگ در هاون سرد حاوی Tris-Hcl (PH= ۸/۸) ۵۰ میلی مولار حاوی بتامرکاپتوتانول ۱۵ میلی مولار ساییده و سپس ۳۰ دقیقه با دور ۵۰۰۰، سانتریفیوژ شد. محلول رویی جهت سنجش میزان فعالیت آنزیم استفاده شد. در یک لوله ۱ میلی لیتر از بافر استخراج به همراه ۰/۵ میلی لیتر فنیل آلانین ۱۰ میلی مولار، ۰/۴ میلی لیتر آب دوبار تقطیر و ۱ میلی لیتر عصاره آنزیمی مخلوط و ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شد. واکنش با اضافه کردن ۰/۵ میلی لیتر تری کلرواستیک اسید ۱۰٪ پایان می پذیرد. غلظت سینامیک اسید با قرائت جذب ۲۹۰ نانومتر محاسبه شد. یک واحد از فعالیت آنزیم معادل ۱ میکرومول از سینامیک اسید تولید شده در دقیقه است.

جهت سنجش میزان پروتئین کل یک گرم برگ فریز شده در یک هاون چینی محتوی ۳ میلی لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی مولار که دارای اتیلن دی آمین تتراستیک اسید ۱ میلی مولار، فنیل متان سولفونیل فلورید ۱ میلی مولار و پلی وینیل پیرولیدین ۱ درصد بود، ساییده شد. عصاره حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در سانتریفیوژ یخچال دار با ۱۴۰۰۰ دور و دمای ۴ درجه قرار گرفت. جهت سنجش پروتئین کل از روش Bradford (۱۹۷۶) استفاده شد. به این منظور به لوله‌های آزمایش مقدار ۰/۱ میلی لیتر عصاره پروتئینی، ۵ میلی لیتر معرف بیوره افزوده و سریعاً ورتکس گردید. پس از ۲ دقیقه و قبل از یک ساعت جذب محلول‌ها در طول موج ۵۹۵ قرائت و غلظت پروتئین با استفاده از منحنی استاندارد آلومین و بر حسب میلی گرم بر گرم وزن تر محاسبه گردید.

برای سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX) با استفاده از روش Nakano و Asada (۱۹۸۱)، مخلوط کل واکنش با حجم ۳ میلی لیتر شامل ۲/۴۹۰ میلی لیتر بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی مولار با PH= ۷، ۳۰۰ میکرولیتر

سنجش میزان آنتوسیانین و محتوای فلاونوئید کل در برگ‌ها نشان داد که تیمار ۹۰۰ میکرومولار باعث افزایش معنی‌دار این پارامترها شده است. میزان ترکیبات فنلی در دو سطح ۶۰۰ و ۹۰۰ میکرومولار نسبت به شاهد افزایش یافته و تفاوت معنی‌دار نشان داد (شکل ۵ و جدول ۱، ۲).

فعالیت فنیل آلانین آمونیا لیا ز: طبق نتایج شکل (A) ۶ افزایش فعالیت این آنزیم با افزایش سطح کلرید کادمیوم به ۹۰۰ میکرومولار تفاوت معنی‌داری را نسبت به شاهد نشان داد (جدول ۱ و ۲).

محتوای پروتئین کل: نتایج تغییرات مقدار پروتئین در برگ‌های ماریتیغال نشان می‌دهد با افزایش سطح تنش مقدار پروتئین کل به طور معنی‌داری در سطح ۹۰۰ میکرومولار کاهش می‌یابد. این کاهش همان‌طور که در شکل (B) ۶ نشان داده شده است بین سطوح ۳۰۰ و ۶۰۰ میکرومولار تفاوت معنی‌داری نشان نداد، هرچند تفاوت کاهش در این دو سطح نسبت به شاهد معنی‌دار بود (جدول ۱ و ۲).

فعالیت آنزیم گلوکاتایون ردوکتاز: بررسی اثر سطوح مختلف کلرید کادمیوم (شکل (C) ۶) بیانگر افزایش این فعالیت این آنزیم در برابر افزایش غلظت کادمیوم است و این افزایش در سطح ۹۰۰ میکرومولار در بالاترین حد و در سطوح ۳۰۰ و ۶۰۰ تفاوت معنی‌دار با شاهد نداشت (جدول ۱ و ۲).

فعالیت آسکوربات پرکسیداز: طبق نتایج شکل (D) ۶ فعالیت آسکوربات پرکسیداز با افزایش سطح کلرید کادمیوم به ۶۰۰ و ۹۰۰ میکرومولار تفاوت معنی‌داری را نسبت به شاهد نشان داد. هر چند فعالیت این آنزیم نسبت به آنزیم گلوکاتایون ردوکتاز کمتر بود (جدول ۱ و ۲).

شاخص تنش تحمیل شده: از نظر مقدار Ti تیمارها به سه گروه دسته بندی شدند، به طوری که تیمار شاهد کمترین مقدار تنش تحمیل شده را نشان داد و سایر تیمارهای کادمیوم مقدار بالاتری را نشان دادند (شکل ۷).

جذب و تجمع کادمیوم: مقدار جذب و تجمع این فلز در برگ و ریشه گیاه شاهد با گیاهان تحت تیمار مقایسه شد.

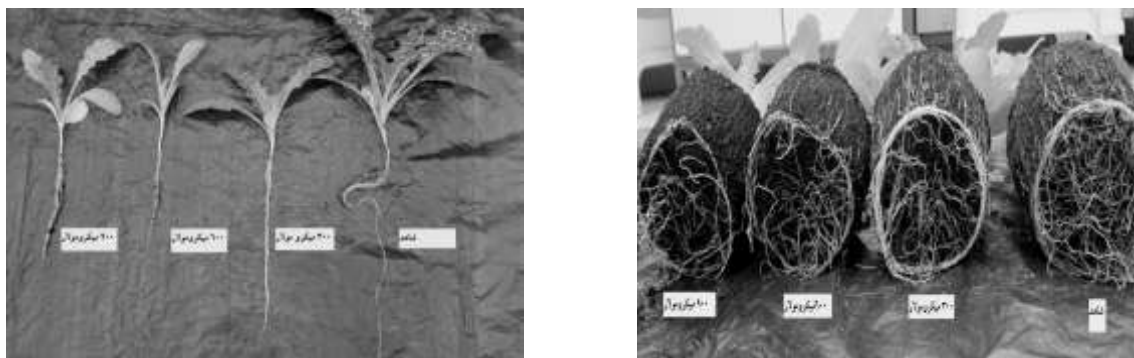
پارامترهای مورفولوژیک: خارج کردن گیاهچه‌ها با خاک از گلدان نشان داد که حجم ریشه بطور کاملاً محسوسی در سطوح مختلف تیمار نسبت به شاهد کاهش یافته است. بعد از شستشوی خاک و جدا کردن ریشه‌های فرعی، کاهش طول ریشه اصلی در سطوح بالای تیمار کاملاً محرز بود (شکل ۱). در حقیقت کادمیوم از تقسیم سلول‌های منطقه مریستمی و رشد سلول‌های منطقه رشد جلوگیری می‌کند و از طرف دیگر تمایز زودرس و چوبی شدن دیواره سلول‌های واقع در منطقه رشد طولی سلول می‌تواند از دلایل دیگر کاهش رشد ریشه باشد (Fusconi et al., 2007).

وزن خشک اندام هوایی: مقایسه گیاهان تیمار شده با گیاه شاهد (شکل ۲a) نشان داد که با افزایش غلظت کادمیوم این وزن کاهش می‌یابد. وزن خشک اندام هوایی در غلظت ۹۰۰ میکرومولار کادمیوم کاهش چشم‌گیری نسبت به گیاه شاهد داشت و اختلاف معنی‌دار بین شاهد و این غلظت مشاهده شد (جدول ۱ و ۲).

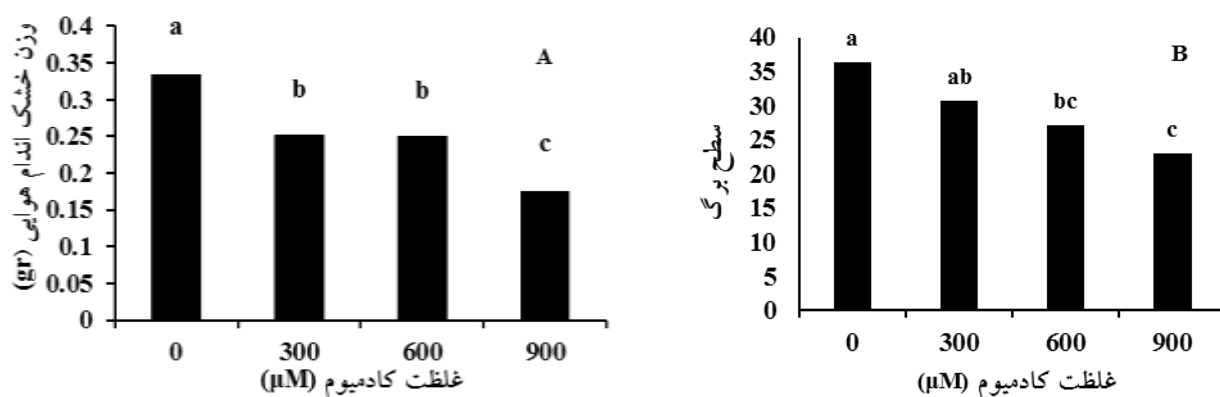
سطح برگ: نتایج حاصل از این تحقیق نشان می‌دهد که در گیاهان تحت تنش سطح برگ نسبت به گیاه شاهد اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهد (شکل ۲b).

رنگیزه‌های فتوسنتزی: نتایج نشان داد که کادمیوم در غلظت ۳۰۰ میکرومولار، اثر چندانی بر مقدار کلروفیل a، کلروفیل کل و کاروتنوئید نداشته در حالی که توانسته میزان کلروفیل b را هم‌چون غلظت‌های ۶۰۰ و ۹۰۰ میکرومولار کاهش دهد. کاهش محتوای کلروفیل a و کلروفیل کل در سطوح ۶۰۰ و ۹۰۰ میکرومولار معنی‌دار است (شکل ۳). در این مطالعه هیچ یک از سطوح تیمار علی‌رغم روند رو به افزایش، نتوانسته منجر به تغییرات معنی‌داری نسبت به شاهد در میزان کاروتنوئید برگ این گیاه گردد (جدول ۱ و ۲).

مالون‌دآلدئید: بررسی نشان داد مقدار مالون‌دآلدئید در برگ گیاهان تحت تیمار در غلظت‌های ۳۰۰ و ۶۰۰ میکرومولار کادمیوم تفاوت زیادی با شاهد ندارد (جدول ۱ و ۲)، اما در غلظت ۹۰۰ میکرومولار افزایش چشم‌گیری را نسبت به گیاه شاهد در سطح ۵ درصد نشان می‌دهد (شکل ۴).



شکل ۱- کاهش کل حجم ریشه (راست)، طول ریشه اصلی و رشد رویشی (چپ) در سطوح مختلف تیمار کلرید کادمیوم (به ترتیب در هر شکل از راست به چپ: شاهد، ۳۰۰، ۶۰۰ و ۹۰۰ میکرومولار)



شکل ۲- اثر سطوح مختلف کادمیوم بر وزن خشک اندام هوایی (A) و سطح برگ (B) گیاه ماریتیغال. مقایسه میانگین‌ها (میانگین ۵ تکرار) با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۵ درصد انجام شده است.

جدول ۱- میانگین مربعات صفات مختلف مورد بررسی در چهار سطح تیمار کلرید کادمیوم در گیاه ماریتیغال

منابع تغییرات	درجه آزادی	وزن خشک اندام هوایی	سطح برگ	رنگیزه های فتوسنتزی			جذب برگ	جذب ریشه	مالون دالدنید
				کلروفیل a	کلروفیل b	کاروتنوئید			
کلرید کادمیوم	۳	۰/۰۲۰**	۳۱۹/۲۸۶**	۵/۳۷*	۱۱/۷۱**	۰/۳۲ ^{ns}	۳۷۰۲/۵۲*	۱۵۴۵/۲۸ ^{ns}	۲۰۸۴/۲۶۹**
خطا	۱۶	۰/۰۰۲	۴۳/۰۴	۱/۱۳	۱/۶۱	۰/۲۳	۶۵۵/۵۳	۱۳۷۹/۰۹	۲۸۳/۲۰۸
ضریب تغییرات (%)		۱۷/۶۹	۲۲/۴۰	۳۱/۷۰	۴۲/۵۶	۴۲/۶۶	۵۶/۵۹	۵۵/۱۶	۲۵/۵۱

**، * و ^{ns} به ترتیب معنی دار در سطح احتمال ۵٪، ۱٪ و غیر معنی دار

ادامه جدول ۱- میانگین مربعات صفات مختلف مورد بررسی در چهار سطح تیمار کلرید کادمیوم در گیاه ماریتیغال

منابع تغییرات	درجه آزادی	آنتوسیانین	فلاونوئید کل	فنل کل	پروتئین کل	فعالیت ویژه	فعالیت ویژه	فعالیت ویژه
کلرید کادمیوم	۳	۲۰۴/۹۲۸**	۰/۰۰۲**	۳۲/۴۹**	۰/۰۰۰۰۹**	۱۸۰۸/۰۲۵**	۰/۸۸۵۳**	۴/۲۷۷**
خطا	۱۶	۲۴/۱۰	۰/۰۰۰۰۲	۰/۲۱۱	۰/۰۰۰۰۰۶	۱۶۹/۳۸۵	۰/۱۴۸۹	۰/۷۶۸
ضریب تغییرات (%)		۱۸/۱۰	۵۰/۲۶	۱۷/۵۵	۲۶/۲۲	۴۶/۴۰	۴۸/۷۴	۴۵/۲۴

**، * و ^{ns} به ترتیب معنی دار در سطح احتمال ۵٪، ۱٪ و غیر معنی دار

جدول ۲- مقایسه میانگین اثرات سطوح کلرید کادمیوم برای صفات مختلف مورد بررسی در گیاه ماریتیغال

تیمار	وزن خشک اندام هوایی (gr)	سطح برگ (cm ²)	رنگیزه های فتوسنتزی (mg/grFw)			جذب برگ (mg/kgDw)	جذب ریشه (mg/grFw)	مالون دآلدئید (mg/grFw)
			کلروفیل a	کلروفیل b	کاروتنوئید			
۰	۰/۳۳۴ ^a	۳۶/۳۵۹ ^a	۴/۵۳ ^a	۵/۰۶ ^a	۰/۶۹ ^a	۰/۰۰ ^b	۰/۷۸ ^a	۲۳/۸۵ ^b
۳۰۰	۰/۲۵۲ ^b	۳۰/۶۲ ^{ab}	۳/۷۵ ^a	۳/۱۳ ^b	۱/۰۴ ^a	۳۲/۷۴ ^b	۵۳/۵۰ ^a	۲۰/۸۷ ^b
۶۰۰	۰/۲۵۱ ^b	۲۷/۱۳ ^{bc}	۳/۳۵ ^{ab}	۲/۲۰ ^b	۱/۱۱ ^a	۳۸/۱۱ ^{ab}	۲۸/۱۱ ^a	۲۰/۸۷ ^b
۹۰۰	۰/۱۷۶ ^c	۲۳/۰۰ ^c	۲/۰۵ ^b	۱/۵۴ ^b	۱/۲۹ ^a	۸۵/۲۸ ^a	۱۳/۱۰ ^a	۶۲/۶۰ ^a

در هر ستون تفاوت بین میانگین هایی که دارای حروف مشابه هستند بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ معنی دار نمی باشد.

ادامه جدول ۲- مقایسه میانگین اثرات سطوح کلرید کادمیوم برای صفات مختلف مورد بررسی در گیاه ماریتیغال

تیمار	آنتوسیانین (Mmol/gr Fw)	فلاوونوئید کل (mgrutin/100 gFw)	فنل کل		فعالیت ویژه فنیل آلانین آمونیا لیاز (Unit/mg protein)	فعالیت ویژه آسکوربات پراکسیداز (Unit/mg protein)	فعالیت ویژه گلوکاتایون ردوکتاز
			کل	پروتئین			
۰	۲۰/۶۰۶ ^c	۰/۰۰۲ ^b	۰/۴۱۳ ^c	۵/۰۶ ^a	۸/۷۲ ^b	۰/۲۲۴ ^b	۰/۲۹۸ ^b
۳۰۰	۲۳/۶۳ ^{bc}	۰/۰۰۵ ^b	۰/۸۵۰ ^c	۳/۱۳ ^b	۱۴/۲۹ ^b	۰/۳۶۸ ^b	۰/۶۴۷ ^b
۶۰۰	۲۹/۰۹ ^{ab}	۰/۰۲۲ ^b	۳/۲۷ ^b	۲/۲۰ ^b	۱۸/۲۹ ^b	۰/۶۶۹ ^{ab}	۰/۷۴۶ ^b
۹۰۰	۳۵/۱۴ ^a	۰/۰۵۳ ^a	۵/۹۴ ^a	۱/۵۴ ^b	۵۰/۹۸ ^a	۸۵/۲۸ ^a	۲/۳۷۳ ^a

در هر ستون تفاوت بین میانگین هایی که دارای حروف مشابه هستند بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ معنی دار نمی باشد.

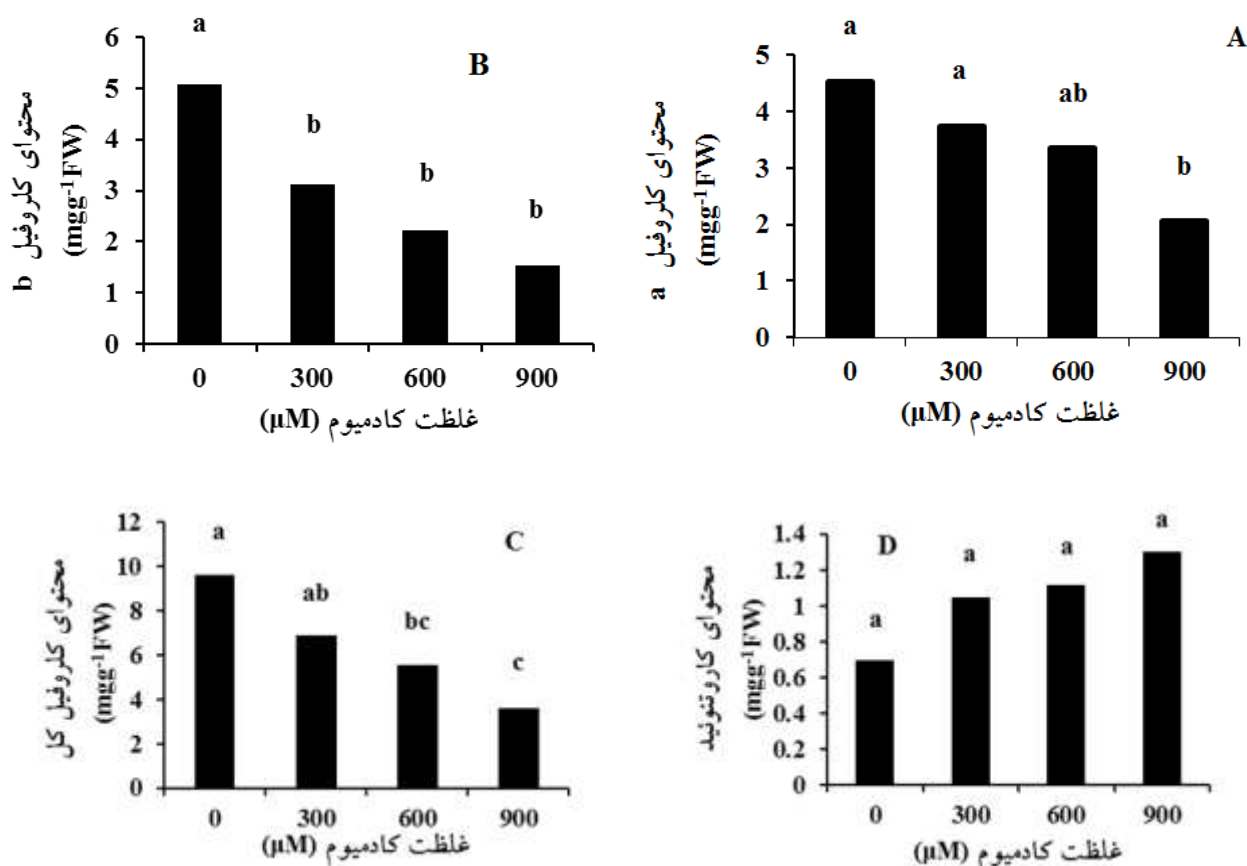
سمیت کادمیوم به ویژه در غلظت های بالا در مورد گیاه مورد مطالعه محسوب می شود. فلزات سنگین با کاهش شدید فتوسنتز و انتقال مواد فتوسنتزی و تقسیم سلولی، رشد گیاه را به شدت کاهش می دهند (Dalla et al., 2005). انباشته شدن کادمیوم در بسیاری از گیاهان باعث کمبود آهن، منیزیم و کلسیم می شود و سنتز کلروفیل را متوقف می کند و سرعت رشد و فتوسنتز را به شدت کاهش می دهد (Mobin and Khan., 2007).

نشان داده شده که کادمیوم به غشاهای تیلاکوئیدی کلروپلاست آسیب می زند و ظرفیت فتوسنتزی را به شدت کاهش داده و باعث توقف رشد و کاهش گسترش برگ نیز می شود (Vassilev and Yordanov., 1997). نتایج حاصل از این تحقیق نیز موید این موضوع است، زیرا در گیاهان تحت

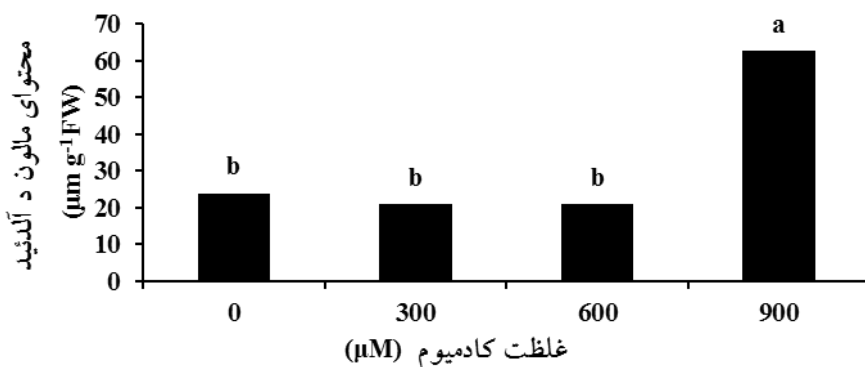
نتایج نشان داد که جذب و تجمع کادمیوم در برگ در دو تیمار شاهد و ۳۰۰ میکرومولار تفاوت معنی داری ندارد، ولی در دو تیمار ۶۰۰ و ۹۰۰ این تجمع در برگ اختلاف معنی داری نشان داد. نتایج آزمایش از عدم وجود اختلاف معنی دار بین کلیه سطوح تیمار از لحاظ جذب و تجمع در ریشه حکایت دارد. وجود میزان اندک کادمیوم در ریشه گیاه شاهد ناشی از خطای آزمایش بوده است. همانطور که در (شکل ۸) مشاهده می شود با افزایش غلظت کادمیوم، مقدار جذب و تجمع کادمیوم در برگ گیاه نیز افزایش می یابد (جدول ۱ و ۲).

بحث

نتایج حاصل از این مطالعه، نشان دهنده بروز واکنش های متعدد در گیاه ماریتیغال بود. کلروز و کاهش رشد از مهم ترین آثار



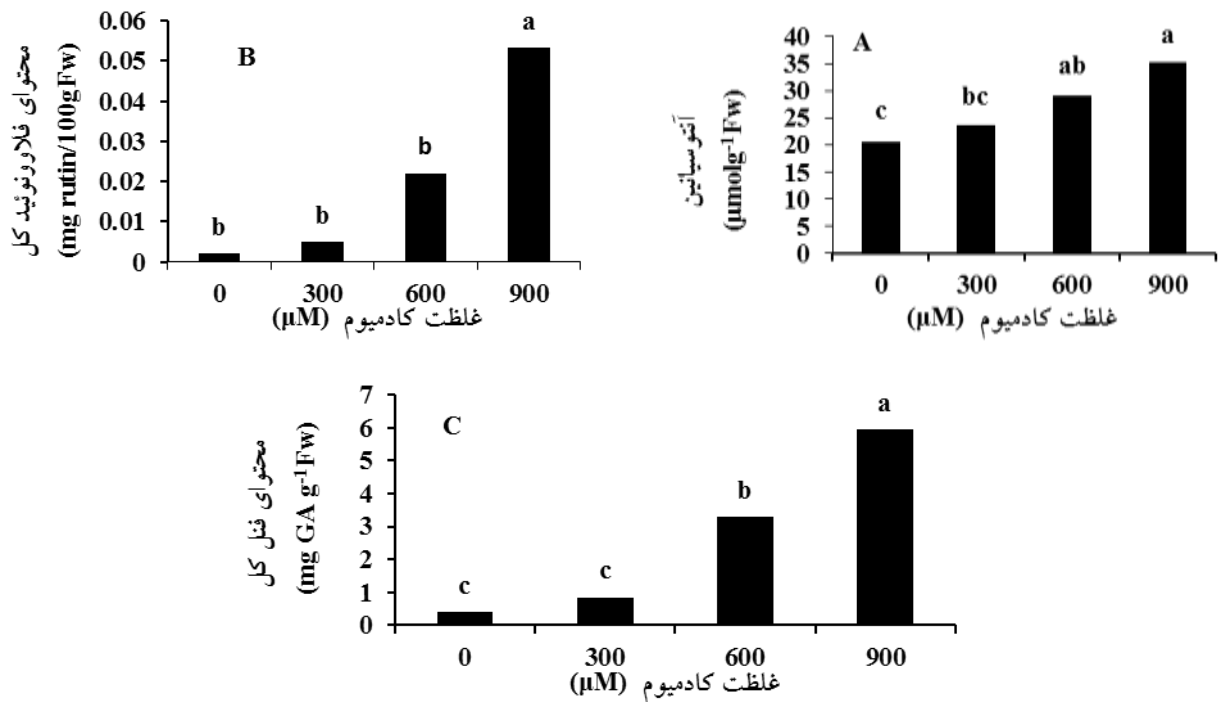
شکل ۳- اثر سطوح مختلف کادمیوم بر مقدار کلروفیل و کاروتنوئید برگ گیاه ماریتیغال، (A) کلروفیل a، (B) کلروفیل b، (C) کلروفیل کل (D) کاروتنوئید. مقایسه میانگین‌ها (میانگین ۵ تکرار) با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۵ درصد انجام شده است.



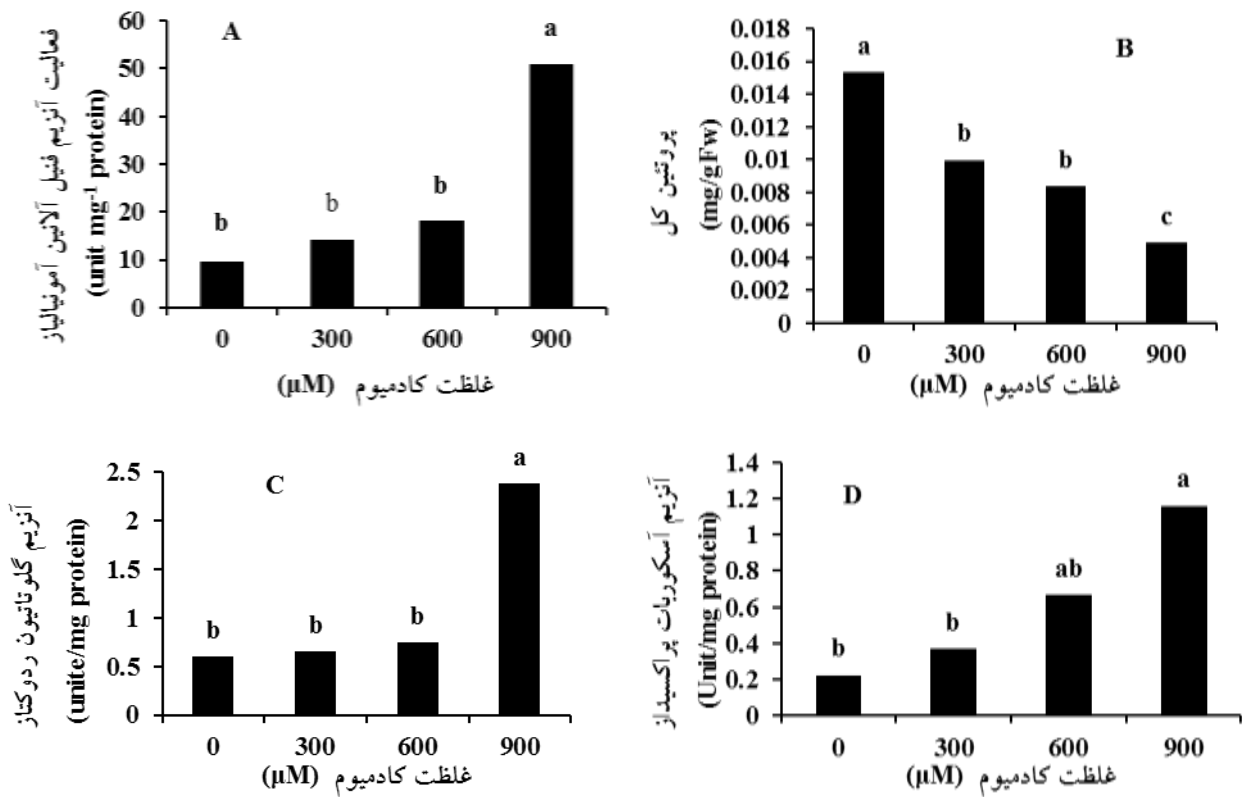
شکل ۴- اثر سطوح مختلف کادمیوم بر محتوای مالون د آلدئید برگ‌های ماریتیغال. مقایسه میانگین‌ها (میانگین ۵ تکرار) با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۵ درصد انجام شده است.

کاهش فضای بین سلولی در گیاهان تحت تنش می‌شود (نورائی و کفیل‌زاده، ۱۳۹۰). کاهش وزن اندام‌ها به علت اختلال در متابولیسم کلی سلول‌هاست (Jeliazkova et al., 2003). حاصل از مطالعه دانشمندان نشان داده است که میزان پراکسیداسیون چربی‌ها به علت افزایش مقدار

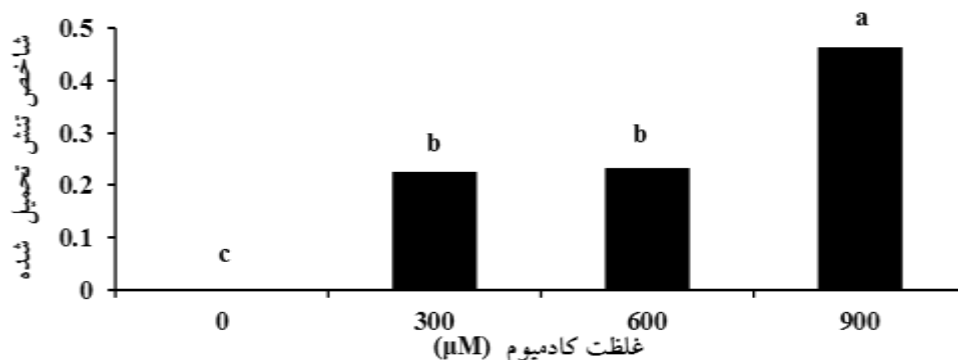
تنش سطح برگ نسبت به گیاه شاهد کاهش چشم‌گیری دارد و با نتایج گزارش سلطانی و همکاران (۱۳۸۵) در گیاه کلزا مطابقت دارد. کادمیوم تأثیرات منفی بر جذب آب دارد که نتیجه آن کاهش فشار تورگر است. این کاهش همراه با کاهش قابلیت ارتجاعی دیواره سلول باعث کوچک شدن سلول‌ها و



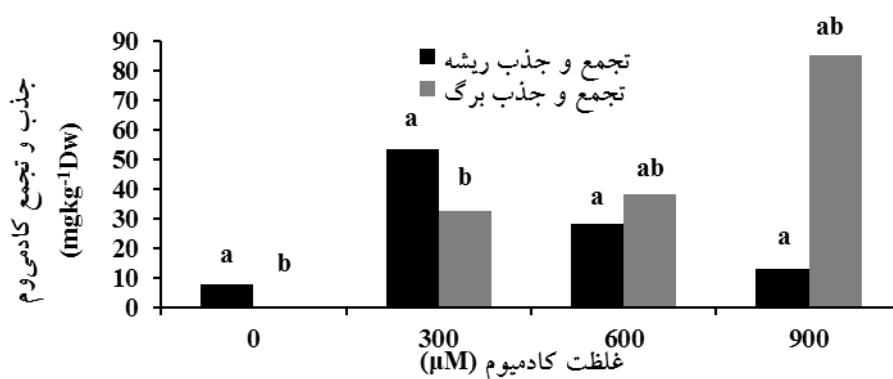
شکل ۵- اثر سطوح مختلف کادمیوم بر ترکیبات آنتوسیانین، فلاونوئید کل و محتوای فنل کل. مقایسه میانگین‌ها (میانگین ۵ تکرار) با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۵ درصد انجام شده است.



شکل ۶- اثر سطوح مختلف تیمار کادمیوم بر میزان فعالیت فنیل آلانین آمونیا لایاز (A)، محتوای پروتئین کل برگ (B)، میزان فعالیت آنزیم گلو تاتیون ردوکتاز (C) و فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (D). مقایسه میانگین‌ها (میانگین ۵ تکرار) با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۵ درصد انجام شده است.



شکل ۷- شاخص تنش تحمل شده که در واقع شدت تنش وارد بر گیاه را نشان می دهد. مقایسه میانگین ها (میانگین ۵ تکرار) با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۵ درصد انجام شده است.



شکل ۸- میزان و روند جذب و تجمع کادمیوم در برگ و ریشه گیاه ماریتغال. مقایسه میانگین ها (میانگین ۵ تکرار) با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۵ درصد انجام شده است.

این به نظر می رسد سمیت کادمیوم و تولید انواع مختلف اکسیژن واکنش گر سبب کاهش رنگیزه های فتوسنتزی و محدود کردن جذب عناصر غذایی لازم برای ساخته شدن و تولید کلروفیل می شود و در نتیجه زردی برگ ها دیده می شود. علاوه بر این فلزات سنگین با بازدارندگی بیوستز پروتئین های کمپلکس LHCII در سطح رونویسی تشکیل این کمپلکس را مختل می نمایند که باعث فتواکسید شدن کلروفیل تازه تشکیل شده می گردد (سلطانی و همکاران، ۱۳۸۵). القای سنتز کاروتنوئیدها در شرایط تنش می تواند به دلیل نقش حفاظتی آن ها در تشکیلات فتوسنتز باشد زیرا این رنگیزه ها مسئول خاموش کردن اکسیژن یکتایی و جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدها و نهایتاً تنش اکسیداتیو می باشند (Karyo, 2006). کادمیوم باعث تولید رادیکال هیدروکسیل شده و بدنبال آن پراکسیداسیون چربی که اولین علامت تنش اکسیداتیو است رخ

پراکسیدهیروژن در سلول در حضور یون کادمیوم افزایش می یابد. این وضعیت باعث برهم خوردن تعادل آبی و تغذیه ای سلول شده که این یکی از مهم ترین دلایل کاهش وزن گیاه می باشد (Sanita and Gabbrielli, 1999). در این مطالعه کاهش وزن خشک اندام های هوایی و ریشه می تواند در اثر اختلال در فرآیند فتوسنتز و متابولیسم نیتروژن باشد و در اثر کاهش رنگیزه های فتوسنتزی، تولید بیوماس و رشد در گیاه مورد مطالعه کاهش یافته است. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که میزان کلروفیل برگ ها با افزایش غلظت کادمیوم در محیط رشد کاهش یافت که در نهایت منجر به کاهش فتوسنتز و رشد شده و علائم کمبود به صورت کلروز در برگ ها بروز کرد. کاهش میزان رنگیزه های فتوسنتزی در گیاهان تحت تیمار می تواند به دلیل آسیب های اکسیداتیو و بازدارندگی مراحل مختلف سنتز کلروفیل باشد (Hegedus et al., 2001). علاوه بر

از طریق مهار جذب mg^{++} ، K^+ و تحریک تغییرات پس از ترجمه (Romero *et al.*, 2007) و جلوگیری از فعالیت رویسکو به عنوان فراوانترین پروتئین برگ (Muthuchelian *et al.*, 2001) محتوای پروتئین کل را کاهش دهد. کاهش چشمگیر پروتئین کل در سطوح ۳۰۰، ۶۰۰ و ۹۰۰ میکرومولار کادمیوم در این تحقیق سبب می‌شود که نقش گونه‌های اکسیژن فعال در اکسیداسیون اسیدهای آمینه، آسیب رساندن به ساختار و عملکرد پروتئین‌ها و کاهش محتوای پروتئین، نادیده گرفته نشود. نتایج مشابهی در لوبیا تحت تنش سرب و کادمیوم (Bhardwaj *et al.*, 2009) و جو تحت تنش کادمیوم (Liu *et al.*, 2005) گزارش شده است. پراکسیدازها گروه بزرگی از آنزیم‌های دفاعی هستند که در گیاهان در برابر تنش‌های زیستی و غیر زیستی تولید می‌شوند. اسکوربات پراکسیداز هم از این گروه نقش مهمی در تعدیل میزان ترکیبات ROS تولید شده طی تنش در سلول دارد و از اسکوربات به عنوان احیاکننده استفاده کرده و پراکسیدهدروژن را از طریق چرخه اسکوربات-گلوتاتیون تجزیه می‌نماید. افزایش در فعالیت این آنزیم در گیاهچه‌های ماریتیغال قابل انتظار بود، چرا که بایستی در راستای حفظ وضعیت رداکس سلولی و سمیت‌زدایی پراکسیدهدروژن تولید شده توسط آنزیم‌هایی هم‌چون سوپراکسیددسموتاز وارد عمل شود. نتایج مطالعات پوراکیبر و اشرفی (۱۳۹۰) نیز نشان داد که میزان فعالیت آنزیم اسکوربات پراکسیداز در گیاه ذرت تحت تیمار کادمیوم افزایش پیدا می‌کند. گلوتاتیون ردوکتاز نیز یکی از آنزیم‌های بالقوه سیستم آنتی‌اکسیدانی آنزیمی است که حالت احیاکننده GSH را از طریق چرخه اسکوربات-گلوتاتیون حفظ کرده و یک نقش حیاتی در حفاظت از گروه سولفیدریل داشته و به عنوان سوسترای گلوتاتیون-اس-ترانسفراز است. این آنزیم با سوپراکسید و رادیکال هیدروکسیل واکنش داده و باعث از بین رفتن رادیکال آزاد می‌شود که افزایش فعالیت این آنزیم نیز در این تحقیق تأیید کننده همین مطلب است و نتایج مشابه در مطالعات بارنده و همکاران (۱۳۹۴) روی گیاه عدس گزارش شده است. اندازه‌گیری شاخص تنش تحمیل‌شده، تنش وارده

می‌دهد، بنابراین با افزایش پراکسیداسیون چربی غشای سلول تخریب شده و نشت غشا اتفاق می‌افتد و میزان مالون‌دآلدئید بالا می‌رود. پراکسیداسیون القا شده توسط تنش نشان‌دهنده آسیب در سطح سلولی است و سطح مالون‌دآلدئید تولید شده در طی این فرایند به عنوان یک شاخص از آسیب اکسیداتیو اندازه‌گیری می‌شود (نادرزاد، ۱۳۹۲). نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد افزایش مالون‌دآلدئید در غلظت ۹۰۰ میکرومولار کادمیوم در برگ به‌طور قابل توجهی نسبت به شاهد بیشتر است که این افزایش احتمالاً با افزایش ایجاد رادیکالهای آزاد واکنش‌پذیر و پراکسیداسیون اسیدهای چرب مرتبط است و با گزارش افزایش سطوح مالون‌دآلدئید در برگ و ریشه گیاه جو مطابقت دارد (Hegedus *et al.*, 2001). یکی از مکانیسم‌های مهم گیاهان در برابر تنش تجمع ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها می‌باشد. مطالعات نشان می‌دهد ترکیبات فنلی در مهار و کاهش اتواکسیداسیون لیپیدها و به عنوان یک آنتی‌اکسیدان ضروری برای دفاع علیه گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) عمل می‌نمایند. نتایج بدست آمده از این تحقیق با نتایج بارنده و همکاران (۱۳۹۳) در گیاه عدس مطابقت دارد. افزایش فعالیت آنزیم PAL با تغییرات مقدار ترکیبات فنلی در شرایط تنش گیاه ماریتیغال هم‌خوانی دارد. با توجه به نقش آنتی‌اکسیدانی آنتوسیانین‌ها در کاهش اثرات تنش به نظر می‌رسد که ماریتیغال با افزایش این پارامتر سعی در کاهش اثرات مخرب تنش کادمیوم دارد. تنش‌های غیر زیستی سنتز برخی پروتئین‌ها را مهار و تولید برخی دیگر را تحریک می‌کند، هر چند روند کلی در جهت کاهش میزان کل پروتئین‌ها می‌باشد (Ericson and Alfinito, 1984). تصور می‌شود کاهش در محتوای پروتئین محلول کل تحت تنش فلزات سنگین ممکن است به‌واسطه افزایش در فعالیت پروتئاز (Plasma *et al.*, 2002)، تغییرات مختلف ساختمانی و کارکردی توسط واسرشت شدن و قطعه‌قطعه شدن پروتئین‌ها (John *et al.*, 2009) و یا تعامل با باقی مانده‌های تیول پروتئین‌ها و جایگزینی آنها با عناصر سنگین در متالوپروتئین‌ها (Pal *et al.*, 2006) باشد. گزارش شده است کادمیوم قادر است

نتیجه گیری کلی

به طور کلی از نتایج به دست آمده چنین استنباط می شود که گیاه داروئی ماریتیغال دارای مکانیسم های متفاوت فیزیولوژیک و بیوشیمیایی جهت کاهش خسارت ناشی از تنش فلز سنگین کادمیوم است و کاهش فاکتورهایی مانند میزان رنگیزه های فتوستتزی و سطح برگ ه نشانه ای از آثار سمیت کادمیوم و تولید رادیکال های آزاد اکسیژن می باشد که آسیب هایی به دنبال دارد. این گیاه با تجمع کادمیوم در برگ می تواند کاندید مناسبی جهت مطالعات گیاه پالایی باشد.

به گیاه را مطابق مطالعات شریعت و همکاران (۱۳۸۹) تأیید و نتایج سنجش غلظت یون کادمیوم در بافت برگ و ریشه گیاهچه های ماریتیغال با استفاده از روش جذب اتمی نشان داد که غالب کادمیوم در برگ این گیاه تجمع و مقدار کمی در ریشه باقی می ماند این رویداد اگر چه بر خلاف تصور رایج از تجمع کادمیوم می باشد ولی در این گیاه برای اولین بار گزارش شده و با مطالعات انجام شده توسط کریمی و محسن زاده (۱۳۹۰) بر روی گیاه کاهو که از همین راسته و تیره می باشد مطابقت دارد که می تواند ماریتیغال را به عنوان گزینه مناسبی جهت مطالعات گیاه پالایی معرفی نماید.

منابع

- امینی، ز. و حداد، ر. (۱۳۹۲) نقش رنگیزه های فتوستتزی و آنزیم های آنتی اکسیدان در مقابل تنش اکسیداتیو. مجله پژوهش های سلولی و مولکولی (مجله زیست شناسی ایران). ۲۶: ۲۶۵-۲۵۱.
- بارنده، ف.، کاوسی، ح. و پورسیدی، ش. (۱۳۹۳) فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانت، فنیل آلانین آمونیا لیا ز و میزان پرولین گیاهچه های عدس تحت تنش کلرید کادمیوم. اولین همایش الکترونیکی یافته های نوین در محیط زیست و اکوسیستم های کشاورزی. دانشگاه تهران. تهران. ایران.
- پوراکبر، ل. و اشرفی، ر. (۱۳۹۰) اثر کادمیوم بر میزان تولید هیدروژن پراکسید و فعالیت برخی آنزیم های آنتی اکسیدانی در گیاه ذرت. نشریه علوم دانشگاه تربیت معلم. ۹: ۴۷۳-۴۸۴.
- شریعت، ا.، عصاره، م.، و قمری زارع، ع. (۱۳۸۹) اثر کادمیوم بر برخی پارامترهای فیزیولوژی در *Eucalyptus occidentalis*. مجله علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی، علوم آب و خاک. ۵۳: ۱۵۳-۱۴۵.
- سلطانی، ف.، قربانلی، م.، و منوچهری کلانتری، خ. (۱۳۸۵) اثر کادمیوم بر مقدار رنگیزه های فتوستتزی، قندها و مالون دآلدئید در گیاه کلزا (*Brassica napus*). مجله زیست شناسی ایران. (۲) ۱۹: ۱۴۵-۱۳۶.
- صرامی، م.، زینلی، ح.، و بخشی خانیکی، غ. (۱۳۹۱) بررسی تنوع و روابط بین پارامترهای سیتوژنتیکی در گیاه ماریتیغال. ژنتیک نوین. (۱) ۷: ۲۴-۱۷.
- عسکری لجایر، ح.، نجفی، ن.، مقیسه، ا. (۱۳۹۳) اثر آلودگی خاک ها به فلزات سنگین بر تولید گیاهان دارویی. نشریه مدیریت اراضی. (۲) ۲: ۱۲۲-۱۱۱.
- کریمی، ا. (۱۳۹۰) تاثیر سمیت کادمیوم بر گیاه کاهو (*Lactuca sativa*). پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه تربیت مدرس. تهران. ایران.
- میرزاده اهری، ا.، خسروشاهلی، م.، مطلبی آذر، ع.، و موافقی، ع. (۱۳۹۲) بررسی تنوع کاریولوژیکی چند اکوتیپ گیاه دارویی ماریتیغال در ایران. مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی-مولکولی، (۱۳) ۱۴: ۶۴-۵۷.
- نادرنژاد، ن. (۱۳۹۲) بررسی میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیا ز و تولید ترکیبات فنلی در گیاه پسته و اثر اکتومیکوریز در کاهش UV-B رساله دکتری. دانشگاه شهیدباهنر، کرمان، ایران.
- نبی، م.، روشندل، پ.، و محمدخانی، ع. (۱۳۹۳) بررسی اثر تیمارهای مختلف شیمیایی و غیرشیمیایی بر شکست خواب بذر خارمریم (*Silybum marianum* L. Gaertner). نشریه زراعت. ۵۴-۴۹.
- نورانی آزاد، ح.، و کفیل زاده، ف. (۱۳۹۰) تاثیر سمیت کادمیوم بر رشد، قندهای محلول، رنگیزه های فتوستتزی و برخی آنزیم ها در گلرنگ (*Carthamus tinctorius* L.). مجله زیست شناسی ایران. (۱۰) ۲۴: ۸۶۷-۸۵۸.

- Bhardwaj, P., Gallego, S. M. and Tomaro, M. L. (2009) Cadmium toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17:21-34.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248- 254.
- Dalla vecchia, F., La Rocca, N. and Moro, I. (2005) Morphogenetic, ultrastructural and physiological damages suffered by submerged leaves of *Elodea Canadensis* exposed to cadmium. *Plant Science* 168(2):329-338
- Ericson, M. C. and Alfinito, A. E. (1984) Proteins produced during salt stress in tobacco cell cultures. *Plant Physiology* 74: 506-509
- Ewaise, E.A. (1997) Effects of Cadmium, Nickel and lead on growth, chlorophyll content and proteins of weed. *Biologica Plantarum* 39(3): 403-410.
- Foyer, C. H. and Halliwell, B. (1976) The presence of glutathione and glutathionereductase in chloroplast: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* 133: 21-25.
- Fusconi, A., Gallo, C. and Camusso W. (2007) Effect of cadmium on root apical meristems of (*Pisum sativum* L.): cell viability, cell proliferation and microtubule pattern as suitable makers for assessment of stress pollution. *Mutat Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen* 632: 9–19.
- Gupa, V. (2003) Seed germination and dormancy breaking techniques for indigenous edicinal and aromatic plants. *Journal of Medicinal and Aromatic Plant Science* 25: 402- 407.
- Hahlbrock, K. and Ragg, H. (1975) Light-induced changes of enzyme activities in parsley cell suspension cultures. *Archive Biochemistry Biophysics* 166: 41–46.
- Hart, J., Welch, R. M., Wendell, A., Norvell, W. A., Sullivan, L. A., and Kochian, V. (1998) characterization of Zinc binding, uptake and translocation in intact seedling of Bread and Durum wheat cultivars. *Plant Physiology* 118: 219–226.
- Heath, R. L., and Packer, L. (1969) Photoperoxidation in isolated chloroplast, kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry* 125:189-198.
- Hegedus, A., Erdi, S., and Horvath, G. (2001) Comparative studies of H₂O₂ detoxifying enzymes in green and greening barley seedling under cadmium stress. *Plant Science* 160: 1085- 1093.
- Jeliazkova, E. A., Craker, L. E. and Xing, B. (2003) Seed germination of anise, caraway, and fennel in heavy metal contaminated solutions. *Journal Herbs, Spices and Medicinal Plants* 10(3): 83-93.
- John, P., Ahmad, P., Gadgil, K., and Sharma, S. (2009) Heavy metal toxicity: Effect oplant growth, biochemical parameters and metal accumulation by *Brassica juncea* L. *International Journal of Plant Production* 3: 65-76.
- Kayro, H. W. (2006) Effect of salinity on growth, Photosynthesis, water relatins and solute composition of potential cash crop halophyte *Plantago coronopus*. *Environmental and Experimental Botany* 56: 136- 149.
- Ksouri, R., Megdiche, W., Debez, A., Fallah, M., Grignon, c., and Abdelly, C. (2007) Salinity effects on polyphenol cotent and antioxidant activities in leaves of the halophyte *Cakile maritime*. *Plant Physiology and Biochemistry* 45: 244-248.
- Laiye, Q. U., Quoresh, A. M., Iwase, K., Tamai, Y., Funada, R., and Koike, T. (2003) In vitro ectomycorrhizal formation on two larch species of seedling with six different fungal species. *Eurasian Journal of Forest Research* 6(1): 65-73.
- Lichenthaler, H. K. (1987) chlorophyll and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymol* 148: 350-382.
- Liu, W. L., Zhou, L., Sun, T. H. and Yang, Y. S. (2005) DNA changes in barley (*Hordeumvulgare*) seedlings induced by cadmium pollution using RAPD. *Chemosphere* 61: 158-167.
- Mobin, M. and Khan, N.A. (2007) Photosynthetic activity pigment composition and antioxidative response of two mustard cultivars differing in photosynthetic capacity subjected to cadmium stress. *Plant Physiology* 164:601-610.
- Muthuchelian, K., Bertamini, M., and Nedunchezian, N. (2001) Triacontanol can protect *Erythrina variegata* from cadmium toxicity. *Plant Physiology* 158: 1487-1490.
- Nakano, Y. and Asada, K. (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 22: 867–880.
- Pal, M., Horvath, E., Janda, T., Paldi, E., and Szalai, G. (2006) Physiological changes and defense mechanisms induced by cadmium stress in maize. *Plant Nutrition Soil Science* 169: 239-246.
- Palsma, J. M., Sandalio, L. M., Javier corpas, F., Romero-Puertas, M. C., Mccarthy, I., and Del Rio, L. A. (2002) Plant proteases protein degaradation and oxidative stress: role of peroxisomes. *Plant Physiology and Biochemistry* 40:512-530.
- Ram, G., Bhan, M.K., Gupta, K.K., Brijesh Thaker, U., and Jamwal, S. P. (2005) Variability pattern and correlation studies in *Silybum marianum* Gaertn. *Fitoterapia* 76: 143-147.
- Ramos, I., Esteban, E., Lucena, J. J., and Garate, A. (2002) Cd uptake and Sub cellular distribution in plants of *Lactuca sp.* Cd – Mn intraction. *Plant Science* 162: 761–767.

- Rastgoo, L. and Alemzadeh, A. (2011) Biochemical responses of Gouan (*Aeluropus littoralis*) to heavy metals stress. Australian Journal of Crop Science 5(4): 375-383.
- Romero- Puertas, M. C., Corpas, F. J., Rodriguez-Serrano, M., Gomez, M., Del Rio, L. A., and Sandalio, L. M. (2007) Differential expression and regulation of antioxidative enzymes by cadmium in pea plants. Plant Physiology 164: 1364-1357.
- Sanita di Toppi, L. and R. Gabbrielli. (1999) Response to cadmium in higher plants- review. Environmental and Experimental Plant Botany 41:105-130
- Singh, B. and Myhr, K. (1998) Cadmium uptake by barley as affected by Cd sources PH levels. Geoderma 84: 185-194.
- Sonald, S. F. and Laima S. K. (1999) Phenolics and cold tolerance of *Brassica napus*. Plant Agriculture 1:1-5
- Tziveleka, L., Kaldis, A., Hegedus, A., Kissimon, J., Prombonal, A., Horvath, G., and Arjyroidi, J. (1999) The effect of Cd on chlorophyll and light – Harvesting complex II biosynthesis in greening plants. Naturforsch 54: 740-745.
- Vassilev, A. and Yordanov, I. (1997) Reductive analysis of factors limiting growth of cadmium treated plants. Review Plant Physiology 23: 114-133.
- Wagner, G. J. (1979) Content and vacuole / extra vacuole distribution of neutral sugars free amino acids and anthocyanins in protoplast. Plant Physiology 64: 88-93.
- Zhishen, J., Mengchegen, K., and Jianming, W. (1999) The determination of Flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food chemistry 64: 555-559.