

اثر کادمیوم بر مراحل تکوین و الگوی پروتئینی بساک و دانه‌های گرده گل اطلسی (*Petunia hybrid* Juss.)

عبدالکریم چهرگانی راد ^{۱*} Ph.D.، حسن رضانی ^۲ M.Sc.، فریبا محسن زاده ^۱ Ph.D.، زهرا بقایی فر ^۳ Ph.D.،
حسن باب الحوائجی ^۴ M.Sc.

۱- دانشگاه بوعلی سینا، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، همدان، ایران

۲- دانش آموخته کارشناسی ارشد، دانشگاه بوعلی سینا، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی، همدان، ایران

۳- دانشگاه پیام نور تهران، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، تهران، ایران

۴- دانشگاه بوعلی سینا، گروه زراعت دانشکده کشاورزی، همدان، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: chehregani@basu.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۴/۳۱

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۳/۱۸

چکیده

هدف: کادمیوم یکی از آلاینده‌های جوی و بخشی از ذرات خروجی خودروهای دیزل است و هدف پژوهش حاضر تعیین اثرات کادمیوم بر روند تکوین و الگوی پروتئینی بساک و دانه‌های گرده گل اطلسی که به‌طور متداول در فضای سبز اکثر شهرهای بزرگ کشت می‌شوند، می‌باشد.

مواد و روش‌ها: گیاهان اطلسی در گلدان‌های آزمایشگاهی کشت داده شده و با غلظت‌های مختلفی از CdCl₂ به‌صورت اسپری تیمار شدند. گل‌ها در مراحل مختلف تکوین برداشت شده و در فیکساتور FAA70 (فرمالین: استیک اسید: اتانول، ۲:۱:۱۷) تثبیت و در مطالعات تکوینی به کار برده شدند. دانه‌های گرده‌ی گروه‌های مختلف نیز جمع‌آوری شده و پس از استخراج پروتئین با روش الکتروفورز مطالعه شد. تجزیه تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS (نسخه ۹/۱) و با روش آنالیز واریانس یک طرفه انجام شد.

نتایج: فرآیند تکوین بساک و دانه‌های گرده در گیاهان شاهد از الگوی کلی گیاهان دو لپه پیروی می‌کند اما در گیاهان تحت تیمار با کادمیوم، تغییرات و ناهنجاری‌هایی مشاهده گردید. بی‌نظمی در دیواره بساک، تشکیل دانه‌های گرده چروکیده و واکوئله، کاهش توان زیستی، آسیب دیواره‌اگزین و تشکیل باندهای پروتئینی جدید از اثرات تیمار با کادمیوم می‌باشد.

نتیجه‌گیری: کادمیوم (به‌عنوان یک آلاینده‌ی جوی) مراحل نمو بساک و دانه‌های گرده را تحت تاثیر قرار داده و موجب بروز انواعی از ناهنجاری‌ها و کاهش توان زیستی گرده‌ها می‌گردد. تولید پروتئین‌های جدید (پروتئین‌های سم زدا) یکی از پاسخ‌های گیاه به استرس آلودگی است.

واژگان کلیدی: گل اطلسی، کادمیوم، الگوی پروتئینی، تکوین، دانه گرده

مقدمه

یکی از مسائلی که امروزه بسیار مورد توجه قرار گرفته بحث آلاینده‌های زیست محیطی می‌باشد. بر اساس گزارش کمیسیون آلودگی آکادمی ملی علوم ایالت متحده آمریکا در سال ۱۹۶۶ آلودگی دگرگونی نامطلوب در خصوصیات فیزیکی، شیمیایی و زیستی هوا، آب و خاک است که می‌تواند آثار زیان بخشی بر زندگی انسان، گیاهان و حیوانات، وضع زندگی و میراث فرهنگی داشته باشد (۱). فلزات سنگین گروهی از فلزات با چگالی بالاتر از ۵ گرم بر سانتی متر مکعب نظیر کادمیوم، کروم، جیوه، سرب، آلومینیوم، نقره و غیره هستند که از مهم‌ترین آلاینده‌های محیطی به‌ویژه در مناطقی که دخالت انسان در طبیعت بیشتر است، به شمار می‌آیند. آن‌ها در هوا، خاک و آب حتی در غلظت‌های ناچیز می‌توانند موجب مشکلات متعددی برای همه جانداران شوند و تجمع زیستی عناصر سنگین در زنجیره‌های غذایی می‌تواند خیلی خطرناک باشد (۲).

کادمیوم (با چگالی ۸/۶ گرم بر سانتی متر مکعب) فلز سنگینی است که به‌طور وسیعی توسط نیروگاه‌ها، سیستم‌های حرارتی، ترافیک شهری، کارخانه‌های سیمان و نیز به‌عنوان محصول جانبی در تهیه کودهای فسفاته در محیط آزاد می‌شود. در مناطقی که دخالت انسانی کمتر است، کادمیوم می‌تواند به‌دلیل فرآیندهای معدنی کوهستان آزاد شود (۳) و آن‌را به‌عنوان عنصری با سمیت متوسط طبقه‌بندی می‌کنند (۴).

کادمیوم عنصری سمی است که به‌سرعت توسط گیاهان جذب می‌شود. اگر چه همه گیاهان مقادیر متفاوتی کادمیوم را جذب می‌کنند، بعضی گیاهان (برای مثال *Thlaspi caerulescens* و *Brassica juncea*) به شکل فعال و در ریشه‌ها و بخش‌های هوایی‌شان، این فلز را بدون ایجاد اثرات سمی انباشته می‌سازند (۵). در حالی که دیگر گونه‌ها (برای مثال *Zea mays* L.) در غلظت‌های پائین‌تر تغییراتی را در متابولیسم‌شان نشان می‌دهند (۶). کادمیوم یک بازدارنده قوی آنزیمی است (۷). برخی پژوهش‌ها نشان داده که در نتیجه استرس‌های اکسیداتیو در گیاهان، تجمع پروتئین‌های آسیب دیده از عوامل اکسیداتیو صورت می‌گیرد (۸ و ۹).

کادمیوم همچنین باز شدن روزنه‌ها را ممانعت می‌کند، اما چگونگی انجام این کار هنوز ناشناخته است. احتمالاً باز و بسته شدن روزنه به‌طور مستقیم تحت تاثیر کادمیوم نیست و به دلیل برهم‌کنش قوی کادمیوم و جابه‌جایی K^+ و Ca^{+2} و آبسزیک اسید در سلول‌های نگهبان می‌باشد (۱۰). در میان آلاینده‌ها،

عناصر سنگین بیشترین توانایی در تغییر پروتئوم گیاهی را دارند (۱۱، ۱۲ و ۱۳). به‌ویژه بعضی از این فلزات سنگین می‌توانند بیان چندین پروتئین دفاعی را در گیاهان تحت تاثیر قرار دهند (۱۴ و ۱۵). بعضی از آن‌ها به‌طور مشخص واکنش متقابل با آلرژن‌های گرده‌ای دارند (۱۶ و ۱۷). برای مثال روت و همکاران (۱۸) گزارش کردند که قرارگیری در معرض کادمیوم منجر به بیان پروتئین شبه آلرژن در آرابیدوپسیس تالیانا می‌شود. علاوه بر این عمل کرد کیتیناز PR-3 نوع ۱ که موجب شکل‌گیری عوامل پاسخ به عناصر سنگین در اکثر گیاهان می‌باشد (۱۹) نیز به‌عنوان آلرژن ثابت شده است. زیرا دارای دومین متصل به کیتین می‌باشد که یک پلی پپتید غنی از سیستئین (دارای ۴۰ آمینو اسید) است و در ابتدا به‌عنوان آلرژن اصلی در بیمارانی که نسبت به لاکتکس آلرژی داشتند شناخته می‌شد (۲۰).

دانه‌های گرده خانه گامت‌های نر بوده و در طی مراحل تکوینی برنامه‌ریزی شده از سلول‌های مادر میکروسپوری که توسط لایه مغذی (داخلی‌ترین لایه جداره بساک) حمایت می‌شوند به‌وجود می‌آیند. اثرات غیر مستقیم آلاینده‌های هوا به‌ویژه فلزات سنگینی نظیر کادمیوم بر این فرآیند از طریق تعلیق مسیره‌های متابولیکی تنفس و فتوسنتز، ورود به خاک و تغییر pH، آسیب ریشه و غیره اعمال می‌شود (۲۱ و ۲۲). تاثیرات ترکیبی این آلاینده‌ها موجب کاهش تولید خالص گیاهان، تولید دانه‌های گرده کوچک‌تر و افزایش تعداد گرده‌های غیر عادی در مقایسه با گیاهانی از همان گونه که در مناطق کمتر آلوده رشد کرده‌اند می‌شود (۲۳).

هدف اصلی پژوهش حاضر بررسی اثرات کادمیوم به‌عنوان یکی از آلاینده‌های جوی بر روند تکوین بساک و دانه‌های گرده و الگوی پروتئینی دانه‌های گرده‌های گیاه اطلسی به‌عنوان یک گونه زینتی است که امروزه به فراوانی در سطح فضای سبز شهرهای بزرگ کشورهای مختلف دنیا کشت می‌شود. مطالعات مرجع شناختی صورت گرفته نشان می‌دهند که تحقیقات اندکی در این خصوص انجام شده است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و تیمارها: گیاه مورد مطالعه در این پژوهش، اطلسی و با نام علمی *Petunia hybrid* Juss. می‌باشد. بذور مربوطه از شرکت پاکان بذر واقع در استان اصفهان خریداری

شده و در شرایط گلخانه (دمای 27 ± 4 درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۷۰ درصد و دوره روشنایی ۱۵ ساعت) در گلخانه دانشگاه بوعلی سینا کشت و نگهداری شدند.

دو هفته قبل از گل‌دهی، تیمارها به صورت اسپری روزانه بخش هوایی با محلول‌های کلرید کادمیوم در غلظت‌های مختلف (۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۲۰۰ میکرومولار) به میزان ۲۰ میلی‌لیتر آغاز و در طی گل‌دهی و تکوین بساک و دانه‌های گرده به مدت ۳ هفته ادامه یافت (۲۴). گیاهان اطلسی در قالب ۴ گروه، گیاهان شاهد تیمار شده با آب مقطر و گروه‌های دوم تا چهارم تیمار شده با محلول‌های کلرید کادمیوم به ترتیب با غلظت‌های ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۲۰۰ میکرومولار تقسیم‌بندی شدند.

مطالعات میکروسکوپی: به منظور مطالعه رویان شناختی *P. hybrida*، گل‌ها و غنچه‌ها در مراحل مختلف نموی برداشت شده و در محلول تثبیت کننده FAA70 (فرمالین: استیک اسید: اتانول، ۱:۲:۱۷) تثبیت شدند. نمونه‌ها پس از ۲۴ ساعت تثبیت، با آب شستشو شده تا محلول تثبیت کننده از آن‌ها خارج گردد، سپس در الکل ۷۰ درصد در یخچال و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. به منظور آماده کردن نمونه‌ها جهت برش‌گیری، آن‌ها از الکل‌های با درجات افزایشی (۷۰، ۸۰، ۹۰، ۹۶ و ۱۰۰ درصد) عبور داده شده تا آب‌گیری شوند. سپس نمونه‌ها به ترتیب به محلول‌های ۱-حجم الکل-۱ حجم تولوئن، ۲-حجم‌های مساوی از الکل و تولوئن، ۱-حجم الکل-۲ حجم تولوئن و تولوئن خالص انتقال داده شده تا تولوئن جایگزین الکل شود. در مرحله بعدی نمونه‌ها دو بار در حمام پارافین قرار گرفته تا پارافین جایگزین تولوئن شود و سپس نمونه‌ها در پارافین مذاب قالب‌گیری شدند (۲). نمونه‌ها با میکروتوم دستی (دیده سبز، ایران)، با ضخامت ۷ میکرومتر برش‌گیری شده و رنگ‌آمیزی با روش مضاعف هماتوکسیلین-ائوزین صورت گرفت. عکس‌برداری به کمک میکروسکوپ نوری

LABOMED LX50 دارای دوربین دیجیتال LABOMED iVu 3100، در بزرگ‌نمایی‌های مختلف انجام شد. برای هر مرحله حداقل ۱۰ گل برش‌گیری و از بهترین آن‌ها عکس‌برداری شد (۲۴).

توان زیستی گرده‌ها: برای این منظور، ۱ میلی‌گرم از دانه‌های گرده گروه‌های مختلف گیاهی را بر روی لام‌های مجزا پخش کرده و بر روی آن‌ها چند قطره محلول استوکارمن ریخته شد. سپس با دقت لامل‌گذاری کرده و به مدت چند دقیقه بر روی

الکتروفورز: دانه‌های گرده پس از عبور دادن از صافی میکروسکوپی، به نسبت ۱ به ۶ (وزنی-حجمی) با بافر فسفات نمکی (PHV/۴، ۰/۰۱ مولار PBS) مخلوط و به آن کمی PVP (پلی وینیل پیرولیدین) اضافه شد. مخلوط حاصل چندین بار به آرامی با شیکر هم زده شد، تا پروتئین‌های محلول دانه گرده در بافر حل شوند. مخلوط گرده‌ای حاصل به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد روی شیکر هم زده شد و پس از سانتریفیوژ عصاره‌ها در ۸۰۰g به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، روش‌ناور حاصل جدا و تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۵ و ۱۸).

عصاره پروتئینی استخراج شده به نسبت مساوی یک به یک با بافر نمونه مخلوط گردید. مخلوط حاصله در حمام آب گرم (۹۵ درجه سانتی‌گراد) به مدت ۳ دقیقه حرارت داده شد. ژل اکریل آمید ۱۲ درصد تهیه شد و ۱۰ میکرولیتر از هر نمونه در چاهک‌ها و در یکی از چاهک‌ها، مارکر پروتئینی تزریق شد. برای انجام الکتروفورز از دستگاه الکتروفورز مینی ژل کمپانی Bio-Rad (USA) استفاده شد. الکتروفورز با ولتاژ ثابت ۸۰ ولت انجام گرفت. پس از اتمام الکتروفورز، ژل با مخلوط اسید استیک و اتانول تثبیت گردید. پس از تثبیت پروتئین‌ها، ژل با آب مقطر شسته شده و به محلول رنگ منتقل شده و رنگ آمیزی با رنگ کوماسی بلو بریلیانت R250 انجام گرفت (۱۸). پس از چند مرحله رنگ بری ژل، با استفاده از اسکنر از آن عکس تهیه و تغییرات باندها مورد مطالعه و مقایسه قرار گرفت.

آنالیزهای آماری: برای تجزیه و تحلیل داده‌های حاصله مقایسه گروه‌ها (بیش از ۲ گروه) با استفاده از آزمون تجزیه داده‌های یک‌طرفه-F (ANOVA test) صورت گرفت. در صورت وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها برای تعیین این نکته که این اختلاف بین کدام یک از گروه‌ها وجود دارد، از آزمون مقایسه بین میانگین‌ها در حد معنی‌دار بودن یا نبودن (با سطح معنی‌دار ۰/۰۵) استفاده شد. البته بررسی‌های فوق به کمک نرم افزار آماری SAS (نسخه ۹/۱) و در قالب یک طرح کاملاً تصادفی صورت گرفت (۲۴ و ۲۵).

نتایج

تکوین بساک و دانه‌های گرده

اطلسی گیاهی تک پایه بوده و دارای گل‌های دو جنس می‌باشد که در آن ۵ پرچم با آرایش چرخه‌ای در درون جام گل پیوسته و در اطراف مادگی دو برچه‌ای مستقر شده‌اند (شکل ۱a). بر اساس مطالعات میکروسکوپی هر پرچم دارای بساک متشکل از دو خانه در دو طرف بخش رابط بوده که هر یک به نوبه خود از دو کیسه گرده تشکیل شده است (شکل ۱a).

در مراحل اولیه نمو بساک، یاخته‌های جداری اولیه (آرکتوسپور خارجی) که در حدفصل بین یاخته‌های بافت هاگزا و اپی‌درم بساک قرار دارند، با انجام تقسیمات مماسی (پری‌کلینال) لایه‌های تشکیل دهنده دیواره بساک را به وجود می‌آورند. لایه‌های بساک از بیرون به داخل به ترتیب شامل: لایه اپی‌درم دارای دیواره خارجی کوتینه شده، لایه مکانیکی (آندوتسیال)، لایه میانی که از دو تا سه ردیف یاخته تشکیل شده و لایه مغذی (تاپی) با یاخته‌های حجیم می‌باشد که فضای کیسه‌های گرده را احاطه کرده است (شکل ۱b). با تقسیمات مماسی (پری‌کلینالی) یاخته‌های آرکتوسپور داخلی بساک، یاخته‌های هاگزا که به شکل چهار هلال در چهار گوشه بساک‌ها رویت می‌شوند، به وجود می‌آیند (شکل ۱a). این یاخته‌ها با تقسیمات میتوزی متقاطع خود یاخته‌های مادر گرده را ایجاد می‌کنند. در بخش درونی کیسه‌های بساک (به سمت بافت رابط)، بیرونزدگی بافت پارانشیمی (پلاستونید) که به همراه خود لایه‌های میانی و مغذی درونی را به داخل فضای کیسه هدایت کرده، کاملاً مشهود است (شکل‌های ۱a,b).

یاخته‌های لایه مغذی از نوع ترش‌حی بوده و شامل لایه‌های مغذی بیرونی (به سمت اپی‌درم) و درونی (به سمت بافت رابط) می‌باشد، این دو لایه از نظر شکل یاخته‌ای، شدت واکوتله شدن و رنگ‌پذیری متفاوت هستند (شکل ۱c). قبل از تقسیمات میوزی یاخته‌های مادر گرده و نیز در حین این تقسیمات، یاخته‌های مغذی آندومیتوز کرده و حالت چند هسته‌ای به خود می‌گیرند (شکل ۱c). یاخته‌های این لایه پس از تکمیل فرآیند میکروسپورزائی، واکوتله شده و به تدریج تجزیه می‌گردند (شکل‌های ۱d,e). یاخته‌های مادر گرده تقسیم میوز را در دو مرحله متوالی و با یک سیتوکینز هم‌زمان، مانند حالت کلاسیک قابل مشاهده در اغلب گیاهان دولپه‌ای معمول به انجام می‌رسانند (شکل‌های ۱c,d).

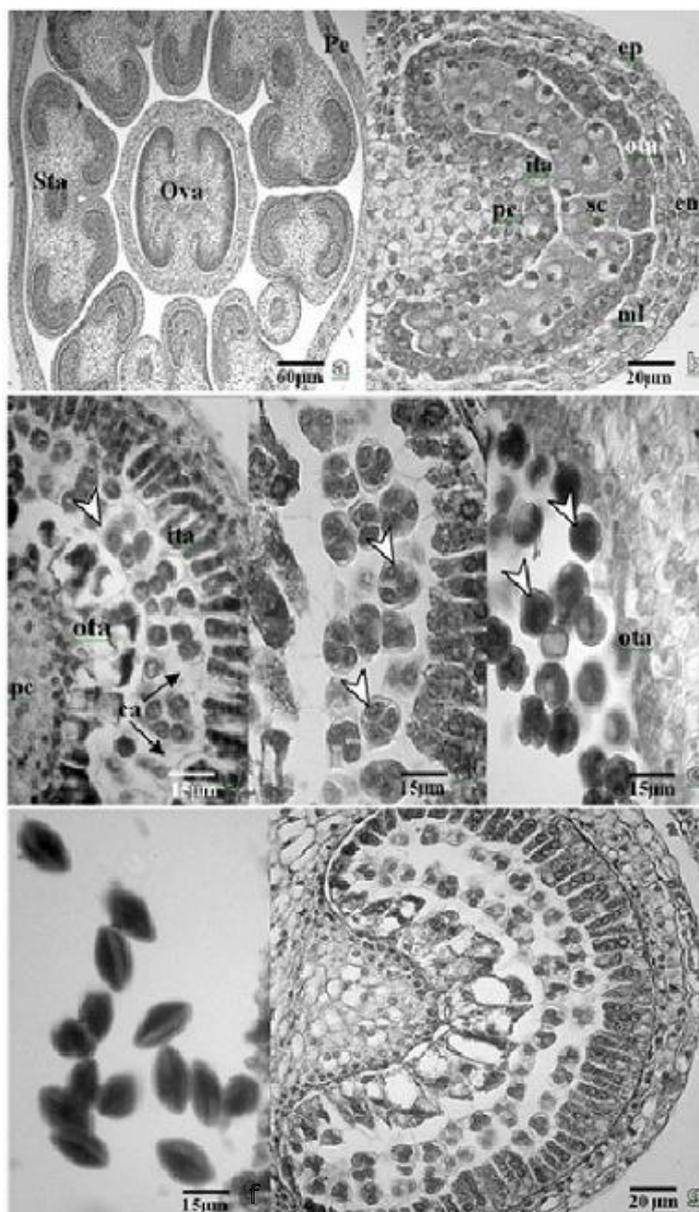
لایه کالوزی کمی پیش از شروع میوز میکروسپورها را تحت پوشش قرار می‌دهد (شکل ۱c) و این پوشش و حمایت تا تشکیل تترادهای تتراهدال ادامه می‌یابد (شکل ۱d)، تا با تجزیه این لایه، میکروسپورها از هم جدا شده و با واکوتله شدن سیتوپلاسم و افزایش حجم دو تا سه برابری، تشکیل دانه گرده جوان را بدهند. این یاخته‌های نابالغ به کمک لایه تاپی شروع به تکمیل دیواره اگزینی خود کرده و سپس با انجام میتوز، بافت گامتوفیتی دو یاخته‌ای شامل یاخته زایشی کوچک‌تر و یاخته رویشی بزرگ‌تر را تشکیل می‌دهند تا تبدیل به گرده بالغ شوند (شکل ۱e). در حین این تغییرات، لایه‌های مغذی تحلیل رفته و با این کار پیش‌سازهای لازم را فراهم می‌آورند. دانه‌های گرده بالغ در منظره قطبی کروی شکل بوده و سه فرورفتگی با فاصله‌های منظم در محیط آن قابل تشخیص است (شکل ۱e). اما در منظره استوائی، گرده‌ها دوکی شکل دیده شده و یک یا دو شیار از سه شیار موجود در آن‌ها قابل رویت است (شکل ۱f). این شیارها در محور طولی دانه گرده امتداد یافته و نسبتاً عمیق هستند.

از نکات قابل توجه در طی تکوین بساک و دانه گرده اطلسی حفظ حالت منظم و هلالی موجود در بافت مادر گرده تا انتهای فرآیند میوز می‌باشد. به نحوی که علی‌رغم رشد کلی بساک و حجیم شدن کیسه‌های گرده، یاخته‌های در حال میوز هم‌چنان و با حفظ نظم در کنار یکدیگر و در مجاورت لایه مغذی خارجی (به سمت اپی‌درم بساک) باقی مانده و از آن جدا نمی‌شوند (شکل ۱g). بساک‌ها به رنگ زرد روشن بوده و در تمامی لایه‌های یاخته‌ای آن، به جز بافت‌های آوندی، لایه مغذی و لایه هاگزا، بلورهای اگزالات کلسیم مشاهده می‌شود.

در بررسی‌های میکروسکوپی برش‌های عرضی پریموردیوم‌های بساک، گروه‌های تیماری مختلف گیاه اطلسی تفاوت شاخصی را نشان ندادند. ولی پس از تشکیل سلول‌های جداری و هاگزا و در طی مراحل مختلف میوز، نظم و جای‌گیری مرتب سلول‌های مادر گرده دچار تغییر شده بود. به نحوی که تا حد قابل توجهی سلول‌های در حال میوز از هم فاصله گرفته و در فضای کیسه‌های گرده پراکنده شده بودند (شکل ۲a). با این وجود، اختلال واضحی در سازمان‌یابی و استقرار کروموزوم‌ها و نیز در انجام فرآیند میوزی سلول‌های مادر گرده مشاهده نشد. اما پس از اتمام میوز و در زمان آزاد شدن میکروسپورها از قالب تتراد، ناهماهنگی زمانی مشخصی مشاهده شد و تجزیه کالوز در بعضی از تترادها به تعویق افتاده بود. با پیشرفت زمان

بالغ قابل مشاهده بود. بی‌نظمی در مراحل بعدی تکوین در همه گروه‌های تیماری مشخص بود (شکل ۲b).

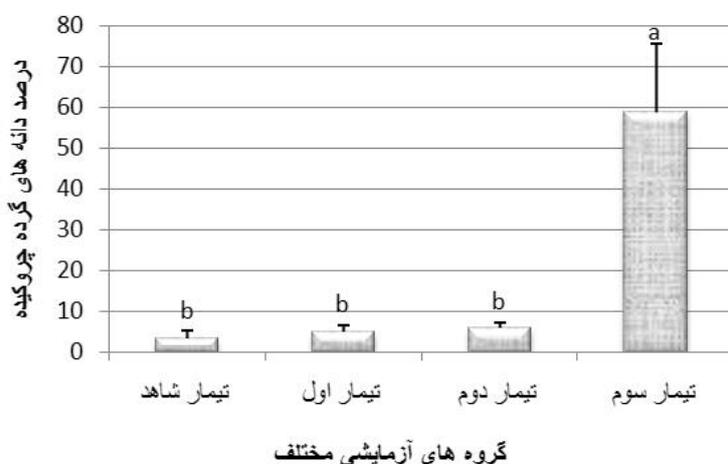
ناهماهنگی در تکوین دانه‌های گرده شدیدتر شده، به نحوی که در درون یک کیسه گرده، هم زمان گرده نابالغ و گرده کاملاً



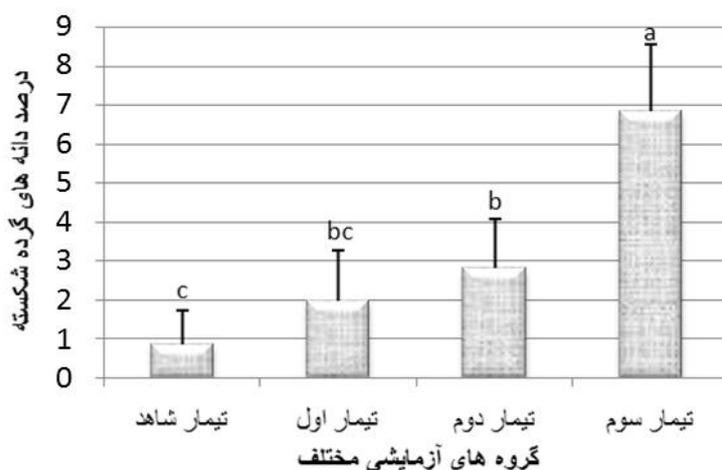
شکل ۱: مراحل اولیه تکوین بساک، میکروسپورزائی و تشکیل گامتوفیت نر در *Petunia hybrida* (a) برش عرضی از غنچه با پنج پرچم زایا (sta) به همراه تخمدان (ova) دو برچه‌ای با تمکن محوری را نشان می‌دهد که توسط یک حلقه از گلبرگ‌ها (pe) محدود شده‌اند. (b) برش عرضی یکی از حفرات بساک چهارحفره‌ای که اجزاء کامل دیواره شامل لایه اپی‌درم (ep)، لایه مکانیکی (en)، لایه بینابینی (ml)، لایه مغذی درونی (ita)، یاخته‌های مادر گرده (sc)، لایه تاپی بیرونی (ota) و بافت پلاستئوئید (pc) در آن مشخص است. (c) برش عرضی از بساک که نشان دهنده آغاز تقسیم میوز در یاخته‌های مادر گرده است (پروفاز I)، در این مرحله تشکیل لایه کالوزی (ca) در دیواره یاخته‌های مادر گرده به صورت یک لایه شفاف مشهود است، همچنین سلول‌های تاپی در وضعیت چند هسته‌ای کاملاً مشخص هستند. (d) برش عرضی از بساک در مرحله تشکیل تتراد میکروسپور، سلول‌های لایه تاپی شروع به تجزیه کرده‌اند. (e) دانه‌های گرده کاملاً بالغ در برش عرضی از کیسه گرده، در این وضعیت تقریباً تمامی گرده‌ها در منظره قطبی بوده و به شکل کروی، همراه با سه شیار طولی در فواصل مساوی دیده می‌شوند، در این مرحله از بلوغ گرده‌ها لایه تاپی تقریباً به طور کامل از بین رفته است. (f) دانه‌های گرده کاملاً بالغ در برش طولی از کیسه گرده که در آن تقریباً تمامی دانه‌ها در منظره استوائی و به شکی دوکی، همراه با شکاف‌های سرتاسری دیده می‌شوند. (g) لایه هاگزای بساک تا زمان تشکیل میکروسپورها حالت منظم خود را حفظ می‌کنند.

چروکیدگی در بعضی از گرده‌ها به قدری شدید بود که موجب بهم چسبیدن دیواره‌های گرده و ایجاد اشکال ستاره‌ای در آن‌ها شده بود (شکل ۲f). در گروه‌های تیماری ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۲۰۰ میکرومولار کلرید کادمیوم به ترتیب ۲، ۳ و ۷ درصد دانه‌های گرده دچار شکستگی در دیواره آگزینی شده بودند (شکل ۲g). در حالی که در گیاهان شاهد، کمتر از ۱ درصد از دانه‌های گرده آسیبی از این دست را نشان می‌دادند (نمودار ۲).

بر اثر تیمارهای مربوطه میزان چین خوردگی جداره بساک نیز افزایش یافته و تقریباً تمامی بساک‌ها در تیمار ۱۲۰۰ میکرومولار کلرید کادمیوم دچار چین خوردگی شده و بر اثر آن فضاهای کیسه‌های گرده به شدت کاهش یافته بود (شکل ۲c)، اما این وضعیت در گروه شاهد مشاهده نشده و در گروه‌های تیماری پائین‌تر نیز قابل اغماض بود. چروک خوردگی دانه‌های گرده شاید مشخص‌ترین آسیب ناشی از تیمارها باشد. چرا که در تمامی گروه‌های گیاهی تحت تیمار کادمیوم، به‌خصوص در گروه آخر مشهود بود (نمودار ۱).



نمودار ۱: مقایسه درصد دانه‌های گرده چروکیدگی گیاهان در معرض کادمیوم. تیمارهای شاهد، اول، دوم و سوم به ترتیب گیاهان تیمار شده با آب، ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۲۰۰ میکرومولار کلرید کادمیوم. هر ستون معرف میانگین داده‌ها \pm انحراف معیار ۵ نمونه است. با مقایسه میانگین گروه‌های مختلف تیماری و مشاهده حروف مشابه در گروه‌های گیاهی اول، دوم و شاهد می‌توان نتیجه گرفت که فقط تغییرات مشاهده شده در گروه سوم نسبت به شاهد معنی‌دار می‌باشد ($p \leq 0.05$).



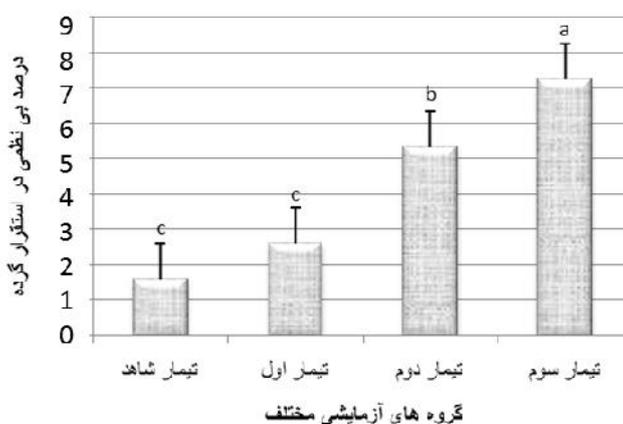
نمودار ۲: مقایسه درصد دانه‌های گرده شکسته گیاهان در معرض کادمیوم. تیمارهای شاهد، اول، دوم و سوم به ترتیب گیاهان تیمار شده با آب، ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۲۰۰ میکرومولار کلرید کادمیوم. هر ستون معرف میانگین داده‌ها \pm انحراف معیار ۵ نمونه است. با مقایسه میانگین گروه‌های مختلف تیماری و مشاهده حروف مشابه در گروه‌های گیاهی اول و شاهد می‌توان نتیجه گرفت که فقط تغییرات حاصله در گروه‌های تیماری دوم و سوم نسبت به شاهد معنی‌دار می‌باشد ($p \leq 0.05$).

ویژگی نیز بر اثر تیمار مربوطه دستخوش تغییر شده بود. به صورتی که در گروه‌های اول، دوم و سوم به طور میانگین، به ترتیب ۲/۶، ۵/۳ و ۷/۲ درصد از گرده‌ها آرایش معمول را نداشتند (نمودار ۳).

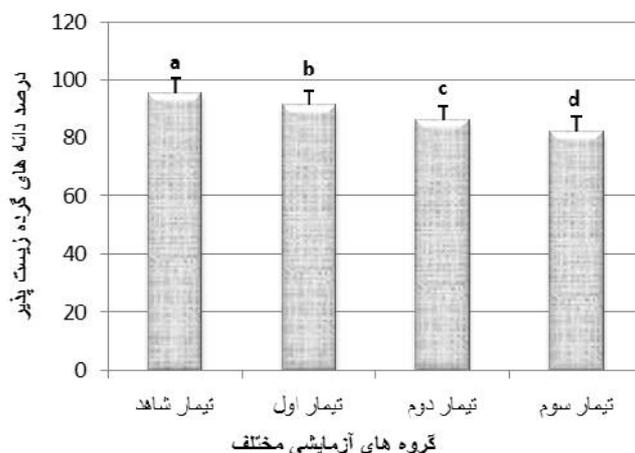
با انجام رنگ آمیزی استوکارمن بر روی دانه‌های گرده گل اطلسی میزان تغییرات قدرت زیست پذیری آن‌ها تحت تیمار کادمیوم بررسی شد (شکل ۲e). در نهایت مشخص شد که این ویژگی دانه‌های گرده نیز بر اثر تیمار مربوطه تحت تاثیر قرار گرفته و به شکل معنی‌داری دچار افت شده بود. به نحوی که از ۹۵ درصد در گروه شاهد به ۸۱ درصد در گروه تیماری ۱۲۰۰ میکرومولار کاهش یافته بود (نمودار ۴).

در گروه تیماری ۱۲۰۰ میکرومولار و تنها در دو نمونه از صد بساک بررسی شده در این گروه، بافت نامتعارفی در جداره داخلی بساک با منشأ لایه میانی مشاهده شد. این بافت ویژگی‌های یک بافت پارانشیمی را داشته ولی با تقسیمات شدید خود تقریباً تمام فضای یکی از کیسه‌های بساک را اشغال کرده و باعث تغییر شکل کیسه گرده مربوطه شده بود (شکل ۲d).

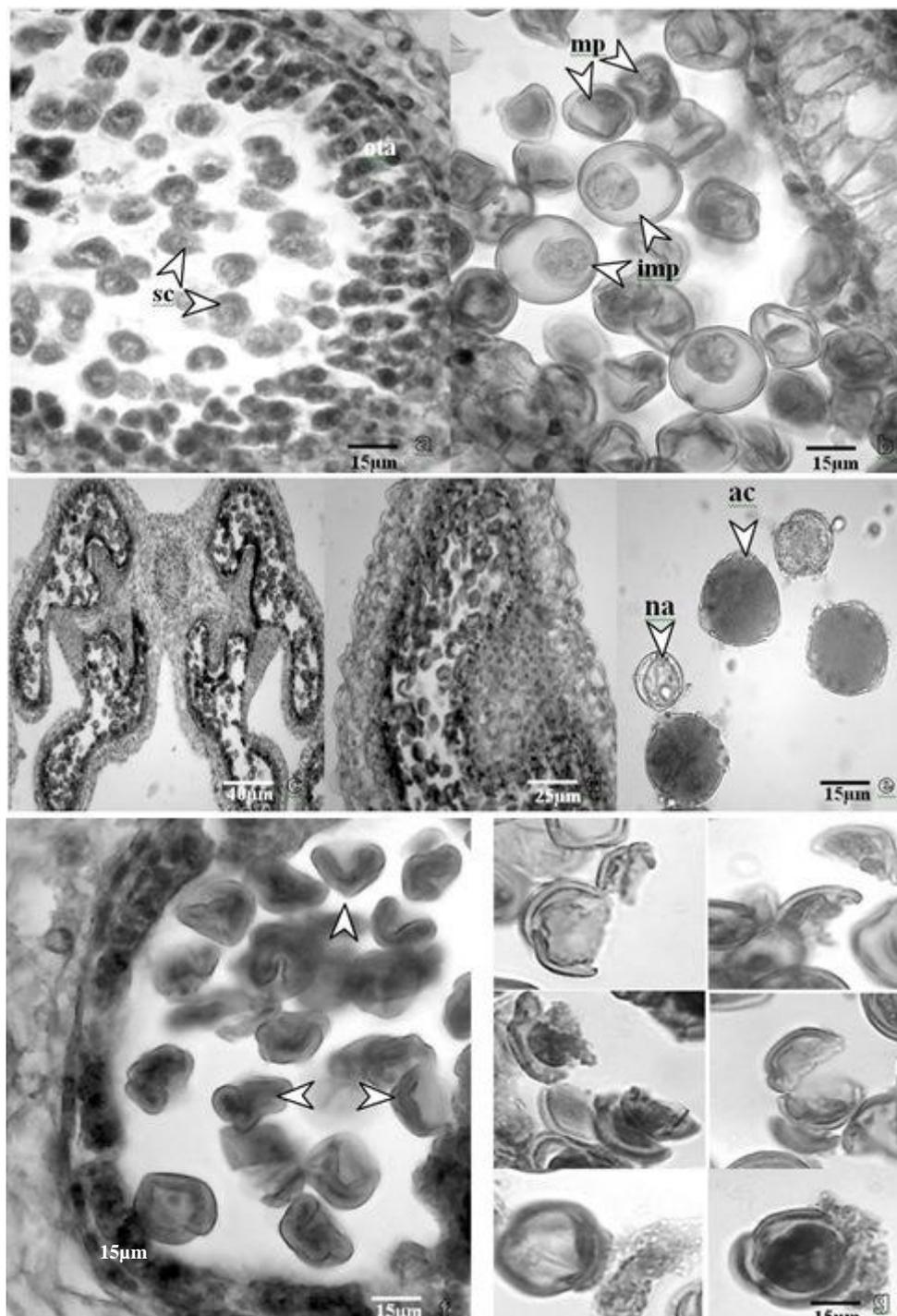
دانه‌های گرده بالغ گل اطلسی دارای آرایش خاصی در کیسه‌های بساک می‌باشند. به نحوی که از هر ۱۰۰۰ گرده موجود در برش عرضی بساک گیاه شاهد تنها ۱۶ مورد، یعنی فقط ۱/۶ درصد در منظره استوائی و به شکل دوکی مشاهده شد و ۹۸۴ گرده دیگر در منظره قطبی بوده و به شکل گرد (با حضور سه فرورفتگی در فاصله‌های منظم) بودند. ولیکن این



نمودار ۳: مقایسه درصد بی‌نظمی در استقرار دانه‌های گرده گیاهان در معرض کادمیوم. تیمارهای شاهد، اول، دوم و سوم به ترتیب گیاهان تیمار شده با آب، ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۲۰۰ میکرومولار کلرید کادمیوم. هر ستون معرف میانگین داده‌ها \pm انحراف معیار ۵ نمونه است. با مقایسه میانگین گروه‌های مختلف تیماری و مشاهده حروف مشابه در گروه‌های گیاهی اول و شاهد می‌توان نتیجه گرفت که فقط تغییرات حاصله در گروه‌های تیماری دوم و سوم نسبت به شاهد معنی‌دار می‌باشد ($p \leq 0.05$).



نمودار ۴: مقایسه درصد قدرت زیست پذیری دانه‌های گرده گیاهان در معرض کادمیوم. تیمارهای شاهد، اول، دوم و سوم به ترتیب گیاهان تیمار شده با آب، ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۲۰۰ میکرومولار کلرید کادمیوم. هر ستون معرف میانگین داده‌ها \pm انحراف معیار ۵ نمونه است. با مقایسه میانگین گروه‌های مختلف تیماری و عدم مشاهده حروف مشابه در هیچ یک از آن‌ها، می‌توان نتیجه گرفت که تغییرات در هر سه گروه نسبت به شاهد معنی‌دار می‌باشد ($p \leq 0.05$).



شکل ۲: نتایج تاثیر تیمار کلرید کادمیوم بر تکوین گرده و بساک گل اطلسی. (a) به هم ریختگی سلول‌های هاگزای (sc) در حال میوز بر اثر تیمار کلرید کادمیوم کاملاً مشخص است. (b) تاخیر در فرآیند بلوغ بعضی دانه‌های گرده و حضور هم‌زمان گرده‌های بالغ (mp) و نابالغ (imp) در یک کیسه گرده بر اثر تیمار دیده می‌شود. (c) دیواره بساک تحت تاثیر کلرید کادمیوم دچار چروک‌خوردگی شدید شده است. (d) بر اثر تیمار مربوطه بافت‌های شبه توموری در جداره داخلی بساک تشکیل شدند. (e) در بررسی قدرت زیست‌پذیری دانه‌های گرده بوسیله رنگ‌آمیزی استوکارمن، دانه‌های گرده دارای توان زیستی بوسیله استوکارمن رنگ‌آمیزی شده (ac) ولی دانه‌های گرده فاقد توان زیستی بدون رنگ باقی مانده‌اند (na). (f) چروک‌خوردگی شدید در گرده‌های اطلسی گیاهان در معرض کلرید کادمیوم مشهود است. (g) بر اثر تیمار کلرید کادمیوم دیواره اگزینی دانه‌های گرده اطلسی دچار شکستگی و نشت سیتوپلاسم سلولی شدند.

میانگین‌ها نشان می‌دهد که همه تیمارها به یک اندازه در این تغییرات دخالت نداشته و حتی برخی تیمارها در بعضی صفات تغییرات معنی‌دار ایجاد نکردند (p < 0/05). در مقایسه با گیاهان شاهد، گروه‌های تیماری بر حسب افزایش غلظت تیمار مربوطه تغییر رنگ قابل توجهی را در بخش‌های رویشی‌شان نشان دادند، به نحوی که در گروهی با غلظت تیماری 400 میکرومولار کلرید کادمیوم کمترین و در گروه آخر یعنی غلظت 1200 میکرومولار بیشترین زرد شدگی در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد.

پس از انجام مشاهدات میکروسکوپی و شمارش گرده‌های تغییر یافته بر اثر تیمار کادمیوم، داده‌های به دست آمده در خصوص چهار صفت چروکیدگی گرده، شکستگی دیواره اگزین، بی‌نظمی در استقرار دانه‌های گرده در بساک و قدرت زیست‌پذیری آن‌ها مورد بررسی‌های آماری از جمله آنالیز واریانس و مقایسه میانگین قرار گرفتند که نتایج آن در قالب جدول 1 برای آنالیز واریانس و جدول 2 برای مقایسه میانگین‌ها ارائه شده است. با توجه به نتایج آنالیز واریانس صورت گرفته مشخص می‌شود که هر چهار صفت نام برده شده به شکل معنی‌داری (p < 0/01) در اثر تیمار مربوطه دچار تغییر شده بودند. ولیکن مقایسه

جدول 1: نتایج تجزیه واریانس قدرت زیست‌پذیری، چروکیدگی، شکستگی اگزین و بی‌نظمی در استقرار گرده. تحت تاثیر سطوح مختلف کلرید کادمیوم

منبع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات	قدرت زیست‌پذیری	چروکیدگی گرده	شکستگی اگزین گرده	بی‌نظمی در استقرار گرده
تیمار	3	0/026**	0/365**	0/003**	0/003**	0/003**
خطا	16	0/0003**	0/007**	0/0002**	0/0002**	0/0002**
ضریب تغییرات		2/18	46/18	43/27	31/70	

**معنی‌دار در سطح 1 درصد

جدول 2: مقایسه میانگین‌های اثر کادمیوم بر قدرت زیست‌پذیری، چروکیدگی، شکستگی اگزین و بی‌نظمی در استقرار گرده

تیمار	قدرت زیست‌پذیری	چروکیدگی گرده	شکستگی اگزین گرده	بی‌نظمی در استقرار گرده
شاهد	0/955a	0/35b	0/008c	0/016c
تیمار اول	0/914b	0/51b	0/019bc	0/026c
تیمار دوم	0/861c	0/58b	0/028b	0/053b
تیمار سوم	0/808d	0/588a	0/068a	0/072a

تیمارهای شاهد، اول، دوم و سوم به ترتیب غلظت‌های 0، 400، 800 و 1200 میکرومولار کلرید کادمیوم. حروف مشابه در هر ستون نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در سطح 5 درصد با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن است.

ب) نتایج آنالیز پروفایل SDS-PAGE باند‌های پروتئینی دانه‌های گرده

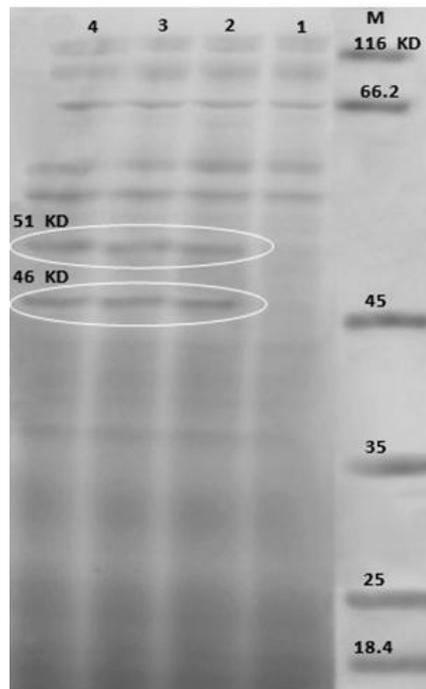
دانه‌های گرده اطلسی‌های گروه شاهد و گروه‌های تحت تیمار مورد مطالعه الکتروفورزی قرار گرفتند. پروفایل SDS-PAGE باندهای پروتئینی نمونه‌های مختلف دانه‌های (شاهد و تیمار شده با محلول کلرید کادمیوم در غلظت‌های مختلف) در شکل 3 نشان داده شده است. باندها در محدوده وزنی 15 تا 120 کیلو

دالتون قرار داشتند. SDS-PAGE نشان می‌دهد که در دانه‌های گرده گیاهان تیمار شده با محلول کلرید کادمیوم باندهایی وجود دارند که در گیاهان شاهد مشاهده نمی‌شوند. در عصاره دانه‌های گرده گیاهان تیمار شده با محلول‌های 400، 800 و 1200 میکرومولار کادمیوم دو باند پروتئینی جدید با حدود وزن مولکولی 46 و 51 کیلو دالتون مشاهده می‌شود.

برش‌گیری و بررسی میکروسکوپی مراحل تکوینی گروه‌های تیماری دوم و سوم، یعنی گیاهانی که با ۸۰۰ و ۱۲۰۰ میکرومولار از کلرید کادمیوم تیمار شده بودند، پس از عبور از محلول‌های صعودی تولون دچار تغییر رنگ شده و به رنگ قهوه‌ای تیره در آمده و در زمان برش‌گیری به‌طور کامل خرد شدند. در صورتی که نمونه‌های گروه شاهد و گروه تیماری اول که مراحل آماده‌سازی مشابهی را طی کرده بودند این مشکل را نداشتند. البته با تغییراتی در مراحل آماده‌سازی این معضل بر طرف شد. چنین وضعیتی در سایر مطالعات انجام شده در خصوص تاثیر آلاینده‌های هوا بر تکوین گیاهان گزارش شده است (۳۰ و ۳۱). در توضیح این مشکل می‌توان به این نکته اشاره داشت که فلزات سنگین قادرند با محتویات آنیونی و زیکول‌های ترشحی بر هم کنش داشته و آن‌ها را از عمل کرد طبیعی‌شان، به ویژه در تکوین دیواره سلولی منحرف سازند (۳۲ و ۳۳). از طرف دیگر، با توجه به گزارشات موجود در خصوص کاهش انعطاف پذیری پلاستیکی دیواره سلولی و جلوگیری از طویل شدن آن در طی رشد لوله گرده بر اثر آلودگی کادمیوم، این مسئله قابل درک است (۳۲ و ۳۳).

در مطالعه تکوینی بساک گیاهان اطلسی تحت تیمار بروز چینخوردگی و چروکیدگی شدید لایه‌های سلولی دیواره هاگدان‌ها کاملاً مشهود بود. به‌نحوی که در بعضی موارد دیواره‌های بساک به هم نزدیک شده و فضای کافی برای استقرار دانه‌های گرده وجود نداشت. در حالی که در بررسی‌های مورفولوژیکی قبل از آماده‌سازی همین بساک‌ها هیچ گونه چروکیدگی مشاهده نمی‌شد. احتمالاً بر اثر تیمار مربوطه، ساختارهای سلولی در جداره بساک دچار آسیب و یا عدم رشد کافی شده و در طی مراحل آماده‌سازی و برش‌گیری این جداره شکسته و یا خمیده می‌شود که در نهایت موجبات چروکیدگی بساک را فراهم می‌کند. رضانژاد (۳۰) و بقائی (۳۱) نیز در پژوهش‌های خود به ترتیب اثر تیمار آلودگی هوا بر تکوین دانه گرده اطلسی و اثر دی بنزو پیرون را بر تکوین دانه‌های گرده آفتاب‌گردان بررسی و موارد مشابه‌ای را گزارش کرده‌اند. نتایج بررسی‌های یوسفی و همکاران (۳۴) و محسن‌زاده و همکاران (۳۵) در مورد اثر آلودگی با فلزات سنگین در سایر گیاهان نیز این موضوع را تأیید می‌نماید.

مراحل میکروسپورزائی و تقسیمات میوزی به شکل طبیعی و بدون وجود اختلالات حاد در گروه‌های تیماری انجام شده بود.



شکل ۳: مقایسه نیمرخ الکتروفورزی پروتئین‌های گرده اطلسی در گروه گیاهان شاهد و تحت تیمار کلرید کادمیوم. M، مارکر پروتئینی؛ الگوهای ۱، ۲، ۳ و ۴ به ترتیب باندهای پروتئینی دانه‌های گرده گیاهان شاهد بدون هیچ گونه تیماری؛ تیمار شده با ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۲۰۰ میکرومولار کلرید کادمیوم. در الگوهای ۲، ۳ و ۴ دو باند به وزن‌های ۴۶ و ۵۱ کیلو دالتون وجود دارد که در الگوی گروه شاهد مشاهده نمی‌شود.

بحث

الف) بررسی نتایج تکوین بساک و دانه‌های گرده

فلزات سنگین دارای عوارض سمی فراوانی تقریباً بر روی همه گیاهان هستند. اما معمول‌ترین و غیر اختصاصی‌ترین عوارض شامل: غیر فعال کردن بیومولکول‌ها توسط ممانعت گروه‌های عامل اساسی یا قرارگیری به جای یون‌های فلزی حیاتی (۲۶)، تغییر در نفوذپذیری غشاهای سلولی، غیر فعال سازی گروه‌های تیولی با کاتیون‌ها و آسیب دستگاه فتوسنتزی می‌باشند (۲۷). اهمیت مطالعه بر هم کنش بین آلاینده‌های محیطی و گرده‌ها در دو دهه اخیر توسط ایشیزاکی و همکاران (۲۸) به پیش برده شده است، که رابطه بین آلاینده‌ها و شیوع گسترده تب یونجه را در مناطق شهری ثابت کردند. مطالعات هیستوژنی بافت‌های گیاهی ابزار مناسبی برای تشریح حساسیت گیاهان نسبت به آلاینده‌ها هستند (۲۹).

در طی انجام مراحل آماده‌سازی نمونه‌های گیاهی، به‌منظور

گرده‌های مختلف یک نمونه است. به نحوی که در درون یک کیسه گرده همزمان گرده نابالغ، بالغ و حتی گرده کاملاً بالغ مشاهده می‌شود، در حالی که در گروه کنترل این فرآیند به شکل کاملاً هماهنگ در بین همه سلول‌های یک هاگدان به پیش می‌رود. مکانیسم بلوغ دانه‌های گرده توسط تعداد بیشماری از ژن‌ها کنترل می‌شود و حتی کوچک‌ترین تغییر ژنی موجب القا آسیب و به هم خوردن نظم در این پروسه خواهد بود (۳۹).

چین خوردگی و چروکیدگی گرده‌های بالغ شدیدترین عارضه ناشی از کادمیوم می‌باشد در حالی که در گیاهان شاهد به میزان بسیار ناچیز مشاهده می‌شود. در این حالت جداره‌های پوشاننده گرده کاملاً چروکیده شده و فضای سیتوپلاسمی سلول را به حداقل ممکن می‌رسانند، به صورتی که شکل دانه گرده کاملاً تغییر کرده و حالت ستاره‌ای به خود می‌گیرد. تغییرات متعددی در شکل گرده‌ها و نیز در تکثوم آن‌ها به دلیل مجاورت با آلاینده‌های مختلف تاکنون گزارش شده است (۴۰، ۴۱ و ۴۲). مشخص شده است که در بین سلول‌های مختلف گیاهان، گرده‌ها به میزان بیشتری به آلاینده‌های مختلف حساس هستند و جوانه‌زنی گرده‌ها و رویش لوله گرده در آن‌ها بر اثر عناصر سنگین مختلف به ویژه کادمیوم ممانعت می‌شود، به نحوی که کشت‌های آزمایشگاهی لوله‌های گرده به‌عنوان یک سیستم استاندارد حساس برای بررسی میزان سمیت عناصر سمی مختلف در سطح سلولی استفاده می‌شود (۴۳ و ۴۴). بر اساس مشاهدات صورت گرفته در این مطالعه تکوین دانه‌های گرده تا مرحله انجام اولین تقسیم میتوز هاپلوئیدی و تشکیل دو سلول رویشی و زایشی در همه میکروسپورها تقریباً طبیعی است. اما پس از این مرحله، در اکثر گیاهان در معرض آلاینده‌ها و استرس‌های مختلف فرآیند تکوین متوقف شده و هیچ ویژگی تکوینی جدیدی مانند ذخیره نشاسته مشاهده نمی‌شود. نتایج مشابهی در مطالعات آثار استرس‌های سرما (۴۵) و تنش آب در برنج (۴۶) و استرس گرما در گوجه‌فرنگی (۴۷) دیده شده است. پیشنهاد می‌شود که کاهش در ذخیره نشاسته در گرده‌ها مربوط به فقدان قند نبوده و ناشی از بازداشته شدن آنزیم‌های متابولیسم قند و بیوسنتز نشاسته می‌باشد. بنابراین، به احتمال زیاد توقف فرآیندهای آنزیمی ناشی از تجمع کادمیوم در دانه‌های گرده، موجب این چروکیدگی و تغییر شکل شدید شده است. البته اثبات این مسئله نیازمند کارهای تحقیقاتی بیشتر می‌باشد.

در گیاه اطلسی به واسطه حضور بافت پلاستوتئید یا جفت‌نما، فضای کیسه‌های گرده به شکل هلالی درآمده و این وضعیت با واکنش شدن لایه مغزی درونی و افزایش حجم گسترده این سلول‌ها، تا آخرین مراحل میوزی سلول‌های مادر گرده پایدار است. در این حالت ارتباطات تنگاتنگی بین سلول‌های هاگزا و سلول‌های لایه‌های تاپی درونی و بیرونی برقرار می‌شود که از نظر تکوینی بسیار مطلوب به نظر می‌رسد. ولیکن در نمونه‌های تیماری بررسی شده سلول‌های لایه پرستار درونی زودتر از زمان مقرر دچار تخریب و مرگ برنامه‌ریزی شده می‌شوند و این موضوع باعث به هم خوردن ساختار هلالی موجود در سلول‌های مادر گرده و پراکنده شدن و بی‌نظمی آن‌ها در فضای کیسه گرده می‌گردد. بعضی از مطالعات صورت گرفته در خصوص اثر فلزات سنگین بر تکوین بساک نتایج متضادی در این خصوص گزارش کرده‌اند. در این بررسی‌ها تخریب دیر هنگام این لایه بر اثر این آلودگی‌ها مشاهده شده است (۳۴ و ۳۵)، که با توجه به رفتارهای متفاوت گیاهان مختلف در مواجهه با فلزات سنگین این تضاد را می‌توان توجیه کرد (۵ و ۶). نتایج مطالعات فاهلر (۳۶) نشان دادند که سطح بالای آلاینده‌ها می‌توانند موجب جهش‌زایی و تغییرات مورفولوژیکی در بخش‌های مختلف بساک نظیر دیواره‌های سلولی هاگدان‌ها، سلول‌های مادر گرده و حتی خود گرده شوند. با توجه به این مطالب می‌توان نتیجه گرفت که احتمالاً مرگ زودرس لایه تاپی به دلیل جهش‌های بوجود آمده توسط تیمار کادمیوم باشد.

در بررسی‌ها میکروسکوپی صورت گرفته در گروه‌های گیاهی تحت تیمار، حضور بافت شبه توموری در جداره داخلی بساک قابل توجه بود. این بافت نامتعارف از سلول‌های پارانشیمی تشکیل شده و به شکل یک توده کروی در جداره داخلی یکی از کیسه‌های گرده مستقر و تقریباً فضای درونی کیسه را به‌طور کامل اشغال می‌نماید. با بررسی‌های دقیق‌تر منشا اولیه این بافت لایه‌های میانی جداره بساک تشخیص داده شد. آثار سمی کادمیوم و دیگر فلزات سنگین در بافت‌های گیاهی معمولاً به دلیل ایجاد اختلال در فرآیندهای حیاتی آن‌ها نظیر: میتوز، جذب آب، تنفس و فتوسنتز می‌باشد (۳۷). از آنجائی که تقسیم سلولی اهمیت ویژه دارد، اغلب عناصر سنگین را عامل اختلالات سیکل سلولی معرفی می‌نمایند (۳۸).

دیگر ناهنجاری مشاهده شده در گیاهان اطلسی تحت تیمار کادمیوم، وجود ناهم‌انگهی زمانی در انجام مراحل تکوین بین

به‌فردی در کیسه‌های هاگدان بساک می‌باشند، به‌نحوی که در برش‌های عرضی صورت گرفته تقریباً تمامی گرده‌ها در منظره قطبی و در برش‌های طولی بساک، در منظره استوائی مشاهده می‌شوند. ولیکن تیمار صورت گرفته این ویژگی را نیز تحت تاثیر خود قرار می‌دهد، به شکلی که در تعداد قابل توجهی از گرده‌ها این نظم وجود ندارد. جابه‌جایی گرده‌های در حال تکوین در مراکز حفرات بساک، به‌ویژه در مرحله واکوئله شدن میکروسپوروسیت‌ها به فراوانی مشاهده شده که احتمالاً به‌دلیل آب‌گیری‌های صورت گرفته در طول جای‌گیری این سلول‌هاست (۵۹). آسیب‌های غشایی صورت گرفته بر اثر تجمع کادمیوم در گرده‌های در حال تکوین کاندید احتمالی برای ایجاد این بینظمی هستند، چرا که مسلماً آسیب غشایی فرآیند آب‌گیری را در این سلول‌ها مختل خواهد کرد و این وضعیت می‌تواند بر نظم آتی در استقرار گرده‌ها اثر گذار باشد.

آخرین ناهنجاری مشاهده شده در این تحقیق افزایش شدت زردشدگی متناسب با افزایش غلظت‌های تیماری، در تمامی بخش‌های رویشی و زایشی گیاهان تحت تیمار می‌باشد. همان‌طور که پیش از این اشاره شد، کاهش تولید کلروفیل و کلروزه شدن بافت‌های گیاهی از شایع‌ترین اثرات آلودگی‌های فلزات سنگین در گیاهان به شمار می‌رود. در دیگر تحقیقات نیز به افزایش خطی تجمع عناصر سنگین از جمله کادمیوم و مس به موازات مقادیر به کار گرفته شده در تیمارها اشاره شده است. اگر چه کادمیوم به‌طور واضحی در ساختارهای تولید مثلی در معرض عناصر سمی تجمع می‌یابد، اما در مقایسه غلظت این فلز در اندام‌های رویشی خیلی بیشتر است (۶۰). نتایج مشابهی نیز در بررسی‌های صورت گرفته در گیاه تنباکو بدست آمده است (۶۱).

ب) بررسی نتایج آنالیز پروفایل SDS-PAGE باندهای

پروتئینی دانه‌های گرده

در مطالعه نیمرخ الکتروفورزی عصاره‌های گرده گروه‌های گیاهی مختلف، تشکیل دو باند پروتئینی جدید به وزن‌های ۴۶ و ۵۱ کیلو دالتون در گیاهان تحت تیمار مشاهده شد در حالی که در عصاره گرده گیاهان شاهد این دو باند وجود نداشتند. تشکیل این پروتئین‌های جدید احتمالاً به‌دلیل اثر تیمار کادمیوم می‌باشد که با بیان ژنی جدید مرتبط بوده است این‌طور به نظر می‌رسد که پروتئین‌های جدید می‌توانند پروتئین‌های سم‌زدا باشند که تشکیل آن‌ها در پاسخ به سمیت فلزات سنگین قبلاً گزارش شده

درصد قابل توجهی از گرده‌های گیاهان تحت تیمار دچار شکستگی جداره اگزین و خروج محتویات سیتوپلاسمی شده که در مقایسه با گیاهان شاهد این اختلاف معنی‌دار می‌باشد. شاید تخریب زودرس لایه پرستار که پیش از این به آن اشاره شد دلیل اصلی این معضل باشد. چرا که این سلول‌ها نقش کلیدی در تشکیل لایه اگزین دارند و تخریب زود هنگام آن‌ها مسلماً موجب نقص در تشکیل کامل جداره اگزینی خواهد شد. این دانه‌های گرده در مقایسه با گرده‌های گروه کنترل، پس از تماس با آب خیلی سریع‌تر جداره اگزینی را از دست می‌دهند. پیش از این نیز ثابت شده است که آلاینده‌های گازی و ذرات معلق در هوا می‌توانند موجب نازک‌شدن و فروپاشی اگزین و تغییر در محتوی پروتئینی و منحنی‌های الکتروفورزی شوند (۲۱، ۲۲، ۴۰، ۴۱، ۴۸ و ۴۹).

در گونه‌های گیاهی غیر مقاوم، فلزات سنگین آثار گسترده‌ای بر فعالیت‌های سلولی گیاه نظیر فتوسنتز، تنفس، تغذیه معدنی و ساختار و ویژگی‌های غشاء‌های سلولی دارند (۵۰ و ۵۱). بسیاری از این آثار می‌توانند به دلیل تاثیر عمومی‌شان بر غشاهای سلولی باشد. ساختارهای غشایی در گیاهان ممکن است اولین ساختارهای زیستی باشند که هدف سمیت فلزات سنگین قرار می‌گیرند (۵۲). مولکاهی (۵۳) نیز ثابت کردند که آلودگی‌های صنعتی موجب تغییرات عمده‌ای در غشای سیتوپلاسمی دانه‌های گرده و در نتیجه توان زیست‌پذیری آن‌ها می‌شود. تحقیقات هوکسترا (۵۴) و گولوپینا و همکاران (۵۵) نیز نشان دادند که غشاهای سیتوپلاسمی اولین هدف برای تغییرات مخرب استرس‌های غیرزیستی بر روی دانه‌های گرده می‌باشند. از طرفی تجمع ترکیبات نیتروژن‌دار و عناصر سنگین در سیتوپلاسم دانه‌های گرده ثابت شد (۵۶). پس با توجه به این مطالب می‌توان این‌گونه نتیجه‌گیری کرد که کاهش قابل توجه قدرت زیست‌پذیری دانه‌های گرده گیاهان در معرض غلظت‌های متفاوت کادمیوم مشاهده شده در این بررسی، می‌تواند به‌دلیل اثرات تخریبی فلزات سنگین بر روی غشای سلول‌های دانه گرده باشد. این پیشنهاد موافق با نتایج فعالیت گروهی از محققین است که آثار آلودگی‌های مختلف هوا را بر تندش دانه‌های گرده مطالعه می‌کردند (۵۷ و ۵۸). بررسی‌های کروماتوگرافی گازی فسفولپیدهای غشا می‌تواند اطلاعات مفیدی در خصوص تغییرات غشا سلول‌های دانه گرده فراهم آورد.

دانه‌های گرده کاملاً بالغ گیاه اطلسی دارای استقرار منحصر

منابع

1. Mirsa KC. Plant Ecology. Oxford and Ibh UK. 1974.
2. Holleman A, Wiberg E. Lehrbuch der Anorganischen Chemie. Berlin: Springer. 1985.
3. Baker AJM, Brooks R. Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements—areview of their distribution. Ecology and Phytochemistry. 1989; 1: 81-128.
4. Duxbury T. Ecological aspects of heavy metal responses in micro-organisms. Adv. Microb. Ecol. 1985; 8: 185-235.
5. Salt DE, Blaylock M, Kumar NBPA, Dushenkov V, et al. Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. Biotechniques. 1995; 13: 468-474.
6. Boussama N, Ouariti O, Suzuki A, Ghorbal MH. Cd-stress on nitrogen assimilation. J. Plant Physiol. 1999; 155: 310-317.
7. Das P, Samantaray S, Rout GR. Studies on cadmium toxicity in plants: a review. Environ. Pollut. 1997; 98: 29-36.
8. Gallego SM, Benavides MP, Tomaro ML. Involvement of an antioxidant defense system in the adaptative response to heavy metal ions in *Helianthus annuus* L. cells. Plant Growth Regul. 2002; 36:267- 273.
9. Romero-Puertas MC, Palma JM, Gomez M, DelRio LA, et al. Cadmium causes the oxidative modification of proteins in pea plants. Plant Cell Enviro. 2002; 25: 677-686.
10. Barcelo J, Poschenrieder C, Andreu I, Gunse B. Cadmium-induced decrease of water stress resistance in bush bean plants (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Contender). I. Effects of Cd on water potential relative water content and cell wall elasticity. J. Plant Physiol. 1986; 125: 17-25.
11. White PA, Claxton LD. Mutagens in contaminated soil: a review. Mutat Res. 2004; 567(2-3): 227-345.
12. Ahsan N, Renaut J, Komatsu S. Recent developments in the application of proteomics to the analysis of plant responses to heavy metals. Proteomics. 2009; 9: 2602-2621.
13. Peralta-Videa JR, Lopez ML, Narayan M, Saupe G, et al. The biochemistry of environmental heavy metal uptake by plants: implications for the food chain. Int J Biochem Cell Biol. 2009; 41: 1665-1677.
14. Bowles DJ. Defense-related proteins in higher plants. Annu Rev Biochem. 1990; 59: 873-907.

است (۳۴). این یافته با یافته‌های سایر محققین هم‌سویی دارد. گزارش‌های پژوهشگران قبلی نیز نشان دهنده نقش آلاینده‌های هوا بر القای تغییرات در سطح پروتئین‌های گرده‌ای است، به نحوی که شکستگی پروتئین‌های گرده‌ای، تغییر در تعداد، نوع باندهای پروتئینی و ترکیب و محتوی پروتئین‌های گرده‌ای تحت تاثیر آلودگی مشاهده شده است (۶۲-۶۷)، نتایج تحقیق ما با این گزارش‌ها هم‌سویی دارد ولی با یافته‌های بهرنت (۴۰)، هلندر و همکاران (۶۸) و نیز مطالعات انجام شده در خصوص محتوی و پروفایل‌های الکتروفورزی پروتئین‌های گرده *Spartium junceum* و باندهای پروتئینی گرده‌های *Thaja orientalis* متفاوت است (۶۹). مطالعات صورت گرفته در این زمینه نتایج متناقضی ارائه می‌دهند، این احتمال وجود دارد که نوع گونه گیاهی، نازک شدن آگزین در شرایط آلودگی هوا و افزایش جرم کاذب گرده‌ها به دلیل رسوب آلاینده‌ها بر سطح گرده دلیل این تفاوت‌ها باشد (۷۰).

نتیجه‌گیری

مطالعه ما نشان داد که غلظت‌های ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۲۰۰ میکرومولار کلرید کادمیوم در طی نمو اندام‌های زایشی نر گل اطلسی نه تنها می‌تواند ویژگی‌های تکوینی این اندام‌ها را تحت تاثیر قرار دهد، بلکه سبب تغییر الگوی بیان پروتئین‌های دانه‌های گرده نیز می‌شود. با توجه به گزارشات موجود در خصوص احتمال افزایش آلرژی‌زایی دانه‌های گرده گیاهان در معرض آلودگی‌های هوا به‌ویژه فلزات سنگین، پیشنهاد می‌شود مطالعات بیشتری در خصوص ماهیت پروتئین‌های به وجود آمده بر اثر تیمار مربوطه و امکان آلرژی‌زایی آن‌ها انجام پذیرد.

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر بر اساس بخشی از نتایج پایان‌نامه کارشناسی ارشد (حسن رضائی) در رشته علوم گیاهی گرایش سلولی-تکوینی نگارش شده است و انجام این پژوهش در دانشگاه بوعلی‌سینا همدان و با حمایت مالی آن بوده است. مولفین مراتب تقدیر و تشکر خود را از معاونت محترم و مدیر محترم پژوهشی این دانشگاه برای تامین اعتبار مالی و امکانات پژوهشی حاضر اعلام می‌دارند. هم‌چنین از مدیریت محترم پردیس دانشگاه به‌دلیل ایجاد امکان استفاده از گلخانه پردیس کمال تشکر را داریم.

15. Sudo E, Itouga M, Yoshida-Hatanaka K, Ono Y, et al. Gene expression and sensitivity in response to copper stress in rice leaves. *J Exp Bot.* 2008; 59(12): 3465-3474.
16. Hanninen AR, Mikkola JH, Kalkkinen N, Turjanmaa K, et al. Increased allergen production in turnip (*Brassica rapa*) by treatments activating defense mechanisms. *J Allergy Clin Immunol.* 1999; 104(1): 194-201.
17. Gorjanovic S, Suznjevic D, Beljanski M, Hranisavljevic J. Barley lipid-transfer protein as heavy metal scavenger. *Environ Chem Lett.* 2004; 2(3): 113-116.
18. Roth U, von Roepenack-Lahaye E, Clemens S. Proteome changes in *Arabidopsis thaliana* roots upon exposure to Cd²⁺. *J Exp Bot.* 2006; 57(15): 4003-4013.
19. Bekešiova B, Hraska S, Libantova J, Moravčíková J, et al. Heavy-metal stress induced accumulation of chitinase isoforms in plants. *Mol Biol Rep.* 2008; 35: 579-588.
20. Breiteneder H, Ebner C. Molecular and biochemical classification of plant-derived food allergens. *J Allergy Clin Immunol.* 2000; 106: 27-36.
21. Emberlin J. The effect of air pollution on allergic pollen. *J Eur Respir Rev.* 1998; 53: 164-167.
22. Emberlin J. The problem of pollen. *Allergy.* 2000; 8(2): 25-28.
23. Omura M, Matsta N, Moriguchi T, Kozaki I, et al. Variation in the physiological and genetic characteristics and pollen grain number in Japanese pear depending on the growing conditions. *Bull. Fruit Trees Res. Stn. Ser.* 1989; 16: 11-24.
24. Chehregani A, Kouhkan F. Diesel Exhaust Particles and allergenicity of pollen grain of *Lilium martagon*. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 2008; 69(3): 568-573.
25. Ruzin SE. Plant microtechnique and microscopy. Oxford New York: Oxford University Press. 1999.
26. Goyer RA. Toxic and essential metal interactions. *Annu Rev Nutr.* 1997; 17: 37-50.
27. Kabata-Pendias A, Pendias H. Trace elements in soil and plant. CRC Press Florida. 2000.
28. Ishizaki T, Koizumi k, Ikemori R, Ishiyama Y, et al. Studies of prevalence of japanese cedar pollinosis among residents in a densely cultivated area. *ANN. Allergy.* 1987; 58(4): 265.
29. Alves PLA. Efeitos nutricionais da chuva acida simulada e do Latossolo Vermelho- Amarelo de Cubatao- SP em soja (*Glycine max* L.). M. Sc Universidade Federal de Vicosa Minas Gerais Brasil. 1988.
30. Rezaejad F. The Study of Anther wall development microsporogenesis proteins structure and pollen grain allergenicity of some plants of parks and green spaces in Tehran and the effects of air pollution on them. Ph.D. Dissertation. Tarbiat Moallem University of Tehran. 2003.
31. Baghaei far Z. The study of anther development microsporogenesis proteins and allergenicity of Sunflower (*Helianthus annuus* L.) pollens and the effect of Benzo(a)pyrene in DEP on them. Ph.D. thesis at Tarbiat Moallem University of Tehran. 2011.
32. Sawidis T, Reiss HD. Effects of heavy metals on pollen tube growth and ultrastructure. *Protoplasma.* 1995; 185 (3-4): 113-122.
33. Sawidis T. Effect of cadmium on pollen germination and tube growth in *Lilium longiflorum* and *Nicotiana tabacum*. *Protoplasma.* 2008; 233(1-2): 95-106.
34. Yousefi N, Chehregani A, Malayeri B, et al. Investigating the effect of heavy metals on developmental stages of anther and pollen in *Chenopodium botrys* L. (Chenopodiaceae). *Biol Trace Elem Res.* 2011; doi:10.1007/s12011-010-8701-6.
35. Mohsenzadeh F, Chehregani A, Yousefi N. Effect of the Heavy Metals on evelopmental Stages of Ovule Pollen and Root Proteins in *Reseda lutea* L. (Resedaceae). *Biol Trace Elem Res DOI.* 2011; 143(3): 1777-88.
36. Pfahler PL. In vitro germination characteristics of maize pollen to detect biological activity of environmental pollutants. *Nviron Health Persp.* 1981; 37: 125-132.
37. Kabata-Pendias A. Trace Elements in Soils and Plants. CRC Press Boca Raton FL USA. 2001.
38. Wierzbicka M. Resumption of mitotic activity in *Allium cepa* root tips during treatment with lead salts. *Environ. Exp. Bot.* 1994; 34:173-180.
39. Mulcahy DL. Pollen tetrads in the detection of environmental mutagenesis .*Environ. Health Perspect.* 1981; 37: 91-94.
40. Behrendt H, Becker WM, friedrichs KH, Darson V, et al. Interaction between aerpallergens and airborne particulate matter. *Arch. Allergy Immunol.* 1992; 99: 425.
41. Behrendt H, Becker M, Friedrich KH, Ring J. Air pollution and allergy: experimental studies on modulation of allergen release from pollen by air pollutants. *J Int Arch Allergy and Immunology.* 1997; 113: 69-74.

42. Knox B, Suphioglu C. Environmental and molecular biology of pollen allergen. Trends in plant science (Elsevier Science). 1996; 5: 156.
43. Kristen U, Hoppe U, Pape W. The pollen tube growth test: a new alternative to the Draize eye irritation assay. J Soc Cosmet Chem . 1993; 44: 153-162.
44. Gur N, Topdemir A. Effects of heavy metals (Cd, Cu, Pb, Hg) on pollen germination and tube growth of quince (*Cydonia oblonga* M.) and plum (*Prunus domestica* L.). Fresenius Environ Bull. 2005; 14: 36-39
45. Ito N. Male sterility caused by cooling treatment at the young microspore stage in rice plants. XVI. Changes in carbohydrates nitrogenous and phosphorous compounds in rice anthers after cooling treatment. Japanese Journal of Crop Science. 1978; 17: 318-323.
46. Sheoran IS, Saini HS. Drought-induced male sterility in rice: changes in carbohydrate levels and enzyme activity associated with the inhibition of starch accumulation in pollen. Sexual Plant Reproduction. 1996; 9: 161-169.
47. Pressman E, Peet MM, Pharr DM. The effect of heat stress on tomato pollen characteristics is associated with changes in carbohydrate concentration in the developing anther. Annals of Botany. 2002; 90(5): 631-636.
48. Majd A, Mohamadi S. Effect of certain toxins and air pollution on pollen development of *Glycine max*. J Islamic Azad University. 1992; 649-651.
49. Pelter G. Interaction between pollens and air pollution. Allergie et Immunologie v(XXX)-n. 1998; 10: 324-326.
50. Maksymiec W. Effect of copper on cellular processes in higher plants Photosynthetica. 1997; 34(3): 321-342.
51. Rama Deli S, Prasad MNV. Membrane lipid alterations in heavy metal exposed plants In: M.N.V. Prasad J. Hagemeyer (Eds.) Heavy Metal Stress in Plants—From Molecules to Ecosystems Springer Berlin. 1999; pp. 99-117.
52. Hall JL. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance J. Exp. Bot. 2002; 53(366): 1-11.
53. Mulkahy DJ, Mulkahy GB. The effect of pollen competition. Amer. Scientist. 1987; 75: 44-50.
54. Hoekstra FA, Crowe JH, Crowe LM, Van Reokel T, et al. Do phospholipids and sucrose determine membrane phase transition in dehydrating pollen species?. Plant cell Environ. 1992; 15: 601-606.
55. Golovina EA, Hokestra FA, Hemminga MA. Drying increases intracellular partitioning of amphiphilic substances into the lipid phase plant physiol. 1998; 118(3): 975-986.
56. Smith WH. Air pollution and forests: Interaction between air contaminants and forest ecosystems. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York. 1990; pp 210-224.
57. Mejnartowicz L, Lewandowski A. Effects of fluorides and sulphur dioxide on pollen germination and growth of the pollen tube. Acta Soc. Bot. Pol. 1985; 54: 125-129.
58. Ostrolucka MG, Bolvansky M, Tokar F. Vitality of pine pollen (*Pinus sylvestris* L. and *Pinus nigra* Arnold) on sites with different ecological conditions. Biologica Bratislava. 1995; 50: 47-51.
59. Schoene K, Franz J-Th, Masuch G. The effect of ozone on pollen development in *Lolium perenne* L. Environmental Pollution. 2004; 131: 347-354.
60. Hattab S, Chouba L, Ben Khedher M, Mehouchi T, et al. Cadmium and copper induced DNA damage in *Pisum sativum* roots and leaves as determined by the Comet assay. Plant. Biosyst. 2009a; 143:S6-S11.
61. Gichner T. DNA damage induced by indirect and direct acting mutagens in catalase-deficient transgenic tobacco. Cellular and acellular comet assays. Mutat. Res. 2003; 535:187-193.
62. Baghali Z, Majd A, Chehregani A, Pourpak Z, et al. Cytotoxic effect of benzo(a)pyrene on development and protein pattern of sunflower pollen grains. Toxicological & Environmental Chemistry, 2011; 93: 665-667.
63. Ghanati F. The impact of environmental pollution on structure ultrastructure and allergenicity of pollen grains. MS thesis. Tarbiat modarres University of Tehran. 1992.
64. Keiabi S. The effect of Tehran air on the structure and ultrastructure and allergenicity of *Cupressus Arizonica* and *Platanus occidentalis* pollen grains. MS Thesis. Islamic Azad University, Tehran North Branch, Iran. 1992.
65. Ruffin J, Williams D, Banerjee U, Pinnix K. The effect of some environmental gaseous pollutants on pollen-wall proteins of certain airborne pollen grains. J Grana. 1983; 22:171-175.
66. Chakraborty P, Gupta-Bhattacharya S, Chanda S. Comparative aerobiology allergenicity and biochemistry of three palm pollen grains in Calcutta Indian. J. Aerobiology. 1996; 12:47-50.
67. Sanjukata P, Mondal AM, Mandol S. Protein content and patient skin test sensitivity of the pollen

of *Argemon Mexicana* on exposure to SO₂. Grana. 1998; 37: 121- 24.

68. Helender ML, Sabolainen J. Effects of air pollution and other environmental factors on birch pollen allergens. Allergy. 1997; 3: 1207-1214.

69. Rezaejad F. The effect of air pollution on microsporogenesis pollen development and soluble pollen proteins in *Spartium junceum* L(Fabaceae). Turk j Bot. 2007; 31: 183-191.

70. Rezaejad F. The response of anther and pollen development pollen cellular material release and pollen proteins to air pollution in *Petunia hybrida* Juss. (Solanaceae). Iranian Journal of Science & Technology. 2013; A1: 63-68.

The Effect of Cadmium on Development of Anther and Pollen Grains and Protein Pattern in *Petunia hybrida* Juss.

Chehregani Rad A, Ph.D.^{1*}, Ramayana H, M.Sc.², Mohsenzadeh F, Ph.D.¹,
Baghaiefar Z, Ph.D.³, Babolhavaeji H, M.Sc.⁴

1. Department of Biology, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran
2. M.Sc. graduated, Department of Biology, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran
3. Department of Biology, Payame-Noor University, Tehran, Iran
4. Department of Horticultural Science, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran

* Email corresponding author: chehregani@basu.ac.ir

Received: 8 Jun. 2014

Accepted: 22 Jul. 2014

Abstract

Aim: Cadmium is one of the air pollutants and a part of diesel exhaust particles. The aim of this study was determination of the effects of cadmium on developmental process and protein pattern of anther and pollen grains in *Petunia hybrida* that is a common decorative plant in landscapes and parks.

Material and methods: *Petunia* plants were grown in experimental pots and treated with the different concentrations of CdCl₂ as spray. Flowers and young buds were collected, fixed in FAA₇₀ (formalin: acetic acid: ethanol with a ratio of 2: 1: 17) and subjected to developmental studies. Pollen grains of different groups were also collected and their proteins were studied using electrophoresis method. Statistical analysis was done using statistical software SAS (version 9.1) and one-way ANOVA analysis.

Results: The developmental process of anther and pollen grains in control plants were followed from the pattern of dicotyledonous plants, but some changes and abnormalities were observed in Cd-treated plants. Irregularity in anther wall, formation of wrinkled and vacuolated pollen grains, decreasing of pollen viability, damaged exine and formation of new protein bands are the effect of Cd treatment.

Conclusion: Cadmium, as an atmospheric pollutant, influences developmental stages of anther and pollen grains. It causes to form different abnormalities and reduction of pollen viability. Formation of new proteins, detoxifying proteins, is a response to pollution stress.

Keywords: *Petunia hybrida*, Cadmium, Protein pattern, Development, Pollen grains