

## اثر تیمار برگی کادمیوم بر ویژگی‌های ریخت‌شناختی، فیزیولوژیکی و تکوین گامتوفیت نر و ماده در درمنه خزری (*Artemisia annua*)

زهرة شیرخانی <sup>۱\*</sup>Ph.D.، عبدالکریم چهرگانی‌راد <sup>۱</sup>Ph.D.، فریبا محسن زاده <sup>۲</sup>Ph.D.، منصور غلامی <sup>۲</sup>Ph.D.

- ۱- دانشگاه خوارزمی، دانشکده علوم زیستی، گروه علوم گیاهی، تهران، ایران
- ۲- دانشگاه بوعلی سینا، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی، همدان، ایران
- ۳- دانشگاه بوعلی سینا، دانشکده کشاورزی، گروه باغبانی، همدان، ایران

\* پست الکترونیک نویسنده مسئول: z.shirkhani@khu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱/۸

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۴/۲۰

### چکیده

**هدف:** هدف از این مطالعه بررسی تغییرات ریخت‌شناختی، تنک‌شناختی (فیزیولوژیک) و تکوین دانه‌ی گرده و تخمک در شرایط تنش ناشی از تیمار کادمیوم در درمنه خزری است.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه انباشتگی کادمیوم در بافت‌های گیاهی، فاکتورهای رشد، محتوای نسبی آب بافت، شاخص پایداری غشا، محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی، محتوای کربوهیدرات‌های محلول، محتوای پروتئین کل، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانسی، الگوی پروتئینی بذر و مراحل تکوین دانه‌ی گرده و تخمک در درمنه خزری تحت تیمار اسپری برگی کادمیوم (۰، ۷۵، ۱۵۰ و ۲۲۵ میلی‌گرم در لیتر) مورد بررسی قرار گرفت.

**نتایج:** نتایج نشان داد که درمنه خزری می‌تواند کادمیوم را در بافت‌های خود انباشته سازد. کاهش در فاکتورهای رشد، محتوای نسبی آب بافت، شاخص پایداری غشا، محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی، محتوای کربوهیدرات‌های محلول و افزایش در محتوای پروتئین کل و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانسی مشاهده شد. همچنین تغییرات در الگوی پروتئینی بذر، تجزیه و تحلیل رفتن سلول‌های کیسه رویانی، و افزایش ناهنجاری‌ها در میکروسپورها و دانه‌های گرده از جمله ناهنجاری‌های مشاهده شده در گیاهان تحت تیمار بود.

**نتیجه‌گیری:** براساس نتایج این تحقیق درمنه خزری مقاومت بالایی نسبت به تنش کادمیوم دارد و می‌تواند تحت غلظت‌های بالای کادمیوم زنده بماند. نتایج بیان‌گر آن است که کادمیوم می‌تواند مراحل نموی اندام‌های زایشی را تحت تاثیر قرار داده و موجب بروز انواعی از ناهنجاری‌ها طی مراحل تکوین اندام‌های زایشی نر و ماده شد اما به‌نظر می‌رسد درمنه خزری با تغییر در ویژگی‌های فیزیولوژیک و پروتئینی خود توانسته در برابر اثرات منفی کادمیوم مقاومت کند.

**واژگان کلیدی:** تنش فلزات سنگین، دانه گرده، درمنه خزری، کیسه رویانی

## مقدمه

وجود سطوح بالای فلزات سنگین در محیط زیست به دلیل مسمومیت، تمایل به تجمع زیستی و ماندگاری بسیار زیاد آن‌ها در اکوسیستم، تهدیدی بالقوه برای سلامت انسان و موجودات زنده است (۱، ۲). گرچه برخی از فلزات سنگین مانند منگنز، روی، کروم، مس، آهن و نیکل به‌عنوان ریزمغذی برای موجودات زنده از جمله گیاهان مورد نیاز هستند، اما ممکن است در سطوح بالاتر اثرات مضر ایجاد کنند. سایر فلزات سنگین غیرضروری مانند جیوه، کادمیوم، آرسنیک و سرب حتی در مقادیر بسیار کم باعث مسمومیت شدید موجودات زنده می‌شوند (۲).

فلزات سنگین هم از طریق منابع انسانی و هم از طریق منابع طبیعی به جو منتقل می‌شوند (۳). تحقیقات اخیر نشان داده است که فلزات سنگین علاوه بر جذب ریشه می‌توانند از طریق مسیر برگ‌ها نیز به گیاهان وارد شوند (۴-۶). فلزات می‌توانند از طریق لایه کوتیکول اندام‌های هوایی نفوذ کرده و مسیر سمپلاستی یا آپوپلاستی را برای حرکت در بین سلول‌ها اتخاذ کنند، سپس می‌توانند توسط آوندها جابه‌جا شوند (۷). فلز جذب شده از مسیر برگ‌ها پس از آزاد شدن در آب‌کش، می‌تواند در سراسر گیاه توزیع شود (۶).

کادمیوم یکی از سمی‌ترین فلزات است که می‌تواند از همان ابتدای چرخه حیات گیاهان، یعنی جوانه‌زنی بذر تا تولید دانه‌ها، روی گیاهان تاثیر بگذارد. در نتیجه غلظت بیش از حد کادمیوم واکنش‌های متابولیکی گیاهان به دلیل تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) آسیب می‌بیند (۸). تنش اکسیداتیو مرتبط با تولید بیش از حد ROS در برگ‌های گیاه می‌تواند منجر به کاهش فعالیت فتوسنتزی، آسیب به DNA و RNA، اکسیداسیون پروتئین‌ها و پراکسیداسیون لیپیدها شود (۹، ۱۰).

شهید و خالید (۶) اثر محلول‌پاشی سرب و آرسنیک را بر *Spinacia oleracea* بررسی کردند و نشان دادند که هر دو فلز به‌طور قابل توجهی رشد گیاه و محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی را کاهش می‌دهند، محلول‌پاشی سرب و آرسنیک باعث پراکسیداسیون لیپیدها و تولید بیش از حد گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) نشد. باین‌حال، هر دو فلز فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانسی را افزایش دادند. شیرخانی و همکاران (۱۱) نشان دادند که تیمار اسپری برگ‌ها با کادمیوم ویژگی‌های مرفولوژیکی و فیزیولوژیکی تاتوره را تحت تاثیر قرار می‌دهد. در پژوهش دیگر نشان داده شد که محلول‌پاشی کادمیوم به‌طور معنی‌داری زیست توده گندم و محصول دانه را کاهش می‌دهد (۱۲). در مطالعه‌ای که به‌وسیله چهرگانی و همکاران (۱۳) بر روی *Petunia hybrida* انجام گرفت نشان داده شد که کادمیوم مراحل نموی بساک و دانه‌های گرده را تحت تاثیر قرار داده و سبب بروز انواعی از ناهنجاری‌ها و کاهش توان زیستی دانه‌های گرده شده است. همچنین با بررسی الگوی پروتئینی گیاهان تحت تیمار مشخص شد که گیاه در پاسخ به تنش کادمیوم پروتئین‌های جدیدی را تولید کرده است.

درمنه خزری قرن‌ها در درمان تب و مالاریا مورد استفاده قرار گرفته است (۱۴). این گونه گیاهی منبع اسانس (۱/۴-۴ درصد) و مواد دیگر مانند لاکتون‌های سزکوئی‌ترین، فلاونوئیدها، پلی‌آلکین‌ها و کومارین است (۱۵). در درمان سایر بیماری‌های انگلی، برخی از عفونت‌های ویروسی و تومورهای مختلف نیز موثر است (۱۶).

باوجود پیشرفت قابل توجه در سال‌های اخیر در مورد جذب ریشه‌ای (۱۷، ۱۸)، داده‌های نسبتاً کمیابی در مورد جذب برگ‌ها فلزات وجود دارد. در حقیقت، جذب برگ‌ها و انباشتگی فلز در مطالعات اخیر مورد توجه قرار گرفته است (۱۹، ۲۰). از طرفی به دلیل کمبود اطلاعات کافی در مورد تاثیر منفی فلزات سنگین بر تکوین دانه‌ی گرده و تخمک گیاهان، مطالعه حاضر با هدف بررسی تاثیر تیمار برگ‌ها با کادمیوم بر فاکتورهای رشد، الگوی پروتئینی، خصوصیات فیزیولوژیک و ویژگی‌های تکوینی گل در درمنه خزری به‌عنوان یک گیاه دارویی مهم انجام گرفت.

## مواد و روش‌ها

بذر درمنه خزری (*Artemisia annua L.*) از مرکز ذخایر زیستی و ژنتیکی ایران تهیه شد. بذرها در سینی‌های حاوی کوکوپیت و پرلیت کشت داده شدند. دانه رست‌های در مرحله ۲ تا ۳ برگی و تا حد امکان هم‌اندازه و یک‌نواخت، عاری از هرگونه علائم بیماری، به‌گلدان منتقل شدند. کشت گلدانی در گلخانه با دمای  $25 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد با یک دوره نوری ۱۴ ساعته انجام شد. از چهار غلظت کلرید کادمیوم (۰، ۷۵، ۱۵۰ و ۲۲۵ میلی‌گرم در لیتر، به‌عنوان گروه‌های تیماری) به‌منظور محلول‌پاشی استفاده شد. محلول‌پاشی به‌صورت روزانه یک هفته بعد از انتقال به‌گلدان آغاز و تا بعد از گل‌دهی ادامه پیدا کرد. در مجموع حدود یک‌ونیم لیتر محلول برای هر بوته مورد استفاده قرار گرفت. نمونه‌گیری برگ در مرحله رشد زایشی و از برگ‌های چهارم و پنجم از راس صورت گرفت.

**سنجش کادمیوم در بافت گیاهی:** نمونه‌های برگ (برگ‌های چهارم و پنجم از راس) برداشت شده در مرحله زایشی با آب شیر و آب دیونیزه شسته شدند. نمونه‌های گیاهی در آن با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد تا به‌دست آوردن وزن ثابت خشک شد. پودر خشک گیاهی (۱ گرم) با اسیدنیتریک غلیظ به‌مدت یک ساعت در دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت سپس ۲/۶ میلی‌لیتر آب اکسیژنه ۲۰ درصد به آن اضافه شد پس از سرد شدن، محلول حاصل صاف و با آب مقطر به‌حجم ۵۰ میلی‌لیتر رسانده شد (۲۱). غلظت کادمیوم با دستگاه جذب اتمی (Varian Spectra AA 220FS) تعیین شد.

**اندازه‌گیری پارامترهای رشد:** وزن تر و خشک اندام هوایی و ارتفاع گیاه پس از دو ماه تیمار و در مرحله زایشی اندازه‌گیری شد. خشک نمودن نمونه‌ها در انکوباتور با دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت انجام گرفت.

**تعیین شاخص پایداری غشا سلول (MSI):** به‌منظور بررسی اثر کادمیوم بر غشا، شاخص پایداری غشا براساس میزان هدایت الکتریکی حاصل از نشت یون‌ها از سلول‌های برگ به‌درون آب دیونیزه اندازه‌گیری شد. ۰/۱ گرم برگ تازه در ۱۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه غوطه‌ور شد، سپس در حمام آب گرم در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد و پس از طی این زمان هدایت الکتریکی نمونه‌ها به‌کمک EC متر اندازه‌گیری شد. سری دوم نمونه‌ها در حمام آب گرم به‌مدت ۳۰ دقیقه و در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و پس از رسیدن به‌دمای اتاق، هدایت الکتریکی آن‌ها اندازه‌گیری شد. در نهایت اعداد حاصله در فرمول زیر جایگذاری و شاخص پایداری غشا سلول محاسبه شد (۲۲).

$$MSI = (1 - EC1/EC2) \times 100$$

EC1: هدایت الکتریکی نمونه‌های آزمایشی در زمان ۱۰ دقیقه

EC2: هدایت الکتریکی نمونه‌های آزمایشی در زمان ۳۰ دقیقه

**سنجش محتوای نسبی آب بافت (RWC):** کاهش محتوای نسبی آب بافت سبب کاهش پایداری غشا می‌شد. بدین منظور از آخرین برگ نمو یافته همه گروه‌های تیماری و شاهد برای سنجش محتوای نسبی آب بافت نمونه‌برداری صورت گرفت. وزن تر نمونه‌ها بلافاصله اندازه‌گیری و سپس تمامی نمونه‌ها در آب مقطر قرار گرفتند و به‌مدت ۲۴ ساعت در یخچال و در دمای چهار درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از ۲۴ ساعت، وزن اشباعی برگ‌ها اندازه‌گیری و برگ‌ها مجدداً به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد در آن قرار داده شدند و وزن خشک هر نمونه به‌دست آمد. با قرار دادن اعداد حاصل از توزین در فرمول زیر، مقدار نسبی آب بافت محاسبه شد (۲۳).

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

Wf: وزن تازه

Wd: وزن خشک

Wt: وزن اشباع

سنجش رنگیزه‌های فتوسنتزی: به‌منظور اندازه‌گیری میزان کلروفیل a و b، کلروفیل کل و کاروتنوئیدها از استون ۸۰ درصد استفاده شد. میزان جذب در طول موج‌های ۶۴۶/۸، ۶۶۳/۲ و ۴۷۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر (مدل II Biowave انگلستان) ثبت شد. میزان کلروفیل a، b، کلروفیل کل و کاروتنوئیدها در هر یک از نمونه‌ها با استفاده از فرمول‌های زیر بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر محاسبه شد (۲۴).

$$C_a = 12/25 A_{663/2} - 2/79 A_{646/8}$$

$$C_b = 21/5 \cdot A_{646/8} - 5/1 \cdot A_{663/2}$$

$$Tchl = C_a + C_b$$

$$C_{x+c} = (1000 \cdot A_{470} - 1/82 C_a - 852/0.2 C_b) / 198$$

$C_a$ : غلظت کلروفیل a

$C_b$ : غلظت کلروفیل b

Tchl: کلروفیل کل

$C_{x+c}$ : غلظت کاروتنوئیدها

**سنجش کربوهیدرات‌های محلول:** سنجش قندهای محلول با استفاده از روش فنل-اسیدسولفوریک انجام گرفت. ۰/۱ گرم از برگ خشک در ۱۰ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد ریخته شد و پس از یک هفته، ۰/۵ میلی‌لیتر از بخش رویی محلول برداشته و با آب مقطر به حجم ۲ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس به آن ۱ میلی‌لیتر فنل ۵ درصد اضافه و بعد از آن که خوب بهم زده شد ۵ میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ اضافه شد، حدود نیم ساعت پس از خنک شدن کامل محلول، جذب آن توسط اسپکتروفوتومتر در طول موج ۴۸۵ نانومتر خوانده شد. برای اندازه‌گیری مقدار قند از منحنی استاندارد تهیه شده از گلوکز استفاده شد (۲۵).

**سنجش کمی محتوای پروتئین کل و فعالیت آنزیمی:** برگ‌های تازه (۱ گرم) در ۵ میلی‌لیتر بافر فسفات (pH=۶) سائیده و همگن شدند. عصاره حاصل با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه، به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ (Sigma, 1-16 k; Germany) شد. مایع رویی برای تعیین میزان پروتئین کل و سنجش فعالیت آنزیم جداسازی شد.

**سنجش کمی محتوای پروتئین کل:** سنجش کمی پروتئین‌ها با استفاده از روش برادفورد انجام گرفت. معرف برادفورد (۵ میلی‌لیتر) به عصاره (۰/۱ میلی‌لیتر) تهیه شده در مرحله قبل اضافه و به سرعت ورتکس شد. جذب و غلظت نمونه‌ها پس از ۲۵ دقیقه در طول موج ۵۹۵ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (مدل Biowave II انگلستان) اندازه‌گیری شد. محتوای پروتئین کل بر اساس میلی‌گرم بر گرم وزن تر نمونه با استفاده از منحنی استاندارد سرم آلبومین گاوی (BSA) گزارش شد (۲۶).

**سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز:** فعالیت آنزیم پراکسیداز (POX) با استفاده از مخلوط واکنش حاوی ۰/۹۵ میلی‌لیتر بافر استات (۰/۱ مولار، pH=۴/۶)، ۱ میلی‌لیتر آب اکسیژنه (۱۶ میلی‌مولار)، ۱ میلی‌لیتر محلول گایاکول (۱۵ میلی‌مولار) و ۰/۰۵ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی تعیین شد. سپس، جذب نوری محلول در طول موج ۴۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر مورد ارزیابی قرار گرفت (۲۷).

**سنجش فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز:** فعالیت پلی‌فنل‌اکسیداز (PPO) براساس روش ریموند (۲۸) با افزایش جذب در طول موج ۴۳۰ نانومتر تعیین شد. مخلوط حاوی ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۲۰۰ میلی‌مولار (pH=۶/۸)، ۰/۲ میلی‌لیتر پیروگالول ۱۰ میلی‌مولار در حمام ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت سپس ۲۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی به مخلوط مورد نظر افزوده شد.

سرانجام، فعالیت آنزیمی برحسب واحد جذب در دقیقه به‌ازای هر میلی‌گرم پروتئین در گرم وزن تر نمونه محاسبه شد. **مطالعه پروتئین‌های بذر به‌روش الکتروفورز:** در پژوهش حاضر از الکتروفورز پروتئین‌های بذر روی ژل پلی‌اکریل‌آمید (۱۲ درصد) در حضور دودسیل سولفات استفاده شد. برای استخراج پروتئین بذر از بافر فسفات‌سدیم (pH=۷) به‌نسبت ۵: ۱ (W/V) استفاده شد. به‌منظور جلوگیری از فعالیت فنل‌اکسیدازها و اثرات سو آن‌ها در سنجش پروتئین از پلی‌وینیل پیرولیدین با وزن ملکولی ۴۰۰۰۰ بهره گرفته شد. عصاره پروتئینی استخراج شده با بافر نمونه به‌نسبت ۱ به ۳ مخلوط شد و در حمام آب گرم به‌مدت ۵ دقیقه حرارت داده شد. پس از اتمام الکتروفورز، رنگ‌آمیزی ژل با رنگ کوماسی برلیانت‌بلو R<sub>250</sub> صورت گرفت. برای انجام الکتروفورز از دستگاه الکتروفورز کمپانی (USA) Bio- Rad استفاده شد الکتروفورز با ولتاژ ثابت ۱۱۰ ولت انجام گرفت. پس از چند مرحله رنگ‌بری ژل، با استفاده از اسکنر از آن عکس تهیه و تغییرات باندها مورد مطالعه و مقایسه شد (۲۹).

#### مطالعه تک‌وین گامتوفیت نر و ماده:

برای مطالعات میکروسکوپی، گل‌آذین‌های درمنه خزری در اندازه‌های مختلف جدا و به‌مدت ۲۴ ساعت در FAA70 (فرمالدئید، اتانول و اسید استیک) تثبیت شدند سپس نمونه‌ها به اتانول ۷۰ درصد منتقل شده، در پارافین قالب‌گیری و با میکروتوم (دید سبز، ایران) با ضخامت ۶-۷ میکرومتر برش داده شدند. نمونه‌ها با استفاده از هماتوکسیلین-ئوزین رنگ‌آمیزی شدند (۳۰).

اسلایدهای تهیه شده با میکروسکوپ نوری (LABOMED مدل LX50، دوربین دیجیتال LABOMED مدل iVu 3100، ایتالیا) مورد بررسی دقیق و عکس‌برداری قرار گرفتند. حداقل ۲۰ گل‌آذین برای هر مرحله مورد مطالعه قرار گرفت و بهترین تصاویر انتخاب شدند.

#### آنالیز آماری

در این پژوهش، تمام محاسبات آماری با حداقل ۳ تکرار با استفاده از نرم‌افزار SAS (version 9.1) توسط آزمون مقایسه‌ای دانکن بر پایه طرح کاملاً تصادفی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

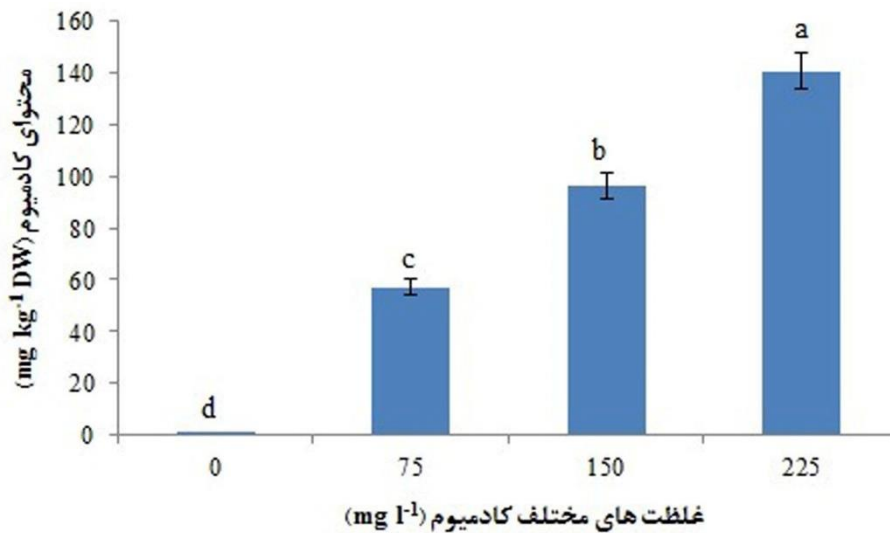
#### نتایج

##### سنجش کادمیوم در بافت گیاهی

نتایج نشان داد که میزان جذب کادمیوم توسط اندام‌های هوایی درمنه خزری در غلظت‌های مختلف کادمیوم تیماری در سطح احتمال (p ≤ ۰/۰۱) معنی‌دار بود. مقایسه میانگین‌ها نشان داد که مقدار جذب کادمیوم با افزایش غلظت کادمیوم تیماری افزایش یافته است. بیش‌ترین میزان کادمیوم جذب شده (۱۴۰/۶۰ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن خشک) در غلظت ۲۲۵ میلی‌گرم در لیتر کادمیوم مشاهده شد. بین مقادیر مختلف کادمیوم انباشته شده در اندام‌های هوایی گروه‌های مختلف اختلاف آماری معنی‌دار مشاهده شد (شکل ۱ و نمودار ۱).



شکل ۱: اثر غلظت‌های مختلف کادمیوم (۰، ۷۵، ۱۵۰ و ۲۲۵ میلی‌گرم در لیتر) بر رشد درمنه خزری



نمودار ۱: مقدار کادمیوم اندام‌های هوایی در گروه‌های مختلف تیماری کادمیوم (۰، ۷۵، ۱۵۰ و ۲۲۵ میلی‌گرم در لیتر). حروف متفاوت نمایان‌گر گروه‌های با تفاوت معنی‌دار است. # مقدار کمتر از ۰/۲ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن خشک. هر ستون معرف میانگین ۳ تکرار است.

### اثر کادمیوم بر پارامترهای رشد

جدول ۱ اثر تیمار کادمیوم بر وزن تر و خشک اندام هوایی و ارتفاع درمنه خزری را نشان می‌دهد. با افزایش غلظت کادمیوم تیماری، شاخص‌های اندازه‌گیری شده کاهش یافت. از نظر آماری کاهش در سطح احتمال (p ≤ ۰/۰۱) معنی‌دار بود. وزن تر و خشک اندام هوایی و ارتفاع گیاه در نمونه‌های تحت تیمار ۲۲۵ میلی‌گرم در لیتر کادمیوم به ترتیب به ۲۳/۳۲ گرم، ۱۲/۶۷ گرم و ۶۶ سانتی‌متر رسید. این مقادیر در نمونه‌های شاهد به ترتیب ۳۵/۶۰ گرم، ۲۴/۰۰ گرم و ۸۲/۵۰ سانتی‌متر بود.

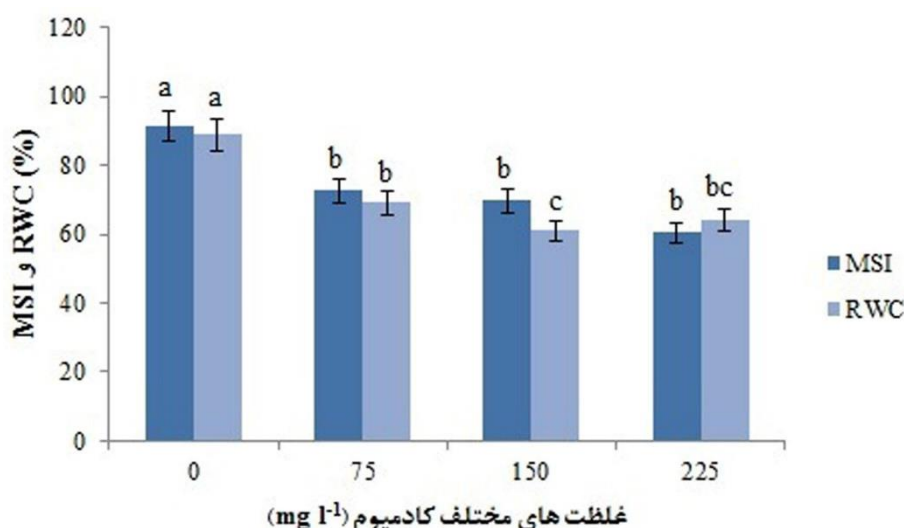
جدول ۱: اثر کادمیوم (تیمار اسپری برگی) بر پارامترهای رشد در درمنه خزری.

ارتفاع (cm)	وزن خشک اندام هوایی (g)	وزن تر اندام هوایی (g)	کادمیوم (mg l <sup>-1</sup> )
۸۲/۵۰±۴/۱۰b	۲۴/۰۰±۲/۵۱a	۳۵/۶۰±۲/۰۴a	۰
۱۱۳/۶۶±۴/۳۳a	۱۷/۶۷±۱/۸۴b	۲۷/۶۰±۱/۴۰b	۷۵
۶۷/۵±۳/۳۵c	۱۷/۰۰±۱/۵۲bc	۲۴/۱۷±۱/۶۴b	۱۵۰
۶۶/۰۰±۲/۰۸c	۱۲/۶۷±۱/۴۵c	۲۳/۳۲±۱/۸۹b	۲۲۵

هر داده معرف میانگین سه تکرار ± خطای استاندارد است. حروف متفاوت بیان‌گر اختلاف آماری معنی‌دار است.

### اثر کادمیوم بر محتوای نسبی آب بافت و شاخص پایداری غشا

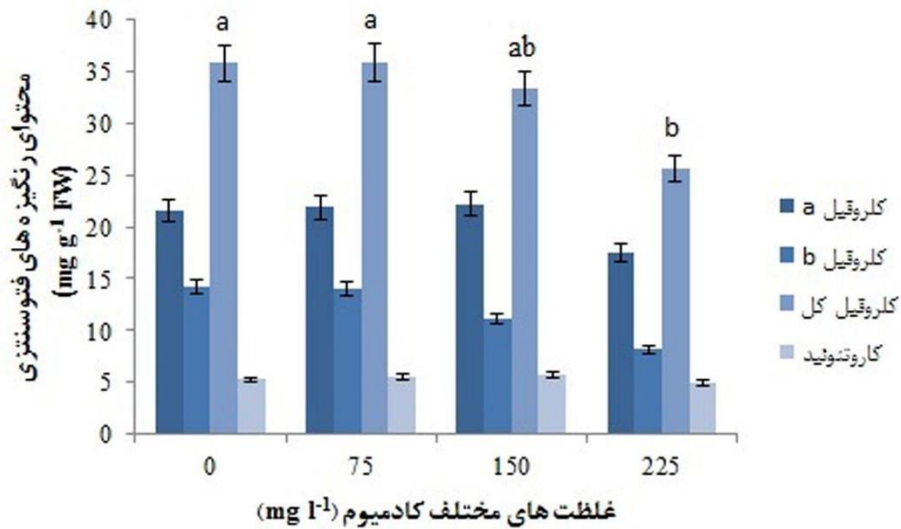
آنالیز داده‌های به‌دست آمده از RWC و MSI درمنه خزری نشان داد که محتوای نسبی آب بافت و شاخص پایداری غشا تحت تیمار کادمیوم در سطح احتمال (p≤۰/۰۱) کاهش معنی‌دار یافت. محتوای نسبی آب بافت و شاخص پایداری غشا در نمونه‌های تحت تیمار ۲۲۵ میلی‌گرم در لیتر کادمیوم به ترتیب به میزان ۲۴ و ۳۱ درصد نسبت به نمونه‌های شاهد کاهش یافت (نمودار ۲).



نمودار ۲: شاخص پایداری غشا (MSI) و محتوای نسبی آب بافت (RWC) تحت تاثیر غلظت‌های مختلف کادمیوم (۰، ۷۵، ۱۵۰ و ۲۲۵ میلی‌گرم در لیتر). حروف متفاوت نمایان‌گر گروه‌های با تفاوت معنی‌دار است. هر ستون معرف میانگین ۳ تکرار است.

### اثر کادمیوم بر رنگیزه‌های فتوسنتزی

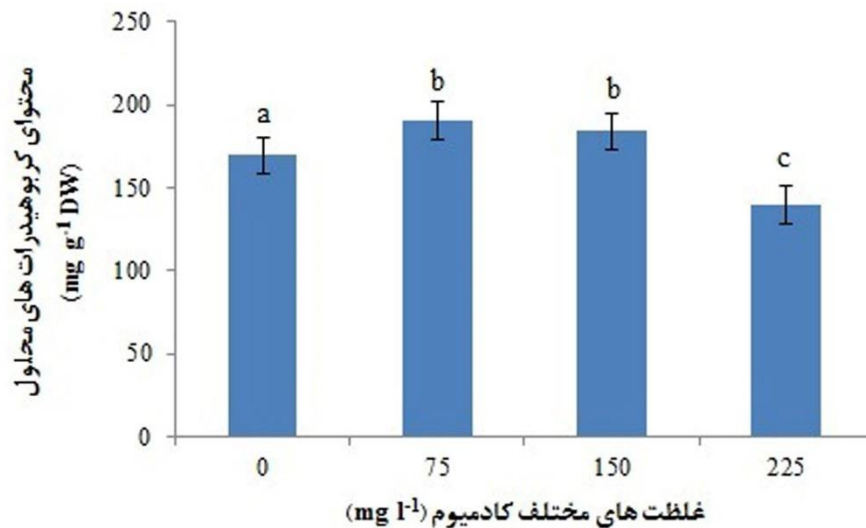
آنالیز داده‌ها نشان داد که فقط محتوای کلروفیل کل تحت تاثیر غلظت‌های مختلف کادمیوم قرار گرفت (p≤۰/۰۱). محتوای کلروفیل کل از ۳۵/۸۰ میلی‌گرم در گرم نمونه شاهد به ۲۵/۶۴ در نمونه تحت تیمار ۲۲۵ میلی‌گرم در لیتر کادمیوم کاهش یافت (نمودار ۳).



نمودار ۳: محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی تحت تاثیر غلظت‌های مختلف کادمیوم (۰، ۷۵، ۱۵۰ و ۲۲۵ میلی‌گرم در لیتر). حروف متفاوت نمایان‌گر گروه‌های با تفاوت معنی‌دار است. هر ستون معرف میانگین ۳ تکرار است. ستون‌های فاقد حروف نشان‌دهنده بی‌اثر بودن فاکتور مورد نظر بر صفت اندازه‌گیری شده هستند.

#### اثر کادمیوم بر محتوای کربوهیدرات‌های محلول

بررسی آنالیز داده‌ها نشان داد که اثر کادمیوم بر محتوای کربوهیدرات‌های محلول در سطح احتمال (p ≤ ۰/۰۱) معنی‌دار بود. محتوای کربوهیدرات‌های محلول در نمونه شاهد ۱۸۳/۷۳ میلی‌گرم در گرم وزن تر و در نمونه تحت تیمار ۲۲۵، ۱۳۹/۲۵ میلی‌گرم در گرم وزن تر بود (نمودار ۴).

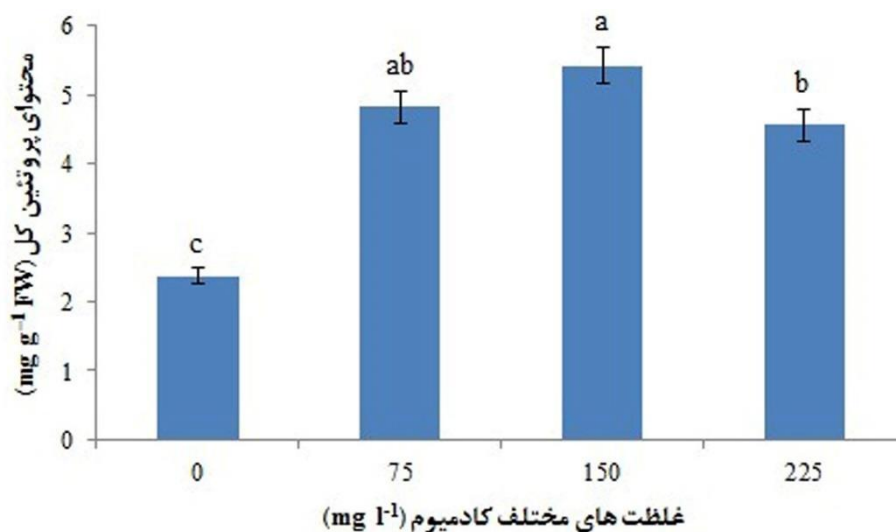


نمودار ۴: محتوای کربوهیدرات‌های محلول تحت تاثیر غلظت‌های مختلف کادمیوم (۰، ۷۵، ۱۵۰ و ۲۲۵ میلی‌گرم در لیتر). حروف متفاوت نمایان‌گر گروه‌های با تفاوت معنی‌دار است. هر ستون معرف میانگین ۳ تکرار است.

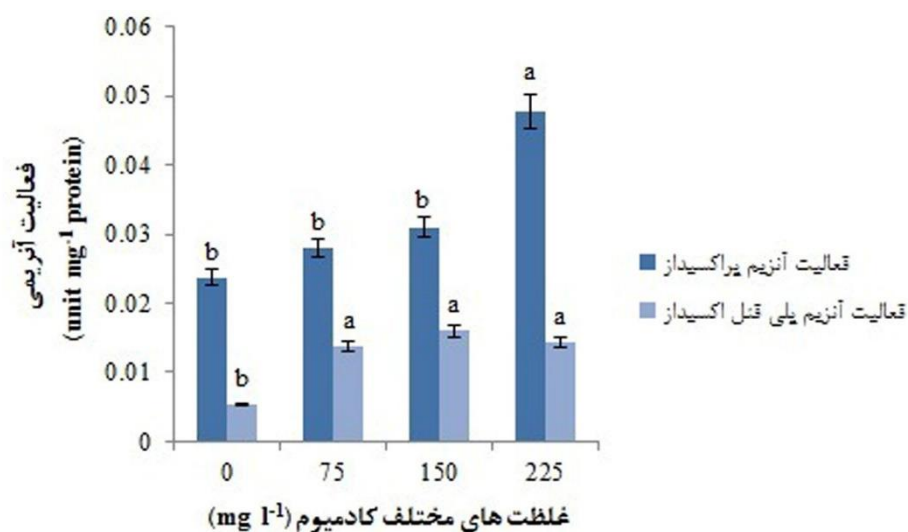


## اثر کادمیوم بر محتوای پروتئین کل و فعالیت آنزیمی

تیمار با کادمیوم موجب افزایش معنی‌دار پروتئین کل در سطح احتمال ( $p \leq 0.01$ ) و افزایش در فعالیت آنزیم پراکسیداز و پلی‌فنل اکسیداز در سطح احتمال ( $p \leq 0.05$ ) شد. محتوای پروتئین کل در نمونه تحت تیمار ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر کادمیوم ۲/۲۹ برابر نسبت به نمونه شاهد افزایش یافت. بیش‌ترین فعالیت آنزیم پراکسیداز و پلی‌فنل اکسیداز در نمونه تحت تیمار ۲۲۵ و ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر کادمیوم به‌ترتیب به‌میزان ۰/۰۴۸ و ۰/۰۱۶ واحد جذب در دقیقه به‌ازای هر میلی‌گرم پروتئین مشاهده شد. کم‌ترین فعالیت آنزیم پراکسیداز و پلی‌فنل اکسیداز در نمونه‌های شاهد به‌ترتیب به‌میزان ۰/۰۲۳ و ۰/۰۰۵ واحد جذب در دقیقه به‌ازای هر میلی‌گرم پروتئین گزارش شد (نمودارهای ۵ و ۶).



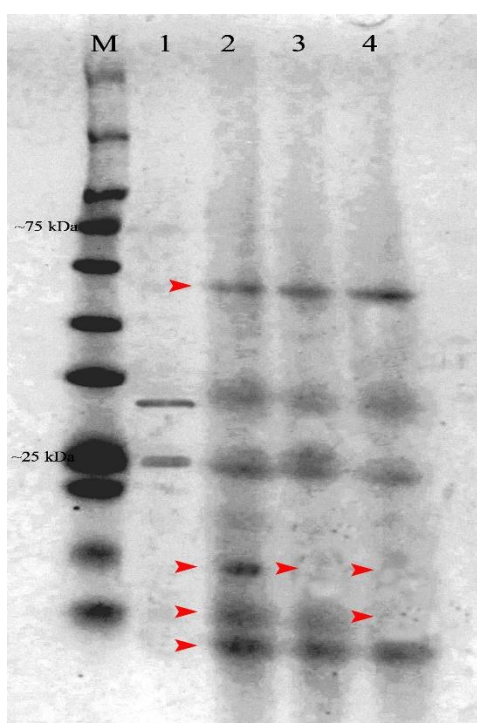
نمودار ۵: محتوای پروتئین کل تحت تاثیر غلظت‌های مختلف کادمیوم (۰، ۷۵، ۱۵۰ و ۲۲۵ میلی‌گرم در لیتر). حروف متفاوت نمایان‌گر گروه‌های با تفاوت معنی‌دار است. هر ستون معرف میانگین ۳ تکرار است.



نمودار ۶: فعالیت آنزیم پراکسیداز و پلی‌فنل اکسیداز تحت تاثیر غلظت‌های مختلف کادمیوم (۰، ۷۵، ۱۵۰ و ۲۲۵ میلی‌گرم در لیتر). حروف متفاوت نمایان‌گر گروه‌های با تفاوت معنی‌دار است. هر ستون معرف میانگین ۳ تکرار است.

## اثر کادمیوم بر الگوی پروتئین بذر

نیمرخ پروتئینی بذرهای درمنه خزری تحت تیمار اسپری برگی و نمونه‌های شاهد مورد مطالعه و مقایسه قرار گرفت. نتایج نشان داد که در نمونه‌های تیمار شده با کادمیوم باندهای پروتئینی وجود دارد که در نیمرخ پروتئینی نمونه شاهد مشاهده نشد و هم‌چنین تراکم و غلظت باندهای پروتئینی در نمونه‌های تیماری ۷۵ و ۱۵۰ بیش‌تر از باندهای نمونه شاهد بود. در گروه تیماری ۲۲۵ کاهش غلظت و تراکم این باندها مشاهده شد (شکل ۲).

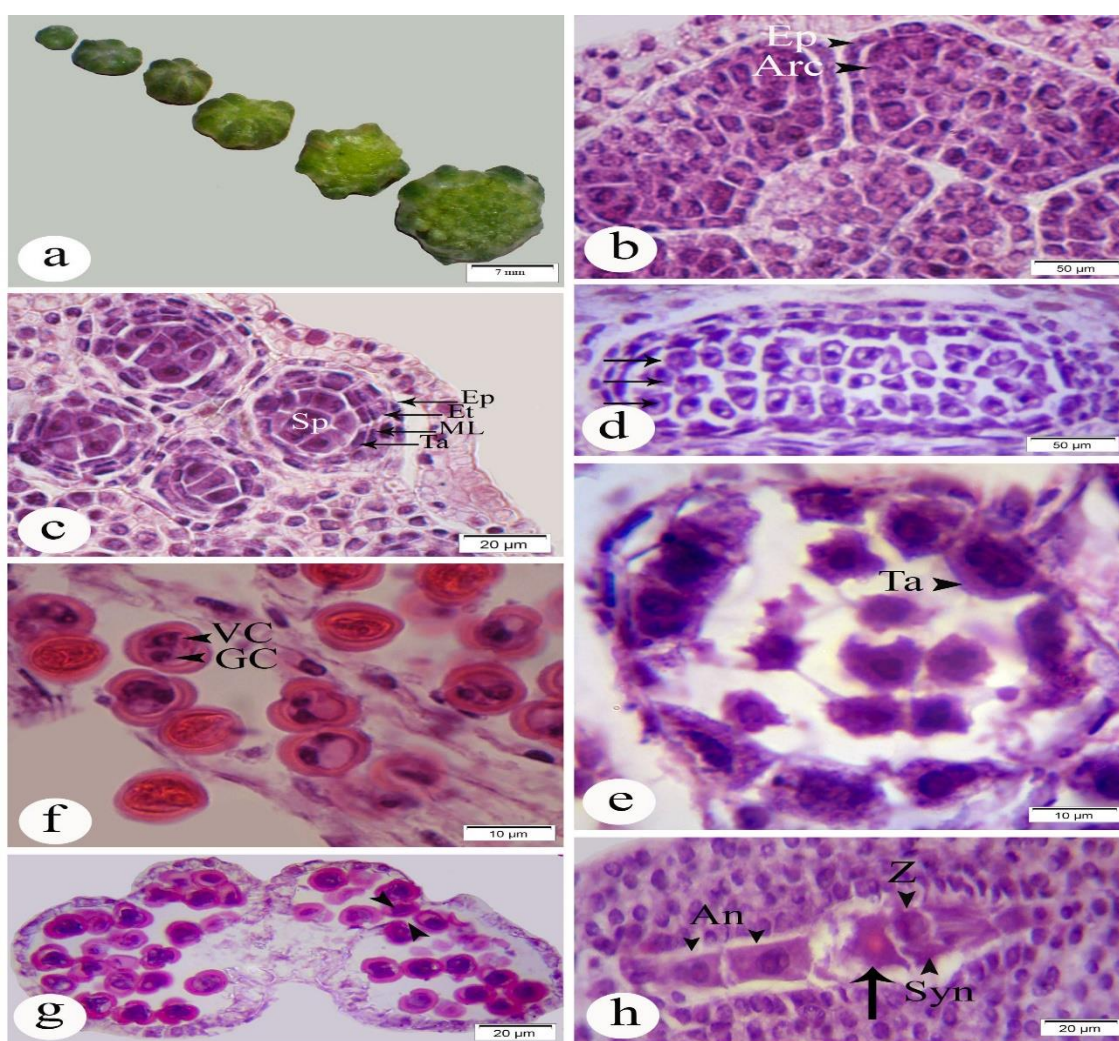


شکل ۲: مقایسه نیمرخ الکتروفورزی پروتئین‌های بذر در گروه شاهد و تحت تیمار غلظت‌های مختلف کادمیوم. M: مارکر پروتئینی، ۱، ۲، ۳ و ۴ به ترتیب باندهای پروتئینی بذرهای گروه شاهد، تحت تیمار ۷۵، ۱۵۰، ۲۲۵ میلی‌گرم در لیتر کادمیوم. پیکان‌ها اختلاف در باندهای پروتئینی بین گروه‌های تیماری و نمونه شاهد را نشان می‌دهند.

## اثر تیمار کادمیوم بر تکوین گامتوفیت نر و ماده

برای مطالعات میکروسکوپی، گل‌آذین‌های درمنه خزری در اندازه‌های مختلف استفاده شد (شکل ۳ a). پرچم‌ها دارای بساک‌های متشکل از چهار خانه و bitechal می‌باشند (شکل ۳ b و c). در مراحل اولیه نمو بساک در زیر اپی‌درم یاخته‌های آرکئوسپوری تمایز پیدا می‌کند (شکل ۳ a). تقسیمات آرکئوسپور باعث ایجاد دیواره بساک و بافت هاگزا می‌شود (شکل ۳ c). دیواره بساک از بیرون به درون شامل اپی‌درم، لایه میانی، لایه مکانیکی و لایه تاپی است (شکل ۳ c). میکروسپوروسیت‌ها با سیتوپلاسم متراکم، هسته‌های بزرگ و متمایز از سلول‌های بافت اطراف مشخص می‌شوند. با شروع میوز، در اطراف میکروسپوروسیت‌ها کالوز شروع به تشکیل می‌کند که در تصاویر میکروسکوپی تهیه شده به صورت یک لایه ضخیم و شفاف در اطراف میکروسپوروسیت‌ها قابل رویت است (شکل ۳ d). پس از انجام میوز میکروسپورهای جوان آزاد می‌شوند (شکل ۳ e). پس از بزرگ شدن میکروسپور، با انجام تقسیم میتوز، یک گامتوفیت نر دو سلولی تشکیل می‌شود که شامل یک سلول زایشی کوچک‌تر و یک سلول رویشی بزرگ‌تر است (شکل ۳ f). دانه‌های گرده در این گونه از نوع دو سلولی است. در مرحله بلوغ دانه

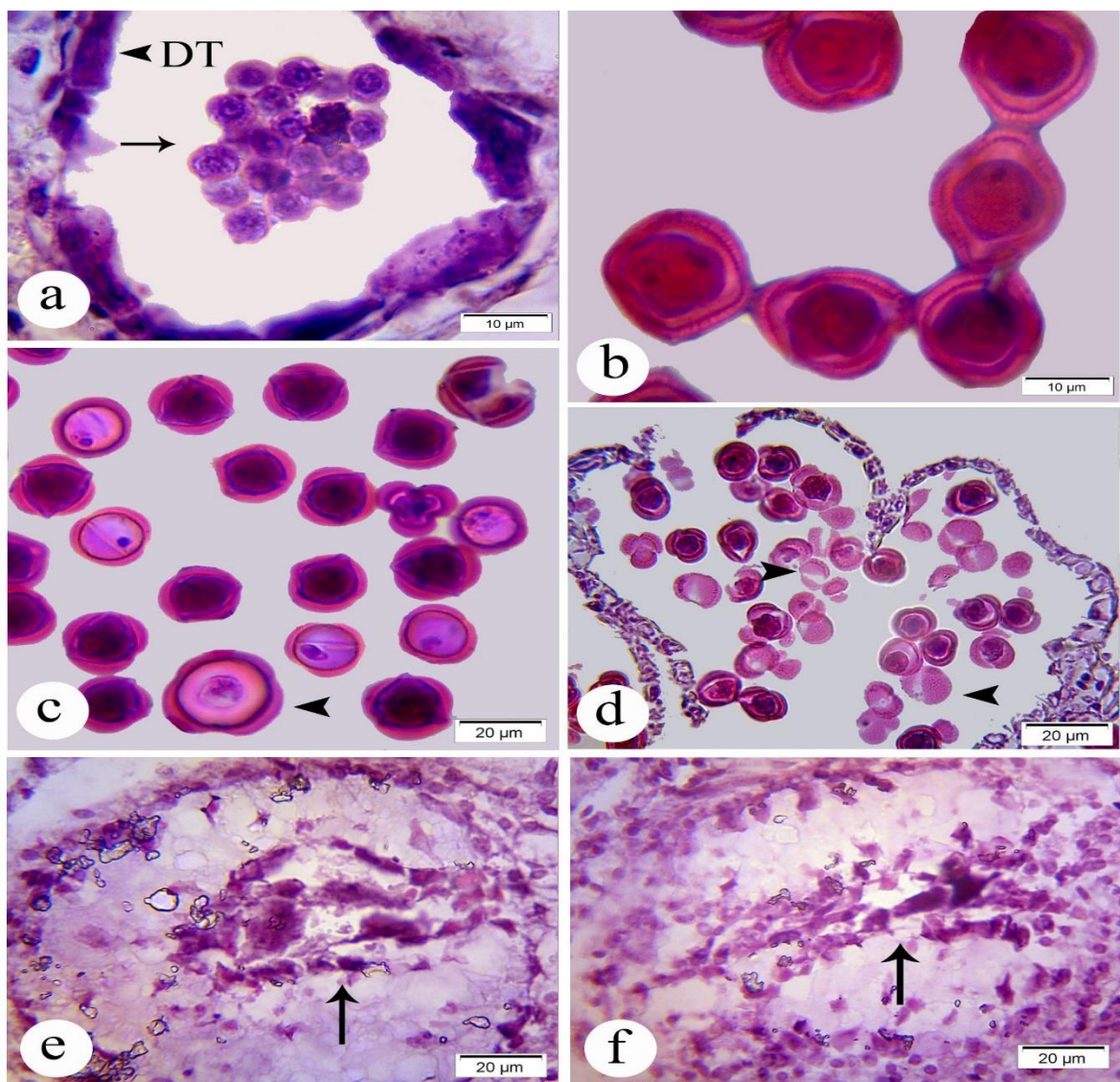
گرده، لایه مکانیکی هم‌چنان به‌رشد و ضخیم شدن خود ادامه می‌دهد. در نهایت سلول‌های لایه مکانیکی می‌میرند و با پاره شدن این لایه، شکوفایی بساک رخ داده و دانه‌های گرده می‌توانند پراکنده شوند (شکل ۳ g). در درمنه خزری تخمدان تک برچه‌ای، تک‌خانه، با جفت قاعده‌ای و یک تخمک است. تشکیل پوسته تخمک در قاعده خورش آغاز می‌شود. تخمک از نوع واژگون و تک‌پوسته‌ای است. تیپ کیسه رویانی از نوع پلی‌گونوم می‌باشد (شکل ۳ h). سه یاخته در قطب مجاور میکروپیلی دستگاه تخم‌زا را ایجاد می‌کند که شامل یک یاخته میانی (تخم‌زا) و دو یاخته کناری سینرژیدها (قرینه‌ها) است. در قطب شالازی یاخته‌های آنتی‌پود به‌وجود می‌آیند (شکل ۳ h). دو هسته قطبی جدا شده از قطب‌های میکروپیلی و شالازی در قسمت مرکزی کیسه رویانی قرار می‌گیرند و تشکیل یاخته مرکزی را می‌دهند. بعد از لقاح، یاخته تخم در قطب میکروپیلی شکل می‌گیرد (شکل ۳ h). بعد از ادغام یاخته مرکزی با گامت نر یاخته مرکزی به تخم ضمیمه (شکل ۳ h) تبدیل می‌شود که به اندوسپرم تکوین می‌یابد لقاح یاخته مرکزی مقدم بر یاخته تخم‌زا بود.



شکل ۳: تکوین دانه گرده و گامتوفیت ماده در درمنه خزری شاهد. (a) گل‌آذین‌های انتخاب شده در اندازه‌های مختلف جهت مطالعات تکوینی؛ (b) برش عرضی بساک جوان نشان‌دهنده مراحل اولیه نمو بساک و تمایز یاخته‌های آرکتوسپوری در زیر اپی‌درم؛ (c) برش عرضی بساک جوان نشان‌دهنده بافت هاگ‌زا و دیواره بساک شامل اپی‌درم، لایه میانی و مغزی؛ (d) برش طولی بساک نشان‌دهنده سلول‌های مادر گرده؛ (e) برش عرضی بساک در مرحله میکروسپوره‌ای (گرده‌های جوان)؛ (f) دانه‌ی گرده بالغ دو سلولی؛ (g) برش عرضی بساک بالغ نشان‌دهنده سلول‌های تایی تجزیه شده؛ (h) کیسه رویانی بالغ، هسته‌های مرکزی لقاح یافته (↑)، یکی از سینرژیدها از بین‌رفته تخم‌زا نیز لقاح یافته است، آنتی‌پودهای چند هسته‌ای و پلی‌پلوئیدی نیز مشخص هستند.

اختصارات: An، آنتی‌پود؛ Arc، آرکتوسپور؛ Ep، اپی‌درم؛ Et، لایه مکانیکی؛ GC، سلول زایشی؛ ML، لایه میانی؛ Sp، بافت هاگ‌زا؛ Syn، سینرژید؛ Ta، لایه مغزی؛ VC، سلول رویشی؛ Z، زیگوت.

در بررسی‌های میکروسکوپی دانه‌های گرده گروه‌های تیماری، چسبیدگی و استقرار توده‌ای میکروسپورهای جوان (شکل ۴ a)، چسبیدگی دانه‌های گرده (شکل ۴ b)، افزایش غیرطبیعی اندازه (شکل ۴ c و d) و از بین رفتن هسته و سیتوپلاسم دانه‌های گرده (شکل ۴ d) مشاهده شد. شمارش دانه‌های گرده شکسته در نمونه‌های تحت تیمار کادمیوم و شاهد افزایش ۲۰ درصدی شکستگی دانه‌های گرده (شکل ۴ c و d) را نشان داد. نمونه‌های تحت تیمار افزایش ۴۰ درصدی تخریب و تحلیل سلول‌های کیسه رویانی را نشان دادند (شکل ۴ e و f). این تخریب و تحلیل به‌گونه‌ای است که کیسه رویانی قادر به تکمیل مراحل تکوینی نیست.



شکل ۴: اثر تیمار کادمیوم بر تکوین دانه‌ی گرده و تخمک درمنه خزری. (a) چسبیدگی و استقرار توده‌ای میکروسپورهای جوان؛ (b) چسبیدگی دانه‌های گرده؛ (c) و (d) افزایش غیرطبیعی اندازه، از بین رفتن هسته و سیتوپلاسم دانه‌های گرده و شکستگی دانه‌های گرده؛ (e) و (f) تخریب و تحلیل سلول‌های کیسه رویانی. اختصارات: DT، لایه مغزی تجزیه شده.

## بحث

در طول سال‌های گذشته، کیفیت جو زمین توسط آلاینده‌های مختلف، از جمله فلزات سنگین تحت تاثیر قرار گرفته است. وجود مقادیر بالای فلزات سنگین در محیط به دلیل سمیت بالا، پایداری و عدم تجزیه تهدیدی بالقوه برای محیط زیست است. (۱). نتایج این مطالعه نشان داد که غلظت کادمیوم در اندام‌های هوایی با افزایش غلظت کادمیوم تیماری افزایش یافته است. نتایج مطالعات مجد و قناتی (۳۱) نشان داد که با افزایش غلظت کادمیوم تیماری تا ۴۰ میلی‌گرم در لیتر، میزان کادمیوم انباشته شده در اندام‌های هوایی گندم افزایش یافته است. نتایج به‌دست آمده از این مطالعه در راستای نتایج پژوهش فوق است.

محلول کادمیوم اسپری شده به‌سطح برگ، ساقه و گل به‌احتمال زیاد از طریق قسمت‌های آپوپلاستی و سیم‌پلاستی این اجزا جذب می‌شود. با این حال، مکانیسم دقیق جذب کادمیوم محلول‌پاشی شده به‌برگ یا سایر اجزای اندام‌های هوایی در پژوهش‌ها به‌اندازه کافی مورد مطالعه قرار نگرفته است (۱۲). تبادل یونی یا انتشار یون ممکن است در این فرایند نقش داشته باشد، همان‌طور که نشان داده شده است چنین مکانیزمی در جذب فلز روی توسط برگ در گندم (۳۲) و در تنش شوری در انگور (۳۳) دخالت دارد. جذب کادمیوم از طریق ناقلین یونی بر روی غشای پلاسمایی سلول‌های اپیدرم نیز ممکن است به‌جذب کادمیوم توسط سلول‌های برگ کمک کند، همان‌گونه که برای جذب کادمیوم توسط ریشه نشان داده شده است (۳۴). جذب برگ‌گی فلزات سنگین با توجه به زاویه شیب برگ، تراکم شاخه و هم‌چنین عواملی مانند پارامترهای ریخت‌شناختی و تشریحی پهنک برگ متفاوت است (۳۶). در میان عوامل مختلف، اندازه و تراکم روزه‌ها و سطح برگ مهم‌ترین عوامل کنترل‌کننده میزان جذب فلزات سنگین هستند (۳۷).

قرار گرفتن گیاهان در معرض فلزات سنگین ممکن است منجر به اثرات سمی بر فاکتورهای رشد مانند کاهش ارتفاع گیاه، طول ریشه، وزن تر و وزن خشک شود، اگرچه میزان این تاثیرات به گونه گیاهی، ژنوتیپ و هم‌چنین بافت گیاهی بستگی دارد. صفات رشد، به‌عنوان پارامترهای بسیار حساسی در نظر گرفته می‌شوند که شاخصی برای اندازه‌گیری پاسخ گیاهان در برابر سمیت فلزات است (۳۸، ۳۹). در مطالعه حاضر وزن تر و خشک اندام هوایی و ارتفاع گیاه به‌طور معنی‌داری در پاسخ به کادمیوم کاهش یافتند. کاهش در پارامترهای رشد در مطالعات بر روی ارقام *Cicer arietinum* L. در اثر تیمار کادمیوم (۴۰) و در *P. hybrida* تحت تیمار سرب (۴۱) نیز گزارش شده است. قرار گرفتن گیاهان در معرض غلظت بالای فلزات سنگین به‌طور کلی با اثرات سمی همراه است (۴۲). نتایج به‌دست آمده با گزارش‌های فوق هم‌سو است. مشخص شده است که کادمیوم با ایجاد اختلال در فرایندهایی نظیر فتوسنتز، تنفس و متابولیسم نیتروژن منجر به کاهش رشد و تولید زیست توده کمتر در گیاه می‌شود (۴۳).

مطالعه حاضر نشان داد که کاربرد کادمیوم سبب کاهش محتوای نسبی آب بافت و پایداری غشا شده است. فلزات سنگین بر تحویل آب به‌اندام‌های هوایی به‌دلیل ممانعت از تعرق تاثیر می‌گذارند. تعرق به‌دلیل کاهش اندازه و ضخامت برگ‌ها، کاهش فضاها بین سلولی، کاهش تراکم روزه‌ها و کاهش اندازه منافذ روزه‌ای کاهش می‌یابد. بسته شدن روزه‌ها در اثر برهم‌کنش مستقیم فلزات سمی با سلول‌های نگهبان و یا در نتیجه اثرات اولیه سمیت فلزات بر ریشه‌ها و ساقه‌ها ایجاد می‌شود. در گیاهان تحت تنش فلزات، سیگنال‌های آبسزیک اسید ممکن است در حرکت روزه‌ای نقش داشته باشند (۴۴).

زایر و همکاران (۴۵) گزارش دادند که محتوای آب *Brassica juncea* تحت سمیت سرب به‌شدت کاهش می‌یابد، حتی در این گونه که به‌عنوان یک گونه متحمل در نظر گرفته می‌شود. کاهش معنی‌دار در محتوای آب بافت *Tillandsia albida* در اثر محلول‌پاشی کادمیوم نیز گزارش شده است (۴۶). کادمیوم هم‌چنین باعث تغییرات در عمل‌کرد غشا با ایجاد تغییرات در ترکیبات لیپیدی و ترکیب اسید چرب آن‌ها می‌شود (۴۷). این مطالعات هم‌سو با نتایج مطالعه حاضر می‌باشند.

کاربرد کادمیوم سبب کاهش محتوای کلروفیل کل و محتوای کربوهیدرات‌های محلول شد. کوواچیک (۴۶) گزارش داد که محلول‌پاشی کادمیوم و نیکل در *T. albida* باعث کاهش قندها، کلروفیل a، کلروفیل b و کاروتنوئیدها می‌شود. هم‌چنین کاهش در محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی تحت تاثیر آرسنیک و سرب در *S. oleracea* (۶) و تحت تاثیر جیوه در توتون (۴۸) مشاهده شد. این نتایج تاییدکننده‌ی نتایج پژوهش حاضر است.

کاهش محتوای کلروفیل تحت تنش فلزات سنگین ممکن است نتیجه مهار آنزیم‌های مسئول بیوسنتز کلروفیل باشد. مشخص شده است که کادمیوم بر بیوسنتز کلروفیل تاثیر می‌گذارد و از سنتز پروتوکلوروفیل ردوکتاز و آمینولولینیک اسید ممانعت به‌عمل می‌آورد (۴۹). متابولیسم کربن می‌تواند با کاربرد فلزات سنگین به‌دلیل برهم‌کنش آن‌ها با مرکز واکنش ریبولوزبیس‌فسفات کربوکسیلاز تحت تاثیر قرار بگیرد (۵۰).

براساس نتایج به‌دست آمده، تیمار کادمیوم محتوای پروتئین کل، فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و پلی‌فنل‌اکسیداز را به‌طور معنی‌داری افزایش داد. مطالعات نشان می‌دهد که تولید بیش از حد ROS در گیاهان از طریق واکنش‌های هابر-ویس یکی از اولین و متداول‌ترین پدیده‌ها در اثر قرار گرفتن در معرض فلزات سنگین است (۹، ۱۰، ۵۱، ۵۲).

در شرایط تنش فلزات سنگین، گیاهان تعدادی از استراتژی‌ها را برای زنده ماندن از اثرات سمی فلزات به‌کار می‌گیرند. باین‌حال، اطلاعات بسیار کمی در مورد فعال‌سازی مکانیسم دفاعی پس از جذب برگی در دسترس است. مطالعات نشان داده است که گیاهان از طریق سنتز اسیدهای آلی و آمینه، گلوکاتینون یا ترکیبات باندشونده به‌فلزات سنگین مانند پلاستوکینون‌ها و متالوتیونین‌ها، ذخیره‌سازی درون واکوئل‌ها و فعال‌سازی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت، سطح بالایی از فلزات سنگین را تحمل می‌کنند (۱۷، ۵۳).

تولید بیش از حد ROS و افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی در *T. albida* تحت محلول‌پاشی نیکل و کادمیوم گزارش شده است. این مطالعه نشان داد که استفاده از تیمار اسپری برگی ممکن است منجر به تولید ROS و فعال‌سازی مکانیسم دفاعی شود (۴۶).

مطالعات گذشته نشان داد که کادمیوم می‌تواند بر روی پروتئین‌های مربوط به پاسخ‌های تنشی در *Populus nigra* تاثیر بگذارد (۵۴). مشخص شده است که پروتئین‌ها به‌طور مستقیم در واکنش به‌تنش‌های گیاهی شرکت می‌کنند و سازگاری گیاه به‌تنش فلزات سنگین با تغییرات پروتئینی مهم همراه است. تحقیقات، افزایش در میزان پروتئین در پاسخ به تیمار کادمیوم در *Glycine max* و *Vigna radiata* را نشان داد (۵۵، ۵۶).

در مطالعه‌ی نیم‌رخ الکتروفورزی بذرهای گروه‌های مختلف، بین گروه شاهد و گروه‌های تیمار اختلاف مشاهده شد. طبق نتایج مشاهده شده می‌توان چنین نتیجه گرفت که تنش کادمیوم منجر به افزایش سنتز پروتئین‌های طبیعی گیاه شده است که کلیه این تغییرات می‌تواند نوعی مقاوم‌سازی گیاه در برابر تنش‌های محیطی باشد و سبب حفظ سلامت دانه در برابر اثر سمی کادمیوم شود. نتایج مشابهی در مورد اثر آلاینده‌های محیطی بر الگوی پروتئینی بذر *Phaseolus vulgaris* و دانه گرده *Spartium junceum* و *P. hybrida* که با تولید پروتئین‌های سم‌زدا همراه بوده، گزارش شده است (۵۷) که با نتایج پژوهش حاضر هم‌سو است. مطالعه تکوین گل در گیاهان درمنه خزری تحت تیمار کادمیوم اختلافاتی را نشان داد. آلودگی‌های فلزات سنگین اثرات مشابه سایر آلاینده‌های محیطی دارند و برخی از ناهنجاری‌ها را در مراحل رویان‌شناختی ایجاد می‌کنند (۵۸). مطالعات اندکی در این زمینه انجام گرفته است (۱۳، ۵۹، ۶۰). تکوین تخمک برای تولیدمثل گیاه بسیار مهم است، به‌طوری‌که هرگونه ناهنجاری می‌تواند باعث کاهش تولید بذر و بقای گیاه شود (۶۱). تخریب و تحلیل سلول‌های کیسه رویانی در برخی مطالعات گذشته نیز گزارش شده است (۶۲، ۶۳). تاثیر فلزات سنگین بر پایداری غشا سلولی می‌تواند دلیل بسیاری از این ناهنجاری‌ها از جمله کاهش زیست‌پذیری دانه‌های گرده باشد (۶۴).

### نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر نشان داد که درمنه خزری مقاومت بالایی نسبت به تنش کادمیوم دارد و با وجود عدم نیاز قادر به جذب کادمیوم است و می‌تواند تحت غلظت‌های بالای کادمیوم زنده بماند که با تغییرات در ویژگی‌های رشد، خصوصیات فیزیولوژیکی و الگوی پروتئینی همراه بود. نتایج بیان‌گر آن است که ساختارهای زایشی نر و ماده در درمنه خزری از نظر حساسیت به تنش کادمیوم متفاوت هستند. اثر تخریبی کادمیوم در اندام زایشی ماده نسبت به اندام زایشی نر به مراتب بیش‌تر بود.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان مراتب قدردانی خود را از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه بوعلی سینا اعلام می‌دارند.

### منابع

1. Goix S, Lévêque T, Xiong T-T, Schreck E, et al. Environmental and health impacts of fine and ultrafine metallic particles: assessment of threat scores. *Environmental research*. 2014; 133: 185-94.
2. Shahid M, Khalid S, Abbas G, Shahid N, et al. Heavy metal stress and crop productivity. *Crop production and global environmental issues*. 2015; 1-25.
3. Moreno-Jiménez E, Manzano R, Esteban E, Peñalosa J. The fate of arsenic in soils adjacent to an old mine site (Bustarviejo, Spain): mobility and transfer to native flora. *Journal of Soils and Sediments*. 2010; 10(2): 301-12.
4. Xiong T, Dumat C, Dappe V, Vezin H, et al. Copper oxide nanoparticle foliar uptake, phytotoxicity, and consequences for sustainable urban agriculture. *Environmental Science & Technology*. 2017; 51(9): 5242-51.
5. Song J, Zhang H, Duan C, Cui X. Exogenous application of succinic acid enhances tolerance of *Larix olgensis* seedling to lead stress. *Journal of Forestry Research*. 2018; 29(6): 1497-505.
6. Shahid M, Khalid S. Foliar application of lead and arsenic solutions to *Spinacia oleracea*: biophysicochemical analysis and risk assessment. *Environmental Science and Pollution Research*. 2020; 27: 39763–39773.
7. Schreck E, Foucault Y, Sarret G, Sobanska S, et al. Metal and metalloid foliar uptake by various plant species exposed to atmospheric industrial fallout: mechanisms involved for lead. *Science of the Total Environment*. 2012; 427: 253-62.
8. Nazar R, Iqbal N, Masood A, Khan MIR, et al. Cadmium toxicity in plants and role of mineral nutrients in its alleviation. 2012; 3(10): 1476-1489.
9. Abbas G, Murtaza B, Bibi I, Shahid M, et al. Arsenic uptake, toxicity, detoxification, and speciation in plants: physiological, biochemical, and molecular aspects. *International journal of environmental research and public health*. 2018; 15(1): 59.
10. Shahid M, Shamsad S, Farooq ABU, Rafiq M, et al. Comparative effect of organic amendments on physio-biochemical traits of young and old bean leaves grown under

- cadmium stress: a multivariate analysis. *Environmental Science and Pollution Research*. 2019; 26(12): 11579-90.
11. Shirkhani Z, Chehregani Rad A, Gholami M, Mohsenzadeh F. Morphological and physiological responses of *Datura stramonium* L. to cadmium toxicity. *Journal of Plant Process and Function*. 2019; 8(32): 121-36.
  12. Li L, Zhang Y, Ippolito JA, Xing W, et al. Cadmium foliar application affects wheat Cd, Cu, Pb and Zn accumulation. *Environmental Pollution*. 2020; 262: 114329.
  13. Chehregani Rad A, Ramazani H, Mohsenzadeh F, Baghaiefar Z, et al. The effect of cadmium on development of anther and pollen grains and protein pattern in *Petunia hybrida* Juss. *Journal of Cell & Tissue (JCT)*. 2014; 5(1): 71-86.
  14. Brown GD, Liang G-Y, Sy L-K. Terpenoids from the seeds of *Artemisia annua*. *Phytochemistry*. 2003; 64(1): 303-23.
  15. Botsaris AS. Plants used traditionally to treat malaria in Brazil: the archives of *Flora Medicinal*. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*. 2007; 3(18): 1-8.
  16. Weathers PJ, Arsenault PR, Covello PS, McMickle A, et al. Artemisinin production in *Artemisia annua*: studies in planta and results of a novel delivery method for treating malaria and other neglected diseases. *Phytochemistry Reviews*. 2011; 10(2): 173-83.
  17. Pourrut B, Shahid M, Dumat C, Winterton P, et al. Lead uptake, toxicity, and detoxification in plants. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. 2011; 213: 113-36.
  18. Shirkhani Z, Chehregani Rad A, Gholami M, Mohsenzadeh F. Phytoremediation of Cd-contaminated Soils by *Datura stramonium* L. *Toxicology and Environmental Health Sciences*. 2018; 10(3): 168-78.
  19. Shahid M, Dumat C, Khalid S, Schreck E, et al. Foliar heavy metal uptake, toxicity and detoxification in plants: A comparison of foliar and root metal uptake. *Journal of hazardous materials*. 2017; 325: 36-58.
  20. Honour SL, Bell JNB, Ashenden TW, Cape JN, et al. Responses of herbaceous plants to urban air pollution: effects on growth, phenology and leaf surface characteristics. *Environmental pollution*. 2009; 157(4): 1279-86.
  21. Stingu A, Volf I, Popa VI. Study of copper and cadmium accumulation by bean. *Environmental Engineering and Management Journal*. 2009; 8(5): 1247-52.
  22. Sairam R, Deshmukh P, Shukla D. Tolerance of drought and temperature stress in relation to increased antioxidant enzyme activity in wheat. *Journal of Agronomy and Crop Science*. 1997; 178(3): 171-178.
  23. Weatherley P. Studies in the water relations of the cotton plant: I. The field measurement of water deficits in leaves. *New Phytologist*. 1950; 49(1): 81-97.
  24. Lichtenthaler HK, Buschmann C. Chlorophylls and carotenoids: Measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. *Current protocols in food analytical chemistry*. 2001; 1(1): F4.3.1-F4.3.8.
  25. Kochert G. Carbohydrate determination by the phenol-sulfuric acid method. *Handbook of physiological methods*. 1978; 2: 95-7.



26. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. 1976; 72(1-2): 248-54.
27. Liu W, Fang J, Zhu WM, Gao PJ. Isolation, purification and properties of the peroxidase from the hull of *Glycine max* var HH2. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1999; 79(5): 779-85.
28. Raymond J, Rakariyatham N, Azanza JL. Purification and some properties of polyphenoloxidase from sunflower seeds. *Phytochemistry*. 1993 Nov 1; 34(4): 927-31.
29. Hames BD. *Gel electrophoresis of proteins: a practical approach*: OUP Oxford; 1998; 19(1): 1-39.
30. Chehregani A, Malayeri B, Yousefi N. Developmental stages of ovule and megagametophyte in *Chenopodium botrys* L.(Chenopodiaceae). *Turkish Journal of Botany*. 2009; 33(2): 75-81.
31. Majd A, Ghanati F. The effect of air pollution on the allergenicity of *Pinus elderica* (Pinaceae) pollen. *Grana*. 1995; 34(3): 208-11.
32. Haslett BS, Reid RJ, Rengel Z. Zinc mobility in wheat: uptake and distribution of zinc applied to leaves or roots. *Annals of Botany*. 2001; 87(3): 379-86.
33. Heidarpour Sh, Abbaspour N, Mohammadkhani N, Mosavi Pornaki S. The effect of salt stress on ion accumulation, photosynthesis and compatible solute contents in four grapevine (*Vitis vinifera*) genotypes. *Nova Biologica Reperta*. 2021; 7(4): 400-410.
34. Clemens S, Ma JF. Toxic heavy metal and metalloids accumulation in crop plants and foods. *Annual review of plant biology*. 2016; 67: 489-512.
35. Greger M, Kabir AH, Landberg T, Maity PJ, et al. Silicate reduces cadmium uptake into cells of wheat. *Environmental Pollution*. 2016; 211: 90-7.
36. Kardel F, Wuyts K, Babanezhad M, Wuytack T, et al. Assessing urban habitat quality based on specific leaf area and stomatal characteristics of *Plantago lanceolata* L. *Environmental Pollution*. 2010; 158(3): 788-794.
37. Abbruzzese G, Beritognolo I, Muleo R, Piazzai M, et al. Leaf morphological plasticity and stomatal conductance in three *Populus alba* L. genotypes subjected to salt stress. *Environmental and experimental Botany*. 2009; 66(3): 381-388.
38. Imtiaz M, Tu S, Xie Z, Han D, et al. Growth, V. uptake, and antioxidant enzymes responses of chickpea (*Cicer arietinum* L.) genotypes under vanadium stress. *Plant and Soil*. 2015; 390(1): 17-27.
39. Mondal NK, Chittaranjan D, Satinath R, Datta JK, et al. Effect of varying cadmium stress on chickpea (*Cicer arietinum* L.) seedlings: an ultrastructural study. *Annals of Environmental Science*. 2013; 7: 59-70.
40. Ullah S, Khan J, Hayat K, Abdelfattah Elateeq A, et al. Comparative study of growth, cadmium accumulation and tolerance of three chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars. *Plants*. 2020; 9(3): 310.
41. Chehregani Rad A, Farzan S, Shirkhani Z. Effect of lead treatment on some morphological and physiological parameters of *Petunia hybrida* L. *Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology)*. 2017; 30(1): 47-57.

42. Hariram M, Sahu R, Elumalai SP. Impact assessment of atmospheric dust on foliage pigments and pollution resistances of plants grown nearby coal based thermal power plants. Archives of environmental contamination and toxicology. 2018;74(1):56-70.
43. Wang L, Zhou Q, Ding L, Sun Y. Effect of cadmium toxicity on nitrogen metabolism in leaves of *Solanum nigrum* L. as a newly found cadmium hyperaccumulator. Journal of Hazardous Materials. 2008; 154(1): 818-25.
44. Rucińska-Sobkowiak R. Water relations in plants subjected to heavy metal stresses. Acta Physiologiae Plantarum. 2016; 38(11): 257.
45. Zaier H, Mudarra A, Kutscher D, De La Campa MF, et al. Induced lead binding phytochelatins in *Brassica juncea* and *Sesuvium portulacastrum* investigated by orthogonal chromatography inductively coupled plasma-mass spectrometry and matrix assisted laser desorption ionization-time of flight-mass spectrometry. Analytica chimica acta. 2010; 671(1-2): 48-54.
46. Kováčik J, Klejdus B, Štork F, Hedbavny J. Physiological responses of *Tillandsia albida* (Bromeliaceae) to long-term foliar metal application. Journal of hazardous materials. 2012; 239: 175-82.
47. Popova L, Maslenkova L, Yordanova R, Krantev A, et al. Salicylic acid protects photosynthesis against cadmium toxicity in pea plants. Gen Appl Plant Physiol. 2008; 34(3-4): 133-48.
48. Farjadi M, Norastehnia, A. Effects of heavy metal mercury on some of the physiological responses in (*Nicotiana tabacum* L.). Nova Biologica Reperta. 2021; 8(2): 102-113.
49. Stobart AK, Griffiths WT, Ameen-Bukhari I, Sherwood RP. The effect of Cd<sup>2+</sup> on the biosynthesis of chlorophyll in leaves of barley. Physiologia plantarum. 1985; 63(3): 293-8.
50. Stiborová M, Ditrichová M, BŘEzinová A. Effect of heavy metal ions on growth and biochemical characteristics of photosynthesis of barley and maize seedlings .Biologia Plantarum. 1987; 29(6): 453.
51. Shahid M, Rafiq M, Niazi NK, Dumat C, et al. Arsenic accumulation and physiological attributes of *spinach* in the presence of amendments: an implication to reduce health risk. Environmental Science and Pollution Research. 2017; 24(19): 16097-106.
52. Shirinpour E, Nasr Esfahani M, Bakhshi D. Morphological and biochemical effect of phosphatedeficiency on different cultivars of common bean (*Phaseolus vulgaris*). Nova Biologica Reperta. 2020; 7(2): 206-218.
53. Flora SJ. Arsenic-induced oxidative stress and its reversibility. Free Radical Biology and Medicine. 2011; 51(2): 257-81.
54. Lomaglio T, Rocco M, Trupiano D, De Zio E, et al. Effect of short-term cadmium stress on *Populus nigra* L. detached leaves. Journal of plant physiology. 2015; 182: 40-8.
55. Hossain Z, Hajika M, Komatsu S. Comparative proteome analysis of high and low cadmium accumulating soybeans under cadmium stress. Amino Acids. 2012; 43(6): 2393-2416.
56. Muneer S, Hakeem KR, Mohamed R, Lee JH. Cadmium toxicity induced alterations in the root proteome of green gram in contrasting response towards iron supplement. International journal of molecular sciences. 2014; 15(4): 6343-55.

57. Chehregani A, Kouhkan F. Diesel exhaust particles and allergenicity of pollen grains of *Lilium martagon*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2008; 69(3): 568-73.
58. Malayeri B, Chehregani A, Mohsenzadeh F, Golmohammadi R. Effect of heavy metals on the development stages of ovule and embryonic sac in *Euphorbia cheiradenia*. *Pak J Biol Sci*. 2005; 8: 622-5.
59. Emberlin J. The problem of pollen. *Allergy*. 2000; 8(2): 25-8.
60. Rezanejad 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 and Technology*. 2013; 37(A1): 63-8.
61. Chehregani A, Lari Yazdi H, Hoseini S, Majd A. Toxic effects of diesel exhaust particles on ovules and embryonic sac development in *Phaseolus vulgaris* L. *Middle Eastern and Russian Journal of Plant Science and Biotechnology, Global Science Books*. 2007; 1(2): 54-6.
62. Yousefi N, Chehregani A, Malayeri B, Lorestani B, et al. Effect of the heavy metals on the developmental stages of ovule and seed proteins in *Chenopodium botrys* L.(Chenopodiaceae). *Biological trace element research*. 2011; 144(1-3): 1142-9.
63. Shirkhani Z, Rad AC, Gholami M. Effects of cadmium on perianth and anther formation in *Datura stramonium* L. *Brazilian Journal of Botany*. 2020; 43(2): 239-46.
64. Mulcahy DL. Pollen tetrads in the detection of environmental mutagenesis. *Environmental Health Perspectives*. 1981; 37: 91-4.

## Effect of foliar application of cadmium on morphological, physiological characteristics and development of male and female gametophytes in *Artemisia annua*

Shirkhani Z<sup>1\*</sup> Ph.D., Chehregani Rad A<sup>2</sup> Ph.D., Mohsenzadeh F<sup>2</sup> Ph.D., Gholami M<sup>3</sup> Ph.D.

1. Department of Plant Science, Faculty of Biological Science, Kharazmi University, Tehran, Iran
2. Department of Biology, Faculty of Basic Science, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran
3. Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran

\* Email corresponding author: z.shirkhani@khu.ac.ir

Received: 7 Apr. 2021

Accepted: 11 Jul. 2021

### Abstract

**Aim:** The aim of this study was to investigate the morphological, physiological, and pollen grain and ovule developmental changes under Cd stress in *Artemisia annua* L.

**Material and Methods:** In this study, Cd accumulation in plant tissues, growth factors, relative water content of tissue, membrane stability index, photosynthetic pigments content, soluble carbohydrates content, total protein content, antioxidant enzymes activity, seed protein pattern and, developmental stages of pollen grains and ovules were studied under foliar treatment of Cd (0, 75, 150 and 225 mg l<sup>-1</sup>).

**Results:** The results showed that *A.annua* can accumulate Cd. Significant decrease in growth factors, relative water content, membrane stability index, photosynthetic pigments content, soluble carbohydrates content and increase in total protein content, antioxidant enzymes activity were observed. Changes in seed protein pattern, embryonic sac cells degeneration, and the increase of abnormalities in microspores and pollen grains were the abnormalities observed in the plants under treatment.

**Conclusion:** According to the results of this study, *A.annua* has a high resistance to Cd stress and can survive under high concentrations of Cd. The results indicate that Cd can affect the developmental stages of reproductive organs and causes a variety of abnormalities during the developmental stages of male and female reproductive organs but it seems that *A.annua* has been able to resist the negative effects of Cd by changing its physiological properties and proteins contents.

**Keywords:** *Artemisia annua*, embryonic sac, heavy metals stress, pollen grains