Plant Prod., 42(4) (2019) 509-522 ISSN (P): 2538-543x
DOI: 10.22055/ppd.2019.24806.1567 ISSN (E): 2588-5979

The Effect of Different Concentrations of Cadmium Chloride on Oxidative Stress in Shoot Cultures of Lemon Balm

Sayyedeh Razieh Nourbakhsh Rezaei[1], Leila Shabani[2]*, Majid Rostami[3] and Mohammad Abdoli[4]

1- M.Sc. Graduate of Plant Production, Faculty of Agriculture, Malayer University, Malayer, Iran
2- ***Corresponding Author:** Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Shahrekord University, Shahrekord, Iran (lshabani@gmail.com)
3- Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Malayer University, Malayer, Iran
4- Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Malayer University, Malayer, Iran

Received: 5 March, 2018 Accepted: 21 November, 2018

Abstract

Background and Objectives

Melissa officinalis is a medicinal plant belonging to the Lamiaceae family. The essential oil of this plant is used in many fields. Although more than 100 types of chemical substances have been identified in this plant, the most important compositions of its essential oil include citral, citronella, geraniol and linalool. Heavy metals are one of the main causes of non-biotic stress for living organisms due to increased use in the field of industrial and agricultural development and its high accumulation and toxicity. Cadmium is an unnecessary heavy metal, which, due to its high mobility and low concentration, easily enters the food chain from the soil. Cadmium induces oxidative stress by stimulating the synthesis of free oxygen radicals in the plant. In this study, the effect of cadmium chloride on oxidative stress induction in lemon balm was investigated. This experiment was carried out in 2016-2017 at Shahrekord University.

Materials and Methods

This research was conducted in a completely randomized design with three replications *in vitro* condition. We investigated the effects of different concentrations of cadmium chloride (0, 10, 20 and 40µm) on the biochemical parameters of the lemon balm. In this study, sterile stems of lemon balm propagated on the medium (1/2 MS) were used. After 60 days, seedlings were removed from solid MS medium and the roots were cut and cultured in liquid medium of 1/2 MS with different concentrations of cadmium. The cultivation was carried out in Erlenmeyer flask (250 cc) and was kept in an incubator shaker device. Sampling for the experiment was conducted one week after the growth of the stems in the medium.

Results

Based on the results obtained in this study, fresh weight of shoots grown in 10 and 20µM of cadmium chloride increased compared to the control. This heavy metal significantly reduced the amount of chlorophyll a, b and carotenoids, while the total chlorophyll content decreased only at 40µm concentration relative to control. Cadmium significantly increased hydrogen peroxide

levels in all treatments. Also, it increased the activity of catalase and superoxide dismutase enzymes. Malondialdehyde increased in all treatment concentrations, but this increase was not significant at 40µm of cadmium chloride. Chloride cadmium reduced the absorption of molybdenum and iron, yet increased the adsorption of manganese and zinc.

Discussion

The results of this study revealed that the cadmium chloride in lemon balm shoots may have the potential to accumulate compounds such as hydrogen peroxide which, as a messenger molecule, produces antioxidants and can help the plant tolerate stressed conditions. It seems that two concentrations of 10 and 20 µm of cadmium chloride have no toxic effects for the stems and the plant has managed to withstand this tension with defense mechanisms.

Keywords: Antioxidant enzymes, Cadmium, Heavy metal, *Melissa officinalis*, Tissue culture

بررسی اثر غلظت‌های مختلف کلرید کادمیوم بر تنش اکسیداتیو گیاه بادرنجبویه تحت شرایط درون شیشه‌ای

سیده راضیه نوربخش رضایی[۱]، لیلا شبانی[۲]*، مجید رستمی[۳] و محمد عبدلی[۴]

۱-دانش‌آموخته کارشناسی ارشد تولیدات گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ملایر، ملایر، ایران

۲-***نویسنده مسئول:** دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران (lshabani@gmail.com)

۳- استادیار، گروه زراعت، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ملایر، ملایر، ایران

۴- استادیار، گروه زراعت، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ملایر، ملایر، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۲/۱۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۸/۳۰

چکیده

بادرنجبویه (*Melissa officinalis L.*) گیاه دارویی متعلق به خانواده نعناعیان (*Lamiaceae*) است. فلزات سنگین یکی از عوامل اصلی تنش غیرزیستی برای موجودات زنده می‌باشند. کادمیوم یکی از فلزات سنگین غیرضروری است که با تحریک سنتز رادیکال‌های آزاد اکسیژن در گیاه منجر به ایجاد تنش اکسیداتیو می‌گردد. این پژوهش در سال‌های ۱۳۹۶-۱۳۹۵ در دانشگاه شهرکرد انجام شد. در این مطالعه اثر غلظت‌های مختلف کلرید کادمیوم (صفر، ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میکرومولار) بر شاخص‌های بیوشیمیایی گیاه بادرنجبویه مورد بررسی قرار گرفت. به این منظور از ساقه‌های گیاه بادرنجبویه که در شرایط استریل بر روی محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (1/2 MS) تکثیر یافته بود استفاده شد. ساقه گیاهچه‌های دوماهه در محیط کشت مایع (1/2 MS) حاوی غلظت‌های مختلف کلرید کادمیوم کشت گردید. پس از گذشت یک هفته، نمونه‌برداری از آن‌ها جهت انجام آزمایش‌ها صورت گرفت. بر اساس نتایج به‌دست آمده در این مطالعه وزن تر ساقه‌های کشت‌شده در غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ میکرومولار کلرید کادمیوم نسبت به شاهد افزایش پیدا کرد. این فلز سنگین به‌طور معنی‌داری سبب کاهش مقدار کلروفیل a، b وکارتنوئیدها شد در حالیکه میزان کلروفیل کل تنها در غلظت ۴۰ میکرومولار نسبت به شاهد کاهش پیدا کرد. همچنین کادمیوم به‌طور معنی‌داری سبب افزایش میزان پراکسید هیدروژن H_2O_2 در تمامی غلظت‌های تیمار شد. در بین آنزیم‌های آنتی اکسیدان مورد بررسی، کلرید کادمیوم موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز شد. میزان مالون دی‌آلدئید در تمامی غلظت‌های تیمار افزایش پیدا کرد اما در غلظت ۴۰ میکرومولار این افزایش نسبت به شاهد معنی‌دار نبود. کلریدکادمیوم موجب کاهش جذب مولیبدن و آهن شد. از طرفی باعث افزایش جذب منگنز و روی گردید. بنابراین می‌توان نتیجه‌گیری کرد که احتمالاً کلرید کادمیوم در ساقه‌های بادرنجبویه باعث تجمع ترکیباتی مثل پراکسید هیدروژن شد که به‌عنوان یک مولکول پیام‌رسان باعث القای دفاع آنتی‌اکسیدانی گردیده است.

کلیدواژه‌ها: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، فلز سنگین، کادمیوم، کشت بافت، ملیسا

مقدمه

تیره نعناع، شامل حدود ۱۸۰ جنس و بیش از ۳۵۰۰ گونه است که در نقاط مختلف کره زمین پراکنده‌اند. بیشترین انتشار این تیره در نواحی معتدله کره زمین دیده می‌شود. بادرنجبویه (*Melissa officinalis* L.) گیاهی دارویی متعلق به خانواده نعناعیان، علفی چندساله با ساقه

چهارگوش به ارتفاع ۶۰-۴۰ سانتی‌متر است. برگ‌های گیاه قلبی شکل، دندانه‌دار و پوشیده از کرک، رنگ آن‌ها در سطح فوقانی سبز تیره و در سطح تحتانی سبز روشن است. گل‌ها به رنگ سفید یا صورتی است که از خردادماه تا اواسط مرداد ظاهر می‌شوند. برای این گیاه ۳ زیرگونه ssp.*altissima*، ssp.*inodora* و ssp.*officinalis* معرفی‌شده است. از بین زیرگونه‌های این جنس، فقط زیرگونه ssp.*officinalis* دارای ارزش اقتصادی است (Bahtyarca Bagdat and Cosge, 2006).

از رایج‌ترین خواص درمانی بادرنجبویه می‌توان به خواص آرام‌بخشی، آنتی‌اکسیدانی، ضداسپاسمی، ضدنفخ، ضدباکتری، ضدویروسی و ضدالتهابی آن اشاره کرد (Zarrindast *et al*., 2010). به‌طورکلی یکی از مهم‌ترین اثرات فلزات سنگین، تحریک سنتز رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌باشد که منجر به تنش اکسیداتیو در سلول می‌شود. به‌طور مثال کادمیوم، از طریق تشکیل کمپلکس با پروتئین‌ها، جانشینی یون‌های فلزی در غشای پلاسمایی و تغییر در سیستم آنتی‌اکسیدان، باعث ایجاد رادیکال‌های آزاد و گونه‌های فعال اکسیژن و درنتیجه تنش اکسیداتیو می‌شود. رادیکال‌های آزاد تولیدشده سپس با لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک برهم‌کنش کرده و باعث تغییر در متابولیسم لیپید و ایجاد پراکسیداسیون لیپیدی و درنتیجه تجزیه غشا، افزایش تعداد اجسام لیپیدی در سیتوپلاسم و واکوئلی شدن آن و نیز افزایش تعداد پلاستوگلبول در کلروپلاست و تغییر در تیلاکوئیدهای آن و درنتیجه تأثیر روی زنده‌مانی سلول می‌شوند (Guillermo *et al*., 2007; Guoa *et al*., 2007). پاسخ گیاهان به تنش کادمیوم شامل پاسخ‌های عمومی و اختصاصی کادمیوم می‌باشد. یکی از این پاسخ‌های عمومی، فعال شدن سیستم آنتی‌اکسیدان می‌باشد که اگرچه در غلظت‌های زیاد کادمیوم باعث تحمل به این فلز نمی‌شود ولی برای بقای گیاه مفید می‌باشد (Metwally *et al*., 2003). با جذب و تجمع این فلز سنگین در گیاه، سیستم دفاعی گیاه فعال‌شده و رادیکال های آزاد زیادی تولید می‌شود اما ممکن است در اثر افزایش و تداوم عامل تنش و به دنبال آن افزایش بیش از حد میزان رادیکال‌های آزاد، مکان‌های جذب و اتصال این رادیکال‌های آزاد توسط آنتی‌اکسیدان‌ها اشباع شود. بنابراین پاسخ علیه تنش‌های مختلف در سطوح مختلف آن تنش، در یک گونه حائز اهمیت است تا از این طریق واکنش گیاه بررسی شود و امکان بهبود شرایط مقاومت و مقابله با شرایط تنش پیش‌بینی شود (Da Rosa Correa *et al*., 2006). به همین منظوراثر کلرید کادمیوم بر القای تنش اکسیداتیو در گیاهبادرنجبویه تحت شرایط درون شیشه‌ای مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

بذور گیاه از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شد و در شرایط کاملاً استریل، در کابینت لامینار ایرفلو، با محلول هیپوکلریت سدیم ۵ درصد به مدت ۲۰ دقیقه ضدعفونی شد و سپس با آب‌مقطر استریل دو مرتبه شسته شدند. بعد از اتمام مرحله استریل، بذور درون شیشه‌های مخصوص کشت بافت حاوی محیط کشت (1/2 MS)، کشت داده شدند. شیشه‌های کشت‌شده در تاریکی، دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۳۰ درصد درون اتاقک رشد نگهداری شدند. در این مطالعه از ساقه‌های گیاه بادرنجبویه استفاده شد. گیاهچه‌های ۲ ماهه از درون شیشه‌های کشت بافت خارج گردید، ریشه‌های آن‌ها قطع شد و ساقه‌های آن‌ها به قطعات کوچک‌تر (با ۳ گره) تقسیم شد (شکل ۱). برای بررسی اثر کلرید کادمیوم بر گیاه بادرنجبویه ۴ غلظت این ترکیب (صفر، ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میکرومولار) انتخاب گردید. بعد از تهیه غلظت‌های موردنظر از کلرید کادمیوم، هر غلظت با ۳ تکرار درون ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتر از قبل استریل شده ریخته شد سپس قطعات ساقه درون ارلن‌ها توزیع شد. درب ارلن با پنبه و فویل خوب بسته شد و در دستگاه شیکر انکوباتور (LabTech) با سرعت ۱۱۰ rpm، دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی به مدت ۷ روز قرار داده شد.

شکل ۱- مراحل کشت، آماده‌سازی و اعمال تیمار
Figure 1. Steps of cultivation, preparation and treatment

اندازه‌گیری وزن تر

قبل از انتقال قطعات ساقه‌های گیاه درون ارلن‌ها، وزن اولیه آن‌ها یادداشت شد. پس از اتمام مدت‌زمان تیمار، ساقه‌ها را از محیط کشت خارج کرده و به منظور اندازه‌گیری وزن تر، با کاغذ صافی آب و محیط کشت اضافی را از ساقه‌ها جذب کرده سپس وزن ثانویه ساقه‌های هر تیمار به‌طور جداگانه توسط ترازوی آزمایشگاهی چهار رقم اعشار برحسب واحد گرم اندازه‌گیری شد.

سنجش رنگیزه‌های فتوسنتزی

اندازه‌گیری کلروفیل با روش Arnon (1949) و کارتنوئید با روش Lichtenthaler (1987) انجام شد. ابتدا ۰/۱ گرم از بافت تازه برگ وزن شد و سپس در هاون با استفاده از حلال استون ۸۰ درصد سائیده شد. سپس حجم عصاره به‌دست آمده با استون ۸۰ درصد به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. عصاره حاصل به مدت ۳ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد و بلافاصله مقداری از عصاره به کوت منتقل و جذب محلول با دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل 6300GENWAY) در طول موج ۴۷۰، ۶۴۵ و ۶۶۳ نانومتر خوانده شد. سپس میزان کلروفیل a، b، کلروفیل کل و کارتنوئیدها طبق روابط زیر برحسب میلی‌گرم در هر گرم وزن تر بافت گیاهی محاسبه شد:

Chlorophyll a (mg/gfw) = ((12.7 × D663) – (2.69 × D645)) × V/1000 × W

Chlorophyll b (mg/gfw) = ((22.9 × D645) – (4.93 × D663)) × V/1000 × W

Total chlorophyll (mg/gfw) = ((20.2 × D645) + (8.02 × D663)) × V/1000 × W

Carotenoids (mg/gfw) = (100 × D470 – 1.82 × chl a – 85.02 × chl b) / 198 × V/1000 × W

سنجش میزان H_2O_2

برای اندازه‌گیری H_2O_2 از روش Alexieva *et al.* (2001) استفاده شد. برای عصاره‌گیری ۰/۱ گرم بافت تازه گیاه در هاون سردشده با ۱/۵ میلی‌لیتر TCA (اسید تری‌کلرواستیک) ۰/۱ درصد سائیده شد. عصاره تهیه‌شده به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰rpm در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. برای به دست آوردن منحنی استاندارد H_2O_2، رقت‌های ۰/۰۰۱، ۰/۰۱ و ۰/۱ تهیه گردید. ۵۰۰ میکرولیتر از استانداردها و عصاره‌ها با ۵۰۰ میکرولیتر بافر فسفات (pH = 7) و ۱ میلی‌لیتر محلول KI ۱ مولار ترکیب شد و در ۳۹۰ نانومتر

قرائت شد و از محلول TCA ۰/۱ درصد به‌عنوان بلانک استفاده شد.

سنجش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان

برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی ۰/۱ گرم از بافت تازه برگ گیاهچه‌ها پس از توزین درون هاون چینی قرار داده شد. برای استخراج پروتئین محلول، ۱/۵ میلی‌لیتر محلول بافر عصاره‌گیری سالین فسفات با pH = ۷/۸ به‌تدریج به آن افزوده و نمونه‌ها ساییده شدند. عصاره‌های حاصل به مدت ۲۰ دقیقه و با دور rpm ۱۳۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. مطالعات کمی توسط اسپکتروفتومتر (مدل Ultrospec 3100) انجام گرفت.

آنزیم کاتالاز

به مقدار ۵۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی ۴/۵۱ میکرولیتر آب‌اکسیژنه و ۳ میلی‌لیتر بافر PBS افزوده و منحنی کاهش جذب در طول موج ۲۴۰ نانومتر در مدت ۶۰ ثانیه رسم گردید. یک واحد از فعالیت آنزیم کاتالاز بر اساس سرعت مصرف یک میکرومول در دقیقه آب‌اکسیژنه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد بیان گردید (Aebi, 1984).

آنزیم سوپراکسید دیسموتاز

فعالیت این آنزیم به روش Beyer and Fridovich (1987) صورت گرفت. یک میلی‌لیتر مخلوط واکنش شامل بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار (pH = ۸/۷)، متیونین ۹/۹ میلی‌مولار، تریتون ۱۰۰X (۰/۰۲۵ درصد)، نیتروبلوتترازولیوم ۷۵ میکرومولار و ۲۰ میکرولیتر عصاره آنزیم به همراه ۱۰ میکرولیتر ریبووفلاوین ۰/۰۰۴ درصد در لوله‌آزمایش ریخته شد. مخلوط حاصل به مدت ۷ دقیقه در یک محفظه دارای دو لامپ فلورسنت ۲۰ وات قرار داده شد. افزایش در جذب به‌واسطه تشکیل فورمازان در طول‌موج ۵۶۰ نانومتر خوانش شد.

سنجش مالون دی آلدئید

۰/۱ گرم از اندام هوایی توزین و درون هاون قرار داده شد و ۲ میلی‌لیتر از اتانول ۸۰ درصد به آن اضافه شد. بافت موردنظر در هاون سائیده شد. بافت‌های عصاره‌گیری‌شده در دور rpm ۵۰۰۰ و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند یک میلی‌لیتر از محلول حاوی (اسید تیوباربیتوریک (۰/۳۷۵ درصد)، اسید تری کلرواستیک (۱۵ درصد) و اسید هیدروکلریک ۰/۲۵ نرمال) به آن‌ها اضافه شد و به مدت ۳۰ ثانیه ورتکس شدند، پس از این‌که پنج دقیقه در دمای اتاق قرار گرفتند با سرعت ۱۰۰۰۰rpm به مدت پنج دقیقه سانتریفیوژ شدند، سوپرناتانت به یک فالکون جدید منتقل شد. به سوپرناتانت ۱۰ میکرولیتر بوتیله هیدروکسی تولوئن اضافه شد و در حمام بن ماری به مدت ۱۵ دقیقه و دمای ۹۲ تا ۹۳ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. نمونه‌ها به مدت پنج دقیقه روی یخ گذاشته شدند و جذب آن‌ها در ۵۳۲ نانومتر قرائت شد (Ertan *et al.*, 2002).

اندازه گیری میزان عناصر در بخش هوایی

ابتدا نمونه‌ها ۳ بار با آب مقطر شسته شد، سپس در پاکت‌های مخصوص قرار گرفت و سپس در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۴۸ ساعت در آون (مدل Memert) خشک گردید. سپس حدود ۰/۱ گرم از اندام هوایی هر نمونه به مدت ۱۴ ساعت در کوره الکتریکی در دمای ۴۸۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. خاکستر حاصل پس از سرد شدن در ۱۰ میلی‌لیتر اسید نیتریک ۱۰ درصد حل شد. پس از فیلتر کردن نمونه‌ها، مقدار عنصر کادمیوم توسط دستگاه ICP آنالیز گردید (Reeves and Chaney, 1999).

تجزیه‌وتحلیل آماری

این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار اجرا گردید. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار SAS (8.0) انجام شد و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه دانکن انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج جدول تجزیه واریانس نشان می‌دهد، اثر

غلظت‌های مختلف کلرید کادمیوم بر شاخص وزن تر در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). در غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ میکرومولار کلرید کادمیوم، افزایش رشد نسبت به شاهد مشاهده شد ولی در غلظت ۴۰ میکرومولار کاهش رشد تفاوت معنی‌داری در مقایسه با شاهد نداشت.

در تحقیقی John et al. (2009) گزارش کردند که با افزایش غلظت کادمیوم از ۱۵۰ به ۹۰۰ میکرومولار در *Brassica juncea* وزن تر اندام هوایی و ریشه کاهش یافت. نتایج تحقیق Abou-Mouriefah (2008) نشان داد که با افزایش غلظت کادمیوم (۱۰۰-۲۵۰ میلی‌گرم/ لیتر) در خیار، وزن تر ریشه و اندام هوایی گیاه کاهش یافت ولی در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم/ لیتر کاهش وزن تر اندام هوایی معنی‌دار نبوده است. از طرفی توانایی تعدادی از سلول‌ها در تجمع کادمیوم می‌تواند به سایر سلول‌ها اجازه دهد که غلظت‌های غیر آسیب‌رسان کادمیوم را تحمل نموده و به عملکرد طبیعی خود ادامه دهند (Radotic *et al.*, 2000). گزارش شده است که در غلظت‌های پایین کادمیوم و سرب در گیاهچه‌های گوجه فرنگی و سیب‌زمینی (Wierzbicka and Obidzinska, 1998) و کشت درون شیشه‌ای گیاه کلم (*Brassica oleracea*) (Sadeghi *et al.*, 2019) و مس در گیاه علف چشمه (*Nasturtium officinale*) (Taghizadeh *et al.*, 2017) میزان رشد و وزن تر به دلیل غلظت پایین این فلزات افزایش یافته است. نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که غلظت‌های مختلف کلرید کادمیوم بر میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی تأثیر معنی‌داری داشت (جدول ۲).

جدول ۱- تجزیه واریانس غلظت‌های مختلف کلرید کادمیوم بر وزن تر و رنگیزه‌های فتوسنتزی ساقه‌های کشت‌شده بادرنجبویه

Table 1. Analysis of variance of different concentrations of cadmium chloride on fresh weight and photosynthesis pigments of shoot cultures of lemon balm

منابع تغییر Sources of variation	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean of squares					
		وزن تر Fresh weight	کلروفیل a Chlorophyll a	کلروفیل b Chlorophyll b	کلروفیل a/b chlorophyll a/b	کلروفیل کل Total chlorophyll	کارتنوئید Carotenoid
تیمار Treatment	3	0.283**	0.072**	0.111**	0.527**	0.145**	0.03**
خطا Error	8	0.009	0.008	0.007	0.062	0.014	0.001

** معنی‌دار در سطح یک درصد. **: significant at 1% probability level.

جدول ۲- اثر غلظت‌های مختلف کلرید کادمیوم بر وزن تر و رنگیزه‌های فتوسنتزی ساقه‌های کشت‌شده بادرنجبویه

Table 2. Effect of different concentrations of cadmium chloride on fresh weight and photosynthesis pigments of shoot cultures of lemon balm

کلرید کادمیوم $CdCl_2$	وزن تر Fresh weight	کلروفیل a Chlorophyll a	کلروفیل b Chlorophyll b	کلروفیل a/b Chlorophyll a/b	کلروفیل کل Total chlorophyll	کارتنوئید Carotenoid
میکرومولار µm	گرم g	میلی‌گرم بر گرم وزن تر mg/g				
0	1.44[b]	0.92[a]	0.79[a]	1.19[b]	1.82[a]	0.44[a]
10	1.92[a]	0.6[b]	0.59[b]	1.19[b]	1.34[a]	0.234[b]
20	1.88[a]	0.81[a]	0.46[bc]	1.81[a]	1.25[a]	0.284[b]
40	1.31[b]	0.62[b]	0.34[c]	1.82[a]	0.95[b]	0.234[b]

میانگین‌هایی که در هر ستون دارای حروف مشترک هستند، از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند (در سطح ۵ درصد).

*In each column, means followed by the same letter are not significant at $p< 0.05$.

تیمار کادمیوم باعث کاهش میزان کلروفیل a و کلروفیل b در تمامی غلظت‌ها شد، ولی در غلظت ۲۰ میکرومولار کاهش میزان کلروفیل a تفاوت معنی‌داری در مقایسه با شاهد نداشت. از طرفی نسبت کلروفیل a/b در غلظت‌های ۲۰ و ۴۰ میکرومولار افزایش یافت. میزان کلروفیل کل در تمامی غلظت‌ها کاهش یافت ولی با این حال تنها در غلظت ۴۰ میکرومولار این کاهش نسبت به شاهد معنی‌دار بود. میزان کارتنوئیدها در غلظت‌های ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میکرومولار به یک میزان نسبت به شاهد کاهش پیدا کرد.

فرآیندهای فیزیولوژیک از قبیل فتوسنتز در گیاهان عالی به فلزات سنگین بسیار حساس هستند (Tanyolac *et al.*, 2007). میزان کلروفیل در گیاهان اغلب برای ارزیابی اثر تنش‌های محیطی تعیین می‌شود. تحقیقات نشان می‌دهد اولین اثر کادمیم بر گیاه، کاهش فتوسنتز و کلروز برگ‌هاست (Baryla *et al.*, 2001). فلزات سنگین از عملکرد فتوسیستم‌های I و II ممانعت می‌کنند. مشخص شده است که حساسیت فتوسیستم II به فلزات سنگین بیش از فتوسیستم I است (Aggarwal *et al.*, 2012). نشان داده شده است که نیکل باعث افزایش در نسبت کلروفیل a/b در گندم می‌شود که نشان می‌دهد کلروفیل b حساس‌تر از کلروفیل a نسبت به سمیت نیکل می‌باشد. این نتایج مشابه نتایج گرفته‌شده Sakalauskaite *et al.* (2006) می‌باشد. در مقابل گزارش شده است که در برگ‌های کلم تیمارشده با نیکل، میزان کلروفیل a بیشتر از کلروفیل b کاهش‌یافته است (Pandey and Sharma, 2002). در تحقیقی دیگر نیز Alsokari (2009) گزارش کرد که نسبت کلروفیل a/b در گیاه سورگوم تیمارشده با کادمیوم کاهش یافته است. گزارش‌شده است که اثر کادمیوم بر میزان فتوسنتز بیش از اثر بر میزان کلروفیل پس از گذشت زمان است، به همین دلیل سمیت کادمیوم تا مراحل آخر با نشانه‌های مورفولوژیک همراه نیست. افزایش و یا عدم تغییر کلروفیل در تنش ملایم می‌تواند به دلیل افزایش در وزن مخصوص برگ باشد که ناشی از کاهش اندازه سلول است. بنابراین طی تنش ملایم، به دلیل وجود سلول‌های بیشتر در واحد وزن برگ، محتوای کلروفیل می‌تواند افزایش یابد و یا تغییر نکند. مشاهدات انجام‌شده توسط Shi *et al.* (2010) به عدم تغییر محتوای رنگیزه‌های کلروفیلی در سطوح پایین‌تر کادمیوم اعمال‌شده بر گیاه گلرنگ اشاره دارد آن‌ها بیان کردند که وجود فرآیندهای محافظتی مانند آنتی‌اکسیدان‌ها و یا باند شدن کادمیوم با پپتیدها می‌تواند سیستم فتوسنتزی گیاه را تحت حفاظت قرار دهد. کاهش مقدار کارتنوئیدها به دلیل فرونشانی غیرفتوشیمیایی کلروفیل‌های برانگیخته است که سبب برهم ریختن ساختارشان می‌گردد. کارتنوئیدها علاوه بر نقش ساختمانی و جذب نور می‌توانند به‌صورت مستقیم اکسیژن آزاد را غیرفعال کنند و یا از طریق فرونشاندن کلروفیل برانگیخته‌شده، به‌صورت غیرمستقیم از تشکیل اکسیژن یکتایی جلوگیری کنند و به‌این‌ترتیب دستگاه فتوسنتزی را از شروع پراکسیداسیون لیپیدی محافظت می‌کنند. کارتنوئیدها، کلروفیل و ترکیب ژنتیکی سلول را در برابر ROS تحت تنش فلزات سنگین محافظت می‌کند (Rastgoo and Alemzadeh, 2011). در تحقیقی Belkahadi *et al.* (2010) گزارش کردند که کادمیوم میزان کارتنوئید را از طریق تجزیه آن در گیاهان کتان کاهش داده است. در مطالعه دیگری بر روی گیاه *Aeluropus littoralis* کاهش محتوای کارتنوئید در برابر افزایش کادمیوم تأیید شده است (Rastgoo and Alemzadeh, 2011). یکی از تغییرات بیوشیمیایی که در گیاه تحت تنش ایجاد می‌شود تجمع گونه‌های فعال اکسیژن است که محصول اجتناب‌ناپذیر متابولیسم طبیعی سلول می‌باشد. کادمیوم به‌طور معنی‌داری سبب افزایش میزان H_2O_2 در ساقه‌های کشت‌شده بادرنجبویه گردید (جدول ۴). در شرایط عادی رشد، بسیاری از فرایندهای متابولیکی تولید ROS می‌کنند. گیاهان دارای سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی پیچیده‌ای برای گریز از اثرات مضر ROS هستند. در شرایط تنش، تشکیل ROS بیشتر از توانایی گیاه برای برطرف کردن آن است و در نتیجه منجر به صدمات اکسیداتیو، اکسید کردن رنگیزه‌های فتوسنتزی و خسارت به لیپیدهای غشایی، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک در گیاهان می‌شود (Laspina *et al.*, 2005).

پراکسیدهیدروژن یکی از گونه‌های اکسیژن فعال می‌باشد که به سرعت در عرض غشا منتشر می‌شود و باعث اختلال در فرایندهای فیزیولوژیکی گیاه می‌گردد. در حالی‌که H_2O_2 برای برخی از اجزای سلولی مضر است، در واکنش‌های مختلف بیوسنتز گیاه ضروری است و توسط برخی مطالعات پیشنهاد شده است، احتمالاً در مسیرهای انتقال سیگنال دخالت دارد که می‌تواند به دفاع گیاه کمک کند. پیشنهاد شده است که تجمع سطوح H_2O_2 ناشی از تنش‌های مختلف زیست‌محیطی به منظور محافظت از سلول‌های گیاهی به فعالیت ترکیبی از کاتالاز و پراکسیداز نیاز دارد (Maksymiec, 2007). نتایج تجزیه واریانس تأثیر غلظت‌های مختلف کلرید کادمیوم بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در جدول (۳) آمده است. فعالیت آنزیم کاتالاز در غلظت ۱۰ میکرومولار کلرید کادمیوم نسبت به شاهد افزایش یافت. سپس در غلظت ۲۰ میکرومولار بیشترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز مشاهده شد. با افزایش غلظت کادمیوم میزان فعالیت آنزیم کاهش پیداکرده و نسبت به شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت (جدول ۴).

کاتالاز یکی از مهم‌ترین اجزا مکانیسم‌های محافظتی گیاه است که در میتوکندری‌ها و پراکسی‌زوم‌ها وجود دارد و دارای نقش مهمی در مهار رادیکال‌های آزاد در شرایط تنش می‌باشد (Rastgoo and Alemzadeh, 2011). در تحقیقی Schutzendubel *et al.* (2001) گزارش کردند اضافه کردن ۵۰ میکرومولار کادمیوم به کشت هیدروپونیک *Pinus sylvestris* در ۶ ساعت اول باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و سوپراکسیددسیموتاز می‌شود و بعد از گذشت ۱۲ ساعت کاهش می‌یابد، درحالی‌که در ۶ ساعت اول باعث کاهش فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز می‌شود و بعد از ۱۲ ساعت باعث افزایش فعالیت این آنزیم نسبت به شاهد می‌شود. در این مطالعه کلرید کادمیوم موجب افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز در مقایسه با شاهد شد (جدول ۴). اما به نظر می‌رسد غلظت‌های بالاتر از کادمیوم اثر سمی بر روی این آنزیم داشته باشد و موجب تخریب آن شود. افزایش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز توسط کلرید کادمیوم نشان می‌دهد که این آنزیم‌ها با همکاری یکدیگر در حذف رادیکال‌های آزاد عمل می‌کنند و نیز دلیلی بر شروع دفاع آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. به‌عنوان مثال در گزارشی بیان‌شده است پاسخ ناکافی یک آنزیم به فلزات سنگین توسط افزایش فعالیت آنزیم‌های دیگر جبران می‌شود (Merquez-Garica and Cordoba, 2010). پاسخ آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی به کادمیوم و در کل به فلزات بحث برانگیز باقی‌مانده است و در بین گونه و حتی در بین بافت‌های گیاهان هم متفاوت است. میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان بسته به مدت و نوع تنش، گونه گیاهی و بخش‌های گیاهی متفاوت است (Dinakar *et al.*, 2009). همچنین فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان تنها مکانیسم دفاعی گیاه در کاهش خسارت‌های اکسیداتیو نیست (Omar *et al.*, 2009).

جدول ۳- تجزیه واریانس غلظت‌های مختلف کلرید کادمیوم بر میزان H_2O_2، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و پراکسیداسیون لیپید ساقه‌های کشت‌شده بادرنجبویه

Table 3. Analysis of variance of different concentrations of cadmium chloride on H_2O_2 production, antioxidant enzymes activity and lipid peroxidation of shoot cultures of lemon balm

منابع تغییر Sources of variation	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean of squares			
		پراکسیدهیدروژن H_2O_2	کاتالاز CAT	سوپراکسید دیسموتاز SOD	پراکسیداسیون لیپید MDA
تیمار Treatment	3	231.503**	243.35**	0.048**	304.531*
خطا Error	8	9.179	0.279	0.002	67.55

**: معنی‌دار در سطح یک درصد، *: معنی‌دار در سطح پنج درصد.

**: Significant at 1% level, *: significant at 5% level.

جدول ۴- اثر غلظت‌های مختلف کلرید کادمیوم بر میزان H_2O_2، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و پراکسیداسیون لیپید ساقه‌های کشت‌شده بادرنجبویه

Table 4. Effect of different concentrations of cadmium chloride on H_2O_2 production, antioxidant enzymes activity and lipid peroxidation of shoot cultures of lemon balm

کلرید کادمیوم $CdCl_2$	پراکسیدهیدروژن H_2O_2	کاتالاز CAT	سوپراکسید دیسموتاز SOD	پراکسیداسیون لیپید MDA
میکرومولار µm	میکروگرم بر گرم µg/g		واحد آنزیم بر گرم وزن تر u/g	
0	364.03[c]	14.54[c]	0.86[c]	15.31[c]
10	383.31[a]	24.15[b]	1.03[b]	36.24[a]
20	377[b]	31.72[a]	1.15[a]	33.10[ab]
40	381.93[ab]	12.27[c]	1.1[ab]	20.08[bc]

میانگین‌هایی که در هر ستون دارای حروف مشترک هستند، از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند (در سطح ۵ درصد).

*In each column, means followed by the same letter are not significant at $p< 0.05$.

سطح مالون‌دی‌آلدئید به‌عنوان شاخص سلولی تجمع پراکسیدها در این پژوهش سنجیده شد. اگرچه کادمیوم توانایی ردوکسی پایین دارد اما شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد این فلز باعث اختلال مرتبط با اکسیداتیو شامل پراکسیداسیون لیپیدی می‌شود (Vassillev *et al*., 2005). بیشترین میزان پراکسیداسیون لیپید در غلظت ۱۰ میکرومولار رخ داده است. روند تغییرات در میزان پراکسیداسیون لیپید با افزایش غلظت کلرید کادمیوم کاهش یافت به‌طوری‌که در غلظت ۴۰ میکرومولار کلرید کادمیوم افزایش میزان پراکسیداسیون لیپید نسبت به شاهد اختلاف معنی‌داری نشان نداد. افزایش سطح مالون‌دی‌آلدئید توسط فلزات سنگین نشان می‌دهد که یون‌های فلزی باعث تحریک تولید رادیکال‌های آزاد از طریق افزایش فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز نیز باعث ایجاد پراکسیداسیون لیپیدی و درنتیجه افزایش سطح مالون‌دی‌آلدئید می‌شوند (Ahmad *et al*., 2010). در واقع هنگامی‌که سطوح رادیکال‌های آزاد اکسیژن از توانایی سیستم آنتی‌اکسیدان برای از بین بردن آن‌ها تجاوز کند باعث آسیب رساندن به ترکیبات سلولی گیاه می‌شوند (Choudhary *et al*., 2006). نتیجه مطالعه Krante *et al*. (2008) نشان داد که میزان مالون‌دی‌آلدئید در گیاه ذرت تیمارشده با کادمیوم بیشتر از گیاهان شاهد بوده است که نشان‌دهنده سمیت کادمیوم در گیاهان ذرت مرتبط با پراکسیداسیون لیپیدی می‌باشد. در گیاه نخود نیز کادمیوم به‌طور قابل ملاحظه‌ای سبب افزایش پراکسیداسیون لیپید می‌شود، در صورتی‌که در ریشه‌های هویج پراکسیداسیون لیپید مشاهده نمی‌شود (Sanita *et al*., 1999). مشاهده پاسخ‌های گوناگون پراکسیداسیون لیپید، احتمالاً به سطح کادمیوم ذخیره‌شده و به غلظت گروه‌های تیولی موجود در گیاه بستگی دارد. تیول‌ها دارای خصوصیات آنتی‌اکسیدانی قوی هستند که می‌توانند تنش اکسیداتیو را بی‌اثر کنند (Mejare and Bulow, 2001).

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های مربوط به اثر غلظت‌های مختلف کلرید کادمیوم بر میزان جذب عناصر (کادمیوم، آهن، روی، منگنز و مولیبدن) در جدول (۵) نشان داده شده است. بررسی داده ها نشان داد که تأثیر غلظت‌های مختلف کلرید کادمیوم بر میزان جذب عناصر در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان می‌دهد (جدول ۶) که با افزایش غلظت کلرید کادمیوم در محیط کشت، میزان جذب این فلز نیز افزایش پیدا کرد به‌طوری‌که بیشترین میزان جذب کادمیوم در غلظت ۴۰ میکرومولار مشاهده شد. جذب آهن نیز در تمامی غلظت‌ها با افزایش غلظت کلرید کادمیوم در محیط کشت کاهش معنی داری پیدا کرد و کمترین میزان جذب آهن در غلظت ۴۰ میکرومولار بود. بیشترین جذب روی در غلظت ۱۰ میکرومولار بود بعد از آن با افزایش غلظت کلرید کادمیوم میزان جذب این عنصر کاهش یافت ولی با این حال کمترین میزان جذب روی در شاهد بود. کلرید کادمیوم موجب کاهش جذب مولیبدن در همه غلظت ها نسبت به شاهد شد. اما کلرید کادمیوم موجب افزایش جذب منگنز شد. کادمیوم اغلب در واکوئل سلول‌های گیاهان عالی تجمع می‌یابد، همچنین تجمع کادمیوم در دیواره سلول و تیغه میانی بین آندودرم و دایره محیطیه نیز

گزارش شده است (Ramos *et al*., 2002). در گزارشی بیان شده است که غلظت کادمیوم در اندام‌های گوناگون گیاه به خصوصیات ژنتیکی هر گیاه و غلظت این فلز در محیط کشت بستگی دارد (Ji *et al*., 2011). به منظور برآورد انتقال فلزات از محیط کشت به گیاه از چندین پارامتر از جمله شاخص ترابری و شاخص گردآوری استفاده می‌شود. این ضرایب بستگی به گونه گیاهان و نوع فلز دارد. شاخص ترابری پارامتری است که توان جابجایی فلز را نشان می‌دهد و راندمان انتقال فلزات را ارزیابی می‌کند (Zhang *et al*., 2010). فرم قابل جذب کادمیوم توسط گیاه کاملاً مشخص‌نشده ولی به نظر می‌رسد که ریشه عمدتاً یون فلزی آزاد را از محلول خاک جذب می‌کند (Glick, 2003).

مشخص شده است که گیاهان رشدیافته در مناطق آلوده به فلزات سنگین دارای کمبود آهن می‌باشند (Burd *et al*., 2000). در گیاهانی که کمبود Zn دارند، ساخته شدن پروتئین کاهش می‌یابد و انباشته شدن اسیدهای آمینه در این گیاهان نشان‌دهنده اهمیت Zn در سنتز پروتئین است. روی یکی از اجزای ضروری آنزیم RNA پلیمراز است و در هر مولکول این آنزیم دو اتم روی وجود دارد و اگر روی برداشته شود، آنزیم غیرفعال می‌شود. بدون روی ریبوزوم‌ها از هم پاشیده می‌شوند اما با مصرف آن ساختمان آن‌ها به حالت اول برمی‌گردد. روی برای ساخته شدن اسیدایندول استیک از تریپتوفان ضروری است، چون تریپتوفان ماده پیش‌نیاز برای تولید اسیدایندول استیک می‌باشد، بنابراین ساخته شدن این ماده رشدی به‌طور غیرمستقیم تحت تأثیر روی خواهد بود. غلظت بیش از حد تریپتوفان در برگ‌های گیاهان دچار کمبود روی احتمالاً ناشی از همین مسئله می‌باشد. در گیاهان مبتلا به کمبود روی غلظت هورمون‌های گیاهی بخصوص جیبرلین کاهش می‌یابد. روی یکی از ضروری‌ترین عناصر ریزمغذی می‌باشد که این عنصر در بسیاری از اعمال بیولوژیکی نقش دارد، به‌عنوان مثال روی باعث ثبات غشای پلاسمایی سلول‌ها شده و همچنین کوفاکتور بسیاری از آنزیم‌های آنتی‌اکسیداتیو می‌باشد (Zhao *et al*., 2005). کادمیوم با عناصر پرمصرف نظیر فسفر، کلسیم و منیزیم و عناصر کم مصرف مثل آهن، منگنز، مس و روی جهت انتقال از طریق پروتئین‌های ناقل موجود در غشای سلولی رقابت می‌کند (Sharma *et al*., 2012).

جدول ۵- تجزیه واریانس غلظت‌های مختلف کلرید کادمیوم بر میزان جذب عناصر ساقه‌های کشت‌شده بادرنجبویه

Table 3. Analysis of variance of different concentrations of cadmium chloride on absorption of mineral elements of shoot cultures of lemon balm

منابع تغییر Sources of variation	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean of squares				
		کادمیوم Cd	آهن Fe	روی Zn	منگنز Mn	مولیبدن Mo
تیمار Treatment	3	1098524.372**	0.389**	0.102**	0.07**	0.008**
خطا Error	8	644.307	0.001	0.001	0.001	0.001

** معنی‌دار در سطح یک درصد.

** . significant at 1% probability level:

جدول ۶- اثر غلظت‌های مختلف کلرید کادمیوم بر میزان جذب عناصر ساقه‌های کشت‌شده بادرنجبویه

Table 6. Effect of different concentrations of cadmium chloride on absorption of mineral elements of shoot cultures of lemon balm

کلرید کادمیوم (میکرومولار) $CdCl_2$ (µm)	کادمیوم (پی‌پی‌ام) Cd (ppm)	آهن (پی‌پی‌ام) Fe (ppm)	روی (پی‌پی‌ام) Zn (ppm)	منگنز (پی‌پی‌ام) Mn (ppm)	مولیبدن (پی‌پی‌ام) Mo (ppm)
0	24.419[a]	3.398[d]	2.383[d]	1.394[c]	0.265[a]
10	369.681[b]	2.786[c]	2.819[a]	1.761[a]	0.185[b]
20	749.905[c]	2.699[b]	2.699[b]	1.612[b]	0.152[c]
40	1436.58[d]	2.598[a]	2.593[c]	1.644[b]	0.157[c]

میانگین‌هایی که در هر ستون دارای حروف مشترک هستند، از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند (در سطح ۵ درصد).

*In each column, means followed by the same letter are not significant at $p < 0.05$.

نتیجه‌گیری

نتایج پژوهش حاصل نشان داد که کلرید کادمیوم تأثیر معنی‌داری بر القای تنش اکسیداتید در گیاه بادرنجبویه داشت و در ساقه‌های کشت‌شده بادرنجبویه باعث تجمع ترکیباتی مثل پراکسید هیدروژن‌شده که به‌عنوان یک مولکول پیام‌رسان باعث فعال شدن دفاع آنتی اکسیدانی و افزایش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسیددیسموتاز شد. کادمیوم توسط گیاه متناسب با غلظت آن در محیط کشت جذب شد که جذب آن اثرات متفاوتی بر جذب سایر عناصر داشت. کادمیوم موجب کاهش جذب مولیبدن و آهن شد. از طرفی باعث افزایش جذب منگنز و روی گردید، احتمالاً افزایش در جذب این عناصر موجب عملکرد بهتر گیاه در برابر این فلز سنگین شد.

سپاسگزاری

این پژوهش در قالب پایان‌نامه دانشجویی و با حمایت معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهرکرد و دانشگاه ملایر انجام پذیرفته است و بدین‌وسیله از گرنت با شماره 96GRN1M1032 قدردانی می‌گردد.

تضاد منافع

نویسندگان هیچ تضاد منافعی را اعلام نمی‌کنند.

سهم نویسندگان

نویسنده اول: انجام پژوهش، آنالیز آماری و نوشتن مقاله به کمک بقیه نویسندگان. نویسنده دوم: استاد راهنما پایان‌نامه، طراحی آزمایش، آنالیز، نوشتن و ویرایش مقاله؛ نویسنده سوم: استاد راهنما پایان‌نامه، مساعدت در انجام پژوهش و نویسنده چهارم: استاد مشاور پایان نامه، مساعدت در انجام پژوهش.

References

Abou-Mouriefah, S. S. (2008). Growth parameters and elemental status of cucumber (*Cucumus Sativus*) seedlings in response to cadmium accumulation. *International Journal of Agriculture and Biology*, 10(3), 261-266.

Aebi, H. (1984). Catalase *in vitro*. *Methods Enzymology*, 105, 121-126.

Aggarwal, A., Sharma, I., Tripathi, B. N., Munjal, A. K., Baunthiyal, M. and Sharma, V. (2012). Metal toxicity and photosynthesis. In S. Itoh, P. Mohanty, K. N. Guruprasad (Eds.), *Photosynthesis: Overviews on recent progress and future perspectives* (pp. 229-236). New Delhi, India: IK International Publishing House.

Ahmad, P., Nabi, G. and Ashraf, M. (2010). Cadmium-induced oxidative damage in mustard plants can be alleviated by salicylic acid. *South African Journal of Botany*, 77(1), 36-44.

Alexieva, V., Sergiev, I., Mapelli, S. and Karanov, E. (2001). The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant, Cell & Environment*, 24(12), 1337-1344.

Alsokari, S. S. (2009). Modulatory role of kinetin on photosynthetic characteristics, yield and yield attributes of cadmium-treated *Sorghum bicolor* plants. *Journal of Applied Sciences Research*, 5(12), 2383-2396.

Arnon, D. I. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenol-oxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*, 24(1), 1-15.

Bahtyarca Bagdat, R. and Cosge, B. (2006). The essential oil of lemon balm *Melissa officinalis* L. its components and using fields. *Journal of Agricultural Faculty, OMU*, 21(1), 116-121.

Baryla, A. P., Carrier, F., Franck, C., Coulomb, C. and Sahut, M. (2001). Havaux, leaf chlorosis in oil seed rape plants (*Brassica napus*) grown on cadmium-polluted soil causes and consequences for photosynthesis and growth. *Planta*, 212(5-6), 696-709.

Belkahadi, A., Hediji, H., Abbes, Z., Nouairi, I., Barhoumi, Z., Zarrouk, M., Chabi, W. and Djebali, W. (2010). Effects of exogenous salicylic acid pre-treatment on cadmium toxicity and leaf lipid content in *Linum usitatissimum* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73(5), 1004-1011.

Beyer, W. F. and Fridovich, I. (1987). Assaying for superoxide dismutase activity: Some large consequences of minor change in condition. *Analytical Biochemistry*, 161(2), 559-566.

Burd, G. I., Dixon D. G. and Glick, B. R. (2000). Plant growth-promoting bacteria that decrease heavy metal toxicity in plants. *Canadian Journal of Microbiology*, 46(3), 237-245.

Choudhary, M., Jetley U. K., Khan M. A., Zutshi, S. and Fatma, T. (2006). Effect of heavy metal stress on prolin, malondialdehyde, and superoxide dismutase activity in the cyanobacterium *Spirulina platensis*-S_5. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 66(2), 204-209.

Da Rosa Correa, A. X., Rorig, L. R., Verdinelli, M. A., Cotelle, S., Ferard, J. F. and Radetski, C. M. (2006). Cadmium phytotoxicity quantitative sensitivity relationships between classical endpoints and antioxidative enzyme biomarkers. *Science of the Total Environment*, 357(1-3), 120-127.

Dinakar, N., Nagajyyothi, P. C., Suresh, S., Damodharam, T. and Suresh, C. (2009). Cadmium induced changes on proline, antioxidant enzymes, nitrate and nitrite reductases in *Arachis hypogaea* L. *Journal of Environmental Biology*, 30(2), 289-294.

Ertan, T., Soran A., Kocer B. and Cengiz, O. (2002). Oxidative stress in hemorrhagic shock: Prospective clinical study. *Nagoya Medical Journal*, 45(2), 43-54.

Glick, B. R. (2003). Phytoremediation: Synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment. *Biotechnology Advances*, 21(5), 383-393.

Guillermo, O., Noriega, K. B., Balestrasse, A. B. and Tomaro, M. L. (2007). Cadmium induced oxidative stress in soybean plants also by the accumulation of d-aminolevulinic acid. *Biometals*, 20(6), 841-851.

Guoa, B., Liang, Y. C., Zhu, Y. G. and Zhao, F. J. (2007). Role of salicylic acid in alleviating oxidative damage in rice root subjected to cadmium stress. *Environmental Pollution*, 147(3), 743-749.

Ji, P., Sun, T., Song, Y., Ackland, M. and Liu, Y. (2011). Strategies for enhancing the phytoremediation of cadmium contaminated agricultural soils by *Solanum nigrum* L. *Environmental Pollution*, 159, 762-768.

John, R., Ahmad, P., Gadgil, K. and Sharma, S. (2009). Heavy metal toxicity: Effect on plant growth, biochemical parameters and metal accumulation by *Brassica juncea* L. *International Journal of Plant Production*, 3(3), 65-76.

Krantev, A., Yordanova, R., Janda, T., Szalai, G. and Popova, L. (2008). Treatment with salicylic acid decreases the effect of cadmium on photosynthesis in maiz plants. *Journal of Plant Physiology*, 165(3), 920-931.

Laspina, N. V., Groppa, M. D., Tomaro, M. L. and Benavides, M. P. (2005). Nitric oxide protects sunflower leaves against Cd-induced oxidative stress. *Plant Sciences*, 169(2), 323-330.

Lichtenthaler, H. (1987). Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods of Enzymology*, 148, 350-382.

Maksymiec, W. (2007). Signaling responses in plants to heavy metal stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 29, 177-187.

Mejare, M. and Bulow, L. (2001). Metal-binding proteins and peptides in bioremediation and phytoremediation of heavy metals review. *Trends in Biotechnology*, 19(2), 67-72.

Merquez-Garica, B. and Cordoba, F. (2010). Antioxidative system in wild populations of *Erica andevalensis*. *Environmental and Experimental Botany*, 68(1), 58-65.

Metwally, A., Finkemeier, I., Georgi, M. and Dietz, K. J. (2003). Salicylic acid alleviates the cadmium toxicity in barley seedlings. *Plant Physiology*, 132, 272-281.

Omar, M. H., Osman, W., Kasim, A. and El-Daim, L. A. (2009). Improvement of salt tolerance mechanisms of barley cultivated under salt stress using *Azospirillum brasilense*. *Salinity and Water Stress*, 44(2), 133-147.

Pandey, N. and Sharma, C. P. (2002). Effect of heavy metals on growth and metabolism of cabbage. *Plant Science*, 163(4), 753-758.

Radotic, K., Ducic, T. and Mutavdzic, D. (2000). Changes in peroxidase activity and isoenzymes in spruce needles after exposure to different concentrations of cadmium. *Environmental and Experimental Botany*, 44(2), 105-113.

Ramos, I., Esteban, E., Lucena, J. J. and Garate, A. (2002). Cadmium uptake and subcellular distribution in plants of *Lactuca* sp. Cd-Mn interaction. *Plant Science*, 162(5), 761-767.

Rastgoo, L. and Alemzadeh, A. (2011). Biochemical responses of Gouan (*Aeluropus littoralis*) to heavy metals stress. *Australian Journal of Crop Science*, 5(4), 375-383.

Reeves, P. G. and Chaney, R. L. (1999). Nutritional status affects the absorption and whole-body and organ retention of cadmium in rats fed rice-based diets. *Environmental Science & Technology*, 36(12), 2684-2692.

Sadeghi, O., Taghizadeh, M. and Solgi, M. (2019). The Effect of lead on the regeneration and the metal accumulation in *Brassica Oleracea* Var. Acephala by in vitro culture. *Plant Productions*, 42(2), 265-278. [In Farsi]

Sakalauskaite, J., Stanieene, G., Stanys, V., Duchovskis, P., Samuoliene, G., Baranauskis, K., Urbonaviciute, A., Revin, V. and Lukatkin, A. (2006). Cadmium resistance of apple rootstocks M.9 and B.396 *in vitro*. *Sodininkyste ir Darzininkyste*, 25(3), 273-282.

Sanita, D., Toppi, L. and Gabrielli, R. (1999). Review, response to Cd in higher plants. *Environmental and Experimental Botany*, 41(2), 105-130.

Schutzendubel, A., Nikolova, P., Rudolf, C. and Polle, A. (2001). Cadmium and H_2O_2-induced oxidative stress in *Populus Canescens* roots. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40(6-8), 577-584.

Sharma, I., Tripathi, B. N., Munjal, A. K., Baunthiyal, M., and Sharma, V. (2012). Metal Toxicity and Photosynthesis. In I. Shigeru, P. Mohanty, and K. N. Guruprasad (Eds), *Photosynthesis: Overviews on recent progress and future perspectives* (PP. 236-229). New Delhi, India: IK International Publishing House.

Shi, G., Liu, C., Cai, Q., Liu, Q. and Hou, C. (2010). Cadmium accumulation and tolerance of two safflower cultivars in relation to photosynthesis and antioxidative enzymes. *Bulletin of Environmental Contamination of Toxicology*, 85(3), 256-263.

Taghizadeh, M., Mohtadi, A. and Asemaneh, T. (2017). Investigating of copper effect on growth and physiological characteristics of *Nasturtium Officinale*. *Plant Productions*, 39(4), 101-114. [In Farsi]

Tanyolac, D., Ekmekci, Y. and Unalan, S. (2007). Changes in photochemical and antioxidant enzyme activities in maize (*Zea mays* L.) leaves exposed to excess copper. *Chemosphere*, 67(1), 89-98.

Vassillev, A., Berova, M., Stoeva, N. and Zlatev, Z. (2005). Chronic Cd toxicity of bean plants can be partially reduced by supply of ammonium sulphate. *Journal of Central European Agriculture*, 6(3), 389-396.

Wierzbicka, M. and Obidzinska, J. (1998). The effect of lead on seed imbibitions and germination in different plant species. *Plant Science*, 137(2), 155-171.

Zarrindast, M. R., Nasehi, M., Piri, M. and Bina, P. (2010). Anxiety-like behavior induced by histaminergic agents can be prevented by cannabinoidergic WIN55, 212-2 injected into the dorsal hippocampus in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 94(3), 387-96.

Zhang S., Chen M., Li T., Xu X. and Deng L. (2010). A newly found cadmium accumulator-*Malva sinensis* Cavan. *Journal of Hazardous Materials*, 173(1-3), 705-709.

Zhao, Z. Q., Zhu, Y. G., Kneer, R. and Smith, S. E. (2005). Effect of zinc on cadmium toxicity induced zinc on carrots: Growth and biomass accumulation. *Journal of Plant Nutrition*, 31(1), 19-34.

© 2019 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-Non Commercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)