

اثر کادمیوم بر میزان آتروپین و پارامترهای فیزیولوژیکی گیاه داتوره (*Datura stramonium L.*)

سمیرا ناطقی، سید مجید قادریان* و اکبر مستاجران

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۴/۲۳، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۸/۰۶/۰۲)

چکیده

القای محرک‌های غیرزیستی یکی از راهکارهایی است که با آن می‌توان سبب تغییرات کمی و کیفی متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی شد. کادمیوم به عنوان یکی از فلزات سنگین سمی و همچنین محرک‌های غیرزیستی در گیاهان باعث کاهش فتوسنتز، تنفس، متابولیسم کربوهیدرات‌ها و همچنین ایجاد کلروز و کاهش رشد می‌گردد. هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر غلظت‌های مختلف کادمیوم بر رشد، محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی، آنتوسیانین، پرولین، کربوهیدرات محلول و احیاء و تولید آتروپین در گیاه داتوره می‌باشد. به این منظور گیاه داتوره در گلدان‌های حاوی پرلیت کشت شده سپس گیاهان به مدت ۲ هفته برای پارامترهای فیزیولوژیکی و به مدت ۱۲ هفته برای بررسی میزان آتروپین تحت تیمار غلظت‌های ۰، ۱، ۵، ۱۵ و ۵۰ میلی‌گرم برلیتر کادمیوم قرار گرفتند. براساس نتایج حاصل، با افزایش غلظت کادمیوم رشد گیاه و مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی به طور معنی‌داری کاهش یافت. همچنین مقدار آنتوسیانین، کربوهیدرات محلول و احیاء و پرولین به طور معنی‌داری نسبت به نمونه شاهد به ترتیب تا ۰/۵۶٪، ۳۱/۵٪، ۴۰/۵٪ و ۶۲/۷٪ افزایش یافت. همچنین افزایش کادمیوم در محیط کشت منجر به افزایش معنی‌دار میزان آتروپین در گیاه گردید. به طور کلی کادمیوم به عنوان یک تنش غیرزیستی منجر به افزایش مکانیسم‌های دفاعی گیاه داتوره از جمله کربوهیدرات‌ها، پرولین، آنتوسیانین و آلکالوئیدهای تروپانی (آتروپین) می‌گردد.

واژگان کلیدی: آتروپین، پرولین، داتوره (*Datura stramonium L.*)، رنگیزه‌های فتوسنتزی، فلزات سنگین.

مقدمه

ماهچه‌های صاف ناشی از ترکیبات فسفره آلی و کاهش ترشح عرق و اسید معده اشاره نمود (Kennedy and Wightman, 2011). در سال‌های گذشته توجه زیادی به امکان افزایش میزان متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی معطوف شده است و رویکردهای گوناگونی برای افزایش میزان تولید آنها به وسیله تحقیقات فراوان آزموده شده است (Rao and Ravishanker, 2002). با این حال آلکالوئیدهای تروپان هنوز هم به طور تجارتي از گیاهان دارویی استخراج می‌شوند و تا امروز گیاهان به عنوان تنها منبع آلکالوئیدهای تروپان باقی مانده اند (Chevallier and Kindersley, 1996) اگرچه سنتز این آلکالوئیدها در اصل تحت

گیاهان منابعی غنی از متابولیت‌های ثانویه هستند. آلکالوئیدها گروه مهمی از متابولیت‌های ثانویه گیاهان را تشکیل می‌دهند. گروهی از آلکالوئیدها به نام آلکالوئیدهای تروپانی به طور عمده در گیاهان خانواده‌ی سبب‌زمینی به ویژه در گیاه داتوره (*Datura stramonium L.*) وجود دارند (Ashtiana and Sefidkon, 2011). آلکالوئیدهای تروپانی از جمله آتروپین، کاربردهای مختلفی در پزشکی دارند که می‌توان به مواردی مانند تسکین علائم بیماری پارکینسون، گشاد کردن مردمک چشم، افزایش ضربان قلب، خنثی کردن سستی

*نویسنده مسؤول، نشانی پست الکترونیکی: ghaderian_m@yahoo.com

جلوگیری می‌کند (Fusconi et al 2007). کاهش وزن اندام‌ها به علت اختلال در متابولیسم کلی سلول‌ها است. نتایج حاصل از مطالعات نشان داده است که میزان پراکسیداسیون چربی‌ها در حضور یون کادمیوم به علت افزایش مقدار پراکسید هیدروژن در سلول افزایش می‌یابد. این وضعیت باعث برهم خوردن تعادل آبی و تغذیه ای سلول می‌شود، که یکی از مهم‌ترین دلایل کاهش وزن گیاه می‌باشد (Sanita di Toppi and Gabbrielli, 1999).

از جمله نقش‌های اصلی آنتوسیانین‌ها می‌توان به نقش آنتی‌اکسیدانی و محافظت سیستم فتوسنتزی در برابر فتواکسیداسیون اشاره نمود (Jamshidi et al., 2010). Dai و همکاران (۲۰۱۲) نشان دادند که در گیاه *Azolla imbricate* رشد یافته تحت سمیت کادمیوم، آنتوسیانین‌ها ممکن است با فعالیت آنتی‌اکسیدانی در باند شدن به فلزات سنگین در کاهش تنش نقش داشته باشند. تحت تنش کادمیوم افزایش پرولین به عنوان یک عامل حفاظتی واقع می‌شود، این حالت به دلیل بر هم خوردن تعادل آبی سلول بوده که در اثر افزایش غلظت فلز حاصل شده است (Talanova et al., 2000). در آراییدوپسیس، افزایش غلظت پرولین در اثر افزایش غلظت کادمیوم گزارش گردیده است (Xu et al., 2010). در بسیاری از گیاهان نقش کربوهیدرات‌ها به عنوان یک عامل تنظیم کننده اسمزی در تنش‌های محیطی پذیرفته شده است. چندین گزارش بر روی تجمع کربوهیدرات در تنش‌های زیستی و غیر زیستی وجود دارد (Pagter et al., 2005). گزارش شده است که کادمیوم سبب افزایش قندهای احیاء کننده در گیاه برنج (*Oryza sativa*) می‌شود (Verma and Dubey, 2001). در تحقیق حاضر، مقاومت گیاه داتوره نسبت به غلظت‌های مختلف کادمیوم و تأثیر این فلزسنگین بر برخی شاخص‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی این گیاه مورد ارزیابی قرار گرفته است. همچنین اثر کادمیوم به عنوان یک عامل تنش‌زای محیطی بر تغییرات کمی ترکیب طبیعی آتروپین در این گیاه بررسی شده است.

کنترل فرایندهای ژنتیکی است، ولی به طور آشکار تحت تأثیر عوامل محیطی و تغییرات آنها قرار می‌گیرند (Zhao et al., 2000). بنابراین از آنجایی که عوامل محیطی نقش عمده ای در فرآیند بیوسنتزی متابولیت‌های ثانویه دارند بررسی تأثیر آنها روی این فرآورده‌ها ضروری است. از جمله عوامل محیطی، اثر تنش فلزات سنگین بر تولید متابولیت‌های ثانویه نظیر آلکالوئیدها می‌باشد.

در گیاهان تحت تنش، تجمع متابولیت‌های ثانویه اغلب به واسطه مولکول‌های سیگنالی و محرک‌ها اتفاق می‌افتد. متابولیت‌های ثانویه دارای عملکرد حفاظتی در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی هستند (Ramakrishna and Ravishanker, 2011). فلزات سنگین ممکن است نقش مهمی در راه اندازی ژن‌های گیاه برای تغییر متابولیت ثانویه ایفا کنند. استرس‌های اکسیداتیو القا شده توسط فلز سنگین مسیر سیگنالی را راه اندازی می‌کند که تولید متابولیت‌های گیاه را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Srivastava et al., 2001). گزارش شده است که کادمیوم کلرید، موجب افزایش تولید دو نوع تروپان آلکالوئیدی به نام‌های اسکوپولامین و هیوسیانین در گیاه *brugmanisa* *Candida* می‌شود (Ramakrishna and Ravishanker, 2011). سمیت کادمیوم در گیاهان باعث کاهش فتوسنتز و تنفس، ایجاد کلروز و کاهش رشد می‌گردد (Sun and Shen, 2007). این عنصر باعث تشکیل گونه‌های فعال اکسیژن و در نتیجه ایجاد استرس‌های اکسیداتیو می‌شود (Hossain et al., 2010). برهمکنش بین یون‌های کادمیوم و منگنز در سلول می‌تواند دلیل احتمالی مهار انتقال الکترون در سطح کمپلکس شکست آب باشد که در نهایت باعث کاهش محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی کلروفیل و کاروتنوئید نیز می‌گردد (Jason, 1978). کاهش آهن و منیزیم نیز در برگ‌های چغندر قند تیمارشده با کادمیوم دیده شده است، کاهش این دو عنصر خود سبب کاهش کلروفیل می‌شود (Lee and Leustek, 1999). در حضور کادمیوم رشد گیاه بسیار کاهش می‌یابد، درحقیقت کادمیوم از تقسیم سلول‌های منطقه مریستم و رشد سلول‌های منطقه رشد

مواد و روش‌ها

کشت و جوانه زنی گیاه: به منظور بررسی اثر کادمیوم بر میزان آتروپین و برخی از ویژگی‌های فیزیولوژیکی گیاه داتوره، بذرتوده شیرازی این گیاه از شرکت پاکان بذرافشان تهیه گردید. در آزمایشگاه برای کشت بذر، از گلدان‌های پلاستیکی با قطر ۹ سانتی متر که شامل مخلوطی از پرلیت ریز و درشت بود استفاده گردید. ابتدا بذرها به وسیله‌ی الکل ۷۰٪ به مدت ۱ دقیقه و سپس هیپوکلریت سدیم ۳٪ به مدت ۱۵ دقیقه استریل شدند و سپس در هر گلدان تعداد ۱۰ عدد بذر گیاه داتوره کاشته شد و ۳ تکرار در هر غلظت از تیمار در نظر گرفته شد. گلدان‌ها در قالب طرح آماری کاملاً تصادفی و در اتاقک کشت تحت شرایط محیطی کنترل شده، تناوب نور (۱۶ ساعت روشنایی، ۸ ساعت تاریکی) و دمای متناوب (۲۵ درجه سانتی گراد در روز و ۱۶ درجه سانتی گراد در شب) و شدت نوری (۲۰۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه) قرار داده شدند. پس از گذشت ۳ روز آبیاری با آب مقطر گیاهچه‌های حاصل به مدت ۳۰ روز با محلول غذایی تغییر یافته یک چهارم قدرت هوگلدن تغذیه شدند (Mohtadi et al., 2012). سپس گیاهچه‌ها جهت بررسی اثر کادمیوم بر میزان آتروپین به علت تشکیل این آلکالوئید در مرحله‌ی پیش از گل دهی به مدت ۹۰ روز تحت تاثیر غلظت‌های مختلف کادمیوم کلرید ($CdCl_2 \cdot 5H_2O$) قرار گرفتند. در حالی که برای بررسی سایر ویژگی‌های فیزیولوژیکی، گیاهچه‌ها به مدت ۱۴ روز تحت تیمار بودند. تیمارها به صورت ۰، ۱، ۵، ۱۵ و ۵۰ میلی گرم بر لیتر کادمیوم و بر اساس آزمایشات مقدماتی انتخاب و اعمال گردیدند. همچنین با توجه به سمیت شدید کادمیوم در گیاهان، غلظت‌های کم کادمیوم در فواصل کمتر و غلظت‌های بالاتر آن در فواصل بیشتری انتخاب شدند. لازم به ذکر است که بر اساس اصول تغذیه معدنی و تحت غلظت‌های اعمال شده در این آزمایش، کلر حالت سمی بر گیاه ندارد (Marschner, 2012). pH محلول‌های غذایی در محدوده‌ی ۶-۵/۷ تنظیم گردید.

تعیین میزان انباشتگی کادمیوم در بخش‌های هوایی: کادمیوم موجود در نمونه‌های گیاهی بر اساس روش Reeves و

همکاران (۱۹۹۹) اندازه‌گیری شد. به منظور اندازه‌گیری میزان فلز تجمع یافته در بخش‌های هوایی گیاه ۰/۱ گرم از برگ گیاهان به طور مجزا خشک گردید و سپس خرد شدند و درون لوله‌های آزمایش شیشه‌ای ریخته شدند. به هر نمونه ۲ میلی لیتر اسید نیتریک ۶۵ درصد اضافه شد و درب نمونه‌ها با فویل آلومینیومی بسته گردید، سپس در بن ماری در دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳ ساعت قرار داده شدند. در این مرحله محلول بی رنگ می‌شود. پس از آن به هر نمونه ۱ میلی لیتر پراکسید هیدروژن اضافه گردید و به مدت ۲۰ دقیقه در بن ماری در حال جوش قرار داده شد. سپس محلول‌ها صاف شده و حجم محلول به کمک آب مقطر به ۱۰ میلی لیتر رسانده شد. مقدار عنصر کادمیوم موجود در نمونه‌ها توسط دستگاه طیف سنج جذب اتمی (AAS, Shimadzu model 6200) مورد اندازه‌گیری قرار گرفت و به کمک رابطه‌ی زیر مقدار عنصر موجود در نمونه‌های گیاهی محاسبه گردید.

$$X = \frac{A \times B}{Dw}$$

X میزان عنصر موجود در نمونه‌های گیاهی بر حسب میکرو گرم بر گرم (میلی گرم بر کیلوگرم) بافت خشک گیاه: A عدد نشان داده شده توسط دستگاه طیف سنج: B رقت نمونه بر حسب میلی لیتر: DW مقدار نمونه گیاهی توزین شده بر حسب گرم

اندازه‌گیری طول اندام‌های هوایی و ریشه: در پایان تیماردهی ۱۴ روز گیاه، طول ساقه و ریشه با استفاده از خط‌کش اندازه‌گیری گردید. طول ساقه از یقه تا قسمت انتهایی ساقه و طول ریشه از یقه تا انتهایی ریشه در نظر گرفته شد. برای هر تیمار ۳ تکرار در نظر گرفته شد و مقادیر بر اساس سانتی متر گزارش گردید.

تعیین وزن خشک: پس از مدت تیماردهی ۱۴ روز گیاه، نمونه‌های گیاهی، جمع‌آوری شده و با آب مقطر شسته شدند تا کادمیوم سطحی سلول‌های ریشه شسته شوند. سپس هر گیاهچه به بخش هوایی و ریشه تقسیم و در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت در آون خشک گردید. سپس میزان وزن خشک بخش هوایی و ریشه گیاه در هر غلظت و در همه تکرارها تعیین شد.

بافت گیاهی مورد نیاز را به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد خشک کرده و سپس ۰/۰۱ گرم از بافت خشک به تعداد ۳ تکرار در هر تیمار توزین گردید و با ۱۰ میلی لیتر آب مقطر گرم در هاون سائیده شد و با کمک کاغذ صافی صاف گردید.

اندازه‌گیری کربوهیدرات محلول: برای اندازه‌گیری کربوهیدرات‌های محلول، ۲ میلی لیتر از عصاره گیاهی استخراج شده با ۵۰ میکرولیتر (۲ میلی لیتر) فنل ۸۰ درصد وزنی (حل شده در آب مقطر) مخلوط کرده و سپس ۵ میلی لیتر اسید سولفوریک غلیظ به صورت عمود بر سطح مایع آن اضافه شد. این ترکیب به مدت ۱۰ دقیقه در محیط نگهداری شده و پس از آن به مدت ۱۵ دقیقه در حمام آب گرم ۲۵ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و سپس جذب محلول در ۴۹۰ نانومتر خوانده شد (Dubois et al., 1956). سپس منحنی استاندارد رسم شده و مقدار کربوهیدرات محلول با کمک نمودار و براساس رابطه زیر در یک گرم بافت گیاهی به دست آمد.

$$X = \frac{A \times B}{D \times W}$$

اندازه‌گیری آنتوسیانین: برای اندازه‌گیری آنتوسیانین از روش Wagner (۱۹۷۹) استفاده شد. در این روش ۱۰۰ میلی گرم بافت تر برگ به تعداد ۳ تکرار در هر تیمار وزن گردید. سپس با استفاده از ۱۰ میلی لیتر متانول اسیدی (متانول خالص) و اسیدکلریک خالص به نسبت حجمی (۹۹:۱) درون هاون چینی یک دست شد تا در نهایت محلولی همگن به دست آمد. عصاره حاصل به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. پس از آن عصاره حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در ۴۰۰۰ rpm سانتریفیوژ گردید و جذب محلول رویی در ۵۵۰ نانومتر خوانده شد. غلظت آنتوسیانین در هر نمونه با ضریب خاموشی $33000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ طبق رابطه زیر محاسبه گردید.

استخراج و سنجش رنگیزه‌های فتوسنتزی: ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت تر برگ به تعداد ۳ تکرار در هر تیمار وزن شد و سپس با استفاده از ۵ میلی لیتر استون ۸۰٪ حجمی در محیطی تاریک و در روی یخ درون هاون چینی یک دست گردید تا در نهایت محلولی همگن به دست آمد. سپس عصاره حاصل صاف گردید و حجم محلول به کمک استون ۸۰٪ به ۱۰ میلی لیتر رسانده شد. سپس جذب محلول‌های به دست آمده به کمک اسپکتروفوتومتر در طول موج‌های ۴۱۲ و ۴۳۱ و ۴۶۰ و ۴۸۰ و ۶۴۵ و ۶۶۳ نانومتر اندازه‌گیری شد. میزان کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل (Arnon, 1949) و کاروتنوئید (Sen and Saini, 1969) طبق رابطه‌های زیر برحسب میلی‌گرم برگرم وزن تر محاسبه گردید..

$$\begin{aligned} \text{Chla}(\text{mg/g}) &= [12.7(D_{663}) - 2.69(D_{645})] \times \frac{V}{1000} \times \frac{1}{W} \\ \text{Chlb}(\text{mg/g}) &= [22.9(D_{645}) - 4.68(D_{663})] \times \frac{V}{1000} \times \frac{1}{W} \\ \text{Total chla+b}(\text{mg/g}) &= [20.2(D_{645}) + 8.02(D_{663})] \times \frac{V}{1000} \times \frac{1}{W} \\ \text{Car}(\text{mg/g}) &= (-0.43(D_{412}) + (0.215(D_{431}) + (-4.376(D_{460}) + (13.246(D_{480}))) \end{aligned}$$

اندازه‌گیری آنتوسیانین: برای اندازه‌گیری آنتوسیانین از روش Wagner (۱۹۷۹) استفاده شد. در این روش ۱۰۰ میلی گرم بافت تر برگ به تعداد ۳ تکرار در هر تیمار وزن گردید. سپس با استفاده از ۱۰ میلی لیتر متانول اسیدی (متانول خالص) و اسیدکلریک خالص به نسبت حجمی (۹۹:۱) درون هاون چینی یک دست شد تا در نهایت محلولی همگن به دست آمد. عصاره حاصل به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. پس از آن عصاره حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در ۴۰۰۰ rpm سانتریفیوژ گردید و جذب محلول رویی در ۵۵۰ نانومتر خوانده شد. غلظت آنتوسیانین در هر نمونه با ضریب خاموشی $33000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ طبق رابطه زیر محاسبه گردید.

$A = \epsilon \cdot b \cdot C$
 A میزان جذب نوری عصاره: ϵ ضریب خاموشی ($\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)
 b عرض کووت (۱ cm): C غلظت نمونه برحسب مولار
 استخراج قند از بافت‌های گیاهی: برای استخراج قند،

یک دست کردن بافت گیاه بر حسب میلی لیتر (1.7 ml): FW مقدار نمونه گیاهی توزین شده بر حسب گرم

آنالیز میزان آلکالوئید آتروپین در گیاه داتوره: پس از خشک کردن کامل بخش هوایی در شرایط محیطی آزمایشگاه، وزن خشک آنها اندازه‌گیری شد. پس از آن بخش هوایی پودر شده و برای مرحله عصاره‌گیری آماده گردیدند. برای عصاره‌گیری، مجموع سه تکرار مربوط به بخش هوایی خشک شده‌ی هر نمونه در ویال‌های جداگانه ای ریخته و بر روی آن ۸ میلی لیتر از اتانول ۹۹/۶٪ اضافه شد. سپس ویال‌ها در دستگاه سونیکاتور به مدت ۱ ساعت با دمای ۵۰ درجه سانتیگراد تحت امواج اولتراسونیک قرار گرفت تا عصاره‌ی داخل بخش هوایی بوسیله این امواج خارج گردند. پس از آن به مدت ۲۴ ساعت، در شرایط محیطی آزمایشگاه قرار داده شد تا عصاره‌ی بخش‌هوایی کاملاً خارج شوند و به دنبال آن با پیپت پاستور عصاره‌های محلول در اتانول خارج گردیدند و در شرایط آزمایشگاه، اتانول آن کاملاً تبخیر شد. سپس ۲ میلی لیتر از محلول اتر آمونیاک ۱۴٪ با نسبت ۱۰:۱ (pH=۸)، به هر نمونه اضافه شد. در این حالت دو فاز جدا از هم قابل تشخیص بود که فاز حاوی عصاره و اتر آمونیاک انتخاب گردید. بعد از آن سدیم سولفات به منظور رسوب دادن آمونیاک به این فاز اضافه و فاز محلول از رسوب جداسازی شد. فاز محلول بوسیله اتر در مرحله مورد شستشو قرار گرفت و در هر مرحله، ۲ میلی لیتر اتر برای هر نمونه استفاده شد. سپس این محلول در شرایط آزمایشگاه کاملاً خشک گردید و به هر نمونه ۲ میلی لیتر بافر فسفات با pH=۳ اضافه شد.

بافرسفات با ۰/۷۸ g/L از NaH₂PO₄ و ۰/۲ میلی لیتر از H₃PO₄ تهیه گردید. علاوه بر آن، pH این بافر با اسیدسولفوریک (۰/۰۱٪) بر روی عدد ۳ تنظیم شد. نمونه‌ها تا زمان اجرای تزریق به دستگاه HPLC (مدل Germany Knauer)، در یخچال با دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

روش آنالیز داده‌ها: تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار Excel (مدل ۲۰۱۰ برای ویندوز) و SPSS (مدل ۲۳ برای ویندوز) انجام شد. به منظور تعیین معنی‌دار بودن

لیتر از محلول‌های استاندارد گلوکز برداشته و ۱ میلی لیتر معرف DNS به آن اضافه شده و به طور کامل مخلوط گردید و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و در ۵۴۶ نانومتر جذب آن‌ها خوانده شد. سپس منحنی استاندارد رسم شده و مقدار کربوهیدرات احیا با کمک این نمودار و براساس رابطه زیر در یک گرم بافت گیاهی به دست آمد.

$$X = \frac{A \times B}{DW}$$

X مقدار کربوهیدرات محلول بر حسب میلی گرم در گرم بافت خشک: A مقدار کربوهیدرات محلول به دست آمده از نمودار استاندارد بر حسب میلی گرم بر میلی لیتر: B ضریب رقت (۱۰ میلی لیتر): DW مقدار نمونه گیاهی توزین شده بر حسب گرم

سنجش و اندازه‌گیری پرولین: برای اندازه‌گیری پرولین از

روش Bates و همکاران (۱۹۷۳) استفاده گردید. برای این منظور ۰/۰۴ گرم از نمونه‌های تازه گیاهی ریز شده و درون ۱۰ میلی لیتر اسید سولفوسالیسیلیک ۳٪ ریخته و به مدت ۴۸ ساعت در محیط آزمایشگاه قرار داده شد. سپس ۲ میلی لیتر از محلول را به لوله آزمایش انتقال داده و ۲ میلی لیتر معرف نین هیدرین و ۲ میلی لیتر اسید استیک غلیظ اضافه گردید و به مدت ۱ ساعت درون حمام آب گرم ۱۰۰ درجه سلسیوس قرار داده شد، سپس لوله‌ها درون یخ قرار داده شد و پس از سرد شدن محلول‌ها، ۴ میلی لیتر تولوئن به هر لوله اضافه گردید و به مدت ۳۰-۱۵ ثانیه توسط همزن برقی بهم زده شد و دو فاز ایجاد گردید. آنگاه میزان جذب فاز رویی در طول موج ۵۲۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. از پرولین با غلظت‌های مختلف برای رسم نمودار منحنی استاندارد استفاده گردید و برای جذب‌های اندازه‌گیری شده با استفاده از منحنی استاندارد، غلظت پرولین در گرم بافت تازه بر حسب میکرومول بدست آمد.

$$X = \frac{A \times C}{Fw \times 1000}$$

X مقدار پرولین بافت بر حسب میکرومول در گرم بافت تازه: A مقدار پرولین به دست آمده از نمودار استاندارد بر حسب میکرومول: C مقدار اسید سولفوسالیسیلیک استفاده شده برای

اختلاف بین میانگین‌ها در تیمارهای مختلف از آزمون دانکن استفاده شد.

نتایج

میزان انباشتگی کادمیوم در بخش هوایی: میزان فلز تجمع یافته تحت اثر غلظت‌های مختلف کادمیوم در بخش هوایی گیاه داتوره در شکل ۱ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که میزان فلزتجمع یافته در گیاه تحت اثر غلظت‌های مختلف کادمیوم در بخش هوایی ۱۴ روز پس از تیمار دهی در سطح ۵ درصد معنی دار بود و با افزایش غلظت کادمیوم به طور معنی داری به میزان فلز جذب شده و تجمع یافته در گیاه افزوده شد ($P < 0/05$). به طوری که در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر کادمیم بیشترین میزان تجمع فلز به مقدار ۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم مشاهده شد.

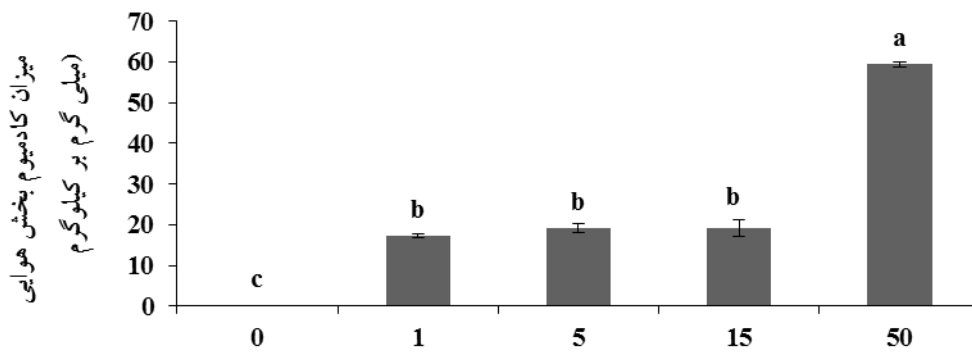
طول ریشه و بخش هوایی: اثر غلظت‌های مختلف کادمیوم بر طول ریشه و بخش هوایی گیاه داتوره در شرایط کشت گلدانی پس از ۱۴ روز تیماردهی در شکل ۲ نشان داده شده است. براساس این نتایج، اثر غلظت‌های ۱، ۵، ۱۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر کادمیوم بر طول بخش هوایی گیاه، ۱۴ روز پس از تیمار در سطح ۵ درصد نسبت به گیاه شاهد معنی‌دار بود ($P < 0/05$). همچنین همانطور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، طول ریشه گیاهچه‌ها در تیمار با کادمیوم نسبت به گیاه شاهد کاهش معنی‌داری را نشان داد ($P < 0/05$). به طوری که در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر کادمیم بیشترین کاهش طول ریشه و بخش هوایی را نسبت به گیاه شاهد نشان می‌دهد.

وزن خشک بخش هوایی: اثر غلظت‌های مختلف کادمیوم بر وزن خشک بخش هوایی گیاه داتوره در شرایط گلدانی پس از ۱۴ روز تیماردهی در شکل ۳ نشان داده شده است. براساس این نتایج، در غلظت ۵، ۱۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر کادمیوم، وزن خشک بخش هوایی گیاهچه‌ها به طور معنی‌داری نسبت به گیاه شاهد کاهش نشان می‌دهد ($P < 0/05$). طبق نمودار بیشترین کاهش وزن خشک ساقه در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر کادمیم مشاهده شد.

مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی بخش هوایی: اثر غلظت‌های مختلف کادمیوم بر مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی گیاه داتوره، ۱۴ روز پس از تیماردهی، در شکل ۴ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که اعمال تیمارهای ۱، ۵، ۱۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر کادمیوم، موجب کاهش معنی‌دار کلروفیل a شده است ($P < 0/05$). همچنین در مورد کلروفیل b، نتایج نشان داد که اثر تیمارهای ۱، ۵، ۱۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر کادمیوم بر کلروفیل b معنی‌دار بوده است ($P < 0/05$). بیشترین کاهش در مقدار کلروفیل b در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر کادمیوم مشاهده شد. همچنین افزایش غلظت کادمیوم در محیط کشت، موجب کاهش در مقدار کل گریدید که این کاهش در غلظت‌های ۱، ۵، ۱۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر کادمیوم نسبت به گیاه شاهد در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود ($P < 0/05$).

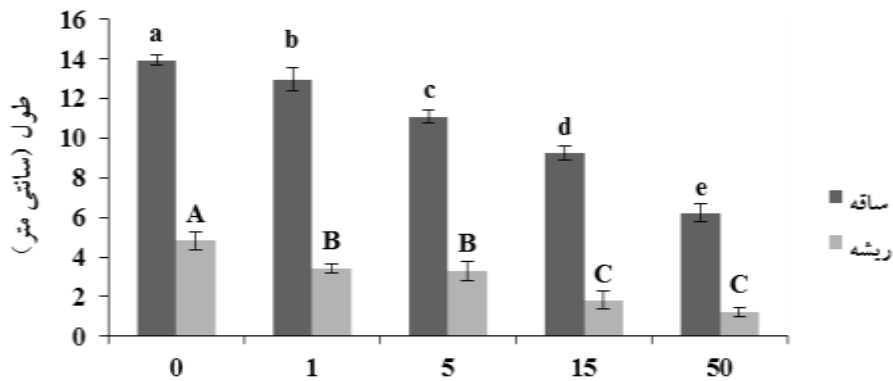
مقدار کاروتنوئید بخش هوایی: اثر غلظت‌های مختلف کادمیوم بر مقدار کاروتنوئید گیاه داتوره، ۱۴ روز پس از تیماردهی، در شکل ۵ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که اعمال تیمار ۱، ۵، ۱۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر کادمیوم، موجب کاهش معنی‌دار کاروتنوئید شده است ($P < 0/05$). بیشترین کاهش در مقدار کاروتنوئید در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر کادمیوم مشاهده شد.

مقدار آنتوسیانین موجود در بخش هوایی: اثر غلظت‌های مختلف کادمیوم بر مقدار آنتوسیانین موجود در گیاه داتوره در شکل ۶ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که اثر غلظت‌های مختلف کادمیوم بر مقدار آنتوسیانین موجود در بخش هوایی گیاه داتوره در سطح ۵ درصد معنی‌داری بود ($P < 0/05$). اعمال تیمارهای ۵، ۱۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر کادمیوم موجب افزایش معنی‌دار مقدار آنتوسیانین نسبت به شاهد می‌گردد و بین تیمارها و شاهد اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($P < 0/05$). بیشترین مقدار آنتوسیانین در تیمار ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر کادمیوم بعد از ۱۴ روز تیماردهی مشاهده شد. براساس نتایج این تحقیق، چنین استنباط شد که غلظت‌های بالای کادمیوم بر مقدار آنتوسیانین موجود در بخش هوایی گیاه داتوره تأثیر گذاشته و موجب افزایش مقدار این رنگیزه‌ها شده است. در



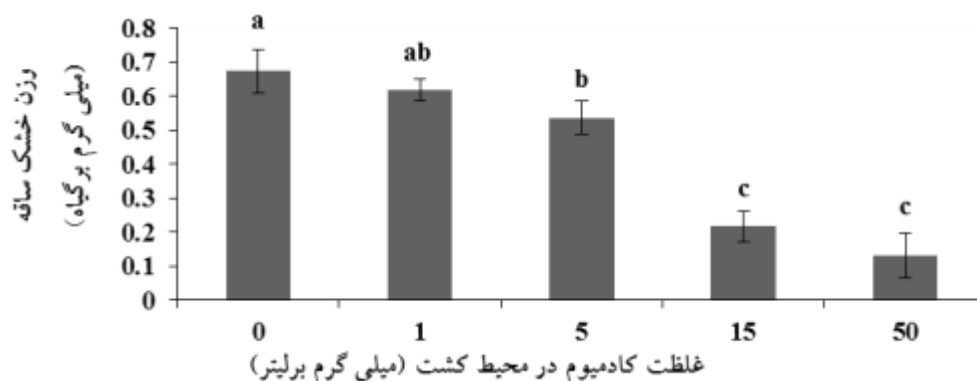
غلظت کادمیوم در محیط کشت (میلی گرم بر لیتر)

شکل ۱- اثر غلظت‌های مختلف کادمیوم محیط کشت بر میزان انباشتگی کادمیوم در بخش هوایی گیاه داتوره بعد از دو هفته تیمار دهی. مقادیر حاصل از میانگین سه تکرار از هر تیمار \pm خطای استاندارد می‌باشد. وجود حروف متفاوت بیانگر تفاوت معنی دار بین تیمارها بر اساس آزمون دانکن می‌باشد ($P < 0/05$).

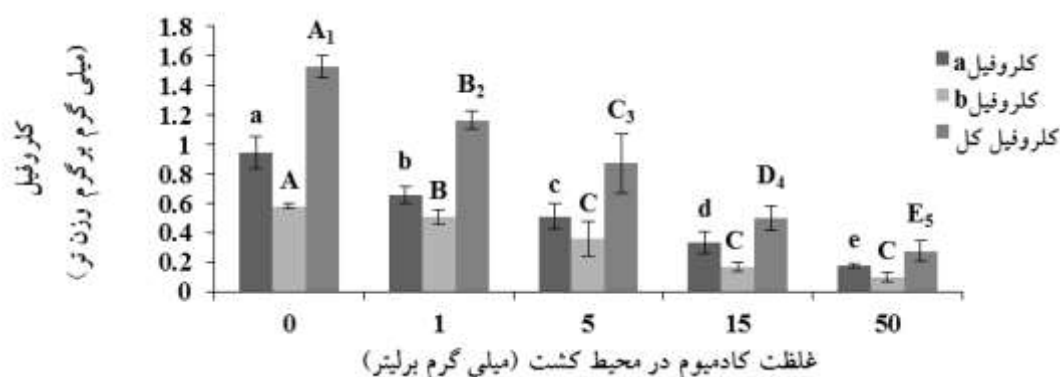


غلظت کادمیوم در محیط کشت (میلی گرم بر لیتر)

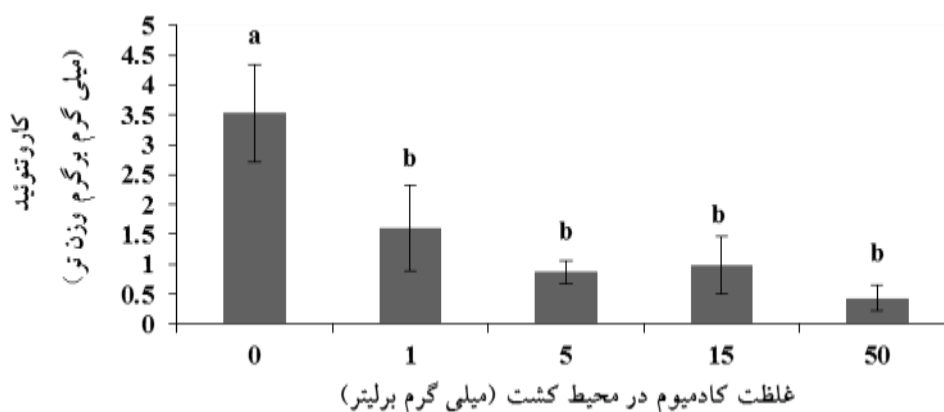
شکل ۲- اثر غلظت‌های مختلف کادمیوم محیط کشت بر طول ریشه و بخش هوایی گیاه داتوره بعد از دو هفته تیمار دهی. مقادیر حاصل از میانگین سه تکرار از هر تیمار \pm خطای استاندارد می‌باشد. وجود حروف متفاوت بیانگر تفاوت معنی دار بین تیمارها بر اساس آزمون دانکن می‌باشد ($P < 0/05$).



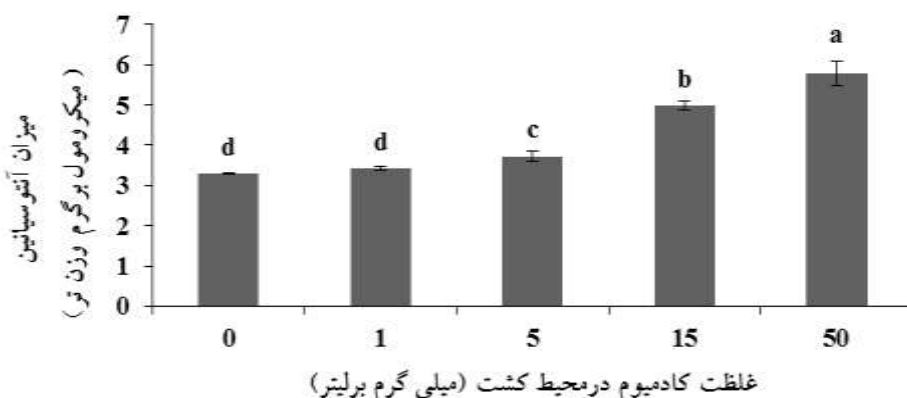
شکل ۳- اثر غلظت‌های مختلف کادمیوم محیط کشت بر وزن خشک بخش هوایی گیاه داتوره بعد از دو هفته تیمار دهی. مقادیر حاصل از میانگین سه تکرار از هر تیمار \pm خطای استاندارد می‌باشد. وجود حروف متفاوت بیانگر تفاوت معنی دار بین تیمارها بر اساس آزمون دانکن می‌باشد ($P < 0/05$).



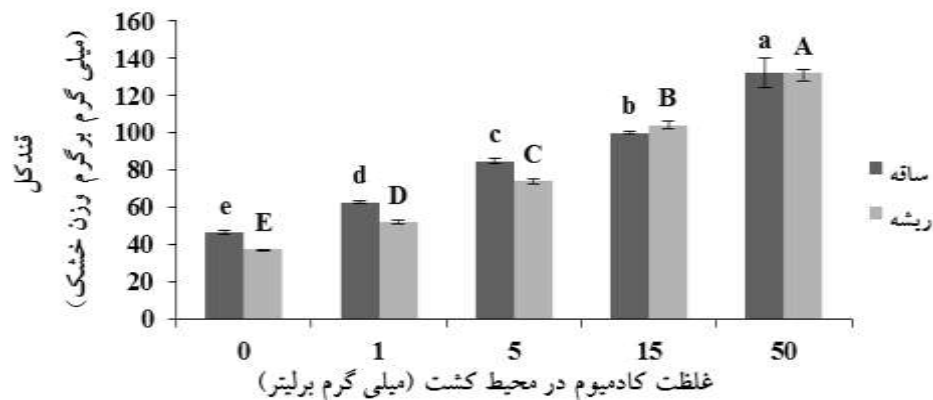
شکل ۴- اثر غلظت‌های مختلف کادمیوم محیط کشت بر مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی در بخش هوایی گیاه داتوره بعد از دو هفته تیماردهی. مقادیر حاصل از میانگین سه تکرار از هر تیمار \pm خطای استاندارد می‌باشد. وجود حروف متفاوت بیانگر تفاوت معنی‌دار بین تیمارها براساس آزمون دانکن می‌باشد ($P < 0/05$).



شکل ۵- اثر غلظت‌های مختلف کادمیوم محیط کشت بر مقدار کاروتنوئید در بخش هوایی گیاه داتوره بعد از دو هفته تیماردهی. مقادیر حاصل از میانگین سه تکرار از هر تیمار \pm خطای استاندارد می‌باشد. وجود حروف متفاوت بیانگر تفاوت معنی‌دار بین تیمارها براساس آزمون دانکن می‌باشد ($P < 0/05$).



شکل ۶- مقایسه تغییرات مقدار آنتوسیانین در برگ‌های گیاه داتوره تحت غلظت‌های مختلف کادمیوم در محیط کشت بعد از دو هفته تیماردهی. مقادیر میانگین سه تکرار از هر غلظت \pm خطای استاندارد می‌باشد. حروف متفاوت در هر گروه بیانگر تفاوت بودن اثر غلظت‌های مختلف کادمیوم بر مقدار آنتوسیانین براساس آزمون دانکن می‌باشد ($P < 0/05$).



شکل ۷- اثر غلظت‌های مختلف کادمیوم محیط کشت بر مقدار قند کل موجود در ریشه و بخش‌های هوایی گیاه داتوره بعد از دو هفته تیماردهی. مقادیر حاصل از میانگین سه تکرار از هر تیمار \pm خطای استاندارد می‌باشد. وجود حروف متفاوت بیانگر تفاوت معنی‌دار بین تیمارها بر اساس آزمون دانکن می‌باشد ($P < 0.05$).

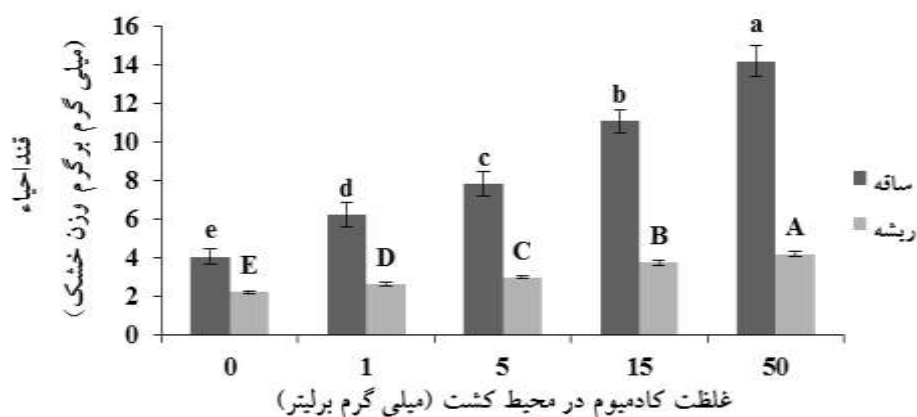
موجود در ریشه گیاه، ۴ روز پس از تیماردهی در سطح ۵ درصد نسبت به گیاه شاهد معنی‌دار بود ($P < 0.05$). همچنین همان طور که در شکل ۸ مشاهده می‌شود، با افزایش غلظت کادمیوم در محیط کشت، مقدار قند احیاء موجود در بخش‌های هوایی نیز روند رو به افزایشی را نشان داد که این مقدار در غلظت‌های ۱، ۵، ۱۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر کادمیوم، نسبت به گیاه شاهد معنی‌دار بود ($P < 0.05$). براساس این نتایج، اعمال تیمارهای مختلف کادمیوم باعث افزایش میزان قندهای محلول در ریشه و بخش‌های هوایی گیاه گردید، همچنین غلظت‌های بالای این ترکیبات در محیط کشت، موجب افزایش کربوهیدرات احیاء در ریشه و بخش‌های هوایی گیاه گردید. میزان افزایش قند محلول، در مورد تیمار گیاه با بالاترین غلظت کادمیوم ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر موجب افزایش تقریباً ۳ برابری در ریشه و افزایش ۳ برابری در بخش‌های هوایی نسبت به گیاه شاهد گردید. میزان افزایش قند احیاء نیز در مورد تیمار گیاه با بالاترین غلظت کادمیوم ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر موجب افزایش ۴ برابری در ریشه نسبت به گیاه شاهد گردید.

مقدار پرولین موجود در ریشه و بخش‌های هوایی: اثر غلظت‌های مختلف کادمیوم بر مقدار پرولین موجود در ریشه و بخش‌های هوایی گیاه داتوره در شرایط کشت گلدانی در شکل ۸ نشان داده شده است. براساس این نتایج، اثر غلظت‌های ۱، ۵، ۱۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر کادمیوم بر مقدار قند احیاء

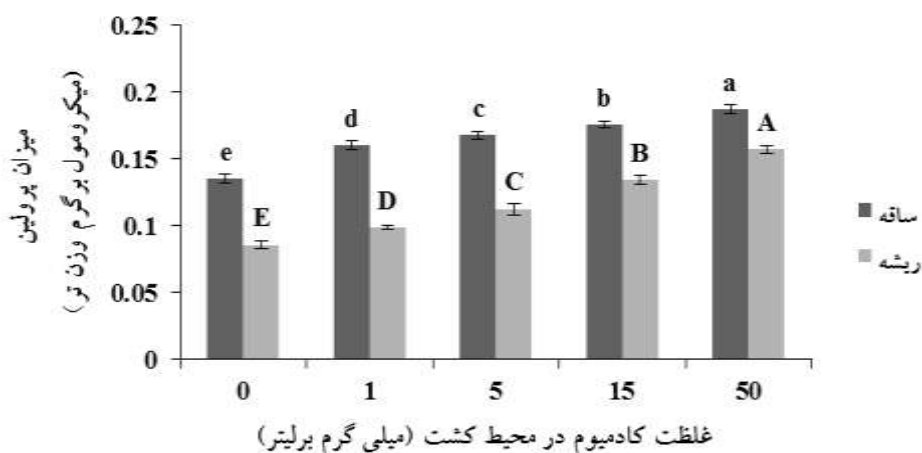
مورد تیمارگیاه با بالاترین غلظت کادمیوم ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، مقدار آنتوسیانین بعد از ۱۴ روز تیماردهی تقریباً افزایش ۲ برابری را نسبت به گیاهان شاهد نشان داد.

مقدار قند کل موجود در ریشه و بخش‌های هوایی: براساس نتایج حاصل از اثر غلظت‌های مختلف کادمیوم بر مقدار قند کل موجود در ریشه و بخش‌های هوایی گیاه داتوره، مشاهده شد که اثر تیمارها ۴ روز پس از تیماردهی بر مقدار قند کل در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود ($P < 0.05$). اثر غلظت‌های مختلف کادمیوم بر مقدار قند کل در ریشه نشان دهنده‌ی افزایش مقدار کربوهیدرات کل با افزایش غلظت تیمارها در محلول غذایی است و بالاترین میزان قند در تیمار ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر کادمیوم ۱۴ روز بعد از تیماردهی در ریشه مشاهده شد که به طور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش یافته بود ($P < 0.05$). همچنین غلظت‌های ۱، ۵، ۱۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر کادمیوم موجب افزایش معنی‌دار مقدار قند کل در بخش‌های هوایی گیاه داتوره ۱۴ روز پس از تیماردهی گردید (شکل ۷).

مقدار قند احیاء موجود در ریشه و بخش‌های هوایی: اثر غلظت‌های مختلف کادمیوم بر مقدار قند احیاء موجود در ریشه و بخش‌های هوایی گیاه داتوره در شرایط کشت گلدانی در شکل ۸ نشان داده شده است. براساس این نتایج، اثر غلظت‌های ۱، ۵، ۱۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر کادمیوم بر مقدار قند احیاء



شکل ۸- اثر غلظت‌های مختلف کادمیوم محیط کشت بر مقدار قند احياء موجود در ریشه و بخش‌های هوایی گیاه داتوره بعد از دو هفته تیماردهی. مقادیر حاصل از میانگین سه تکرار از هر تیمار \pm خطای استاندارد می‌باشد. وجود حروف متفاوت بیانگر تفاوت معنی‌دار بین تیمارها بر اساس آزمون دانکن می‌باشد ($P < 0/05$).

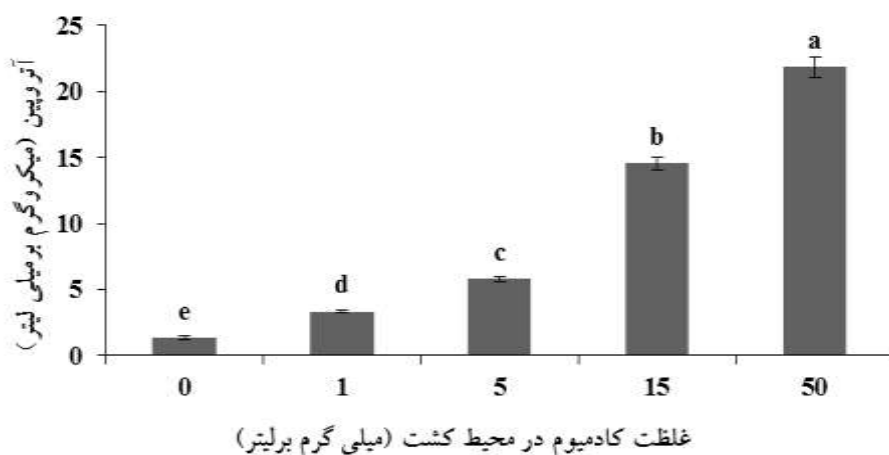


شکل ۹- اثر غلظت‌های مختلف کادمیوم محیط کشت بر مقدار پرولین در ریشه و بخش‌های هوایی گیاه داتوره بعد از دو هفته تیماردهی. مقادیر حاصل از میانگین سه تکرار از هر تیمار \pm خطای استاندارد می‌باشد. وجود حروف متفاوت بیانگر تفاوت معنی‌دار بین تیمارها بر اساس آزمون دانکن می‌باشد ($P < 0/05$).

غلظت کادمیوم موجود در محیط کشت، مقدار پرولین موجود در ریشه‌ها و بخش‌های هوایی گیاه روند رو به افزایشی را نشان داد. میزان افزایش پرولین در مورد تیمار گیاه با بالاترین غلظت کادمیوم ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر می‌باشد که منجر به افزایش تقریباً ۲ برابری پرولین در ریشه و به مقدار کمتری در بخش‌های هوایی نسبت به گیاه شاهد گردید.

مقدار آتروپین بخش هوایی: اثر غلظت‌های مختلف کادمیوم بر میزان آتروپین موجود در گیاه داتوره در شرایط کشت گلدانی در شکل ۱۰ نشان داده شده است. بر اساس این

لیتر کادمیوم بر مقدار پرولین در بخش‌های هوایی گیاه، ۱۴ روز پس از تیماردهی در سطح ۵ درصد نسبت به گیاه شاهد معنی‌دار بود ($P < 0/05$) و بیشترین مقدار پرولین موجود در بخش‌های هوایی گیاه در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر کادمیوم یافت شد. همچنین همانطور که در شکل ۹ مشاهده می‌شود، با افزایش غلظت کادمیوم در محیط کشت، مقدار پرولین موجود در ریشه‌ها نیز روند رو به افزایشی را نشان داد و در تمام غلظت‌های ۱، ۵، ۱۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر کادمیوم، این مقدار نسبت به گیاه شاهد معنی‌دار بود ($P < 0/05$). بر اساس این نتایج، با افزایش



شکل ۱۰- اثر غلظت‌های مختلف کادمیوم محیط کشت بر مقدار آتروپین موجود در گیاه داتوره بعد از ۱۲ هفته تیماردهی. مقادیر حاصل از میانگین سه تکرار از هر تیمار \pm خطای استاندارد می‌باشد. وجود حروف متفاوت بیانگر تفاوت معنی‌دار بین تیمارها بر اساس آزمون دانکن می‌باشد ($P < 0.05$).

از هم گسسته شده به طوری که به حدود ۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در بخش هوایی افزایش یافته است. با افزایش مقدار کادمیوم در بخش هوایی سیستم‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی و اسمولیتی گیاه فعال شده و در جهت مقابله با سمیت کادمیوم افزایش می‌یابد.

با افزایش غلظت کادمیوم در محیط رشد گیاه، وزن خشک و طول گیاه در بخش هوایی و ریشه کاهش یافت. فلز کادمیوم با اختلال در فتوسنتز، تنفس و متابولیسم نیتروژن در گیاهان منجر به کاهش رشد می‌شود که به دنبال آن زیست توده نیز کاهش می‌یابد (Dong et al., 2005). عناصر سنگین، به واسطه‌ی برهمکنش با گروه‌های سولفیدریل پروتئین‌ها سبب بسته شدن کانال‌های آبی و عدم نفوذ آب به درون بافت‌های گیاهی می‌شوند. همچنین با اثر سریع بر ارتباطات آبی سلول‌های گیاهی به علت کاهش سریع قابلیت هدایت آبی سلول‌ها سمیت خود را آشکار می‌کنند. کاهش وزن می‌تواند به دلیل افت محتوای آب گیاه و تأثیر آن بر فرایندهای فیزیولوژیکی رخ داده باشد (Barcelo et al., 2004). مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی در گیاه داتوره تحت استرس کادمیوم، مورد بررسی قرار گرفت و مشاهده شد با افزایش غلظت فلز کادمیوم در محیط کشت، از مقدار کلروفیل a، b، کلروفیل کل و کاروتنوئید کاسته می‌شود. گیاهانی که در معرض کادمیوم قرار

نتایج، اثر غلظت‌های ۱، ۵، ۱۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر کادمیوم بر میزان آتروپین موجود در گیاه، ۹۰ روز پس از تیماردهی در سطح ۵ درصد نسبت به گیاه شاهد معنی‌دار بود ($P < 0.05$). همچنین همان‌طور که در شکل ۱۰ مشاهده می‌شود، با افزایش غلظت کادمیوم در محیط کشت، مقدار آتروپین موجود در گیاه نیز روند رو به افزایشی را نشان داد. به طوری که در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر کادمیم بیشترین مقدار آتروپین به مقدار ۲۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر مشاهده شد.

بحث

وجود فلزات سنگین در محیط زیست گیاهان نوعی عامل تنش‌زا می‌باشد که باعث ایجاد تغییرات فیزیولوژیک شده و می‌تواند موجب کاهش توان رشد گیاه و در حالت شدیدتر باعث از بین رفتن گیاه شود (Sankaran and Ebbs, 2007). نتایج حاصل در گیاه داتوره نشان داد که با افزایش غلظت کادمیوم در محیط کشت، میزان فلز تجمع یافته در بخش‌های هوایی افزایش یافت. غلظت کادمیوم در بخش هوایی گیاه تا غلظت ۱۵ میلی‌گرم بر لیتر در محیط کشت در حدود ۲۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم بوده و به نظر می‌رسد با افزایش غلظت کادمیوم در محیط کشت تا مقدار ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر باعث گردیده تا مکانیسم‌های نقل و انتقال کادمیوم در گیاه

نسبت داد. نتایج این تحقیق، با نتایج Dai و همکاران ۲۰۱۲ مطابقت دارد، آنها نشان دادند که در گیاه *Azolla imbricate* رشد یافته تحت سمیت فلز کادمیوم، آنتوسیانین‌ها ممکن است با فعالیت آنتی‌اکسیدانی در باند شدن به فلزات سنگین در کاهش استرس نقش داشته باشند.

بسیاری از شرایط تنش‌زای محیطی بر متابولیسم قندها و پخش مواد فتوسنتزی در گیاهان در حال رشد اثر می‌گذارند. افزایش مقدار قندهای احیاءکننده تحت شرایط تنش شوری، غرقابی، فلزات سنگین و سرما نیز ذکر شده است. گزارش شده است که کادمیوم سبب افزایش قندهای احیاءکننده در گیاه برنج *Oryza sativa* می‌شود (Verma and Dubey, 2001). قندها سبب تنظیم اسمزی و پایداری غشاهای پروتئین‌های موجود در سلول می‌شوند. این عمل می‌تواند از طریق تشکیل پیوندهای هیدروژنی بین گروه‌های کربوکسیل قندها و زنجیره‌های قطبی پروتئین‌ها و بالاخره پایداری پروتئین‌ها صورت گیرد. برای مثال تجمع ساکارز موجب حفظ فسفولیپیدهای غشاء شده و از تغییرات ساختاری در پروتئین‌های محلول سلول نیز جلوگیری می‌کند (Parviz and Satyawati, 2008). افزایش در میزان کربوهیدرات‌های محلول نقش بسیار مهمی در کاهش پتانسیل اسمزی و در نهایت ایجاد شیب مناسب بین گیاه و خاک نموده و سبب افزایش جذب آب می‌گردد، زیرا کربوهیدرات‌ها به عنوان تنظیم‌کننده اسمزی نقش بسیار مهمی بازی می‌کنند. افزایش قندهای محلول، در اغلب شرایط تنش‌زا به عنوان یک مکانیسم تحمل در برابر تنش است و در واقع باعث تنظیم پتانسیل آب سلول در بخش سیتوزول، برای مقابله با غلظت بالای یون‌های جذب شده و تجمع یافته در واکوئل، می‌گردد (Kameli and Losel, 1993).

وجود فلزات سنگین منجر به بهم ریختگی وضعیت اسموتیک در گیاهان می‌شود، گیاهان جهت مقابله با انواع تنش‌ها مکانیسم‌های مقاومتی متفاوتی را به کار می‌گیرند از جمله مکانیسم سازگاری گیاه در مقابله با فلزات سنگین تجمع پرولین در گیاه می‌باشد که دارای نقش‌هایی از جمله جاروبگر رادیکال‌های آزاد، محافظ آنزیم‌های سیتوپلاسمی و منبع

می‌گیرند میزان فتوسنتز آنها کاهش پیدا می‌کند که ناشی از تخریب فرا ساختار کلروپلاست، جلوگیری از سنتز کلروفیل، پلاستوکوئینون، کاروتنوئید، ممانعت از انتقال الکترون و جلوگیری از فعالیت آنزیم‌های چرخه کالوین است. کادمیوم در جذب فلزات ضروری منیزیم و آهن اختلال ایجاد می‌کند که در نهایت مانع از سنتز کلروفیل می‌شود (Sandalio et al., 2001). افزایش تخریب کلروفیل در گیاهان تیمار شده با کادمیوم ناشی از افزایش فعالیت کلروفیل‌لاز می‌باشد. گزارش شده است که کلروفیل b بیشتر از کلروفیل a در تیمار کادمیوم تحت تأثیر قرار می‌گیرد (Drazkiewicz, 1994). کاهش مقدار کلروفیل طی تنش ناشی از فلزات سنگین، می‌تواند به دلیل تغییر متابولیسم نیتروژن، در رابطه با ساخت ترکیباتی نظیر پرولین باشد که در تنظیم اسمزی به کار می‌روند. افزایش تولید پرولین موجب می‌شود گلوتامات که پیش ماده مشترک ساخت کلروفیل و پرولین است کمتر در مسیر سنتز کلروفیل وارد شود (Parvaiz and Satyawati, 2008). گزارش شده است که میزان کلروفیل و کاروتنوئید برگ‌ها با افزایش غلظت کادمیوم در محیط رشد کاهش می‌یابد. کاهش میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی در گیاهان تحت تیمار کادمیوم نیز می‌تواند به دلیل آسیب‌های اکسیداتیو باشد. نتایج این تحقیق با نتایج Hami در سال ۲۰۱۰ در گیاه *Phaseolus vulgaris* همخوانی دارد.

آنتوسیانین‌ها، از جمله فعال‌ترین ترکیبات فنلی هستند (He et al., 2010). انواع تنش‌هایی که منجر به کاهش آب درون سلولی می‌شوند سبب تجمع آنتوسیانین‌ها در برگ‌ها می‌گردند (Xin and Browse, 2000). آنتوسیانین‌ها در جاروب کردن گونه‌های فعال اکسیژن، نقش دارند. آنها همچنین با توانایی باند شدن به فلزات مانع از تشکیل رادیکال‌های آزاد می‌گردند (Havsteen, 1983). آنتوسیانین‌ها همچنین از طریق القای آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند گلوکاتایون-s-ترانسفراز و سوپراکسید دسموتاز می‌توانند فعالیت آنتی‌اکسیدانی خود را اعمال کنند (Ross and Kasum, 2002). بنابراین افزایش مقدار آنتوسیانین‌های موجود در برگ‌های گیاه داتوره تحت استرس فلز کادمیوم در این تحقیق را می‌توان به فعالیت‌های فوق‌الذکر

استرس فلزات سنگین می باشند. امروزه همچنین شناسایی گیاهان مقاوم به فلزات، اهمیت بسیار زیادی دارد، زیرا علاوه بر جنبه‌های زیست‌شناسی و مطالعات اکولوژیکی، از این گیاهان می‌توان برای مطالعات اکولوژیکی، بررسی شرایط تکامل این گیاهان و بررسی ژن‌های موثر در مقاومت به فلز استفاده کرد (Sheoran, 2006).

اساساً مکانیسم‌های سلولی و مولکولی که موجب افزایش بیوستت و تجمع الکلوئیدها می‌شود، هنوز به روشنی شناخته نشده است. بر اساس این یافته‌ها می‌توان اینگونه استنباط کرد که در فرایند مشاهده شده افزایش الکلوئیدها بر اثر تیمار گیاه با فلز سنگین کادمیوم حداقل در دو فرایند نقش دارند: یکی تحریک بیوستت برخی از الکلوئیدها به دلیل ایجاد شرایط استرس اکسیداتیو و دیگر تحریک انتقال الکلوئیدهای ساخته شده به اندام‌ها و اندامک‌های سلولی محل ذخیره. به این ترتیب مهار فیدبک از مسیر بیوستت برداشته شده و موجب بیوستت بیشتر الکلوئیدها می‌شود (Samanani et al., 2005). به طور کلی از نتایج به دست آمده چنین استنباط می‌شود که تأثیر تنش ناشی از افزایش غلظت فلز کادمیوم بر فرایندهای فیزیولوژیک گیاه متفاوت می‌باشد. گیاه به منظور سازگاری و تحمل بیشتر در برابر غلظت‌های سمی کادمیوم مبادرت به تجمع آن در ریشه و محدود کردن انتقال آن به اندام‌های هوایی می‌کند. همچنین افزایش میزان قندهای محلول و احیاء و افزایش اسید آمینه‌ی پرولین در اندام‌های هوایی و به ویژه ریشه‌ها، و همچنین افزایش در میزان آنتوسیانین نشانگر نقش مهم اسمولیت‌ها در برابر سمیت این فلز است. کاهش میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی، آثار سمیت کادمیوم را آشکار می‌کند. افزایش میزان آتروپین موجود در گیاه تحت تنش کادمیوم در مقایسه با گیاه شاهد را می‌توان به نقش دفاعی و آنتی‌اکسیدانی این متابولیت ثانویه نسبت داد.

تشکر و قدر دانی

از معاونت پژوهشی دانشگاه اصفهان به دلیل حمایت مالی از این تحقیق صمیمانه سپاسگزاری می‌شود.

نیروژن و کربن جهت از سرگیری رشد گیاه پس از تنش به شمار می‌رود. گزارش شده است که پرولین به عنوان یک حفاظت‌کننده‌ی اسمزی، تثبیت‌کننده‌ی پروتئین، کلات‌کننده‌ی فلز، ممانعت‌کننده‌ی پراکسیداسیون لیپید و برطرف‌کننده رادیکال آزاد فعالیت می‌کند. تجمع چشمگیر پرولین به علت افزایش سنتز و کاهش تجزیه آن تحت شرایط استرس‌های مختلف مانند شوری، خشکی و استرس فلزات سنگین در چندین گیاه ثابت شده است. نتایج این تحقیق با نتایج Saadati و همکاران (۲۰۱۲) در گیاه لوبیا همخوانی دارد. در آرابیدوپسیس نیز، افزایش غلظت پرولین در اثر افزایش غلظت کادمیوم گزارش گردیده است (Xu et al., 2010). تنش کادمیوم منجر به سنتز پرولین از طریق متابولیسم اسید آمینه می‌شود که در نهایت منجر به کاهش رشد گیاه می‌گردد (Dinakar, 2008). در مطالعه موجود تحت تنش کادمیوم تجمع پرولین در مقایسه با شاهد افزایش پیدا کرده است که این افزایش مطابق با یافته‌های Zhao (۲۰۱۱) می‌باشد.

افزایش میزان آتروپین در مورد تیمار گیاه با کادمیوم کلرید مشاهده شد. در کشت ریشه‌های موئین گیاه *Brugmansia candida* اثر انواع محرک‌های زیستی و غیرزیستی بر تولید هیوسیامین و اسکوپولامین مورد بررسی قرار گرفت. کادمیوم کلرید باعث افزایش میزان (۳ تا ۲۴ برابری) این الکلوئیدها شد (Alvarez et al., 2000). اگرچه متابولیت‌های ثانویه اساساً به وسیله فرایندهای ژنتیکی تولید می‌شوند، اما از آنجایی که تجمع متابولیت‌های ثانویه در گیاهان، یک پاسخ رایج گیاهان به تنش‌های زیستی و غیرزیستی است بیوستت آنها شدیداً تحت تأثیر فاکتورهای محیطی قرار می‌گیرد (Smetanska, 2008). در واقع وجود تنش‌های غیرزیستی از جمله فلزات سنگین (کادمیوم) منجر به راه اندازی مکانیسم‌های دفاعی گیاه می‌گردد. الکلوئیدها از جمله متابولیت‌های ثانویه به شمار می‌روند که منجر به پایداری گیاه در برابر تنش‌های محیطی می‌شوند. با توجه به اهمیت افزایش متابولیت‌های گیاهی در برابر مقاومت گیاهان نسبت به تنش‌های محیطی، محققین به دنبال مشخص نمودن سازوکارهای مقاومتی گیاهان در برابر

- Alvarez, S. P., Spollansky, T. C., Giuliotti, A. M. and Spollansky, T. C. (2000) The influence of different biotic and abiotic elicitors on the production and profile of tropane alkaloids in hairy root cultures of *Brugmansia candida*. *Enzyme and Microbial Technology* 26: 252–258.
- Arnon, D. I. (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts, Polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology* 24: 391-369.
- Ashtiana F and Sefidkon F. (2011) Tropane alkaloids of *Atropa belladonna* L. and *Atropa acuminata* Royle ex Miers plants. *Journal of Medicinal Plants Research* 5: 6515- 22.
- Barcelo, J. and Poschenrieder, CH. (2004) Structural and ultrastructural changes in heavy metal exposed plants In: *Heavy metal stress in plant* (eds Prasad, M. N. V.) Pp223-248 3rd edn Spring, Berlin.
- Bates, L. S., Waldren, R. P. and Teare, I. D. (1973) Rapid determination of free proline for water-stress. *Plant and Soil* 39: 205-207.
- Chevallier, A. and Kindersley, D. (1996) *The Encyclopedia of Medicinal Plants* 3: 345-370.
- Dai, L. P., Dong, X. J. and Ma, H. H. (2012) Antioxidative and chelating properties of anthocyanins in *Azolla imbricate* induced by Cadmium. *Environmental Pollution* 21: 837-844.
- Dinakar, N., Nagajyothi, P.C., Suresh, S., Udaykiran, Y., Damodharam, T. (2008) Phytotoxicity of cadmium on protein, proline and antioxidant enzyme activities in growing *Arachis hypogaea* L. seedlings. *Journal Environment Science* 20: 199-206.
- Dong, J., F. Wu and Zhang, G. (2005) Effect of cadmium on growth and photosynthesis of tomato seedlings. *J. of Zhejiang University Science B* 6: 974-980.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Annals* 3: 354-360.
- Drazkiewicz, M. (1994) Chlorophyll-occurrence, functions, mechanism of action, effects of internal and external factor. *Photosynthetica* 30: 321-331.
- Fusconi, A., Gallo, C. and Camusso, W. (2007) Effect of cadmium on root apical meristems of *Pinum sativaum* L.: Cell viability, cell proliferation and microtubule pattern as suitable makers for assessment of stress pollution. *Mutation Research/ Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 632: 9-19.
- Hossain, M. A., Hasanuzzaman, M. and Fujita, M. (2010) Up- Regulation of Antioxidant and Glyoxalase Systems by Exogenous Glycinebetaine and Proline in *Mung bean* Confer Tolerance to Cadmium Stress, *Physiology and Molecular Biology of Plants* 16: 259-272.
- Hamid, N., Bukhari, N. and Jawaid, F. (2010) Physiological responses of *Phaseolus vulgaris* to different lead concentrations. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 42: 239-246.
- Havsteen, B. (1983) Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochemical Pharmacology* 32:1141-1148.
- He, F., Mu, L., Yan, G. L., Liang, N., Pan, Q., Wang, J., Reeves, M. J. and Duan, C. (2010) Biosynthesis of anthocyanins and their regulation in colored grapes. *Molecular* 15: 9057-9091.
- Jason, A. (1978). *Chlorophyll and Carotenoid: Handbook of Physiological Method*. Cambridge University Press, Cambridge, New York 2: 507-510.
- Jamshidi M, Ahmadi HR, Rezazadeh Sh, Fathi F, Mazanderani, M. (2010) Study on phenolic and antioxidant activity of some selected plants of Mazandaran province. *Medicinal plant* 9: 177-183.
- Jeffries, T. W., Yang, V. W. and Davis, M. W. (1998) Comparative study of xylanase Kinetics using dinitrosalicylic, arsenomolibdate and ion chromatographic assays. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 257: 70-72.
- Kameli, A. and Losel, D. M. (1993) Carbohydrates and water stress in wheat plants under water stress. *New Phytologist* 125: 609-614.
- Kennedy, D., and Wightman, E. I. (2011) *Herbal Extracts and Phytochemicals: Plant Secondary Metabolites and the Enhancement of Human Brain Function*. *Advances in nutrition* 2: 32-50.
- Lee, S. and Leustek, T. (1999) The effect of cadmium on sulfate assimilation enzymes in *Brassica juncea*. *Plant Science* 141: 201-207.
- Marschner, P. (2012) *Mineral nutrition of higher plants*. Third edition. Elsevier Ltd, London.
- Mohtadi. A., Ghaderian, S. M. and Schat, H. (2012) A comparison of lead accumulation and tolerance among heavy metal hyperaccumulating and non-hyperaccumulating metallophytes. *Plant and Soil* 352: 267-276.
- Pagter, M., Bragato, C. and Brix, H. (2005) Tolerance and physiological responses of phragmites australis to water deficit. *Aquatic Botany* 81: 285-299.
- Parviz, A. and Satywati, S. (2008) Salt stress and phyto-biochemical responses of plants. *Plant Soil and Environment* 54: 89-99.
- Ramakrishna, A. and Ravishanker, G. A. (2011) Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling and Behavior* 6: 1720-1731.

- Raoa SR, Ravishankar G. A. (2002) Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances* 20: 101-153.
- Reeves, R. D., Baker, A. J. M, Borhidi, A. and Berazain, R. (1999). Nickel hyperaccumulation in serpentin flora of Cubq. *Annals of Botany* 83: 29-38.
- Ross, J. A. and Kasum, C. M. (2002) Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annual Review of Nutrition* 22: 19-34.
- Saadati, M., Motesharezadeh, B. and Moez-ardalan, M. (2012) Study of concentration change of proline and potassium for two varieties of *Pinto beans* under cadmium stress. *International Research Journal of Applied and Basic Sciences* 3: 344-352.
- Samanani, N., Park, S. and Facchini, P. J. (2005) Cell type-specific localization of transcripts encoding nine consecutive enzymes involved in protoberberine alkaloid biosynthesis. *The Plant Cell* 17: 915-926.
- Sandalio, L. M., H. C. Dalurzo, M. Gomez, M. C. Romero-Puertas and L. A. del Rio. (2001) Cadmium induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *Experimental Botany* 52: 2115-2126.
- Sanita di Toppi, L. and Gabbrielli, R. (1999) Response to cadmium in higher plants-review. *Environmental and Experimental Botany* 41: 105-130.
- Sankaran, P. P. and Ebbs, S. D. (2007) Cadmium accumulation in deer tongue grass (*Panicum chandestineum*. L.) and potential for trophic transfer to microtine rodents. *Environmental Pollution* 148: 580-589.
- Sen, B., & Saini, J. P. (1969) Modern methods in plant physiology, *Minstoda Scientific Research* 68:118.
- Sheoran, A. and Sheoran, V. (2006) Heavy metal removal mechanism of acid mine drainage in wetlands: a critical review *Minerals Engineering* 19: 105-116.
- Smetanska, I. (2008) Production of secondary metabolites using plant cell cultures. *Advance in Biochemistry and Engineering Biotechnology* 111: 187-228.
- Srivastava, R., Khan, R., Nasim, S. A., Manzoor, N. and Mahmood, U. (2001) Cadmium treatment alters phytochemical and biochemical activity in *Glycine max* L. *International Journal of Botany* 7: 305-309.
- Sun, J. Y. and Shen, Z. G. (2007). Effects of Cd stress on Pho- to synthetic characteristics and nutrient uptake of Cabbages with different Cd-tolerance, *Chinese Journal of Applied Ecology* 18: 2605-2610.
- Talanova, V. V., Titov, A. F., and Boeva, N. P. (2000). Effect of increasing concentrations of lead and cadmium on cucumber seedlings, *Biologia Plantarum* 43: 441-444.
- Verma, S. and Dubey, R. S. (2001) Effect of cadmium on soluble sugars and enzymes of their metabolism in rice. *Biologia Plantarum* 44: 117-123.
- Wagner, G. J. (1979) Content and vacuole/extra vacuole distribution of neutral sugars, free amino acids, and anthocyanins in protoplast. *Plant Physiology* 64: 88-93.
- Xin, Z. and Browse, J. (2000) Cold comfort farm: the acclimation of plants to freezing temperatures. *Plant, Cell and Environment* 23: 893-902.
- Xu, J., Yin, X. and Liu, X. (2010) Salt affects plant Cd-stress responses by modulating growth and Cd accumulation. *Planta* 231: 449-459.
- Zhao, Y. (2011) Cadmium accumulation and antioxidative defenses in leaves of *Triticum aestivum* L. and *Zea mays* L. *African Journal of Biotechnology* 10: 2936-2943.
- Zhao, J., Zhu, W., Hu, Q. and He, X. W. (2000) Improved indole alkaloid production in *Catharanthus roseus* suspension cultures by various chemicals. *Biotechnology Letters* 22: 1221-1226.

The effect of cadmium on Atropin content and the physiological parameters in *Datura stramonium* L.

Samira Nateghi , Seyed Majid Ghaderian*, Akbar Mostajeran

Department of Biology, Faculty of Sciences, Universtiy of Isfahan, Isfahan, Iran

(Received: 14/07/2018, Accepted: 24/08/2020)

Abstract

Application of non-bio-stimulants is one of solutions to quantitative and qualitative changes in secondary metabolites in medicinal plants. Cd in plant reduces photosynthesis and respiration, decreases the metabolism of carbohydrates, causes chlorosis and decreases growth. The aim of the present study was to investigate the effect of cadmium concentrations on photosynthetic pigments, anthocyanin, proline, total soluble sugars, reducing sugars and atropine production in *Datura stramonium* L. The plants were cultured in perlite containing pots. Then, plants were treated with different concentrations of Cd (0,1,5,15 and 50 mg/l) for 2 weeks to measure physiological parameters and for 12 weeks to determine the amount of atropine. With increasing Cd concentration in solution media, photosynthetic pigments significantly decreased. Also, the results indicated that the amount of anthocyanin, soluble and reduction carbohydrate and proline significantly were increased in most treatments up to 62/7%, 40/5%, 31/5%, 56/7%, respectively. Cadmium also increased the amount of atropine. The heavy metal cadmium as a non-biological stress led to increased plant defense mechanisms, including carbohydrate and proline and secondary metabolites of anthocyanin photosynthetic pigment and tropane alkaloids (atropine).

Keywords: Atropin, Prolin, *Datura stramonium* L., Photosynthetic pigment, Heavy metal

Corresponding author, Email: ghaderian_m@yahoo.com