University of Birjand

Journal homepage:
https://escs.birjand.ac.ir

تنشهای محیطی در علوم زراعی
Environmental Stresses In Crop Sciences

Vol. 15, No. 4, pp. 1143-1160 (Winter 2023)

http://dx.doi.org/10.22077/escs.2021.4245.1996

Original article

The effect of cadmium stress on photosynthetic pigments and secondary metabolites in borage (*Borago officinalis* L.)

P. Sheikhzadeh[1*], N. Zare[1], Sh. Abootalebi[2]

1. Associate Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

2. Ph.D. Student, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Mohaghegh Ardabili University, Ardabil, Iran

Received 5 April 2021; Accepted 16 May 2021

Extended abstract

Introduction

Heavy metals are one of the most important abiotic stresses which can have detrimental effects on the growth, metabolic pathways, and physiological and biochemical characteristics of plants. Today, the accumulation of heavy metals in agricultural lands has an increasing trend that can affect the production and quality of agricultural products as well as human health. Among heavy metals, cadmium (Cd) is one of the most important worldwide environmental pollutants. It can rapidly be taken up by plants and accumulates in plant tissues, and easily enter the food chain; so this heavy metal is a serious threat to humans, animals, plants, and environmental sustainability. Secondary metabolites play vital protective and adaptive roles in plants in response to biotic and abiotic stresses. In this study, the effect of cadmium stress on the physiological characteristics and secondary metabolite production, and cadmium accumulation in borage (*Borago officinalis* L.) was investigated under hydroponic conditions.

Materials and methods

Borage seeds were germinated in Petri dishes, and the 5–6 cm seedlings were then transferred to hydroponic containers containing half of the Hoagland nutrient solution with continuous aeration. The cultures were maintained in a growth chamber with 16 hours of light and 25±2 °C. Cadmium treatments were applied at five levels (0, 81, 162, 243, and 324 µM cadmium) using cadmium nitrate (Cd (NO3)2 .4H2O) at the 6-7 leaves stage. European borage seedlings were sampled at five-time intervals (12, 24, 48, 72, and 108 hours after cadmium stress) treatments and cadmium content, physiological characteristics, and secondary metabolites of leaf samples were measured.

Results and discussion

The results showed that the amount of photosynthetic pigments, chlorophyll index (SPAD), chlorophyll fluorescence, and secondary metabolites in borage leaves were significantly influenced by cadmium stress. With increasing cadmium concentration and exposure duration, the absorption and accumulation of cadmium in borage leaves increased significantly. Cadmium stress reduced the amount of chlorophyll a and b, total chlorophyll, and carotenoids at all sampling times in comparison with the control treatment. The maximal quantum efficiency of photosystem II and the chlorophyll index (SPAD) were decreased with increasing the cadmium concentration and exposure duration so that the lowest

[*] Corresponding author: Parisa Sheikhzadeh; E-Mail: sheikhzadehmp@gmail.com

© 2022, The Author(s). Published by University of Birjand. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0).

value of these traits was observed at 108 hours after treatment with 324µM cadmium. With increasing the cadmium stress severity, the amount of secondary metabolites including anthocyanin, phenol, and total flavonoids and also the amount of soluble sugars were significantly increased in the borage leaves. The highest amount of these metabolites was observed at 108 hours after treatment with 324 µM cadmium.

Conclusion
In general, the results of this study showed that increasing the concentration and duration of cadmium stress negatively influenced plant photosynthesis by reducing the content of photosynthetic pigments and increasing chlorophyll fluorescence. On the other hand, increasing the concentration and duration of cadmium stress, increased the cadmium absorption and accumulation in the borage leaves as well as the amount of secondary metabolites.

***Keywords*:** Efficiency of photosystem II, Heavy metals, Medicinal plant, Secondary metabolites

تنش‌های محیطی در علوم زراعی
Environmental Stresses in Crop Sciences
جلد پانزدهم، شماره چهارم، زمستان ۱۴۰۱

http://dx.doi.org/10.22077/escs.2021.4245.1996

مقاله پژوهشی

تأثیر تنش کادمیوم بر رنگیزه‌های فتوسنتزی و متابولیت‌های ثانویه گاوزبان اروپایی (*Borago officinalis* L.)

پریسا شیخ‌زاده[1*]، ناصر زارع[1]، شهربانو ابوطالبی[2]

۱. دانشیار، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل

۲. دانشجوی دکتری، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل

مشخصات مقاله

واژه‌های کلیدی:
فلزات سنگین
کارایی کوانتومی فتوسیستم II
کلروفیل
گیاه دارویی
متابولیت‌های ثانویه

تاریخ دریافت:
۱۴۰۰/۰۱/۱۶

تاریخ پذیرش:
۱۴۰۰/۰۲/۲۶

تاریخ انتشار:
زمستان ۱۴۰۱

۱۱۶۰-۱۱۴۳ :(۴)۱۵

چکیده

کادمیوم یکی از آلاینده‌های مهم محیط‌زیست است که به‌عنوان یک نگرانی عمده زیست‌محیطی در سراسر جهان اثرات بازدارنده‌ای بر رشد گیاهان دارد. در این پژوهش تأثیر کادمیوم بر رنگیزه‌های فتوسنتزی، صفات فیزیولوژیکی و متابولیکی برگ گاوزبان اروپایی در شرایط هیدروپونیک موردبررسی قرار گرفت. گیاهچه‌های گاوزبان اروپایی در مرحله ۷-۶ برگی به محیط کشت هیدروپونیک حاوی غلظت‌های مختلف کادمیوم (صفر، ۸۱، ۱۶۲، ۲۴۳ و ۳۲۴ میکرومولار) منتقل شدند و بعد از ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۱۰۸ ساعت اعمال تنش، نمونه‌برداری و اندازه‌گیری صفات انجام گرفت. نتایج نشان داد میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی، شاخص سبزینگی، فلورسانس کلروفیل و فعالیت‌های متابولیکی برگ گیاه دارویی گاوزبان اروپایی به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر تنش کادمیوم قرار گرفت. با افزایش غلظت کادمیوم و مدت‌زمان تیماردهی، میزان تجمع این عنصر در برگ‌های گاوزبان اروپایی افزایش یافت. تیمار کادمیوم باعث کاهش میزان کلروفیل a و b، کلروفیل کل، کارتنوئیدها در همه زمان‌های نمونه‌برداری نسبت به تیمار شاهد گردید. حداکثر کارایی کوانتومی فتوسیستم II و شاخص سبزینگی نیز با افزایش غلظت کادمیوم و مدت‌زمان اعمال تنش کادمیوم، کاهش یافت به‌طوری‌که کمترین مقدار این صفات مربوط به ۱۰۸ ساعت پس از اعمال تنش با ۳۲۴ میکرومولار کادمیوم بود. با افزایش شدت تنش کادمیوم، میزان متابولیت‌های ثانویه شامل آنتوسیانین، فنل، فلاونوئید کل و میزان قندهای محلول در برگ‌ها افزایش یافت. بیشترین مقدار این متابولیت‌های ثانویه مربوط به ۱۰۸ ساعت پس از تیمار با غلظت ۳۲۴ میکرومولار کادمیوم بود. به‌طورکلی نتایج این تحقیق نشان داد که افزایش غلظت و مدت‌زمان اعمال تنش کادمیوم از طریق کاهش میزان رنگیزه‌ها فتوسنتزی و افزایش میزان فلورسانس کمینه کلروفیل بر فتوسنتز گیاه تأثیر منفی می‌گذارد و از طرف دیگر تجمع کادمیوم در برگ‌های گاوزبان اروپایی موجب افزایش میزان متابولیت‌های ثانویه در این گیاه می‌گردد.

مقدمه

گاوزبان اروپایی یکی از مهم‌ترین و رایج‌ترین گیاهان دارویی مورداستفاده است و به دلیل داشتن ترکیبات ثانویه منحصربه‌فرد، به‌طور گسترده در صنعت داروسازی مورداستفاده قرار می‌گیرد. گل‌گاوزبان حاوی بالاترین درصد از گامالینولینیک اسید (GLA) و بهترین انتخاب برای اهداف تجاری است. حدود ۳۰ درصد این گیاه از روغن تشکیل شده است که از این مقدار حدود ۲۴ درصد آن گامالینولنیک اسید است. همچنین اسید رزمارینیک (به‌عنوان یکی از آنتی‌اکسیدان‌های اصلی تشکیل‌دهنده این گیاه) و ترکیبات فنلی با پتانسیل آنتی‌اکسیدانی از این گیاه شناسایی شده است (Asadi-Samani et al., 2014).

فلزات سنگین یکی از تنش‌های غیرزیستی مهم برای گیاهان به شمار می‌آیند که می‌تواند رشد و نمو و متابولیسم گیاهان را تحت تأثیر قرار داده و فعالیت بسیاری از واکنش‌های آنزیمی و متابولیکی در گیاهان را مهار کنند (Shahid et al., 2017; Sheikhadeh et al., 2021). در

* نگارنده پاسخگو: پریسا شیخ‌زاده، پست الکترونیک: sheikhzadehmp@gmail.com

میان فلزات سنگین، کادمیوم (Cd) تهدید جدی برای انسان، حیوانات و پایداری محیط‌زیست است زیرا این فلز سنگین به‌راحتی و به‌سرعت توسط گیاه جذب‌شده و در بافت‌های گیاهی تجمع می‌یابد، درنتیجه وارد زنجیره غذایی شده و همچنین، در طبیعت نیز ماندگار است (Clemens et al., 2013). آفت‌کش‌ها و کودها، استخراج معادن، فرآیندهای صنعتی، فاضلاب‌ها و برخی از فعالیت‌های انسانی سبب تجمع کادمیوم در خاک می‌شود (Shahid et al., 2017). از مهم‌ترین و قابل‌مشاهده‌ترین علائم سمیت کادمیوم می‌توان به کاهش جوانه‌زنی و رشد گیاهچه (Mahmoudi et al., 2017)، بازدارندگی رشد گیاه، کاهش وزن خشک بوته، عملکرد دانه (Meers et al., 2010; Hosseini et al., 2021) و کاهش میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان (Sheikhadeh et al., 2021) اشاره کرد.

کادمیوم با تأثیر بر فعالیت آنزیم رداکتاز کلات فریک (آهن III) باعث کاهش جذب و درنتیجه کمبود آهن در گیاهان می‌شود که این امر به‌نوبه خود روی فتوسنتز، جذب و انتقال آب و عناصر غذایی مانند پتاسیم، فسفر، منیزیم و کلسیم توسط گیاهان تأثیر منفی بگذارد. این عنصر به دلیل میل ترکیبی بسیار برای تشکیل پیوند با گروه‌های سولفیدریل، هیدروکسیل و لیگاندهای حاوی نیتروژن بسیاری از آنزیم‌های مهم را غیرفعال نموده و نیز متابولیسم نیتروژن را در گیاهان مختل می‌کند و سنتز پروتئین را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Bavi et al., 2011). این فلز سنگین با تخریب ساختار کلروپلاست، کاهش میزان رنگریزه‌های فتوسنتزی و کاهش فعالیت آنزیم‌های دخیل در تثبیت CO_2، موجب تحریک تولید گونه‌های فعال اکسیژن و ایجاد تنش اکسیداتیو می‌شود (Farooq et al., 2016). گونه‌های فعال اکسیژن معمولاً با ایجاد آسیب‌های غشایی، فرایندهای مختلف سلولی را دچار اختلال می‌کنند و باعث بروز اثرات مخرب بر بافت‌های گیاهی می‌شود (Zhang et al., 2009). نقش تنش کادمیوم در اختلال در سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی گیاه و به دنبال آن افزایش تولید و تجمع گونه‌های فعال اکسیژن در گاوزبان اروپایی (Mahmoudi et al., 2017)، کینوا (Naeem et al., 2020) و نخود (Bavi et al., 2011) نیز گزارش شده است.

متابولیت‌های ثانویه در گیاهان یکی از ترکیبات مهمی است که نقش‌های مختلف و متعددی در گیاهان دارد. یکی از مهم‌ترین وظایف متابولیت‌های ثانویه در گیاهان، نقش محافظتی آن‌ها در شرایط نامساعد محیطی مانند وجود تنش فلزات سنگین ازجمله کادمیوم است. از مهم‌ترین متابولیت‌های ثانویه می‌توان به آلکالوئیدها، ترپنوئیدها، رنگیزه‌ها، فنولیک‌ها، روغن‌های ضروری، استروئیدها، لیگنین‌ها، تانن‌ها و فلاونوئیدها اشاره کرد (Asadi-Samani et al., 2014; Taherkhani et al., 2019). وجود ترکیبات ثانویه در گیاهان سبب بهبود سازگاری گیاه در برابر تنش‌های محیطی و زیستی می‌شود. در شرایط نامساعد محیطی مقدار این ترکیبات به میزان قابل‌توجهی در گیاه افزایش می‌یابد (Walpola and Arunakumara, 2010)، به صورتی که پاسخ‌های دفاعی تحت تنش فلزات سنگین القاشده و سبب تحریک مسیر بیوسنتز و انباشت متابولیت‌های ثانویه می‌شود.

امروزه به دلایل مختلف تجمع عناصر سنگین در بسیاری از اراضی کشاورزی روند روبه رشدی داشته که می‌تواند رشد گیاهان زراعی و دارویی و کیفیت محصولات کشاورزی و درنهایت سلامت انسان را تحت تأثیر قرار دهد؛ بنابراین، این تحقیق با هدف بررسی تجمع کادمیوم در گاوزبان اروپایی و همچنین تغییرات رنگیزه‌ها، عوامل فتوسنتزی و مطالعه تغییر در میزان ترکیبات بیوشیمیایی در شرایط تنش کادمیوم انجام شده است.

مواد و روش‌ها

به‌منظور بررسی تأثیر فلز سنگین کادمیوم بر میزان رنگریزه‌های فتوسنتزی و متابولیت‌های ثانویه در برگ‌های گاوزبان اروپایی، آزمایشی در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام گرفت. بذرهای گاوزبان اروپایی از شرکت پاکان بذر (اصفهان، ایران) تهیه شدند. تیمارهای موردمطالعه شامل غلظت‌های کادمیوم در پنج سطح (صفر، ۸۱، ۱۶۲، ۲۴۳ و ۳۲۴ میکرومولار) بود (Ekmekci et al., 2008; Bavi et al., 2011; Hosseini et al., 2021).

به‌منظور جوانه‌زنی بذرهای گاوزبان اروپایی، ابتدا بذرها در پتری‌دیش‌های یک‌بارمصرف استریل بین دو کاغذ صافی مرطوب کشت شدند. سپس گیاهچه‌های ۵-۶ سانتی‌متری، به ظرف‌های هیدروپونیک حاوی نصف غلظت محلول غذایی هوگلند همراه با هوادهی مداوم، در اتاقک کشت با دوره روشنایی ۱۶ ساعت و دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد انتقال یافتند. به‌منظور ثابت نگه‌داشتن شرایط رشد، حجم محلول و pH آن دائماً بازبینی و pH با استفاده از HCl و NaOH در حدود ۵/۸ حفظ شد. اعمال تیمار فلز سنگین کادمیوم

به‌صورت نیترات کادمیوم ($Cd(NO_3)_2.4H_2O$) (شرکت سیگما-آلدریچ) در ظروف حاوی محیط غذایی هیدروپونیک در مرحله ۷-۶ برگی گیاهچه‌ها انجام گرفت (Ekmekci et al., 2008; Agami and Mohamed, 2013; Hosseini et al., 2021). نمونه‌برداری از برگ‌های گیاهچه گاوزبان اروپایی برای اندازه‌گیری میزان کادمیوم، صفات بیوشیمیایی و متابولیت‌های ثانویه در پنج بازه زمانی ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۱۰۸ ساعت پس از اعمال تنش کادمیوم صورت گرفت و نمونه‌های مربوط به هر بازه زمانی از هر تیمار و تکرار پس از انجماد در ازت مایع بلافاصله به فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند (Hosseini et al., 2021).

میزان کادمیوم در بافت برگی

با هدف بررسی میزان تجمع کادمیوم در بافت‌های برگی گیاهچه گاوزبان اروپایی، در ۴ غلظت کادمیوم (صفر، ۸۱، ۲۴۳ و ۳۲۴ میکرومولار) و در دو بازه‌های زمانی ۲۴ و ۱۰۸ ساعت بعد از اعمال تیمار تنش، نمونه‌برداری انجام شد و پس از خشک‌کردن نمونه گیاهی در ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت، یک گرم نمونه خشک به بالن هضم منتقل و عصاره آن به روش هضم اسیدی تهیه شد (Araújo et al., 2017). درنهایت غلظت کادمیوم موجود در عصاره با استفاده از دستگاه جذب اتمی (Agilent 240FS AA- USA) قرائت شد.

فلورسانس کلروفیل، شاخص سبزینگی و میزان رنگریزه‌های فتوسنتزی

برای بررسی صفات فلورسانس کلروفیل و شاخص سبزینگی، تعداد سه برگ از هر ظرف کشت به‌طور کاملاً تصادفی انتخاب و در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۱۰۸ ساعت بعد از اعمال تیمار کادمیوم به ترتیب با استفاده از دستگاه فلورمتر (Chlorophyll Fluorometer مدل OS-30) و دستگاه کلروفیل‌متر (SPAD 502 Plus) اندازه‌گیری شدند. برای اندازه‌گیری میزان کلروفیل a، b، کلروفیل کل و کارتنوئید، ۰/۱ گرم از نمونه تر گیاهی درون هاون چینی همراه یک میلی‌لیتر استون ۸۰٪ سائیده شده و سانتریفیوژ گردید. سپس جذب نوری محلول رویی در طول‌موج‌های ۶۴۵، ۶۶۳ و ۴۷۰ نانومتر با استفاده دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل BIO-RAD SmartSpec) قرائت گردید (Lichtenthaler, 1987). درنهایت مقادیر کلروفیل a، b، کلروفیل کل و کارتنوئید برحسب میلی‌گرم بر وزن تر بافت برگ ($mg\ g^{-1}\ FW$) محاسبه گردید.

اندازه‌گیری متابولیت‌های ثانویه و قندهای محلول

متابولیت‌های اندازه‌گیری شده در این پژوهش شامل فنل کل، فلاونوئید و آنتوسیانین بود. برای محاسبه‌ی مقدار فنل کل از روش فولین سیوکالتیو و رسم منحنی استاندارد گالیک اسید (Al-Farsi et al., 2005) استفاده شد. فلاونوئید کل نمونه‌ها بر اساس منحنی استاندارد کوئرستین و با استفاده از روش چانگ و همکاران (Chang et al., 2002) اندازه‌گیری شد. جهت اندازه‌گیری مقدار آنتوسیانین از روش واگنر (Wagner, 1979) استفاده شد. با هدف سنجش قند محلول عصاره الکلی نمونه‌ها تهیه و سپس با استفاده از معرف آنترون مطابق روش ایرگوین (Irigoyen, 1992) میزان قند نمونه‌ها به دست آمد.

تجزیه‌وتحلیل آماری

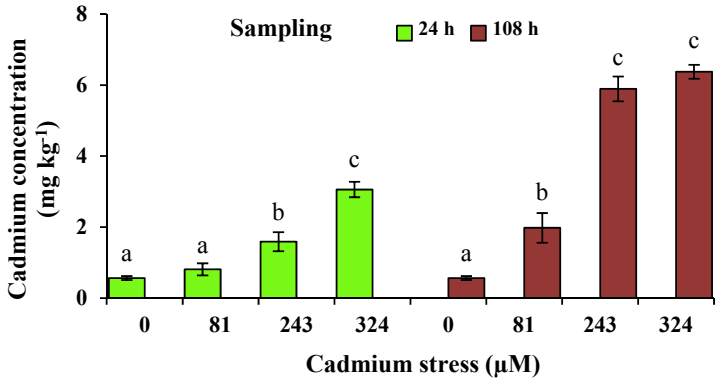
آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام گرفت. قبل از انجام تجزیه‌وتحلیل داده‌ها، آزمون نرمال بودن توزیع داده‌ها با استفاده از آزمون تک نمونه‌ای کولموگروف-اسمیرنوف (نرم‌افزار SPSS ver. 22) انجام گرفت. تجزیه واریانس و مقایسه میانگین داده‌ها به روش آزمون چند دامنه دانکن با استفاده از نرم‌افزار SPSS ver. 22 انجام گرفت. رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excell انجام شد.

نتایج و بحث

تجمع کادمیوم

اندازه‌گیری میزان تجمع کادمیوم در برگ گاوزبان اروپایی در مدت‌زمان‌های ۲۴ و ۱۰۸ ساعت پس از اعمال تنش کادمیوم با غلظت‌های ۸۱، ۲۴۳ و ۳۲۴ میکرومولار کادمیوم و تیمار شاهد (بدون تیمار کادمیوم) انجام گرفت. نتایج نشان داد در ۲۴ و ۱۰۸ ساعت پس از تیماردهی، با افزایش غلظت کادمیوم از صفر تا ۳۲۴ میکرومولار کادمیوم، میزان تجمع این عنصر در برگ نیز افزایش یافت. این یافته‌ها با نتایج به‌دست‌آمده در گیاه مرزه (*Satureja hortensis* L.) (Azizollahi et al., 2019) و کلم (Abdollahi and Golchin, 2018) مطابقت دارد. بیشترین میزان تجمع کادمیوم در غلظت ۳۲۴ میکرومولار مشاهده شد. همچنین، با افزایش مدت‌زمان تیماردهی، میزان جذب و تجمع کادمیوم در گیاه نیز افزایش یافت، به‌طوری‌که میزان تجمع کادمیوم بعد از ۱۰۸ ساعت

تیماردهی بیشتر از ۲۴ ساعت بود (شکل ۱). به نظر می‌رسد کادمیوم محلـول از طریق حرکت در فضـای بین سلولی و درون‌سلولی وارد ریشه می‌شود و با ورود به جریان شیره خام از طریق آوند چوبی به اندام هوایی گیاه مانند برگ‌ها انتقال یافته و باعث اختلال در ساختارهای سلولی، فرآیندهای فیزیولوژیکی و متابولیکی و درنهایت مهار رشد و نمو گیاه می‌شود (Abdollahi and Golchin, 2018; Sheikhzadeh et al., 2020). عوامل متعددی بر قابلیت جذب کادمیوم توسط گیاه تأثیر دارند که از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به گونه گیـاهی، غلظت کادمیوم موجود در محیط و قدرت اکسیداسیون و احیا اشاره کرد (Singh et al., 2011).



شکل ۱. تأثیر غلظت‌های مختلف کادمیوم بر میزان تجمع کادمیوم در برگ‌های گاوزبان اروپایی در زمان‌های ۲۴ و ۱۰۸ ساعت پس از اعمال تنش. داده‌ها میانگین ۳ تکرار و میله‌های عمودی نشان‌دهنده خطای استاندارد است. حروف متمایز در هر بازه زمانی، نشان‌دهنده تفـاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ است.

Fig. 1. The effect of different concentrations of cadmium on cadmium accumulation in borage leaves at 24 and 108 hours after treatment. The data are the mean of 3 replicates and the error bars indicate the standard error. Distinct letters in each sampling time indicate a significant difference at the 5% level of probability.

محتوای کلروفیل a، b و کل و کاروتنوئید

نتایج به‌دست‌آمده از تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۱) نشان داد که میزان کلروفیل a، b و کلروفیل کل و میزان کاروتنوئید به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر تنش کادمیوم قرار گرفت. بر اساس نتایج مقایسه میانگین داده‌ها (شکل ۲ و ۳)، تنش کادمیوم باعث کاهش معنی‌دار محتوای کلروفیل a، b و کلروفیل کل در برگ‌های گاوزبان اروپایی در هر پنج زمان نمونه‌برداری پس از اعمال تیمار کادمیوم در مقایسه با شاهد گردید. همان‌طوری که در شکل (2. A) مشاهده می‌شود در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۱۰۸ ساعت پس از تیماردهی با افزایش غلظت کادمیوم میزان کلروفیل a در گاوزبان اروپایی به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. در این تیمارها، بیشترین میزان کلروفیل a در تیمار شاهد و کمترین مقدار آن در غلظت ۳۲۴ میکرومولار کادمیوم مشاهده شد. در تیمار ۱۲ ساعت پس از اعمال تنش کادمیوم تفاوت معنی‌داری بین سطوح مختلف غلظت کادمیوم از نظر میزان کلروفیل a وجود نداشت. غلظت‌های مختلف کادمیوم همچنین موجب کاهش میزان کلروفیل b و کل در مقایسه با شاهد گردید. در زمان‌های مختلف اعمال تنش، با افزایش غلظت کادمیوم از ۸۱ به ۳۲۴ میکرومولار، میزان کلروفیل b و کلروفیل کل کاهش یافت که این تأثیر منفی کادمیوم در ۱۰۸ ساعت بعد از تیماردهی بیشتر بود. بیشترین میزان کلروفیل b و کلروفیل کل در تیمار شاهد (بدون تنش کادمیوم) و کمترین آن‌ها در تیمار ۳۲۴ میکرومولار کادمیوم مشاهده گردید (شکل 2. B و 3. A). بعد از ۱۲ و ۲۴ ساعت تیماردهی بین شاهد و غلظت ۸۱ میکرومولار کادمیوم از نظر میزان کلروفیل کل اختلاف معنی‌داری وجود نداشت، اما با افزایش مدت‌زمان اعمال تیمار تنش، میزان کلروفیل کل کاهش یافت (شکل 3. A). این موضوع نشان می‌دهد کادمیوم در گاوزبان اروپایی در ساعات اول تنش در غلظت ۸۱ میکرومولار تأثیر منفی بر تولید و تجمع کلروفیل ندارد. همان‌طور که مشاهده می‌شود در تمامی زمان‌های اعمال تیمار کادمیوم، با افزایش غلظت کادمیوم از ۸۱ به ۳۲۴ میکرومولار میزان کارتنوئید کل کاهش یافت به‌طوری‌که کمترین میزان آن در تیمار ۳۲۴ میکرومولار و بیشترین میزان آن در تیمار ۸۱ میکرومولار مشاهده گردید (شکل 3. B). میزان کارتنوئید در تیمار شاهد

(عدم کاربرد کادمیوم) به‌طور معنی‌داری بیشتر از تیمارهای کاربرد کادمیوم بود. بااین‌حال، کاهش میزان کارتنوئیدها در شرایط تنش بسته به غلظت کادمیوم و مدت‌زمان اعمال تیمار متفاوت بوده که بیانگر اثر متقابل بین این دو عامل است. به‌طورکلی تنش کادمیوم، باعث کاهش معنی‌دار میزان رنگریزه‌های فتوسنتزی (کلروفیل a، b و کلروفیل کل و میزان کارتنوئید) شد و با افزایش غلظت کادمیوم از ۸۱ به ۳۲۴ میکرومولار، محتوای کلروفیل کاهش یافت. نتایج این تحقیق مبنی بر کاهش میزان کلروفیل در غلظت‌های بالای کادمیوم با یافته‌های ناطقی و همکاران (Nateghi et al., 2020) در داتوره و شیخ‌زاده و همکاران (Sheikhzadeh et al., 2021) در گاوزبان اروپایی مطابقت داشت.

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که محتوای کلروفیل با افزایش غلظت کادمیوم کاهش یافت که این موضوع منجر به کاهش ظرفیت فتوسنتز و بروز کلروز در برگ‌ها می‌شود. به‌طورکلی فرایند فتوسنتز در برابر کادمیوم حساس بوده و نیز آنزیم‌های دخیل در تثبیت CO_2 تحت تأثیر کادمیوم قرار می‌گیرند. علت کاهش کلروفیل در حضور کادمیوم، مهار سنتز آنزیم‌های سازنده آن و نیز کاهش جذب عناصر اصلی مانند نیتروژن در خاک‌های حاوی کادمیوم است (Meers et al., 2010). کاهش رنگیزه‌های فتوسنتزی گیاهان تحت تنش کادمیوم را می‌توان به اثر بازدارندگی این فلز سنگین بر جذب منیزیم، منگنز، کلسیم و آهن در اثر تجمع کادمیوم در بافت‌های گیاهی و همچنین مهار آنزیم‌های گروه سولفیدریل دخیل در مسیر بیوسنتز رنگیزه‌ها نسبت داد (Mobin and Khan, 2007). همچنین، تنش کادمیوم با افزایش میزان گونه‌های فعال اکسیژن در گیاهان موجب کاهش رنگ‌دانه‌های فتوسنتزی می‌شود. گونه‌های فعال اکسیژن به‌عنوان عامل مخرب رنگ‌دانه‌ها و دیگر ماکرومولکول‌های زیستی در گیاهان عمل می‌کنند (Chen et al., 2011).

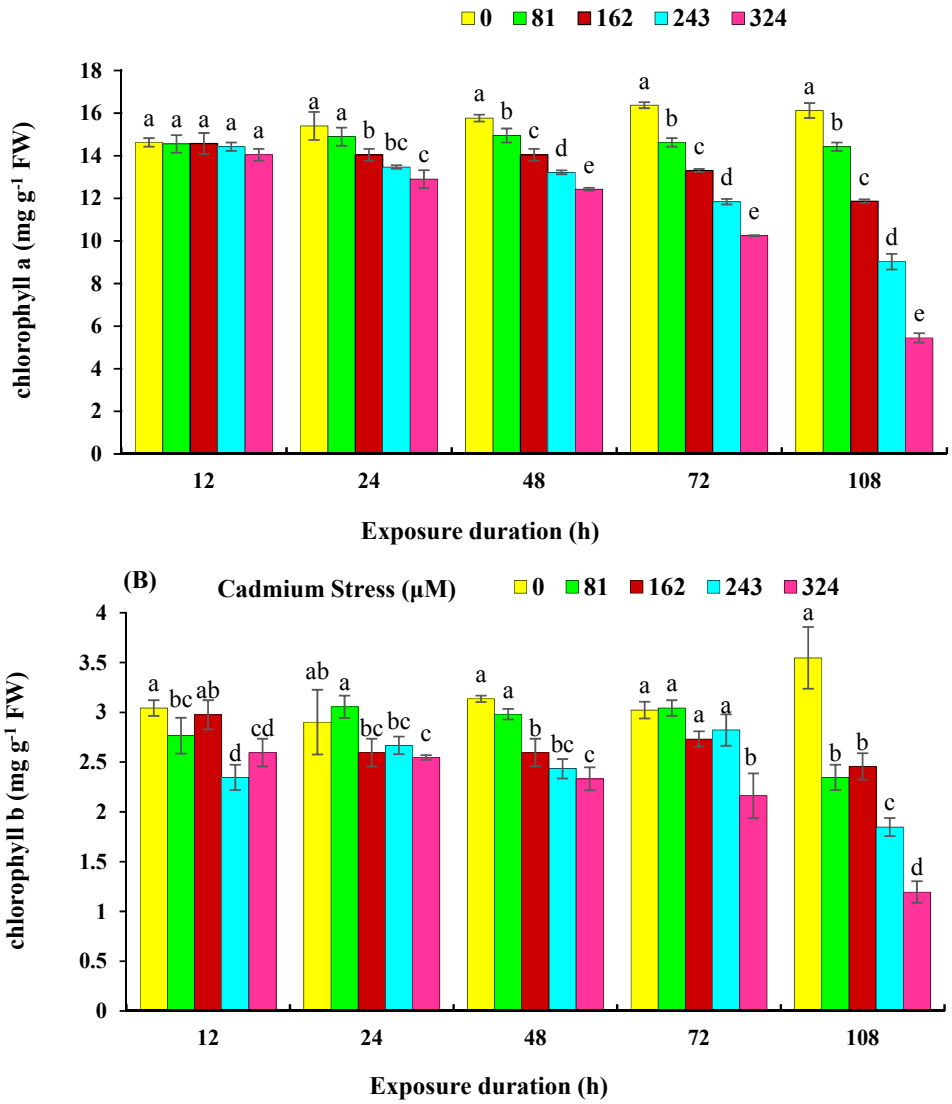
جدول ۱. تجزیه واریانس تأثیر تنش کادمیوم بر رنگریزه‌های فتوسنتزی در برگ گاوزبان اروپایی در زمان‌های مختلف پس از تنش

Table 1. Analysis of variance of the effects of cadmium stress on photosynthetic pigments in borage leaves at different exposure duration

زمان نمونه‌برداری Sampling time	SOV	منابع تغییرات	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean of Squares			
				کلروفیل a Chlorophyll a	کلروفیل b Chlorophyll b	کلروفیل کل Total chlorophyll	کارتنوئید Carotenoid
۱۲ ساعت 12 h	Cadmium stress	تنش کادمیوم	4	0.166 ns	0.243**	0.638**	0.218**
	Error	خطا	10	0.115	0.019	0.105	0.027
	CV (%)	ضریب تغییرات		*2.34*	*5.03*	*1.88*	*3.86*
۲۴ ساعت 24 h	Cadmium stress	تنش کادمیوم	4	3.105**	0.141*	4.360**	0.751**
	Error	خطا	10	0.174	0.029	0.124	0.047
	CV (%)	ضریب تغییرات		*2.92*	*6.19*	*2.08*	*5.48*
۴۸ ساعت 48 h	Cadmium stress	تنش کادمیوم	4	5.297**	0.365**	8.392**	1.797**
	Error	خطا	10	0.045	0.009	0.044	0.009
	CV (%)	ضریب تغییرات		*1.50*	*3.52*	*1.25*	*2.26*
۷۲ ساعت 72 h	Cadmium stress	تنش کادمیوم	4	17.009**	0.383**	21.764**	3.067**
	Error	خطا	10	0.016	0.049	0.043	0.008
	CV (%)	ضریب تغییرات		*0.95*	*8.19*	*1.29*	*2.34*
۱۰۸ ساعت 108 h	Cadmium stress	تنش کادمیوم	4	54.587**	2.255**	77.481**	5.427**
	Error	خطا	10	0.071	0.030	0.135	0.024
	CV (%)	ضریب تغییرات		*2.34*	*7.63*	*2.69*	*4.50*

*، ** وns: به ترتیب اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و نبود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪

*, ** and ns: significant at a probability level of 5% and 1%, and non-significant at probability level of 5%, respectively



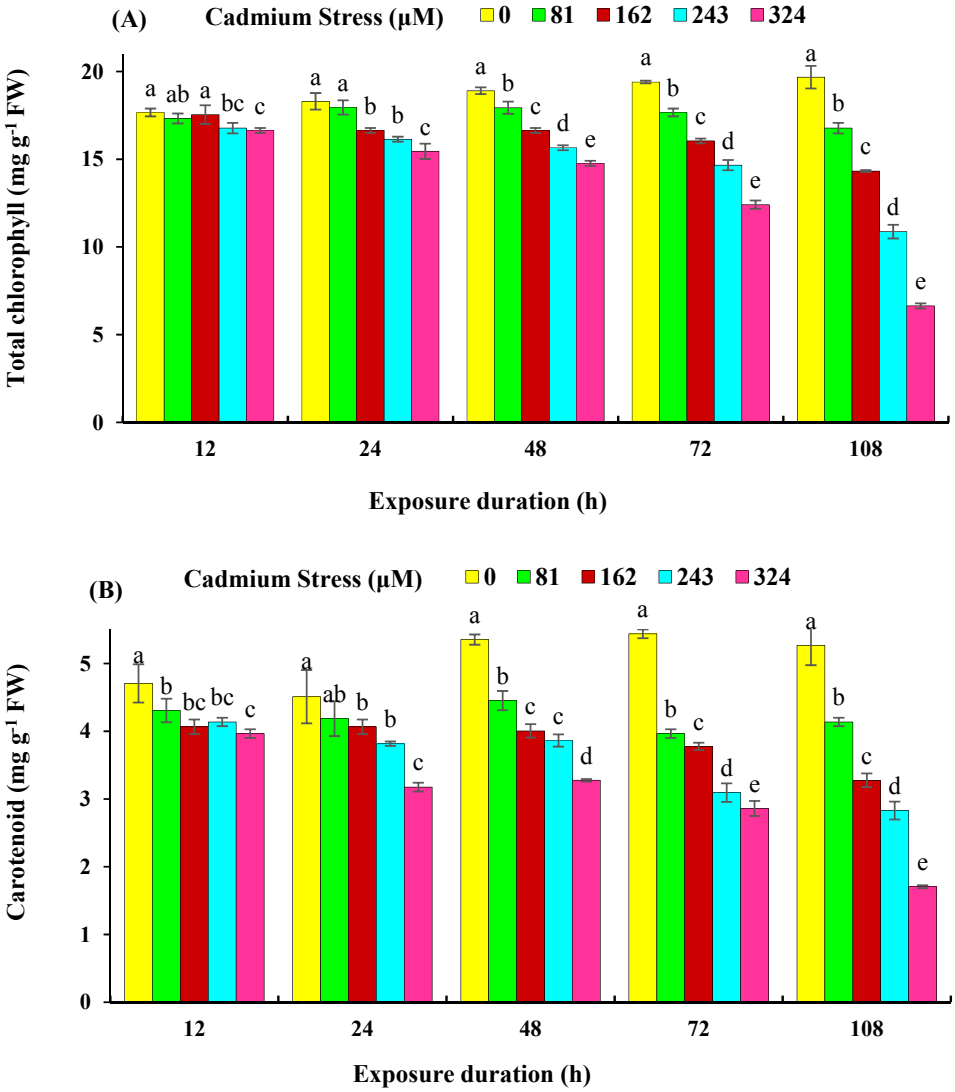
شکل ۲. تأثیر غلظت‌های مختلف کادمیوم بر میزان کلروفیل a (A) و کلروفیل b (B) در مدت‌زمان‌های مختلف پس تیمار در گاوزبان اروپایی. داده‌ها میانگین ۳ تکرار و میله‌های عمودی نشان‌دهنده خطای استاندارد است. حروف متمایز در هر بازه زمانی، نشان‌دهنده تفـاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ است.

Fig. 2. The effect of different concentrations of cadmium on the chlorophyll a (A) and chlorophyll b (B) content in borage at different exposure times. The data are the mean of 3 replicates and the error bars indicate the standard error. Distinct letters in each sampling time indicate a significant difference at the 5% level of probability.

شاخص سبزینگی

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۲) نشان داد که شاخص سبزینگی به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر تیمار کادمیوم قرار گرفت. ۲۴ ساعت بعد از اعمال تنش کادمیوم، کمترین میزان شاخص سبزینگی در تیمار ۳۲۴ میکرومولار کادمیوم مشاهده شد که به‌طور معنی‌داری کمتر از سایر سطوح تنش کادمیوم بود. در این زمان بین سایر غلظت‌های کادمیوم از نظر آماری اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. در زمان‌های ۴۸ و ۱۰۸ ساعت بعد از اعمال تنش، بیشترین میزان شاخص سبزینگی مربوط به تیمار شاهد (عدم کاربرد کادمیوم) بود که به‌طور معنی‌داری بیشتر از تیمارهای کاربرد کادمیوم بود. با افزایش غلظت کادمیوم از ۸۱ به ۳۲۴ میکرومولار شاخص سبزینگی برگ‌های گاوزبان اروپایی کاهش یافت، به‌طوری در گیاهان تحت تیمار با غلظت ۳۲۴ میکرومولار کادمیوم، میزان شاخص سبزینگی کمترین بود. ۴۸ ساعت بعد از تیماردهی بین غلظت ۲۴۳ و ۳۲۴ میکرومولار کادمیوم اختلاف معنی‌داری مشاهده

نشد (شکل ۴). کلروفیل نقش مهمی در فرایندهای مرتبط با فتوسنتز مانند جذب نور، ترکیب با کمپلکس پروتئین‌ها و انتقال انرژی به‌صورت کربوهیدرات‌ها بازی می‌کند (Dalla Vecchia et al., 2005). به نظر می‌رسد کاهش شاخص کلروفیل تحت تنش کادمیوم ناشی از تجزیه رنگریزه‌های فتوسنتزی، تخریب کلروپلاست‌ها و افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن باشد. رادیکال‌های آزاد باعث پراکسیده شدن لیپیدها و درنتیجه کاهش کارایی کلروفیل و کلروپلاست‌ها در فرایند فتوسنتز می‌شود (Hajiboland et al., 2012). غلظت‌های بالای کادمیوم می‌تواند موجب کلروز و نکروزه شدن برگ و کاهش کلروفیل و درنتیجه کاهش فتوسنتز شود (Chen et al., 2011; Xue et al., 2013). در کلم (Abdollahi and Golchin, 2018) کاهش شاخص سبزینگی با افزایش غلظت کادمیوم گزارش شده که با یافته‌های تحقیق حاضر مطابقت دارد.



شکل ۳. تأثیر غلظت‌های مختلف کادمیوم بر میزان کلروفیل کل (A) و کارتنوئید (B) در مدت‌زمان‌های مختلف پس تیمار در گاوزبان اروپایی. داده‌ها میانگین ۳ تکرار و میله‌های عمودی نشان‌دهنده خطای استاندارد است. حروف متمایز در هر بازه زمانی، نشان‌دهنده تفـاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ است

Fig. 3. The effect of different concentrations of cadmium on the total chlorophyll (A) and carotenoids (B) content at different times after treatment in borage. The data are the mean of 3 replicates and the error bars indicate the standard error. Distinct letters in each sampling time indicate a significant difference at the 5% level of probability.

جدول ۲. تجزیه واریانس (میانگین مربعات) تأثیر غلظت‌های مختلف کادمیوم بر فلورسانس کلروفیل و شاخص سبزینگی گاوزبان اروپایی در مدت‌زمان زمان‌های مختلف پس از تنش

Table 2. Analysis of variance of the effect of concentrations of cadmium on chlorophyll fluorescence and chlorophyll index (SPAD) in different exposure duration

			Mean of Squares			میانگین مربعات	
زمان نمونه‌برداری Sampling time	منابع تغییرات SOV	درجه آزادی df	فلورسانس کمینه F_0	فلورسانس بیشینه F_m	فلورسانس متغیر F_v	حداکثر کارایی کوانتومی فتوسیستم II F_v/F_m	شاخص سبزینگی Cholorophyll Index
۲۴ ساعت 24 h	Cadmium stress تنش کادمیوم	4	1.767^{ns}	927.233^{ns}	930.733^{ns}	0.00007**	4.048**
	Error خطا	10	6.267	2017.800	2002.467	0.00001	0.425
	CV (%) ضریب تغییرات		*1.13*	*3.96*	*1.48*	*0.44*	*2.19*
۴۸ ساعت 48 h	Cadmium stress تنش کادمیوم	4	31.933**	7359.733**	6424.733*	0.0001**	30.701**
	Error خطا	10	3.800	1087.067	1129.00	0.00003	0.455
	CV (%) ضریب تغییرات		*0.87*	*2.91*	*3.69*	*0.70*	*2.50*
۱۰۸ ساعت 108 h	Cadmium stress تنش کادمیوم	4	265.900**	68145.900**	60653.100**	0.001**	42.876**
	Error خطا	10	25.333	3314.600	3438.133	0.00005	0.519
	CV (%) ضریب تغییرات		*2.27*	*5.41*	*7.01*	*0.90*	*2.74*

*، ** وns: به ترتیب اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و نبود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪

*, ** and ns: significant at a probability level of 5% and 1% and non-significant at probability level of 5%, respectively

فلورسانس کلروفیل

بر اساس نتایج تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۲) میزان فلورسانس کمینه (F_0)، فلورسانس بیشینه (F_m)، فلورسانس متغیر (F_v) و حداکثر کارایی کوانتومی فتوسیستم II (F_v/F_m) به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر تنش کادمیوم قرار گرفت. F_0 بیانگر مقدار فلورسانسی است که پذیرنده کوئینون آ (QA) در فتوسیستم II در بالاترین مقدار شرایط اکسیداسیونی قرار دارد (Baker, 2008). ۲۴ ساعت بعد از اعمال تنش کادمیوم اگرچه بین غلظت‌های مختلف کادمیوم اختلاف معنی‌داری از نظر میزان فلورسانس کمینه مشاهده نشد، اما بیشترین میزان فلورسانس کمینه در غلظت ۳۲۴ میکرومولار کادمیوم مشاهده شد (جدول ۳). با افزایش غلظت کادمیوم در ۴۸ و ۱۰۸ ساعت بعد از اعمال تنش، میزان فلورسانس کمینه افزایش یافت. در این زمان‌ها، بالاترین میزان فلورسانس کمینه در تیمار ۳۲۴ میکرومولار کادمیوم مشاهده شد که به‌طور معنی‌داری بیشتر از تیمار شاهد (عدم کاربرد کادمیوم) بود. بین تیمارهای ۲۴۳ و ۳۲۴ میکرومولار کادمیوم از نظر آماری اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. کمترین میزان فلورسانس کمینه در تیمار عدم کاربرد کادمیوم به دست آمد. در شرایط تنش کادمیوم افزایش میزان فلورسانس کمینه در برگ‌های گاوزبان اروپایی نشان می‌دهد که مقدار کمتری از انرژی تابشی برای فتوسنتز مورداستفاده قرار می‌گیرد که این موضوع نشان‌دهنده آسیب به زنجیره انتقال الکترون در فتوسیستم II، دگرگونی ساختار و تغییر در رنگ‌دانه‌های فتوسیستم II در شرایط تنش است (Zlatev and Yordanov, 2004).

مقدار فلورسانس بیشینه و فلورسانس متغیر با افزایش غلظت کادمیوم کاهش پیدا کرد که این کاهش در ۲۴ ساعت بعد از اعمال تنش در هیچ‌یک از غلظت‌های کادمیوم معنی‌دار نبود؛ اما در ۴۸ ساعت پس از اعمال تنش، در غلظت ۳۲۴ میکرومولار و در ۱۰۸ ساعت پس از اعمال تنش در غلظت‌های ۲۴۳ و ۳۲۴ میکرومولار نسبت به شاهد مقدار

فلورسانس بیشینه و فلورسانس متغیر به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (جدول ۳). کاهش فلورسانس بیشینه می‌تواند ناشی از کاهش فعالیت فتوسیستم II در اثر تخریب سیستم فتوسنتزی باشد. با ممانعت از انتقال الکترون در فتوسیستم II، گونه‌های فعال اکسیژن تولیدشده با حمله به لیپیدهای غشایی و ایجاد رادیکال‌های آزاد، باعث تخریب غشاهای سلولی و پروتئین‌ها می‌شوند (Zhang et al., 2009).

جدول ۳. تأثیر غلظت‌های مختلف کادمیوم بر فلورسانس کمینه، فلورسانس بیشینه، فلورسانس متغیر، حداکثر کارایی کوانتومی فتوسیستم II (F_v/F_m) درگاوزبان اروپایی در مدت‌زمان های مختلف پس تنش

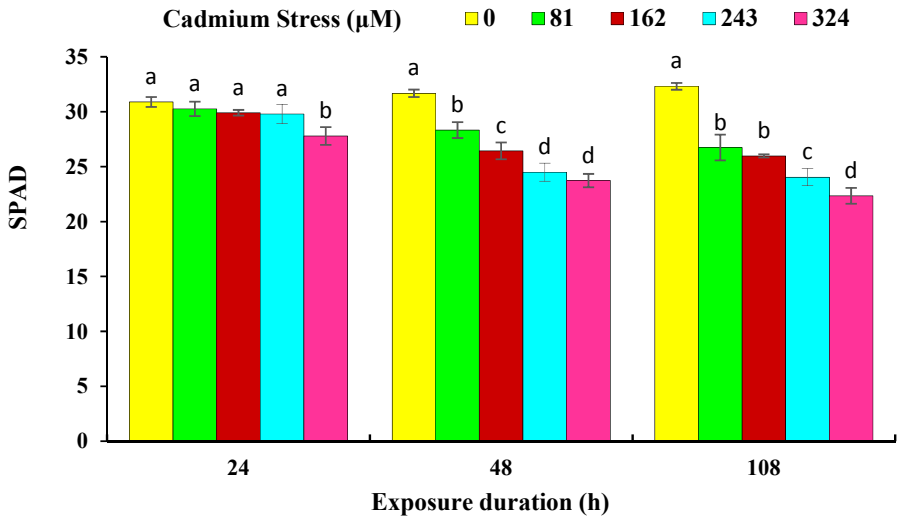
Table 3. The effect of different concentrations of cadmium on minimum fluorescence (F0), maximum fluorescence (Fm), variable fluorescence (Fv), maximal quantum efficiency of photosystem II (Fv / Fm) in borage at different exposure duration

زمان پس از اعمال تنش Sampling time	غلظت کادمیوم Cadmium concentration (µM)	فلورسانس کمینه F_0	فلورسانس بیشینه F_m	فلورسانس متغیر F_v	حداکثر کارایی کوانتومی فتوسیستم II F_v/F_m
۲۴ ساعت 24 hours	0	219.0 ±1.47 a	1144.0±12.16 a	923.0 ±11.01 a	0.814±0.0014 a
	81	220.0 ±2.08 a	1135.7±11.69 a	915.7 ±10.89 a	0.813±0.0017 a
	162	220.0 ±2.57 a	1140.0±28.02 a	883.3 ±48.84 a	0.81±0.0032 a
	243	220.6 ±1.45 a	1148.3±24.16 a	928.3 ±22.24 a	0.809±0.0020 a
	324	221.0 ±1.15 a	1126.7±13.77 a	907. 7±14.71 a	0.801±0.0017 b
۴۸ ساعت 48 hours	0	217.0±2.22 c	1173.7±18.85 a	948. 7±19.83 a	0.817±0.0012 a
	81	220.3±0.89 bc	1172.3±12.17 a	948.0±13.01 a	0.814±0.0028 ab
	162	222.6±1.45 ab	1145.0±11.06 ab	922.3±12.17 a	0.813±0.0011 ab
	243	224.3±1.88 a	1104.3±23.39 bc	884.0±24.26 ab	0.804±0.0046 bc
	324	225.0±1.35 a	1057.7±25.27 c	840.7±24.12 b	0.794±0.0046 c
۱۰۸ ساعت 108 hours	0	206.67±1.45 c	1192.7±29.97 a	961.3±30.88 a	0.820±0.0014 a
	81	219.67±2.33 b	1177.7±8.64 a	950.3±9.17 a	0.820±0.0017 a
	162	220.33±3.53 b	1134.7±15.16 a	914.3±17.94 a	0.821±0.0046 a
	243	227.33±2.72 ab	955.0±11.67 b	735.3±9.68 b	0.801±0.001 b
	324	231.33±3.84 a	853.0±26.72 b	646.3±16.23 b	0.789±0.0078 b

داده‌ها میانگین ۳ تکرار ± خطای استاندارد هستند. برای هر زمان نمونه‌برداری در هر ستون حروف غیر یکسان، نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۵٪ بر اساس آزمون چند دامنه‌ایی دانکن است.

Data are mean of 3 replicates ± standard error. In each sampling time, means followed by the same letter(s) are not significantly different ($p \leq 0.05$).

حداکثر کارایی کوانتومی فتوسیستم II نیز با افزایش غلظت کادمیوم کاهش پیدا کرد. در زمان ۲۴ ساعت پس از اعمال تنش کادمیوم کمترین میزان F_v/F_m در تیمار کاربرد ۳۲۴ میکرومولار کادمیوم حاصل شد که به‌طور معنی‌داری کمتر از تیمار شاهد بود. غلظت‌های ۲۴۳ و ۳۲۴ میکرومولار در ۴۸ و ۱۰۸ ساعت پس از اعمال تنش نسبت به شاهد کاهش معنی‌داری نشان دادند. در این مدت‌زمان کمترین میزان F_v/F_m در تیمار ۳۲۴ میکرومولار کادمیوم به دست آمد که اختلاف معنی‌داری با تیمار ۲۴۳ میکرومولار کادمیوم نداشت (جدول ۳). F_v/F_m نشان‌دهنده حداکثر کارایی کوانتومی فتوسیستم II برای تبدیل نور جذبی به انرژی شیمیایی بوده و به‌عنوان یکی از شاخص‌های تنش استفاده می‌شود، زیرا این نسبت کارایی و یکپارچگی فتوسیستم II را تعیین می‌کند و توانایی گیاه را برای تحمل در برابر تنش‌های محیطی را نشان می‌دهد (Araújo et al., 2017). کاهش F_v/F_m در اثر تنش کادمیوم می‌تواند ناشی از محدود شدن اکسیداسیون مجدد QA از طریق کاهش یا ایجاد مانعی در مسیر انتقال الکترون در واکنش نوری فتوسنتزی در فتوسیستم II باشد (Mallick et al., 2003; Dezhban et al., 2016).



شکل ۴. تأثیر غلظت کادمیوم بر شاخص سبزینگی (SPAD) در گاوزبان اروپایی در زمان‌های مختلف پس از تنش. داده‌ها میانگین ۳ تکرار و میله‌های عمودی نشان‌دهنده خطای استاندارد است. حروف متمایز در هر بازه زمانی، نشان‌دهنده تفـاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ است.

Fig. 4. The effect of cadmium concentration on chlorophyll index (SPAD) in borage at different exposure duration. The data are the mean of 3 replicates and the error bars indicate the standard error. Distinct letters in each sampling time indicate a significant difference at the 5% level of probability.

همچنین کاهش F_v/F_m ممکن است به دلیل برهمکنش و رقابت غیرمستقیم کادمیوم با ریزمغذی‌هایی مانند آهن، منگنز و روی باشد که دسترسی گیاهان به این عناصر را به‌عنوان کوفاکتور آنزیم‌ها، رنگ‌دانه‌ها و اجزای ساختاری دستگاه فتوسنتز با چالش روبرو می‌کند (Khan et al., 2013). در مطالعه انجام‌گرفته روی پنبه (Khan et al., 2013) گزارش شده است که تنش کادمیوم سبب کاهش حداکثر کارایی کوانتومی فتوسیستم II می‌شود که این کاهش بیانگر وقوع آسیب در مرکز واکنش فتوسیستم II است. چنین کاهشی در فلورسانس کلروفیل منجر به کاهش فتوسنتز و درنهایت رشد گیاه می‌شود. در ذرت (Ekmekci et al., 2008)، بادرنجبویه (Yaghoubian et al., 2016)، برنج (He et al., 2008) و گوجه‌فرنگی (Lopez-Millan et al., 2009) نیز تأثیر تنش کادمیوم بر متغیرهای فلورسانس کلروفیل موردمطالعه قرار گرفت و نتایج مطالعات نشان‌دهنده حساسیت بالای متغیرهای فلورسانس کلروفیل به سمیت ناشی از کادمیوم است.

میزان آنتوسیانین

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که میزان آنتوسیانین در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۱۰۸ ساعت پس تیمار به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر تنش کادمیوم قرار گرفت، ولی در زمان ۱۲ ساعت پس از تنش اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (جدول ۴). نتایج حاصل از مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که با افزایش شدت تنش کادمیوم میزان تولید و تجمع آنتوسیانین در برگ‌های گاوزبان اروپایی افزایش یافته است. در زمان‌های مختلف پس از تیمار، در بین غلظت‌های مختلف کادمیوم، کاربرد ۳۲۴ میکرومولار سبب تولید بیشترین مقدار آنتوسیانین در برگ‌های گاوزبان اروپایی گردید و کمترین مقدار آنتوسیانین در تیمار شاهد مشاهده شد. بین تیمار ۳۲۴ میکرومولار کادمیوم و تیمار شاهد از نظر مقدار آنتوسیانین موجود در برگ‌های گیاهچه‌های گاوزبان اروپایی اختلاف معنی‌داری وجود داشت (جدول ۵). اعمال تیمار ۳۲۴ میکرومولار کادمیوم در زمان‌های مختلف پس از اعمال تنش، موجب شد مقدار آنتوسیانین در حدود ۱۶/۴۱ تا ۲۵/۸۴ درصد نسبت به تیمار عدم کاربرد کادمیوم افزایش یابد. بین غلظت‌های مختلف کادمیوم در زمان‌های ۱۲ ساعت بعد از تیمار از نظر آماری اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. در مدت‌زمان تیماردهی ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۱۰۸ ساعت، افزایش غلظت کادمیوم باعث افزایش میزان آنتوسیانین در برگ‌های گاوزبان اروپایی گردید بیشترین مقدار آن در غلظت ۳۲۴ میکرومولار کادمیوم مشاهده شد (جدول ۵). در زمان‌های

مختلف اختلاف کم تغییرات آنتوسیانین نشان می‌دهد که میزان تجمع آنتوسیانین ارتباط زیادی با زمان پس از اعمال تیمار کادمیوم ندارد. درصورتی‌که بین سطوح مختلف کادمیوم اختلاف معنی‌دار مشاهده شد (جدول ۵). نتایج به‌دست‌آمده در تحقیق حاضر مبنی بر افزایش تجمع آنتوسیانین هنگام اعمال تنش کادمیوم است. از نتایج به‌دست‌آمده در این تحقیق چنین به نظر می‌رسد که غلظت‌های بالای کادمیوم بر مقدار آنتوسیانین موجود تأثیر گذاشته و موجب افزایش مقدار این رنگیزه‌ها شده است.

ترکیبات فنلی شامل آنتوسیانین‌ها و فلاونوئیدها جزو متابولیت‌های ثانویه هستند که می‌توانند به‌عنوان آنتی‌اکسیدان در شرایط وجود تنش‌های محیطی مانند تنش فلزات سنگین با حذف رادیکال‌های آزاد به حفظ سیستم فتوسنتزی در گیاهان کمک کنند (Solecka, 1997). همچنین به نظر می‌رسد آنتوسیانین موجب تسهیل در انتقال کادمیوم به واکوئل می‌شود (Amiri et al., 2012)، بنابراین افزایش آنتوسیانین در برگ گاوزبان اروپایی تحت تنش کادمیوم در تحقیق حاضر می‌تواند به‌عنوان مکانیسم مقاومت این گیاه در برابر تنش کادمیوم عمل کند. در گیاه مرزه (Azizollahi et al., 2019) و مریم‌گلی (Gerami et al., 2018) و داتوره (Nateghi et al., 2020) نیز افزایش میزان آنتوسیانین در اثر تنش کادمیوم گزارش شده که با نتایج این تحقیق مطابقت داشت.

جدول ۴. تجزیه واریانس تأثیر تنش کادمیوم بر متابولیت‌های ثانویه و قندهای محلول در گاوزبان اروپایی در مدت‌زمان‌های مختلف پس از تنش

Table 4. Analysis of variance of the effect of cadmium stress on secondary metabolites and soluble sugars in borage at different exposure duration

زمان نمونه‌برداری Sampling time	SOV	منابع تغییرات	درجه آزادی df	Mean of Squares: آنتوسیانین Anthocyanin	Mean of Squares: فنل Phenol	میانگین مربعات: فلاونوئید Flavonoid	میانگین مربعات: قند محلول soluble sugar
۱۲ ساعت 12 h	Cadmium stress	تنش کادمیوم	4	0.109 ns	206.943**	20.487**	0.00002 ns
	Error	خطا	10	0.042	6.710	1.168	0.00005
	CV (%)	ضریب تغییرات		*7.37*	*20.46*	*6.41*	*14.41*
۲۴ ساعت 24 h	Cadmium stress	تنش کادمیوم	4	0.128*	322.982**	101.119**	0.002**
	Error	خطا	10	0.028	11.909	3.839	0.00004
	CV (%)	ضریب تغییرات		*6.01*	*21.88*	*9.61*	*18.21*
۴۸ ساعت 48 h	Cadmium stress	تنش کادمیوم	4	0.290**	1160.196**	147.755**	0.041**
	Error	خطا	10	0.020	4.723	3.223	0.00008
	CV (%)	ضریب تغییرات		*4.65*	*6.97*	*7.73*	*8.88*
۷۲ ساعت 72 h	Cadmium stress	تنش کادمیوم	4	0.075*	1226.450**	75.193**	0.072**
	Error	خطا	10	0.037	4.127	4.610	0.0001
	CV (%)	ضریب تغییرات		*6.58*	*6.01*	*9.40*	*5.40*
۱۰۸ ساعت 108 h	Cadmium stress	تنش کادمیوم	4	0.181*	1618.484**	179.229**	0.202**
	Error	خطا	10	0.036	6.088	7.088	0.0001
	CV (%)	ضریب تغییرات		*6.28*	*6.66*	*9.08*	*2.85*

*، ** وns: به ترتیب اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و نبود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪

*, ** and ns: significant at a probability level of 5% and 1% and non-significant at probability level of 5%, respectively

جدول ۵. تأثیر غلظت کادمیوم بر میزان متابولیت‌های ثانویه و قندهای محلول در گاوزبان اروپایی در زمان‌های مختلف پس از تنش

Table 5. The effect of cadmium concentration on the amount of secondary metabolites and soluble sugars in borage at different exposure duration

زمان پس از اعمال تنش Time after treatment	غلظت کادمیوم Cadmium concentration	آنتوسیانین Anthocyanin	فنل Phenol	فلاونوئید Flavonoid	قندهای محلول Soluble Suger
	µM	µmol g^{-1}	mg g^{-1}		
۱۲ ساعت 12 hours	0	2.60±0.16 a	2.05±0.33 c	13.07±0.41 c	0.0133±0.003 a
	81	2.65±0.10 a	6.53±0.72 c	15.34±0.53 b	0.0151±0.004 a
	162	2.69±0.06 a	14.47±2.26 b	17.61±0.32 a	0.0155±0.003 a
	243	2.91±0.14 a	17.73±2.28 b	18.99±0.93 a	0.0186±0.005 a
	324	3.05±0.07 a	22.50±0.4 a	19.23±0.72 a	0.0200±0.004 a
۲۴ ساعت 24 hours	0	2.51±0.11 c	2.14±0.33 d	13.09±0.68 c	0.0137±0.002 d
	81	2.70±0.07 bc	9.14±0.92 c	18.63±0.41 b	0.0144±0.003 d
	162	2.77±0.06 abc	17.92±3.18 b	19.11±0.47 b	0.0334±0.004 c
	243	2.84±0.12 ab	20.82±2.67 b	22.15±1.04 b	0.0532±0.004 b
	324	3.08±0.07 a	28.84±1.26 a	28.96±2.11 a	0.0694±0.005 a
۴۸ ساعت 48 hours	0	2.68±0.06 b	2.52±0.32 l e	14.57±0.66 d	0.0179±0.002 d
	81	2.89± 0.08 ab	20.91±0.56 d	19.4±1.31 c	0.0215±0.004 d
	162	2.94±0.07 ab	36.97±2.26 c	22.2±0.78 c	0.0536±0.005 c
	243	2.98±0.09 ab	43.22±0.89 b	27.11±1.13 b	0.1298±0.006 b
	324	3.12±0.10 a	52.19±1.23 a	32.78±1.37 a	0.2977±0.007 a
۷۲ ساعت 72 hours	0	2.67±0.07 c	3.36±0.32 e	16.12±0.54 c	0.0504±0.002 d
	81	2.76±0.10 c	26.91±0.56 d	19.58±1.44 c	0.0825±0.003 c
	162	3.08±0.13 b	35.85±1.54 c	23.53±1.24 b	0.1040±0.007 c
	243	3.31±0.12 ab	49.20±0.94 b	26.69±1.32 ab	0.2758±0.005 b
	324	3.36±0.09 a	54.15±1.78 a	28.24±1.41 a	0.4145±0.004 a
۱۰۸ ساعت 108 hours	0	2.73±0.10 c	3.36±0.16 e	18.81±0.83 d	0.1199±0.005 e
	81	2.90±0.14 bc	27.44±0.64 d	26.39±1.40 c	0.1580±0.005 d
	162	2.97±0.04 bc	38.46±1.86 c	29.44±1.36 bc	0.2645±0.005 c
	243	3.11±0.09 ab	52.84±1.81 b	31.95±2.54 b	0.5231±0.006 b
	324	3.39±0.13 a	63.11±1.71 a	39.95±0.90 a	0.7278±0.009 a

داده‌ها میانگین ۳ تکرار ± خطای استاندارد هستند. برای هر گروه تیماری در هر ستون حروف غیر یکسان، نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۵٪ بر اساس آزمون چند دامنه‌ایی دانکن است.

In each column, means which followed by the same letter(s) are not significantly different ($p \leq 0.05$)

میزان فنل کل

میزان فنل کل به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر تیمارهای کادمیوم قرار گرفت (جدول ۴). نتایج نشان داد با افزایش زمان تیماردهی از ۱۲ تا ۱۰۸ ساعت میزان فنل در تمامی تیمارهای کادمیوم افزایش یافت. همچنین، افزایش غلظت کادمیوم از ۰ تا ۳۲۴ میکرومولار باعث افزایش معنی‌دار فنل شد. میزان فنل کل بسته به غلظت کادمیوم و مدت‌زمان تیمار متفاوت بود، به‌طوری‌که در زمان ۱۲ ساعت پس از تیمار بین ۲/۰۵-۲۲/۵۰، در زمان ۲۴ ساعت بین ۲/۱۴-۲۸/۸۴، در زمان ۴۸ ساعت ۲/۵۲-۵۲/۱۹، در زمان ۷۲ ساعت بین ۳/۳۶-۵۴/۱۵ و در زمان ۱۰۸ ساعت بین ۳/۳۶-۶۳/۱۱ متغیر بود. در تمامی زمان‌های موردمطالعه کاربرد غلظت‌های مختلف کادمیوم موجب افزایش معنی‌دار میزان فنل در مقایسه با تیمار شاهد گردید. به‌طوری‌که بیشترین و کمترین مقدار فنل موجود در برگ‌های گاوزبان اروپایی به ترتیب در تیمار ۳۲۴ میکرومولار و تیمار شاهد مشاهده گردید (جدول ۵). در ماش (Leng et al., 2020) و مریم‌گلی (Gerami et al., 2018) نیز افزایش میزان فنل در اثر تنش کادمیوم گزارش شده است. از مکانیسم‌های مهم دفاع غیرآنزیمی برای مقابله با تنش اکسیداتیو ناشی از تنش کادمیوم در برگ

گاوزبان، تجمع ترکیب‌های فنلی است که به‌عنوان گیرنده رادیکال‌های آزاد عمل می‌کند و باعث افزایش مقاومت گیاهان در برابر تنش‌های اکسیدکننده ناشی از کادمیوم می‌شود (Schaller and Kieber, 2002). در تحقیق حاضر، همان‌طوری که در جدول ۵ مشاهده می‌شود، در تیمار شاهد با افزایش مدت‌زمان پس از تیمار محتوای فنل کل افزایش معنی‌داری نداشته، ولی در تنش کادمیوم با افزایش غلظت و مدت‌زمان پس از تیمار میزان فنل کل به‌طور معنی‌داری افزایش یافته است.

میزان فلاونوئید

نتایج حاصل از جدول ۴ نشان داد که تیمارهای کادمیوم تأثیر معنی‌داری بر میزان فلاونوئید برگ‌های گاوزبان اروپایی داشتند. در تمام تیمارهای موردمطالعه تنش کادمیوم موجب افزایش معنی‌دار میزان فلاونوئید برگ‌های گاوزبان اروپایی گردید. با افزایش غلظت کادمیوم نیز میزان فلاونوئید نیز افزایش یافت به‌طوری‌که بیشترین میزان فلاونوئید برگ‌های گیاهان تحت تنش ۳۲۴ میکرومولار کادمیوم مشاهده شد که به‌طور معنی‌داری بیشتر از شرایط بدون تنش بود (جدول ۵).

اگرچه در تمام مدت‌زمان‌های نمونه‌برداری پس از اعمال کادمیوم، بیشترین میزان فلاونوئید در تیمار ۳۲۴ میکرومولار کادمیوم مشاهده شد اما در زمان ۱۲ ساعت پس از اعمال تنش بین تیمارهای ۱۶۲، ۲۴۳ و ۳۲۴ میکرومولار اختلاف معنی‌دار از نظر میزان فلاونوئید مشاهده نشد ولی بین این سه تیمار با تیمارهای ۰ و ۸۱ میکرومولار اختلاف معنی‌دار وجود داشت. در زمان ۲۴، ۴۸ و ۱۰۸ ساعت بعد از تیماردهی با افزایش غلظت تنش کادمیوم میزان فلاونوئید افزایش معنی‌داری داشت. در این تیمارها غلظت ۳۲۴ میکرومولار دارای بیشترین مقدار فلاونوئید بود که اختلاف معنی‌دار با سایر تیمارها داشت. در زمان ۷۲ ساعت نیز بیشترین مقدار فلاونوئید مربوط به تیمار ۳۲۴ میکرومولار بود که اختلاف معنی‌داری با غلظت ۲۴۳ میکرومولار کادمیوم نداشت. در این تحقیق میزان فلاونوئید در طی تنش کادمیوم در گیاه گاوزبان اروپایی افزایش یافت. در حقیقت این ترکیب به‌عنوان آنتی‌اکسیدان‌های ثانویه بوده که گیاه جهت مقاومت به شرایط تنش‌های محیطی تولید کرده و از طریق جاروب کردن رادیکال‌های آزاد، به تنش اعمال‌شده پاسخ می‌دهد (Kubi, 2005). افزایش میزان فلاونوئید تحت تأثیر تنش کادمیوم در گندم (Agami and Mohamed, 2013) و مریم‌گلی (Gerami et al., 2018) نیز گزارش شده است.

میزان قندهای محلول

نتایج حاصل ۴ نشان داد که تنش کادمیوم موجب افزایش میزان قندهای محلول در گاوزبان اروپایی گردید. در تمام مدت‌زمان‌های تیماردهی، بیشترین و کمترین میزان قند محلول به ترتیب در تیمار کاربرد ۳۲۴ میکرومولار کادمیوم و تیمار شاهد به دست آمد. در زمان ۱۲ ساعت بعد از تیماردهی اگرچه بیشترین میزان قند محلول در تیمار کاربرد ۳۲۴ میکرومولار کادمیوم مشاهده شد اما اختلاف معنی‌داری بین غلظت‌های مختلف کادمیوم از نظر میزان قند مشاهده نشد. در زمان‌های ۲۴ ساعت تا ۱۰۸ ساعت بعد از تیماردهی، اعمال تنش کادمیوم موجب افزایش معنی‌دار میزان قند محلول نسبت به تیمار شاهد گردید. در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از تیماردهی بین تیمار شاهد و غلظت ۸۱ میکرومولار کادمیوم اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد؛ اما با افزایش مدت‌زمان اعمال تنش کادمیوم، کمترین میزان قند محلول در تیمار شاهد مشاهده شد که به‌طور معنی‌داری کمتر از تیمار کاربرد کادمیوم در گاوزبان اروپایی بود. در این مدت‌زمان‌ها با افزایش غلظت کادمیوم میزان قند محلول نیز به‌طور معنی‌داری افزایش یافت به‌طوری‌که تیمار غلظت ۳۲۴ میکرومولار کادمیوم دارای بیشترین مقدار قند محلول بود. نتایج به‌دست‌آمده در این تحقیق حاضر با یافته‌های عزیزالهی و همکاران (Azizollahi et al., 2019) مبنی بر افزایش میزان تجمع قند با افزایش زمان پس از تنش کادمیوم مطابقت داشت.

نتیجه‌گیری نهایی

به‌طورکلی نتایج این تحقیق نشان داد که فلز سنگین کادمیوم باعث کاهش شاخص سبزینگی، رنگریزه‌های فتوسنتزی (کلروفیل a و b، کلروفیل کل، کارتنوئیدها) و حداکثر کارایی کوانتومی فتوسیستم II در برگ‌های گاوزبان اروپایی گردید به‌طوری‌که با افزایش غلظت و زمان پس از اعمال تنش کادمیوم مقدار این صفات نسبت به تیمار شاهد (عدم کاربرد کادمیوم) کاهش یافت. همچنین افزایش غلظت کادمیوم و مدت تیماردهی در محیط کشت هیدروپونیک سبب شد تا میزان انباشت کادمیوم در برگ‌های گاوزبان اروپایی افزایش

یابد. در گیاهان تیمار شده با غلظت‌های مختلف کادمیوم، میزان متابولیت‌های ثانویه مانند آنتوسیانین، فنل، فلاونوئید و قندهای محلول در نمونه‌های برگی افزایش یافت که نشان‌دهنده افزایش سوخت‌وساز گیاه در اثر تنش ایجادشده توسط عنصر سنگین کادمیوم است. به‌طورکلی نتایج این تحقیق نشان داد که افزایش غلظت کادمیوم از طریق کاهش میزان رنگیزه‌ها فتوسنتزی و حداکثر کارایی کوانتومی فتوسیستم II (Fv/Fm) بر فتوسنتز گیاه تأثیر منفی می‌گذارد. همچنین با افزایش مدت‌زمان اعمال تنش از ۱۲ تا ۱۰۸ ساعت تأثیر کادمیوم بر خصوصیات فتوسنتزی تشدید می‌شود. از طرف دیگر تجمع کادمیوم در برگ‌های گاوزبان اروپایی موجب افزایش میزان متابولیت‌های ثانویه در این گیاه می‌گردد. گیاه گاوزبان اروپایی از طریق افزایش میزان متابولیت‌های ثانویه خود از اثرات منفی تنش کادمیوم می‌کاهد.

منابع

Abdollahi, S., Golchin, A., 2018. Biomass production and cadmium accumulation and translocation in three varieties of cabbage. Iranian Journal of Soil and Water Research. 49, 243-259. [In Persian with English Summary]

Agami, R.A., Mohamed, G.F., 2013. Exogenous treatment with indole-3-acetic acid and salicylic acid alleviates cadmium toxicity in wheat seedlings. Ecotoxicology and Environmental Safety. 94, 164-171.

Al-Farsi, M., Alasalvar, C., Morris, A., Baron, M.G., Shahidi, F., 2005. Comparison of antioxidant activity, anthocyanins, carotenoids, and phenolics of three native fresh and sun-dried date (*Phoenix dactylifera* L.) varieties grown in Oman. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 53, 7592-7599.

Amiri, J., Entesari, S., Delavar, K., Saadatmand, M., Aghamohammad Rafie, N., 2012. The effect of silicon on cadmium stress in *Echium amoenum*. World Academy of Science, Engineering and Technology. 62, 242-245.

Araujo, R.P., de Almeida, A.A.F., Pereira, L.S., Mangabeira, P.A., Souza, J.O., Pirovani, C.P., Baligar, V.C., 2017. Photosynthetic, antioxidative, molecular and ultrastructural responses of young cacao plants to Cd toxicity in the soil. Ecotoxicology and Environmental Safety. 144, 148-157.

Asadi-Samani, M., Bahmani, M., Rafieian-Kopaei, M., 2014. The chemical composition, botanical characteristic and biological activities of *Borago officinalis*: a review. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine. 7, S22-S28.

Azizollahi, Z., Ghaderian, S.M., Ghotbi-Ravandi, A.A., 2019. Cadmium accumulation and its effects on physiological and biochemical characters of summer savory (*Satureja hortensis* L.). International Journal of Phytoremediation. 21, 1241-1252.

Baker, N.R. 2008. Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. Annual Review of Plant Biology. 59, 89-113.

Bavi, K., Kholdebarin, B., Moradshahi, A., 2011. Effect of cadmium on growth, protein content and peroxidase activity in pea plants. Pakistan Journal of Botany. 43, 1467-1470.

Chang, C.C., Yang, M.H., Wen, H.M., Chern, J.C., 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. Journal of Food and Drug Analysis. 10, 178-182.

Chen, S., Xu, B., Liu, L., Luo, Y., Zhou, H., Chen, W., Shen, T., Han, X., Kontes, C.D., Huang, S., 2011. Cadmium induction of reactive oxygen species activates the mTOR pathways, leading to neuronal cell death. Free Radical Biology and Medicine. 50, 624-632.

Chen, X., Wang, J., Chi, Y., Zhao, M.Q., Chi, G.Y., 2011. Effects of cadmium on growth and photosynthetic activities in pakchoi and mustard. Botanical Studies. 52, 41-46.

Clemens, S., Aarts, M.G.M., Thomine, S., Verbruggen, N., 2013. Plant science: the key to preventing slow cadmium poisoning. Trends in Plant Science. 18, 92-99.

Dalla Vecchia, F., La Rocca, N., Moro, I., De Faveri, S., Andreoli, C., Rascio, N. 2005. Morphogenetic, ultrastructural and physiological damages suffered by submerged leaves of *Elodea canadensis* exposed to cadmium. Plant Science. 168, 329-338.

Dezhban, A., Shirvany, A., Attarod, P., Delshad, M., Matinizadeh, M., 2016. Cadmium effect on the chlorophyll fluorescence, chlorophyll

pigments and proline contents of *Celtis caucasica* and *Robinia pseudoacacia* seedlings leaves. Journal of Plant Research. 28, 746-758. [In Persian with English Summary].

Ekmekci, Y., Deniz, T., Beycan, A., 2008. Effects of cadmium on antioxidant enzyme and photosynthetic activities in leaves of two maize cultivars. Journal of Plant Physiology. 165, 600-611.

Farooq, M., Ali, S., Hameed, A., Bharwana, S.A., Rizwan, M., Ishaque, W., Farid, M., Mahmood, K., Iqbal, Z., 2016. Cadmium stress in cotton seedlings: physiological, photosynthesis and oxidative damages alleviated by glycinebetaine. South African Journal of Botany. 104, 61-68.

Gerami, M., Ghorbani, A., Karimi, S., 2018. Role of salicylic acid pretreatment in alleviating cadmium-induced toxicity in *Salvia officinalis* L. Iranian Journal of Plant Biology. 10, 81-96. [In Persian with English Summary].

Hajiboland, R., Ebrahimi, N., Poschenrieder, Ch., 2012. Bound putrescine, a distinctive player under salt stress in the natrophilic sugar beet in contrast to glycophyte tobacco. Journal of Sciences, Islamic Republic of Iran. 23, 105-114.

He, J.Y., Ren, Y.F., Zhu, C., Yan, Y.P., Jiang, D.A., 2008. Effect of Cd on growth, photosynthetic gas exchange, and chlorophyll fluorescence of wild and Cd-sensitive mutant rice. Photosynthetica. 46, 466-470.

Hosseini, S., Zare, N., Sheikhzadeh, P., Abootalebi S. 2021, The effect of nano-silicone on biochemical characteristics of Borago officinalis under the cadmium stress. Environmental Stresses in Crop Sciences. [In Persian with English Summary].

Irigoyen, J.J., Einerich, D.W., Sánchez-Díaz, M., 1992. Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa (*Medicago sativa*) plants. Physiologia Plantarum. 84, 55-60.

Khan, M.D., Mei, L., Ali, B., Chen, Y., Cheng, X., Zhu, S.J., 2013. Cadmium-induced upregulation of lipid peroxidation and reactive oxygen species caused physiological, biochemical, and ultrastructural changes in upland cotton seedlings. BioMed Research International. 2013, 1-10.

Kubi, J., 2005. The effect of exogenous spermidine on superoxide dismutase activity, H2O2 and superoxide radical level in barley leaves under water deficit condition. Acta Physiologie Plantarum. 27, 289-295.

Leng, Y., Li, Y., Ma, Y.H., He, L.F., Li, S.W., 2020. Abscisic acid modulates differential physiological and biochemical responses of roots, stems, and leaves in mung bean seedlings to cadmium stress. Environmental Science and Pollution Research. 28, 6030-6043.

Lichtenthaler, H.K., 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. Methods in Enzymology. 148(11), 350-382.

Lopez-Millan, A.F., Sagardoy, R., Solanas, M., Abadia, A., Abadia, J., 2009. Cadmium toxicity in tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants grown in hydroponics. Environmental and Experimental Botany. 65, 376-385.

Mahmoudi, F., Sheikhzadeh Mosaddegh, P., Zare, N., Esmaielpour, B., 2017. The effect of hydropriming on germination, growth and antioxidant enzymes activity of borage (*Borago officinalis* L.) seedling under cadmium stress. Iranian Journal of Field Crop Science. 48, 253-266. [In Persian with English Summary].

Mallick, N., Mohn, F.H., 2003. Use of chlorophyll fluorescence in metal-stress research: a case study with the green microalga Scenedesmus. Ecotoxicology and Environmental Safety. 55, 64-69.

Meers, E., Van Slycken, S., Adriaensen, K., Ruttens, A., Vangronsveld, J., Du Laing, G., Witters, N., Thewys, T., Tack, T.M.G., 2010. The use of bio-energy crops (*Zea mays*) for phytoattenuation of heavy metals on moderately contaminated soils: a field experiment. Chemosphere. 78, 35-41.

Mobin, M., Khan, N.A., 2007. Photosynthetic activity, pigment composition and antioxidative response of two mustard (*Brassica guncea*) cultivars differing in photosynthetic capacity subjected to cadmium stress. Journal of Plant Physiology. 164, 601-610.

Naeem, M.A., Shabbir, A., Amjad, M., Abbas G., Imran, M., Murtaza, B., Tahir, M., Ahmad, A., 2020. Acid treated biochar enhances cadmium tolerance by restricting its uptake and improving physio-chemical attributes in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). Ecotoxicology and Environmental Safety. 191, 1-9.

Nateghi, S., Ghaderian, S.M., Mostajeran, A., 2020. The effect of cadmium on Atropin

content and the physiological parameters in *Datura stramonium* L. Journal of Plant Process and Function. 9, 17-32. [In Persian with English Summary].

Schaller, G., Kieber, J., 2002. Ethylene. The Arabidopsis Book. American Society Plant Biologists. 17p.

Shahid, M., Dumat, C., Khalid, S., Schreck, E., Xiong, T., Niazi, N.K., 2017. Foliar heavy metal uptake, toxicity and detoxification in plants: a comparison of foliar and root metal uptake. Journal of Hazardous Materials. 325, 36-58.

Sheikhzadeh, P., Zare, N., Mahmoudi, F., 2021. The synergistic effects of hydro and hormone priming on seed germination, antioxidant activity and cadmium tolerance in borage. Acta Botanica Croatica. 80, 1-17.

Singh, B.R., Gupta, S.K., Azaizeh, H., Shilev, S., Sudre, D., Song, W.Y., Martinoia, E., Mench, M., 2011. Safety of food crops on land contaminated with trace elements. Journal of Science of Food and Agriculture. 91, 1349-1366.

Solecka, D., 1997. Role of phenylpropanoid compounds in plant responses to different stress factors. Acta Physiologiae Plantarum. 19, 257-268.

Taherkhani, T., Asghari-Zakaria, R., Omidi, M., Zare, N., 2019. Effect of ultrasonic waves on crocin and safranal content and expression of their controlling genes in suspension culture of saffron (*Crocus sativus* L.). Natural Product Research. 33, 486-493.

Wagner, G.J., 1979. Content and vacuole/extravacuole distribution of neutral sugars, free amino acids, and anthocyanin in protoplasts. Plant Physiology. 64, 88-93.

Walpola, B.C., Arunakumara, K.K.I.U., 2010. Effect of salt stress on decomposition of organic matter and nitrogen mineralization in animal manure amended soils. Journal of Agricultural Sciences. 5, 9-18.

Xue, Z.C., Gao, H.Y., Zhang, L.T., 2013. Effects of cadmium on growth, photosynthetic rate and chlorophyll content in leaves of soybean seedlings. Biologia Plantarum. 57, 585-590.

Yaghoubian, Y., Siadat, S.A., Moradi Telavat, M.R., Pirdashti, H., 2016. Quantify the response of growth and chlorophyll fluorescence parameters of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) medicinal plant to cadmium concentration in the soil. Journal of Plant Production Research (JOPPR). 23, 165-185. [In Persian with English Summary].

Zhang, F., Zhang, H., Wang, G., Xu, L., Shan, Z., 2009. Cadmium-induced accumulation of hydrogen peroxide in the leaf apoplast of *Phaseolus aureus* and *Vicia sativa* and the roles of different antioxidant enzymes. Journal of Hazardous Materials. 168, 76-84.

Zlatev, Z., Yordanov, I.T., 2004. Effect of soil drought on photosynthesis and chlorophyll fluorescence in bean plants. Bulgarian Journal of Plant Physiology. 30, 3-18.