فصلنامه

شناخت و کاربرد گیاهان دارویی

سال دوم، شماره ۱، تابستان ۸۸ صفحات ۱۰-۱

اثر غلظت‌های مختلف مس و بر هم‌کنش آن با کینتین بر چند جنبه بیوشیمیایی و فیزیولوژیک نوروزک (*Salvia leriifolia* Benth.)

مه لقا قربانلی*

دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان، گروه زیست شناسی، گرگان، ایران

فریبا میقانی

موسسه تحقیقات گیاه پزشکی کشور، بخش تحقیقات علفهای هرز، تهران، ایران

شیما سادات میرسعیدقاضی

دانشگاه پیام نور، مرکز تهران، تهران، ایران

محل انجام پژوهش: دانشگاه پیام نور، مرکز تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۹۰/۲/۱۱ **تاریخ پذیرش:** ۹۰/۶/۱۲

چکیده

در این پژوهش، کاربرد خارجی کینتین بر رشد و برخی فرایندهای فیزیولوژیکی نوروزک (*Salvia leriifolia* Benth.) که در محیط کشت محتوی غلظت‌های مختلف سولفات مس (صفر، ۱۰۰، ۳۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ میکرومولار) پرورش یافته بود، مطالعه شد. به طور معمول، چنین گیاهانی، محتوی کلروفیل و طول ریشه کمتر و قند محلول و نامحلول بالاتری نسبت به شاهد داشتند. افزودن کینتین، روند کاهش محتوی کلروفیلی نوروزک تحت تیمار فلز مس را شدت بخشید. اثر مس بر کاهش، رشد ریشه را بی اثر کرد و حتی در غلظت‌های بالای مس، باعث افزایش طول آن شد و غلظت قند محلول و نامحلول را در بخش هوایی و ریشه، کاهش داد. نتایج این مطالعه مشخص کرد که کینتین می‌تواند اثرات نامطلوب مس بر رشد و فیزیولوژی نوروزک را در طی تنش مس، کاهش دهد و از شدت اثرات نامطلوب این تنش بکاهد.

واژه‌های کلیدی: تنش مس، کینتین، کلروفیل، کربوهیدرات، ، نوروزک

مقدمه

نوروزک (*Salvia leriifolia* Benth.) گیاهی است از تیره نعناع، بومی استان خراسان و سمنان که واجد خواص با ارزش آنتی‌اکسیدانی، ضد باکتری، ضد قارچی، ضد دیابت و درد است. اثر ضد درد و آرام‌بخش عصاره برگ نوروزک در دوز ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، قابل مقایسه با دوز ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم دیازپام گزارش شده است. عصاره‌های دانه و برگ، قند خون موش‌های دیابتی را کاهش می‌دهند. همچنین خواص ضدمیکروبی ریشه و برگ این گیاه بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*،

* مسئول مکاتبات ghorbanli@yahoo.com

پزودوموناس ایروژینوزا و *باسیلوس سوبتیلیس* و خواص ضد قارچی آن بر *کاندیدا آلبیکنس*، ثابت شده است که از این حیث، عملکرد آن مشابه داروی کلوتریمازول و برخی آنتی‌بیوتیک‌هاست. تأثیر آنتی‌اکسیدانی ۰/۱ درصد (W/V) عصاره اتانولی برگ در روغن آفتاب‌گردان در ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد، همانند ۰/۰۲ درصد از آنتی‌اکسیدان تجاری بوتیلیتد هیدروکسی تولوئن BHT است (۱).

مس، یک ریز مغذی برای گستره وسیعی از فرایندهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی است که به عنوان کوفاکتور سوپر اکسید دیسموتاز لازم است (۲). در واکنش‌های انتقال الکترون فتوسنتز به شکل پلاستوسیانین (۳) و همچنین در ساختار سیتوکروم اکسیداز میتوکندری شرکت دارد (۴).

فلزات سنگین، دسته‌ای از فلزات جدول مندلیف هستند که چگالی آنها از عنصر آهن (۵/۵ گرم بر سانتی‌متر مکعب) بیشتر باشد (۵). طبق این تعریف، مس جزو فلزات سنگین است. افزایش فلزات سنگین در خاک، منجر به تغییر در ویژگی زراعی خاک، به ویژه ظرفیت تبادل کاتیونی، کاهش میزان فسفات و سولفات قابل استفاده گیاه و تغیرات شیمیایی دیگر در خاک (۶) و کاهش فعالیت موجودات ذره‌بینی می‌شود (۷) و بدین شیوه، بر فعالیت‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه اثر می‌گذارد. فزونی مس در برگ‌ها می‌تواند تغییراتی در فرایندهای تنفس و فتوسنتز، فعالیت آنزیم‌ها و ساختار غشاء و DNA ایجاد نماید. تمامی این موارد، منجر به کاهش رشد می‌شود (۸).

سازش گیاهان به غلظت‌های سمی فلزات، بستگی به سطوح متنوع مکانیزم‌های سلولی و بین سلولی دارد. مکانیزم‌های ملکولی پیشنهاد شده در تحمل فلزی گیاهان شامل دفع مسمومیت به شیوه اتصال به دیواره سلولی، کده‌بندی فلزات در واکوئل و مکانیزم‌های سازشی متابولیکی و آنزیمی است (۹). همچنین، ایجاد کمپلکس با پروتئین‌های ویژه اتصال فلزی در مکانیزم تحمل در برخی گیاهان متحمل به مس پذیرفته شده است (۳).

تنظیم کننده‌های رشد ممکن است قسمتی از یک زنجیره علامت باشند، یا حضورشان می‌تواند واکنش‌هایی را که منجر به علامت‌دهی می‌شود، فعال نماید یا مسبب پاسخ در برابر تنش شود. سیتوکینین‌ها گروهی از فیتوهورمون‌ها هستند که جذب آب را تحریک می‌کنند، تقسیم سلولی را افزایش می‌دهند، نمو اندامی را شدت می‌بخشند و منجر به ترمیم و گسترش اندام هوایی می‌شوند (۱۰). کاهش رشد تحت شرایط تنش، نتیجه جلوگیری از تقسیم سلولی، رشد سلول و یا هر دوی آن‌هاست. این اثرات بازدارنده می‌تواند ناشی از تغییر در توازن تنظیم کننده‌های رشد گیاهی (فیتوهورمون‌ها) بر اثر تنش باشد (۱۱). تحت شرایط نامساعد محیطی، سطوح درون‌زای فیتوهورمون‌ها دچار تغییرات اساسی می‌شود (۱۲). از این رو، تیمار برون‌زای (خارجی) تنظیم‌کننده‌های رشدی به عنوان عامل متقابل روی گیاهان متأثر از تنش می‌تواند روشی جهت بهبود اثرات تنش‌های محیطی غیرزیستی باشد (۱۳).

هدف این پژوهش، بررسی اثرات زیادی مس و بر هم‌کنش آن با کینتین بر برخی فرایندهای فیزیو لوژیکی گیاه نوروزک است.

مواد و روش ها

کشت گلخانه‌ای

بذرهای گیاه نوروزک، از مؤسسه تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی سبزوار، تهیه و با محلول هیپوکلریت سدیم، ۵ دقیقه ضدعفونی شد و ۵ دقیقه دیگر در جریان آب، شستشو شد. به منظور شکستن دوره خواب، بذرها ۷۲ ساعت غوطه‌ور در آب در یخچال ۵ درجه سانتی‌گراد خیسانده شدند. پس از آن برای تسریع در جوانه‌زنی، با فشار اندکی بر بذرها، شکافی در پوسته ضخیم بذر ایجاد گردید. بذرها به ظروف سفالی نمناک، منتقل و هر روز با اسپری آب، سطح سفال و بذرها نمناک شدند و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. بذرهای جوانه زده، به گلدان‌های حاوی ماسه، رس، کود حیوانی و پرلیت به نسبت ۱، ۰/۵، ۰/۵، ۰/۵ منتقل شدند. پس از رسیدن دانه رست‌ها به مرحله ۴ برگی (حدوداً ۲ هفته پس از کشت)، ۱۰۰ میلی‌لیتر غلظت‌های مختلف سولفات مس صفر (شاهد)، ۱۰۰، ۳۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار به محیط

کشت اضافه شد. پس از گذشت دو هفته از اعمال تنش، نوروزک‌ها به دو سری تفکیک شدند. سری اول، محلول کینتین را دریافت نکردند و سری دوم، ۶ میکرومولار کینتین را در سه مرتبه و در فاصله زمانی سه روزه با اسپری کردن اندام هوایی دریافت کردند.

سنجش رشد

طول ریشه و ساقه نوروزک‌ها پس از خروج از خاک و شستشو با آب، اندازه‌گیری شد. از یقه به سمت پایین، با خط‌کش مدرج، بر حسب سانتی‌متر اندازه‌گیری شد و همین‌طور از یقه به سمت بالا و جوانه انتهایی، طول ساقه بر حسب سانتی‌متر با خط‌کش مدرج، اندازه‌گیری شد.

سنجش کلروفیل

۰/۵ گرم بافت تازه برگی، با ۱۰ میلی‌لیتر استن ۸۰ درصد، به خوبی ساییده شد تا یک بافت بی‌رنگ و کاملاً سفید باقی بماند. سپس محلول حاصل، با کاغذ صافی واتمن شماره ۲ صاف گردید. ۱۰ میلی‌لیتر استن دیگر به آن اضافه شد تا حجم محلول به ۲۰ میلی‌لیتر برسد. جذب آن در طول موج ۶۶۳ و ۶۴۵ با استفاده از اسپکتروفتومتر خوانده شد. غلظت رنگیزه‌های کلروفیل، بر حسب میلی‌گرم وزن تر بر اساس روش آرنون تعیین شد (۱۴).

سنجش کربوهیدرات‌ها

کربوهیدرات‌های محلول

بافت خشک ریشه و اندام هوایی گیاه، جداگانه با ۱۰ میلی‌لیتر الکل ۷۰ درصد سائیده شد. پس از یک هفته نگهداری در یخچال به منظور آزاد شدن قندهای محلول، از محلول رویی طبق روش فنل- سولفوریک اسید، شدت رنگ حاصل، با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۸۵ نانومتر خوانده شد (۱۵).

کربوهیدرات‌های نامحلول

رسوب باقی‌مانده از محلول اتانولی که برای سنجش کربوهیدرات‌های محلول استفاده شد، پس از خشک شدن، توزین و به لوله‌های آزمایش محتوی ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر منتقل شد و ۱۵ دقیقه در بن‌ماری آب جوش قرار گرفت. حجم محلول مورد نظر پس از صاف شدن، به ۲۵ میلی‌لیتر رسانده شد. طبق روش فنل- سولفوریک اسید، شدت رنگ حاصل، با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۸۵ نانومتر خوانده شد (۱۵).

نتایج

رشد

در شرایط تنش مس، حضور و غیاب کینتین، اثری بر طول بخش هوایی نداشت. ولی ریشه‌ها در شرایط تنش مس و غیاب کینتین، کاهش رشد معنی‌داری را نسبت به شاهد ($P<۰/۰۵$) نشان دادند. درحالی‌که سری دارای کینتین اثر بازدارنده مس را بی‌اثر کرد و حتی در غلظت‌های بالا مس بر طول ریشه‌ها افزوده شد که این تغییرات نسبت به شاهد ($P<۰/۰۵$) معنی‌دار بودند. در حضور کینتین، بیشترین رشد ریشه، در غلظت ۳۰۰ میکرومولار و کمترین آن در غلظت ۱۰۰ میکرومولار سولفات مس بود (نمودارهای ۱ و ۲).

کلروفیل

در شرایط تنش مس، در حضور و غیاب کینتین، محتوی کلروفیلی با افزایش غلظت تنش مس، کاهش معنی‌داری را نسبت به شاهد ($P<۰/۰۵$) داشت. نوروزک‌های تحت تیمار کینتین، از محتوی کلروفیلی بیشتری برخوردار بودند. حضور کینتین، از شدت کاهش محتوی کلروفیلی کاست (نمودارهای۳، ۴، ۵).

کربوهیدرات‌ها

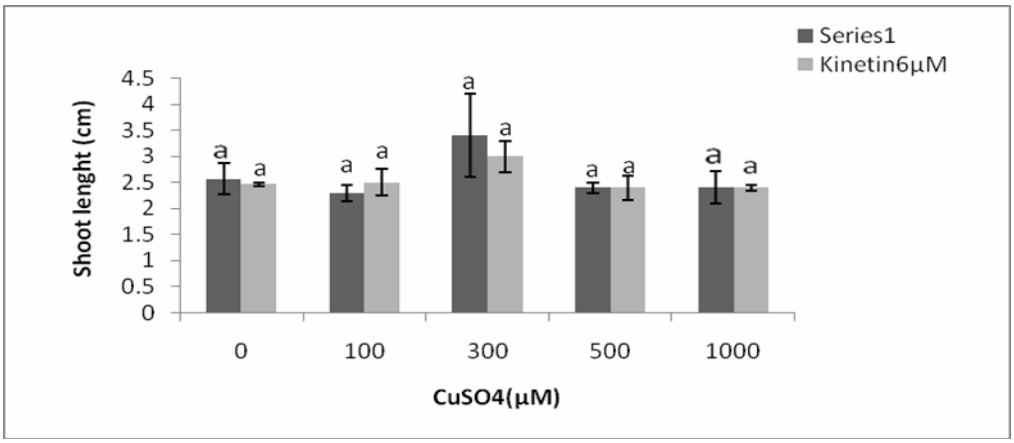
کربوهیدرات‌های محلول

در شرایط تنش مس، در غیاب کینتین، تغییرات کربوهیدرات محلول در بخش هوایی و ریشه نسبت به شاهد ($P<۰/۰۵$) بی‌معنی است. در بخش هوایی و ریشه، با افزایش غلظت مس، بر محتوی کربوهیدرات‌های محلول افزوده شد و فقط ریشه در غلظت ۱۰۰۰ میکرومولار مس، کاهش در محتوی کربوهیدرات نامحلول داشت. در حضور کینتین، از محتوی کربوهیدرات محلول در بخش هوایی و

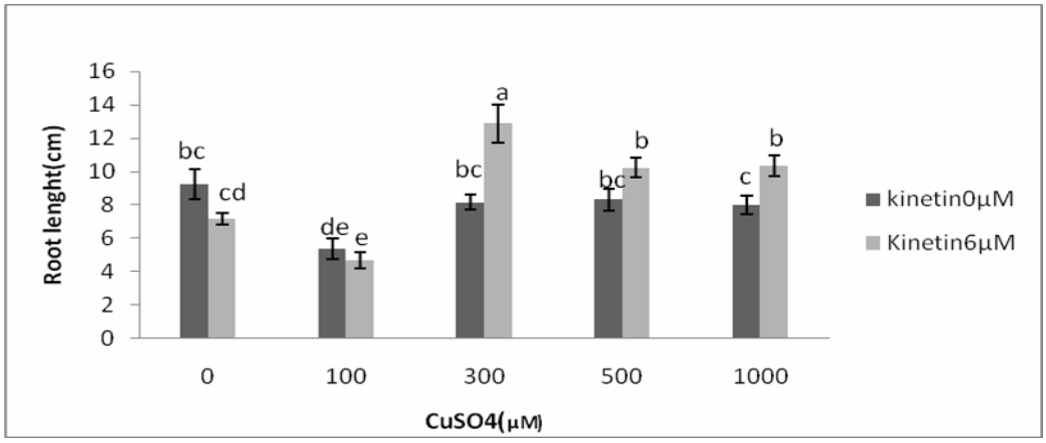
ریشه کاسته شد که این کاهش نسبت به شاهد (P<۰/۰۵) معنی‌دار است (نمودارهای ۶ و ۷).

کربوهیدرات‌های نامحلول

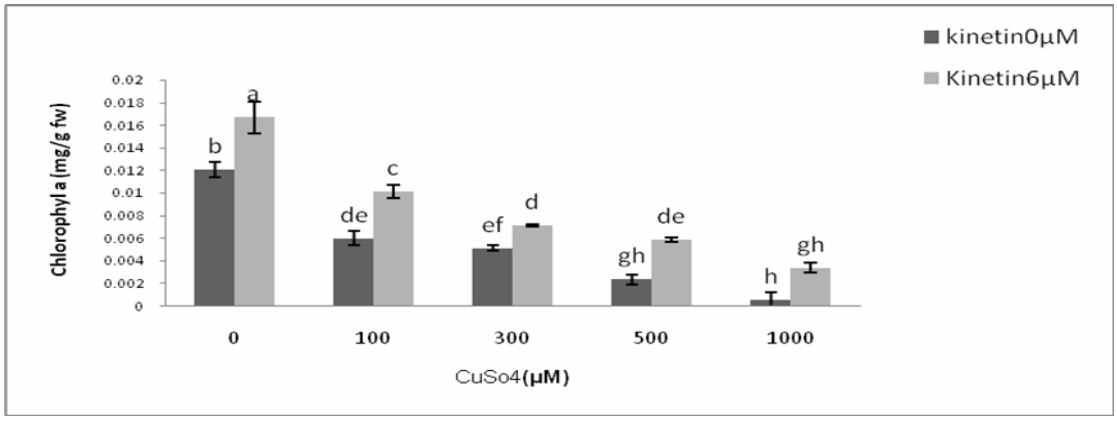
در شرایط تنش مس، در غیاب کینتین، تغییرات کربوهیدرات نامحلول در بخش هوایی و ریشه نسبت به شاهد (P<۰/۰۵) معنی‌دار است. در بخش هوایی، با افزایش غلظت مس، بر محتوای هیدرات کربن نامحلول افزوده شد. در ریشه با افزایش غلظت مس، از محتوای کربوهیدرات نامحلول نسبت به شاهد کاسته شده است. در حضور کینتین، از محتوای کربوهیدرات نامحلول در بخش هوایی و ریشه کاسته شد که این کاهش نسبت به شاهد (P<۰,۰۵) معنی‌دار است (نمودارهای ۸ و ۹).



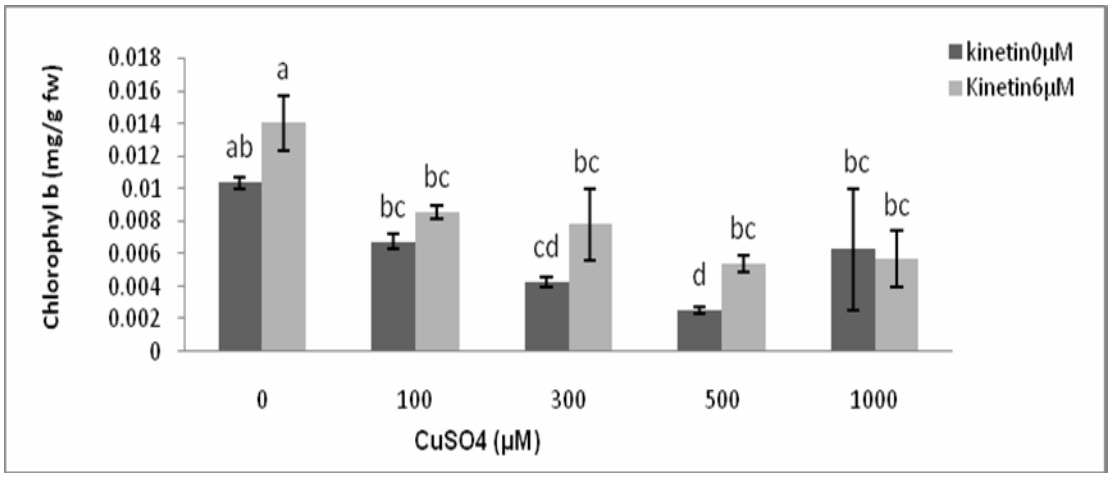
نمودار ۱: میانگین تغییرات طول بخش هوایی در پاسخ به سولفات مس در دو سری فاقد کینتین و دارای کینتین (X ±S.E)



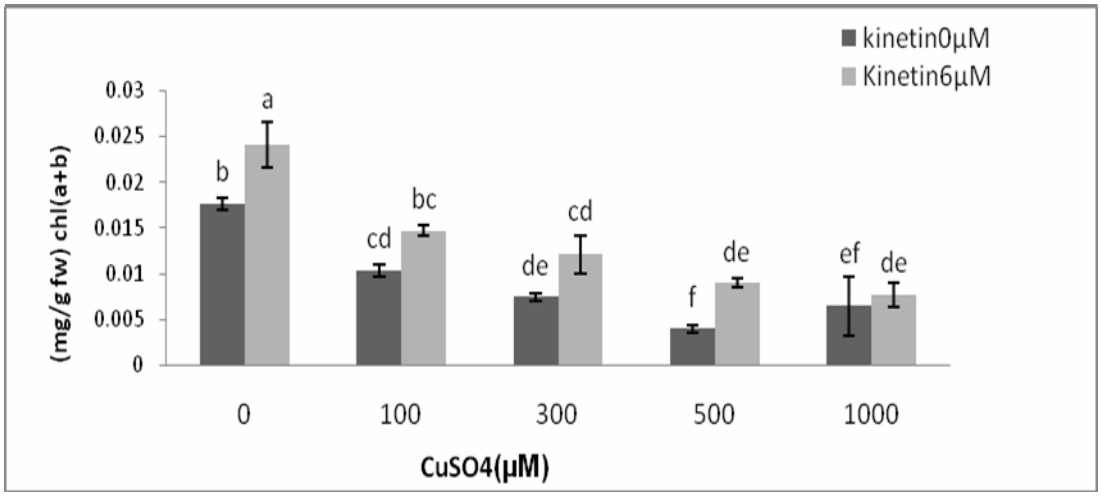
نمودار ۲: میانگین تغییرات ریشه در پاسخ به سولفات مس در دو سری فاقد کینتین و دارای کینتین (X ±S.E)



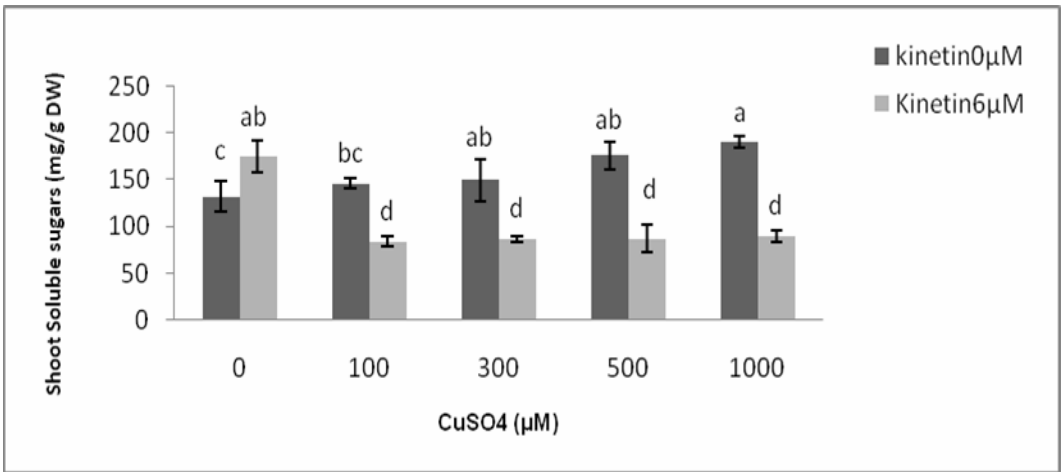
نمودار ۳: میانگین تغییرات کلروفیل a در پاسخ به سولفات مس در دو سری فاقد کینتین و دارای کینتین (X ±S.E)



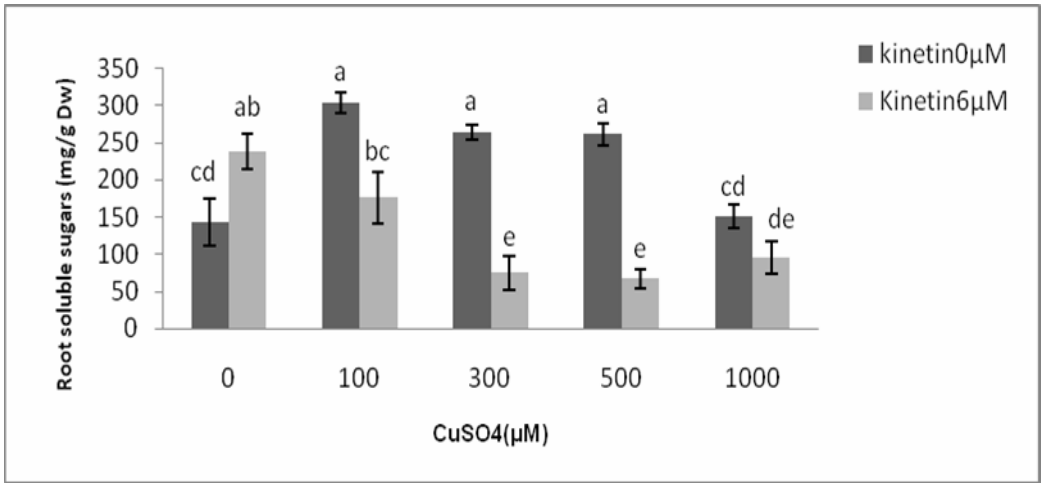
نمودار ۴: میانگین تغییرات کلروفیل b در پاسخ به سولفات مس در دو سری فاقد کینتین و دارای کینتین (X ±S.E)



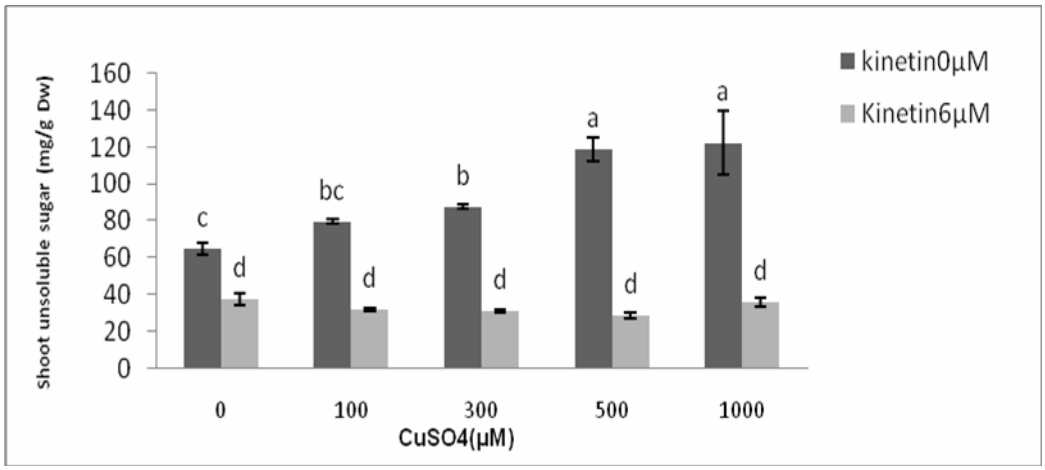
نمودار ۵: میانگین تغییرات کلروفیل (a+b) در پاسخ به سولفات مس در دو سری فاقد کینتین و دارای کینتین (X ±S.E)



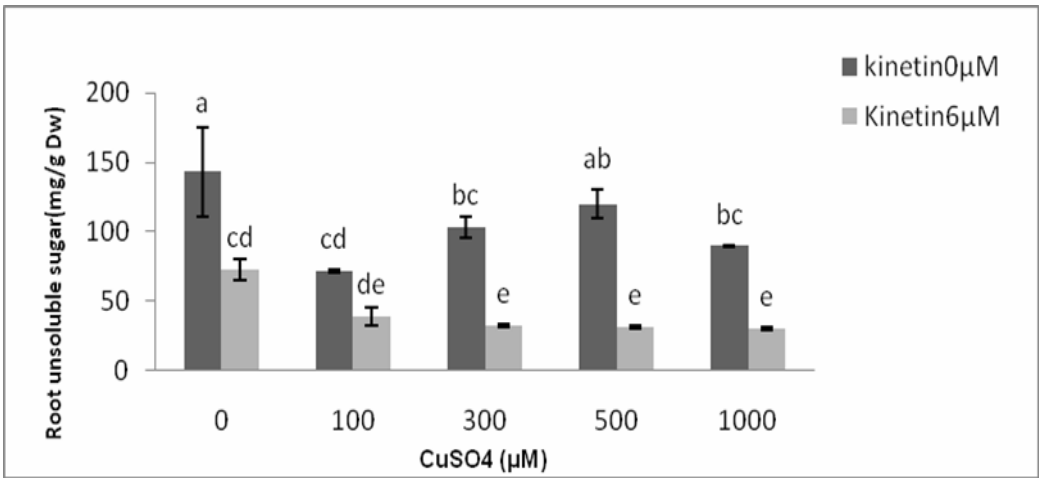
نمودار ۶: میانگین تغییرات قند محلول بخش هوایی در پاسخ به سولفات مس در دو سری فاقد کینتین و دارای کینتین (X ±S.E)



نمودار ۷: میانگین تغییرات قند محلول ریشه در پاسخ به سولفات مس در دو سری فاقد کینتین و دارای کینتین (X ±S.E)



نمودار ۸: میانگین تغییرات قند نامحلول بخش هوایی در پاسخ به سولفات مس در دو سری فاقد کینتین و دارای کینتین (X ±S.E)



نمودار ۹: میانگین تغییرات قند نامحلول ریشه در پاسخ به سولفات مس در دو سری فاقد کینتین و دارای کینتین (X ±S.E)

بحث

به دلیل تجمع زیاد فلز سنگین در ریشه، مسمومیت با فلز سنگین، در درجه اول، بازدارنده رشد ریشه است (۱۶). جلوگیری از رشد در حضور فلزات سنگین ممکن است ناشی از به هم خوردن برخی تعادلات، مانند وضعیت آبی سلول (۱۷) میتوز (۱۸) چرخه سلولی(۱۹) و سخت شدن دیواره سلولی (۲۰) باشد. اختلال در رشد گیاه می‌تواند به دلایل متعددی از جمله کاهش آب و کشسانی دیواره یاخته (۲۱)، اختلال در تعادل آبی گیاه به دلیل کاهش اندازه و تعداد آوند چوبی (۱۷) باشد. کاهش انشعابات فرعی و تغییر رنگ و قطر ریشه، از جمله تغییرات دیگر بر افزایش غلظت فلز سنگین در گیاه است (۲۲). کاهش سطوح جذب کننده و تغییر در ساختار غشای سلولی، قدرت جذب و در نتیجه، محتوای آب گیاه را کاهش می‌دهد و این امر بر فرایندهای فیزیولوژیکی مانند تعرق، فتوسنتز و تنفس، اثر کرده، در نهایت، موجب کاهش رشد گیاه خواهد شد (۱۶). قسمت اعظم فلز سنگین جذب شده در دیواره سلول‌های ریشه، رسوب کرده، موجب ایجاد شکاف‌هایی در دیواره می‌شود و در نتیجه، از رشد طولی ریشه ممانعت می‌کند (۲۳). تنش مس، باعث تولید رادیکال‌های اکسیژن می‌شود که منجر به واکنش‌های پراکسیداسیون و افزایش میزان اتیلن موجود در گیاه می‌گردد. افزایش اتیلن، رشد طولی را کاهش می‌دهد (۲۴). از آن‌جا که تقسیم سلولی ریشه، در حضور سیتوکینین و رشد سلولی، در حضور اکسین و جیبرلین صورت می‌گیرد (۴). مس احتمالاً اثر مهار کنندگی بر بیوسنتز و انتقال هورمون‌های مذکور یا اثری مستقیم بر متابولیسم آن‌ها دارد. کاهش رشد تحت شرایط تنش، نتیجه جلوگیری از تقسیم سلولی، رشد سلول و یا هر دوی آن‌هاست که این اثرهای بازدارندگی می‌تواند بر اثر تغییرات در توازن هورمون‌های گیاهی در اثر تنش باشد (۱۱). کاهش سطوح درون‌زای سیتوکینین‌های گیاهان در معرض تنش، عامل محدود کننده رشد است و اشاره بر این دارد که کاربرد خارجی کینتین می‌تواند منجر به افزایش رشد شود (۲۵).

کاهش محتوی کلروفیلی، به عنوان یکی از اثرات عمومی فلزات سنگین در گیاهان، شناخته شده است. این امر به دلیل اثر مستقیم فلزات بر فرایند بیوسنتز کلروفیل، القای تنش رادیکال‌های آزاد اکسیژن و ایجاد تنش اکسیداتیو و درنتیجه تخریب ساختارهای فتوسنتزی از جمله کلروفیل صورت می‌گیرد (۲۶). احتمالاً مکانیزم‌هایی مستقیماً با مهار سنتز کلروفیل، به واسطه مهار سنتز دلتا آمینولوولینیک اسید و مهار تشکیل پروتوکلروفیلید ردوکتاز می‌باشد (۲۷). جایگزینی یون فلزات سنگین به جای یون منیزیم مرکزی کلروفیل، صدمه دیگری است که باعث جلوگیری از به دام انداختن نور برای فتوسنتز و در نتیجه، از بین رفتن کلروفیل و کاهش فتوسنتز می‌شود (۵). کاهش کلروفیل بر اثر تنش، ممکن است به علت افزایش تولید رادیکال‌های اکسیژن باشد که باعث پراکسیداسیون این رنگیزه‌ها و تجزیه آنان می‌شود (۲۹،۲۸). یکی از مکانیزم‌های عامل بروز سمیت در بافت‌های گیاهی در حضور فلزات سنگین از جمله مس، تحریک تولید رادیکال‌های آزاد و ایجاد تنش اکسیداتیو است (۳۰). آسیب کلروپلاست، ناشی از اتصال فلز با تیلاکوئیدها، ترکیب با پروتئین‌های غشاء، تخریب سیستم آنزیمی و متوقف شدن سنتز کلروفیل است. علاوه بر این فراساختار کلروپلاست نیز دگرگون می‌شود، گراناها تجزیه می‌شوند (۳۱). در این رابطه، اثر کینتین شامل کاهش تخریب کلروفیل احتمالاً به خاطر اثرش بر سطوح کلروفیلاز (۳۲) و افزایش فعالیت فتوسنتزی به خاطر برانگیختن اتصال مس به متالوتیونین‌ها به صورت اتصال فلز به کمپلکس که منجر به بسط هومئوستازی مس می‌شود (۳۳). نوروزک‌های تیمار شده با کینتین، محتوای کلروفیلی بیشتری نسبت به گیاهان فاقد این تیمار داشتند. کینتین ممکن است به خاطر اثرش بر پروتوکلروفیلید سنتاز (۳۴) یا مهار تخریب کلروفیل به خاطر اثرش بر سطوح کلروفیلاز باعث تحریک ساخت کلروفیل گردد (۳۲). علت بالا بودن محتوی کلروفیل در تیمار سری دوم، وجود کینتین است که مانع پیری زودرس بر اثر اختلال هورمونی ناشی از مس می‌شود. افت غلظت قند محلول در سری تیمارهای نوروزک که علاوه بر تنش مس، کینتین دریافت کرده‌اند ممکن است ناشی از تقویت رشد تحت شرایط تنش توسط کینتین به دلیل افزایش آب به منظور افزایش نفوذپذیری غشاء و یا به علت

افزایش غلظت داخلی املاح اسمتیکی باشد (۳۵). پس احتمال وجود آب فراوان‌تر نسبت به نوروزک‌هایی که کینتین دریافت نکرده‌اند، باعث افت غلظت گلوکز در این سری تیمارهای گیاهی شده است و از آنجایی‌که سیتوکینین‌ها گروهی از فیتوهورمون‌ها هستند که روند نمو اندامی را شدت می‌بخشند و منجر به ترمیم و گسترش اندام هوایی می‌شوند (۳۶). بنابراین احتمالاً گلوکز بیشتری را برای فعال‌تر نمودن روند ترمیم و مقابله با تنش، مصرف می‌کنند و در نتیجه، غلظت گلوکز در سری تنش نوروزک با مس به همراه کینتین، نسبت به سری تنش نوروزک با مس در غیاب کینتین و شاهد، کاهش بیشتری را نشان می‌دهد. در نوروزک بدون تنش مس و حضور کینتین، غلظت قند محلول افزایش یافت که به علت اثر کینتین بر افزایش محتوای کلروفیل به طریقه کاهش تخریب کلروفیل با اثر بر سطح کلروفیلاز است (۳۲). به نظر می‌رسد کینتین نقش حفاظتی برای نوروزک داشته که مانع می‌شود در تنش مس، شرایط سخت برای آنان ایجاد شود. بنابراین، نیاز به تجمع قند در این سری تیماری وجود ندارد.

با توجه به این که غلظت هیدرات کربن نامحلول در بخش هوایی و ریشه سری تیماری تنش مس به همراه کینتین، کاهش یافته است، علت را می‌توان مربوط به آمیلاز دانست، زیرا کینتین، فعالیت آمیلاز را در گیاهان تحت تنش افزایش می‌دهد. این امر باعث بی‌اثر کردن شرایط تنش مس شده و با تقویت و تشدید متابولیسم نشاسته، غلظت آن کاهش یافته است. علت افزایش غلظت نشاسته در سری نوروزک‌های تحت تنش مس در غیاب کینتین در بخش هوایی، کاهش تحرک نشاسته است که بر اثر کاهش فعالیت آمیلاز، تشکیل گلوکز از نشاسته، مختل شده است (۱۳). با توجه به این که در ریشه نوروزک تحت تنش مس و در غیاب کینتین، مقدار قند محلول ریشه افزایش یافته است، این عامل نقش مؤثری در تنظیم اسمزی و کاهش پتانسیل آب دارد و آب بیشتری برای حفظ تورگر تحت تنش مس در داخل سلول فراهم می‌شود. بنابراین، کاهش نشاسته در ریشه احتمالاً با تجمع قندهای محلول در آن ارتباط دارد. تنفس و رشد نوروزک باعث استفاده از نشاسته در طی تنش مس و در نتیجه، کاهش مقدار ذخیره کربوهیدرات نامحلول در طی تنش می‌شود (۱۱).

منابع

۱. مدرس، م.، ابریشم چی، پ.، فرهوش، ر.، اجتهادی، ح. ۱۳۸۶. بررسی تغیر آنتی اکسیدانی ریشه و برگ نوروزک در مراحل مختلف رشد و نمو. فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران. جلد۲۳، شماره ۳.

2. Bowler, C., Van Montagu, M., Inze, D. 1992. Superoxide dismutase and stress tolerance. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 43: 83-116.
3. Palma, J. M., Yanez, J., Gomez, M., Del Rio, L. A. 1990. Copper-binding proteins and copper tolerance in *Pisum sativum* L. Characterization of low-molecular-weight metalloproteins from plants with different sensitivity to copper. Planta 181: 487-495.
4. Raven, J. A., Evans, M. C. V., Korb, R. E. 1999. The role of trace metals in photosynthetic electron transport in O_2 –evolving organisms. Photosynth. Res. 60:111-149.
5. Prasad, M. N. V., Strzatka, K. 2002. Physiology and biochemistry of metal toxicity and tolerance in plants. Kluwer Academic Pub, Dordrecht, 432p.
6. Kabata-Pendias, A., Pendias, H. 2001. Trace Elements in Soils and Plants, CRC Press, Boca Raton, FL, 1984, pp. 75–86.
7. Niyazova, G. A., Letunova, S. V. 1981. Microelements accumulation by soil microflora at the conditions of the Sumsarsky lead-zinc biogeochemical Province in Kirghizya. Ekologiya 5: 89.
8. Alaoui-Sosse, B., Genet, P., Vinit-Dunand, F., Toussaint, M. L., Epron, D., Badot, P. M. 2004. Effect of copper on growth in cucumber plants *(Cucumis sativus*) and its

9. relationships with carbohydrate accumulation and changes in ion contents, Plant Sci. 166 1213-1218.
10. Tood, G. W., Basler, E. 1965. Fate of various protoplasmic constituents in drought wheat plants. Phyton 22:76-85.
11. Lombardi, L., Sebastiani, L. 2005. Copper toxicity in *Prunus cerasifera:* Growth and antioxidant enzymes responses of *in vitro* grown plants. Plant Sci. 168: 797- 802.
12. Sato, F., Yoshioka, H., Fujiwara, T., Higashio, H., Uragami, A., Tokuda, S. 2004. Physiological responses of cabbage plug seedlings to water stress during low-temperature storage in darkness. Science Horticulturae 101:349-357.
13. Hare, P. D., Cress W. A. van Staden, J. 1997. The involvement of cytokinin in plant responses to environmental stress. Plant Growth Regulation. 23: 79-103.
14. Kaur, S., Gupta, A. K., Kaur, N. 1998. Gibbrellic A3 reverses the effect of salt stress in chick pea (*Cicer arietinun* L.) seedling by changing amylase activity and mobilization of water stress on germination and seedling growth in chick pea. Plant Growth Regulation 26(2):85-90.
15. Arnon, D. I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts, polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiol., 24, 1-15.
16. Kochert, G., 1987. Carbohydrate determination by the phenolsulfuric acid method. in Helebus Cambrige Univ. Press, Cambridge.
17. Yang Yell, Y., Young Jung, J., Yong Song, W., Soo Suh, H., Sook Lee, Y., 2000. Identification of Rice varieties with high tolerance or sensitivity to lead and characterization of the Mechanism of to tolerance. Plant physiol 124: 1019-1026.
18. Burzynski, M., Grabowski, A. 1948. Influence of lead on NO_3 And on initial steps of its synthesis in greening cucumber seedling. Acta Soc. Bot. POL. 54: 93-105.
19. Roderer, G. 1979. Hemmung der Cytocinase und Bildung von Riesenzellen bei Poterioochromonsis durch organische Bleiverbildungen und andree Agenzien Protoplasma, 99: 39-51.
20. Wierzbicka, M. 1999. The effect of lead on the cell cycle in the root meristem of *Allium cepa* L. Protoplasma 207: 186-194.
21. Quireshi, J. A., Hardwick K., Collin, H. A. 1996. Intracellular localization of lead in a lead tolerant and sensitive clone *Anthoxanthum odoratum*. J. Plant: Physiol., 122:357-367.
22. Asada, K., 1984. Chloroplast: formation of active oxygen and its scavenging. Method in Enzymology 105: 422-429.
23. De Vos, C. H. R., Schat, H., Vooigs R., Ernsr, W.A.O. 1989. Copper induced damage to the permeability barrier in roots of *Silene cucubalus*. J. Plant Physiol., 135:164-169.
24. Foy, C. D., Chaney, R. L., White, M. C., 1978. The physiology of metal toxicity. Annu. Rev. Physiol. 29: 511-527.
25. Krizek, D. T., Brita, S. J., Miewcki, R. M. 1998. Inhibitory effects of ambient level of solar UV-A and UV-B on growth of cv. New Red Fire lettuce. Physiol. Plant. 103: 1-7.
26. Hare, P. D., Cress, W. A. 1997. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. Plant Growth Regul. 21: 79-102.
27. Rout, G. R., Das, P. 2003. Effect of metal toxicity on plant growth and metabolism; Zinc. Agronomy and Soil Science 23: 3–11.

28. Vassilev, A., Yordanov, I. 1997. Reductive analysis of factors limiting growth of cadmium–treated plants – A review. Plant Physiology 23: 14-133.
29. Van Assche, F., Clijsters, H. 1986. Inhibition of photosynthesis in *Phaseolus vulgaris* by treatment with toxic concentration of Zinc: effect on ribulose-1, 5-bisphophate carboxylase oxygenase. J. Plant physiology 125: 355-360.
30. Sanitá di Toppi, L., Gabbrielli, R. 1999. Response to cadmium in higher plants. Environ. Exp. Bot. 41:105-130.
31. Zimdahl, R. L., 1975. Entry and movement in vegetation of lead derived from air and soil sources, paper presented at 68th Annu. Meeting of air pollution control association. Boston M.A., June, 5, 2.
32. Zeainvent, A., Trstinska S., 2001. Abiotic and biotic stresses. Institute of Plant physiology, Final report.
33. Drazkiewice, M. 1994. Chlorophyll -occurrence, function and mechanism of action. Effects of external and internal factors. Photosynthetica, 50:321-331.
34. Grill, E., Winnacker, E. L., Zenk, M. H. 1985. Phytochelatins the principal heavy metal complexing peptides of higher plants. Science 230:674-676.
35. Gadallah, M. A. A. 1995. Effect of Cadmium and kinetin on chlorophyll content, saccharides and dry matter accumulation in sunflower plants. Biol Plant 37: 233-240.
36. Stavir, K., Gupta, A. K., Kaure, N., 1998. Gibbrellic Acid and Kinetin Partially reverse the effect of water stress on germination and seedling growth in chick pea. Plant Growth. 25:29-33.
37. Mizrahi, Y., Blumonfeld, A., Bittner S., Richmond, A.E. 1971. Abscisic acid and cytokinin content of leaves in relation to salinity and relative humidity. Plant Physiology 48:752-755.