بررسی اثر آلودگی سرب و کادمیوم بر جوانه‌زنی و فعالیت آنزیمی بذر ذرت رقم سینگل کراس ۷۰۴

Effects of lead and cadmium contamination on seed germination and enzyme activities in seed corn (*Zea mays* L.) KSC 704

حسین برکند[۱*]، پورنگ کسرایی[۲] و حمیدرضا توحیدی مقدم[۲]

۱- گروه اگرواکولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین- پیشوا، ورامین، تهران – ایران.
۲- گروه زراعت، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین- پیشوا، ورامین، تهران – ایران.

***نویسنده مسوول مکاتبات**: hbarkand@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۳/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۶/۲۸

چکیده

به‌منظور بررسی اثر سطوح مختلف سرب و کادمیوم بر جوانه‌زنی و فعالیت آنزیمی بذرگیاه ذرت، تحقیقی در سال ۱۳۹۴ در آزمایشگاه بذر گروه زراعت دانشگاه آزاد ورامین بر روی بذر ذرت رقم سینگل کراس ۷۰۴ انجام شد. این تحقیق به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با پنج سطح سرب شامل (صفر، ۱۰، ۴۰،۷۰ و ۱۰۰ میکرومول در لیتر کلریدسرب) و پنج سطح کادمیوم شامل (صفر، ۱۰، ۴۰،۷۰ و ۱۰۰ میکرومول در لیتر کلریدکادمیوم) در سه تکرار اجرا شد. نتایج نشان داد که اثر کاربرد سرب و کادمیوم بر تمامی صفات مورد بررسی معنی‌دار بود. افزایش غلظت این فلزات سنگین سبب کاهش درصد جوانه‌زنی، سرعت جوانه‌زنی، وزن خشک ساقه‌چه، وزن خشک ریشه‌چه، فعالیت آنزیم فسفاتاز و آنزیم α آمیلاز و افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز شد. اثرات متقابل نشان داد که کم‌ترین و بیش‌ترین سرعت جوانه‌زنی به‌ترتیب ۵/۸۶ و ۸/۹۲ (دانه در روز)، وزن خشک ریشه‌چه ۰/۳۴ و ۰/۶۶ (گرم)، فعالیت آنزیم فسفاتاز ۰/۹ و ۴/۳ (واحد در گرم وزن تر گیاهچه) و آنزیم آلفا آمیلاز ۳/۳ و ۵/۹ (واحد در گرم وزن تر گیاهچه) در شرایطی حاصل شد که ۱۰۰ میکرومول در لیتر کلرید سرب و کادمیوم به‌صورت توأم استفاده گردید.

واژگان کلیدی: آنزیم آلفا آمیلاز، آنزیم کاتالاز، ذرت، سرب، کادمیوم.

مقدمه

سرب (Pb) یکی از فلزات سنگین و سمی در محیط زیست طبیعی است که از انواع منابع انسانی از جمله معدن، کشاورزی و فعالیت‌های صنعتی منتشر می‌شود. آلودگی سرب در خاک تأثیر منفی در رشد و توسعه پوشش گیاهی دارد و از طریق مسمومیت سبب اختلالات فیزیولوژیکی در گیاه می‌شود و از این‌رو گیاهان رشدیافته در خاک‌های آلوده عملکردشان کاهش می‌یابد (Lamb *et al.*, 2010). کادمیوم (Cd) یکی از فلزات سنگین غیرضروری است که توسط فعالیت‌های انسانی و غیره در محیط زیست منتشر می‌شود. انباشته‌شدن فلزات سنگین از جمله کادمیوم در محیط ریشه سبب کاهش جذب آب و مواد غذایی، کاهش انتقال آب و برهم خوردن تعادل آب، مهار فعالیت آنزیم‌ها، کاهش سوخت و ساز سلولی، کاهش فتوسنتز، تنفس و تعرق، فقدان نیتروژن و فسفر و در نتیجه مهار رشد، تسریع پیری و حتی مرگ گیاه می‌گردد (Cheng and Huang, 2006). از بارزترین اثرات سمی این فلزات می‌توان به افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن اشاره نمود که در آسیب‌رسانی به غشاهای پلاسمایی، اسیدهای نوکلوئیک و رنگدانه‌های کلروپلاستی نقش به‌سزایی دارند (Juknys *et al.*, 2012; Agrawal *et al.*, 2013). تجمع گونه‌های فعال اکسیژن ممکن است در نتیجه عدم تعادل بین تولید آن‌ها و فعالیت سامانه آنتی‌اکسیدانت ایجاد شود. سامانه آنتی‌اکسیدانت سلول شامل ترکیبات آنزیمی مانند کاتالاز (CAT) و آسکوربات پراکسیداز (APX) و همچنین ترکیبات غیرآنزیمی از جمله گلوتاتیون و کارتنوئیدها می‌باشد (Zhao *et al.*, 2011). کاهش قدرت جوانه‌زنی ممکن است در ارتباط با اثرات منفی کادمیوم بر جذب و حرکت آب باشد (Goncalvez *et al.*, 2007). تحقیقات سایر محققان حاکی از آنست که با افزایش غلظت فلزات سنگین در وضعیت رشد گیاهان، مقدار ABA در بذر گیاهان افزایش یافته و همین امر می‌تواند دلیلی برای کاهش جوانه‌زنی در حضور فلزات باشد (Munzuroglu *et al.*, 2008). نتایج سایر محققان حاکی از آن است که افزایش غلظت سرب و کادمیوم باعث کاهش جوانه‌زنی و رشد ساقه‌چه به‌علت تخریب مواد غذایی ذخیره شده در دانه‌های گیاه گل ابریشم شود (Farooqui *et al.*, 2009). با توجه به تأثیرات منفی دو عنصر سرب و کادمیوم که از آلوده‌کنندگان رایج در محیط‌های کشاورزی به‌شمار می‌روند و همچنین از آن‌جائی که جوانه‌زنی به‌عنوان مهم‌ترین مرحله رشد گیاهان می‌باشد این تحقیق به‌منظور تعیین تأثیر احتمالی غلظت‌های مختلف سرب و کادمیوم بر بذر و گیاهچهٔ ذرت و آستانه تحمل بذر به این فلزات سنگین صورت‌پذیرفت. در این تحقیق به اثر این فلزات سنگین بر رشد و نمو بذر ذرت در محیط آزمایشگاهی و سیستم آنزیمی و آنتی‌اکسیدانتی بذر پس از تیمار با غلظت‌های مختلف سرب و کادمیوم پاسخ داده شد.

مواد و روش‌ها

این آزمایش به‌منظور بررسی اثر آلودگی سرب و کادمیوم بر جوانه‌زنی بذر ذرت رقم سینگل کراس ۷۰۴ (K.S.C 704) تهیه شده از مؤسسه تحقیقات کشاورزی کرج، در آزمایشگاه دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین - پیشوا انجام شد. این تحقیق به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با پنج سطح سرب شامل (صفر، ۱۰، ۴۰،۷۰ و ۱۰۰ میکرومول در لیتر کلرید سرب) و پنج سطح کادمیوم شامل (صفر، ۱۰، ۴۰،۷۰ و ۱۰۰ میکرومول در لیتر کلرید کادمیوم) در سه تکرار اجرا گردید. پس از انتخاب بذرهای هم‌اندازه، بذرها با هیپوکلریت سدیم ۱٪ به‌مدت ۳۰ ثانیه ضدعفونی شدند و سه تا پنج مرتبه با آب مقطر شست‌وشو و سپس آلودگی بذور با سرب و کادمیوم با مقادیر تعیین شده، انجام شد. در ابتدا با استفاده از پتری دیش‌هایی با قطر نه سانتی‌متری، تعداد ۲۵ عدد بذر ذرت را در شرایط کشت BP (درون کاغذی)، بر روی کاغذ صافی کشت و برای جلوگیری از تبخیر از سطح ظروف، درب ظرف‌ها به‌طور کامل با نوار پارافیلم پوشیده شد. سپس ظروف در داخل ژرمیناتور با دمای ۱ ± ۲۵ درجه سانتی‌گراد منتقل و به‌طور روزانه بازبینی و تعداد بذور جوانه‌زده ثبت گردید. ملاک جوانه‌زنی، خروج یک- دو میلی‌متر ریشه‌چه بود. در آخرین روز جوانه‌زنی، از هر پتری دیش ۱۰ گیاهچه به‌طور تصادفی انتخاب شدند، در پاکت‌های کاغذی قرار داده‌شد و به‌مدت ۴۸ ساعت در آون ۷۰ درجه سانتی‌گراد خشک شدند و وزن ریشه‌چه و ساقه‌چه

اندازه‌گیری شد. محاسبه درصد جوانه‌زنی، سرعت جوانه‌زنی، درصد جوانه‌زنی نهایی و شاخص قدرت گیاهچه از روابط ذیل به‌دست آمد.

- درصد جوانه‌زنی (Maguire,1962)

$$\%G = {}^{n}\!/_{N} * 100$$

G : درصد جوانه‌زنی، n : تعداد نهائی بذرهای جوانه‌زده، N: تعداد بذرهای کشت شده

- سرعت جوانه‌زنی (Maguire,1962)

$$Vg = \Sigma \frac{Ni}{Di}$$

Vg: سرعت جوانه‌زنی بر حسب تعداد بذر در روز، Ni: تعداد بذر جوانه‌زده در هر روز، Di: شماره روز

- درصد جوانه‌زنی نهایی (Ellis *et al.*, 1981)

FGP= (n/N)*100

n= تعدادکل بذرهای جوانه‌زده، N= تعدادکل بذرهای مورد ارزیابی

- شاخص قدرت گیاهچه

پس از تعیین گیاهچه‌های عادی و غیرعادی تعداد ۱۰ گیاهچه از هر توده به‌طور تصادفی انتخاب و سپس طول گیاهچه و برگ‌های اولیه و ریشه‌های اولیه و وزن تر و وزن خشک تعیین گردید. با استفاده از داده‌های اخیر دو شاخص قدرت گیاهچه از روی رابطه زیر تعیین گردید (Abdul-Baki, 1973).

قوه نامیه× (میانگین طول ریشه اولیه + میانگین طول ساقه اولیه)=$\mathbf{SVI_{(1)}}$

قوه نامیه × وزن خشک گیاهچه =$\mathbf{SVI_{(2)}}$

- طول ریشه‌چه: طول ریشه‌چه در روز آخر توسط کولیس بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری شد.

- طول ساقه‌چه: طول ساقه‌چه در روز آخر توسط کولیس بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری شد.

- اندازه‌گیری میزان فسفاتاز اسیدی: محلول بافر استخراج پروتئین از جنین شامل آب مقطر استریل و ۱۰۰ میلی‌مولار تریس با اسیدیته برابر هفت بود. استخراج پروتئین گیاهچه به‌منظور اندازه‌گیری آنزیم فسفاتاز اسیدی به‌روش (Lee, 2000) انجام‌گرفت. برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم اسید فسفاتاز از روش (Pan and Chen, 1998) استفاده شد. واکنش با افزودن پنج میلی‌مولار پارانیتروفنل فسفات و ۱۰۰ میلی‌مولار سدیم استات بافر با اسیدیته ۵/۴ به پنج میکرولیتر نمونه استخراجی در اندازه کل ۲۰۰ میکرولیتر شروع شد و این محلول برای هر تکرار آزمایشی به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس به آن ۵۰ میکرولیتر هیدروکسیدپتاسیم یک مولار اضافه گردید. میزان جذب pNP آزاد شده در طول موج ۴۰۵ نانومتر اندازه‌گیری شد.

- اندازه‌گیری آلفاآمیلاز: دو گرم گیاهچه جهت اندازه‌گیری فعالیت آلفاآمیلاز استفاده شد. برای تهیه عصاره ابتدا پنج میلی‌لیتر محلول ۶۰ میلی‌مولار بافر فسفات (pH= 6.8) به گیاهچه‌ها اضافه شد و سپس گیاهچه به‌مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند (با دور ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه). جهت اندازه‌گیری آنزیم آلفاآمیلاز ابتدا ۰/۵ میلی‌لیتر محلول نشاسته به داخل لوله آزمایش منتقل شد سپس ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره تهیه شده در بالا به آن اضافه شد و بعد از ۳۰ دقیقه انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌وسیله یک میلی‌لیتر اسید هیدروکلریدریک ۰/۱ نرمال واکنش را متوقف کرد و در ادامه یک میلی‌لیتر از معرف ید به آن اضافه شد. پس از آن حجم محتوی لوله را با آب مقطر به حدود ۱۰ میلی‌لیتر رسانید و میزان جذب رنگ را با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۲۰ نانومتر خواند و با نمونه شاهد مقایسه نمود (Xiao *et al*., 2006).

- اندازه‌گیری میزان کاتالاز: پس از آماده‌سازی عصاره‌های پروتئینی به‌منظور سنجش فعالیت سینتیکی آنزیم کاتالاز، معرف زیر مورد استفاده قرارگرفت. بافر تریس با pH=7 ۵۰ میلی‌مولار ۲/۵ لیتر و آب اکسیژنه سه درصد

(محلول حجمی/حجمی) ۰/۳ میلی‌لیتر، موارد فوق را در حمام یخ با یکدیگر مخلوط نمود و بلافاصله ۶۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی به آن افزوده شد. منحنی تغییرات جذب در طول موج ۲۴۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر خوانده شد. فعالیت آنزیم بر حسب تغییرات واحد جذب در دقیقه به ازای هر گرم (1m H_2O_2 min) از نمونه محاسبه گردید (Noctor and Foyer, 1998).

در نهایت داده‌های آزمایشی با استفاده از نرم افزار SAS تجزیه واریانس گردید (SAS Institute, 2002). به‌منظور مقایسه میانگین‌ها نیز از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح پنج درصد استفاده گردید.

نتایج و بحث

اثر سرب و اثر کادمیوم در سطح یک درصد بر تمامی ویژگی‌های مورد بررسی معنی‌دار بود. اثرات متقابل سرب و کادمیوم بر صفات سرعت جوانه‌زنی، وزن خشک ریشه‌چه، میزان فعالیت آنزیم فسفاتاز، میزان فعالیت آنزیم **α** آمیلاز و میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در سطح یک درصد معنی‌دار بود اما بر سایر صفات مورد بررسی معنی‌دار نبود (جدول یک).

درصد جوانه‌زنی

نتایج جدول تجزیه واریانس نشان داد اثرات ساده تیمارهای سرب و کادمیوم تاثیر معنی‌داری بر درصد جوانه‌زنی در سطح یک درصد داشت و اما اختلافات به‌دست آمده از نظر آماری در اثرات متقابل تیمارهای کاربرد سرب و کادمیوم بر درصد جوانه‌زنی معنی‌دار نشد (جدول یک). با توجه به جدول مقایسه میانگین اثرات ساده (جدول دو) مشاهده گردید که بیش‌ترین درصد جوانه‌زنی با ۷۸ درصد و کم‌ترین سرعت جوانه‌زنی با ۶۵ درصد به‌ترتیب در تیمار غلظت‌های صفر و ۱۰۰ میکرومول بر لیتر کادمیوم مشاهده شد. در تیمار کاربرد سرب، بالاترین درصد جوانه‌زنی با ۷۸ درصد و پایین‌ترین سرعت جوانه‌زنی با ۶۵ درصد به‌ترتیب از تیمار غلظت‌های صفر و ۱۰۰ میکرومول بر لیتر حاصل شد که کاهشی معادل ۱۶ درصد داشت. بازدارندگی جوانه‌زنی ازجمله اثرات شناخته شده فلزات سنگین است. کاهش قدرت جوانه‌زنی ممکن است در ارتباط با اثرات منفی کادمیوم بر جذب و حرکت آب باشد (Goncalvez *et al*., 2007). تحقیقات سایر محققان حاکی از آنست که با افزایش غلظت فلزات سنگین در وضعیت رشد گیاهان، مقدار ABA در بذر گیاهان افزایش یافته و همین امر می‌تواند دلیلی برای کاهش جوانه‌زنی در حضور فلزات باشد (Munzuroglu *et al*., 2008) جوانه‌زنی سورگوم تا غلظت‌های پنج میلی‌مولار کادمیوم (۵۰۰ میکرومول) کم‌تر تحت تاثیر قرار می‌گیرد و غلظت‌های بالای پنج میلی‌مولار (۳۰۰۰ میکرومول) باعث کاهش جدی در جوانه‌زنی و فعالیت آنزیمی می‌شوند (Kuriakose and Prasad, 2008). نتایج نشان داد که افزایش تا غلظت ۹۰ میکرومول بر لیتر کادمیوم میزان درصد جوانه‌زنی گل ابریشم (*Albizia lebbeck* L. Benth) را ۷۷ درصد کاهش داد و این میزان برای سرب ۴۳ بود. تفاوت در تاثیر فلزات سنگین بر خصوصیات جوانه‌زنی را می‌توان به مقدار ماده جذب شده مواد سمی از محیط ارتباط داد (Farooqi *et al*., 2009).

سرعت جوانه زنی

نتایج تجزیه واریانس نشان داد اثرات ساده تیمارهای مختلف سرب و کادمیوم و اثرات متقابل تیمارها بر سرعت جوانه‌زنی تاثیر معنی‌داری داشت و اختلافات به‌دست آمده از نظر آماری در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول یک). بالاترین سرعت جوانه‌زنی بذر از تیمار عدم استفاده از سرب و کادمیوم حاصل شد (جدول دو). با افزایش غلظت سرب و کادمیوم سرعت جوانه‌زنی کاهش یافت، کم‌ترین سرعت جوانه‌زنی از سطح ۱۰۰ میکرومول بر لیتر سرب و سطح ۱۰۰ میکرومول بر لیتر کادمیوم به‌دست آمد، در این افزایش تا غلظت ۱۰۰ میکرومول بر لیتر کادمیوم و سرب از سرعت جوانه‌زنی ذرت به‌ترتیب ۲۰ و ۱۸ درصد کاسته شد. بررسی اثرات متقابل غلظت سرب و کادمیوم بر سرعت جوانه‌زنی (جدول سه) نشان داد که کم‌ترین سرعت جوانه‌زنی بذر مربوط به سطح ۱۰۰ میکرومول بر لیتر سرب در تمامی سطوح کاربرد کادمیوم بود. کاهش درصد جوانه‌زنی تحت تأثیر فلزات سنگین کاهش سرعت جوانه‌زنی را در پی دارد. نتایج نشان داد که افزایش تا ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کادمیوم و سرب باعث کاهش سرعت جوانه‌زنی ذرت گردید (پرمون و همکاران، ۱۳۹۳).

جدول ۱- جدول تجزیه واریانس ویژگی‌های مورد بررسی ذرت تحت شرایط تنش سرب و کادمیوم

Table 1. Analysis of variance on corn attributes affected by lead and cadmium stress condition

S.O.V	منابع تغییرات	میانگین مربعات M.s				
		درجه آزادی df	درصد جوانه زنی Germination percentage	سرعت جوانه زنی Germination rate	وزن خشک ساقه چه dry Plumule weight	وزن خشک ریشه‌چه Radicle dryweight
Lead	سرب	4	728**	10.83**	0.038**	0.07**
Cadmium	کادمیوم	4	551**	5.45**	0.034**	0.079**
Lead* Cadmium	سرب*کادمیوم	16	8.3ns	0.549**	0.00041ns	0.0038*
C.V (%)	ضریب تغییرات	50	9.3	0.218	0.0004	0.0018
			8.49	6.6	7.08	9.8

*، ** و ns به‌ترتیب معنی‌دار در سطح پنج، یک درصد و فاقد اختلاف معنی‌دار

*,** and ns significant at 0.05, 0.01 percentage and no significant

ادامه جدول یک

Continued Table 1

S.O.V	منبع تغییرات	میانگین مربعات M.s			
		درجه آزادی df	فعالیت فسفاتاز Phosphatase activities	فعالیت آمیلاز α-Amylases enzyme activity	فعالیت کاتالاز Catalase enzyme activity
Lead	سرب	4	18.4**	2.07**	12.52**
Cadmium	کادمیوم	4	3.82**	9.92**	1.97**
Lead* Cadmium	سرب*کادمیوم	16	0.158**	0.074**	0.014**
C.V (%)	ضریب تغییرات	50	0.018	0.036	0.014
			5.3	4.09	3.5

*، ** و ns به‌ترتیب معنی‌دار در سطح پنج، یک درصد و فاقد اختلاف معنی‌دار

*,** and ns significant at 0.05, 0.01 percentage and no significant

وزن خشک ساقه‌چه

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که وزن خشک ساقه‌چه تحت تاثیر اثرات ساده تیمارهای سطوح مختلف سرب و کادمیوم قرارگرفت و اختلافات به‌وجود آمده از نظر آماری در سطح یک درصد معنی‌دار بود؛ اما اثرات متقابل تیمارهای سرب و کادمیوم بر صفت وزن خشک ساقه‌چه تاثیرمعنی‌داری نداشت و تیمارها همه در یک سطح آماری جای‌گرفتند (جدول یک). بالاترین وزن خشک ساقه‌چه متعلق به سطح عدم استفاده از سرب و کادمیوم با متوسط ۰/۳۶ گرم بود که با تیمار مصرف ۱۰ میکرومول در لیتراختلاف معنی‌داری نداشت و هر دو تیمار در گروه آماری a جای گرفتند (جدول دو). با افزایش غلظت سرب وزن خشک ساقه‌چه کاهش‌یافت، کم‌ترین وزن خشک ساقه‌چه با متوسط ۰/۲۴ گرم از تیمار ۱۰۰ میکرومول بر لیتر سرب حاصل شد، نتایج اثرات ساده کادمیوم بر وزن خشک ساقه‌چه نشان داد بیش‌ترین وزن خشک ساقه‌چه از تیمار عدم مصرف کادمیوم با ۰/۳۷ گرم و کم‌ترین وزن خشک ساقه‌چه از سطح ۱۰۰ میکرومول بر لیتر کادمیوم با ۰/۲۵ گرم به‌دست آمد. درصد کاهش برای سطوح مختلف تیمارهای کادمیوم و سرب به‌ترتیب ۳۲ و ۳۳ درصد بود.

سمیت سرب، میزان پروتئین‌های بافت گیاهی را کاهش داد و ترکیبات لیپیدی غشای و تراوایی آن را به‌طور قابل ملاحظه تغییر داد. همچنین نتایج سایر محققان حاکی از آن است که افزایش غلظت سرب و کادمیوم باعث کاهش جوانه‌زنی و رشد ساقه‌چه به‌علت تخریب مواد غذایی ذخیره شده در دانه‌های گیاه گل ابریشم شد (Farooqi *et al*., 2009). کاهش زیست توده تحت تاثیر عناصر سنگین، نشان‌دهنده کاهش و اختلال در سنتز

پروتئین‌ها و همچنین کاهش فعالیت دستگاه فتوسنتزی بود (Manivasagaperumal *et al.,* 2011).

وزن خشک ریشه‌چه

اثرات ساده تیمارهای مصرف سرب و کادمیوم و اثرات متقابل آن‌ها بر وزن خشک ریشه‌چه معنی‌دار شد و اختلافات به‌وجود آمده در سطح یک و پنج درصد معنی‌دار بود (جدول یک). وزن خشک ریشه‌چه نیز با افزایش سطوح کاربرد سرب و کادمیوم کاهش‌داشت، بیش‌ترین وزن خشک ریشه‌چه از تیمار عدم مصرف سرب و کادمیوم با ۰/۶۶ گرم به‌دست آمد و کم‌ترین وزن خشک ریشه‌چه از تیمار ۱۰۰ میکرومول بر لیتر سرب و۱۰۰ میکرومول بر لیتر کادمیوم با میانگین ۰/۳۵ گرم حاصل شد، هرچند که اختلاف آن از لحاظ آماری با سطح ۷۰ میکرومول بر لیتر سرب و کادمیوم معنی‌دار نبود و هر دو در یک کلاس آماری جای‌گرفتند (جدول سه). لازم به‌ذکر است کم‌ترین وزن خشک ریشه‌چه مربوط به سطح ۱۰۰ میکرومول بر لیتر سرب در تمامی سطوح کاربرد کادمیوم بود. این درصد کاهش در سطح ۱۰۰میکرومول برای کادمیوم و سرب به‌ترتیب ۳۱ و ۴۳ درصد بود.

آنزیم فسفاتاز

کادمیوم یک عنصر سمی است که فعالیت‌های متابولیکی گیاه را متأثر می‌سازد (Li *et al.,* 2008). از سوئی دیگر در غلظت‌های بالای فلزات سنگین با مهار ساخت RNA های ریبوزمی در سلول‌های مریستمی سبب کاهش رشد می‌گردند (Serida *et al.,* 2008). تأثیر منفی سرب بر رشد ریشه‌چه شلغم روغنی نیز قبلاً توسط سایر محققان گزارش گردید (Singh *et al.,* 2011).

براساس نتایج به‌دست آمده از جدول تجزیه واریانس، اثرات ساده کاربرد سرب و کادمیوم و اثرات متقابل تیمارها بر آنزیم فسفاتاز در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول یک). میزان فعالیت آنزیم فسفاتاز با افزایش سطوح کاربرد سرب و کادمیوم کاهش یافت، کم‌ترین میزان آنزیم فسفاتاز از سطح ۱۰۰ میکرومول بر لیتر سرب ($IU.g.FW^{-1}$ ۱/۱) و۱۰۰ میکرومول بر لیتر کادمیوم ($IU.g.FW^{-1}$۱/۹) بود هرچند که اختلاف آن از لحاظ آماری با سطح ۷۰ میکرومول بر لیتر کادمیوم از لحاظ آماری معنی‌دار نبود. درصد کاهش فعالیت آنزیم فسفاتاز تحت تاثیر غلظت ۱۰۰ میکرومول کادمیوم نسبت به شاهد ۳۲ درصد و تحت تاثیر سرب ۶۵ درصد بود. که نشان از تاثیر منفی بالای سرب بر فعالیت آنزیم فسفاتاز در گیاهچه ذرت دارد (جدول دو).

بررسی اثرات متقابل غلظت سرب و کادمیوم بر روی میزان فعالیت آنزیم فسفاتاز (جدول سه) نشان داد که پائین‌ترین میزان فعالیت آنزیم فسفاتاز مربوط به سطح ۱۰۰ میکرومول بر لیتر سرب در تمامی سطوح کاربرد کادمیوم بود، کم‌ترین میزان آنزیم فسفاتاز از تیمار مصرف ۱۰۰ میکرومول بر لیتر سرب و ۱۰۰ میکرومول بر لیتر کادمیوم با $IU.g.FW^{-1}$ ۰/۹ به‌دست آمد و بیش‌ترین میزان آنزیم فسفاتاز از تیمار عدم مصرف سرب و مصرف ۱۰ میکرومول بر لیتر کادمیوم با $IU.g.FW^{-1}$ ۴/۴ حاصل شد که با تیمار عدم مصرف سرب و کادمیوم اختلاف معنی‌داری نداشت و هر دو در کلاس آماری a جای‌گرفتند (جدول سه) و در ضمن این نتایج حاکی از آن است که فعالیت آنزیم فسفاتاز زمانی‌که در معرض هم‌زمان کادمیوم و سرب قرار می‌گیرد، کاهش بیش‌تری نشان می‌دهد. فسفات یک ترکیب ضروری در ساختار مولکول‌های DNA و RNA و فسفولپیدهای دیواره سلولی، ATP و اجسام فیتین در بذر جوانه نزده است (Sharma *et al.,* 2008).

آنزیم‌های فسفاتاز در فضای درون و برون سلول فعالیت دارد و نقش آن دفسفرسیلاسیون فسفات آلی و تبدیل آن به فسفات معدنی است. آنزیم‌های هیدرولیز کننده، با هیدرولیزکردن کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌ها و چربی‌ها نقش مهمی در جابجایی ذخایر غذایی دارند (Kuriakose and Prasad, 2008). از این رو کاهش آن‌ها باعث کاهش جوانه‌زنی و رشد بعد از آن می‌شود. نتایج سایر محققان نشان داد که با افزایش غلظت کادمیوم آنزیم‌های هیدرولیز کننده مانند فسفاتاز اسید (ACPs)، پروتئاز و آلفا آمیلاز در سورگوم (*Sorghum bicolor* L.) (Kuriakose and Prasad, 2008) و افزایش غلظت سرب تا ۵۰۰ میکرومول باعث کاهش فعالیت فسفاتاز اسید و اینورتاز به‌ترتیب با ۵۲ و ۷۴

درصد در شلغم روغنی (*Brassica campestris* L) گردید (Singh *et al.*, 2011) که با نتایج حاصل از این تحقیق مطابقت دارد.

آنزیم α آمیلاز

آنزیم α آمیلاز از آنزیم‌های حیاتی در سوخت‌وساز کربوهیدرات‌ها در فرآیند جوانه‌زنی است که فعالیت آن تحت تاثیر عوامل محیطی قرار می‌گیرد. در دانه غلات انرژی برای جوانه‌زنی از طریق تجزیه کربوهیدرات‌ها (نشاسته) در آندوسپرم دانه تامین می‌شود. نتایج جدول تجزیه واریانس نشان داد اثرات ساده کاربرد سرب و کادمیوم و اثرات متقابل تیمارها بر میزان α آمیلاز تاثیر معنی‌داری در سطح یک درصد داشت (جدول یک). در این تحقیق میزان فعالیت آنزیم α آمیلاز نیز با افزایش سطوح کاربرد سرب و کادمیوم کاهش یافت، کم‌ترین میزان فعالیت آنزیم α آمیلاز از تیمار ۱۰۰ میکرومول بر لیتر سرب و۱۰۰ میکرومول بر لیتر کادمیوم بود هرچند که اختلاف آن از لحاظ آماری با سطح ۷۰ میکرومول بر لیتر سرب و کادمیوم معنی‌دار نبود (جدول دو).

بررسی اثرات متقابل غلظت سرب و کادمیوم بر میزان فعالیت آنزیم α آمیلاز (جدول سه) نشان داد که بیش‌ترین میزان آلفاآمیلاز (۵/۹ $IU.g.FW^{-1}$) از تیمار عدم کاربرد کادمیوم و سرب (۵/۹ $IU.g.FW^{-1}$) و کم‌ترین میزان آلفاآمیلاز (۳/۳ IU.g.FW-1) از تیمار غلظت ۱۰۰ میکرومول در لیتر سرب و کادمیوم به‌دست آمد. همچنین نتایج اثرات متقابل نشان داد که در غلظت ۱۰۰ میکرومول کادمیوم به همراه غلظت‌های ۱۰۰ و ۷۰ میکرومول سرب به‌ترتیب کاهش ۴۴ و ۴۰ درصدی در فعالیت آنزیم داشت. که نشانگر اثر سینرژیست این دو عنصر بود. نتایج نشان داد که تنش فلزات سنگین باعث کاهش فعالیت آنزیم α آمیلاز و جوانه‌زنی بذر گیاه (*Abelmoschus esculentus*) گردید (Dkhil & Denden, 2010). حضور فلزات سنگین باعث ایجاد تنش اکسیداتیو و افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) می‌شود که به‌نوبه خود باعث ایجاد اثرات سمی مختلف در گیاهان نظیر کاهش رشد، کاهش محتویات کلروفیل و فتوسنتز، کاهش و مهار فعالیت‌های آنزیمی، آسیب به مولکول‌های زیستی به‌خصوص DNA شد (Mishra *et al*., 2006).

آنزیم کاتالاز

کاتالاز آنزیم مهم دیگری است که در شرایط تنش اکسیدی فعال می‌شود. این آنزیم قادر به هضم و حذف H_2O_2 می‌باشد. بدین ترتیب که پراکسید هیدروژن که محصول سمی حاصل از عملکرد SOD است، توسط این آنزیم مورد استفاده قرار می‌گیرد (Khatun *et al.*, 2008). فلز سرب با کوفاکتور آنزیم‌هایی که در غشای پلاسمایی وجود دارند (سبب نشت الکترون از طریق غشای پلاسمایی) و یا اتصال به اسیدهای نوکلئیک، سبب افزایش تولید گونه‌های اکسیژن واکنش‌گر مانند هیدروژن پراکسید می‌شود (Chin, 2007). هیدروژن پراکسید تولید شده می‌تواند منجر به تخریب غشای و پراکسیداسیون لیپید شود. این مولکول می‌تواند توسط کاتالاز یا پراکسیداز حذف گردد (Malecka *et al.*, 2012).

نتایج جدول تجزیه واریانس نشان‌داد اثرات ساده کاربرد سرب و کادمیوم و اثرات متقابل تیمارها بر میزان کاتالاز تاثیرگذار بود و اختلافات به‌وجود آمده در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول یک). بالاترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز برگ متعلق به سطح ۱۰۰ میکرومول بر لیتر سرب و کادمیوم با متوسط (۴/۹ $IU.g.FW^{-1}$)، کم‌ترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز برگ نیز متعلق به سطح عدم کاربرد سرب و کادمیوم با میانگین (۲ $IU.g.FW^{-1}$) بود (جدول سه). بررسی اثرات متقابل غلظت سرب و کادمیوم بر روی میزان فعالیت آنزیم کاتالاز (جدول سه) نشان داد که بالاترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز مربوط به سطح ۱۰۰ میکرومول بر لیتر سرب در تمامی سطوح کاربرد کادمیوم می‌باشد. افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز می‌تواند ناشی از این واقعیت باشد که این آنزیم در سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانتی گیاهان تحت تش اکسیداتیو ناشی از فلزات سنگین مشارکت دارد. گزارش گردید که افزایش فعالیت کاتالاز در تیمار با فلزات سنگین به‌دلیل افزایش تولید سوبسترای آن مانند H_2O_2 در سلول‌های گیاهی و به‌منظور مقابله با شرایط تنش می‌باشد (Jiang *et al*., 2010). میزان فعالیت آنزیم کاتالاز وابسته

بـه شـدت، مـدت و نوع تنش است (Sharma *et al*., 2012). قرارگرفتن در معرض فلزات سنگین، سیستم آنتی‌اکسیدانت را تحریک می‌کند، اما نحوه این پاسخ بسته به گونه گیاهی، فلزات به‌کار رفته و شدت استرس متفاوت است. در این رابطه آنزیم کاتالاز در مقایسه با سایر آنزیم‌های آنتـی‌اکسیدانتـی از حساسیت بیش‌تری برخوردار است. به‌طورکلی می‌توان گفت تنش فلزات سنگین، که در اینجا ترکیب سرب و کادمیوم مدنظر است، هم‌راستا با کاهش جوانه‌زنی و رشد گیاهان، سیستم آنتی‌اکسیدانتی آنها را تحریک می‌کند. با توجه به اثر کاهشی این فلزات سنگین بر رشد گیاهان، سیستم دفاعی گیاه نیز فعال می‌شود.

جدول ۲- مقایسه میانگین‌های اثرات ساده تنش سرب و کادمیوم بر برخی از ویژگی‌های ذرت

Table 2. Comparison of main means corn attributes affected by lead and cadmium stress condition

تیمار Treatment	درصد جوانه زنی Germination percentage (%)	سرعت جوانه زنی Germination rate (Seed per day)	وزن خشک ساقه چه Plumule dryWeight (gr)	وزن خشک ریشه چه Radicle dry weight (gr)	فعالیت آنزیم فسفاتاز Phosphatase activities (IU. g FW^{-1})	آنزیم آلفا آمیلاز α-Amylases enzyme (IU. g FW^{-1})	آنزیم کاتالاز Catalase enzyme (IU. g FW^{-1})
میزان سرب Lead concentration							
0	78^{a}	7.7^{a}	0.36^{a}	0.53^{a}	3.8^{a}	5.1^{a}	2.3^{e}
10	77^{a}	7.9^{a}	0.35^{a}	0.47^{b}	3.3^{b}	4.9^{b}	2.9^{d}
40	69^{b}	7.0^{b}	0.30^{b}	0.39^{c}	2.4^{c}	4.9^{b}	3.2^{c}
70	62^{c}	6.2^{c}	0.27c	0.39^{c}	1.8^{d}	4.4^{c}	4.1^{b}
100	65^{bc}	6.1^{c}	0.24^{d}	0.37^{c}	1.1^{e}	4.2^{c}	4.5^{a}
میزان کادمیوم Cadmium concentration							
0	78^{a}	7.7^{a}	0.37^{a}	0.51^{a}	3.06^{a}	5.6^{a}	3.1^{c}
10	74^{ab}	7.5^{a}	0.33^{b}	0.49^{a}	2.90^{a}	5.3^{a}	3.2^{c}
40	70^{bc}	7.0^{b}	0.30^{c}	0.44^{b}	2.60^{b}	4.6^{b}	3.5^{b}
70	64^{c}	6.4^{c}	0.28^{d}	0.37^{c}	2.10^{c}	4.1^{c}	3.7^{a}
100	65^{c}	6.3c	0.25^{e}	0.35^{c}	1.90^{c}	4.2^{c}	3.8^{a}

میانگین‌های داده شده در ستون که دارای حروف مشترک می‌باشند، تفاوت‌شان از نظر آماری در سطح پنج درصد دانکن معنی‌دار نیست

Treatment means followed by the same letter within each common are not significantly different ($P < 0.05$) according to Duncan's Multiple Range test

نتیجه‌گیری کلی

نتایج نشان داد که افزایش غلظت سرب و کادمیوم تا ۱۰۰ میکرومول در لیتر بر کاهش فعالیت آنزیم‌های آمیلاز، فسفاتاز و کاتالاز گیاهچه ذرت تاثیر معنی‌داری دارند. همچنین این کاهش تحت تاثیر وجود همزمان این عناصر افزایش نشان داد که نشان از تاثیر منفی بیش‌تر این عناصر زمانی که در کنار هم قراردارند، می‌باشد. در غلظت ۱۰۰ میکرومول در لیتر کادمیوم به‌همراه غلظت‌های ۱۰۰ و ۷۰ میکرومول سرب به‌ترتیب کاهش ۴۴ و ۴۰ درصدی در فعالیت آنزیم آمیلاز رخ داد. این کاهش در غلظت‌های ۴۰ و ۷۰ میکرومول در لیتر کادمیوم به‌همراه ۱۰۰ میکرومول در لیتر سرب ترتیب ۷۶ و ۷۹ بود. برای آنزیـم کاتـالاز در غلظت

۱۰۰ میکرومول کادمیوم به‌همراه غلظت‌های ۱۰۰ و ۷۰ میکرومول سرب به‌ترتیب کاهش ۵۴ و ۵۰ درصدی رخ داد. همان‌طور مشاهده در بین آنزیم‌ها تحت اثر متقابل دو عنصر، بیـش‌ترین درصـد کاهش برای آنزیـم فسفاتاز (۷۹ درصد) می‌باشد. با توجه به افت شدیدتر مقدار آنزیم فسفاتاز تحت تاثیر سرب و کادمیوم، به نظر می‌رسد، این آنزیم از حساسیت بیش‌تری برخوردار است. به‌طورکلی نتایج نشان داد تمامی صفت‌های مورد بـررسـی گیـاهچـه ذرت (درصد جوانه‌زنی،

سرعت جوانه‌زنی، وزن خشک ساقه‌چه و ریشه‌چه) تحت تاثیر عناصر کادمیوم و سرب کاهش معنی‌داری داشتند. برای نمونه، افزایش غلظت تا ۱۰۰ میکرومول در لیتر کادمیوم و سرب باعث کاهش ۱۶ درصدی صفت درصد جوانه‌زنی ذرت شدند و همچنین با افزایش تا غلظت ۱۰۰ میکرومول بر لیتر کادمیوم و سرب از سرعت جوانه‌زنی ذرت ۲۰ و ۱۸ درصد کاسته شد. وزن خشک ساقه‌چه ذرت تحت تاثیر غلظت کادمیوم و سرب به‌ترتیب ۳۲ و ۳۳ درصد کاهش یافت. کاهش وزن خشک ریشه‌چه تحت کادمیوم و سرب به‌ترتیب ۴۳ و ۳۱ درصد بـود. همان‌طور مشاهده شد که همانند صفت سرعت جوانه‌زنی، نتایج حاکی از تاثیر منفی بیش‌تر کادمیوم بر صفت وزن خشک ساقه‌چه و ریشه‌چه ذرت نسبت به سرب می‌باشد. با توجه به موارد فوق وجود این عناصر سنگین می‌توانند در سبزشدن و رشد گیاه ذرت اخلال وارد کنند و در محیط‌های کشاورزی منجر به خسارت در امر تولید این محصول استراتژیک شوند.

جدول ۳- مقایسه میانگین اثرات متقابل تنش سرب و کادمیوم بر برخی از ویژگی‌های ذرت

Table 3. Interaction between lead and cadmium stress condition on some attributes of corn

سرب Lead concentration	کادمیوم Cadmium concentration	سرعت جوانه‌زنی rate.G (Seed per day)	وزن خشک ریشه‌چه R. D.W (g)	آنزیم فسفاتاز Phosphatase (IU. g FW^{-1})	آنزیم آمیلاز α-Amylases (IU. g FW^{-1})	آنزیم کاتالاز Catalase enzyme (IU. g FW^{-1})
0	0	8.92^{a}	0.66^{a}	4.3^{a}	5.9^{a}	2.0^{m}
	10	8.55^{a}	0.51^{a}	4.4^{a}	5.7^{abc}	2.1^{m}
	40	7.42^{b}	0.53^{a}	4.1^{b}	5.2^{de}	2.2^{m}
	70	7.09^{b}	0.46^{b}	3.4^{c}	4.4^{hi}	2.4^{kl}
	100	6.81^{c}	0.43^{b}	2.9^{d}	4.0^{kjl}	2.5^{k}
10	0	8.89^{a}	0.60^{a}	3.8^{b}	5.8^{a}	2.3^{kl}
	10	8.43^{a}	0.53^{a}	3.9^{b}	5.7^{abc}	2.7^{j}
	40	8.53^{a}	0.50^{a}	3.5^{c}	4.8^{fgh}	2.9^{i}
	70	7.27^{b}	0.39^{c}	3.0^{d}	4.5^{hi}	3.0^{i}
	100	6.78^{c}	0.36^{c}	2.4^{fg}	3.8^{klm}	3.2^{gh}
40	0	7.65^{a}	0.49^{ab}	3.3^{c}	5.8^{ab}	3.3^{gh}
	10	8.12^{a}	0.48^{ab}	2.7^{e}	5.5^{bcd}	3.0^{i}
	40	6.96^{b}	0.39^{c}	2.5^{ef}	4.7^{fgh}	3.1^{hi}
	70	6.30^{c}	0.33^{c}	1.8^{i}	3.9^{l}	3.4^{gh}
	100	6.26^{c}	0.32^{c}	1.8^{i}	3.5^{mn}	3.6^{f}
70	0	6.51^{c}	0.46^{b}	2.2^{h}	5.4^{cd}	3.4^{fg}
	10	6.10^{c}	0.42^{b}	2.2^{gh}	5.0^{ef}	3.9^{e}
	40	6.22^{c}	0.39^{c}	1.9^{i}	4.1^{ijk}	4.3^{d}
	70	6.15^{c}	0.33^{c}	1.3^{kl}	3.7^{lm}	4.6^{c}
	100	6.14^{c}	0.30^{c}	1.2^{jk}	3.5^{mn}	4.7^{bc}
100	0	6.70^{c}	0.44^{b}	1.5^{j}	4.9^{efg}	3.8^{e}
	10	6.39^{c}	0.42^{b}	1.8^{jk}	4.6^{gh}	4.3^{d}
	40	6.07^{c}	0.39^{c}	1.3^{m}	4.2^{ij}	4.8^{ab}
	70	5.82^{d}	0.36^{c}	1.0^{elm}	3.8^{lm}	4.9^{ab}
	100	5.68^{d}	0.34^{c}	0.9^{m}	3.3^{n}	4.9^{a}

میانگین‌های داده شده در ستون که دارای حروف مشترک می‌باشند، تفاوت‌شان از نظر آماری در سطح پنج درصد دانکن معنی‌دار نیست.

Treatment means followed by the same letter within each common are not significantly different ($P < 0.05$) according to Duncan's Multiple Range test

منابع References

پرمون، ق.، عبادی، ع.، قهرمانی، م.، و موسوی، س، ا. ۱۳۹۳. تاثیر فلزات سنگین بر شاخص‌های جوانه‌زنی و قدرت بذر ذرت تحت شرایط آزمایشگاهی. نشریه تحقیقات بذر. ۴(۳): ۴۰-۵۱.

Agrawal, B., Czymmek, K. J., Sparks, D.L., and Bais, H.P. 2013. Transient influx of nickel in root mitochondria modulates organic acid and reactive oxygen species production in nicke hyper accumulator Alyssum murale. Journal of Biological Chemistry 288: 7351-7362.

Cheng, S., and Huang, C. 2006. Influence of cadmium on growth of root vegetable and accumulation of cadmium in the edible root. International journal of applied science and engineering 3: 243-252.

Chin, L. 2007. Investigations into Lead (Pb) Accumulation in Symphytum officinale L. A Phytoremediation Study 6 (10): 1182-1192

Dkhil, B.B., and Denden, M. 2010. Water stress induced changes in germination, sugars, starch and enzyme of carbohydrate metabolism in *Abelmoschus esculentus* L. (Moench.) seeds.African journal of agricultural research 5: 1412-1418.

Farooqui, Z.R., Iqbal Zafar, M., Kabir, M., and Shafiq, M. 2009. Toxic effects of lead and cadmium on germination and seedling growth of Albizia lebbeck (L.) benth. Pakistan journal of botany 41(1): 27-33.

Jiang, N., Luo, X., Zeng, J., Yang, Z. 2010. Lead toxicity induced growth and antioxidant responses in Luffa cylindrica seedlings. Int. j. agri. biol 12(2): 205–10.

Goncalvez, J., Beker, A., Cargnelutti, D., Tabaldi, L., Pereira, L., Battisti, V., Spanevello, R., Morsch, V., Nicoloso, F., and Schetinger, M. 2007. Cadmium toxicity causes oxidative stress and induces response of the antioxidant system in cucumber seedling. Brazilian Journal Plant Physiology 19: 223-232.

Juknys, R., Vitkauskaite, G., Racaite, M., and Vencloviene, J. 2012. The impacts of heavy metals on oxidative stress and growth of spring barley. Central European Journal of Biology 7: 299-306.

Khatun, S., Ali, M.B., Hahn, E.J., and Paek, K.Y. 2008. Cooper toxicity in withania somnifera: Growth and antioxidant enzymes responses of in vitro grown plants. Environmental and experimental botany 64: 279-285.

Kuriakose, S.V., and Prasad, M.N.V. 2008. Cadmium stress affects seed germination and seedling growth in *Sorghum bicolor* L. Moench by changing the activities of hydrolyzing enzymes. Journal of plant growth regulation 54: 143–156.

Lamb, D.T., Ming, H., Megharaj, M., and Naidu, R. 2010. Phytotoxicity and accumulation of lead in Australian native vegetation. Arch Environ Contam Toxicol 58(3): 613–621**Lee, T. M. 2000**. Phosphate starvation induction of acid Phosphatase in *Ulva lactuca* L. Botanical bulletin of academia sinica 39: 29-32.

Li, M., Zhang, L.J., Tao, L., and Li, W. 2008. Ecophysiological responses of Jussiaea rapens to cadmium exposure. Journal of Aquatic botany 88(4): 347-352.

Maguire, J.D. 1962. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. Crop science 2: 176-177.

Malecka, A., Piechalak, A., Mensinger, A., Hanc, D., Baralkiewicz, D. 2012. Tomaszewska, B. Ant oxidative Defense System in Pisum sativum Roots Exposed to Heavy Metals (Pb, Cu, Cd, Zn). Pol. J. Environ. Stud 21(6):1721-30

Manivasagaperumal, R., Vijayarengan, P., Balamurugan, S., and Thiyagarajan, G. 2011. Effect of coupper on growth, dry matter yield and nutrient content of *Viggna Radiata* L. Journal of phytology 3: 53-62.

Mishra, S., Srivastava, S., Tripathi, R.D., Govindarajan, R., Kuriakose, S.V., and Prasad, M.N.V. 2006. Phytochelatin synthesis and response of antioxidants during cadmium stress in *Bacopa monnieri* L. Journal of plant physiology and biochemistry 44: 25-37.

Munzuroglu, O., Zengin, F.K., and Yahyagil, Z. 2008. The absicic acid levels of wheat (*Triticum aestivum* L.cv. Cakmak (79). *G.*U. Journal of Science 21: 1-7.

Noctor, G., and Foyer, C.H. 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. Annual rof plant physiology and plant molecular biology 49: 249-279.

Pan, S.M., and Chen, Y.R. 1998. The effects of drought stress on acid phosphatase activity of *Zea mays* seedling. Botanical Bulletin of Academia Sinca 20: 33-38.

Serida, K., Mohammad, B.A., Eun, J.H., and Kee, Y.P. 2008. Copper toxicity in With an iasom nifera: Growth and antioxidant enzymes responses of in vitro grown plants. Environmental and experimental botany 64: 279–285.

Sharma, A., Jha, A.M., Dubey, R.S., Pessarakli, M. 2012. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plant under stressful conditions. J. botany. 26: 1–26.

Sharma, R.K., Agrawal, M., and Marshall, F.M. 2008. Heavy, metal (Cu, Zn, Cd and Pb) contamination of vegetables in urban India: a case study in Varanasi. Environmental Pollution. 154(2): 254-63.

Singh, H.P., Kaur, G., Batish, D.R., and Kohli, R.K. 2011. Lead (Pb) inhibited radical emergence in Brassica campestris involves alterations in starch-metabolizing enzymes. Biological trace element research 144: 1295–1301.

Xiao, Z., Storms, R., and Tsang, A. 2006. A quantitative starch- iodine method for measuring alpha- amylase and glucoamylase activities. Analytical Biochemistry 351: 146–148.

Zhao, Y., Peralta-Videa, J.R., Lopez-Moreno, M.L., Ren, M., Saupe, G., and Gardea-Torresdey, J.L. 2011. Kinetin increases chromium absorption, modulates iths distribution, and changes the activity of catalase and ascorbate peroxidase in Mexican Palo Verde. Environmental Science and Technology 45: 1082-1087.