بررسی اثر آلودگی‌های صنعتی بر تجمع آرسنیک در خاک و برخی واکنش‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه دارویی *Malva neglecta* L.

زهرا عربی[1*]، زینب زاهد[2]

[1]استادیار، گروه خاکشناسی، دانشکده کشاورزی، واحد گرگان، دانشگاه آزاد اسلامی، گرگان، ایران

[2]کارشناس‌ارشد، گروه زیست گیاهی، دانشکده کشاورزی، واحد گرگان، دانشگاه آزاد اسلامی، گرگان، ایران

تاریخ دریافت: ۹۶/۰۹/۰٤ تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۰/۱۸

چکیده

آلودگی‌های زیست محیطی، از جمله فلزات سنگین یکی از معیارهای کنترل کیفیت گیاهان دارویی و محصولات فرآوری شده‌ی آنها می‌باشند. در این تحقیق به منظور بررسی اثر آلودگی‌های صنعتی بر برخی واکنش‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه پنیرک (*Malva neglecta* L.)، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با سه تکرار در اراضی کشاورزی اطراف شهرک صنعتی بندر گز در استان گلستان در بهار ۱۳۹۲ اجرا گردید. فاکتور اول شامل فاصله از منبع آلودگی در چهار سطح (شاهد، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ متر) و فاکتور دوم نوع اندام گیاه (هوایی و ریشه) بود. کرت شاهد نیز در همان منطقه در فاصله ۱۰۰۰ متری از منبع آلودگی در نظر گرفته شد. در این آزمایش مقدار آنتوسیانین، قند محلول کل، فلاونوئید، پروتئین، پرولین، آنزیم پراکسیداز، کاتالاز، گلیسین بتائین و آرسنیک و کادمیوم خاک و گیاه اندازه‌گیری شدند. نتایج نشان داد بیشترین میزان آنتوسیانین (٦/۳۷ میکرومول در گرم وزن تر اندام هوایی)، ، قند محلول (٤۲/۰٤ میلی‌گرم در گرم وزن خشک اندام هوایی)، پرولین (۱۵/۰۵ میکرومول در گرم وزن خشک اندام هوایی) و گلیسین بتائین (٤٦/۹۹ میکروگرم در گرم وزن خشک اندام هوایی) در تیمار ۲۰۰ متر فاصله از منبع آلودگی به دست آمد. بیشترین میزان پروتئین (۰/۰۹۹ گرم در کیلوگرم وزن خشک)، فلاونوئید (۱/۳۰۵ میلی‌گرم در گرم وزن خشک اندام هوایی)، آرسنیک (۵۱۵/۳۷ میکروگرم در کیلوگرم اندام هوایی) و فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز (به‌ترتیب ۸/۸٤ و ۲۵/٦۲ میکرومول آب اکسیژنه بر دقیقه) مربوط به تیمار ۱۰۰ متر فاصله از منبع آلودگی بود.

واژه‌های کلیدی: آرسنیک، آنتوسیانین، پروتئین، پنیرک، قندهای محلول کل

*نویسنده مسئول: arabi_z2003@yahoo.com

مقدمه

به‌دلیل سهم بزرگ گیاهان دارویی و محصولات آنها در بازارهای دارویی جهان باید توجه ویژه‌ای به کیفیت، سلامت و کارایی آنها داشت. گیاه پنیرک با نام علمی *Malva neglecta* L. گیاهی است علفی و یکساله، دوساله یا به ندرت چند ساله از خانواده پنیرکیان که گل‌های این گیاه حاوی آنتوسیانین و موسیلاژ بوده که از آن در صنایع غذایی، آرایشی بهداشتی و صنایع دارویی استفاده فراوان می‌شود (Omidbeigi, 1995). جذب فلزات سنگین به وسیله گیاهان و تجمع آنها در زنجیره غذایی، تهدیدی برای سلامتی انسان است. اگرچه برخی از فلزات سنگین برای رشد بیولوژیکی لازم هستند، ولی غلظت‌های کمی بیش از حد آستانه آنها می‌تواند بر حیات گیاهی و جانوری بسیار خطرآفرین باشد. سازمان بهداشت جهانی (WHO, 1988 and 2005) حداکثر مقدار مجاز کادمیوم، آرسنیک و سرب برای گیاهان دارویی را به ترتیب ۰/۳، ۱ و ۱۰ میلی‌گرم در کیلوگرم اعلام کرده است. در غلظت‌های بالای این فلزات، جانشینی با فلزات ضروری، رخ می‌دهد و از آنجا که فلزات ضروری در تشکیل رنگیزه‌ها و آنزیم‌ها نقش مهمی دارند بنابراین تشکیل رنگیزه‌ها دچار اختلال می‌شود و از این رو عناصر موجود در خاک را برای رشد گیاه نامناسب ساخته و تنوع زیستی را از بین می‌برد. تنش‌های زیستی و غیر زیستی منجر به شکل‌گیری گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر (ROS[1]) می‌شود. تولید گونه‌های اکسیژن فعال سبب پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء، تخریب پروتئین‌ها و نوکلئیک اسیدها می‌شود (Jiang and Zhang, 2001). گیاهان برای کاهش دادن اثر مخرب گونه‌های اکسیژن فعال، مکانیسم‌های متفاوتی دارند. از جمله این مکانیسم‌ها می‌توان به سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی اشاره کرد. این سیستم شامل سیستم آنزیمی و غیرآنزیمی است. آنزیم‌های آنتی اکسیدان مانند کاتالاز، سوپراکسیددیسموتاز و پراکسیداز در پاکسازی رادیکال‌های آزاد اکسیژن در سلول نقش دارند (Agarwal and Pandey, 2004). در سال‌های اخیر استفاده از تکنولوژی نو پدید گیاه‌پالایی به عنوان یک روش مورد قبول برای پاکسازی و جابه‌جایی فلزات سنگین از خاک‌های آلوده، توجه پژوهشگران متعددی را به خود معطوف داشته است. گیاهان دارویی ممکن است در مقایسه با سایر گیاهان، پتانسیل گیاه پالایی خیلی بالایی نداشته باشند با این وجود، استفاده از این گیاهان برای گیاه پالایی ممکن است اولاً به دلیل تولیدات نهایی عاری از فلزات (متابولیت‌های ثانویه)، اقتصادی بودن تولیدات ثانویه آن‌ها، عدم مشکل وارد شدن این فلزات به زنجیره غذایی در صورت مصرف متابولیت‌های ثانویه و ثانیاً به دلیل مقاومت بالای این گیاهان به تنش فلزات سنگین به دلیل دارا بودن متابولیت‌های ثانویه و نقش این متابولیت‌ها در تحمل به تنش، بر گیاهان خوراکی و چوبی ترجیح داده شود (Gupta et al., 2013). شئوران و همکاران (Sheoran et al., 2009) حداقل غلظت مورد نیاز آرسنیک و کادمیوم در بخش هوایی گیاهان برای طبقه‌بندی به عنوان بیش انباشتگر را به ترتیب ۱۰۰۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم گزارش کردند. هم چنین برای بیش انباشتگری فلزات علاوه بر داشتن **حداقل غلظت مورد نیاز**، بایستی فاکتور انتقال (غلظت عنصر مورد نظر در بخش هوایی به غلظت عنصر مورد نظر در ریشه) بزرگتر از یک باشد (Sheoran et al., 2009). در ایران به علت جمع‌آوری گیاهان دارویی از مکان‌های نامعلوم از طبیعت و امکان برداشت از مکان‌های آلوده و نبود استاندارد ملی برای فلزات سنگین در این گیاهان، در حد امکان باید از مناطق عاری از فلزات سنگین برداشت شوند. شهرک صنعتی بندر گز با مساحت ۷۳ هکتار یکی از

1. Reactive Oxygen Species

بزرگترین مجتمع‌های صنعتی فعال استان گلستان می‌باشد که شامل صنایع مختلف شیمیایی، فلزی، منسوجات جز پوشاک، چوبی، بتن و غذایی- آشامیدنی است. این تحقیق به منظور بررسی آلودگی‌های احتمالی ناشی از پساب خروجی این شهرک صنعتی بر تجمع فلزات سنگین در خاک و گیاه پنیرک و اثر این فلزات بر برخی صفات فیزیولوژی (پروتئین، قندهای محلول، فلاونوئید، آنتوسیانین، پرولین، بتائین، ترکیبات فنلی، کاتالاز، اسکوربات پراکسیداز) بر این گیاه انجام شد.

مواد و روش‌ها

به منظور بررسی آلودگی‌های احتمالی ناشی از پساب خروجی شهرک صنعتی بندر گز، اراضی کشاورزی واقع در ۵۰۰ متری اطراف شهرک صنعتی به مساحت تقریبی ۱۰۰۰۰ متر مربع با عرض جغرافیایی ۳۷ درجه و ٤٥ دقیقه شمالی و طول جغرافیایی ٥٤ درجه و ۳۰ دقیقه شرقی با ارتفاع ۱۰۰ متر از سطح دریا به عنوان محدوده مورد مطالعه انتخاب شدند. بر مبنای فاصله از آبراهه محتوی پساب کارخانه (منبع آلودگی)، منطقه به سه قسمت ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ متر تقسیم بندی شد. بدین‌منظور آزمایشی به صورت فاکتوریل و در قالب طرح بلوک کامل تصادفی در سه تکرار اجرا گردید. فاکتور اول شامل چهار فاصله از منبع آلودگی (شاهد، ۱۰۰، ۲۰۰و ۳۰۰ متر) و فاکتور دوم شامل دو اندام (هوایی و ریشه) گیاه پنیرک بود. بلوک‌ها به ابعاد۳۰۰ ×۱۰۰ متر و با فواصل ۱۰ متر از یکدیگر در سمت راست منبع آلودگی که آبراهه محتوی پساب شهرک صنعتی بود، در نظر گرفته شد. هر بلوک یک تکرار در نظر گرفته شد. کرت شاهد نیز در همان منطقه ولی با فاصله ۱۰۰۰ متر از آبراهه انتخاب شد. نمونه‌برداری از خاک به طور تصادفی تا عمق ۳۰ سانتی‌متر در هر سه بلوک از کرت‌های ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ متر فاصله از منبع آلودگی، انجام شد. یک نمونه مرکب خاک نیز از کرت شاهد گرفته شد. نمونه‌های خاک پس از خشک شدن در معرض هوا، آسیاب و از الک ۲ میلی‌متری عبور داده شدند. قابلیت هدایت الکتریکی در عصاره اشباع خاک با هدایت‌سنج الکتریکی مدل AZ8302، اسیدیته خاک به روش الکترود شیشه‌ای در عصاره اشباع و کربن آلی به روش واکلی و بلاک (Nelson and Sommers, 1982) اندازه‌گیری شد. اسیدیته گل اشباع (pH) با استفاده از دستگاه pH سنج، درصد مواد خنثی شونده (TNV) به روش تیتراسیون، فراوانی نسبی ذرات (رس، سیلت و شن) به روش هیدرومتری و همین‌طور مقدار ازت کل با استفاده دستگاه کجلدال تعیین شد. آرسنیک و کادمیوم خاک به روش عصاره‌گیری با DTPA، توسط دستگاه جذب اتمی مدل Spectr AA.200 برای کلیه‌ی نمونه‌ها اندازه‌گیری شد (Gupta, 2000). نتایج تجزیه خاک در جدول ۱ نشان داده شده است. از کرت‌های هر سه بلوک و کرت شاهد، به‌طور تصادفی ۱۰ بوته گیاه پنیرک برداشت شد. اندام هوایی و ریشه گیاهان جمع آوری شده، پس از جداسازی، با آب مقطر به دقت شستشو شدند. نمونه‌برداری از خاک و گیاهان در بهار ۱۳۹۲ انجام گرفت. برای اندازه‌گیری آرسنیک و کادمیوم در اندام هوایی و ریشه پنیرک از روش هضم تر با استفاده از اسید نیتریک غلیظ و آب اکسیژنه۳۰٪ استفاده گردید. غلظت عناصر مورد نظر در عصاره‌های حاصل توسط دستگاه جذب اتمی مدل UNICAM 919 AA spectrometer اندازه‌گیری شد.

جدول ۱: برخی خصوصیات فیزیکوشیمیایی خاک مزرعه مورد مطالعه

مشخصات خاک	۱۰۰ متر فاصله از منبع آلودگی	۲۰۰ متر فاصله از منبع آلودگی	۳۰۰ متر فاصله از منبع آلودگی	شاهد
عمق (سانتی متر)	۳۰	۳۰	۳۰	۳۰
هدایت الکتریکی(EC) (دسی زیمنس بر متر)	۰/٦۱	۰/٦۰	۰/٦۰	۰/٦۰
اسیدیته (pH)	۷/۱	۷/۲	۷/٦	۷/۹
موادخنثی شونده (درصد)	۲/۰۱	۲/۱۵	۲/۲۰	۲/۲۵
موادآلی O.M (درصد)	۱/۷۰	۱/۷۰	۱/۷۰	۱/۷۰
آرسنیک (µg/kg)	۲۸۱٤/۸	۲۷۲۲/۳	۲۳۱۷/۳	۸۸۵/۱
کادمیم (µg/kg)	۲۷٤۵/٤	۲٦۷٤/٦	۲٤۷۹/۳	۵۸۹/۵
مولیبدن (µg/kg)	۲	۲	۲	۱
بافت خاک	سیلتی کلی لومی	سیلتی کلی لومی	سیلتی کلی لومی	سیلتی کلی لومی

تعیین مقدار آنتوسیانین در اندام هوایی و ریشه گیاه بر طبق روش وانگر (Wanger, 1979) صورت گرفت. سنجش قندهای محلول با استفاده از روش فنل- اسید سولفوریک (Kochert,1978) انجام شد. برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پر اکسیداز، از ساقه و ریشه گیاه پنیرک استفاده شد. سنجش فعالیت آنزیم طی ۲ مرحله صورت گرفت (Chance and Maehly, 1955). برای سنجش آنزیم کاتالاز از عصاره آنزیمی استخراج شده برای فعالیت پراکسیداز استفاده شد (Chance and Maehly, 1955). اندازه‌گیری فلاونوئید کل با روش چانگ و همکاران (Chang et al., 2002)، اندازه‌گیری مقدار پروتئین کل با روش لوری و همکاران (Lowry et al., 1951)، اندازه‌گیری گلیسین بتائین (GB) با توجه به روش سایرام و همکاران (Sairam et al., 2002) و اندازه‌گیری پرولین با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۲۰ نانومتر انجام شد. فاکتور غلظت زیستی (BCF)[3] که نشان دهنده توانایی گیاه برای تجمع عنصر در گیاه می‌باشد از رابطه ۱ استفاده گردید (Li et al., 2007 and Tang et al., 2003). فاکتور انتقال (TF)[4]، توانایی گیاه برای انتقال عنصر از ریشه به اندام هوایی را نشان می دهد و از طریق رابطه ۲ تعیین گردید (Ghosh et al., 2005).

$$BCF=\frac{\text{غلظت عنصر مورد نظر در ریشه و اندام هوایی}}{\text{غلظت عنصر مورد نظر در محیط رشد}} \quad (۱)$$

$$TF=\frac{\text{غلظت عنصر مورد نظر در اندام هوایی}}{\text{غلظت عنصر مورد نظر در ریشه}} \quad (۲)$$

داده‌های آزمایش با استفاده از نرم افزار SPSS 22 و Excel 2010 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. مقایسه میانگین‌های هر صفت نیز با استفاده از آزمون LSD و در سطح احتمال ۰/۰۵ انجام شد.

نتایج

با توجه به نتایج آزمون خاک (جدول ۱) و ناچیز بودن مقدار مولیبدن خاک، تنها مقادیر آرسنیک و کادمیوم در اندام هوایی و ریشه گیاه پنیرک اندازه‌گیری شد. به دلیل قابل توجه نبودن مقدار کادمیوم در گیاه پنیرک بحث تنها بر روی آرسنیک انجام شد. نتایج تجزیه واریانس نشان داد اثر متقابل فاصله از منبع آلودگی و نوع اندام گیاهی بر تمام صفات اندازه‌گیری شده معنی‌دار بوده است (جدول ۲).

3. Bio Concentration Factor
4. Translocation Factor

جدول ۲: تجزیه واریانس اثر فاصله از منبع آلودگی و نوع اندام گیاهی بر صفات اندازه گیری شده

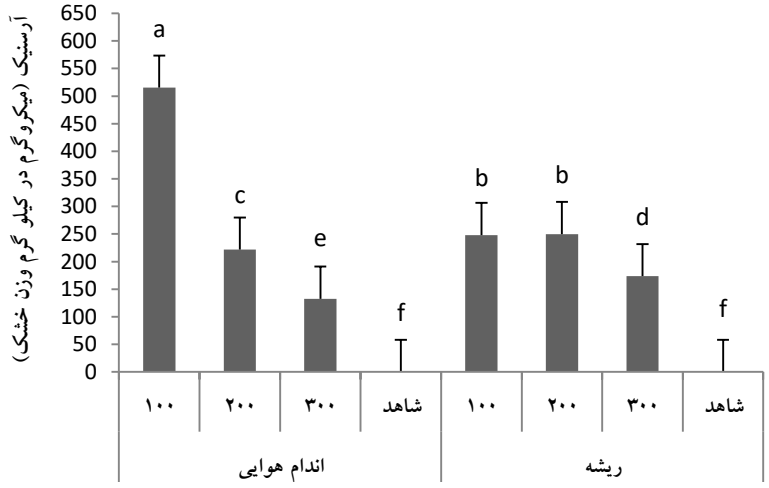
منابع تغییرات	درجه آزادی (DF)	آرسنیک گیاه	آنتوسیانین	فلاونوئید	قند محلول کل	پروتئین	پرولین	گلایسین بتائین	کاتالاز	پراکسیداز
بلوک	۲	۰/۰۰۱۹^{ns}	۳/۳۱۸^{ns}	۸۵/۳۵۸^{ns}	۱/۵۳^{ns}	۵/۲۶^{ns}	۴/۵۶^{ns}	۱۵۴/۳۶^{ns}	۰/۰۰۱۵^{ns}	۰/۰۱۹^{ns}
فاصله از منبع آلودگی (A)	۳	۱۰۰۹۰۶/۵۲**	۲/۶۲۵**	۳۱/۷۴*	۷۵/۹۷**	۴/۹۶*	۵۰/۲۹*	۲۸۶/۳۱**	۲۳/۲۰**	۳۳۹/۶۴**
نوع اندام گیاهی (B)	۱	۸۵۹۹/۱۰*	۸۱/۲۷۲*	۱۶۵/۳۷*	۱۱۵/۶۴*	۴/۹۷*	۰/۱۲۶^{ns}	۲۰۲/۸۰*	۱/۴۹*	۴۶۶/۶۰*
A*B	۳	۲۰۲۴۶۶۲/۶۵*	۲/۹۸۲**	۸۹/۰۷*	۱۵/۰۲**	۳/۷۹*	۶۱/۳۹*	۴۳۸/۱۱*	۴۰/۹۳**	۶۴/۴۷*
خطا	۶	۴/۶۵	۳/۴۵	۸۶/۴۵	۱/۶۲	۵/۴۴	۴/۳۶	۱۵/۴۲	۱/۵۶	۵/۰۲
درصد ضریب تغییرات		۲/۰۷	۱۰/۳۰	۹/۷۳	۳/۴۵	۸/۵۲	۱۷/۸۶	۶/۹۷	۷/۹۴	۹/۳۲

** اختلاف معنی‌دار در سطح ۱٪، * اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪، $^{n.s}$ عدم وجود اختلاف معنی‌دار

ارزیابی میزان غلظت آرسنیک در گیاه پنیرک: نتایج تجزیه واریانس اثرات ساده و متقابل فاصله از منبع آلودگی و اندام گیاهی بر میزان آرسنیک (جدول ۲) نشان داد بین تیمارها، اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد وجود دارد. بیشترین میزان آرسنیک مربوط به تیمار ۱۰۰ متر فاصله از منبع آلودگی با میانگین ۵۱۵/۳۷ میکروگرم در کیلوگرم اندام هوایی و کمترین میزان آرسنیک مربوط به تیمارهای اندام هوایی و ریشه‌ی شاهد به ترتیب با میانگین ۰/۰۱ و ۰/۲۱ میکروگرم در کیلوگرم می‌باشد (شکل ۱). بیشترین مقادیر برای فاکتورهای غلظت زیستی و انتقال برای آرسنیک به ترتیب ۰/۳ و ۲/۱ در تیمار ۱۰۰ متر فاصله از منبع آلودگی به دست آمد (جدول ۳).

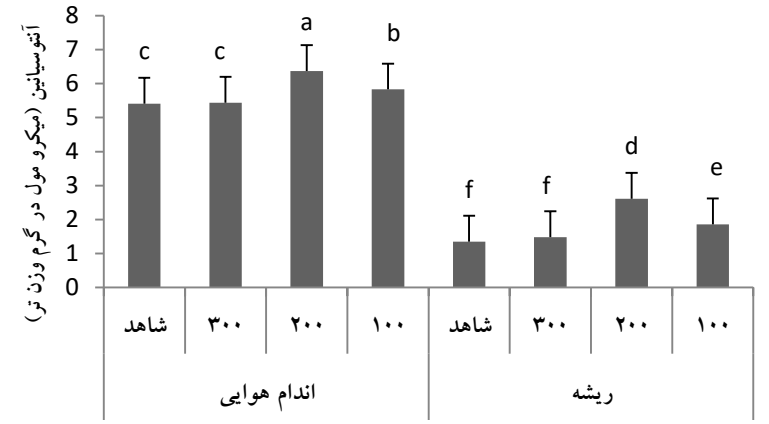
جدول ۳: مقادیر فاکتور تجمع زیستی و فاکتور انتقال آرسنیک در گیاه در فواصل مختلف از منبع آلودگی

	BCF	TF
۱۰۰ متر فاصله از منبع آلودگی	۰/۲۷	۲/۰۸
۲۰۰ متر فاصله از منبع آلودگی	۰/۱۷	۰/۸۹
۳۰۰ متر فاصله از منبع آلودگی	۰/۱۳	۰/۷۷
شاهد	۰	۱



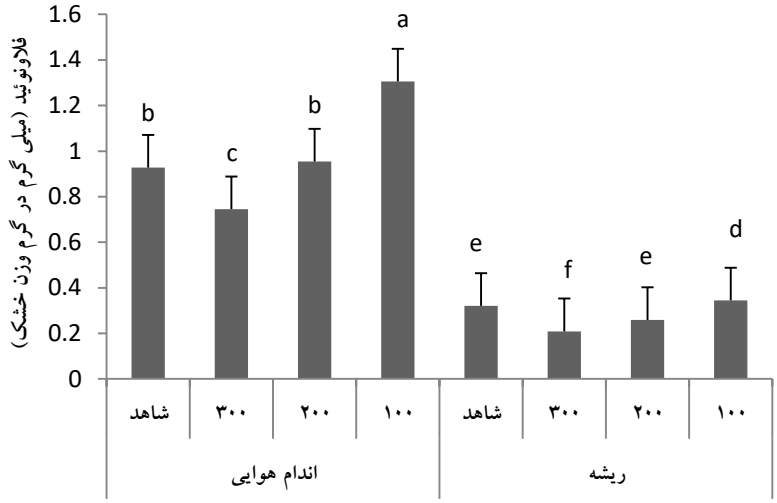
شکل ۱: مقایسه میانگین اثر فاصله از منبع آلودگی و نوع اندام گیاهی بر میزان آرسنیک

اعداد میانگین هستند (n=3) و سطح معنی‌داری آزمون‌ها ۵ درصد است.



شکل ۲: مقایسه میانگین اثر فاصله از منبع آلودگی و نوع اندام گیاهی بر میزان آنتوسیانین

اعداد میانگین هستند (n=3) و سطح معنی‌داری آزمون‌ها ۵ درصد است.



شکل ۳: مقایسه میانگین اثر فاصله از منبع آلودگی و نوع اندام گیاهی بر میزان فلاونوئید
اعداد میانگین هستند (n=3) و سطح معنی‌داری آزمون‌ها ۵ درصد است.

ارزیابی میزان آنتوسیانین کل: نتایج تجزیه واریانس اثر متقابل فاصله از منبع آلودگی و نوع اندام گیاهی بر میزان آنتوسیانین در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ۲). نتایج نشان داد تیمار ۳۰۰ متر فاصله از آلودگی در ریشه از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد نداشت. تیمار ۲۰۰ متر فاصله از منبع آلودگی با میانگین ٦/۳۷ میکرومول در گرم وزن تر اندام هوایی حاوی بیشترین و تیمار شاهد و ۳۰۰ متر فاصله از منبع آلودگی به ترتیب با میانگین ۱/٤٥ و ۱/٤٨ میکرومول در گرم وزن تر ریشه حاوی کمترین مقدار آنتوسیانین بودند (شکل ۱). در تیمار ۱۰۰ متر فاصله از منبع آلودگی مشاهده می شود که میزان آنتوسیانین اندام هوایی و ریشه به طور معنی داری کمتر از تیمار ۲۰۰ متر فاصله بوده است.

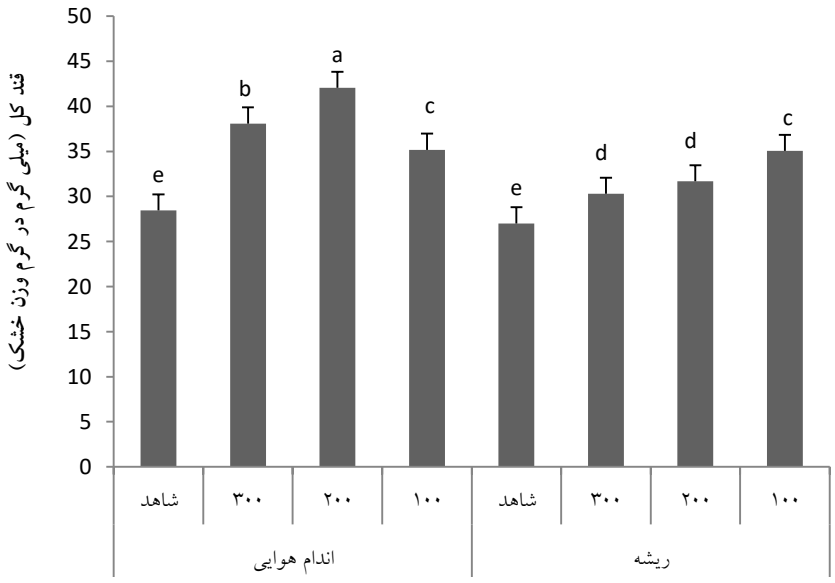
ارزیابی میزان فلاونوئید کل: نتایج تجزیه واریانس (جدول ۲) اثرات ساده و متقابل فاصله از منبع آلودگی و اندام گیاهی بر میزان فلاونوئید کل، اختلاف معنی‌داری را بین تیمارها برای این صفت در سطح احتمال ۵ درصد نشان داد. در بررسی مقایسه میانگین‌ها (شکل ۲)، مقدار فلاونوئید در اندام هوایی نسبت به ریشه در تمامی تیمارها بیشتر بود. همین‌طور تیمار ۱۰۰ متر از منبع آلودگی هم در اندام هوایی و هم در ریشه بیشترین مقدار فلاونوئید را نسبت به سایر تیمارها داشت. این تفاوت در میزان فلاونوئید، در تمامی تیمارهای نسبت به تیمار ۱۰۰ متر فاصله از منبع آلودگی معنی‌دار بود. در حالی‌که تیمار ۲۰۰ متر فاصله از منبع آلودگی از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد نداشت. تیمار ۱۰۰ متر فاصله از منبع آلودگی در اندام هوایی با میانگین ۱/۳۱ میلی‌گرم در گرم وزن خشک، بیشترین و تیمار ۳۰۰ متر فاصله از منبع آلودگی در ریشه با میانگین ۰/۲۱ میلی‌گرم در گرم وزن خشک، حاوی کمترین مقدار فلاونوئید می‌باشند.

ارزیابی میزان قند کل: با بررسی نتایج تجزیه واریانس اثرات ساده و متقابل فاصله از منبع آلودگی و اندام گیاهی، اختلاف معنی دار در سطح ۱ درصد، بین تیمارهای مختلف در میزان قند کل به دست آمد (جدول ۲). مقایسه میانگین‌ها نشان داد که میزان قند محلول کل (شکل ۳) تحت تأثیر تیمارهای مختلف آلودگی خاک افزایش یافته است که این افزایش در

مورد تمام تیمارها نسبت به شاهد معنی‌دار بود. بیشترین میزان قند محلول کل با میانگین ٤٢/٠٤ میلی‌گرم در گرم وزن خشک مربوط به تیمار ۲۰۰ متر فاصله از منبع آلودگی در اندام هوایی و کمترین میزان قند محلول کل مربوط به تیمارهای شاهد ساقه و ریشه به ترتیب با میانگین ۲۸/٤٤ و ۲۷/۰۰ میلی‌گرم در گرم وزن خشک ساقه و ریشه بود.

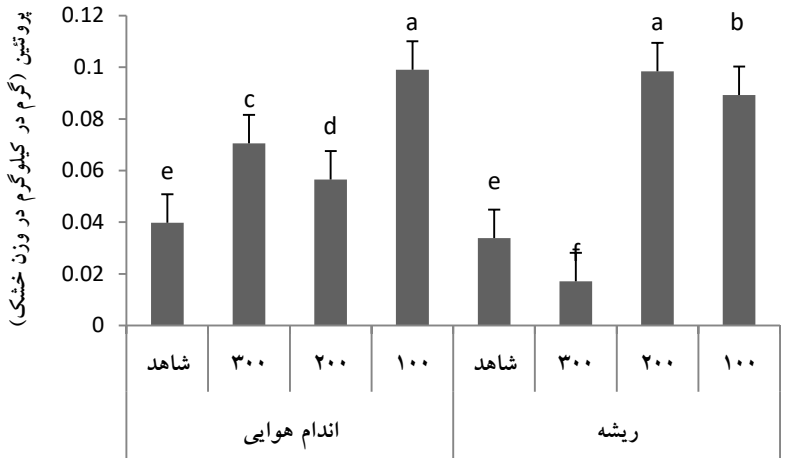
ارزیابی پروتئین کل: در بررسی نتایج تجزیه واریانس، مشاهده شد مقدار پروتئین کل در تمامی تیمارها به جز تیمار ۳۰۰ متر فاصله از منبع آلودگی نسبت به شاهد معنی‌دار بود (جدول ۲). تیمار ۱۰۰ متر فاصله از منبع آلودگی با میانگین ۰/۰۹۹ گرم در کیلوگرم وزن خشک اندام هوایی حاوی بیشترین و تیمار ۳۰۰ متر فاصله از منبع آلودگی با میانگین ۰/۰۱۷ گرم در کیلوگرم وزن خشک ریشه، حاوی کمترین مقدار پروتئین بود (شکل ۵).

ارزیابی میزان پرولین: از لحاظ میزان پرولین، نتایج تجزیه واریانس اثر متقابل فاصله از منبع آلودگی و نوع اندام گیاهی در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود (جدول ۲). بیشترین میزان پرولین با میانگین ۱۵/۰۵ میکرو مول در گرم وزن خشک ساقه و ۱۳/۸۲ میکرو مول در گرم وزن خشک ریشه مربوط به تیمار ۲۰۰ متر فاصله از منبع آلودگی و کمترین میزان پرولین مربوط به تیمارهای شاهد ساقه و ریشه به ترتیب با میانگین ۷/۵۳ و ۷/۲۷ میکرو مول در گرم وزن خشک ساقه و ریشه بود (شکل ٦). با نزدیک شدن به منبع آلودگی تا ۲۰۰ متر، پرولین افزایش یافت اما با بیشتر شدن مقدار آلودگی آرسنیک، مشاهده می‌شود میزان پرولین کاهش یافته است.

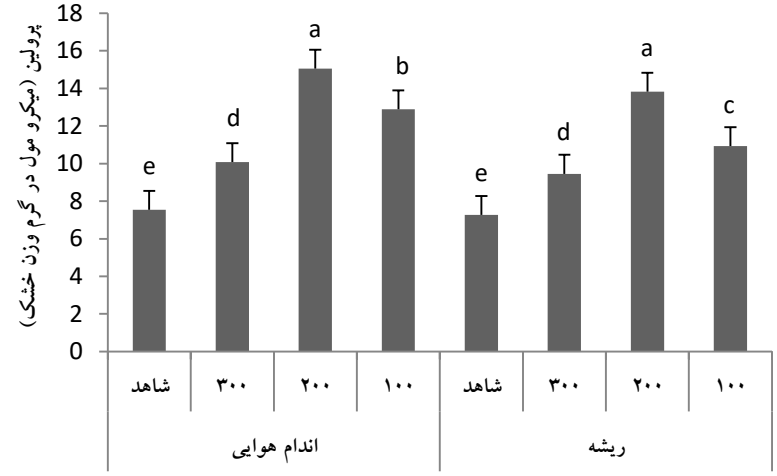


شکل ٤: مقایسه میانگین اثر فاصله از منبع آلودگی و نوع اندام گیاهی بر میزان قند کل

اعداد میانگین هستند (n=3) و سطح معنی‌داری آزمون‌ها ۵ درصد است.



شکل ۵: مقایسه میانگین اثر فاصله از منبع آلودگی و نوع اندام گیاهی بر میزان پروتئین
اعداد میانگین هستند (n=3) و سطح معنی‌داری آزمون‌ها ۵ درصد است.

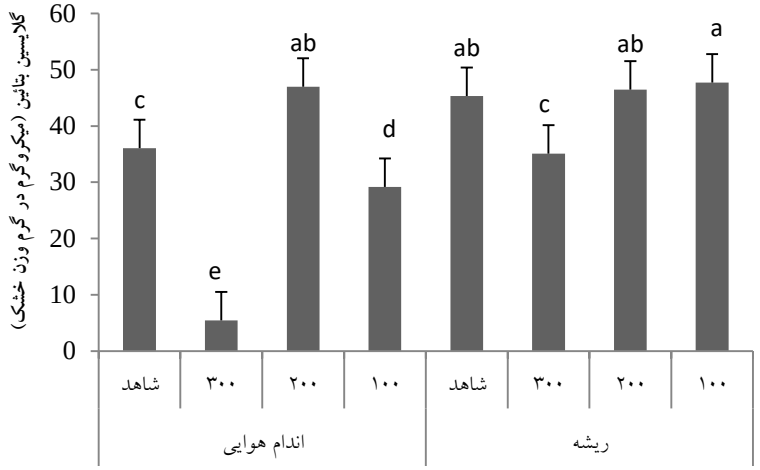


شکل ٦: مقایسه میانگین اثر فاصله از منبع آلودگی و نوع اندام گیاهی بر میزان پرولین
اعداد میانگین هستند (n=3) و سطح معنی‌داری آزمون‌ها ۵ درصد است.

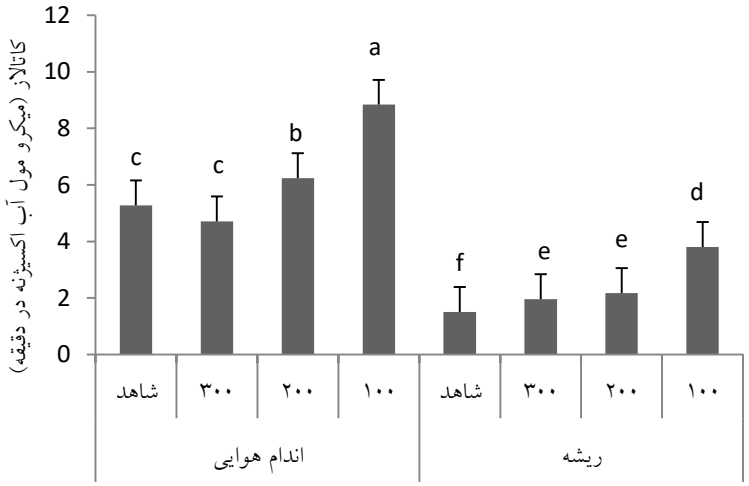
ارزیابی میزان گلایسین بتائین: در بررسی نتایج تجزیه واریانس اثرات ساده و متقابل فاصله از منبع آلودگی و اندام گیاهی، اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد بین تیمارهای مختلف در میزان گلایسین بتائین به دست آمد (جدول ۲). مقایسه میانگین‌ها نشان داد که میزان گلایسین بتائین تحت تأثیر تیمارهای مختلف آلودگی خاک قرار گرفته‌اند به طوری که بیشترین میزان گلایسین بتائین با میانگین ٤٧/٨ میکروگرم در گرم وزن خشک ریشه مربوط به تیمار ۱۰۰ متر فاصله از منبع آلودگی بود که با تیمارهای شاهد و ۲۰۰ متر فاصله از منبع آلودگی در ریشه و ۲۰۰ متر اندام هوایی تفاوت معنی‌داری نداشت (شکل ۷).

ارزیابی میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز: بررسی اثرات ساده و متقابل فاصله از منبع آلودگی و اندام گیاهی بر میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز، اختلاف معنی‌داری در سطح پنج درصد نسبت به تیمار شاهد را نشان داد (جدول ۲). با افزایش غلظت فلز سنگین در خاک به واسطه نزدیک شدن به منبع آلودگی، مقدار فعالیت هر دو آنزیم افزایش یافت که در اندام هوایی به مراتب بیشتر از

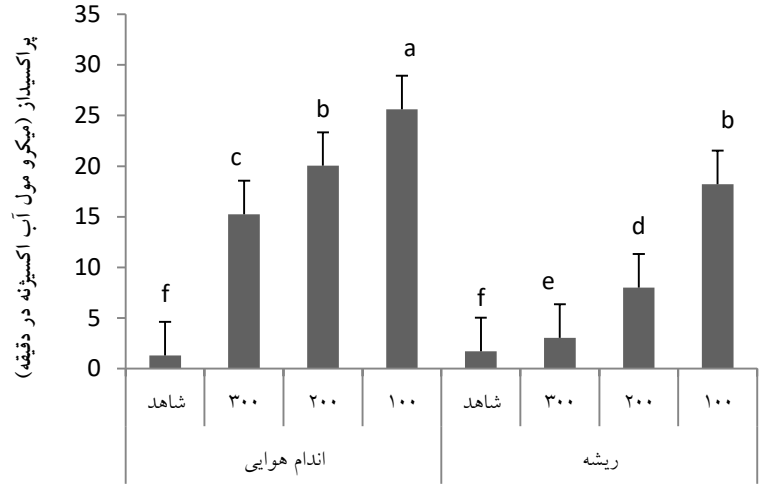
ریشه بود. نتایج نشان داد بیشترین میزان فعالیت هر دو آنزیم کاتالاز و پراکسیداز، مربوط به تیمار ۱۰۰ متر فاصله از منبع آلودگی در اندام هوایی با میانگین به ترتیب ۸/۸۳ و ۲۵/۶۲ میکرو مول آب اکسیژنه در دقیقه و کمترین میزان فعالیت آنها مربوط به تیمار شاهد ریشه و اندام هوایی با میانگین به‌ترتیب ۱/۵۱ و ۱/۷۲۵ میکرومول آب اکسیژنه در دقیقه می‌باشد که در مورد پراکسیداز با تیمار شاهد ریشه در یک سطح آماری بود (شکل ۸).



شکل ۷: مقایسه میانگین اثر فاصله از منبع آلودگی و نوع اندام گیاهی بر میزان گلایسین بتائین
اعداد میانگین هستند (n=3) و سطح معنی‌داری آزمون‌ها ۵ درصد است.



شکل ۸: مقایسه میانگین اثر فاصله از منبع آلودگی و نوع اندام گیاهی بر میزان کاتالاز
اعداد میانگین هستند (n=3) و سطح معنی‌داری آزمون‌ها ۵ درصد است.



شکل ۹: مقایسه میانگین اثر فاصله از منبع آلودگی و نوع اندام گیاهی بر میزان پراکسیداز

اعداد میانگین هستند (n=3) و سطح معنی‌داری آزمون‌ها ۵ درصد است.

بحث

نتایج این تحقیق نشان داد (شکل ۱) به دنبال افزایش آرسنیک محیط رشد، میزان آرسنیک اندام هوایی و ریشه افزایش معنی‌داری یافته است. عربی و همکاران (Arabi et al., 2017)، گزارش کردند میزان کادمیوم ریشه و اندام هوایی با افزایش کادمیوم محیط کشت افزایش یافته که با پژوهش حاضر مطابقت دارد. بسته به نوع فلز سنگین و نوع گیاه، غلظت آن در اندام‌های مختلف گیاهی متفاوت است. به عنوان مثال برخی محققین غلظت کادمیوم را در اندام ذخیره‌ای بذور بیشتر از برگ و در برگ بیشتر از ریشه‌های فیبری گزارش کرده‌اند (Vaseghi, 2003; Arabi et al., 2017). نتایج پژوهش ما نشان داد غلظت آرسنیک در اندام هوایی بیشتر از ریشه بوده است و فاکتور انتقال نیز در مقادیر بیشتر آلودگی افزایش یافته و حتی به بیشتر از ۲ رسیده است که با نتایج خسروی و همکاران (Khosravi et al., 2014) در خصوص تجمع بیشتر آرسنیک در ریشه گیاه خار مریم در مقایسه با اندام هوایی، همسو نیست که می‌تواند به دلیل تفاوت در نوع گیاه باشد. به نظر می‌رسد که تنش ناشی از افزایش آرسنیک در بافت، منجر به فعال شدن سیستم حفاظتی گیاه و تشکیل آنتوسیانین‌ها گردد تا از تجمع عنصر مذکور در بافت جلوگیری و به واکوئل صادر نماید. از طرفی تعدادی از آنتوسیانین‌ها دارای اجزای اضافی نظیر اسیدهای آلی و فلزاتی نظیر آلومینیوم، آهن و منیزیم می‌باشند که احتمال دارد ورود برخی از این عناصر در ساختمان آنتوسیانین‌ها منجر به تشکیل و افزایش در مقادیر تعدادی از آنتوسیانین‌ها گردد (Khavari nezhad, 2013). در گزارشات دیگر شالین و همکاران (Shalin et al., 2009) افزایش پایداری آنتوسیانین را در گیاه ستاره‌ای رقم سانگال که تحت تأثیر دمای بالا بوده و با عناصر فلزی منیزیم، آلومنیوم، آهن و منگنز تیمار شده بود گزارش نمودند و اظهار داشتند که منیزیم باعث افزایش آنتوسیانین می‌شود. وجود قند برای تشکیل آنتوسیانین‌ها که ترکیبات گلیکوزیدی هستند، ضروری می‌باشد (Oloomi, 2003). در این پژوهش کاهش میزان آنتوسیانین در تیمار ۱۰۰ متر فاصله از منبع آلودگی بیانگر این مطلب است که در غلظت‌های بالاتر آرسنیک به دنبال کاهش ساخت قند در گیاه (شکل ٤)، کاهش میزان آنتوسیانین را به همراه داشته است. کاهش میزان آنتوسیانین در شرایط تنش با کاهش میزان

قند بر روی دو رقم گیاه کلزا نیز اثبات شده است. تخریب ساختار کلروپلاست و ناپایداری کمپلکس‌های رنگدانه پروتئین، تجزیه کلروفیل‌ها توسط آنزیم تخریب- کننده‌ی کلروفیل (کلروفیلاز) موجب کاهش میزان کلروفیل و در نتیجه میزان قند می‌شود (Bertrand and Schoefs, 1999). فلاونوئیدها یا ترکیبات فنلی در سیتوپلاسم و نیز سطح سیتوپلاسمی شبکه آندوپلاسمی سنتز می‌شوند و با فعالیت آنتی‌اکسیدانی در برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی نقش حفاظتی دارند. در این پژوهش با نزدیک شدن به منبع آلودگی، میزان فلاونوئید به طور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش یافت. فلاونوئیدها از مهمترین این ترکیبات آنتی‌اکسیدانی هستند. این ترکیبات نه تنها رادیکال‌های آزاد را از بین برده، بلکه از تولید بیشتر آن‌ها نیز جلوگیری می‌کنند. فلاونوئیدها دارای گروه-های هیدروکسیل و کربوکسیل هستند که قادرند به طور اختصاصی به عناصر سنگین باند شوند و همچنین ریشه‌های بسیاری از گیاهان در معرض عناصر سنگین، میزان بالای تولید فلاونوئید را دارند (Diaz et al., 2001., Sakihama et al., 2002., Jang et al., 2003). نتایج به دست آمده در این مطالعه نشان دهنده کاهش میزان ترکیبات فنولی محلول در ریشه و افزایش آنها در اندام هوایی می‌باشد. مطالعات قبلی نشان داده است که کاهش میزان ترکیبات فنلی محلول می‌تواند به علت سنتز سایر ترکیبات فنولی از جمله لیگنین باشد. همچنین مشخص شده است که در استرس فلزات سنگین، فنول‌های متصل به دیواره بیشتر از فنل‌های محلول تحت تأثیر قرار می‌گیرند (Matsouka et al., 2011). قلیچ و همکاران (Ghelich et al., 2015) در پژوهش خود نشان دادند که افزایش محتوای فلاونوئید کل در اندام هوایی و ریشه گیاهچه‌های یونجه در پاسخ به تنش سرب نشان دهنده نقش این گروه از متابولیت‌های ثانویه در افزایش تحمل گیاهچه‌های یونجه نسبت به تنش سرب می‌باشد. بسیاری از شرایط تنش زای محیطی بر متابولیسم قندها و پخش مواد فتوسنتزی در گیاهان در حال رشد اثر می‌گذارند. افزایش مقدار قندهای احیاکننده تحت شرایط تنش شوری، غرقابی و سرما نیز گزارش شده است (Assareh & Shariat, 2009). گیاه با افزایش قندهای محلول در شرایط تنش علاوه بر حفظ پتانسیل اسمزی، قادر خواهد بود تا ذخیره کربوهیدراتی خود را برای متابولیسم پایه سلولی در حد مطلوب نگه دارد (Dubey & Singh, 1999). نتایج بررسی رنجبر و همکاران (Ranjbar et al., 2011) نشان داد اثرات سرب بر مقدار قندهای محلول در اندام‌های هوایی و زیرزمینی معنی‌دار بوده و با افزایش غلظت سرب محیط، به تدریج مقدار قند محلول در هر دو بخش هوایی و زیرزمینی کاهش یافته است. جان و همکاران (John et al., 2009) در گیاه عدسک آبی که یکی از گیاهان آبزی و به عنوان تجمع‌کننده عناصر شناخته شده است، اثر تیمارهای مختلف کادمیم را مورد بررسی قرار داده و نشان دادند که در غلظت‌های زیر ۳۰ میلی‌گرم در لیتر میزان قندهای محلول، پرولین و پروتئین‌ها افزایش یافته ولی در غلظت‌های بالاتر، مقدار پارامترهای ذکر شده کاهش یافتند. گیاه در مقابله با تنش فلزات سنگین شروع به سنتز پروتئین‌های دفاعی می‌کند. در این راستا متابولیت‌ها و آنزیم‌های موجود در ساختار پروتئین‌ها را درگیر می‌کند. نتایج پیروز و همکاران (Pirooz et al., 2012) نشان داد که محتوای پروتئین ریشه گیاه آفتابگردان در اثر تنش کروم کاهش یافته است. گزارش شده است که کاهش در محتوای پروتئینی در غلظت‌های بالای یون می‌تواند به علت کاهش در سنتز بعضی پروتئین‌ها و یا احتمالاً افزایش فعالیت آنزیم‌های پروتئولیتیک باشد (Khudsar et al.,2001). نتایج نشان داد در اثر افزایش غلظت

آرسنیک میزان پرولین در اندام هوایی تا دو برابر افزایش یافت. در حقیقت مکانیسم متابولیکی جهت مقابله با تنش آرسنیک منجر به افزایش میزان این آنزیم گشته است. تجمع پرولین موجب کاهش آسیب به غشاء و پروتئین‌ها می‌گردد. پرولین علاوه بر تنظیم اسمزی، تنظیم pH سلول، تنظیم اکسیداسیون و احیاء، منبع کربن و نیتروژن احیاء شده نیز محسوب می‌گردد (Liamas et al., 2000). ایوایز (Ewaise, 1997) گزارش کرد که افزایش غلظت کادمیم، نیکل و سرب باعث افزایش میزان پروتئین‌ها و آنزیم‌ها در چند گونه علف هرز گردید. در تحقیق دیگری که روی خردل هندی (Brassica junceae) انجام گرفت نشان داده شد که غلظت‌های کم کادمیم باعث افزایش پرولین، ولی غلظت‌های بالاتر سبب کاهش پرولین گردید که با نتایج به دست آمده از پژوهش ما همخوانی دارد (Shah et al., 2001). نتایج این پژوهش نشان می‌دهد در مقادیر بالای آرسنیک، تولید گلایسین بتائین افزایش یافته است و با دور شدن از منبع آلودگی مقدار آن هم در ریشه و هم در اندام هوایی کاهش یافته است. از پاسخ‌های گیاهان در برابر فلزات سنگین می‌توان تغییر فرآیندهای متابولیک گیاه، افزایش تولید تنظیم کننده‌های اسمزی، آنتی‌اکسیدان‌ها و مواد محافظت کننده را نام برد (Seregin and Ivanov, 2001). گلایسین بتائین معمول‌ترین محلول آلی سازگار می‌باشد که در اکثر میکروارگانیسم‌ها، گیاهان و حیوانات وجود دارد و در میان ترکیبات آمونیوم شناخته شده جزء فراوان‌ترین ترکیب در گیاهان می‌باشد که به تنش پاسخ می‌دهد (Yang et al., 2003). همچنین گلایسین بتائین از جمله اسموپروتکتانت‌هایی است که فاقد اثرات سمی بوده و قادر به محافظت گیاه در برابر انواع تنش‌ها مانند فلزات سنگین بوده و از طریق تنظیم اسمزی سلول، خنثی سازی سمیت انواع اکسیژن فعال، پایداری غشا، کاهش آسیب سلولی و محافظت از آنزیم‌های مختلف، تحمل گیاه را به تنش افزایش داده و در شرایط تنش نقش تنظیم کننده اسمزی را ایفا می‌کند (Ashraf and Foolad, 2007). بالا بودن مقدار گلایسین‌بتائین ریشه در تیمار شاهد شاید به این دلیل است که درصد آهک و pH خاک در کرت شاهد نسبت به سایر مناطق بالا بوده که می‌تواند نشان دهنده وجود کلسیم بالاتر در این منطقه باشد. جیریجا و همکاران (Girija et al., 2002) نشان دادند که کلسیم در نهال‌های بادام زمینی تحت تأثیر NaCl، تولید گلایسین بتائین را افزایش می‌دهد اما سطوح پرولین را کاهش می‌دهد. به نظر می‌رسد کلسیم سبب محافظت اسمزی بیشتری برای گیاهچه ای که در معرض شوری قرار گرفته است، شده است (Girija et al., 2002). آرسنیک علاوه بر دارا بودن خاصیت سمی، در تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) در سلول نیز نقش دارد. مشخص شده آرسنیک تولید گونه‌های فعال اکسیژن را افزایش داده در این بین بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان مانند کاتالاز و پراکسیداز در درون سیتوزول سلول‌ها، جهت از بین بردن ROSهای تولید شده نیز افزوده می‌شود (Miteva and Merakchiyska, 2002).

نتیجه‌گیری نهایی

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد با افزایش آلودگی آرسنیک، میزان تجمع آن در گیاه و به ویژه اندام هوایی افزایش یافت. توانایی گیاه در تجمع و تحمل آرسنیک می‌تواند نتیجه‌ای از سمیت‌زدایی ROS به وسیله سیستم آنتی اکسیدانی گیاه باشد. تجمع آرسنیک منجر به فعال شدن سیستم دفاعی گیاه و تشکیل ترکیبات آنتی اکسیدانی مانند آنتوسیانین و فلاونوئید و فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز گردید. قندهای محلول، پروتئین و پرولین نیز با افزایش میزان آرسنیک افزایش یافت ولی در مقادیر

بالاتر آلودگی (تیمار ۱۰۰ متر فاصله از منبع آلـودگی) کاهش داشتند. به دنبال کاهش میـزان قنـد در مقـادیر بالای آرسنیک، میزان آنتوسیانین نیز کاهش نشـان داد. افزایش گلایسین بتائین در ریشه نسبت به اندام هوایی مشهودتر بود. نکته جالبی که در این پژوهش مشـاهده شد بالا بودن میزان گلایسین بتائین در تیمار شاهد بود که احتمالا به دلیل بالاتر بودن اسیدیته و درصد آهـک خاک تیمار شاهد است. با توجه بـه نتـایج بـه دسـت آمده و وجود خاصیت بیش‌انـدوزی در گیـاه پنیـرک، انتظار می‌رود بتوان از آن در پـاک‌سـازی محـیط‌هـای آلوده از طریق جمـع‌آوری فلـزات سـنگین از جملـه آرسنیک استفاده کرد.

تشکر و قدرانی

بر خود لازم می‌دانـم از زحمـات اسـتاد بزرگـوار مرحومه خانم دکتر مه‌لقا قربـانلی کـه در اجـرای ایـن پژوهش یاری رسـاندند، کمـال تشـکر و قـدردانی را دارم. غفران و آمرزش را از خدای منـان بـرای ایشـان مسئلت دارم.

References

1. Assareh, M. H. and Shariat, A. 2009. Study of salt tolerance in germination and vegetative growth in four species of Eucalyptus. Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources of Gorgan, 15 (6): 145-157.
2. Agarwal, S. and Pandey, V. 2004. Antioxidant enzyme responses to NaCl stress in *Cassia angustifolia*. Plant Biology, 48, 555-560.
3. Alamgir., A.N.M. and Akhter, S. 2010. Effects of aluminum on some biochemical characteristics of wheat (*Triticum aestivum* L.). Bangladesh Journal of Botany, 39, 9-14.
4. Arabi, Z., Homaee, M., Asadi, M. A. and Asadi Kapoul, S. 2017. Cadmium removal from Cd-contaminated soils using some natural and synthetic chelates for enhancing phytoextraction. Chemistry and Ecology, 33(5), 389-402.
5. Ashraf, M. and Foolad, M.R. 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. Environmental and Experimental Botany, 59: 206-216.
6. Bertrand M. and Schoefs B. 1999. Photosyntetic pigment metabolism in plants during stress, In: Handbook of plant and crop stress (ed. Pessarakli, M.), Marcel Dekker, New York. 527-543.
7. Boroomand jazi., Sh., Lari Yazdi, H. and Ranjbar, M. 2011. Effect of salicylic acid on photosynthetic pigments, sugar content and antioxidant enzymes in rapeseed under lead stress, Plant Biology, 3 (9): 39-52.
8. Chance, B. and Maehly, A.C. 1955. Assay of catalases and peroxidases. Methods in Enzymologist, 11: 764-755.
9. Chang, C.C., Yang, M.H., Wen, H.M. and 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.
10. Dai, L.P., Xiong, Z.T., Huang,Y. and Li, M. J. 2006. Cadmium-induced changes in pigments, total phenolics, and phenylalanine ammonia-lyase activity in fronds of Azolla imbricata. Environmental toxicology, 21(5): 505-512.
11. Diaz, J., Bernal, A., Pomar, F. and Merino, F. 2001. Induction of shikimate dehydrogenase and peroxidase in pepper (*Capsicum annum L.*) seedlings in response to copper stress and its relation to lignification. Plant Science, 161-179p.
12. Dubey, R.S. and Singh, A.K. 1999. Salinity induces accumulation of soluble sugars and alters the activity of sugar metabolizing enzymes in rice plants. Biol. Plantarum, 42: 233-239.
13. Ewaise, E.A. 1997. Effects of cadmium, nickel and lead on growth, chlorophyll content and proteins of weed. Biologica Plantarum, 39(3): 403-410.
14. Ghelich, s., Zarinkamar, F. and Niknam, V. 2015. Investigating the amount of lead accumulation and its effect on peroxidase activity, phenolic and flavonoids content

in germination stage in alfalfa (*Medicago sativa* L.). Journal of Plant Research, 28 (1): 164-174.
15. Ghosh, M., and Singh, S.P. 2005. A comparative study of cadmium phytoextraction by accumulator and weed species. Environmental Pollution, 133(2): 365-371.
16. Girija, C., Smith, B. N. and Swamy, P. M. 2002. Interactive effects of sodium chloride and calcium chloride on the accumulation of proline and glycinebetaine in peanut (*Arachis hypogaea* L.). Journal of Environmental and Experimental Botany. 47 (1): 1-10.
17. Gupta, P.K. 2000. Soil, plant, water and fertilizer analysis. New Delhi: Agrobios.
18. Gupta, A.K., Verma, S.K., Khan, K. and Verma, R.K. 2013. Phytoremediation using aromatic plants: a sustainable approach for remediation of heavy metals polluted sites. Environmental Science & Technology, 47(18): 10115-10116.
19. Jiang, M. and Zhang, J. 2001. Effect of abscisic acid on active oxygen species, antioxidative defence system and oxidative damage in leaves of maize seedlings. Plant Cell Physiology, 42: 1265-1273.
20. Jiang, L.Y., and Yang, X.E. and He, Z.L. 2004. Growth response and phytoextraction of copper at different levels in soils by Elsholtzia splendens, Chemosphere, 55: 1179-1187.
21. Janzen, H.H., 1993. Soluble salts. in: carter m.r. soil sampling and methods of analysis. crc press, Florida, 161-166.
22. John, R., Ahmad, P., Gadgil, K. and Sharma, S. 2009. Heavy metal toxicity: effect on plant growth, biochemical parameters and metal accumulation by *Brassica juncea* L. international journal of plant production, 3: 1735-8043.
23. Jung, C.H., Maeder, V., Funk, F. and Frey, B. 2003. Release of phenols from *Lupinus albus* L. roots exposed to Cu and their possible role in Cu detoxification. Plant and Soil, 252(2): 301-312.
24. Khavari Nezhad, R., Najafi, F., Afshar Mohammadian, M. and Falah, S.F. 2013. The Effect of Interaction of arsenic and gibberellic acid on anthocyanin and phenol in two rice cultivars. Plant Process and Function, 14: 41-50.
25. Khosravi, Z., Arabi, Z. and Ghorbanli, M. 2014. Effects of some soil properties on arsenic and cadmium uptake by *Silybum marianum*. Journal of Soil Management and Sustainable Production, 5(3): 205-218.
26. Khudsar, T., Uzzafar, M. and Iqbal, M. 2001. Cadmium-induced changes in leaf epidermis, photosynthetic rate and pigment concentrations in *Cajanus cajan.* Biologia Plantarum, 44 (1): 59–64.
27. Kochert, G. 1978. Carbohydrate determination by the phenol sulfuric acid method, In Helebust, J.A., Craig, J.S. Handbook physiological methods, Cambridge university Press, Cambridge, 96-97.
28. Liamas, A., Ullrich, C.I. and Sanz, A. 2000. Cadmium effects on transmembrane electrical potential difference, respiration and membrane permeability of rice (*Oryza sativa* L.) roots. Plant and Soil, 219 (1-2): 21-28.
29. Li, M.S., Luo, Y.P., and Su, Z.Y. 2007. Heavy metal concentrations in soils and plant accumulation in a restored manganese mine land in Guangxi, South China. Environmental Pollution. 147: 168-175.
30. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry, 193 (1): 265-275.
31. Matsouka, I., Beri, D., Chinou, I., Haralampidis, K. and Spyropoulos, C. 2011. Metals and selenium induce medicarpin accumulation and excretion from the roots of fenugreek seedlings: a potential detoxification mechanism. Plant and soil, 343 (1-2): 235-245.
32. McLean, E. O. 1982. Soil pH and lime requirement. In: Page AL, Miller RH, Keeney DR. Methods of Soil Analysis. Part 2. Agronomy Monograph, vol. 9. American Society of Agronomy: Madison, WI, 199-223.
33. Miteva, E. and Merakchiyska, M. 2002. Response of chloroplasts and photosynthetic mechanism of bean plants

to excess arsenic in soil. Bulgarian Journal of Agricultural Science, 8: 151-156.
34. Nelson, D.W. and Sommers, L.E. 1982. Total carbon, organic carbon, and organic matter. P. 539-579. In: Page AL (ed.) Methods of Soil Analysis. Part 2. 2nd ed. American Society of Agronomy, Madison, WI.
35. Omidbeigi, R. 1995. Approaches to the production and processing of medicinal plants. Publishing Thought of the Day, Tehran, 50 p.
36. Oloomi, H. 2003. The effect of cadmium on some growth indices and induction of oxidative stress in canola (*Brasics napus* L.), MA thesis, Kerman University.
37. Pirooz, P.S., Manoochehri Kalantari, Kh. and Nasibi, F. 2012. Physiological investigation of sunflower plant under chromium stress: effect on growth, aggregation and induction of oxidative Stress (*Helianthus annuus*) in Sunflower Root, 4 (11): 73-86.
38. Ranjbar, M., Lari Yazdi, H. and Boroumand Jazi, S.h. 2011. The effect of Salicylic acid on photosynthetic pigments, contents of sugar and antioxidant enzymes under lead stress in *Brassica napus* L. Journal of Plant Biology, 3 (9): 39-52.
39. Sairam, R.K., Rao, K.V. and Srivastava, G.C. 2002. Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. Plant science journal, 163: 1037-1046.
40. Sakihama, Y. and Yamasaki, H. 2002. Lipid peroxidation induces by phenolic in conjunction with aluminum ions, biologia plantarum journal, 45: 249-254.
41. Seregin, I.V. and Ivanov, V.B. 2001. Physiological aspects of cadmium and lead toxic effects on higher plants. Russian journal of plant physiology, 48: 523-544.
42. Sheoran, V., Sheoran, A.S. and Poonia, P. 2009. Phytomining: A review. Minerals Engineering, 22: 1007-1019.
43. Shah, K., Kumar, R.G., Verma, S. and Dubey, R.S. 2001. Effect of cadmium on lipid peroxidation, superoxide anion generation and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. Plant Science journal, 161: 1135-1144.
44. Shalin, A.S. and Moiseev, S.G. 2009. Optical properties of nanostructured layers on the surface of an underlying medium. Optics and Spectroscopy, 106-916p.
45. Tang, S., Xi, L., Zheng, J.M., and Li, H. 2003. Response to elevated CO2 of *Indian mustard* and *sunflower* growing on copper contaminated soil. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 71: 988-997.
46. Vaseghi, S., Afuni, M., Shariatmadari, H. and Mobli, M. 2003. Effect of sewage sludge on the concentration of heavy metals in lettuce and spinach plants in different pH soils. Journal of Horticulture Science and Technology, 3: 142-125.
47. Walkley, A. and Black, I.A. 1947. An examination of the Degtjareff method for determining organic carbon in soils: Effect of variations in digestion conditions and of inorganic soil constituents. Soil Science, 63: 251-263.
48. Wanger, G.J. 1979. Content and vacuole/extra vacuole distribution of neutral sugars, free amino acids, and anthocyanins in protoplasts. Plant Physiology, 64: 88-93.
49. WHO. 1998. Quality control methods for medicinal plant materials, Geneva.
50. Wyn Jones, R.G. and Storey, R. 1981. Betaines. In: The physiology and Biochemistry of Drought Resistance in Plants. (Eds. Paleg, L.G. and Aspinall, D.). Academic Press, New York, 171-204.
51. Yang, W.J., Rich, P.J., Axtell, J.D., Wood, K.V., Bonham, C.C., Ejeta, G., Mickelbart M.V. and Rhodes, D. 2003. Genotypic variation for glycine betaine in sorghum. Crop Science, 43: 162-169.