نشریه فیزیولوژی محیطی گیاهی، سال یازدهم، شماره ۴۴، زمستان ۱۳۹۵ / صفحات: ۴۳-۳۳

بررسی اثر کادمیوم بر شاخص‌های رشد، پیگمان‌های فتوسنتزی و برخی پارامترهای بیوشیمیایی گیاه گلرنگ (*Carthamus tinctorius* L.)

مهرنوش امیرگیلکی، هما محمودزاده*

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

تاریخ دریافت: ۹۵/٦/۱۵ تاریخ پذیرش:۹۵/۱۰/۱٤

چکیده

کادمیوم یکی از سمی ترین عناصر برای موجودات زنده می‌باشد و فاقد نقش مثبت زیستی است. به منظور بررسی تاثیر فلز سنگین کادمیوم بر فاکتورهای رشد گیاه گلرنگ (*Carthamus tinctorius*) آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در محیط باز انجام شد. سطوح مختلف سولفات کادمیوم مورد استفاده در این آزمایش، ۱۵۰، ۳۰۰، ٤۵۰، ٦۰۰، ۷۵۰، ۹۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار بودند که بصورت محلول به خاک گلدان‌ها اضافه گردید. بر اساس نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر، وزن خشک ریشه و ساقه در پاسخ به سطوح مختلف کادمیوم کاهش معنی‌داری نشان داد. در حالی که طول اندام هوایی و سرعت رشد نسبی گیاهان گلرنگ تحت تیمار کادمیوم اختلاف معنی‌داری نداشت. میزان کلروفیل a، b و کلروفیل کل در غلظت‌های بالا کادمیوم کاهش معنی دار نسبت به شاهد داشت. در حالی که میزان ترکیبات کاروتنوئیدی و محتوی نسبی آب برگ گلرنگ با افزایش غلظت کادمیوم نسبت به شاهد تفاوت معنی‌داری نشان نداد. میزان قندهای محلول در ریشه و ساقه گیاهان گلرنگ مورد تیمار کادمیوم افزایش یافت، اما میزان قندهای نامحلول در اندام‌های ذکر شده روند نزولی داشت. همچنین با افزایش غلظت کادمیوم، میزان کادمیوم بخش هوایی افزایش یافت. در بعضی از سطوح کادمیوم (۱۰۰۰ و ۹۰۰، ۷۵۰، ۳۰۰ میکرومولار) فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز نسبت به شاهد تفاوت معنی‌داری نشان داد. همچنین فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز افزایش یافت که در کلیه سطوح نسبت به شاهد معنی‌دار بود و تنها در سطح μM ۱۵۰ تفاوت معنی‌داری در مقایسه با شاهد نداشت. نتایج این پژوهش نشان داد گلرنگ قادر به جذب کادمیوم در بافت‌های خود می‌باشد و می‌توان از آن جهت گیاه پالایی فلز سنگین کادمیوم استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: پلی فنول اکسیداز، قند محلول و نامحلول، کادمیوم، گلرنگ، گایاکول پراکسیداز

مقدمه

خاک و آب آلوده به فلزات سنگین یک معضل محیطی برای سلامت انسان و سایر موجودات زنده می‌باشد. کادمیوم یکی از سمی ترین عناصر برای موجودات زنده می‌باشد و فاقد نقش مثبت زیستی است. این فلز عمدتاً از طریق فرآیندهای صنعتی و کودهای فسفاته وارد محیط زیست شده و سپس به زنجیره غذایی راه می‌یابد. از دلایل خطر آفرین بودن فلزات سنگین، قدرت تجمع زیستی آن‌ها می‌باشد. به این صورت که می‌توانند در بدن موجود زنده تجمع

*نویسنده مسئول:

homa_mahmoodzadeh@yahoo.com

پیدا کنند و غلظت آن‌ها به مرور و با تماس بیشتر افزایش میابد (Salt et al., 1995).

بررسی‌ها نشان داده است که کاهش رشد یکی از اثرات اولیه غلظت‌های سمی کادمیوم بر گیاهان است. توقف رشد ریشه، کاهش پنجه زنی در غلات و رنگ سبز تیره برگ از بارز ترین علائم مسمومیت با کادمیوم می‌باشد. انباشته شدن کادمیوم در بسیاری از گیاهان باعث کمبود آهن، منیزیم و کلسیم شده، سنتز کلروفیل را متوقف ساخته و سرعت رشد و فتوسنتز را به شدت کاهش می‌دهد (Mobin and Khan, 2007). همچنین کادمیوم با اختلال در متابولیسم نیتروژن از طریق مهار فعالیت آنزیم‌هایی مانند گلوتامین سینتاز، گلوتامات سینتاز، نیترات ردوکتاز و فرآیند احیای نیترات، سبب کاهش پروتئین شده و رشد را متوقف می‌سازد. اغلب اثرات اولیه فلزات سنگین در ریشه رخ می‌دهد و سبب کاهش طول آن می شود. جذب مقادیر زیاد کادمیوم در گیاه باعث کاهش و توقف رشد ریشه و چوب پنبه ای شدن ساختمان آن و کاهش هدایت الکتریکی آن در ریشه می‌شود. کاهش رشد اندام‌های هوایی در گیاه لوبیا تحت تاثیر کادمیوم به دلیل اختلال در جذب عناصر غذایی و آب می‌باشد. کاهش وزن خشک اندام‌های هوایی و ریشه نیز در گیاهان مورد تیمار کادمیوم نظیر لوبیا گزارش شده است (Gouia et al., 2001).

فلزات سنگین موجب تولید انواع گونه‌های واکنش گر اکسیژن و ایجاد تنش اکسیداتیو در گیاهان می شوند (Mishra et al., 2006). فعالیت همزمان آنزیم‌های آنتی اکسیدان مختلف نظیر کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز، گایاکول پراکسیداز یک مکانیسم غالب برای خاموشی ROS تحت شرایط تنش فلزات سنگین به حساب می آید. در بین فلزات سنگین، کادمیوم دارای اهمیت ویژه ای می‌باشد. زیرا به راحتی توسط سیستم ریشه ای گیاه جذب شده و سمیت آن برای گیاه ۲ تا ۲۰ برابر سایر فلزات سنگین می‌باشد (Shanker et al., 2004).

گلرنگ (*Carthamus tinctorius*) گیاهی یک ساله و بومی ایران، هند، خاورمیانه و شرق آفریقا است. دانه آن حاوی ٢٤ تا ٤٠ درصد روغن، ۱۵ تا ۳۰ درصد پروتئین و ۵ تا ۸ درصد آب است. روغن آن نیز دارای مقدار زیادی لینولئیک اسید و کمی لینولنیک اسید می‌باشد. گل‌های این گیاه دارای دو نوع ماده رنگی به نام کارتامیدین و کارتامین می‌باشند (Zargari, 1989). در سال‌های گذشته ارزش دارویی گلرنگ در درمان رماتیسم، بیماری‌های پوستی و فلج مشخص شده است. از گل و به خصوص دانه این گیاه به عنوان مسهل، نیرو دهنده سلسله اعصاب، خلط آور در بیماری‌های سینه و قاعده آور استفاده می شود. روغن آن برای بیمارانی که کلسترول خون آن‌ها بالا است و درمان تصلب شرائین اثر مفید دارد (Zargari, 1989).

در جهان سالانه مقادیر زیادی لجن فاضلاب تولید می‌شود که میزان قابل توجهی از آن به‌عنوان کود در زمین‌های کشاورزی استفاده می‌شود و حاوی عناصر سمی مانند سرب، کادمیوم، جیوه و نیکل است. گزارشات متعددی نشان دهنده تجمع کادمیوم در لایه‌های فوقانی خاک و اجتناب‌ناپذیر بودن جذب آن توسط گیاهان است. بنابراین بررسی آثار آن بر فیزیولوژی گیاهان زراعی امری ضروری به نظر می رسد. به همین دلیل در تحقیق حاضر اثر غلظت‌های مختلف کادمیوم بر ویژگی‌های رشد رویشی و نیزقندهای محلول، فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی و انباشت این عنصر سنگین در برگ گیاه گلرنگ به‌عنوان یک گیاه دانه روغنی مهم بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

به‌منظور بررسی تاثیر کادمیوم بر فاکتورهای رشد گیاه گلرنگ، بذرهای گیاه رقم IL 111 از مرکز تحقیقات طرق، استان خراسان رضوی تهیه شد. جهت کاشت از خاک مزرعه با نسبت ۵۰:۵۰ خاک و ماسه استفاده شد. ده بذر در گلدان‌های دو کیلویی کاشته شدند و در شرایط محیط باز با دمای روزانه ۲۸ و دمای شبانه ۲۲ درجه سانتیگراد قرار گرفتند. در روز اول کشت بذرها در حجم زراعی، تیماردهی (۱۰۰۰ و ۹۰۰، ۷۵۰، ۶۰۰، ۴۵۰، ۳۰۰، ۱۵۰ میکرومولار کادمیوم) گلدان‌ها به‌صورت اضافه کردن محلول به خاک انجام شد و در روز ۱۴ ام برای بار دوم تیماردهی صورت گرفت. ۳۰ روز پس از کاشت بذرها، برداشت گیاهان که در مرحله رشد رویشی بودند، انجام شد و جهت سنجش صفات مورد نظر استفاده شدند.

طول ریشه و ساقه با استفاده از خط کش میلی‌متری اندازه‌گیری شد و جهت محاسبه رشد نسبی (RGR) از فرمول زیر استفاده شد (South,1995):

$$RGR = 2.3\log(L_2 - L_1)(T_2 - T_1)/L_1$$

L= ارتفاع (در هفته اول و دوم)

T= زمان (هفته اول و دوم)

پس از شستشوی گیاهان، در انتها با آب مقطر شستشو انجام شد و توزین بخش‌های مختلف گیاهی از جمله ریشه و اندام هوایی (برحسب گرم) با ترازوی Sartorius مدل TE 2145 با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم انجام شد. نمونه‌های مورد استفاده برای تعیین وزن خشک، در انکوباتور با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۸ ساعت گذاشته شدند.ژ

اندازه‌گیری رنگیزه‌های فتوسنتزی: اندازه‌گیری رنگیزه‌های فتوسنتزی به روش Arnon (۱۹۵۶) صورت گرفت. برای این منظور ۲۰۰ میلی گرم از قطعات برگ گیاه در بوته چینی ریخته شده و با استفاده از مقداری استن ۸۰ درصد ساییده شد تا کلروفیل وارد محلول گردد. سپس محلول به لوله سانتریفیوژ منتقل گردید و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۳۵۰۰ سانتریفیوژ گردید. بعد از پایان سانتریفیوژ محلول فوقانی در ارلن ریخته شد و به حجم ۲۵ ml رسانده شد. در مرحله بعد، جذب محلول توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (شیمازو- مدل UV/1100) که قبلا با استن ۸۰ درصد تنظیم شده بود، در طول موج‌های ۶۴۰، ۶۴۶ و ۶۶۳ نانومتر اندازه‌گیری شد. سپس با توجه به فرمول‌های زیر، میزان کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل a+b، کلروفیل کل و نیز کاروتنوئیدها محاسبه گردید.

$$\text{Chla (mg/gfw)} = (12/25A_{(663)} - 2/55A_{(646)}) \times V/W \times 1000$$

$$\text{Chlb (mg/gfw)} = (20/31A_{(646)} - 4/91A_{(663)}) \times V/W \times 1000$$

$$\text{Chla+b (mg/gfw)} = (17/76A_{(646)} + 7/34A_{(663)}) \times V/W \times 1000$$

$$\text{کلروفیل کل (mg/gfw)} = (20A_{(646)} + 8/02A_{(663)}) \times V/W \times 1000$$

$$\text{کاروتنوئیدها (mg/gfw)} = (4/69A_{(440)} - 0/267(\text{Chla+b})) \times V/W \times 1000$$

A= میزان جذب

V= حجم

W= وزن تر

تعیین محتوای آب نسبی: به‌منظور تعیین محتوای آب نسبی، مقدار معینی از برگ دوم گیاهان برداشت شده از هر تیمار، به‌مدت ۴۸ ساعت در آب مقطر غوطه ور شدند. سپس برگ‌ها از آب خارج شده و آب سطح

آنها خشک شد و برگ‌ها در این حالت وزن شدند سپس در آون ۷۰ درجه به مدت ٤٨ ساعت خشک شدند و وزن خشک آن‌ها نیز اندازه گیری شد.
محتوای آب نسبی با استفاده از معادله زیر محاسبه شد:

$$RWC = (FW-DW/TW-DW) \times 100$$

در این معادله، RWC محتوای آب نسبی، FW وزن تر برگ، DW وزن خشک برگ و TW وزن برگ در حالت تورژسانس کامل است (Bian and Jian, 2008).

سنجش میزان انباشت کادمیوم در بافت برگ: برای سنجش میزان انباشت کادمیوم در بافت برگ گیاه گلرنگ، ابتدا خاکستر گیاهی تهیه گردید. در این روش به ۰/۵ گرم از بافت خشک شده برگ ۱۰ ml اسیدنیتریک غلیظ اضافه و تا ۷۲ ساعت به حال خود قرار داده شد. سپس به آرامی حرارت داده شد تا تمام بخارات اسیدی خارج شود و محلول بی رنگی به دست آید بعد آن را در آب مقطر حل کرده و در بالن ژوژه به حجم۱۰۰ میلی‌لیتر رسانیده شد. سپس محلول حاصله صاف شد و توسط اسپکتروفتومتر جذب اتمی مدل (Z- 200 HITACHI) در طول موج ۳۵۷/۹ نانومتر جذب نمونه‌ها خوانده شد. غلظت کادمیوم برگ با کمک منحنی استاندارد تعیین شد.

اندازه گیری میزان فعالیت آنزیم‌ها: به‌منظور اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز و پلی فنول اکسیداز ۰/۱گرم از بافت برگ گیاه پس از شستشو با آب مقطر با ۱ میلی‌لیتر محلول کلرید پتاسیم ۰/۸مولار (افزودن ۰/٦گرم کلرید پتاسیم جامد به ۱۰ میلی‌لیتر محلول بافر فسفات ۰/۱ مولار با pH ٦–۸) درهاون چینی ساییده و مخلوط حاصل با سرعت ۷۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۰ دقیقه با استفاده از سانتریفیوژ سرمایشی (Vision مدل VS-CFN 15000)، سانتریفیوژ گردید. برای آنزیم گایاکول پراکسیداز به عصاره آنزیم ۳ میلی‌لیتر محلول بافر فسفات ۰/۱ مولار و ۵۰ میکرولیتر گایاکول و سپس ۵۰ میکرولیتر هیدروژن پراکسید ۳٪ اضافه شد و تغییرات جذب نوری در طول موج ٤٣٦ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر (شیمادوز مدل ۱۱۰/ UV) در فواصل زمینی ۱۵ ثانیه به مدت ۳ دقیقه ثبت گردید. برای آنزیم پلی فنول اکسیداز ۲/۵میلی‌لیتر محلول بافر فسفات ۰/۲ مولار با pH٦/۸ و ۰/۲ میلی‌لیتر پیروگالل ۹۹٪ اضافه گردید و به آن‌ها فرصت داده شد تا به دمای ٤٠ درجه سانتی‌گراد برسند. در لحظه خواندن جذب آنزیم به هر لوله ۰/۲ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی اضافه و تغییرات جذب در فاصله زمانی ٤ دقیقه، در طول موج ٤٣٠ نانومتر، با استفاده از اسپکتروفتومتر (Raymond et al., 1993).

اندازه‌گیری قندهای محلول و نامحلول: برای اندازه‌گیری قندهای محلول از روش فنل سولفوریک اسید استفاده شد. ۰/۱ گرم از ماده خشک گیاه سائیده شده و به آن ۱۰ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد اضافه گردید پس از یک هفته، ۱ میلی‌لیتر فنل ۵٪ و سپس به هر نمونه ۵ میلی‌لیتر اسیدسولفوریک غلیظ با فشار اضافه و پس از سرد شدن نمونه‌ها شدت رنگ حاصله با استفاده ار دستگاه اسپکتروفتومتر مدل شیمادزو (UV-1100) در طول موج ٤٨٥ نانومتر خوانده شد. مقادیر قند نمونه‌ها با استفاده از منحنی استاندارد گلوکز براساس میلی‌گرم بر گرم وزن خشک محاسبه شد. از رسوب باقی مانده از محلول صاف شده اتانول محتوی نمونه‌های گیاهی به‌منظور اندازه‌گیری نشاسته اندام‌های گیاهی استفاده شد. رسوب صاف شده در آون با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد خشک شده و وزن نهایی ان ثبت گردید. به نمونه بدست آمده ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شده و به مدت ۱۵ دقیقه در بن ماری آب جوش قرار داده شدند. قندهای نامحلول آن به روش فنل

سولفوریک اسید و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ٤٨٥ نانومتر، تعیین گردید. سپس با استفاده از منحنی استاندارد مقادیر قند نامحلول نمونه‌ها بر حسب میلی گرم در گرم بافت خشک محاسبه شد (Mae and Nelson., 1991).

تجزیه آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار MINITAB انجام شد و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون حداقل سطح معنی داری (LSD) در سطح احتمال خطای ۵ درصد (P≤۰/۰۵) استفاده شد. رسم نمودارها توسط نرم‌افزار Excel انجام شد.

نتایج

نتایج صفات مورفولوژیکی: نتایج آماری داده‌ها نشان داد که افزایش غلظت کادمیوم تاثیر معنی دار بر خشک ریشه گیاه گلرنگ داشت. با افزایش غلظت کادمیوم وزن خشک ساقه در سطوح ۱۰۰۰و ۹۰۰، ۷۵۰، ٦۰۰ میکرومولار در مقایسه با شاهد تفاوت معنی‌دار نشان داد. نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که کادمیوم در کلیه سطوح تاثیر معنی دار بر طول ساقه نداشت. در سطح ٦۰۰ و ۱۵۰ میکرومولار کادمیوم، افزایش در میزان طول ساقه مشاهده شد که در مقایسه با شاهد معنی دار نبود. هم چنین تیمار کادمیوم تاثیر معنی دار بر سرعت رشد نسبی گیاه گلرنگ نداشت (جدول ۱ و۲).

جدول ۱: تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف کادمیوم بر صفات مورفولوژیکی گلرنگ

منابع تغییرات	درجه آزادی	وزن خشک ریشه	وزن خشک اندام هوایی	طول اندام هوایی	سرعت رشد نسبی
تیمار	۷	۰/٦۹*	۰/۰۷*	۵۲/۸	۰/۰۰۳*
خطا	۳۲	۰/۰۳	۰/۰۰۸	٤۳/۳	۰/۰۰۱

*معنی دار در سطح ۵ درصد

جدول ۲: متوسط صفات مورفولوژیکی اندازه‌گیری شده گیاه گلرنگ در غلظت‌های مختلف کادمیوم

غلظت کادمیوم (میکرو مولار)	۰	۱۵۰	۳۰۰	٤۵۰	٦۰۰	۷۵۰	۹۰۰	۱۰۰۰
وزن خشک ریشه (گرم)	۱/۱٤ a	۱/۱۲ a	۰/٦۰ b	۰/۵۵ bc	۰/٤۰ bc	۰/۳۸ bc	۰/۲۰ c	۰/۱۹ c
وزن خشک بخش هوایی(گرم)	۰/٦۲ a	۰/٦٦ a	۰/۵٦ ab	۰/۵۵ ab	۰/٤۲ bc	۰/٤۱ bc	۰/۳۵ c	۰/۳٤ c
طول ساقه (سانتی‌متر)	۲۲/۲٤a	۲۷/۲۳ a	۲۱/۱۲ a	۲۲/٦٤ a	۲٦/۳۲ a	۲٤/۱۵ a	۲۲/۵۸ a	۲۲/۳۰ a
سرعت رشد نسبی (سانتی‌متر بر سانتی‌متر روز)	۰/۱٤ ab	۰/۱۷ a	۰/۱۳ ab	۰/۱۵ ab	۰/۱۳ ab	۰/۰۸ b	۰/۱۲ ab	۰/۱۰ ab

نتایج رنگیزه‌های فتوسنتزی: نتایج حاصل از اندازه گیری رنگدانه‌های فتوسنتزی نشان داد که میزان کلروفیل a, b و کلروفیل کل برگ گلرنگ با افزایش غلظت کادمیوم کاهش یافت و در غلظت‌های بالای کادمیوم از نظر آماری اختلاف معنی‌داری با گیاهان شاهد مشاهده گردید. در حالی که میزان کاروتنوئیدهای برگ در گروه شاهد و گیاهان تحت تیمار کادمیوم اختلاف آماری معنی‌داری نشان نداد (جدول ۳ و ٤).

جدول ۳: تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف کادمیوم بر رنگیزه‌های فتوسنتزی گلرنگ

		میانگین مربعات			
منابع تغییرات	درجه آزادی	کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل کل	کاروتنوئیدها
تیمار	۷	۰/۰٤٦*	۰/۰۰۹*	۰/۰۹٤*	۰/۰۱۹
خطا	۳۲	۰/۰۱۸	۰/۰۰۳	۰/۰۳۱	۰/۰۰۸

*معنی‌دار در سطح ۵ درصد

جدول ٤: متوسط صفات مربوط به رنگیزه‌های فتوسنتزی اندازه‌گیری شده گیاه گلرنگ در غلظت‌های مختلف کادمیوم

غلظت کادمیوم (میکرومولار)	۰	۱۵۰	۳۰۰	٤۵۰	٦۰۰	۷۵۰	۹۰۰	۱۰۰۰
کلروفیل a (میلی‌گرم بر گرم وزن تر)	۱/۰۹ a	۱/۰۲ ab	۰/۹٦ b	۰/۹۷ b	۰/۹۵ b	۰/۹۱ bc	۰/۹۱ bc	۰/۸٦ c
کلروفیل b (میلی‌گرم بر گرم وزن تر)	۰/٤٦ a	۰/٤۰ ab	۰/٤۰ ab	۰/۳٦ b	۰/۳٤ b	۰/۳٦ b	۰/۳٤ b	۰/۳۳b
کلروفیل کل (میلی‌گرم بر گرم وزن تر)	۱/٦۰ a	۱/۵۳ ab	۱/۵۱ ab	۱/۳۵ b	۱/۳۲ b	۱/۲۷ bc	۱/۲۷ bc	۱/۲۵ bc
کاروتنوئیدها (میلی‌گرم بر گرم وزن تر)	۰/٤۸ a	۰/۵۰ a	۰/٤۷ a	۰/۵۷ a	۰/۵۷ a	۰/۵۷ a	۰/۳۹ a	۰/۵۵ a

نتایج سنجش صفات بیوشیمیایی: محتوای نسبی آب برگ گیاهان گلرنگ با افزایش غلظت کادمیوم افزایش یافت که نسبت به شاهد تفاوت معنی‌دار نداشت. نتایج حاصل از آنالیز واریانس داده‌ها در سطح ۵ درصد نشان داد با افزایش غلظت کادمیوم، میزان کادمیوم بخش هوایی افزایش یافت. در سطوح تیماری ۱۰۰۰و ۹۰۰، ۷۵۰ میکرومولار کادمیوم، میزان این عنصر در بخش هوایی افزیش یافت که در مقایسه با شاهد معنی‌دار بود. در سایر سطوح با افزایش غلظت کادمیوم، افزایش در میزان این عنصر در بخش هوایی ملاحظه شد که نسبت به شاهد معنی‌دار نبود.

میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در غلظت ۳۰۰ میکرومولار در مقایسه با گروه شاهد افزایش معنی‌دار نشان داد در حالی که در غلظت‌های ۷۵۰، ۹۰۰ و ۱۰۰۰ فعالیت آنزیم کاهش یافت و نسبت به شاهد این کاهش معنی‌دار بود. حداکثر میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز مربوط به غلظت ۳۰۰ میکرو مولار کادمیوم و حداقل میزان آن مربوط به تیمار ۱۰۰۰ میکرومولار بود. میزان فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز در کلیه سطوح کادمیوم به جز غلظت ۱۵۰ میکرومولار کاهش معنی‌دار نسبت به شاهد نشان داد. حداکثر میزان فعالیت این آنزیم در سطح ۱۰۰۰ میکرومولار کادمیوم مشاهده شد. نتایج مربوط به اندازه‌گیری میزان قند محلول نشان داد با افزایش غلظت کادمیوم، میزان قند محلول ریشه افزایش یافت که نسبت به شاهد معنی دار بود. در سطوح تیماری ۱۰۰۰ و ۹۰۰، ۷۵۰ ، ٦۰۰، ٤۵۰ میکرومولار کادمیوم، میزان قند محلول ریشه افزایش یافت که در مقایسه با شاهد معنی دار بود. سطوح ۳۰۰ و ۱۵۰ میکرومولار افزایش نسبت به شاهد معنی‌دار نبود. میزان قندهای محلول بخش هوایی نیز در تیمار با کادمیوم افزایش یافت و در کلیه سطوح به جز غلظت ۱۵۰ میکرومولار نسبت به شاهد معنی‌دار بود. نتایج آنالیز واریانس داده‌ها نشان داد میزان قندهای نامحلول ریشه تحت تیمار کادمیوم کاهش یافت که در سطوح تیماری ۱۰۰۰ و ۹۰۰، ۷۵۰ ، ٦۰۰، ٤۵۰، ۳۰۰ میکرومولار نسبت به شاهد معنی‌دار بود. با افزایش غلظت کادمیوم، میزان قندهای نامحلول بخش هوایی نیز کاهش یافت این کاهش در سطوح تیماری ۱۰۰۰و ۹۰۰، ۷۵۰ ، ٦۰۰، ٤۵۰ میکرومولار کادمیوم در مقایسه با شاهد معنی‌دار بود. ولی در سطوح ۳۰۰ و

۱۵۰ میکرومولار اختلاف آماری معنـی‌دار نشـان نـداد (جدول ۵ و٦).

جدول ۵: تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف کادمیوم بر صفات بیوشیمیایی گلرنگ

		میانگین مربعات						
منابع تغییرات	درجه آزادی	محتوی نسبی آب برگ	غلظت کادمیوم در بخش هوایی	فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز	فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز	میزان قندهای محلول ریشه	میزان قندهای محلول اندام هوایی	میزان قندهای نا محلول ریشه	میزان قندهای نامحلول اندام‌هوایی
تیمار	۷	۰/۰۰۰۰۰۱۸	۰/۰٦۰*	۲۷۰/۱٦*	۰/۰۵۵*	۱۲٤٤/۵*	۵۸۵/۳۱*	۲۷۰/۱٦*	۷۹/۵۳*
خطا	۳۲	۰/۰۰۰۰۰۲۸	۰/۰٤٤	۷/۵۹	۰/۰۰۱	٤۰	۹/٦۱	۷/۵۹	۵/۲۰

*معنی‌دار در سطح ۵ درصد

جدول ٦: متوسط صفات بیوشیمیایی اندازه‌گیری شده گیاه گلرنگ در غلظت‌های مختلف کادمیوم

غلظت کادمیوم (میکرو مولار)	۰	۱۵۰	۳۰۰	٤۵۰	٦۰۰	۷۵۰	۹۰۰	۱۰۰۰
غلظت کادمیوم بخش هوایی (میلی گرم بر گرم وزن خشک)	۰ c	۰/۱۳ c	۰/۱٤ c	۰/٤٤ bc	۰/٤۳ bc	۰/۹۰ ab	۰/۹۲ ab	۰/۹٤ a
فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز (تغییرات جذب بر دقیقه بر وزن تر)	۰/۵۷ b	۰/۷۰ ab	۰/۷۷ a	۰/٦۲ ab	۰/۵۲ b	۰/۳۳ c	۰/۲۲ c	۰/۱۸ c
فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز(تغییرات جذب بر دقیقه بر وزن تر)	۰/۳۵ f	۰/۳۸ ef	۰/٤۱ de	۰/٤۵ bc	۰/٤٤ cd	۰/٤٦ bc	۰/٤۹ b	۰/۵٤ a
قند محلول ریشه (میلی گرم بر گرم وزن خشک)	٤۲/٤ c	٤٤/٤ c	۵۰/۸ c	٦٤/٦ b	٦٦/٦ b	۷٤ ab	۷٦/٦ ab	۸۵/٤ a
قند محلول بخش هوایی(میلی گرم بر گرم وزن خشک)	۲۵/٤ e	۲۹/٦ de	۳۵/۲ cd	۳۸/۲ c	٤۱/۲ c	٤۸/۲ b	۵۰/۲ b	۵۷/٤ a
قند نا محلول ریشه (میلی گرم بر گرم وزن خشک)	٦۰/۲ a	۵٤/٦ ab	۵۳/۲ b	۵۱ b	٤۹/٦ bc	٤٤ cd	٤۲ de	۳۷/۸ e
قند نا محلول بخش هوایی (میلی گرم بر گرم وزن خشک)	۳۰/۲ a	۲۸ ab	۲٦/۸ ab	۲۵/۲ bc	۲٤/۲ bc	۲۱/۲ cd	۲۰/٦ cd	۱۸/٦ d
محتوی نسبی آب برگ (درصد)	۰/۰۰٦٤ a	۰/۰۰۷٦ a	۰/۰۰۸۲ a	۰/۰۰۷٦ a	۰/۰۰۷٦ a	۰/۰۰۷۸ a	۰/۰۰۷۸ a	۰/۰۰۷۲ a

اعداد دارای حروف غیر مشابه هر ردیف در سطح احتمال ۵ درصد دارای اختلاف معنی‌دار است.

بحث

براساس نتایج به‌دست آمـده در پـژوهش حاضـر، وزن خشک ریشه و ساقه در پاسخ به سطوح مختلـف کـادمیوم کـاهش معنـی‌داری نشـان داد.Abraham و همکاران (۲۰۱۳) کـاهش معنـی‌داری در وزن خشـک ریشه‌های گیـاه گلرنـگ بـا افـزایش غلظـت کـادمیوم مشاهده کردند. کاهش وزن تر و خشک برگ‌های گیاه کلزا نیز توسط Soltani و همکـاران (۲۰۰٦) در تیمـار کـادمیوم گـزارش شـده اسـت. Behtash و همکـاران (۲۰۱۰) نیز اثر تیمـار کـادمیوم و سیلیسـیوم بـر روی گیاهان چغندر لبویی را بررسی و گزارش نمودنـد کـه تیمار کادمیوم موجب کاهش معنی دار وزن خشک در گیاهان مذکور شد. آن‌ها بـر ایـن باورنـد کـه کـاهش فتوسنتز در گیاهـان چغنـدر تحـت تـنش کـادمیوم از

دلایل اصلی کاهش رشد آن‌ها می‌باشد. همچنین Safarzadeh و همکاران (۲۰۱۲) اثر سمیت کادمیوم را بر هفت رقم برنج بررسی کردند. نتایج آزمایش مذکور نشان‌دهنده کاهش وزن تر و خشک گیاهان برنج تحت تیمار این فلز سنگین بود. بر اساس این پژوهش، کاهش رشد گیاهان برنج تحت تنش کادمیوم به علت از دست رفتن اتساع سلولی و کاهش طویل شدن سلول‌ها می‌باشد.

به نظر می رسد فلزات سنگین مانند کادمیوم برای جذب توسط ناقلین غشایی با عناصر غذایی دیگر مانند کلسیم، آهن، منگنز، مس، نیکل، روی، پتاسیم و سدیم رقابت می‌کنند. بنابراین می‌توانند موجب کمبود این عناصر ضروری در گیاه شده و سبب کاهش رشد گیاه گردد (Soltani et al., 2006). در این راستا اعلام شده است سمیت کادمیوم بر روی گیاهان به‌دلیل واکنش این فلز سمی با گروه SH آنزیم‌ها و غیر فعال کردن آن‌ها است. همچنین کادمیوم بر در دسترس بودن مواد معدنی خاک تاثیر گذاشته و جذب عناصر مغذی توسط گیاه را به تاخیر می اندازد (Ahmad et al., 2012). کاهش رشد گیاه *Lemna polyrrhiza* L. در غلظت‌های مختلف $CdSO_4$ نیز مشاهده شده است. تصور می شود که کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی مانند گلوتاتیون ردوکتاز و کاتالاز و افزایش میزان مالون دی آلدهید موجب ایجاد تنش اکسیداتیو و در نتیجه کاهش رشد گیاهان تحت تیمار کادمیوم می شوند (Riffat et al., 2007). تحقیقات متعدد نشان داده است که کادمیوم نقش مهمی در جابجایی مواد غذایی به برگ دارد، در حالیکه جذب منگنز را در ریشه کاهش می‌دهد. همچنین کادمیوم مانع انتقال و جابجایی‌های مختلف مانند انتقال شعاعی در ریشه، بارگیری آوند چوب و یا جذب در برگ می شود (Sadalio et al., 2001). همچنین عنوان شده است فلز کادمیوم، پمپ‌های پروتون را به طور برگشت ناپذیری مهار می کند. این پمپ‌ها نقش کلیدی در طویل شدن سلول‌ها دارند (Ahmad et al., 2012). برخی محققین معتقدند زمانی که شبکه دفاعی گیاه قادر به حفظ غلظت‌های آزاد یون کادمیوم در سیتوسول در سطح پایین تر از آستانه نباشد، کادمیوم سبب القای تولید بیش از حد انواع واکنش گر اکسیژن می شود. همچنین کادمیوم موجب تغییر در فعالیت آنزیم‌های کلیدی مسیرهای متابولیکی متعدد می شود. این تغییرات ممکن است نتیجه مهار برخی فرآیندهای فیزیولوژیکی اولیه مانند تثبیت نیتروژن و سایر فرایندهای متابولیکی باشد (Abraham et al., 2013). کاهش بیشتر رشد ریشه نسبت به بخش هوایی نیز می‌تواند نتیجه ابقای کادمیوم در ریشه باشد. همچنین سمیت کادمیوم با محدود کردن انتقال آب به بافت‌های درحال رشد و برگ‌ها، موجب تغییرات فراساختاری در اندامک‌های سلولی و تغییر در فعالیت آنزیم‌های مسیرهای متابولیکی متعدد شده و از این طریق اثرات مضری بر جوانه زنی بذور، رشد دانه رست‌ها و گیاه و متابولیسم می گذارد. انباشت سطوح بالای کادمیوم در گیاهان ممکن است با رشد و نمو گیاه در مسیرهای گوناگون مانند کاهش فعالیت‌های آنزیمی، اختلال در فتوسنتز و تنفس تاریکی، بسته شدن روزنه و مهار جذب آب تداخل نماید. کادمیوم از تقسیم سلول‌های منطقه مریستمی و رشد سلول‌های منطقه رشد جلوگیری می کند. از طرف دیگر تمایز زودرس و چوبی شدن دیواره سلول‌های واقع در منطقه رشد طولی سلول می‌تواند از دلایل کاهش رشد ریشه باشد (Bauddh and Singh, 2011).

Chen و همکاران (۲۰۱۱)، کاهش معنی دار کلروفیل a و b را در گیاهان تیمار شده توسط غلظت ۲٤ میلی گرم کادمیوم در کیلوگرم خاک مشاهده کردند. همچنین افزایش غلظت کادمیوم در گیاهان مذکور موجب کاهش میزان خالص فتوسنتز (P_n) و

هدایت روزنه ای (G_s) شد. مهار آنزیم‌های مهمی مانند دلتا- آمینولوولینیک اسید دهیدراتاز (ALA دهیدراتاز) و پروتوکلروفیلید ردوکتاز که در بیوسنتز کلروفیل نقش دارند نیز از دلایل احتمالی کاهش کلروفیل تحت تیمار کادمیوم می‌باشد. همچنین کاهش کلروفیل در حضور کادمیوم ممکن است به علت رقابت بین آهن و کادمیوم برای ورود به سلول‌های برگ باشد که منجر به ایجاد لکه‌های قرمز- قهوه‌ای می‌گردد.

Sadalio و همکاران (۲۰۰۱) بیان داشتند که در حضور کادمیوم، میزان فتوسنتز کم می‌شود که در واقع پاسخی است به کاهش کلروفیل در گیاهان مورد تیمار کادمیوم. همچنین در کلروپلاست‌های تیمار شده با کادمیوم، تغییرات فراساختاری مشاهده می‌شود. فتوسنتز به مختل شدن جابجایی گازها از روزنه بسیار حساس است و مشاهدات میکروسکوپ الکترونی نمایانگر بسته شدن روزنه توسط کادمیوم می‌باشد. بنابراین کادمیوم از طریق بستن روزنه‌های برگ، موجبات کاهش فتوسنتز را فراهم می‌آورد. Soltani و همکاران (۲۰۰۶) نیز مختل شدن تشکیل LHCII را در برگ‌های گیاهان کلزای مورد تیمار کادمیوم نشان دادند. ایشان بر این باورند که علت این امر، مهار سنتز پروتئین LHCII در مرحله رونویسی است که موجب فتواکسیداسیون کلروفیل تازه تشکیل شده می‌شود. تولید انواع واکنش گر اکسیژن در گیاهان تحت این تنش از طریق تجزیه کلروفیل، کاهش سنتز این رنگیزه فتوسنتزی و پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی، موجب کاهش این رنگدانه در گیاهان می‌شود. در پژوهش حاضرمیزان قندهای محلول در ریشه و ساقه گیاهان گلرنگ مورد تیمار کادمیوم افزایش یافت، اما میزان قندهای نامحلول در اندام‌های ذکر شده کاهش داشت. احتمالاً کادمیوم اضافی از فعالیت روبیسکو که آنزیم کلیدی چرخه کالوین است، جلوگیری می‌کند. همچنین تصور می‌شود که کاهش تنفس و افزایش فعالیت آنزیم‌های تجزیه کننده قندهای غیرمحلول، مانند انورتاز و ساکارز سنتاز که موجب کاهش مصرف قندها و افزایش تولید آن‌ها می‌شوند، یکی از دلایل افزایش قندهای محلول است (Soltani et al., 2006). کادمیوم با کاهش انتقال آب به برگ‌ها و در نتیجه اختلال در سرعت تعرق برگ منجر به بروز تغییرات فراساختاری اندامک‌های سلول و تغییر در رفتار آنزیم‌های کلیدی چند مسیر متابولیسمی از جمله مسیر متابولیسم قند می‌شود. همچنین با کاهش انتقال آب به برگ‌ها و به دنبال آن انباشت کادمیوم در سلول‌ها، محتوای قندهای احیاء کننده در گیاه افزایش می‌یابد (Behtash et al., 2010). این پدیده احتمالاً مکانیسم سازشی گیاه برای حفظ پتانسیل اسمزی در شرایط سمیت کادمیوم است. علاوه بر نقش قندها در تنظیم فشار اسمزی، تصور می‌شود با افزایش قندهای محلول، گیاه بتواند ذخیره کربوهیدراتی خود را برای حفظ متابولیسم پایه سلول در شرایط محیطی تحت تنش در حد مطلوب نگه دارد. حضور تنش فلز سنگین نیز، ممکن است سبب صدمه به متابولیسم کربوهیدرات و اسیدهای آمینه شود. همچنین به نظر می‌رسد که کاهش کلروفیل در گیاهان گلرنگ مورد تیمار کادمیوم موجب کاهش فتوسنتز و در نتیجه کاهش سنتز قندهای نامحلول مانند نشاسته می شود (Soltani et al., 2006).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که با افزایش غلظت کادمیوم، میزان کادمیوم بخش هوایی افزایش یافت. Raffit و همکاران (۲۰۰۷) نیز بیان کردند که انباشت کادمیوم در بیومس گیاه *Lemna polyrrhiza* L. وابسته به غلظت کادمیوم و مدت زمان تیمار می‌باشد که با نتایج تحقیق حاضر همخوانی دارد. کادمیوم اگر چه برای گیاهان ضروری نمی‌باشد، اما به راحتی از طریق پوست ریشه جذب شده و سپس از مسیر سیم

پلاستی یا آپوپلاستی وارد بافت چوب می‌گردد (Raffit et al., 2007).

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در غلظت‌های بالای کادمیوم نسبت به شاهد کاهش معنی دار داشت. در حالی که، میزان فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز افزایش یافت. فلز سمی کادمیوم تولید انواع واکنشگر اکسیژن را به طور غیرمستقیم افزایش می دهد (Raffit et al., 2007). کادمیوم برخلاف سایر فلزات سنگین مانند مس به نظر نمی رسد که مستقیما موجب تولید انواع واکنشگر اکسیژن از طریق واکنش‌های فنتون و یاهابر–ویس شود. دلیل این امر ان است که کادمیوم نمی‌تواند جانشین یون مس یا آهن موجود در واکنش فنتون شود (Raffit et al., 2007). کادمیوم قادر است در بیوسنتز کلروفیل، فعالیت آنزیم‌های چرخه کالوین، چرخه ازت، گلیکولیز، مسیر پنتوزفسفات و تثبیت سولفات اختلال ایجاد کرده و از این طریق موجب تولید انواع فعال اکسیژن شود. رادیکال‌های آزاد اکسیژن تولید شده در غلظت‌های بالای کادمیوم احتمالاً با حمله به آنزیم‌های آنتی اکسیدان و آسیب‌های اکسیداتیو موجب مهار فعالیت گایاکول پر اکسیداز می‌شوند (Sadalio et al., 2001). به‌طور کلی افزایش پلی فنل اکسیداز در گیاهان تحت تاثیر تنش‌های غیرزیستی مشاهده شده است (Bauddh and Singh, 2011). برخی مطالعات نمایانگر آن است که عملکرد این آنزیم با واکنش‌های مرتبط با فتوسنتز، تنفس و سنتز ترکیبات فنلی در ارتباط است. تصور می‌شود که آنزیم پلی فنل اکسیداز در مراحل اولیه مقابله گیاه با تنش کادمیوم نقش دارد. پلی فنل اکسیداز موجب اکسیداسیون ترکیبات فنلی به کوئینون‌ها و در نتیجه کاهش میزان این ترکیبات در برگ‌ها و ریشه‌های گیاهان تحت تنش می شود. این عمل با تغییر سینتیک پراکسیداسیون، منجر به کاهش سیالیت غشا و ممانعت از انتشار رادیکال‌های آزاد شده و در نتیجه مقاومت گیاه نسبت به تنش کادمیوم را افزایش می دهد (Raffit et al., 2007).

نتیجه‌گیری نهایی

کادمیوم یکی از فلزات سنگین است که اثرات سمی آن بر گونه‌های مختلف گیاهی به اثبات رسیده است. طی پژوهش حاضر، تاثیر این عنصر بر گیاه گلرنگ مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر، وزن خشک ریشه و ساقه در پاسخ به سطوح مختلف کادمیوم کاهش معنی‌داری نشان داد. میزان کلروفیل a, b و کلروفیل کل برگ گلرنگ با افزایش غلظت کادمیوم کاهش معنی دار یافت. اما میزان ترکیبات کاروتنوئیدی در برگ گلرنگ با افزایش غلظت کادمیوم تفاوت معنی دار نسبت شاهد نشان نداد. میزان قندهای محلول در ریشه و ساقه گیاهان مورد تیمار کادمیوم افزایش اما میزان قندهای نامحلول در اندام‌های ذکر شده کاهش نشان داد. همچنین با افزایش غلظت کادمیوم، میزان کادمیوم بخش هوایی افزایش یافت. در غلظت‌های بالا ی کادمیوم میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز نسبت به شاهد کاهش معنی‌داری نشان داد، در حالی که میزان فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز نیز افزایش معنی‌داری داشت. با افزودن کادمیوم به محیط رشد گیاه گلرنگ میزان رشد این گیاه کاهش یافت. به‌طور کلی نتایج این تحقیق نشان داد این گیاه قادر به جذب کادمیوم در بافت‌های خود می‌باشد و می‌توان از آن جهت گیاه پالایی این فلز استفاده کرد.

References

Abraham, K., Sridevi, R., Suresh, B. and Damodharam, T. (2013). Effect of heavy metals (Cd, Pb, Cu) on seed germination of *Arachis hypogeae*. L. Asian Journal of Plant Science and Research. 3(1): 10-12.

Ahmad, I., Akhtar, M.J., Zahir, Z.A. and Jamir, A. (2012). Effect of cadmium on seed germination and seedling growth of four wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. Pakistan Journal of Botany. 44(5): 1569-1574.

Arnon, D.I. (1956). Photosynthesis by isolated chloroplast, Iv, Central concept and comparison of three photochemical reactions. Journal of Biochemistry and Biophysics Acta. 20:440-446.

Bauddh, K., and Singh, P.R. (2011). Differential toxicity of cadmium to mustard (*Brassica juncia* L.) genotypes under higher metal levels. Journal of Environmental Biology. 32(3): 355-62.

Behtash, F., Tabatabai, S., Malakooti, M., Sorouredin, M. and Ustan, S. (2010). Effect of cadmium and silisium on growth and physiological characters of Beta vulgaris. Journal of Agricultural Knowledge. 2(1): 53-67.

Bian, Sh. and Jiang, Y. (2008). Reactive oxygen species, antioxidant enzyme activities and gene expression patterns in leaves and roots of Kentucky bluegrass in response to drought stress and recovery. Scientia Horticulturae, 3118 :10-17

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

Gouia, H., Ghorbal M.H. and Meyer, C. (2001). Effect of cadmium on activity of nitrate reductase and on other enzymes of the nitrate assimilation pathway in bean. Plant physiology. 38: 629-638.

Mae- Adam, J.W. and Nelson sharp, C.J. (1992). Peroxidase activity in leaf elongation zone of tall feseue. Journal Plant Physiology. 10: 872-878.

Mishra, S., Srivastava, S. and Tripathi, P.D. (2006). Phytochelatin synthesis and response of antioxidants during cadmium stress in *Baccopa monnieri* L.. Journal Plant Physiology and Biochemistry. 44: 25-37.

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

Raymond, J., Pakariyathanm, N. and Azanza, J.L. (1993). Purification and some properties of poly phenol oxidases from Sunflower seeds. Phytochemistry. 34: 927-931.

Riffat, J., Ahmad, P., Gadgi, K. and Sharma, S. (2007). Antioxidative response of *Lemna polyrrhiza* L. to cadmium stress. Journal of Environmental Biology. 28(3): 583-589.

Sadalio, L.M., Dalurzo, H.C., Gomez, M., Romero- Puertas, M.C. and Del Rio, L.A. (2001). Cadmium-induce changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. Journal of Experimental Botany. 52: 2115-2126.

Safarzadeh, S., Ronaghi, A., Karimian, N., Yasrebi, J. and Emam, Y. (2012). Poisnous effect of cadmium on nitrogen and phosphorous uptake and shoot vegetative characters of seven cultivars of rice. Sciences of Greenhouse Planting. 3(9): 107-117.

Salt, D.E., Blaylock, M., Kumar, P.B., Dushenkov, V., Ensley, B.D., Chet, I. and Raskin, I. (1995). Phytoremediation: A novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. Biotechnology. 13: 468-475.

Shanker, A.K., Djanaguiraman, M., Sudhagar, R., jayarma, K. and Pathmanabhar, G. (2004). Expression of metallothioneins like protein mRNA in sorghum cultivars under chromium (VI) stress. Current Science. 86: 901-902.

South, D.B. (1995). Relative growth rate: A Critique. South African Forestry Journal. 173: 43- 48.

Soltani, F., Ghorbanli, M. and Manouchehri, K. (2006). Effect of cadmium on photosynthetic pigments, sugars and malonedealdehyde in canola. Iran Biology Journal. 9(2):134-136.

Zargari, A. (1989). Medicinal plants. Tehran University Publication.