



Scan online to view this article

Evaluation of the effect of zinc on the physiological stress process of spinach

Allahyar Kamari

Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran.

Abstract

Aim and Background: Phytorefining is a sustainable, natural, eco-friendly and widely applicable method for refining heavy metals in soil. Heavy metals are dangerous environmental pollutants that enter the food chain and cause harm to humans, plants, and other organisms. The purpose of this research was to investigate the effect of zinc on the physiological stress process of spinach plants. Research method: In order to investigate the effect of zinc element on the physiological stress process of spinach plant, a pot experiment was carried out in a factorial form and in the form of a randomized complete block design with three replications.

Results: The results showed that increasing the concentration of chlorophyll b did not have a significant effect on chlorophyll b values, but caused significant changes in root and aerial parts, chlorophyll a, total chlorophyll and leaf surface.

Conclusion: According to the findings of the research, this plant can be used in soils contaminated with zinc metal or lands under the wastes of industrial factories to refine this metal.

Keywords: plant breeding, zinc, physiological stress, spinach, Iau Science.

Corresponding author:
Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran.

Email: a.kamari63@gmail.com



برای مشاهده این مقاله به صورت آنلاین اسکن کنید

بررسی اثر عنصر روی بر فرآیند تنش فیزیولوژیک گیاه اسفناج

اله یار کمری

گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: گیاه پالایی روشی پایدار، طبیعی، دوست‌دار زیست بوم و کاربردی در سطح وسیع برای پالایش فلزات سنگین در خاک است. فلزات سنگین از آلاینده‌های خطرناک زیست محیطی هستند که از طریق ورود به زنجیره غذایی موجب بروز خطرات زیان‌باری برای انسان‌ها، گیاهان و سایر موجودات می‌شوند. هدف از این پژوهش بررسی اثر عنصر روی بر فرآیند تنش فیزیولوژیک گیاه اسفناج بوده است.

مواد و روش‌ها: به‌منظور بررسی اثر عنصر روی بر فرآیند تنش فیزیولوژیک گیاه اسفناج، آزمایشی گلدانی به‌صورت فاکتوریل و در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار اجرا گردید.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که افزایش غلظت کلریدروی تأثیر معنی‌داری بر مقادیر کلروفیل b نداشت اما سبب تغییرات معنی‌داری در زیتوده ریشه و بخش هوایی، کلروفیل a، کلروفیل کل و سطح برگ گردید که بیش‌ترین کاهش مربوط به تیمار ۲۰۰۰ میکرومولار کلریدروی بود.

نتیجه‌گیری: با توجه به یافته‌های پژوهش می‌توان از این گیاه در خاک‌های آلوده به فلز روی یا اراضی زیردست پسماندهای کارخانجات صنعتی جهت پالایش این فلز بهره گرفت.

واژه‌های کلیدی: گیاه پالایی، روی، تنش فیزیولوژیک، اسفناج، Iau Science.

مقدمه

محیط ضروری است. پاکسازی محیط با روش‌های مهندسی مرسوم بسیار پر هزینه و قابل اجرا در سطح کوچک است و بدین‌علت لزوم به‌کارگیری روش پالایشی مناسب احساس می‌شود. لازم است ذکر شود که برخی از فلزات سنگین در غلظت‌های پایین برای گیاهان مواد غذایی محسوب می‌شوند لیکن تمام فلزات سنگین در غلظت‌های بالا برای گیاهان سمیت ایجاد می‌نمایند. عنصر روی ب‌عنوان یکی از ریز مغذی‌های ضروری در گیاهان است که برای رشد و توسعه گیاه لازم و ضروری است. با این وجود زمانی که به‌صورت مازاد در بافت‌های گیاهی وجود دارد برای سلول‌های گیاهی به‌شدت سمی است (۱).

هنگامی که روی در غلظت‌های بالا در سیستم‌های آبی (دریاچه‌ها، تالاب‌ها، جریان‌های آبی و غیره) وجود داشته باشد مشکلات محیطی عدیده‌ای را نظیر کاهش نمو گیاهی، آلودگی آب‌های زیرزمینی و مسمومیت فلزی در زنجیره

آلودگی خاک‌ها به فلزات سنگین از مهم‌ترین موضوعات و مباحث چالش برانگیز در جهان امروز است. فرآیندهایی طبیعی مانند خاک‌سازی و هوازدگی سنگ بستر باعث افزایش تدریجی غلظت عناصر مختلف در خاک می‌گردد. بشر با فعالیت‌های صنعتی بی‌رویه و بدون رعایت موازین زیست‌محیطی منجر به آلودگی محیط زیست به انواع مختلف فلزات سنگین، مواد رادیو اکتیو، مواد شیمیایی و مواد آلی مختلف گردیده‌است و لزوم پاکسازی محیط از این آلودگی‌ها به‌منظور بهره‌برداری پایدار و طولانی مدت از

نویسنده مسئول:

گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.

پست الکترونیکی: a.kamari63@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۲/۲۶

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۰/۱۳

دارد از جمله رایج ترین آن‌ها می‌توان به روش‌های مهندسی مانند تصفیه پساب‌های صنعتی و روش‌های زیستی مانند زیست‌پالایی میکروبی اشاره کرد. لیکن از این بین روش‌های مهندسی بسیار دشوار بوده و موجب آلودگی بخش دیگری از محیط زیست می‌گردد و همچنین این روش‌ها از لحاظ اقتصادی هم مقرون به صرفه نیستند (۳).

در فن‌آوری استفاده از گیاهان به‌عنوان گیاه پالایی، از گیاهان سبز و ارتباط آن‌ها با میکروارگانیسم‌های خاک برای کاهش آلودگی خاک و آب‌های زیرزمینی استفاده می‌شود. این فن‌آوری می‌تواند برای رفع هر دو نوع آلاینده آلی و معدنی به‌کار رود که این تکنولوژی شیوه‌ای مناسب جهت از بین بردن فلزات سمی خاک بوده و به‌دلیل مقرون‌به‌صرفه بودن و مناسب بودن از نظر محیط زیست بسیار قابل توجه است (۴).

برخی گیاهان دارای توانایی رشد در محیط‌های آلوده به روی و قابلیت انتقال زیاد آن رابه بخش‌های هوایی را دارند در نتیجه در فرآیند گیاه‌پالایی بسیار مؤثرند که به بیش انباشتگرهای روی معروفند. این گیاهان دارای توانایی تجمع روی به میزان ۱۰۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن خشک در بخش‌های هوایی‌شان است که این امر توانایی خاصی به گیاه در جذب و انتقال فلزات و ذخیره آن‌ها در اندام‌های هوایی می‌دهد (۵). به‌نظر می‌رسد بین گیاهان از نظر مقاومت به فلزات سنگین موجود در محیط کشت تفاوت وجود داشته باشد. لذا شناسایی گیاهانی که بتوانند به‌عنوان گیاه پالاینده در جمع‌آوری این فلزات نقش داشته باشد حائز اهمیت است. در مقایسه با روش‌های اصلاح فیزیکی و شیمیایی، پاکسازی خاک با گیاهان روشی مقرون‌به‌صرفه و دوست‌دار محیط زیست است. لذا هدف از بررسی انجام شده ارزیابی اثر عنصر روی بر فرآیند تنش فیزیولوژیک گیاه اسفناج به‌عنوان یکی از گیاهان مطرح شده در زمینه گیاه پالایی است تا راهگشای استفاده از این گیاه در خاک‌های آلوده به این فلزات باشد.

مواد و روش‌ها

به‌منظور بررسی اثر عنصر روی موجود در محیط کشت گیاه بر رشد و نمو و برخی ویژگی‌های فیزیولوژیک اسفناج آزمایشی در قالب طرح به‌طور کامل تصادفی با سه تکرار انجام شد.

بذور مورد استفاده برای پژوهش حاضر از شرکت پاکان بذر اصفهان خریداری گردید. برای ضدعفونی بذور از هیپوکلرید

غذایی سبب می‌شود (۲). از طرفی روی می‌تواند فعالیت‌های خاک را مختل کند و سبب تغییر در بافت خاک شود زیرا بر فعالیت‌های میکروارگانیسم‌ها و کرم‌های خاکی اثرات منفی دارد و به‌همین دلیل تجزیه مواد آلی به‌شدت کند می‌شود. روی به‌طور عمده به فرم دو ظرفیتی از محلول خاک جذب می‌شود که این جذب یا به صورت فرآیند پخشیدگی از طریق غشاهای مخصوص صورت می‌گیرد و یا از طریق ناقل‌های ویژه‌ای امکان‌پذیر می‌شود (۳).

در روش گیاه پالایی، گیاهان بر اساس مکانیسم جذب طبقه‌بندی و آلودگی خاک به فلزات سنگین به کمک روش‌های شیمیایی، فیزیکی و بیولوژیکی کاهش داده می‌شود. بر اساس تحقیقات دفتر بررسی آلودگی آب و خاک سازمان حفاظت محیط زیست، رفع آلودگی خاک به‌طور معمول با دو روش خارج از محل و در محل صورت می‌گیرد. در روش خارج از محل، خاک آلوده به مکان دیگری انتقال یافته و پس از رفع آلودگی به مکان اولیه برگردانده می‌شود. در روش دیگر که نیاز به جابه‌جایی و انتقال ندارد آلاینده‌ها با آلی شدن، از قابلیت جذب زیستی آن‌ها کاسته می‌شود.

برای کاهش آلودگی آلاینده‌های معدنی در خاک می‌توان از روش‌های آلی کردن، کمپلکس کردن و افزایش خاک به وسیله آهک استفاده کرد اما بیش‌تر این روش‌ها گران بوده و سبب تخریب محیط زیست می‌شوند. در فناوری استفاده از گیاهان با عنوان گیاه پالایی، از گیاهان سبز و ارتباط آن‌ها با میکروارگانیسم‌های خاک برای کاهش آلودگی خاک و آب‌های زیرزمینی استفاده می‌شود. این فناوری می‌تواند برای رفع هر دو نوع آلاینده خاک یعنی معدنی و آلی به‌کار رود. بررسی‌ها نشان می‌دهد کاربرد تکنیک‌های فیزیکوشیمیایی، سبب از میان رفتن میکروارگانیسم‌های مفید خاک مانند تثبیت‌کننده‌های نیتروژن میکروریزا می‌شود که در نتیجه فعالیت‌های بیولوژیکی خاک را ضعیف می‌کند و در مقایسه با تکنیک گیاه پالایی، بسیار هزینه‌بر است.

روی جذب شده توسط ریشه از طریق اپیدرم، حلقه کاسپاری و سپس آندودرم ریشه حرکت کرده و پس از جذب، تشکیل پیوند داده و یا متابولیزه می‌شود و مواد شیمیایی یا متابولیت‌های حاصل از آن از اپیدرم عبور و پس از رسیدن به آوند چوبی از طریق جریان تعرق انتقال می‌یابد. روش‌های گوناگونی برای کاهش آلودگی آب و خاک وجود

با آب مقطر استریل سه بار آب کشتی شدند. در پژوهش حاضر از محیط کشت MS استفاده گردید و غلظت‌های مختلف روی (به صورت کلریدروی) (صفر، ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰ و ۲۰۰۰ میکرومولار در لیتر) به محیط کشت اضافه گردید. الزمه ذکر است که pH محیط کشت مورد استفاده در محدوده ۵/۶ تا ۵/۸ تنظیم گردید.

ضد عفونی محیط کشت به کمک دستگاه اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار یک اتمسفر به مدت ۲۰ دقیقه انجام دمای ۲۵ تا ۲۷ درجه سانتی‌گراد با تناوب روشنایی/ تاریکی ۸:۱۶ ساعت نگهداری شد. واکشت گیاهان هر ۲۰ روز یکبار در محیط MS حاوی تیمارهای مورد نظر انجام گرفت. بعد از رشد گیاهان صفات زیتوده ریشه و ساقه، میزان کلروفیل a, b و کل، میزان پرولین، کربوهیدرات، میزان انباشت روی در ریشه و ساقه اندازه‌گیری شد.

سنجش کلروفیل

برای این منظور مقدار ۰/۵ گرم از بافت تر بخش هوایی گیاه با ۵ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد خرد شد. مخلوط به دست آمده به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید و در نهایت، قسمت بالایی عصاره جدا و حجم آن به ۸ میلی‌لیتر رسانده شد. اندازه‌گیری کلروفیل با استفاده از روش اسپکتروفتومتری و در دو طول موج ۶۴۵ و ۶۶۳ انجام گرفت.

$$Chla. \left(\frac{mg}{g} \right) = [(12.7 \times A_{663}) - (2.69 \times A_{645})] \times \frac{V}{FW}$$

$$Chlb. \left(\frac{mg}{g} \right) = [(22.9 \times A_{645}) - (6.48 \times A_{633})] \times \frac{V}{FW}$$

$$Chltot. \left(\frac{mg}{g} \right) = [(20.2 \times A_{645}) - (8.02 \times A_{663})] \times \frac{V}{FW}$$

V = حجم محلول صاف شده (محلول فوقانی حاصل از سانتریفیوژ)

FW = وزن تر نمونه بر حسب گرم

A = جذب نور در طول موج های ۶۴۵ و ۶۶۳ نانومتر

سنجش زیتوده ریشه و ساقه

برای این منظور، پس از سپری شدن دوره تیمار، نمونه‌ها با دقت از ماسه شسته شده داخل گلدان‌ها، خارج شد. اندام‌های هوایی و ریشه را با دقت از هم جدا کرد و به‌طور کامل شستشو داده شد. جهت خشک کردن، گیاهان را به دور از رطوبت و نور در پاکت‌هایی در بسته، در داخل آون ۸۰

درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت نگهداری شدند تا به‌طور کامل خشک شوند. پس از خشک کردن نمونه‌ها، وزن خشک ریشه و اندام‌های هوایی نمونه‌ها بر حسب گرم با ترازوی آزمایشگاهی با دقت ۰/۰۰۱ گرم اندازه‌گیری و ثبت گردید.

سنجش هیدرات کربن

برای اندازه‌گیری هیدرات‌های کربن محلول از روش فنل - اسید سولفوریک استفاده شد. در این روش اکثر قندها شامل مونوساکاریدها، دی‌ساکاریدها، اولیگوساکاریدها قابل شناسایی هستند. اسید سولفوریک، دی‌ساکاریدها، اولیگوساکاریدها و پلی‌ساکاریدها را به واحدهای کوچک‌تر یعنی مونوساکارید می‌شکند. سپس پنتوزها یا قندهای پنج کربنه به فورفورال دهیدراته شده و هگزوزها یا قندهای شش کربنه به هیدروکسی متیل فورفورال دهیدراته می‌شوند. این ترکیب‌ها سپس با فنل واکنش داده و در اثر این واکنش، رنگ زرد طلائی حاصل می‌شود که این رنگ تا چند ساعت پایدار باقی می‌ماند. با خواندن جذب ترکیب رنگی هر نمونه در طول موج ۴۹۰ نانومتر می‌توان به مقدار قند محلول نمونه پی برد. به این منظور ۲ میلی‌لیتر از عصاره گیاهی استخراج شده را با ۵۰ میکرولیتر فنل ۸۰ درصد وزنی (حل شده در آب مقطر) مخلوط کرده و سپس ۵ میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ به‌صورت عمود بر سطح مایع به آن اضافه شد. این مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه در محیط نگهداری شده و پس از آن به مدت ۱۵ دقیقه در حمام آب گرم ۲۵ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و سپس جذب محلول در ۴۹۰ نانومتر خوانده شد (۷). سپس منحنی استاندارد با استفاده از گلوکز خالص رسم شده و مقدار قندهای محلول با کمک این نمودار در یک گرم بافت گیاهی به دست آمد.

سنجش پرولین

به منظور اندازه‌گیری پرولین ۰/۵ گرم از نمونه‌های تر برگ در ۱۰ میلی‌لیتر اسید سولفوسالیسیلیک ۳٪ به‌وسیله هاون هموژن شده و عصاره حاصل صاف گردید. به ۲ میلی‌لیتر از عصاره صاف شده فوق ۲ میلی‌لیتر اسیداستیک و ۲ میلی‌لیتر اسید ناین هیدرین (شامل: ۰/۰۵ گرم ناین هیدرین، ۱/۲ میلی‌لیتر اسیداستیک و ۰/۸ میلی‌لیتر اسید ارتوفسفریک ۶ مولار) اضافه شد. محلول حاصل به مدت یک ساعت در حمام آب و در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد، پس از آن برای پایان یافتن واکنش لوله‌های آزمایش در داخل یک بستر یخی قرار گرفتند و ۴ میلی‌لیتر

نتایج

تأثیر تیمار روی بر بیوماس اندام هوایی

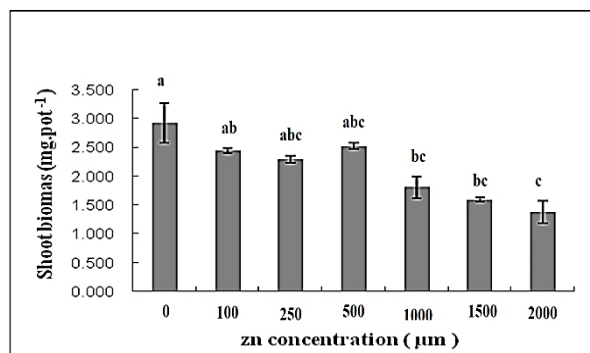
نتایج تجزیه واریانس در جدول ۱ نشان داد که اثر غلظت‌های مختلف روی بر بیوماس اندام هوایی در سطح ۵٪ معنی‌دار بود.

بیش‌ترین کاهش در تیمار ۲۰۰۰ میکرومولار و کم‌ترین کاهش در شاهد دیده شد. تغییرات بیوماس ساقه در تیمارهای شاهد، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰ و ۲۰۰۰ میکرومولار به- ترتیب ۲/۹۲، ۱/۸۱، ۱/۶۰ و ۱/۳۸ میلی‌گرم در هر گلدان مشاهده شد (شکل ۱). مقایسه میانگین‌ها به روش LSD در سطح احتمال ۵ درصد، نشان داد بین تیمار شاهد و تیمارهای ۱۰۰۰، ۱۵۰۰ و ۲۰۰۰ میکرومولار کلریدروی تفاوت معنی‌داری در وزن خشک ساقه اسفناج مشاهده شد (جدول ۲).

تولونن به هر لوله اضافه شد. غلظت پرولین نمونه‌ها در تولونن با استفاده از اسکپتروفوتومتر در طول موج ۵۲۰ نانومتر و در نهایت با توجه به منحنی استاندارد حاصل از غلظت‌های مختلف پرولین، میزان پرولین نمونه‌ها برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر محاسبه شد (۶).

سنجش سطح برگ

برای اندازه‌گیری با استفاده از دستگاه اندازه‌گیری سطح برگ (leaf area meter) بر حسب سانتی‌متر مربع انجام شده و سپس شاخص سطح برگ (LAI) با استفاده از روش واتسن (۸) محاسبه شد. آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS انجام شد. آنالیز واریانس بر روی داده‌های حاصل از اثر تیمارهای مختلف بر زیتوده بخش هوایی و ریشه‌ای، شاخص سطح برگ، میزان انواع کلروفیل‌ها، غلظت کل روی ریشه و ساقه، پرولین و کربوهیدرات هر کدام از نمونه‌ها انجام شد. هم-چنین به‌منظور پی بردن به معنی‌دار بودن یا نبودن تفاوت میانگین‌ها در تیمارهای مختلف، از آزمون LSD در سطح ۵ درصد استفاده شد. کلیه نمودارها با استفاده از نرم افزار Excel رسم شدند.



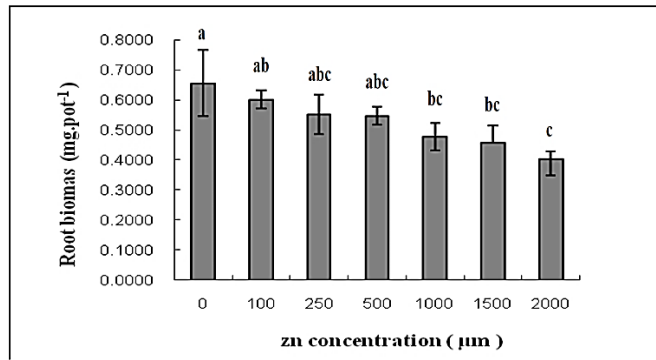
شکل ۱. اثر غلظت‌های مختلف کلریدروی بر بیوماس ساقه

کاهش مربوط به تیمار ۲۰۰۰ میکرومولار است و تأثیر این تنش بر بیوماس ریشه نسبت به بیوماس ساقه بیش‌تر بوده است. زیرا نتیجه تجزیه واریانس برای بیوماس ریشه گیاه اسفناج در سطح ۱ درصد معنی‌دار است ($P < 0.1$), در صورتی که نتایج تجزیه واریانس برای بیوماس ساقه گیاه اسفناج در سطح ۵ درصد معنی‌دار شده است ($P < 0.05$) (جدول ۱).

تأثیر تیمار روی بر بیوماس ریشه

نتایج تجزیه واریانس در جدول ۱ نشان داد که اثر غلظت‌های مختلف روی بر بیوماس ریشه در سطح ۱ درصد معنی‌دار است.

نتایج بیانگر این مطلب است که بیوماس ریشه گیاه اسفناج در پاسخ به استرس روی کاهش می‌یابد که بیش‌ترین



شکل ۲. اثر غلظت‌های مختلف کلریدروی (۰ تا ۲۰۰۰ میکرومولار) بر بیوماس ریشه

۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ میکرومولار به ترتیب معادل ۱۶/۸، ۰۲/۲۴، ۱۶/۵۸، ۲۷/۱۶ و ۳۰/۳۶ درصد بود که میزان درصد کاهش تنها در تیمار ۱۰۰ میکرومولار نسبت به تیمار شاهد معنی‌دار نبود. تغییرات معنی‌دار بیوماس ریشه نسبت به تیمار شاهد در تیمارهای ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰ و ۲۰۰۰ میکرومولار به ترتیب ۰/۵۵، ۰/۵۴، ۰/۴۷، ۰/۴۵، ۰/۴۰ میلی‌گرم در هر گلدان بود در حالی که میزان بیوماس ریشه در تیمار شاهد ۰/۶۵ میلی‌گرم در هر گلدان بود (شکل ۲).

در مقایسه میانگین‌ها با روش LSD در سطح احتمال ۵ درصد، بین تیمار ۱۰۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ میکرومولار کلریدروی با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری وجود نداشت در حالی که بین تیمار شاهد و تیمارهای ۱۰۰۰، ۱۵۰۰ و ۲۰۰۰ میکرومولار کلریدروی اختلاف معنی‌داری در بیوماس ریشه اسفناج مشاهده شد (جدول ۲). کم‌ترین میزان زیتوده ریشه مربوط به تیمار ۲۰۰۰ میکرومولار روی با میزان کاهش ۳۸/۴۰ درصدی نسبت به شاهد، بود. تغییرات کاهشی وزن خشک ریشه نسبت به شاهد در تیمارهای ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰

جدول ۱. تجزیه واریانس تیمار غلظت‌های مختلف کلرید روی بر صفات اسفناج

S.O.V	منبع تغییرات	درجه آزادی df	بیوماس ریشه (mg.pot ⁻¹)	بیوماس ساقه (mg.pot ⁻¹)	سطح برگ (Cm ²)	a کلروفیل (mg.g ⁻¹ .fw)	b کلروفیل (mg.g ⁻¹ .fw)	کلروفیل کل (mg.g ⁻¹ .fw)	کربوهیدرات (mg/g.fw)	پروپین (µg.g ⁻¹ .D.W)
Treatment	تیمار	6	۰/۰۲۲۸۰**	۰/۸۵۱۲*	۱۳۸/۹۵۶*	۵۹۵۶/۰۳ ^{ns}	۷۷۶/۵۶ ^{ns}	۱۰۴۳۹/۵۶ ^{ns}	۱۲/۴۷۵ ^{ns}	۰/۲۸۹۷**
Error	خطای آزمایش	14	-	-	-	-	-	-	-	-
CV (%)	ضریب تغییرات	-	۱۱/۰۹	۲۴/۳۹	۲۲/۶۴	۱۱/۲۷	۶۲/۵۱	۱۲/۵۲	۱۸/۱۱	۲۲/۹۰

و ** به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪.

ns غیر معنی‌دار.

جدول ۲. جدول مقایسه میانگین صفات ارزیابی شده روی اسفناج

تیمار (µm)	بیوماس ریشه (mg.pot ⁻¹)	بیوماس ساقه (mg.pot ⁻¹)	سطح برگ (Cm ²)	a کلروفیل (mg.g ⁻¹ .fw)	b کلروفیل (mg.g ⁻¹ .fw)	کلروفیل کل (mg.g ⁻¹ .fw)	کربوهیدرات (mg/g.fw)	پروپین (µg.g ⁻¹ .D.W)
شاهد	۰/۶۵۵۳ ^a	۲/۹۲۳ ^a	۳۳/۴۲ ^a	۵۵۳/۷۸۷ ^{ab}	۱۵۹/۲۹ ^a	۷۱۳/۰۷ ^a	۱۲/۹۴ ^a	۰/۲۹۸ ^c
۱۰۰	۰/۶۰۱۳ ^{ab}	۲/۴۴۲ ^{ab}	۳۰/۷۲ ^{ab}	۵۶۱/۲۰ ^a	۱۵۴/۳۸۲ ^a	۷۱۵/۵۸ ^a	۱۳/۳۴ ^a	۰/۲۴۵ ^c
۲۵۰	۰/۵۵۰۳ ^{abc}	۲/۲۹۲ ^{abc}	۳۰/۵۵ ^{ab}	۵۱۰/۳۱۸ ^{ab}	۱۲۴/۹۲۴ ^a	۶۳۵/۲۴ ^{ab}	۱۳/۶۴ ^a	۰/۲۸۶ ^c
۵۰۰	۰/۵۴۶۷ ^{abc}	۲/۲۴۷ ^{abc}	۲۶/۶۴ ^{ab}	۵۳۹/۵۰ ^{ab}	۱۳۵/۵۷۵ ^a	۶۷۵/۰۷ ^{ab}	۱۳/۶۰ ^a	۰/۲۹۱ ^c
۱۰۰۰	۰/۴۷۷۳ ^{bc}	۱/۸۱۰ ^{bc}	۲۵/۶۰ ^{ab}	۵۰۹/۹۲۶ ^{ab}	۱۳۰/۰۱۵ ^a	۶۳۹/۹۴ ^{ab}	۱۰/۱۸ ^{ab}	۰/۲۴۱ ^c
۱۵۰۰	۰/۴۵۶۳ ^{bc}	۱/۵۹۸ ^{bc}	۲۱/۳۴ ^{bc}	۴۵۹/۸۳۱ ^{ab}	۱۲۶/۱۵۶ ^a	۵۸۵/۹۹ ^{ab}	۸/۴۸ ^b	۰/۶۵۶ ^b
۲۰۰۰	۰/۴۰۳۷ ^c	۱/۳۸۱ ^c	۱۳/۴۵ ^c	۴۴۶/۲۲۱ ^b	۱۱۵/۹۵ ^a	۵۶۲/۶۷ ^b	۱۰/۷۷ ^{ab}	۱/۰۶۴ ^a

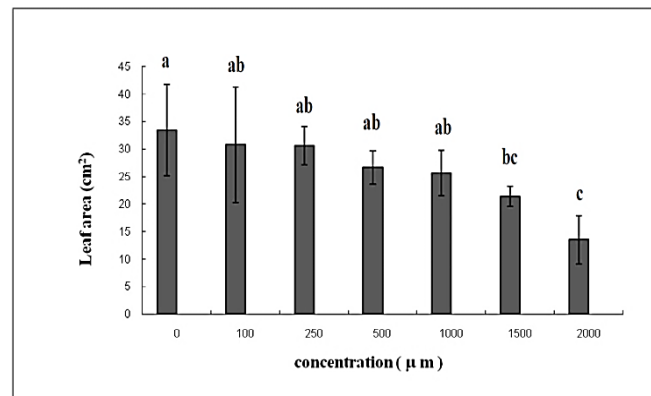
در هر ستون واجد یک حرف مشترک نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار است.

۱۵۰۰ میکرومولار و ۱۳/۴۵ سانتی-متر مربع در تیمار ۲۰۰۰ میکرومولار تقلیل یافت (شکل ۳). از طرفی تیمار ۲۰۰۰ میکرومولار تفاوت معنی داری با تیمارهای شاهد، ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار داشت، به عبارتی تیمار ۲۰۰۰ میکرومولار به غیر از تیمار ۱۵۰۰ میکرومولار، با سایر تیمارها از نظر شاخص سطح برگ تفاوت معنی داری داشت (جدول ۲).

سطح برگ

نتایج تجزیه واریانس در جدول ۱ نشان داد که اثر غلظت‌های مختلف روی بر شاخص سطح برگ در سطح ۵٪ معنی دار بود. مقایسه میانگین‌ها به روش LSD در سطح احتمال ۵٪ نشان داد با افزایش غلظت روی در محلول غذایی از سطح برگ گیاه اسفناج کاسته می‌شود به طوری که بیشترین کاهش، مربوط به تیمار ۲۰۰۰ میکرومولار و بیشترین سطح برگ مربوط به تیمار شاهد بود.

مقایسه میانگین‌ها به روش LSD با سطح احتمال ۵ درصد نشان داد بین تیمار شاهد با تیمارهای ۱۵۰۰ و ۲۰۰۰ میکرومولار کلریدروی تفاوت معنی داری در سطح برگ دیده شد (جدول ۲)، که میزان تغییرات در دو تیمار ۱۵۰۰ و ۲۰۰۰ میکرومولار، به ترتیب ۳۶/۱۳ و ۵۹/۷۶ درصد، کاهش نسبت به شاهد است که میزان سطح برگ در تیمار شاهد از ۳۳/۴۲ سانتی متر مربع به ۲۱/۳۴ سانتی متر مربع در تیمار

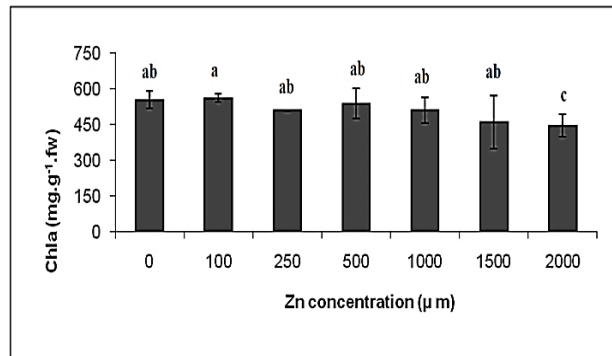


شکل ۳. تغییرات سطح برگ در غلظت‌های مختلف کلریدروی

تیمار ۱۰۰ میکرومولار است. به غیر از تیمار ۲۰۰۰ میکرومولار، سایر تیمارها تفاوت معنی داری نسبت به تیمار شاهد نشان ندادند، که درصد کاهش کلروفیل a تیمار ۲۰۰۰ میکرومولار نسبت به تیمار شاهد ۲۰/۶۷ درصد است. از طرفی بین تیمارهای ۲۰۰۰ و ۱۵۰۰ میکرومولار نیز با تیمار ۱۰۰ میکرومولار و شاهد اختلاف معنی داری از نظر میزان کلروفیل a دیده شد (جدول ۲).

میزان کلروفیل‌ها

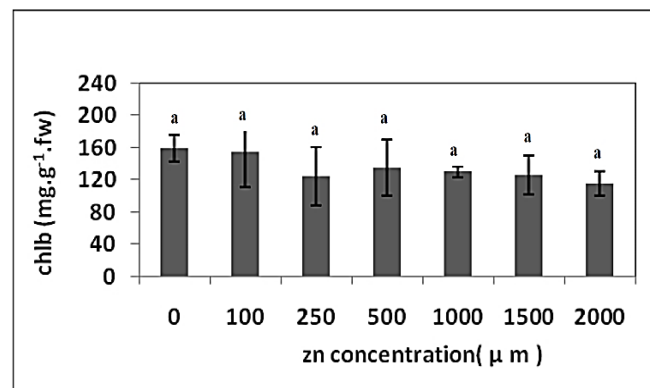
نتایج حاصل از آنالیز واریانس اثر روی بر میزان کلروفیل a، b و کلروفیل کل در سطح ۵ درصد نشان داده شد که استرس روی اثر معنی داری بر این پارامترها نداشته است (جدول ۱). مقایسه میانگین‌ها به روش LSD در سطح ۵٪ نشان داد، در گیاه تحت تنش فلز سنگین روی، چنان که در شکل ۴ مشخص است، در تیمار ۱۰۰ میکرومولار میزان کلروفیل a نسبت به نمونه شاهد اندکی افزایش غیر معنی دار (۱/۳۴ درصد) و در سایر تیمارها کاهش نشان می‌دهد. به طوری که بیشترین کاهش مربوط به تیمار ۲۰۰۰



شکل ۴. تغییرات میزان کلروفیل a در غلظت‌های مختلف کلریدروی

کاهش غیر معنی‌داری مواجه شد، به طوری که بیش‌ترین میزان کلروفیل b مربوط به تیمار شاهد و بیش‌ترین کاهش مربوط به تیمار ۲۰۰۰ میکرومولار بود (شکل ۵). مقایسه میانگین‌ها به روش LSD در سطح احتمال ۵٪ نشان داد، هیچ تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای مختلف کلریدروی از نظر کلروفیل b وجود ندارد. به عبارتی غلظت‌های مختلف این فلز سنگین تأثیر معنی‌داری بر محتوای کلروفیل b نداشت (جدول ۲).

تغییرات کلروفیل a در تیمارهای مختلف نسبت به شاهد به این صورت بود که با اعمال تیمار ۱۰۰ میکرومولار کلروفیل a به میزان ۱/۳۴ درصد افزایش یافت اما با افزایش غلظت روی دچار نقصان گردید به طوری که در تیمارهای ۲۵۰ میکرومولار، ۵۰۰ میکرومولار، ۱۰۰۰ میکرومولار، ۱۵۰۰ میکرومولار و ۲۰۰۰ میکرومولار، مقادیر کلروفیل a به ترتیب ۸/۲، ۳/۵، ۸/۱، ۱۷ و ۲۰/۷ درصد کاهش یافت (شکل ۴). ارزیابی کلروفیل b تحت تأثیر تیمارهای روی نشان داد که در تمامی تیمارها میزان کلروفیل b نسبت به تیمار شاهد، با



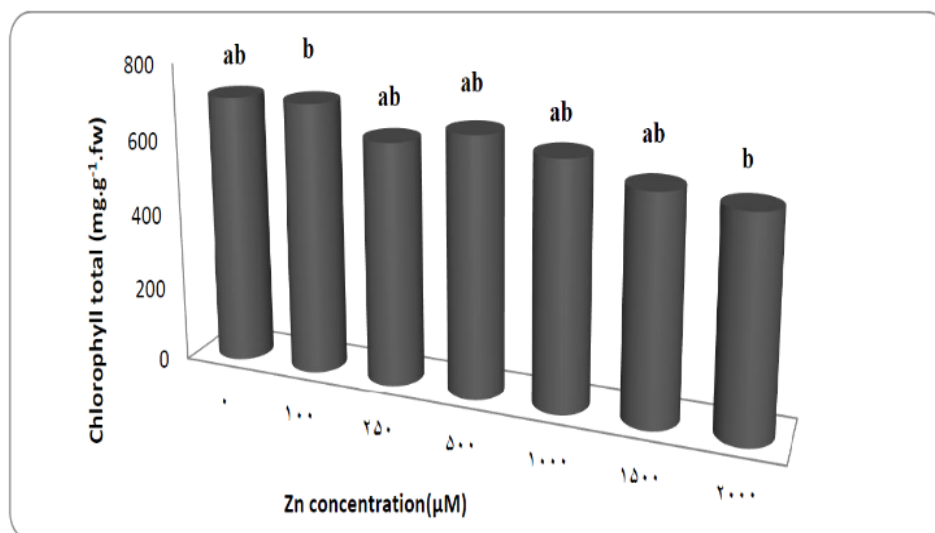
شکل ۵. تغییرات میزان کلروفیل b در غلظت‌های مختلف کلریدروی

معنی‌دار نیست (جدول ۲). با مقایسه تیمارها نسبت به شاهد مشاهده می‌شود که در تیمار ۱۰۰ میکرومولار، ۰/۳۵ درصد کلروفیل کل افزایش یافت و تیمارهای ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰ و ۲۰۰۰ میکرومولار کلریدروی به ترتیب کاهش ۱۰/۹۲، ۵/۳۲، ۱۰/۲۵، ۱۷/۱۲ و ۲۱/۱۰ درصدی کلروفیل کل در گیاه اسفناج را نشان دادند که تنها در تیمار ۲۰۰۰

مقایسه میانگین‌ها به روش LSD با سطح احتمال ۵٪ نشان داد که با افزایش غلظت روی در محیط از میزان کلروفیل (a+b) کاسته می‌شود، که بیش‌ترین کاهش مربوط به تیمار ۲۰۰۰ میکرومولار است و تنها در تیمار ۲۰۰۰ میکرومولار در مقایسه با نمونه شاهد این کاهش معنی‌دار شده است. یعنی در تیمارهای ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰ و ۲۰۰۰ میکرومولار کلریدروی، کاهش معنی‌داری در کلروفیل (a+b) مشاهده نشد.

و کل در تیمارهای مختلف روی برگیه اسفناج نشان دهنده تأثیرپذیری بیش تر کلروفیل a نسبت به سایر کلروفیل ها بود.

(شکل ۶). به عبارتی افزایش غلظت روی تا ۱۵۰۰ میکرومولار، تأثیر معنی داری بر میزان کلروفیل کل گیاه اسفناج ندارد. مقایسه بین تغییرات میزان کلروفیل های a, b

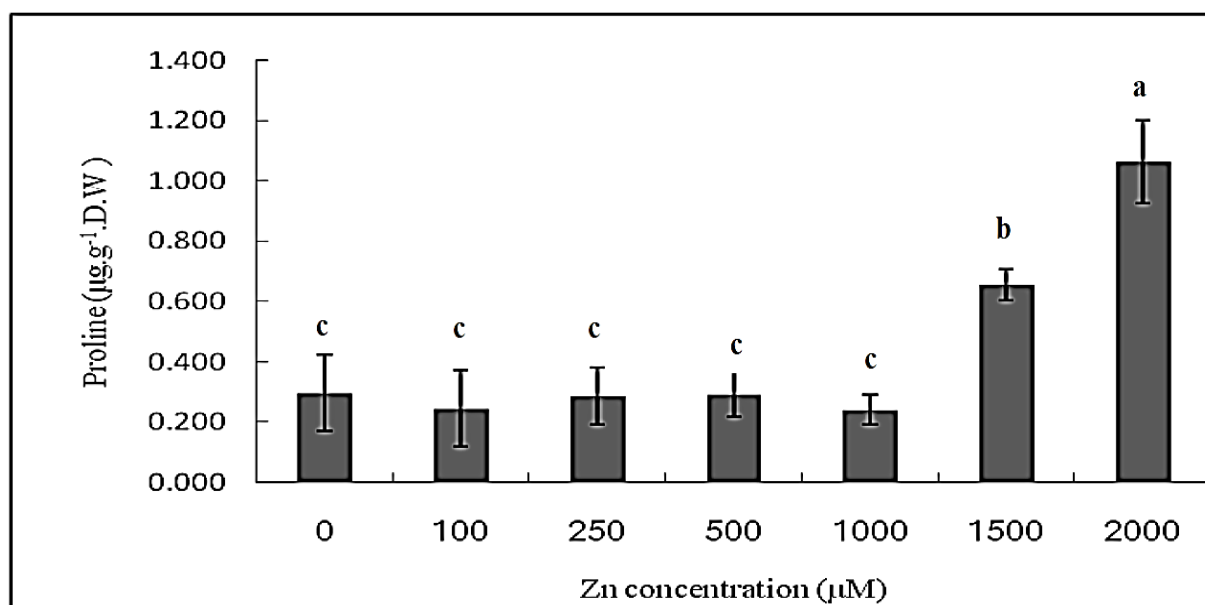


شکل ۶. تغییرات میزان کلروفیل (a + b) در غلظت های مختلف کلریدروی

تغییرات میزان پرولین در گیاه اسفناج تحت تأثیر غلظت- های مختلف روی در سطح احتمال ۱ درصد معنی دار شده است ($p < 0.01$)، (جدول ۱).

پرولین

پرولین آمینو اسید خاصی است که در گروه ایمینوسیدها قرار دارد، به عنوان یکی از راهبردهای دفاعی گیاهان در شرایط تنش تولید می شود. مطابق با جدول آنالیز واریانس

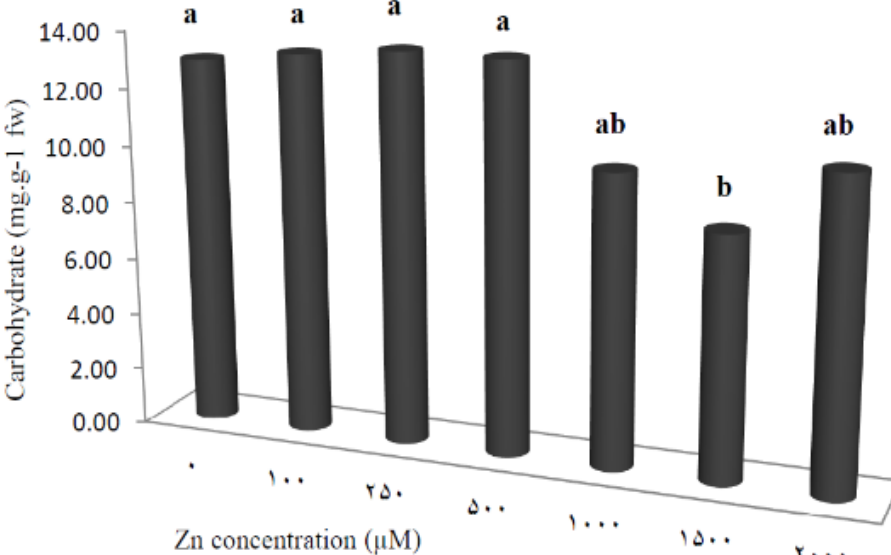


شکل ۷. اثر غلظت های مختلف روی (۰ تا ۲۰۰۰ میکرومولار) بر میزان پرولین در بخش هوایی .

مقایسه میانگین‌ها به روش در سطح احتمال ۵٪ گویای آن بود که میزان پرولین تجمع یافته در بوته‌های اسفناج تا سطح تیمار ۱۰۰۰ میکرومولار تفاوت معنی‌داری با شاهد نداشت در حالی‌که تیمارهای ۱۵۰۰ و ۲۰۰۰ میکرومولار نسبت به بقیه تیمارها روند افزایش معنی‌دار نشان دادند (جدول ۲). به‌طوری‌که بیش‌ترین میزان پرولین، مربوط به گیاهان تحت تیمار ۲۰۰۰ میکرومولار بود، که این افزایش، ۲/۵۷ برابر تیمار شاهد بود و افزایش پرولین در تیمار ۱۵۰۰ میکرومولار، ۱/۲ برابر تیمار شاهد بود. مطابق مقایسه میانگین‌ها میزان پرولین تجمع یافته در تیمار ۲۰۰۰ میکرومولار نسبت تیمار ۱۵۰۰ میکرومولار روند افزایش نشان داد که این روند افزایش، معنی‌دار بود. به گونه‌ای که میزان افزایش پرولین در تیمار ۲۰۰۰ میکرومولار نسبت به تیمار ۱۵۰۰ میکرومولار، ۱/۳۷ برابر بود. تغییرات معنی‌دار میزان پرولین در تیمارهای ۱۵۰۰ و ۲۰۰۰ میکرومولار به- ترتیب ۰/۶۵ و ۱/۰۶ میکروگرم بر گرم وزن خشک بود در صورتی‌که میزان پرولین در تیمار شاهد ۰/۳ میکروگرم بر گرم وزن خشک بود (شکل ۷).

کربوهیدرات

با توجه به نتایج جدول تجزیه واریانس (جدول ۱)، میزان قندهای محلول تحت اثر غلظت‌های مختلف روی در گیاه



شکل ۸. میزان قندهای محلول در غلظت‌های مختلف کلریدروی

اسفناج در سطح ۵٪ معنی‌دار نیست. بررسی میانگین‌ها به روش LSD در سطح احتمال ۵٪ نشان داد که افزایش غلظت کلریدروی تا تیمار ۵۰۰ میکرومولار در محیط غذایی گیاه اسفناج، میزان قند محلول درون گیاه افزایش می‌یابد، که میزان افزایش نسبت به شاهد در تیمارهای ۱۰۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ میکرومولار به ترتیب معادل ۳/۰۱، ۵/۴۶ و ۵/۱۳ درصد بود هرچند که این افزایش معنی‌دار نبود (جدول ۲). در صورتی‌که از تیمار ۱۰۰۰ میکرومولار تا ۲۰۰۰ میکرومولار، غلظت قند محلول درون گیاه کاهش یافت که بیش‌ترین کاهش مربوط به تیمار ۱۵۰۰ میکرومولار بود و بین تیمار ۱۵۰۰ میکرومولار کلریدروی با نمونه شاهد کاهش معنی-داری ملاحظه گردید (۳۴/۴۱ درصد) و تیمارهای ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میکرومولار با نمونه شاهد از جنبه محتوای قند محلول درون گیاه تفاوت معنی‌داری نداشتند هر چند که تغییرات کربوهیدرات محلول نسبت به نمونه شاهد در تیمار ۱۰۰۰ میکرومولار، ۲۱/۳۲ درصد و در تیمار ۲۰۰۰ میکرومولار معادل ۱۶/۷۱ درصد کم‌تر بود (شکل ۸).

بحث

توسعه سریع تکنولوژی‌های جدید، همراه با یکسری مشکلات محیطی از جمله آلودگی خاک، آب و هوا است. آلوده شدن خاک بوسیله فلزات سنگین ساختار و تنوع زیستی خاک را بهم می‌زند. گیاه پالایی از روش‌های نوین در پاکسازی خاک از فلزات سنگین است. گیاه پالایی از جمله روش‌های پیشنهادی است که با انباشت عناصر سنگین در اندام هوایی گیاهان، خروج این عناصر از خاک‌های آلوده را امکان‌پذیر می‌کند. براساس نتایج به‌دست آمده از این تحقیق میزان کلروفیل a، کل و پارامترهای رشد مانند بیوماس ریشه، بیوماس ساقه و شاخص سطح برگ در گیاه اسفناج، با افزایش غلظت روی کاهش یافت که در غلظت‌های بالای روی (۲۰۰۰ تا ۱۰۰۰ تا میکرومولار) این شاخص‌ها در قیاس با تیمار شاهد کاهش معنی‌داری نشان داد. در صورتی‌که افزایش غلظت روی تأثیر معنی‌داری بر میزان کلروفیل b نداشته است. از نظر بیوماس ریشه به غیر از تیمار ۱۰۰ میکرومولار سایر تیمارها با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری دارد. میزان کربوهیدرات گیاه اسفناج تا تیمار ۵۰۰ میکرومولار غلظت روی اندکی افزایش نشان داد، اما از تیمار ۵۰۰ تا ۲۰۰۰ میکرومولار میزان این پارامتر با کاهش مواجه شد که در غلظت ۱۵۰۰ میکرومولار این کاهش معنی‌دار بود (۱۰). وجود عنصر روی در سیتوزول سلول‌های اندام‌های هوایی گیاه می‌تواند باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های تجزیه‌کننده قندهای غیر محلول و اسید اینورتاز و سوکروز سنتتاز می‌شود در نتیجه در غلظت‌های پایین روی بر مقدار قندهای محلول اضافه شده است ولی علت کاهش در غلظت‌های بالاتر به احتمال به دلیل کاهش فتوسنتز یا تحریک سرعت تنفس است. کاهش کلروفیل در شرایط تنش فلزات سنگین، تغییر مسیر متابولیسمی به سمت تولید پرولین است زیرا گلوتامات که پیش‌ساز سنتز کلروفیل و پرولین است به سمت تولید پرولین می‌رود (۱۱). با افزایش غلظت روی در محیط انباشت روی در ریشه و ساقه اسفناج افزایش معنی‌داری نشان داد، بیش‌ترین انباشت مربوط به تیمار ۲۰۰۰ میکرومولار بود که در ریشه ۳۵۵/۴۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم و در ساقه به میزان ۳۲۴/۰۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم بود. غلظت‌های بالای روی در محلول غذایی موجب کاهش بیوماس ریشه و ساقه در گیاهانی از قبیل گندم *Triticum aestivum* L. (۱۲) و گیاه نعنای سبز خوراکی *Menthaspicata* L. (۱۳) می‌شود، که در توافق نتایج به‌دست آمده از این تحقیق، (غلظت بالای روی سبب کاهش

بیوماس ریشه و ساقه در گیاه اسفناج) هستند. همچنین نتایج حاصل از این تحقیق، با نتایج An و همکاران (۱۴)، هم‌زمان با غلظت بالای روی ($Zn > 1000 \text{ mg/kg}$) در گیاه *Pteris vittata* L. بیوماس کل و بیوماس بخش هوایی کاهش می‌یابد، همسو است.

در بررسی اثر فلزروی بر *Menthaspicata* L. (۱۵)، کاهش میزان سطح برگ در گیاهان تیمار شده با غلظت‌های بالای روی، به دلیل تجمع فلز در برگ، با یافته‌های ما مطابقت دارد. کاهش معنی‌دار سطح برگ در اثر تیمارهای مس-کلرید، در دو رقم کلزا (*Brassica napus* L.) (۱۶) گزارش شده است، که با یافته‌های ما مطابقت دارد. Malea و همکاران (۱۷) نیز با مطالعه اثر روی بر گیاه *Halophylastipulecea*، به این نتیجه رسیدند که این فلز در غلظت بالا موجب مهار رشد سطحی برگ‌ها در این گیاه می‌شود. که با نتایج ما همسویی دارد. در بررسی اثر روی و کادمیوم بر چغندر لبویی، کاهش عملکرد گیاه ناشی از کادمیوم زیاد در محیط رشد چغندر لبویی و جذب آن توسط چغندر لبویی، که باعث کاهش تعداد برگ‌ها، کاهش سطح برگ‌ها و کاهش فتوسنتز خالص می‌شود (۱۸)، کاهش سطح برگ در مطالعه اثر غلظت‌های مختلف سرب بر گیاه بادمجان (*Solanum melongena* L.) (۱۹) که با یافته‌های حاصل از این پژوهش همسو هستند. فلز روی از طریق تأثیر بر میزان جذب و جابه‌جایی عناصر ضروری و نیز اثر بر میزان فعالیت برخی از آنزیم‌ها در جایگاه عملکردشان موجب اختلال در متابولیسم گیاهان می‌شود. دستگاه فتوسنتزی در دو بخش فتوشیمیایی و تثبیت کربن در مقابل فلزات سنگین آسیب‌پذیر است. در مورد بخش نوری فتوسیستم II نسبت به فتوسیستم I آسیب‌پذیرتر است. مکانیسم اثر تخریبی فلزروی بر دستگاه فتوسنتزی به صورت جانشینی فلزسنگین در ساختار کلروفیل است که به صورت Zn-Chls در می‌آید (۲۰). کاهش کلروفیل و فعالیت فتوسنتزی در پژوهش سمیت و دفع فلزات سنگین (کادمیوم، مس و روی) در گیاه *Lemnagibba* تحت تنش کادمیوم، مس و روی، با یافته‌های حاصل از این تحقیق مطابقت دارد. افزایش میزان پرولین در پژوهش اثر کادمیوم بر گیاه *Eucalyptus occidentalis* (۲۱) و افزایش پرولین در پژوهش سمیت و دفع فلزات سنگین (کادمیوم، مس و روی) توسط *Lemnagibba* تحت تنش کادمیوم، مس و روی با نتایج تحقیق ما همسو است.

نتیجه گیری

به طور کلی با توجه به این که گیاه اسفناج از نظر شاخص های رشد، کلروفیل a، کلروفیل کل، کربوهیدرات و سطح برگ نسبت به غلظت های پایین روی از خود مقاومت نشان می دهد و از طرفی با افزایش پرولین به عنوان یک مکانیسم مقاومتی، در دسته گیاهان بردبار در برابر تنش فلزات سنگین قرار می گیرد. چنین به نظر می رسد که می توان از این گیاه در خاک های آلوده به فلز روی یا اراضی زیر دست پسماندهای کارخانجات صنعتی جهت پالایش این فلز بهره گرفت

1. An, Z.Z., Huang, Z.H., Lei, M., Liao, X.Y., Zheng, Y.M., Chen, T.B., 2006, Zinc tolerance and accumulation in *Pteris vittata* L. and its potential for phytoremediation of Zn- and As-contaminated soil, *Chemosphere*, 62, 796-802.
2. Amouei AI, Mahvi AH, Naddafi K. Effect on heavy metals Pb, Cd and Zn availability in soils by amendments. *J Babol University of Medical Sciences*, 2006; 7: 26-31.
3. Bates, I. S., R. P. Waldern, & I. D. Teare. 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil*. 39:205-207
4. Candan, N., Tarhan, L., 2003, Change in chlorophyll-carotenoid contents, antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation levels in Zn-stressed *Menthapulegium*, *Turkish Journal of Chemistry*, 27, 21-30.
5. Behtash, F., Tabatabai, S.J., Malakouti, M.J., Sarvaruddin, M.H., Ostan, Sh., 2010, The effect of zinc and cadmium on growth, chlorophyll content, photosynthesis and cadmium concentration in beet Laboei, *Journal of Soil Research (Soil and Water Sciences)*, Volume 24, Number 1, Pages 41-31.
6. Pirooz, PS, Manouchehri-Kalantari, Kh., Nasibi, F., 2011, Physiological study of sunflower under chromium stress: Effect on growth, accumulation and induction of oxidative stress in sunflower root (*Helianthus annuus*), *Journal of Biology Plant Biology*, Fourth Year, Issue 11, pp. 86-73.
7. Tavakoli, M., Chehrgani Rad, A.K., Larizizdi, H., Pakdel, A., 2011, Study of the effect of different concentrations of lead and salicylic acid on some growth indices of eggplant (*Solanum melongena* L., *Journal of Plant Biology*, Year 3, Issue 7, Pages 40-29.
8. Rezvani, M., Nour Mohammadi, Q., Zafarian, F., 2005, Purification of soil, groundwater and air pollutants by plants (Phytoremediation), *Special Issue of Agricultural Sciences*, Eleventh Year, No. 1, Page 24-7.
9. Zaredeh Abadi, S., Asrar, Z., Mehrabani, M., 2010, Biochemical changes in the amount of terpenoids in the essential oil of Mint (*Menthaspicata* L.) in response to the treatment of excess zinc (Zn), *Journal Plant Biology of Iran*, Year 2, Issue 1, Series 3, Pages 34-25.
10. Zaredeh Abadi, S., Asrar, Z., 2008, The effect of excess zinc on the accumulation of some essential elements and antioxidant responses of the medicinal plant Mint (*Menthaspicata* L.), *Quarterly Journal of Research Iranian Medicinal and Aromatic Plants*, Volume 24, Number 4, Pages 540-530.
11. Shariat, A., Extract, M.H., Qamari-Zare, A., 2010, The effect of cadmium on some physiological parameters in *Eucalyptus accidentalis*, *Journal of Agricultural Science and Technology and Natural Resources, Soil and Water Sciences*, Fourteenth year, No. 53, pp. 153-145.
12. Ghorbanli, M., Miqani, F., Asadollahi, B., 2007, The effect of muscloride stress on chlorophyll concentration, carbohydrate accumulation and some growth indices in two cultivars of rapeseed (*Brassica napus* L.), *Journal of Agriculture and Horticulture*, No. 76, pp. 141-134.
13. Larizizdi, H., Ghorbanli, M., Mirzaei, M., Hashemi, AR, 2011, Investigation of the effect of different concentrations of lead on proline, soluble sugars, starch and the activity of catalase antioxidant enzymes And peroxidase in wheat plant *Triticumaestivum* L. Pishtaz cultivar, the first national conference on new topics in agriculture, Saveh Azad University, pp. 5-1.
14. Dubois M, Gilles K, Hamilton J, Rebers P, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem*. 1956; 28(3):350-356.
15. Khellaf, N., Zerdaoui, M., 2009, Phytoaccumulation of zinc by an aquatic plant, *Lemnagibba* L., *Bioresource Technology*, 100, 6137-6140

16. Li, T.Q., Yang, X.E., Yang, J.Y., HE, Z.L., 2006, Zn Accumulation and Subcellular Distribution in the Zn Hyperaccumulator *Sedum alfredii* Hance, *Pedosphere*, 16, 5, 616-623.
17. Megateli, S., Semsari, S., Couderchet, M., 2009, Toxicity and removal of heavy metals (cadmium, copper and zinc) by *Lemnagibba*, *Ecotoxicology and Environmental*, 72, 1774-1780.
18. Mishra, V.K., Tripathi, B.D., 2009, Accumulation of chromium and zinc from aqueous solutions using water hyacinth (*Eichhorniacrassipes*), *Journal of Hazardous Materials*, 164, 1059-1063.
19. Prasad, M.N.V., Freitas, H., 2003, Metal hyperaccumulation in plants-Biodiversity prospecting for phytoremediation technology, *Electronic J. Biotechnol*, 6, 275-321.
20. Prasad, M., Strzalka,....., 1999, Impact of heavy metals of phytosynthesis, *Journal Exp. Bot.*, 41, 314-320.
21. Watson, D.J., (1952). The physiological basis of varieties in yield. *Adv Agron.*, 4:101-145.