ارزیابی اثر غلظت‌های مختلف Cr^{3+} در حضور کود دامی بر فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و انباشت اسمولیت‌های سازگار در ریحان

جمیله باردل[1*]، علیرضا سیروس‌مهر[2]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱/۲۹ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۱/۷)

چکیده

به‌منظور مطالعه فعالیت برخی آنزیم‌های ضداکسنده و تجمع اسمولیت‌های سازگار تحت تأثیر غلظت‌های مختلف تنش اکسیداتیو ناشی از کروم (Cr^{3+}) سه ظرفیتی (صفر، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک) توأم با سطوح مختلف کود دامی (صفر، ۱۰ و ۲۰ تن در هکتار) در گیاه ریحان سبز، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با چهار تکرار در سال ۱۳۹۱ در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه زابل انجام گرفت. بر اساس نتایج، با افزایش سطح کروم از صفر تا ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، در تیمار ۲۰ تن در هکتار کود دامی در مقایسه با عدم کود، فعالیت آنزیم‌های کاتالاز (CAT)، آسکوربات پراکسیداز (APX)، گلوتاتیون پراکسیداز (GPX) برگ به ترتیب از ۰/۰۰۸، ۰/۵۳۷ و ۰/۰۸۱ به ۰/۰۰۶، ۰/۳۰۵ و ۰/۰۷۱ میکرومول پراکسید هیدروژن در یک میلی‌گرم پروتئین کاهش یافت که می‌تواند ناشی از بهبود فعالیت‌های فیزیولوژیک انجام شده توسط گیاه در حضور ترکیبات آلی باشد. به‌نظر می‌رسد که مقادیر مختلف کود دامی استفاده شده، از طریق فراهمی عناصر غذایی کم‌نیاز و پرنیاز، بخصوص نیتروژن، در شرایط وجود مقادیر متفاوتی از فلز سنگین کروم در محیط رشد، منجر به افزایش محتوای پرولین و هیدرات‌های کربن برگ گردید. سنجش ضرایب همبستگی مبین رابطه مثبت و معنی‌دار میان اکثر صفات فیزیولوژیک بوده، و بزرگترین ضریب همبستگی (۰/۸۴) بین پرولین و هیدرات‌های کربن محلول به‌دست آمد. به‌نظر می‌رسد ترکیبات آلی نظیر کود دامی دارای پتانسیل قابل توجهی در کاهش آثار سوء فلز کروم و بهبود شاخص‌های فیزیولوژیک گیاه ریحان تحت این شرایط بوده است.

واژه‌های کلیدی: شاخص‌های فیزیولوژیک، فلزات سنگین، کود آلی

مقدمه

فلزات سنگین عناصر طبیعی هستند که در مناطق مختلف زمین، با توجه به نوع سنگ مادری، در غلظت‌های مختلف یافت می‌شوند. به‌عنوان مثال، نیکل، کروم و کبالت در خاک‌های سرپنتین فراوان هستند. از طرف دیگر، فلزات سنگین به‌وسیله انواع مختلف فعالیت‌های انسانی مانند عملیات کشاورزی و صنعتی نیز به محیط اضافه می‌شوند. نتایج این فعالیت‌ها منجر به تولید پساب‌ها و فاضلاب‌هایی می‌شود که فلزات سنگین را به‌وسیله آب، هوا و رسوبات به محیط منتقل می‌کنند (۵).

کروم (Cr) به‌عنوان هفتمین عنصر فراوان کره زمین، در محیط به شکل‌های مختلف اکسید شده است. اما پایدارترین شکل‌های آن کروم با ظرفیت‌های III و VI است (۷). جذب و اثر سمی کروم در گیاهان با توجه به فرم شیمیایی آن متفاوت است. کروم VI بسیار سمی بوده و به‌عنوان یک عامل سرطان‌زا برای انسان و حیوان تلقی می‌شود. در مقابل، کروم III تحرک کمتری دارد، سمی بوده و اساساً با ماده آلی خاک و محیط‌های

۱. گروه باغبانی، دانشگاه زابل

۲. گروه زراعت، دانشگاه زابل

*: مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: jamileh.bardel@yahoo.com

آب پیوند برقرار می‌کند (۹). اگرچه بیان شده که غلظت‌های کم کروم می‌تواند رشد گیاهان را افزایش دهد (۲۳)، اما سمیت کروم در غلظت‌های نسبتاً زیاد می‌تواند در فعالیت‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیک گیاه اختلال ایجاد کند. یک پاسخ به تنش کروم توسط گیاه، تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن است که ترکیباتی سمی هستند (۱۳). گونه‌های اکسیژن واکنشگر نیز توسط سیستم‌های آنتی‌اکسیدان آنزیمی و غیرآنزیمی کنترل می‌شوند. سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی شامل متابولیت‌هایی نظیر گلوتاتیون، اسید آسکوربیک، آلفاتوکوفرول، فلاونوئیدها و آنزیم‌های پاک‌کننده اکسیژن واکنشگر مانند پراکسیداز و کاتالاز هستند (۲۷). تنش اکسیداتیو از نتایج مهم گیاهان در معرض کروم است. بدین ترتیب، از جمله پاسخ‌های عمومی گیاهان در معرض فلزات سنگین تغییر در سطح پروتئین‌ها، فعالیت آنزیم‌های ضداکسنده و ترکیبات سازگارکننده است (۱ و ۱۴).

از مهم‌ترین اسمولیت‌های سهیم در تنظیم اسمزی برای غلبه بر آثار سوء بسیاری از تنش‌ها، از جمله فلزات سنگین، پرولین و هیدرات‌های کربن محلول است (۲ و ۱۵). این ترکیبات دارای وزن ملکولی کم و حلالیت زیاد بوده و در غلظت‌های زیاد سلول‌ها را در برابر تنش‌ها از طریق تنظیم اسمزی، سمیت‌زدایی رادیکال‌های آزاد اکسیژن، حفظ تمامیت غشا و ثبات آنزیم‌های پروتئینی محافظت می‌کنند (۱۲). نتایج تحقیقات بیشه‌کلایی و همکاران (۱) نشان داد که تنش کروم در شرایط هیدروپونیک در گیاه ریحان، در غلظت‌های بیش از ۴ میلی‌گرم بر لیتر، فعالیت آسکوربات پراکسیداز را در مقایسه با شاهد و غلظت‌های کمتر کروم افزایش می‌دهد. قربانلی و همکاران (۵) نیز بیان کردند که با افزایش غلظت عنصر سنگین نیکل، مقدار پرولین و فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز افزایش می‌یابد. به‌نظر می‌رسد تنش ناشی از فلزات سنگین می‌تواند مقدار پرولین را به‌طور قابل توجهی افزایش دهد و سبب تحریک فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان گردد. طبق آزمایش‌های پیروز و همکاران (۲)، افزایش غلظت کروم در آفتابگردان سبب افزایش محتوای پرولین اندام هوایی گیاه شده است. گابرلی و همکاران (۱۵) گزارش کردند که با اینکه محتوای کربوهیدرات ریشه و ساقه جو در غلظت‌های ۱۰ تا ۳۰ میلی‌مولار کادمیوم به ترتیب تا سطح ۰/۰۴۷ و ۰/۰۶۴ میلی‌گرم بر گرم کاهش می‌یابد، اما پرولین ریشه و ساقه در نتیجه تیمار با کروم به‌ترتیب تا ۰/۰۹ و ۰/۰۶۸ میلی‌گرم بر گرم افزایش می‌یابد.

مدیریت کشاورزی و کاربرد کودهای آلی از جمله عوامل مهم تأثیرگذار بر رشد گیاهان و خواص فیزیکی و شیمیایی خاک‌ها است. کودهای آلی، به‌ویژه کود دامی، به سبب بهبود خصوصیات شیمیایی خاک نظیر اسیدیته و ظرفیت تبادل کاتیونی و همچنین با افزایش دسترسی به عناصرغذایی، باعث افزایش باروری خاک می‌گردند. در این رابطه، شریفی و همکاران (۴) معتقدند که مقدار جذب کادمیوم توسط گیاه ذرت در حضور ضایعات آلی (کود گاوی و لجن فاضلاب) به‌طور معنی‌داری کمتر از خاک تیمار شده با نمک معدنی بود.

امروزه، فلزات سنگین جزو مهم‌ترین آلاینده‌های منابع آب کره زمین به‌شمار می‌آیند و با توجه به ثبات شیمیایی، تجزیه‌پذیری ضعیف و داشتن قدرت تجمع زیستی در بدن موجودات زنده، تبدیل به آلاینده‌های مضر می‌شوند؛ به‌طوری که وجود فلزات سنگین در دنیای صنعتی امروز به یک معضل تبدیل شده است که از راه‌های مختلف در حال وارد شدن به بدن انسان می‌باشند. نتایج گزارش‌های رجایی و همکاران (۳) مبنی بر بالا بودن میانگین غلظت کروم، کادمیوم، نیکل و سرب در مخزن آب چاه‌نیمه شماره ۱، و کادمیوم و سرب در چاه‌نیمه‌های ۲ و ۳ فراتر از استاندارد سازمان بهداشت جهانی، در منطقه سیستان مؤید نکته اخیر است.

بنابراین، هدف از تحقیق حاضر، بررسی تأثیر سطوح مختلف عنصر کروم در تلفیق با مقادیر متفاوت کود دامی به عنوان یک مداخله‌گر جهت کاهش اثرهای فلز سنگین کروم بر میزان فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و ترکیبات سازگارکننده، نظیر پرولین و کربوهیدرات، در گیاه ریحان می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه در قالب آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح پایه کاملاً

جدول ۱. برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک مورد استفاده در گلدان‌های آزمایش

هدایت الکتریکی (dS/m)	pH	نیتروژن کل	فسفر قابل‌جذب	پتاسیم قابل‌جذب	آهن قابل‌جذب	روی قابل‌جذب	منگنز قابل‌جذب	سیلت	رس	شن	بافت خاک
		(mg/kg)						(٪)			
۱/۸	۷/۱	۶/۳	۱۲	۱۸۵	۲/۲	۴/۸	۳/۱	۲۷	۳۲	۴۱	لوم رسی

جدول ۲. برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی کود دامی مورد استفاده در گلدان‌های آزمایش

هدایت الکتریکی (dS/m)	pH	ماده آلی	نیتروژن کل	فسفر قابل جذب	پتاسیم قابل جذب	آهن قابل جذب	روی قابل جذب	منگنز قابل جذب
			(٪)			(میلی‌گرم در یک کیلوگرم خاک)		
۶/۶	۷/۶	۲۶/۵	۱/۷۱	۰/۷۲	۲/۵۹	۱۹۸۶	۵۱/۴	۱۶۵/۲

تصادفی با ۴ تکرار در سال ۱۳۹۱ در محل گلخانه پژوهشی دانشگاه زابل به اجرا درآمد. عوامل آزمایش شامل پنج سطح کروم (Cr_0=0، Cr_1=5، Cr_2=10، Cr_3=15 و Cr_4=20 میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک گلدان) از منبع $Cr(NO_3)_3.9H_2O$ و سه سطح کود پوسیده گاوی (M_0=0، M_1=10 و M_2=20 تن در هکتار) بود. از خاک دست‌نخورده برای گلدان‌ها استفاده گردید. نمونه خاک هواخشک شده پس از کوبیده شدن، از الک ۲ میلی‌متری جهت انجام آزمایش‌های فیزیکوشیمیایی عبور داده شد. خصوصیات خاک از جمله pH در سوسپانسیون با نسبت ۲/۵ :۱ خاک به آب، هدایت‌الکتریکی عصاره گل اشباع به روش هس (۱۶)، نیتروژن کل به روش کجلدال (۱۳)، فسفر قابل استخراج از خاک به روش اولسن و سومر (۲۲)، پتاسیم قابل استفاده از روش نادسن و همکاران (۱۷)، آهن، روی و منگنز قابل استخراج با DTPA (۱۹) اندازه‌گیری، و بافت خاک به روش هیدرومتری تعیین گردید. برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک و کود دامی مورد استفاده در گلدان‌های آزمایش در جداول ۱ و ۲ آورده شده است.

بذرهای ریحان توده ورامین در ۲۴ آبان در ۶۰ گلدان زهکش‌دار یک کیلوگرمی به ارتفاع ۱۳ سانتی‌متر، قطر دهانه ۱۴ سانتی‌متر و ضخامت ۳ میلی‌متر حاوی مقادیر معین کود دامی (صفر، ۱۰ و ۲۰ تن در هکتار) کاشته شد. جهت برآورد بدون اریب تیمارها و اشتباه آزمایشی، جایگاه و چگونگی اختلاط عوامل آزمایش در گلدان‌ها با استفاده از زیربرنامه EXPSERIES نرم‌افزار MSTAT-C به‌دست آمد. گیاهان آزمایش تا مرحله ۴ برگی (۵۲ روز پس از کاشت) در شرایط گلخانه به فاصله هر ۳ روز با آب مقطر آبیاری سطحی شدند. پس از آن، مقادیر مورد آزمایش عنصر کروم برای هر تیمار در یک لیتر آب مقطر حل و طی ۵ نوبت گلدان‌ها آبیاری گردیدند. به منظور سنجش برخی صفات فیزیولوژیک در مرحله رشد گیاه، از برگ‌های جوان نمونه‌برداری و برای اندازه‌گیری به روش زیر عمل شد.

استخراج عصاره و روش اندازه‌گیری آنزیم‌ها

برای تهیه محلول پتاسیم فسفات از دو نمک KH_2PO_4 و K_2HPO_4 استفاده شد. بدین‌صورت که ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول ۱ مولار از این دو نمک تهیه نموده، سپس ۲۵ میلی‌لیتر از هر یک را مخلوط کرده و به حجم رسانیده شد. جهت تهیه محلول سدیم فسفات نیز از دو نمک $NaHPO_4$ و Na_2HPO_4 استفاده گردید. به این ترتیب که ۲۵ میلی‌لیتر از محلول هر یک از دو نمک با غلظت ۱ مولار برداشته و سپس به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانیده شد. از این بافر دو نمونه تهیه گردید که pH یکی در ۶ و دیگری در ۷ تنظیم شد. در نهایت، برای تهیه بافر Ice-Cold

Extraction از محلول بافر پتاسیم فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار با اسیدیته ۷ و محلول EDTA ۰/۱ میلی‌مولار استفاده شد.

جهت سنجش فعالیت آنزیم‌ها، ۰/۲ گرم از بافت سبز برگ را به همراه ۴ میلی‌لیتر بافر Ice-Cold در هاون سرد سائیده و مخلوط همگن حاصل به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۶۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. سپس، فاز بالایی به‌عنوان عصاره پروتئینی برای سنجش فعالیت آنزیمی استفاده شد. در نهایت، اندازه‌گیری آنزیم کاتالاز با روش بیر و سیزر (۱۱)، آنزیم آسکوربات پراکسیداز با روش ناکانو و آسادا (۲۱) و گلوتاتیون پراکسیداز از روش اوربانک و همکاران (۲۵) صورت گرفت.

تعیین محتوای پرولین برگ به روش بیتس و همکاران (۱۰) انجام شد. برای این منظور، ۰/۵ گرم از نمونه گیاهی توزین و ضمن سائیدن در هاون سرد، ۱۰ میلی‌لیتر اسید سولفوسالیسیلیک ۳٪ به آن اضافه شد. محلول حاصل پس از انتقال به لوله آزمایش درب‌دار به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۳۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. یک میلی‌لیتر از عصاره حاصل و یک میلی‌لیتر معرف ناین‌هیدرین به همراه یک میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال را در لوله آزمایش مخلوط کرده و همگنای حاصل یک ساعت در بن‌ماری ۱۰۰ درجه قرار گرفت تا رنگ آجری ظاهر گردد. سپس، به منظور متوقف نمودن واکنش‌ها لوله‌ها در آب یخ قرار گرفته و در هر لوله آزمایش ۴ میلی‌لیتر تولوئن اضافه شد. در نهایت، از فاز رویی شامل کمپلکس رنگی برای اندازه‌گیری پرولین استفاده گردید که میزان جذب نور آن توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مدل BTS-45 در طول موج ۵۲۰ نانومتر قرائت شده و با قرار دادن میزان جذب نمونه‌ها در معادله خط، میزان پرولین بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر گزارش گردید.

اندازه‌گیری قندهای محلول بر اساس روش دوبیس و همکاران (۱۴) انجام شد. بدین منظور، ۰/۲ گرم از بافت سبز برگ، به همراه ۱۰ میلی‌لیتر الکل اتانول ۹۶٪ به مدت یک ساعت در حمام بن‌ماری با دمای ۸۰ درجه قرار گرفت. یک میلی‌لیتر از این نمونه‌ها به همراه یک میلی‌لیتر فنل ۵٪ و ۵ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۹۸٪ مخلوط شده و پس از سرد شدن میزان نور جذبی در طول موج ۴۸۳ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر مدل BTS-45 اندازه‌گیری گردید. با قرار دادن اعداد حاصل در معادله خط، میزان هیدرات کربن بر حسب میلی‌گرم در لیتر محاسبه شد. تجزیه واریانس داده‌ها در قالب طرح آماری آزمایش با نرم‌افزارهای SAS و MSTAT-C، و مقایسه میانگین‌ها به روش LSD در سطح احتمال ۵٪ انجام شد.

نتایج و بحث

آنزیم کاتالاز

نتایج نشان داد که میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاه ریحان تحت تأثیر تیمار با فلز سنگین کروم قرار گرفت (جدول ۳). افزایش غلظت کروم سبب افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز در برگ ریحان گردید (جدول ۴). تمامی سطوح کروم از نظر تأثیر بر فعالیت کاتالازی در گروه‌های مختلف آماری قرار گرفتند. کمترین و بیشترین میزان فعالیت این آنزیم به‌ترتیب در نمونه شاهد و غلظت ۲۰ میلی‌گرم در کیلوگرم کروم در آب آبیاری مشاهده شد (جدول ۳). با این که کاظمی و همکاران (۶) کاهش فعالیت کاتالازی را به‌علت افزایش بیش از اندازه H_2O_2 در گیاهان تحت تیمار با نیکل گزارش نموده‌اند، اما افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز نیز در حضور فلزات نیکل و کادمیوم گزارش شده است (۵ و ۲۴).

نتایج حاصل از مقادیر مختلف کود دامی بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز برگ معنی‌دار ($P\leq$۰/۰۱) بود (جدول ۳). به‌نظر می‌رسد کود دامی به خوبی توانسته است آسیب اکسیداتیو ناشی از کروم را در گیاه ریحان کاهش دهد. به‌طوری که کاهش فعالیت کاتالازی در تیمارهای تحت تنش کروم و مصرف کود دامی مشهود بود. با افزایش مقادیر کود دامی از فعالیت این آنزیم کاسته شد. با کاربرد ۲۰ تن در هکتار کود دامی، کاهش ۴۷ درصدی در مقایسه با نمونه شاهد در فعالیت کاتالازی ایجاد شد (جدول ۴).

نتایج مربوط به میزان فعالیت آنزیم کاتالاز، تحت تأثیر

جدول ۳. نتایج تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف کروم و کود دامی بر فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و اسمولیت‌های سازگار در بافت برگ گیاه ریحان

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات				
		آنزیم کاتالاز	آنزیم آسکوربات پراکسیداز	آنزیم گایاکول پراکسیداز	پرولین	هیدرات‌های کربن
کروم	۴	۰/۰۰۰۰۶۶۵۵**	۰/۰۴۵۱۴**	۰/۰۰۱۹۸**	۰/۰۰۱۸۲**	۲۱۴۰۰/۳۵**
کود دامی	۲	۰/۰۰۰۰۱۴۶۱**	۰/۱۱۲۴۷**	۰/۰۰۱۲۸**	۰/۰۰۰۳۵**	۳۰۵۹/۱۲**
کروم×کوددامی	۸	۰/۰۰۰۰۰۱۵**	۰/۰۵۱۰۶**	۰/۰۰۰۴۱۰**	۰/۰۰۰۱۶**	۱۰۳۸/۰۸**
خطا	۴۵	۰/۰۰۰۴۲۷	۰/۰۳۳۵۷	۰/۰۰۶۴۲	۰/۰۰۳۶۹	۹/۲۲
ضریب تغییرات (٪)	–	۹/۶۴	۱۲/۲۲	۱۱/۸۰	۹/۱۷	۸/۵۶

** و ns به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ و بدون اختلاف معنی‌دار

جدول ۴. مقایسه میانگین‌های اثر غلظت‌های مختلف کروم و مقادیر مختلف کود دامی بر فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و اسمولیت‌های سازگار در بافت برگ گیاه ریحان

عوامل آزمایش/ صفات		آنزیم کاتالاز	آنزیم آسکوربات پراکسیداز	آنزیم گایاکول پراکسیداز	پرولین	هیدرات‌های کربن محلول
		($\mu mol\ H_2O_2/min.mg\ protein$)			(mg/gr fwt)	(mg/L)
غلظت‌های مختلف کروم (mg/kg)	Cr_0=0	۰/۰۰۱۴e	۰/۱۹۲۶c	۰/۰۳۶۱e	۰/۰۲۴۲e	۴۸/۱۶۷e
	Cr_1=5	۰/۰۰۲۷d	۰/۲۶۹۱b	۰/۰۴۸۳d	۰/۰۳۲۱d	۸۰/۴۱۷d
	Cr_2=10	۰/۰۰۴۶c	۰/۲۷۲۶b	۰/۰۵۵۵c	۰/۰۴۲۰c	۱۲۴/۵۸۳c
	Cr_3=15	۰/۰۰۶۲b	۰/۲۷۳۵b	۰/۰۶۳۸b	۰/۰۵۴۸a	۱۳۶/۰۸۳b
	Cr_4=20	۰/۰۰۷۰a	۰/۳۶۵۶a	۰/۰۶۸۶a	۰/۰۴۸۶b	۱۴۹/۵۸۳a
مقادیر مختلف کود دامی (ton/ha)	M_0=0	۰/۰۰۵۰a	۰/۳۶۰۹a	۰/۰۶۲۰a	۰/۰۳۸۱b	۹۳/۵۰۰b
	M_1=10	۰/۰۰۴۸a	۰/۲۳۸۲b	۰/۰۵۵۳b	۰/۰۳۷۷b	۱۱۴/۳۵۰a
	M_2= 20	۰/۰۰۳۴b	۰/۲۲۴۹b	۰/۰۴۶۱c	۰/۰۴۵۲a	۱۱۵/۴۵۰a

در هر ستون و برای هر جزء، حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار است.

برهمکنش عوامل آزمایش، در جدول ۵ نشان داده شده است. با این که بیشترین و کمترین فعالیت آنزیم کاتالاز در ترکیبات تیماری M_0Cr_4 و M_0Cr_0 به ترتیب با میانگین‌های ۰/۰۰۸ و ۰/۰۰۱ میکرومول پراکسید هیدروژن در یک میلی‌گرم پروتئین به‌دست آمد، اما کاربرد صفر و ۱۰ تن در هکتار کود دامی از نظر تأثیر بر فعالیت کاتالازی اختلاف چندانی با یکدیگر نداشتند. مصرف ۲۰ تن در هکتار کود دامی اثر قطعی‌تری داشته و به‌طور کارآتری در کاهش تنش ناشی از فلز سنگین کروم عمل نمود. لی و همکاران (۱۸) معتقدند که فلزات سنگین به‌خوبی توسط ترکیبات آلی جذب می‌شوند. به همین دلیل، قابلیت جذب و اثرات سوء آن‌ها بر گیاهان در شرایط کاربرد ترکیبات آلی تقلیل می‌یابد. پیشنهاد شده که پس از کاربرد کود آلی در خاک، به‌دلیل تجزیه مواد آلی و حل شدن ترکیبات آلی ناپایدار، قابلیت جذب فلزات سنگین توسط ترکیبات آلی پایدار افزایش شدیدی را نشان می‌دهد (۷). این افزایش جذب عموماً همراه با یک کاهش شدید در قابلیت جذب فلزات سنگین

جدول ۵. واکنش آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و گایاکول پراکسیداز، پرولین و هیدرات‌های کربن برگ ریحان (*O. basilicum*) تحت تأثیر برهمکنش غلظت‌های مختلف کروم و مقادیر مختلف کود دامی

کود دامی (ton/ha)	کروم (mg/kg)	آنزیم کاتالاز	آنزیم آسکوربات پراکسیداز	آنزیم گایاکول پراکسیداز	پرولین	هیدرات‌های کربن محلول
		(µmol H_2O_2/min.mg protein)			(mg/gr fwt)	(mg/L)
M_0=0	Cr_0=0	۰/۰۰۲ij	۰/۲۳۷e	۰/۰۴۵gh	۰/۰۱۶i	۳۵/۰۰j
	Cr_1=5	۰/۰۰۳f	۰/۲۴۰e	۰/۰۶۰d	۰/۰۲۸h	۴۴/۷۵ij
	Cr_2=10	۰/۰۰۵e	۰/۳۲۱d	۰/۰۶۳cd	۰/۰۳۶f	۱۰۳/۲۵f
	Cr_3=15	۰/۰۰۷c	۰/۴۶۹b	۰/۰۶۱d	۰/۰۵۵b	۱۳۹/۲۵bc
	Cr_4=20	۰/۰۰۸a	۰/۵۳۷a	۰/۰۸۱a	۰/۰۵۵b	۱۴۵/۲۵abc
M_1= 10	Cr_0=0	۰/۰۰۱j	۰/۲۱۲e	۰/۰۴۶g	۰/۰۲۹h	۴۸/۲۵hi
	Cr_1=5	۰/۰۰۳gh	۰/۲۳۶e	۰/۰۵۰f	۰/۰۳۳g	۱۱۲/۲۵ef
	Cr_2=10	۰/۰۰۶d	۰/۳۷۵c	۰/۰۶۱d	۰/۰۳۶f	۱۳۷/۷۵bc
	Cr_3=15	۰/۰۰۷bc	۰/۱۱۳f	۰/۰۶۵c	۰/۰۵۱d	۱۲۴/۲۵de
	Cr_4=20	۰/۰۰۸ab	۰/۲۵۵e	۰/۰۴۵e	۰/۰۳۹e	۱۴۹/۲۵ab
M_2= 20	Cr_0=0	۰/۰۰۱j	۰/۱۲۸f	۰/۰۱۸j	۰/۰۲۸h	۶۱/۲۵h
	Cr_1=5	۰/۰۰۲hi	۰/۳۳۱cd	۰/۰۳۵i	۰/۰۳۶f	۸۴/۲۵g
	Cr_2=10	۰/۰۰۳fg	۰/۱۲۲f	۰/۰۴۲h	۰/۰۵۳c	۱۳۲/۷۵cd
	Cr_3=15	۰/۰۰۵e	۰/۲۳۹e	۰/۰۶۵c	۰/۰۵۸a	۱۴۴/۷۵abc
	Cr_4=20	۰/۰۰۶de	۰/۳۰۵d	۰/۰۷۱b	۰/۰۵۱d	۱۵۴/۲۵a

حروف مشابه در هر ستون و برای هر جزء، نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار است

توسط گیاه می‌باشد. این امر بیانگر نقش بخش معدنی خاک و کودهای آلی در تثبیت فلزات سنگین است (۴).

آنزیم آسکوربات پراکسیداز

آسکوربات یکی از آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی است که در کلروپلاست، سیتوسول، واکوئل و همچنین در فضاهای آپوپلاستی سلول‌های برگ در غلظت‌های زیاد یافت می‌شود. گزارش شده که ۲۰-۴۰ درصد از آسکوربات کل گیاه در سلول‌های مزوفیل برگ قرار دارد (۸). میزان APX در گیاه *O. basilicum* تحت تأثیر فلز سنگین کروم افزایش یافت. به‌طوری که بالاترین سطح کروم (غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) سبب افزایش ۸۹ درصدی فعالیت APX نسبت به نمونه شاهد شد.

کاربرد کود دامی سبب کاهش قابلیت جذب کروم شده (جدول ۴). از طرفی، به‌علت وجود عناصر غذایی نظیر آهن و روی در این کود، می‌تواند بر فعالیت آنزیم اثرگذار باشد. اگر چه کاربرد ۱۰ و ۲۰ تن در هکتار کود دامی از نظر رتبه‌بندی در یک گروه آماری قرار گرفت، اما اختلاف آن‌ها با شاهد معنی‌دار بوده و هر یک به ترتیب در حدود ۵۲ و ۶۰ درصد کاهش در فعالیت APX ایجاد نمود (جدول ۴). مطالعه اثر متقابل سطوح مختلف فلز سنگین کروم و کود دامی (جدول ۵) نیز نشان از کاهش فعالیت APX در گیاهان تیمار شده با کود دامی دارد. این‌چنین به‌نظر می‌رسد که کود دامی به‌خوبی توانسته با کاهش قابل ملاحظه فعالیت آسکوربات پراکسیداز، سطح تنش را تنزل دهد. سایر محققین نیز به آثار مثبت ترکیبات آلی در خنثی‌سازی اثر فلزات سنگین نظیر کروم اشاره کرده‌اند. کود گاوی حاوی مواد آلی است که این مواد می‌توانند اثرهای مطلوبی بر

ویژگی‌های خاک داشته و البته به سبب وجود ترکیبات ویژه در ساختار کود دامی، این کود منجر به کاهش جذب و دامنه عمل فلزات مضر در گیاهان می‌گردد. در این باره نتیجه مشابهی توسط شریفی و همکاران (۴) در بررسی اثر کود گاوی، لجن فاضلاب و کلرید کادمیوم در ذرت گزارش گردیده است.

آنزیم گایاکول پراکسیداز

در این پژوهش، آنزیم گایاکول پراکسیداز نیز جهت بررسی آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از Cr^{3+} بر سیستم آنزیمی اندازه‌گیری شد. بر اساس نتایج، روند افزایشی فعالیت GPX در سطوح مختلف عنصر کروم نسبت به نمونه شاهد و نسبت به یکدیگر مشاهده گردید (جدول ۴). با این حال، کاظمی و همکاران (۶) معتقدند در فعالیت این آنزیم در شرایط مواجهه گیاهان کلزا با تنش نیکل کاهش ایجاد می‌شود. با توجه به این که واکنش گیاهان به تنش‌های غیرزنده متفاوت است، در پژوهش حاضر، افزایش فعالیت GPX دیده شد و این بدان معناست که در گیاه ریحان، برای کاهش اثر تنش اکسیداتیو ناشی از کروم، سیستم‌های آنزیمی فعال‌تر می‌شوند.

از نظر تأثیر بر فعالیت GPX، بین نمونه شاهد و مصرف ۱۰ تن در هکتار کود آلی اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. اما فعالیت GPX در تیمار ۱۰ تن در هکتار کود دامی در حدود ۱۲٪ کاهش یافت. کاهش فعالیت GPX در تیمار ۲۰ تن در هکتار کود دامی معنی‌دار و معادل ۳۵٪ در مقایسه با شاهد بود (جدول ۴). جدول ۵ به بیان تغییرات آنزیم GPX تحت تأثیر برهمکنش عوامل آزمایش می‌پردازد. فعالیت GPX تحت تأثیر برهمکنش عوامل آزمایش نشان می‌دهد که کاربرد ۲۰ تن در هکتار کود دامی به‌طور کارآتری در غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، در کاهش تنش اکسیداتیو ناشی از فلز کروم مؤثر بود. اما در غلظت‌های بیشتر، یعنی ۱۵ و ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، افزایش سطح مصرفی کود دامی نیز نتوانسته در کاهش تنش اکسیداتیو و اثرهای زیان‌بار ناشی از تولید رادیکال‌های آزاد و اکسیژن فعال توفیق حاصل نماید. این‌طور استنباط می‌گردد که فعالیت آنزیم GPX کمتر تحت تأثیر کود بوده، ضمن این که روند تغییرات آنزیم گایاکول پراکسیداز تحت تأثیر برهمکنش غلظت‌های مختلف کروم و مقادیر کود دامی در مقایسه با کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز در این شرایط، به‌ویژه در غلظت‌های زیاد، قابل توجه نبود. این موضوع نشان از حساسیت هر چه بیشتر GPX از تنش فلز سنگین کروم در گیاه ریحان دارد.

پرولین و هیدرات‌های کربن: اثر تیمار فلز کروم بر گیاه دارویی ریحان با افزایش پرولین برگ همراه بود. روند تغییرات پرولین برگ از شاهد تا سطح ۱۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم، به‌صورت افزایشی بوده، اما در تیمار ۲۰ میلی‌گرم در کیلوگرم کاهشی معادل ۱۳٪ در محتوای پرولین نسبت به تیمار ۱۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم مشاهده شد (جدول ۴). تحت تأثیر تنش فلز سنگین، افزایش معنی‌دار ($P\leq ۰/۰۱$) در محتوای هیدرات‌های‌کربن برگ دیده شد، به‌طوری که کمترین و بیشترین میزان کربوهیدرات نیز از نمونه شاهد و بیشترین غلظت کروم ثبت گردید (جدول ۴). می‌توان گفت که در راستای مقابله با تنش ایجاد شده در اثر فلز سنگین و اتخاذ مکانیزم‌های سازگارکننده، گروهی از گیاهان غلظت تعدادی از متابولیت‌های محافظ اسمزی مانند پرولین، بتائین و هیدرات‌های کربن احیاکننده را افزایش می‌دهند. از دیدگاه گابرلی و همکاران (۱۵)، این افزایش می‌تواند به‌عنوان سازوکاری جهت تنظیم تعادل اسمزی بین سیتوپلاسم و واکوئل عمل نماید.

از نظر تأثیر کود دامی بر پرولین، بین تیمار شاهد و کاربرد ۱۰ تن در هکتار تفاوت معنی‌داری نبود. اما با افزایش مقدار کود دامی تا ۲۰ تن، معادل ۱۹٪ بر تجمع پرولین افزوده شد (جدول ۴). اثر متقابل سطوح عنصر سنگین کروم و کود دامی بر پرولین برگ معنی‌دار ($P\leq ۰/۰۱$) بود (جدول ۳). بیشترین و کمترین میزان آن نیز به ترتیب در ترکیب‌های تیماری M_2Cr_4 و M_0Cr_0 مشاهده شد (جدول ۵). تغییرات هیدرات‌های کربن نیز تقریباً مشابه پرولین بود. به‌طوری که بیشترین و کمترین میزان

جدول ۶. ضرایب همبستگی میان پارامترهای فیزیولوژیک مورد مطالعه در بافت برگ گیاه ریحان

صفات	آنزیم کاتالاز	آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز	آنزیم گایاکول‌پراکسیداز	پرولین	هیدرات‌های کربن محلول
آنزیم کاتالاز	۱				
آنزیم آسکوربات پراکسیداز	۰/۵۱۶*	۱			
آنزیم گایاکول پراکسیداز	۰/۷۸۳**	۰/۵۵۷*	۱		
پرولین	۰/۶۶۱**	۰/۲۸۱ns	۰/۵۶۲*	۱	
هیدرات‌های کربن محلول	۰/۸۱۲**	۰/۳۵۸ns	۰/۵۷۶*	۰/۸۴۴**	۱

**، * و ns به ترتیب معنی‌دار در سطوح احتمال ۱٪ و ۵٪ و بدون اختلاف معنی‌دار

کربوهیدرات در تیمارهای M_2Cr_4 و M_0Cr_1 مشاهده شد (جدول ۵). در ارتباط با تأثیر توأمان تیمار کروم و کود دامی بر اسمولیت‌های سازگار، اطلاعات اندکی در دست است. از آنجایی که ترکیباتی با وزن ملکولی کم نظیر پرولین دارای ساختمان نیتروژنی هستند، نیتروژن تا حد زیادی می‌تواند سبب افزایش مقدار آن‌ها در گیاه گردد (۲۰). کودهای دامی نیز دارای مقادیر زیادی مواد آلی بوده و به عنوان منابع غنی از مواد غذایی، به‌ویژه نیتروژن، فسفر و پتاسیم به‌شمار می‌آیند که این عناصر را به مرور در اختیار گیاه قرار می‌دهند. احتمالاً استفاده از ترکیبات نیتروژنی ذخیره به‌عنوان تدبیری برای مقابله با تنش عمل نموده است.

ضریب همبستگی صفات

نتایج سنجش ضریب همبستگی مشخص نمود که بین اکثر صفات مورد بررسی، همبستگی معنی‌داری وجود دارد (جدول ۶). به‌طوری که محتوای پرولین برگ همبستگی مثبت و معنی‌داری با میزان هیدرات‌های کربن محلول برگ داشته و ضریب همبستگی میان این دو صفت ۰/۸۴۴ به‌دست آمد. بنابراین، با افزایش مقدار پرولین برگ، هیدرات‌های کربن محلول برگ نیز افزایش یافته است. این روابط نشان‌دهنده این است که افزایش یکی از محافظت‌کننده‌های اسمزی (قند محلول در برگ) می‌تواند باعث افزایش دیگری، یعنی پرولین، گردد. به‌نظر می‌رسد تحت تأثیر تنش کروم و کاربرد کود دامی، سنتز این ترکیبات با هم رقابتی نداشته، بلکه با افزایش تجمع قندهای محلول تحت تنش عنصر سنگین کروم، امکان سنتز پرولین که منشأ تولید آن از قندهاست، بیشتر فراهم می‌شود. در این پژوهش، شدت و نوع رابطه آنزیم کاتالاز با هیدرات‌های کربن محلول و آنزیم گایاکول پراکسیداز نیز مثبت و معنی‌دار (به‌ترتیب ۰/۸۱۲ و ۰/۷۸۳) بود. به این معنی که همگام با افزایش غلظت عنصر سنگین کروم در محیط رشد، بر فعالیت CAT و GPX و انباشت هیدرات‌های کربن محلول افزده شد. می‌توان گفت که در گیاه ریحان تحت شرایط این تحقیق، افزایش فعالیت CAT و GPX و هیدرات‌های کربن محلول در برگ منافاتی با هم نداشته و بلکه در تنش کروم، گیاه ریحان به منظور جبران آسیب‌های اکسیداتیو و جاروب نمودن پراکسید هیدروژن تولید شده، اقدام به افزایش فعالیت در سیستم آنتی‌اکسیدانی آنزیمی نظیر CAT، APX و GPX می‌نماید.

نتیجه‌گیری

گیاهان برای مقابله با تنش فلزات سنگین به دو شکل عمل می‌کنند: اجتناب با جلوگیری از ورود فلز به داخل گیاه، یا تحمل، که گیاه با وجود فلزات سنگین در داخل بافت‌های خود، به حیات ادامه می‌دهد. با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق، می‌توان گفت که فلز کروم III در غلظت‌های زیاد (بیشتر از ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک) به‌عنوان یک مهارکننده رشد عمل کرده، سبب بروز اثرهای سمی و فعال شدن سیستم

آنتی‌اکسیدانی برگ نظیر کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و گایاکول پراکسیداز گردید. افزایش ترکیبات آنتی‌اکسیدانی، از پراکسیده شدن لیپیدهای غشایی در غلظت‌های کم جلوگیری می‌کند. در حالی که در غلظت‌های زیادتر، این فلز سنگین، متابولیسم را مختل کرده و با القای تنش اکسیداتیو میزان رادیکال‌های آزاد را افزایش می‌دهد. همچنین، افزایش در محتوای پرولین و کربوهیدرات‌های محلول در تیمار با کروم می‌تواند مبین اختلال در تعادل اسمزی تحت فشار تنش اکسیداتیو باشد. بر اساس نتایج تحقیقات و بر مبنای مزایایی که برای کودهای آلی، در مقایسه با کودهای شیمیایی بیان شده است، می‌توان کود دامی را به‌عنوان کاندیدای مناسبی جهت بهبود وضعیت رشد و شاخص‌های فیزیولوژیک گیاه ریحان معرفی نمود؛ زیرا که در تیمارهای کاربرد کود دامی، این کود به‌عنوان ماده مداخله‌گر مناسب با آثار اصلاحی، به‌خوبی اثر عامل تنش‌زای فلز سنگین را کاهش داده است.

سپاسگزاری

نویسندگان از دکتر مصطفی حیدری و مهندس سپیده محمدی به جهت مساعدت‌های بی‌دریغ کمال تشکر را دارند.

منابع مورد استفاده

۱. بیشه‌کلایی، ر.، ح. فهیمی، س. سعادتمند و ط. نژادستاری. ۱۳۹۰. اثر Cr^{3+} بر لیپید پراکسیون غشا و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان آسکوربات پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز و پلی‌فنول اکسیداز در گیاه ریحان (*Ocimum basilicum* L.). علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی) ۲۵(۴): ۴۷۰- ۴۷۸.

۲. پیروز، پ.، خ. منوچهری کلانتری و ف. نصیبی. ۱۳۹۰. بررسی فیزیولوژیک گیاه آفتابگردان تحت تنش کروم: تأثیر بر رشد، تجمع و القای تنش اکسیداتیو در ریشه آفتابگردان (*Helianthus annus*). زیست‌شناسی گیاهی ۴(۱۱): ۷۳-۸۶.

۳. رجایی، ق.، ح. جهان‌تیغ، ع. میر، س. حصاری مطلق و م. حسن‌پور. ۱۳۹۱. بررسی غلظت فلزات سنگین در مخازن آب چاه‌نیمه‌های سیستان و بلوچستان در سال ۱۳۸۹. مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران ۲۲(۹۰): ۱۰۵-۱۱۲.

۴. شریفی، م.، م. افیونی و ا. ح. خوشگفتارمنش. ۱۳۸۹. اثر کود گاوی، لجن فاضلاب و کلرید کادمیوم بر جذب کادمیوم در شاخساره ذرت. آب و فاضلاب ۲۱(۴): ۹۸-۱۰۳.

۵. قربانلی، م.، ر. حاجی‌حسینی، س. هزارخانی و ر. شیردم. ۱۳۸۴. بررسی اثر نیکل بر درصد جوانه‌زنی و متابولیسم پرولین و فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز در دو رقم کلزا (*Brassica napus* L.). علوم و تکنولوژی محیط زیست ۲۷(۳): ۳۶-۴۹.

۶. کاظمی، ن.، ر. ع. خاوری‌نژاد، ح. فهیمی، س. سعادتمند و ط. نژادستاری. ۱۳۸۹. تأثیر سالیسیلیک اسید برون‌زا بر پراکسیداسیون لیپید و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در برگ‌های گیاهان کلزا تحت تنش نیکل. فصلنامه علوم زیستی دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان ۳(۱۰): ۷۱-۸۰

7. Alloway, B. and D.C. Ayres. 1997. Chemical Principles of Environmental Pollution. Blackie Academic and Professional, London, 281 p.
8. Arora, A., R.K. Sairam and G.C. Srivastava. 2002. Oxidative stress and antioxidant system in plants. Ann. Rev. Current Sci. 82(10): 1227-1238.
9. Barton, L.L., G.V. Johnson, A.G. Onan and B.M. Wagener. 2000. Inhibition of ferric chelate reductase in alfalfa roots by cobalt, nickel, chromium and copper. J. Plant Nutr. 23(11): 1833-1845.
10. Bates, L.S., R.P. Waldren and I.D. Teare. 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant Soil 39(1): 205-207.
11. Beers, Jr., R.F. and I.W. Sizer. 1952. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxidase by catalase. J. Biol. Chem. 195(1): 133-140.
12. Bohnert, H.J. and R.G. Jensen. 1996. Strategies for engineering water stress tolerance in plants. Trends Biol.

Technol. 14(3): 89-97.
13. Bremner, J.M., and C.S. Mulvaney. 1982. Nitrogen-total. PP. 595-624. *In:* Page, A. L. (Ed.), Methods of Soil Analysis, part 2, ASA, Madison, WI, USA.
14. Dubois, M., K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers and F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. J. Anal. Chem. 28(3): 350-356.
15. Gubrelay, U., R.K. Agnihotri, G. Singh, R. Kaur and R. Sharma. 2013. Effect of heavy metal Cd on some physiological and biochemical parameters of barley (*Hordeum vulgare* L.). Int. J. Agric. Crop Sci. 5(22): 2743-2751.
16. Hesse, P.R. 1971. A Textbook of Soil Chemical Analysis. John Murray, London, 405 p.
17. Knudsen, D., G.A. Peterson and P.F. Pratt. 1982. Lithium, sodium and potassium. PP. 225-246. *In:* Page, A.L. (Ed.), Methods of Soil Analysis: Chemical and Microbiological Properties, Part 2, 2nd Ed., Agron. Monogr. No. 9, ASA and SSSA, Madison, WI.
18. Li, Z., J.A. Ryan, J.L. Chen and S.R. Al-Abed. 2001. Adsorption of cadmium on biosolids-amended soils. J. Environ. Qual. 30(3): 903-911.
19. Lindsay, W.L. and W.A. Norvell. 1978. Development of a DTPA soil test for zinc, iron, manganese and copper. Soil Sci. Soc. Am. 42(3): 421-428.
20. Marschner, H. 1995. Mineral Nutrients of Higher Plants. Academic Press, Ltd., London.
21. Nakano, Y. and K. Asada. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant Cell Physiol. 22(5): 867-880.
22. Olsen, S.R. and L.E. Sommer. 1982. Phosphorus. PP. 403-430. *In:* Page A.L. (Ed.), Methods of Soil Analysis: Chemical and Microbiological Properties, Part 2, 2nd Ed., Agron. Monogr. No. 9, ASA and SSSA,Madison, WI.
23. Samantaray, S., G.R. Rout and P. Das. 1998. Role of chromium on plant growth and metabolism. Acta Physiol. Plant. 20(2): 201-212.
24. Srivastava, R., R. Khan, S.A. Nasim, N. Manzoor and Mahmooduzzaffar. 2011. Cadmium treatment alters phytochemical and biochemical activity in *Glycine max* L. Int. J. Bot. 7(4): 305-309.
25. Urbanek, H., E. Kuzniak-Gebarowska and K. Herka. 1991. Elicitation of defense responses in bean leaves by botrytis cinerea polygalacturonase. Acta Physiol. Plant. 13(1): 43-50.
26. Van Breusegem, F., E. Vranova, J.F. Dat and D. Inze. 2001. The role of active oxygen species in plant signal transduction. Plant Sci. 161(3): 405-414.
27. Vangronsveld, J. and H. Clijsters. 1994. Toxic effects of metals. *In:* Farago, M.E. (Ed.), Plants and the Chemical Elements: Biochemistry, Uptake, Tolerance and Toxicity, Wienheim, Germany.