

## بررسی اثرات سولفات روی ( $ZnSO_4$ ) بر غلظت آنتوسیانین، پرولین و عناصر روی و آهن در لوبیا (*Phaseolus vulgaris* L.)

رضانعلی خاوری نژاد<sup>۱</sup>، فرزانه نجفی<sup>۲</sup>، رعنا فیروزه<sup>۱\*</sup>

۱. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی، تهران، ایران

۲. دانشگاه تربیت معلم، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، تهران، ایران

**مسئول مکاتبات:** رعنا فیروزه، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران، شماره تلفن: ۰۹۱۵۵۸۴۷۳۳۲، پست الکترونیکی: r.firuze1848@yahoo.com

**محل انجام تحقیق:** تهران، مجتمع آزمایشگاهی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات

تاریخ پذیرش: ۸۹/۱۲/۱۸

تاریخ دریافت: ۸۹/۱۰/۶

### چکیده

تنش ناشی از فلزات سنگین، یکی از انواع تنش‌های محیطی است که منجر به بروز تغییرات فیزیولوژیکی، مورفولوژیکی و بیوشیمیایی در سلول و در مجموع در گیاه می‌شود. طی تنش فلزات سنگین، گونه‌های فعال اکسیژن در اندامک‌های مختلف سلولی، تولید و باعث ایجاد تغییراتی در متابولیسم سلول می‌شوند، که زندگی گیاه را به خطر می‌اندازند. فلز  $Zn$  نیز یکی از فلزات سنگینی است که افزایش غلظت آن در محیط ریشه گیاه، سبب بروز اختلالات متابولیسمی در گیاه می‌گردد. در این پژوهش، تاثیر فلز  $Zn$  بر ویژگی‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه لوبیا مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور، از نمک سولفات روی در محلول غذایی گیاه لوبیا با غلظت‌های ۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۵۰، ۲۵۰، ۳۵۰، ۴۵۰ و ۵۵۰ میکرومولار استفاده شد. بر اساس نتایج به دست آمده، غلظت آنتوسیانین و پرولین، با افزایش غلظت سولفات روی، به‌طور معنی‌داری نسبت به نمونه کنترل افزایش یافت. افزایش میزان پروتئین کل و همچنین تراکم و تجمع  $Zn$  در برگ‌ها در گیاهان تحت تیمار سولفات روی، از پیامدهای افزایش  $Zn$  بود. از طرفی، به‌دلیل بروز خاصیت آنتاگونیسمی بین دو عنصر آهن و روی، جذب آهن در گیاه، با افزایش غلظت سولفات روی، کاهش یافت.

**واژه‌های کلیدی:** سولفات روی، آنتوسیانین، پرولین،  $Zn$ ، آهن، لوبیا

### مقدمه

فلزات سنگین معمولاً با بروز تنش اکسیداتیو، اثرات سمی خود را بر گیاه اعمال می‌کنند. گونه‌های مختلف گیاهی در برابر آلودگی محیط با فلزات سنگین، واکنش‌های متفاوتی نشان می‌دهند. برخی گونه‌های گیاهی، در مقابل مقدار معینی از فلزات سنگین در خاک، مقاوم بوده و توانایی جذب و تثبیت آن‌ها را در بافت‌های درونی خود دارند. در برخی از گیاهان نیز آثار مسمومیت چندان بارز نیست، ولی میزان محتوای فلز موجود در گیاه، سلامت انسان و

فلزات سنگین اغلب در قالب آلاینده‌های محیطی از جمله آلودگی‌های جوی مراکز صنعتی، استفاده افراطی از کودهای کشاورزی و فاضلاب‌های شهری و صنعتی، به صورت برگشت‌ناپذیر وارد خاک می‌شوند. در بسیاری از خاک‌های اسیدی سراسر دنیا و حدود نیمی از زمین‌های زراعی که پتانسیل تولید غذا و مواد غذایی را دارند، فلزات سنگین به‌عنوان عامل اصلی محدودیت رشد گیاهان به‌شمار می‌آیند (۶).

دام‌هایی را که از آن تغذیه می‌کنند، به خطر می‌اندازد (۷).

فلزات سنگین می‌توانند در رقابت با عناصر دیگر مورد نیاز گیاه، در جذب آن‌ها و تغذیه معدنی گیاه، ایجاد نیز اختلال نمایند. از طرف دیگر، فلزات جذب شده با اتصال به بخش‌های حساس مولکول‌های زیستی و با مهار آن‌ها، متابولیسم طبیعی سلول را مختل می‌نمایند. فلز Zn نیز همانند بسیاری از فلزات سنگین، در غلظت‌های فزاینده، با ایجاد اختلال در متابولیسم سلولی، موجبات کاهش رشد و عملکرد گیاهی را فراهم می‌آورد (۸).

البته باید اشاره کرد که بر، مولیدن و روی، از عناصر کم‌مصرف و ضروری هستند که برای رشد و نمو گیاهان عالی مورد نیاز هستند (۹). غلظت‌های بحرانی Zn برای انجام وظیفه طبیعی گیاه در برخی مسیرهای فیزیولوژیکی گیاه می‌توانند مشکل‌ساز باشند. این مسیرها نقش مهمی در فتوسنتز، سنتز قند و رنگیزه‌های فتوسنتزی، باروری، تولید بذر، تنظیم رشد و دفاع در برابر بیماری‌ها دارند. هنگامی که کمبود روی در گیاه زراعی پیش می‌آید، این وظایف فیزیولوژیکی، دچار اختلال شده و سلامت و باردهی گیاهان زراعی، با خطر حمله بیماری‌ها و کاهش عملکرد و کیفیت محصول مواجه می‌شود. در چنین شرایطی، اگر سایر عناصر غذایی به جز روی، به مقدار مورد نیاز برای گیاه زراعی تامین شود، باز هم گیاه زراعی قادر به دستیابی به عملکرد بالقوه مطلوب خود نخواهد بود (۱۰). Zn همچنین جزیی از ساختار چندین آنزیم است و به‌عنوان کوفاکتور فعالیت برخی آنزیم‌ها مورد نیاز می‌باشد. کمبود روی، باعث کاهش رشد ریشه و کاهش تولید ماده خشک ساقه و کاهش فعالیت تعداد زیادی از آنزیم‌ها از جمله کربونیک انهدراز و سوپراکسید دیسموتاز می‌گردد (۱۱، ۶). از طرفی، کمبود روی می‌تواند بر فرآیندهای فیزیولوژیکی متعددی گیاه از جمله متابولیسم پروتئین‌ها و آنزیم‌ها، بیان ژن، تمامیت ساختمانی و عملکردی غشاهای زیستی، متابولیسم کربن فتوسنتزی و متابولیسم اکسین، اثر گذاشته و باعث اختلال در آن‌ها شود (۱۲).

از سوی دیگر، با توجه به این که لوبیا یک محصول مهم زراعی است، پژوهشگران سعی در شناخت عوامل مهم برای ایجاد محصول برتر آن و کاهش عوامل درونی و خارجی آسیب زنده به آن‌را دارند؛ زیرا عوامل محیطی نامناسب همانند تنش‌های یونی، به‌طور مستقیم بر باردهی لوبیا موثر است. لوبیا با ۲۰ تا ۲۵ درصد پروتئین و ۵۰ تا ۵۶ درصد کربوهیدرات، دارای ارزش غذایی بالایی است. ارزش بیولوژیکی پروتئین حبوبات، به خاطر اسیدهای آمینه ضروری موجود در آن‌ها است. بذر حبوبات دارای لیزین فراوان، همراه با مقدار قابل توجهی تریپتوفان است (۱). از دیگر ویژگی‌های مهم گیاهان بقولات می‌توان به وجود باکتری‌های تثبیت‌کننده نیتروژن اتمسفری در ریشه آن‌ها اشاره کرد که در حاصلخیزی خاک نقش مهمی را ایفا می‌کنند (۲).

هدف از مطالعه حاضر، بررسی و مشخص کردن غلظت مطلوب عنصر جهت رشد بهتر گیاه و نیز بهبود وضعیت خاک کشاورزی و به‌عمل آوردن محصولات کشاورزی بیشتر و با کیفیت بهتر می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

### تهیه بذر، سترون کردن و آماده‌سازی گیاهک‌ها

حدود ۲۰۰ عدد بذر لوبیای قرمزگلی همگن، انتخاب و با آب مقطر شسته شدند. سپس به مدت ۵ دقیقه در آب ژاول با ۱ درصد کلر فعال قرار گرفتند و پس از آن با آب مقطر استریل، آبکشی و سپس به ظرف‌های پتری استریل منتقل شدند. درون هر پتری، ۸ بذر لوبیا با فواصل مناسب چیده شد و در هر ظرف پتری، ۵ میلی‌لیتر آب مقطر استریل، ریخته و در ظرف‌های پتری بسته و چسب‌زده، در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته شد. ظرف‌های پتری، داخل ورق آلومینیومی پیچیده شدند تا در معرض روشنائی قرار نگیرند. زمانی که بذرهای لوبیا شروع به جوانه‌زدن کردند، از ورق آلومینیوم، خارج و به روشنائی منتقل شدند.

### روش کشت و تیماردهی

روش کشت در این پژوهش، کشت هیدروپونیک است. ترکیب اصلی و پایه‌ای کشت هیدروپونیک،

لیوان‌های محتوی محلول هوگلند منتقل شدند (۱۳). به این صورت که لیوان‌های درب‌دار انتخاب و درب آن‌ها سوراخ شد و گیاهچه‌ها روی درب لیوان قرار گرفت؛ به طوری که ریشه و محور زیر لپه، داخل لیوان و لپه‌ها و محور روی لپه و برگ‌ها، خارج از لیوان قرار بگیرند (تصویر ۱).

محلول‌هایی غذایی‌اند که تنها منبع آب و مواد معدنی گیاهان هستند. محلول‌های غذایی بایستی به‌طور نامحدود، نیازهای سیستم ریشه‌ای گیاهان را برطرف کنند.

بعد از تهیه و آماده‌سازی محلول غذایی هوگلند Hogland (۱۹۵۷)، گیاهک‌های ۷ روزه به



تصویر ۱ - گیاهک‌های منتقل شده به گلدان و آماده‌شده برای شروع تیماردهی.

ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی رشد داده شدند و به‌صورت یک روز در میان، محلول غذایی آن‌ها تعویض شد. روشنایی مورد نیاز هم با استفاده از لامپ‌های تنگستن و فلورسانت تامین شد. برای کم-کردن اثرات محیطی، جابه‌جایی تصادفی گلدان‌ها در طول دوره رشد انجام گرفت. بعد از گذشت ۳ هفته، گیاهان برداشت شدند و سنجش‌های زیر در آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

زمانی که گیاهچه به مرحله سه‌برگی رسیدند، تحت تیمارهای مختلف سولفات روی قرار گرفتند. این پژوهش در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با ۴ تکرار و ۹ تیمار (۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۵۰، ۲۵۰، ۳۵۰، ۴۵۰ و ۵۵۰ میکرومولار سولفات روی) انجام پذیرفت (تصویر ۲). کلیه گیاهان در شرایط آزمایشگاهی با دمای ۲۴ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد در روز (روشنایی) و ۱۸ تا ۱۹ درجه سانتی‌گراد در شب (تاریکی) و



تصویر ۲ - گیاهان لوبیایی تحت تیمار غلظت‌های مختلف سولفات روی (میکرو مولار) در محیط گلخانه.

### سنجش آنتوسیانین

در بسیاری از پژوهش‌های انجام شده روی استخراج آنتوسیانین، از متانول و اتانول به عنوان حلال استفاده می‌شود (۱۴). آنتوسیانین‌ها نسبت به اتصالات در محل پیوندهای ۳، ۴ و ۵ در ساختارشان، حلالیت متفاوت در آب و الکل نشان می‌دهند. وجود دو گروه OH در ساختار سیانیدین، حلالیت بیشتر آنتوسیانین در متانول و اتانول را توجیه می‌کند (۱۵). ۰/۱ گرم وزن تر برگ در ۱۰ میلی‌لیتر محلول متانول اسیدی (شامل الکل متیلیک و اسید کلریدریک به نسبت ۹۹ به ۱) به خوبی ساییده شد و در ۱۲۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. محلول رویی به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی قرار گرفت، سپس جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۳۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتری خوانده شد.

### سنجش پرولین

۰/۲ گرم وزن تر قسمت انتهایی ریشه پس از توزین، در ۵ میلی‌لیتر اسید سولفوسالیسیلیک ۳ درصد ساییده شد و همگن (هموژن) حاصل با استفاده از کاغذ صافی واتمن، صاف گردید. از عصاره حاصل، یک میلی‌لیتر در لوله آزمایش ریخته شد و به آن یک میلی‌لیتر اسید نین‌هیدرین و یک میلی‌لیتر اسید استیک خالص اضافه شد. لوله‌های آزمایش، در حمام آب گرم به مدت یک ساعت در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند.

لوله‌ها بلافاصله بعد از خارج کردن از حمام آب گرم، به درون ظروف محتوی آب یخ (جهت متوقف شدن واکنش) منتقل شدند. در این مرحله، به هر لوله آزمایش، ۲ میلی‌لیتر تولوئن اضافه شد و به مدت ۲۰ ثانیه به شدت تکان داده شدند تا دو لایه به طور مجزا از همدیگر تشکیل گردید. بخش بالایی دارای تولوئن و پرولین به وسیله‌ی پی‌پت پواردار جدا شد و در دمای آزمایشگاه خنک گردید (۱۶). میزان جذب بخش بالایی در طول موج ۵۲۰ نانومتر با استفاده از شاهد تولوئن توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد.

### سنجش پروتئین کل

اندازه‌گیری پروتئین کل، با استفاده از روش براد فورد صورت گرفت (۱۷).

برای استخراج پروتئین کل، ۰/۵ گرم برگ تر گیاه، در یک هاون چینی (در یخ) ریخته، پس از افزودن ۵ میلی‌لیتر از بافر فسفات (۱۰۰ mM و pH=۷) به مدت ۳ دقیقه ساییده شد. عصاره به دست آمده، در لوله سانتریفوژ ریخته شد. هاون با ۲ میلی‌لیتر از بافر شسته و محتویات آن به لوله اضافه شد. سپس لوله‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۴۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. از روش‌ناورها برای سنجش پروتئین کل استفاده گردید.

جهت تعیین جذب نمونه‌ها، به ۱۰ میکرولیتر عصاره پروتئینی، ۹۰ میکرولیتر بافر فسفات و ۵ میلی‌لیتر معرف براد فورد اضافه شد و بعد از ۵ دقیقه، میزان جذب آن‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد و میزان غلظت پروتئین موجود در نمونه‌ها بر حسب mg/g f. w محاسبه گردید.

### سنجش غلظت عناصر فلزی (روی و آهن) در

#### نمونه برگ گیاه

اندازه‌گیری دو عنصر روی و آهن توسط دستگاه (Inductively Coupled Plasma) ICP بررسی شد. در این روش، درجه حرارت بالا سبب برانگیخته شدن الکترون‌های فلز شده و پس از کم-شدن دما و زمانی که الکترون‌ها به لایه خود بازمی‌گردند، انرژی از دست می‌دهند که مقدار آن توسط دستگاه محاسبه می‌شود و بر اساس آن، مقدار فلز مورد نظر، تخمین زده می‌شود (۱۸). مطابق با این روش، ۱ گرم نمونه پودر شده گیاهی در کوره با دمای ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶ ساعت قرار داده شد تا به خاکستر سفید تبدیل گردد. سپس به خاکستر سفید شده، ۱۰ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۲ نرمال اضافه شد و به مدت نیم ساعت روی بن ماری (حمام آب گرم) قرار گرفت. آنگاه عصاره با آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. از این عصاره، جهت اندازه‌گیری عناصر روی، آهن استفاده شد.

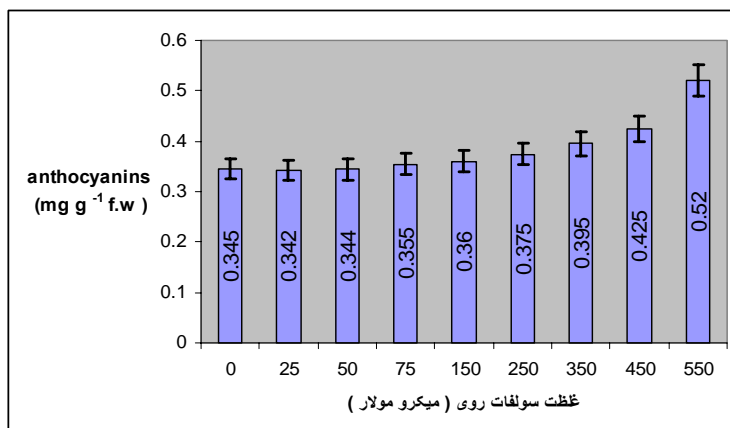
### محاسبات آماری

نتایج حاصل از این آزمایش با استفاده از کتاب اصول آمار زیستی (۳) و با استفاده از نرم افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. نتایج در سطح احتمال  $P < 0.05$  مورد آزمون قرار گرفت و معنی دار بودن نتایج در سطح فوق تعیین گردید.

### نتایج

#### اثرات سولفات روی بر غلظت آنتوسیانین در برگ گیاه لوبیا

غلظت آنتوسیانین در غلظت‌های کم سولفات روی، تفاوت معنی‌داری با نمونه شاهد ندارد، ولی با افزایش غلظت سولفات روی (از ۱۵۰ میکرو مولار به بالا) بتدریج بر میزان غلظت آنتوسیانین برگی افزوده می‌شود (نمودار ۱ و جدول‌های ۱ و ۲).



نمودار ۱ - اثر غلظت‌های مختلف سولفات روی بر غلظت آنتوسیانین در برگ گیاه لوبیا (Mean±SE).

جدول ۱- مقادیر مربوط به میزان آنتوسیانین در غلظت‌های مختلف سولفات روی در برگ گیاه لوبیا (Mean ±SE)

تیمار سولفات روی (میکرو مولار)	Anthocyanins (mg/g f. w.)
0	0.35 ± 0.007
25	0.34 ± 0.002
50	0.34 ± 0.006
75	0.35 ± 0.007
150	0.36 ± 0.00
250	0.37 ± 0.007
350	0.39 ± 0.007
450	0.42 ± 0.007
550	0.52 ± 0.014
F	118.20
P	< 0.05

(۲). این افزایش به طور معنی‌دار قابل مشاهده است (جدول‌های ۳ و ۴).

#### اثرات سولفات روی بر غلظت پروتئین کل در ساقه گیاه لوبیا

نتایج به دست آمده و داده‌ها نشان می‌دهد که با افزایش غلظت روی غلظت پروتئین کل ساقه افزایش می‌یابد (نمودار ۳ و جدول‌های ۵ و ۶).

#### اثرات سولفات روی بر غلظت پروتئین در ریشه گیاه لوبیا

نتایج نشان می‌دهد که سولفات روی در غلظت‌های پایین (۲۵، ۵۰ و ۷۵ میکرومولار) باعث کاهش غلظت پروتئین ریشه نسبت به گیاهان شاهد شده است؛ در حالی که افزایش غلظت سولفات روی از ۱۵۰ میکرومولار به بالاتر، باعث افزایش تجمع پروتئین ریشه نسبت به نمونه شاهد می‌شود (نمودار

غلظت روی و تجمع آن در برگ‌ها برخوردار هستند (نمودار ۴ و جدول‌های ۷ و ۸).

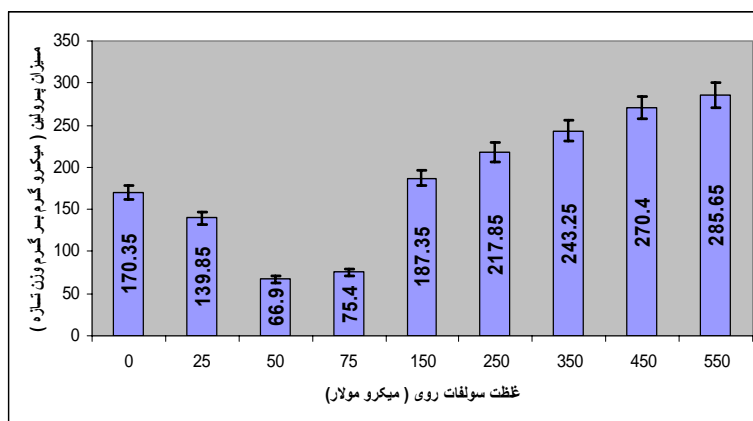
### اثرات سولفات روی بر میزان تجمع عنصر روی در برگ گیاه

در این بررسی مشاهده شد که گیاهان لوبیا از روند افزایش تدریجی معنی‌داری از دیدگاه افزایش

جدول ۲- اختلاف بین میانگین‌های آنتوسیانین در غلظت‌های مختلف سولفات روی در برگ گیاه لوبیا (Mean ± SE).

Zn So4 (μM)	$\bar{x}_0(0)$	$\bar{x}_1(25)$	$\bar{x}_2(50)$	$\bar{x}_3(75)$	$\bar{x}_4(150)$	$\bar{x}_5(250)$	$\bar{x}_6(350)$	$\bar{x}_7(450)$	$\bar{x}_8(550)$
$\bar{x}_0(0)$	0	0.003	0.001	0.009	0.014	0.029*	0.049*	0.079*	0.174*
Zn So4 (μM)	$\bar{x}_1(25)$	0	0.002	0.012	0.017*	0.032*	0.052*	0.082*	0.177*
$\bar{x}_0(0)$	$\bar{x}_0(0)$	$\bar{x}_2(50)$	0	0.010	0.015	0.030*	0.050*	0.080*	0.175*
		$\bar{x}_3(75)$	0	0.005	0.020*	0.040*	0.070*	0.165*	
			$\bar{x}_4(150)$	0	0.015	0.035*	0.065*	0.160*	
				$\bar{x}_5(250)$	0	0.020*	0.050*	0.145*	
					$\bar{x}_6(350)$	0	0.030*	0.125*	
						$\bar{x}_7(450)$	0	0.095*	
							$\bar{x}_8(550)$	0	

\*: معنی‌دار در سطح احتمال (P < 0.05).



نمودار ۲ - اثر غلظت‌های مختلف سولفات روی بر غلظت پرولین در ریشه گیاه لوبیا (Mean ± SE).

می‌دهند (نمودار ۵). این کاهش به صورت تدریجی و معنی‌دار است (جدول‌های ۹ و ۱۰). در واقع، روی به طور رقابتی با یون‌های آهن از جذب و ورود این یون‌ها به درون سلول گیاهی ممانعت کرده است.

### اثرات سولفات روی بر میزان تجمع عنصر آهن در برگ گیاه

گیاهان لوبیا با افزایش غلظت سولفات روی (۷۵ میکرومولار به بالا) در محلول غذایی مورد استفاده خود، روند کاهشی محتوای آهن را در برگ‌ها نشان

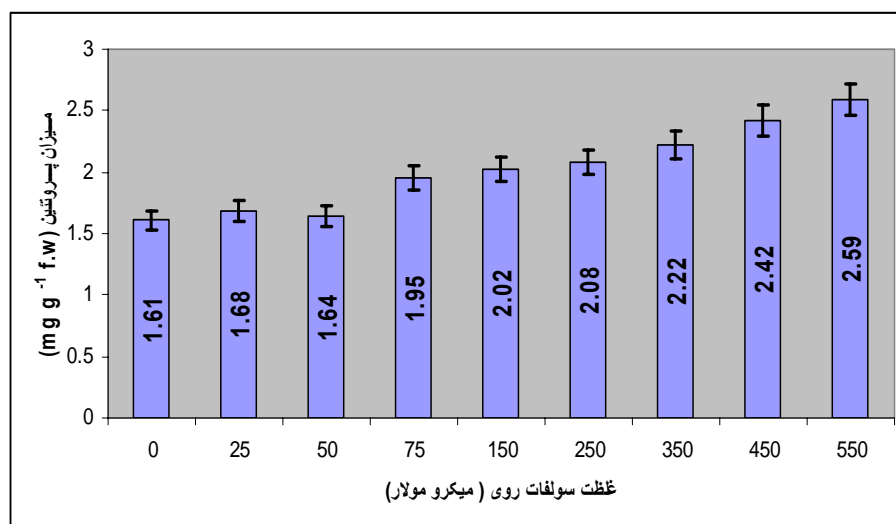
جدول ۳ - مقادیر مربوط به میزان پرولین در غلظت‌های مختلف سولفات روی در ریشه گیاه لوبیا (Mean ± SE).

تیمار سولفات روی (میکرو مولار)	Proline (µg/g f. w.)
0	170.42 ± 1.07
25	139.81 ± 0.96
50	66.70 ± 0.80
75	75.60 ± 1.50
150	187.32 ± 1.02
250	217.75 ± 0.22
350	243.33 ± 0.63
450	270.45 ± 0.95
550	285.65 ± 0.15
F	7623.6
P	< 0.05

جدول ۴ - اختلاف بین میانگین‌های میزان پرولین در ریشه لوبیا در غلظت‌های مختلف سولفات روی (Mean ± SE).

ZnSO <sub>4</sub> (µM)	X <sub>0</sub> (0)	X <sub>1</sub> (25)	X <sub>2</sub> (50)	X <sub>3</sub> (75)	X <sub>4</sub> (150)	X <sub>5</sub> (250)	X <sub>6</sub> (350)	X <sub>7</sub> (450)	X <sub>8</sub> (550)
$\bar{x}_0(0)$	0	30.61*	103.72*	94.82*	16.9*	47.33*	72.91*	100.02*	115.2*
$\bar{x}_1(25)$	0	73.11*	64.21*	47.51*	77.94*	103.52*	130.64*	145.84*	
$\bar{x}_2(50)$	0	8.9*	120.6*	151.0*	176.6*	203.75*	218.95*		
$\bar{x}_3(75)$	0	111.7*	142.1*	167.7*	194.8*	210.0*			
$\bar{x}_4(150)$	0	30.4*	56.0*	83.1*	98.3*				
$\bar{x}_5(250)$	0	25.5*	52.6*	67.8*					
$\bar{x}_6(350)$	0	27.1*	42.3*						
$\bar{x}_7(450)$	0	15.2*							
$\bar{x}_8(550)$	0								

\*: معنی‌دار در سطح احتمال (P < 0.05).



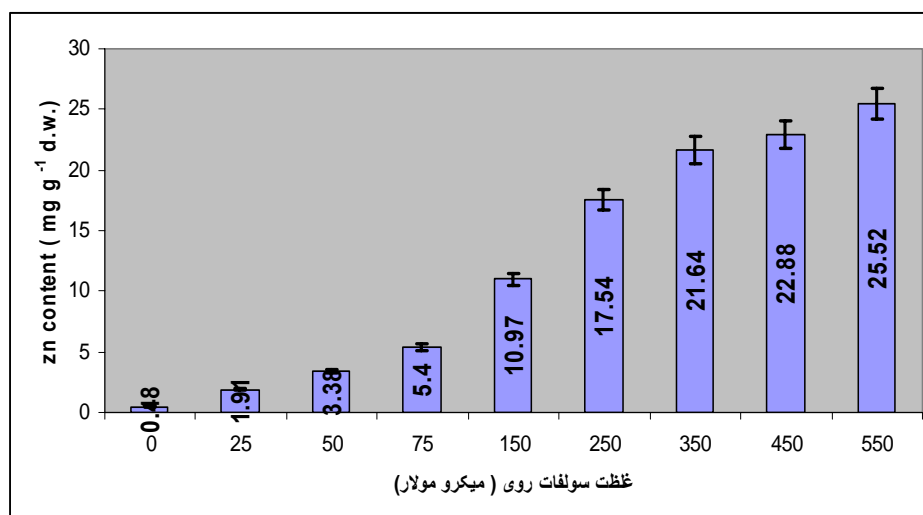
نمودار ۳ - اثر غلظت‌های مختلف سولفات روی بر غلظت پرولین کل در ساقه گیاه لوبیا (Mean ± SE).

جدول ۵- مقادیر مربوط به پروتئین کل در غلظت‌های مختلف سولفات روی در ساقه گیاه لوبیا (Mean ±SE).

تیمار سولفات روی (میکرو مولار)	میزان پروتئین (mg/g f. w.)
0	1.61 ± 0.02
25	1.68 ± 0.01
50	1.64 ± 0.02
75	1.95 ± 0.05
150	2.03 ± 0.01
250	2.08 ± 0.01
350	2.21 ± 0.02
450	2.41 ± 0.02
550	2.58 ± 0.02
F	332.6
P	< 0.05

جدول ۶- اختلاف بین میانگین‌های پروتئین کل در غلظت‌های مختلف سولفات روی در ساقه گیاه لوبیا (Mean ±SE).

Zn SO4 (μM)	X <sub>0</sub> (0)	X <sub>1</sub> (25)	X <sub>2</sub> (50)	X <sub>3</sub> (75)	X <sub>4</sub> (150)	X <sub>5</sub> (250)	X <sub>6</sub> (350)	X <sub>7</sub> (450)	X <sub>8</sub> (550)
$\bar{x}_0(0)$	0	0.07*	0.03	0.34*	0.42*	0.47*	0.60*	0.80*	0.97*
$\bar{x}_1(25)$		0	0.03	0.27*	0.35*	0.40*	0.53*	0.73*	0.90*
$\bar{x}_2(50)$			0	0.30*	0.38*	0.43*	0.57*	0.77*	0.94*
$\bar{x}_3(75)$				0	0.08*	0.13*	0.26	0.46*	0.63*
$\bar{x}_4(150)$					0	0.05	0.18*	0.38*	0.55*
$\bar{x}_5(250)$						0	0.13*	0.33*	0.50*
$\bar{x}_6(350)$							0	0.20*	0.37*
$\bar{x}_7(450)$								0	0.17*
$\bar{x}_8(550)$									0



نمودار ۴ - اثر غلظت‌های مختلف سولفات روی بر غلظت روی در برگ گیاه لوبیا (Mean ± SE).



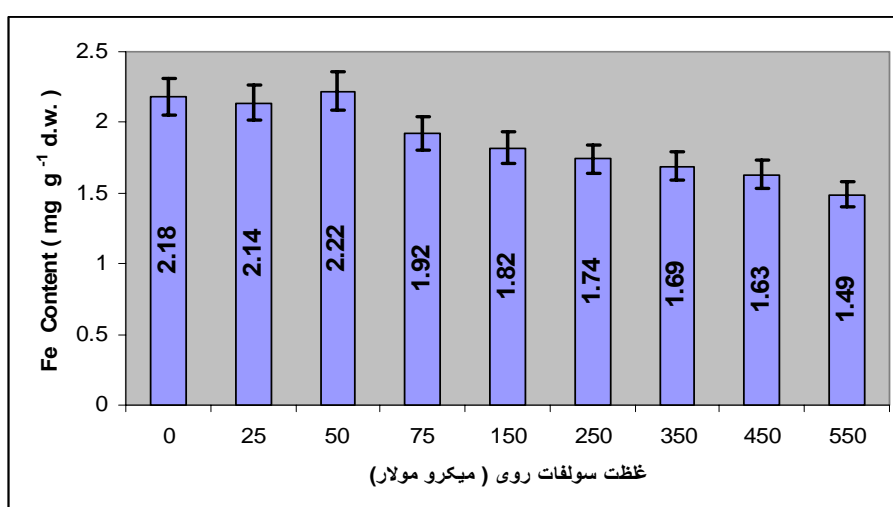
جدول ۷ - مقادیر مربوط به میزان روی در غلظت‌های مختلف سولفات روی در برگ گیاه لوبیا (Mean ±SE).

تیمارسولفات روی (میکرو مولار)	Zn content (mg/g d. w.)
0	0.48 ± 0.010
25	1.91 ± 0.010
50	3.38 ± 0.010
75	5.40 ± 0.020
150	10.97 ± 0.010
250	17.54 ± 0.015
350	21.64 ± 0.010
450	22.88 ± 0.010
550	25.52 ± 0.010
F	660527.5
P	< 0.05

جدول ۸ - اختلاف بین میانگین‌های میزان روی در غلظت‌های مختلف سولفات روی در برگ گیاه لوبیا (Mean ±SE).

Zn SO4 (μM)	X <sub>0</sub> (0)	X <sub>1</sub> (25)	X <sub>2</sub> (50)	X <sub>3</sub> (75)	X <sub>4</sub> (150)	X <sub>5</sub> (250)	X <sub>6</sub> (350)	X <sub>7</sub> (450)	X <sub>8</sub> (550)
$\bar{x}_0(0)$	0	1.43*	2.90*	4.92*	10.49*	17.06*	21.16*	22.40*	25.04*
$\bar{x}_1(25)$		0	1.47*	3.49*	9.06*	15.63*	19.73*	20.97*	23.61*
$\bar{x}_2(50)$			0	2.02*	7.59*	14.16*	18.26*	19.50*	22.14*
$\bar{x}_3(75)$				0	5.57*	12.14*	16.24*	17.48*	20.12*
$\bar{x}_4(150)$					0	6.57*	10.67*	11.91*	14.55*
$\bar{x}_5(250)$						0	4.09*	5.33*	7.97*
$\bar{x}_6(350)$							0	1.24*	3.88*
$\bar{x}_7(450)$								0	2.64*
$\bar{x}_8(550)$									0

\*: معنی‌دار در سطح احتمال (P < 0.05).



نمودار ۵ - اثر غلظت‌های مختلف سولفات روی بر غلظت آهن در برگ گیاه لوبیا (Mean ± SE).

جدول ۹- مقادیر مربوط به میزان آهن در غلظت‌های مختلف سولفات روی در برگ گیاه لوبیا (Mean ±SE).

تیمار سولفات روی (میکرو مولار)	Fe content (mg g <sup>-1</sup> d. w. )
0	2.18 ± 0.02
25	2.14 ± 0.04
50	2.22 ± 0.01
75	1.92 ± 0.02
150	1.82 ± 0.03
250	1.74 ± 0.00
350	1.69 ± 0.00
450	1.63 ± 0.04
550	1.49 ± 0.05
F	9.44
P	< 0.05

جدول ۱۰- اختلاف بین میانگین‌های میزان آهن در غلظت‌های مختلف سولفات روی در برگ گیاه لوبیا (Mean ±SE).

Zn SO4 (μM)	X <sub>0</sub> (0)	X <sub>1</sub> (25)	X <sub>2</sub> (50)	X <sub>3</sub> (75)	X <sub>4</sub> (150)	X <sub>5</sub> (250)	X <sub>6</sub> (350)	X <sub>7</sub> (450)	X <sub>8</sub> (550)
$\bar{x}_0(0)$	0	0.04	0.04	0.26*	0.36*	0.44*	0.48*	0.54*	0.69*
	$\bar{x}_1(25)$	0	0.08*	0.22*	0.32*	0.40*	0.44*	0.50*	0.65*
		$\bar{x}_2(50)$	0	0.30*	0.40*	0.48*	0.52*	0.58*	0.73*
			$\bar{x}_3(75)$	0	0.10*	0.18*	0.22*	0.28*	0.43*
				$\bar{x}_4(150)$	0	0.08*	0.12*	0.18*	0.33*
					$\bar{x}_5(250)$	0	0.04	0.10*	0.25*
						$\bar{x}_6(350)$	0	0.06	0.20*
							$\bar{x}_7(450)$	0	0.14*
								$\bar{x}_8(550)$	0

### بحث

#### بررسی تغییرات غلظت آنتوسیانین در برگ گیاهان تحت تیمار سولفات روی

گیاهان در مقابله با تنش‌های ایجاد شده، اثر فلزات سنگین، یک سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی با ساز و کارهای آنزیمی و غیرآنزیمی دارند که می‌تواند رادیکال‌های آزاد اکسیژن را از بین ببرد. سیستم دفاعی غیرآنزیمی در گیاهان، شامل ترکیبات آنتی-اکسیدان مانند آنتوسیانین‌ها، کاروتنوئیدها، اسید آسکوربیک و ترکیبات فنلی است. این ترکیبات، نه تنها رادیکال‌های آزاد را از بین می‌برند، بلکه از تولید بیشتر آن‌ها در گیاه نیز جلوگیری می‌کنند (۴). در این پژوهش، میزان آنتوسیانین در غلظت‌های بالای سولفات روی (۲۵۰ میکرومولار به بالا) به‌طور

معنی‌داری افزایش یافت. این نتایج با گزارش Kong و همکاران (۲۰۰۳) مبنی بر این‌که میزان آنتوسیانین‌ها و سایر رنگدانه‌ها در گیاه به موقعیت و محیط رویشی آن‌ها بستگی دارد و در نتیجه ورود تنش‌های محیطی سنتز آن‌ها در گیاه افزایش می‌یابد مطابق است (۱۹). آنتوسیانین‌ها به احتمال زیاد باعث تسهیل ورود فلزات سنگین به واکوئل سلول‌ها و در نتیجه، جمع‌آوری آن‌ها از سایر بخش‌ها می‌شوند. این ترکیبات به‌عنوان سیستم محافظتی گیاه، در برابر تنش اکسیداتیو، از افزایش میزان پراکسیداسیون لیپیدها جلوگیری می‌کنند (۸). از طرفی، فلز روی در غلظت‌های بالا، با تاثیرگذاری بر آنزیم‌های دخیل در فتوسنتز و همچنین با متلاشی کردن غشاءهای فتوسنتزی، باعث اختلال در عملکرد و ساختار کلروپلاستی می‌شود. این امر می‌تواند منجر به

هیدروکسیل و سایر ترکیبات دارای فعالیت بالا که تحت شرایط تنش تولید شده و در انتقال الکترون در کلروپلاست‌ها و میتوکندری‌ها ایجاد اختلال می‌کنند، تظاهر می‌کند و از این طریق، پروتئین‌ها و غشاء‌ها را در برابر آسیب محافظت می‌نماید (۲۲).

این اسیدآمین می‌تواند در تنظیم اسمزی، موثر بوده و یا به عنوان بافر احیایی در طی تنش، عمل کند. پرولین با محافظت از آنزیم‌ها، غشاء سلولی و پلی‌ریبوزوم‌ها و همچنین توان ثابت نگه‌داشتن نسبت  $\text{NAD(P)}^+ / \text{NAD(P)}\text{H}$  در شرایط تنش، مثل شرایط رشد طبیعی و تنظیم pH سلولی، نقش مهمی را در حفظ حیات گیاه بازی می‌کند (۲۳). به‌طور کلی، پرولین از طریق تشکیل کمپلکس‌های پایدار با رادیکال‌های آزاد می‌تواند از اثرات سمیت آلاینده‌ها بکاهد. به‌نظر می‌رسد تجمع پرولین در نتیجه ارتباط آن با مسیر پنتوز فسفات باشد. مسیر پنتوز فسفات، مسیر متابولیسم گلوکوزی است که منجر به تشکیل محصولات ویژه‌ای می‌شود که برای رشد سلولی، مورد نیاز است. افزایش فعالیت‌های آنابولیک که مورد نیاز برای ایجاد لیگنین است، به‌طور کلی در مواقع نیاز بالا به قندهای چهارکربنه و احیاءکننده‌ها و  $\text{NADPH}$  اتفاق می‌افتد. تبدیل پرولین 5 کربوکسیلات به پرولین، باعث تولید سطوح بالای  $\text{NADP}^+$  می‌شود که در فرآیند ایجاد لیگنین، مورد نیاز است (۲۴).

#### بررسی تغییرات غلظت پروتئین در ساقه گیاهان تحت تیمار سولفات روی

افزایش غلظت سولفات روی محیط کشت گیاه، سبب افزایش غلظت پروتئین کل در ساقه گیاه می‌شود. روی به‌عنوان کوفاکتور آنزیم RNA پلیمراز، نقش اساسی در سنتز پروتئین‌ها دارد. اثر اصلی روی بر افزایش متابولیسم پروتئین‌ها، اثر آن در ثبات و عملکرد مواد ژنتیکی است (۲۵). قرار گرفتن گیاه در معرض تنش‌های محیطی مانند حرارت بالا، شوری، خشکی و فلزات سنگین باعث می‌شود که گیاه شروع به سنتز پروتئین‌هایی به نام پروتئین‌های شوک گرمایی ((Heat shock Protein (HSPs))

افزایش حساسیت به سطوح بالای نور شود و بنابراین، تولید رنگیزه‌های محافظ نور مانند آنتوسیانین می‌تواند موجب حفاظت در برابر آسیب اکسیداتیو الفاء شده با نور باشد. این پدیده می‌تواند دلیل محکمی برای افزایش تدریجی محتوای آنتوسیانین برگی هم‌زمان با افزایش غلظت روی باشد (۵).

#### نتایج حاصل از اندازه‌گیری غلظت پرولین در ریشه گیاهان تحت تیمار سولفات روی

اندازه‌گیری محتوای پرولین، افزایش میزان این ماده را با افزایش میزان فلز روی نشان می‌دهد که این افزایش از تیمارهای ۲۵۰ میکرومولار سولفات روی به بالا معنی‌دار بود. این مسأله تایید می‌کند که تا غلظت ۱۵۰ میکرو مولار سولفات روی، تنش فلزی به گیاه وارد نشده، ولی پس از آن، تنش و شرایط تنش‌زا برای گیاه، معنی پیدا می‌کند. بنابراین، تا غلظت ۱۵۰ میکرومولار، منابع کربن صرف ساخت و حتی ذخیره قند می‌گردد که این مواد صرف رشد گیاه می‌شوند، اما از این غلظت بالاتر نسبت‌های یونی به‌هم خورده و افزایش پرولین از این مرحله به بعد به‌عنوان نوعی مکانیسم مقاومت گیاهی به تنش حاصل از فلز روی وارد عمل می‌شود (۲۰). Sudhakar و همکاران (۱۹۹۳) معتقدند سازش گیاهان به تنش‌های محیطی از جمله خشکی و فلزات سنگین با انباشتن متابولیت‌های نیتروژن‌دار مانند پرولین انجام می‌گیرد. از آنجایی که این متابولیت‌ها تعارضی با واکنش‌های بیوشیمیایی ندارند، به متابولیت‌های سازگار معروفند (۲۱). افزایش پرولین در گیاه در پاسخ به گستره وسیعی از تنش‌های زیستی و غیرزیستی به اثبات رسیده است. ریشه به‌عنوان یک اندام تحت‌تأثیر مستقیم نقش افزایشی قابل‌توجهی را از نظر میزان پرولین نشان می‌دهد. پرولین دارای نقش‌های مختلف در گیاه در شرایط تنش است، به این ترتیب که به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم با ماکرو مولکول‌ها اثر متقابل داشته و به حفظ شکل و ساختار طبیعی آن‌ها تحت شرایط تنش کمک می‌کند (۲۰). Tattini و همکاران (۱۹۹۶) معتقدند که نقش آنتی‌اکسیدانی پرولین در توانایی آن برای غیرفعال کردن رادیکال‌های

کند که به آن‌ها پروتئین‌های تنشی نیز گفته می‌شود (۲۶).

افزایش میزان پروتئین کل علی‌رغم کاهش رشد می‌تواند بیانگر افزایش پروتئین‌هایی با وزن مولکولی کم باشد که سنتز این پروتئین‌ها تحت تنش فلزات سنگین القاء می‌شود و افزایش این پروتئین‌ها هم-زمان با افزایش تجمع روی در گیاه است. این پروتئین‌ها توسط محققین زیادی در گیاهان مختلف شناخته شده‌اند که در واقع، روی و برخی فلزات سنگین دیگر مکانیسم خاصی از پیوند با گروه تیول اسیدآمینو سیستئین در این پروتئین‌ها دارند. اتصال فلز سنگین به پروتئین، نوعی عمل حفاظتی است و جهت تقلیل اثرات سمی فلز به کار می‌رود (۲۶).

Stresty و Madhava Rao (۱۹۹۹) با مطالعه سلول‌های ریشه گیاهان مسموم شده با روی دریافتند که در این سلول‌ها سیتوپلاسم، ساختار خود را از دست داده، اکثر اندامک‌ها از بین رفته، واکوئل‌های سلولی، گسترش و تعداد هستک‌ها درون هسته در پاسخ به روی، افزایش می‌یابد و این امر موجب سنتز بیشتر یک‌سری پروتئین‌های مقاوم در برابر فلزات سنگین در گیاه می‌شود (۲۷). افزایش پروتئین کل گیاه در پاسخ به روی شاید با مهار خسارت به پروتئین‌های غشاءهای سلولی، نقش حفاظتی مهمی را برای گیاه داشته باشد (۲۷).

Zenk و Kneer نیز معتقدند که در اندام گیاهی تحت تنش عناصر سنگین و به‌ویژه روی، فعالیت یک‌باره آنزیم‌های دخیل در ساخت پروتئین ویژه تنش عناصر سنگین (فیتوکلانتین) موجب افزایش محتوی پروتئین اندام می‌گردد (۲۸). سنتز فیتوکلانتین‌ها در حضور فلز روی ممکن است از دلایل دیگر افزایش محتوای پروتئین کل در گیاه باشد. روی با پروتئین‌های کلات‌کننده، تشکیل کمپلکس داده و میزان سمیت آن تخفیف می‌یابد (۲۹).

Prasad (۱۹۹۵) معتقد است که توان ساخت اکثر پروتئین‌های تنش در مقابل مقادیری از محرک فلزی (تنش)، دلیلی بر پیشرفته‌بودن سیستم آنزیمی گیاه در راستای بردباری به تجمع عناصر سنگین در محیط است (۳۰).

## بررسی تغییرات غلظت عنصر روی در برگ‌ها با افزایش غلظت سولفات روی در تیمارها

با افزایش روی، میزان جذب و تجمع روی در گیاه لوبیا افزایش یافت. این تحقیق ثابت کرد که گیاه لوبیا دارای ویژگی‌هایی است که توانسته است روی را به خوبی به اندام‌های هوایی خود انتقال دهد. شاید یکی از دلایل این پدیده آن باشد که لوبیاهایی که مورد تیمار با روی قرار گرفته‌اند کاملاً جوان بوده‌اند و نوار سوپرینی در اطراف آندودرم آن‌ها به طور کامل ساخته نشده است و روی به راحتی از سد آندودرمی گذشته است (۳۱،۳۲).

یون‌های فلزی مثل روی و منگنز می‌توانند با گروه‌های کربوکسیل دیواره پیوند برقرار کنند و در دیواره سلولی گیاه تجمع یابند. بنابراین، ظرفیت پیوند کاتیونی در دیواره‌ی سلولی، عامل مهمی است که میزان تحمل گیاه را به فلزات سنگین تعیین می‌کند (۳۳). همچنین Jackson (۱۹۹۱) در آزمایش‌های خود متوجه شد که در هضم دیواره سلولی با تریپسین، مقدار معنی‌داری فلز روی آزاد نمی‌شود، این در حالی است که با اضافه کردن سلولاز به دیواره، حدود ۶۶ درصد از روی آزاد شد. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که سوپسترای اصلی در دیواره برای اتصال به فلز روی، سلولز است نه آن‌که پروتئین‌های دیواره سلولی باشند (۳۳).

دیواره سلولی به‌عنوان یک جز، اصلی در تحمل گیاه به فلزات سنگین شرکت دارد، ولی جزء دیگر که میزان انتقال فلزات را تنظیم می‌کند، نیازهای متابولیکی است. روی به عنوان یک کوفاکتور اصلی برای فعالیت شماری از آنزیم‌های سیتوپلاسمیک مانند سوپراکسید دیسموتاز و کربونیک آنهیدراز مورد نیاز است و این امر می‌تواند دلیل اصلی ورود و جذب روی به داخل سیتوپلاسم باشد (۳۴).

## بررسی اثرات روی بر غلظت عنصر آهن در برگ گیاهان تحت تیمار سولفات روی

یون‌های مثبت هنگام عبور از محلول محیط بیرون به درون ریشه‌ها با گروه‌های دارای بار الکتریکی منفی در فضای آزاد دیواره‌های سلول،

(۳۷) نیز معتقد است که دو فلز روی و منگنز، مانع عملکرد آهن در برگ در جهت سنتز کلروفیل می‌شوند و مهم‌ترین نقش آهن در بیوسنتز کلروفیل کنترل تشکیل گاما-آمینو لولینیک اسید به‌عنوان پیش‌ساز مشترک بیوسنتز کلروفیل و گروه هم است. علاوه بر این، یون آهن برای تشکیل پروتوکلروفیلید از Mg-پروتوپورفیرین در مسیر سنتز کلروفیل ضروری است (۳۷). تغییرات میزان آهن، منگنز و فسفر در بخش‌های مختلف گیاهی به‌دلیل غلظت بالای فلز سنگین روی می‌تواند در توجیه کاهش رشد طولی و سطح برگ گیاه مفید باشد.

### تقدیر و تشکر

از کلیه اساتید و کارشناسان گروه کارشناسی ارشد فیزیولوژی گیاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات که ما را در اجرای این تحقیق یاری نمودند، نهایت قدردانی را داریم.

برهم‌کنش دارند. گر چه این برهم‌کنش ممکن است بر جابه‌جایی بعدی به فضاهای درونی (سیتوپلاسم و واکوئل‌ها) اثر گذارد، اما ویژگی‌های جذب یون از سوی ریشه‌ها به طور عمده با جابه‌جایی از درون غشاء‌ها به ویژه غشای سیتوپلاسم تعیین می‌شود. با وجود ویژگی‌های پویای غشاء‌ها برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی یون‌ها و دیگر مواد حل‌شده به-ویژه شعاع یونی و بار الکتریکی آن‌هاست که تعیین‌کننده میزان جذب و جابه‌جایی آن‌ها از درون غشاست (۳۵). به دلیل بروز خاصیت بازدارندگی بین دو عنصر آهن و روی در گیاه، جذب آهن در غلظت‌های بالای روی، کاهش می‌یابد. اثر منفی افزایش فلز روی بر کاهش جذب آهن در گیاه *(Mentha arvensis L)* توسط چند محقق مورد مطالعه قرار گرفته است. آن‌ها چنین پیشنهاد کردند که سمیت روی، سبب القای علائم کمبود آهن در گیاه نعنای می‌شود (۳۶). همچنین اثر متقابل روی و آهن در گیاه ذرت، توسط Rosen و همکاران (۱۹۷۷) گزارش شده است (۳۵). White (۱۹۷۶)

### منابع مورد استفاده

۱. کریمی، ه. ۱۳۵۷. گیاهان زراعی، انتشارات دانشگاه تهران.
۲. عزیز، ف. ۱۳۷۷. تجزیه و تحلیل چند خصوصیت مورفولوژیک در ژنوتیپ‌های لوبیا، پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی و دانشگاه صنعتی اصفهان.
۳. خاوری نژاد، ر. ۱۳۷۴. اصول آمار زیستی، انتشارات دانشگاه تربیت معلم.
۴. خاوری نژاد، ر. ۱۳۷۸. فیزیولوژی گیاهی عملی، تهران، انتشارات امید.
۵. علمی، ح. ۱۳۸۲. بررسی اثر کادمیوم و روی بر برخی از شاخص‌های رشد و القای تنش اکسیداتیو در گیاه کلزا، پایان‌نامه دوره کارشناسی ارشد، دانشگاه کرمان.
6. Lopez-Millan, A., Ellis, D., Grusak, M., 2005. Effect of zinc and manganese supply on the activities of superoxide dismutase and carbonic anhydrase in *Medicago truncatula* wild type and *raz* mutant plants. *Plant Science* 168: 1015-1022.
7. Hong, W., Ji-yun, J., 2007. Effects of zinc deficiency and drought on plant growth and metabolism of reactive oxygen species in Maize (*Zea mays* L.). *Agricultural Sciences in China* 6: 988-995.
8. Mittler, R., 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Science* 7: 405-410.
9. Mei, Y., Lei, Sh., Fang-Sen, X., Jian-Wei, L., Yun-Hua, W., 2009. Effects of B, Mo, Zn, and their interactions on seed yield of rapeseed (*Brassica napus* L.). *Pedosphere* 19: 53-59.
10. Ben Ghnaya, A., 2007. Morphological and physiological characteristics of rapeseed plants regenerated *in vitro* from thin cell layers in the presence of zinc. *Plant Biology* 330: 728-734.
11. Zhi-xin, Y., Shu-qing, L., Da-wei, Zh., Sheng-dong, F., 2006. Effects of cadmium zinc and lead on soil enzyme activities. *Journal of Environmental Sciences* 6: 1135-1141.

12. Gadallah, M., 2000. Effects of indole-3-acetic acid and zinc on the growth, osmotic potential and soluble carbon and nitrogen components of soybean plants growing under water deficit. *Journal of Arid Environments* 44: 451-467.
13. Hoagland, D., Arnon, D., 1957. California agriculture experiment station. Circular 347: 30-37.
14. Wanger, G., 1979. Content and vacuole/extra vacuole distribution of neutral sugars, free amino acids, and anthocyanins in protoplasts. *Plant Physiology* 64: 88-93.
15. Vatai, T., Skerget, M., Knez, Z., Kareth, S., 2008. Extraction and formulation of anthocyanin concentrates grape residues. *Journal of Super Critical Fluids* 22: 12-17.
16. Bates, L., Waldren, R., Teare, D., 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil* 39: 205-207.
17. Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analysis Biochemistry* 72: 248-254.
18. Sanger, S., Kneer, P., Wanner, G., Cosson, J., Neumann, B., Zenk, M., 1998. Hyperaccumulation complexation and distribution of nickel in *Sebertia acuminata*. *Phytochemistry* 47: 339-347.
19. Kong, J. M., Chia, L. S., Goh, N. K., Chia, T. F., Brouillard, R., 2003. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry* 64: 923-933.
20. Bohnert, H., Nelson, D., Jensen, R., 1995. Adaptation to environmental stresses. *Plant Cell* 79: 1098-1111.
21. Sudhakar, C., Reddy, P. S., Veeranjanyulu, K., 1993. Effect of salt stress on the enzymes of proline synthesis and oxidation in Green gram seedling. *Journal of Plant Physiology* 141: 621-623.
22. Tattini, M., Gucci, R., Romani, A., Baldi, A., Everard, J. D., 1996. Change in nonstructural carbohydrates in olive leaves during root zone salinity stress. *Physiologia Plantarum* 98: 117-124.
23. Delauney, A. J., Verma, D. P. S., 1993. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant Journal* 4: 215-223.
24. Zhang, F., Wang, Y., Lou, Z., Dong, J., 2007. Effect of heavy metal stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of two mangrove plant seedlings (*Kandelia candel* and *Bruguiera gymnorrhiza*). *Chemosphere* 67: 44-50.
25. Rion, B., Alloway, J., 2004. Fundamental aspects of Zinc in soils and plants. *International Zinc Association* 23: 1-128.
26. Sanita di Toppi, L., Gabrielli, R., 1999. Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany* 41: 105-130.
27. Stresty, T., Madhava Rao, K., 1999. Ultrastructural alterations in response to zinc and nickel stress in the root cells of *pigeonpia*. *Environmental and Experimental Botany* 41: 3-13.
28. Kneer, R., Zenk, M., 1992. Phytochelations protect plant enzymes from heavy metal poisoning. *Phytochemistry* 931: 2663-2667.
29. Rout, G. R., Das, P., 2003. Effect of metal toxicity on plant growth and metabolism. *Agronomy and Soil Science* 23: 3-11.
30. Prasad, M., 1995. Cadmium toxicity and tolerance in vascular plant. *Environmental and Experimental Botany* 35: 525-545.
31. Marschner, P., God blod, D., Jutschhe, G., 1996. Dynamics of lead accumulation in mycorrhizal and non mycorrhizal Norway spruce (*Picea abies*). *Plant Soil* 178: 239-245.
32. Pedas, P., Schjoerring, J., Husted, S., 2009. Identification and characterization of zinc-starvation-induced ZIP transporters from barley roots. *Plant Physiology and Biochemistry* 47: 377-383.
33. Jackson, P., 1991. Low molecular weight metal complexes in the fresh water moss *Rhyncostegium riparoides* exposed to elevated concentrations of Zn, Cu, Cd and Pb in the laboratory and field. *Environ Experimental Botany* 31: 359-366.
34. Wynn-Jones, R., 1971. Physiological and biochemical basis for heavy metal tolerance in clones of *Agrostis tenuis*. *Plant Nutrition* 121: 575-583.
35. Rosen, J. A., Pike, C. S., Golden, M. L., 1977. Zinc, iron and chlorophyll metabolism in Zinc toxic Corn. *Plant Physiology* 59: 1085-1087.
36. Pavlikova, D., Pavlikova, M., Szakova, J., Vasikova, S., Tlustos, P., Balik J., 2002. The effect of Cadmium and Zinc contents in plants on Fe binding into organic substances of spinach biomass. *Rostelinná Vyroba* 48: 531-535.
37. White, R. E., 1976. Studies on the mineral ion absorption by plants. The interaction of aluminum phosphate and pH on the growth of *Medicago sativa*. *Plant and Soil* 46: 195-208.