

بررسی تغییرات پروتئین و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در دو رقم کلزا^۱ در پاسخ به تنش کلرید مس

مه‌لقا قربانلی: دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرگان

*فریبا میقانی: موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور

بهاره اسدالهی: دانشگاه پیام نور، مرکز تهران

چکیده

اثر غلظت‌های متفاوت کلرید مس بر غلظت پروتئین و فعالیت سینتیکی آنزیم کاتالاز و پراکسیداز در برگ و ریشه دو رقم کلزا (پی‌اف و هایولا) در مرحله طوقه‌ای در گل‌خانه به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۴ تیمار (۰، ۱۰۰، ۳۰۰ و ۵۰۰ میکرومولار کلرید مس) و ۴ تکرار بررسی شد. در مجموع با افزایش غلظت کلرید مس، غلظت پروتئین و فعالیت آنزیم کاتالاز و پراکسیداز افزایش یافت و این افزایش در رقم پی‌اف بیشتر از رقم هایولا و در ریشه بیشتر از برگ بود. بدین‌ترتیب با بررسی رفتار فیزیولوژیکی ارقام بررسی شده به نظر می‌رسد رقم پی‌اف با توانایی بیشتر حفظ پروتئین و افزایش بیشتر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در شرایط تنش در مقایسه با رقم هایولا توانایی بیشتری در تحمل تنش مس دارد و به‌عنوان رقم محتمل‌تر به این تنش معرفی می‌شود.

مقدمه

فلزات سنگین از مهم‌ترین آلاینده‌های زیست‌محیطی‌اند [۲۰]. با وجودی که مس جزو عناصر ضروری گیاهان است و نقش آن در رشد گیاهان به اثبات رسیده، اما فلزات سنگینی مانند مس، کادمیوم، روی، جیوه و سرب در غلظت‌های بالا، اثر سویی بر رشد و نمو و عمل‌کرد گیاه دارند [۱۹]. گونه‌ها و ارقام گیاهی توانایی متفاوتی در برخورد با این تنش‌ها دارند [۱].

فلزات سنگین احتمالاً با تولید رادیکال‌های آزاد و اکسیژن فعال موجب تنش اکسیداتیو می‌شوند. این ترکیبات ضمن واکنش با لیبیدها، باعث پراکسیده‌شدن آن‌ها، آسیب‌های غشایی و غیرفعال شدن آنزیم‌ها می‌شوند و بنا بر این حیات سلول را به خطر می‌اندازد [۹]، [۱۳]. البته سلول‌های گیاهی برای حفاظت در مقابل آسیب‌های اکسیداتیو، مجهز به یک سیستم جاروب‌کننده رادیکال‌های آزاد هستند. این سیستم شامل آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان از

واژه‌های کلیدی: تنش مس، پروتئین، کاتالاز، پراکسیداز، ارقام کلزا

پذیرش ۸۹/۸/۲۴

دریافت ۸۸/۴/۲

*نویسنده مسئول

^۱. *Brassica napus* L.

قبیل کاتالاز و نیز سیستم‌های آنتی‌اکسیدان غیر آنزیمی است [۶]، [۲۶]. به عبارت دیگر، در پاسخ به تنش‌های محیطی، از جمله فلزات سنگین، آنزیم‌های سیستم آنتی‌اکسیدان مانند سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، پراکسیداز، گاپاکول پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز فعال می‌شوند [۲۵] آنزیم‌های یاد شده ظاهراً نقش خود را از طریق بیوسنتز دومین دیواره سلولی ایفا می‌کنند. آنزیم پراکسیداز و کاتالاز از ترکیبات اصلی مسئول سم‌زدایی رادیکال‌های سمی اکسیژن در تنش اکسیداتیو محسوب می‌شوند [۹]. هیدروژن پراکسید پایدارترین شکل اکسیژن فعال و قادر به انتشار سریع از عرض غشاهاست [۱۰]، [۱۱]. این ترکیب به‌عنوان محصولی فرعی در آپوپلاست، سیتوزول، کلروپلاست، میتوکندری و پراکسیزوم تولید می‌شود [۳]، [۸].

تغییر بیان ژن که منجر به تولید پروتئین مقاوم به تنش می‌گردد، یکی از راه‌های مقابله گیاهان با تنش‌های محیطی است [۱۵]. تا کنون مجموعه‌ای از پروتئین‌هایی که در ژنوتیپ‌های مقاوم به فلز سنگین وجود دارند، شناسایی شده‌اند. تنش مس، mRNAهای ترجمه‌شدنی را در ریشه‌های جو تغییر می‌دهد و سبب افزایش چشمگیر پروتئین‌های ویژه‌ای می‌شود [۸]. به‌طور کلی، مقاومت به فلزات سنگین حاصل همکاری چند عامل فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی است. یکی از این عوامل ممکن است توانایی اتصال یون‌ها به پروتئین‌ها باشد [۹].

گیاهانی که در معرض تنش‌های محیطی، از جمله فلزات سنگین هستند، علاوه بر سیستم‌های آنتی‌اکسیدان، دارای فرایندهای سم‌زدایی دیگری نیز برای مقابله با این تنش هستند که از آن جمله می‌توان به تشکیل کمپلکس با پیپتیدهایی به نام فیتوکلانتین و سنتز پروتئین‌های شوک اشاره کرد [۷]. گیاهان عالی، جلبک‌ها و قارچ‌ها در پاسخ به فلزات سنگین پیپتیدهای کمپلکس‌دهنده با گروه تیول (SH) به نام فیتوکلانتین می‌سازند [۲۴]. حاصل رونویسی از DNA سلول‌های تنش‌دیده با فلزات سنگین، تولید mRNAهای خاصی است که محصول ترجمه آن‌ها پروتئین‌های مقاوم در برابر تنش اکسیداتیو با وزن مولکولی ۱۰۰۰ تا ۷۰۰۰ دالتون است که سبب حفظ غشا در برابر سمیت فلزات سنگین می‌شوند [۲۹].

با توجه به این‌که کلزا یکی از مهم‌ترین دانه‌های روغنی محسوب می‌شود، با شرایط آب و هوایی مختلف سازش نشان می‌دهد و زراعت آن در مقایسه با زراعت‌های مشابه هزینه کمتر و عملکرد بهتری در پی دارد. هدف پژوهش حاضر بررسی اثر تنش کلرید مس بر غلظت پروتئین و فعالیت سینتیکی آنزیم کاتالاز در دو رقم کلزا (پی‌اف و هایولا) است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و شرایط کشت

برای انجام این پژوهش بذره‌های دو رقم کلزا (پی‌اف و هایولا) از مؤسسه کشت دانه‌های روغنی تهیه شدند. بذره‌های نسبتاً هم‌اندازه و عاری از آسیب یا بیماری استفاده شدند. به‌منظور جلوگیری از آلودگی قارچی، بذره‌های

با آب ژاول ۱۰ درصد استریل و در گلدان‌های پلاستیکی محتوی حدود ۳ کیلوگرم مخلوطی از ماسه-رس به نسبت به ترتیب ۱:۳ کشت شدند. در هر گلدان ۱۰ بذر کاشته شد. آبیاری سطحی ابتدا با آب و سپس هفته‌ای ۲ بار با محلول غذایی هوگلند [۱۴] انجام شد. گلدان‌ها در گلخانه‌ای با شرایط کنترل‌شده (دما: ۲۵/۲۰ درجه سانتی‌گراد، شدت روشنایی: ۳۵۰۰ لوکس، دوره روشنایی: ۱۶/۸ ساعت و رطوبت نسبی: ۴۰-۴۵ درصد) نگهداری شدند. با رسیدن به مرحله طوقه‌ای، گیاهان پس از شستشوی ریشه با آب مقطر به لیوان‌های (۴۳۰ میلی‌لیتری) محتوی محلول هوگلند منتقل شدند. در لیوان‌ها دارای چند سوراخ بود و گیاهان با کمک پنبه طوری در این سوراخ‌ها قرار گرفتند که ریشه آن‌ها در محلول غذایی قرار گرفت. ۳ روز پس از انتقال گیاهان به محلول هوگلند، ضمن تعویض محلول هوگلند، غلظت‌های مختلف کلرید مس (۰، ۱۰۰، ۳۰۰، ۵۰۰ میکرومولار) به لیوان‌ها اضافه شد و گیاهان ۱۰ روز در این محیط قرار گرفتند طی این ۱۰ روز برای ممانعت از خفگی ریشه‌ها روزانه ۲ ساعت هوادهی با استفاده از پمپ هوا انجام می‌شد. پس از اتمام این مدت برگ و ریشه گیاهان از هم جدا شد. این اندام‌ها برای بررسی غلظت پروتئین و سنجش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند [۱۴].

سنجش پروتئین

سنجش غلظت پروتئین با استفاده از روش لوری [۱۸] انجام شد.

سنجش فعالیت کاتالاز

بهمنظور سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز از روش شانس و ماهلی [۵] استفاده شد.

سنجش فعالیت پراکسیداز

برای سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز از روش کوریوی [۱۷] استفاده شد.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

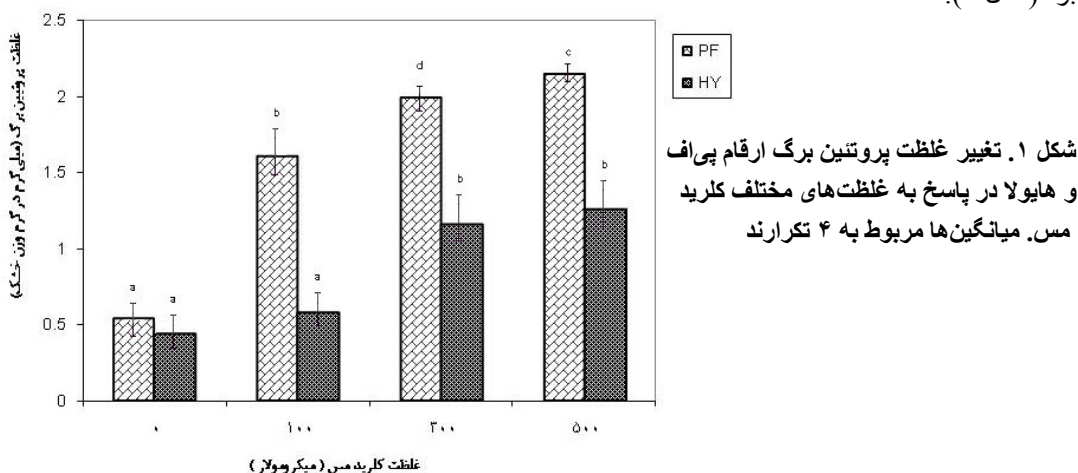
داده‌های حاصل از آزمایش‌های مختلف تجزیه واریانس شدند. آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۴ تیمار (غلظت‌های ۰، ۱۰۰، ۳۰۰ و ۵۰۰ میکرومولار کلرید مس) و ۴ تکرار انجام شد. عامل A: غلظت‌های مختلف کلرید مس و عامل B: ارقام کلزا، یعنی پی‌اف و هایولا بودند. داده‌های آزمایش با استفاده از نرم‌افزار SAS Ver.9 تجزیه واریانس و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن انجام شد.

نتایج

اثر تنش کلرید مس بر غلظت پروتئین

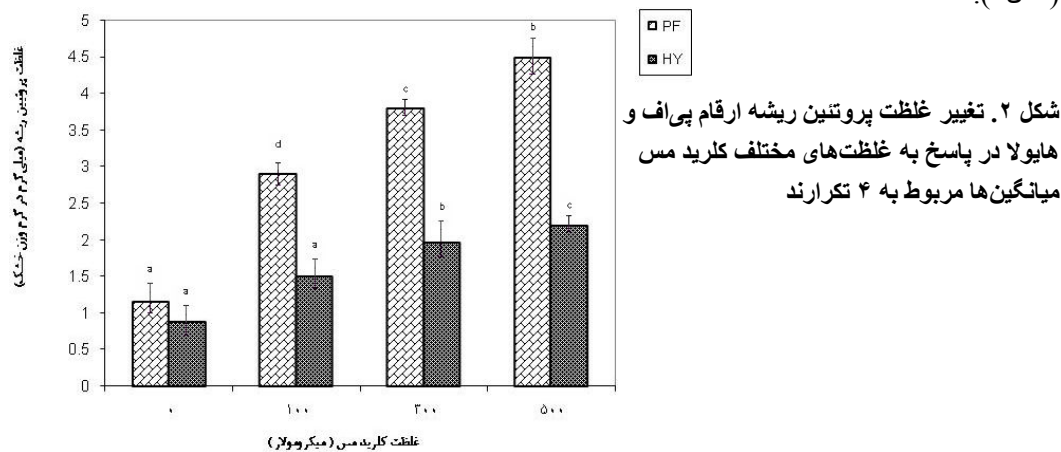
غلظت پروتئین برگ: در رقم پی‌اف، افزایش معنی‌دار ($p < 0/01$) پروتئین برگ مشاهده شد. در بیش‌ترین

غلظت کلرید مس (۵۰۰ میکرومولار)، پروتئین ۴ برابر و در تیمارهای ۱۰۰ و ۳۰۰ میکرومولار کلرید مس به ترتیب ۳ و ۳/۷ برابر شاهد افزایش نشان داد. در رقم هایولا نیز تنش کلرید مس باعث افزایش پروتئین شد. در بیش‌ترین غلظت (۵۰۰ میکرومولار) کلرید مس، پروتئین ۲/۹ برابر و در تیمارهای ۱۰۰ و ۳۰۰ میکرومولار کلرید مس به ترتیب ۱/۳ و ۲/۷ برابر شاهد افزایش نشان داد. تفاوت بین دو رقم در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود (شکل ۱).



شکل ۱. تغییر غلظت پروتئین برگ ارقام پی‌اف و هایولا در پاسخ به غلظت‌های مختلف کلرید مس. میانگین‌ها مربوط به ۴ تکرارند

غلظت پروتئین ریشه: با مقایسه میانگین‌ها در رقم پی‌اف روشن شد که غلظت پروتئین در پاسخ به تیمارهای ۱۰۰، ۳۰۰ و ۵۰۰ میکرومولار کلرید مس به ترتیب ۲/۵، ۳/۳ و ۳/۹ برابر و در رقم هایولا به‌ترتیب بدون تفاوت معنی‌دار، ۱/۶ و ۲ برابر شاهد افزایش یافت. تفاوت بین دو رقم در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود (شکل ۲).

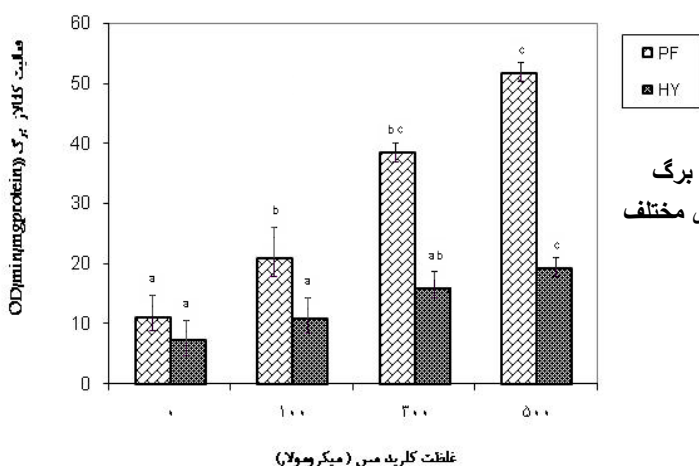


شکل ۲. تغییر غلظت پروتئین ریشه ارقام پی‌اف و هایولا در پاسخ به غلظت‌های مختلف کلرید مس میانگین‌ها مربوط به ۴ تکرارند

اثر تنش کلرید مس بر فعالیت آنزیم کاتالاز

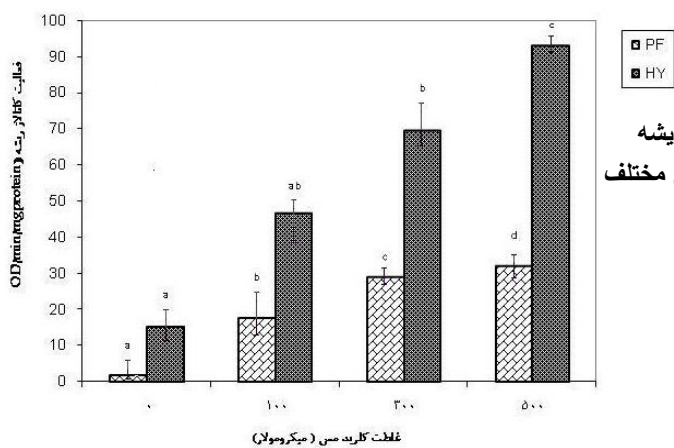
فعالیت کاتالاز برگ: در رقم پی‌اف، اثر تیمارهای کلرید مس بر فعالیت کاتالاز در سطح ۱ درصد معنی‌دار بود. در پاسخ به تیمارهای ۱۰۰، ۳۰۰ و ۵۰۰ میکرومولار کلرید مس، فعالیت کاتالاز به ترتیب ۱/۹، ۳/۵ و ۴/۷ برابر شاهد افزایش نشان داد. در رقم هایولا نیز فعالیت کاتالاز در پاسخ به تیمارهای ۱۰۰، ۳۰۰ و ۵۰۰

میکرومولار به ترتیب ۱/۵، ۲/۲ و ۲/۷ برابر شاهد افزایش یافت. تفاوت بین دو رقم در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود (شکل ۳).



شکل ۳. تغییر فعالیت سینتیکی آنزیم کاتالاز برگ ارقام پی‌اف و هایولا در پاسخ به غلظت‌های مختلف کلرید مس میانگین‌ها مربوط به ۴ تکرارند

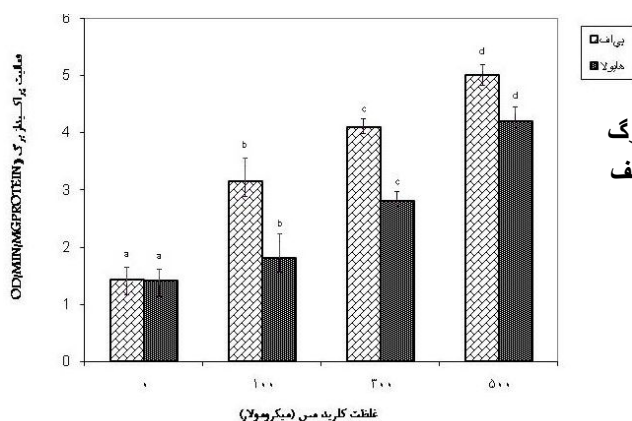
فعالیت کاتالاز ریشه: اثر تیمارهای کلرید مس بر فعالیت کاتالاز در رقم پی‌اف در سطح ۱ درصد معنی‌دار بود. فعالیت کاتالاز در این رقم در حضور کلرید مس ۱۰۰، ۳۰۰ و ۵۰۰ میکرومولار کلرید مس به ترتیب ۹، ۶/۴ و ۱۶ برابر و در رقم هایولا به ترتیب ۳، ۴/۵ و ۶ برابر شاهد افزایش یافت. تفاوت بین دو رقم در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود (شکل ۴).



شکل ۴. تغییر فعالیت سینتیکی آنزیم کاتالاز ریشه ارقام پی‌اف و هایولا در پاسخ به غلظت‌های مختلف کلرید مس. میانگین‌ها مربوط به ۴ تکرارند

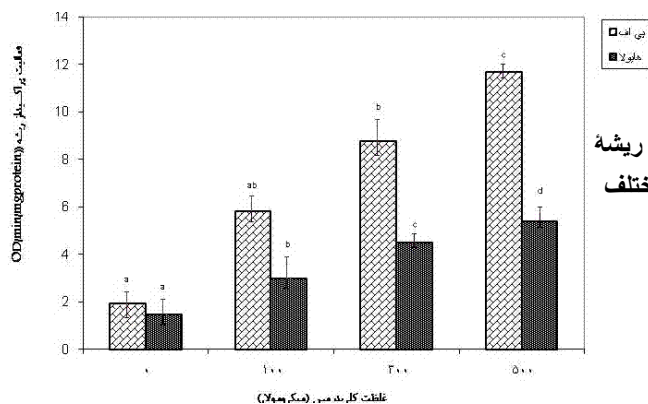
اثر تنش کلرید مس بر فعالیت آنزیم پراکسیداز

فعالیت پراکسیداز برگ: مقایسه میانگین فعالیت پراکسیداز برگ در رقم پی‌اف، نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد بین تیمار شاهد و غلظت‌های ۱۰۰، ۳۰۰ و ۵۰۰ میکرومولار کلرید مس بود. فعالیت پراکسیداز در تیمارهای اخیر به ترتیب ۲/۲، ۲/۹ و ۳/۵ برابر شاهد افزایش نشان داد. در رقم هایولا نیز فعالیت پراکسیداز در پاسخ به کلرید مس ۱۰۰، ۳۰۰ و ۵۰۰ میکرومولار به ترتیب ۱/۳، ۲ و ۳ برابر شاهد افزایش یافت. تفاوت بین دو رقم معنی‌دار نبود (شکل ۵).



شکل ۵. تغییر فعالیت سینتیکی آنزیم پراکسیداز برگ ارقام پی‌اف و هایولا در پاسخ به غلظت‌های مختلف کلرید مس. مقادیر میانگین مربوط به ۴ تکرارند

فعالیت پراکسیداز ریشه: مقایسه میانگین‌ها در رقم پی‌اف نشان داد که تفاوت بین تیمار شاهد با تیمارهای ۱۰۰، ۳۰۰ و ۵۰۰ میکرومولار در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود و فعالیت پراکسیداز در این ۳ سطح به ترتیب ۳، ۴/۵ و ۶ برابر شاهد افزایش یافت. در رقم هایولا نیز فعالیت پراکسیداز با افزایش غلظت کلرید مس تا ۱۰۰، ۳۰۰ و ۵۰۰ میکرومولار به ترتیب ۲، ۳ و ۳/۶ برابر شاهد افزایش یافت. تفاوت بین دو رقم در سطح ۱ درصد معنی‌دار بود (شکل ۶).



شکل ۶. تغییر فعالیت سینتیکی آنزیم پراکسیداز ریشه ارقام پی‌اف و هایولا در پاسخ به غلظت‌های مختلف کلرید مس. میانگین‌ها مربوط به ۴ تکرارند

بحث

اثر کلرید مس بر غلظت پروتئین

در بررسی حاضر، غلظت پروتئین برگ و ریشه در ارقام بررسی شده (به‌ویژه پی‌اف) متناسب با افزایش غلظت کلرید مس در محیط افزایش یافت. به‌نظر می‌رسد افزایش غلظت پروتئین در پاسخ به تنش کلرید مس نوعی سازش گیاه برای تحمل شرایط تنش‌زا باشد. ممکن است رقم پی‌اف با سنتز بیشتر پروتئین در پاسخ به تنش کلرید مس قادر به تحمل بیشتر این تنش در مقایسه با رقم هایولا باشد. در بررسی انباشتگی کاتیون‌ها در حضور تنش کلرید مس نیز انباشتگی بیشتر یون مس در رقم پی‌اف در مقایسه با رقم هایولا مشاهده شد [۲]. بدین‌ترتیب احتمالاً غلظت بیشتر یون مس در رقم پی‌اف باعث القای بیشتر سنتز پروتئین در این رقم در مقایسه با رقم هایولا می‌شود. سنتز پروتئین در پاسخ به تنش‌های محیطی مانند شوک گرمایی، شرایط بی‌هوایی، تنش

فلزات سنگین، تنش خشکی، شوک اسمزی، زخم و شوری تغییر می‌کند. چنین تنش‌هایی سبب افزایش سنتز برخی از پروتئین‌ها و کاهش سنتز عده‌ای دیگر از آن‌ها می‌شود. به نظر می‌رسد که پروتئین‌های القاشده با تنش کلربد مس در تحمل این تنش و ممانعت از اثر سمی آن بر گیاه موثر باشند. یون‌هایی مانند مس، مولیبدن و منیزیم باعث افزایش پروتئین در گیاهان متعددی می‌شوند [۱۲]. در برگ‌های کلزایی که تحت تنش مس قرار گرفته، میزان گلوتامین در زمان کوتاه افزایش چشمگیری می‌یابد [۲۶]. ژن BN_{28} با سنتز پروتئین ویژه‌ای مقاومت گیاه را در مقابل تنش‌ها افزایش می‌دهد [۲۱]، [۲۸].

از سوی دیگر، در پاسخ به تیمارهای کلرید مس سنتز پروتئین در ریشه بیشتر از برگ بود. در بررسی ارقام پی‌اف و هایولا مشاهده شد که تجمع مس در پاسخ به تیمارهای مورد بحث در ریشه بیشتر از برگ بود [۲]. به‌طور کلی، فلزات سنگین با داشتن وزن مولکولی زیاد، به کندی به سمت بالا حرکت می‌کنند. علاوه بر این مقادیری از مس روی دیواره سلولی و همچنین پشت سلول‌های آندودرمی از حرکت بازداشته می‌شود که خود تراکم مس را در ریشه افزایش می‌دهد [۲۱]. بدین ترتیب ۷۵ تا ۹۰ درصد مس جذب‌شده در ریشه تجمع می‌یابد و مقدار کمتری از آن به اندام هوایی می‌رسد. همین غلظت بیشتر مس در ریشه ارقام بررسی شده در مقایسه با برگ می‌تواند باعث تحریک بیشتر پروتئین‌های القاکننده تحمل تنش در ریشه نسبت به برگ باشد. تجمع بیشتر مس در ریشه گیاهان در حضور تنش کلرید مس منطبق با نتایج محققان متعددی [۳۳]، [۳۴] است.

اثر کلرید مس بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان

نتایج بررسی حاضر نشان داد که متناسب با افزایش غلظت کلرید مس، فعالیت آنزیم کاتالاز و پراکسیداز در برگ و ریشه افزایش یافت و این افزایش در هر دو رقم معنی‌دار و در رقم پی‌اف بیشتر از هایولا و در ریشه چشمگیرتر از برگ بود. افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز و پراکسیداز در پاسخ به تنش‌های محیطی از جمله تنش زخم [۱۶]، تنش شوری [۴] و عوامل بیماری‌زا [۱۶] در گیاهان متعددی گزارش شده است. در شرایط تنش اکسیداتیو افزایش فعالیت کاتالاز برای حفاظت گیاه در برابر تنش مؤثر است [۲۷]. در تیلاکوئید برگ گندمی در پاسخ به تنش مس، تولید آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان- از جمله دهیدرواسکوربات‌ردوکتاز و سوپراکسی‌دیسموناز- افزایش می‌یابد [۲۲]. تنش مس و روی باعث تحریک فعالیت کاتالاز و پراکسیداز در برگ برنج می‌شوند. فعالیت کاتالاز در پاسخ به کمبود اکسیژن در دانه‌رست‌های برنج افزایش می‌یابد [۳۲]. کاتالاز به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان مهم گیاهی می‌تواند با انواع اکسیژن فعال ترکیب و مانع پراکسید شدن لیپیدهای غشایی، تخریب غشا و پروتئین‌ها شود. کاتالاز اصلی‌ترین جاروب‌کننده هیدروژن پراکسید محسوب می‌شود که قبل از هر گونه آسیب ناشی از بهم خوردن هموستازی، این ماده را در پراکسیزوم‌ها به آب و اکسیژن تبدیل می‌کند. افزایش سطح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان به‌عنوان یک مکانیسم دفاعی ثانوی معرفی می‌شود. با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از تنش مس به حداقل می‌رسد [۳۰].

در پایان باید گفت، با توجه به این‌که رقم پی‌اف در حضور کلرید مس قادر به القای بیش‌تر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان کاتالاز و پراکسیداز است، به نظر می‌رسد این رقم تحمل بیش‌تری به تنش مس دارد. از سوی دیگر، این رقم برای مقابله با تنش کلرید مس اقدام به سنتز پروتئین بیش‌تری می‌کند که باعث تحمل بیش‌تر تنش مذکور می‌شود. بدین ترتیب از دیدگاه بیوشیمیایی می‌توان رقم پی‌اف را در مقایسه با رقم هایولا رقم متحمل‌تری به تنش کلرید مس معرفی کرد. البته انجام بررسی‌های دقیق‌تر بیوشیمیایی برای حصول به نتیجه قطعی ضروری به نظر می‌رسد.

منابع

۱. م. قربانلی، ف. میقانی، ب. اسدالهی، بررسی اثر تنش کلرید مس بر غلظت کلروفیل، کربوهیدرات و برخی از شاخص‌های رشد در دو رقم کلزا. پژوهش و سازندگی، ۷۶ (۱۳۸۶) ۱۴۱-۱۳۴.
۲. ف. میقانی، م. قربانلی، ب. اسدالهی، نقش یون‌های معدنی و پرولین در تحمل دو رقم کلزا به تنش مس. نشریه علوم دانشگاه تربیت معلم، ۷، ۱ (۱۳۸۶) ۸۷۶-۸۶۵.
3. K. Asoda, "The water-water cycle in chloroplasts scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons", *Ann. Rev. Plant Physiol, Plant Mol. Biol.* 50 (1999) 601-639.
4. M. A. Botella, M. A. Quesada, A. K. Kanonoviez, "Characterization and in situ localization of a salt induced tomato peroxidase mRNA", *Plant Mol. Biol.* 25 (1994) 1105-1140.
5. B. Chance, C. Maehly, "Assay of catalase and peroxidase, *Methods Enzym*", *Mol.* 11 (1995) 764-775.
6. V. H. Cho, J. O. Park, "Mercury-induced oxidative stress in tomato seedling", *Plant Sci.* 126 (2000) 1-9.
7. C.S. Cobbett, "Phytochelation biosynthesis and function in heavy metal detoxification", *Curr. Opin. Plant Biol.* 3 (2000) 211-216.
8. A. Del-Riol, F. J. Coras, L. M. San- dalio, J. M. Palma, J. B. Barroson Reactive oxygen species antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes", *J. Exp. Bot.*, 53 (2001) 1255-1275.
9. V. Dixit and V. Pandey, "Differential antioxidative response to cadmium in root and leaves of pea (*Pisum sativum L.*", cv . Azad. *J. Exp. Bot.* 52 (358) (2001) 1101-1110.
10. C. H. Foyer, H. Lopez-Del Gad, J. E. Dat, I. M. Scott, "Hydrogen peroxidase and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signaling", *Physiol Plant.*, 100 (1997) 241-245 .

11. C. H. Foyer, M. Lelandals, K. J. Funert, "Photo-oxidative stress in plants", *Physiol. Plant.* 92 (1994) 696-717.
12. G. Ginalska, J. Lobarzewski, "The metal ions stabilizing function in the immobilization process of HRP on two supports", *Plant Physiol*, 2 (1999) 101-120.
13. G. A. F. Hendry, A. J. Baker, C. F. Ewart, "Copper tolerance a toxicity, oxygen radical processes and molecular damage in copper tolerant and copper sensitive clones of *Holcus lanatus* L.", *Acta Bot Neerl* 21(1992) 271-281.
14. D. R. Hoagland, D. I. Arnon, "California agriculture Experiment", *Station Corcular* (1957) 347.
15. S. Kawasaki, C. Borchert, "Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in Rice", *The Plant Cell*, 13 (2001) 889-905.
16. A. Kawoaka, T. Kavamoto, M. Sekin, K. Yoshida and A. Takanom, "Cis acting element and trans- acting involved in the wound-induced expression of a horseradish peroxidase gene", *Plant J.* 6 (1996) 87-97.
17. S. A. A. Koroï, "Gelektrophers Tisch and spectral photometrischoe under unchange zomeinfluss der temperature auf structur and aktritar amylase and peroxidase isoenzyme", *Physiol, Veg.* 20 (1989) 15-22.
18. O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. I. Farr, R. J. Randall, "Protein measurment with the folin phenol reagent", *J. Bid. Chem.*, 193 (1951) 565-275.
19. R. A. O. Madhava, T. V. S. Sresty, "Antioxiditive parameters in the seedling of pigeonpea (*Cajanus cajan* L. Millspaugh) in response to Zn and Ni stresses", *Plant Sci.*, 157 (2000) 113-128.
20. A. A. Mehrag, "The role of plasmalemma in metal tolerance in angiosperms", *Physiol. Plant.*, 88 (1993) 191-198.
21. I. R. Mor, S. I. Gokani, S. V. Chanda, "Effect of mercury toxicity on hypocotyls elongation and cell wall lossening in *Phaseolus* seedlings", *J. Plant Nutr.* 25 (2002) 843-860.
22. F. Navari-Izzo, Mike F. Quartacci, C. Pinzino, F. D. Vecchia, C. L. M Sgherri. "Thylakoid-bound and stromal antioxidative enzyme in wheat treated with excess copper", *Physiol Plant*, 104 (1998) 630-638.

23. W. Orr, T. C. White, "Complementary DNA Sequence of a low temperature-induced Brassica napus gene with homology to Arabidopsis kin 1 gene", *Plant Physiol*, 98 (1992) 1533-1534.
24. M. N. V. Prasad, J. Hagemeyer, "Heavy metal stress in plants and molecular biology" Springer, New York (1999).
25. M. N. V. Prasad, "Trace metals, In: Prasad MNV(ed) Plant ecophysiology", Wiley .New York, 20 (1997) 7-249.
26. W. E. Rauser, "Structure and function of metal chelators produced by plants", *Cell Biochem Biophys*, 31(1999) 19-48.
27. M. Russo, C. Sgherri, R. Izzo, F. Navari-Izzo. "Brassica napus subjected to copper excess: Phospholipases C and D and glutathione system in signalling", 62 (2008) 238-246.
28. F. Seebba, L. Sebastiani and C. Vitagliano, "Change in activity antioxidative enzyme in wheat (*Triticum aestivum*) seedling under cold acclimatation", *Physiol, Plant*, 104 (1998) 747-752.
29. F. Schoffi, J. L. Key, "An analysis of mRNA for a group of hsp of soybean using cloned DNAs". *J. Mol. Appl. Genet.*, 1 (1982) 301-314.
30. C. L. M. Sgherri, B. Loggini, A. Bochicchio, B. Navari-izzof, "Antioxidant system in Boea hygroscopic, changes in response to desiccation and rehygroscopic: changes in response to desiccation and rehydration", *Phytochem.*, 37 (1994) 337-381.
31. M. F. Thomoshow, " Role of cold responsive genes in plant freezing tolerance", *Plant Physiol*, 118 (1998) 1-7.
32. T. Ushimaru, S. Kanematsu, M. Hibasaka, H. Tsuji, "Effect of hypoxia on thentioxidative enzymes in erobically grown rice (*Oryza sativa*) seedling", *Physiol Plant*, 107 (1999) 181-187.
33. F. Van Assche and H. Clijsters, "Effect of metals on enzyme activity in plants", *Plant Cell Environ.*, 13 (1990) 195-206 .
34. F. Wie-Ching and K. A. O. Ching-Huei, "Enhanced peroxidase activity in rice leaves response to excess iron copper and zinc", *Plant Sci.*, 158 (2000) 71-76.