تأثیر مقدار اضافی منگنز بر جنبه‌های فیزیولوژیک رشد و نمو گیاه چای

مریم رحمتی ایشکا، فائزه قناتی: دانشگاه تربیت مدرس

چکیده

منگنز یک ریزمغذی ضروری برای رشد و نمو گیاهان است و منگنز اضافی از مهم‌ترین عوامل محدودکننده رشد در خاک‌های اسیدی به شمار می‌رود. در این تحقیق, به منظور بررسی تاثیر مقدار اضافی منگنز بر جنبه‌های فیزیولوژیک رشد و نمو گیاه چای، قلمه‌های ریشه‌دار شده دو ساله چای[1] در محلول هوگلند تغییر یافته در سیستم هیدروپونیک هوادهی شده با pH معادل ٤/۲ به مدت یک ماه در شرایط گل‌خانه‌ای در دمای متوسط C ۳ ° ± ۲۷ و شدت نور $\mu mol.\ m^{-2}\ s^{-1}$ ۱۰۱/۵ و با تعویض هفته‌ای یک‌بار، پیش تیمار شدند. بعد از گذشت این مدت و پیدا شدن ریشه‌های سفید و جدید، گیاهان تحت تیمارهای یک هفته‌ای با فلز منگنز با غلظت نهایی ۰/۹ میلی‌مولار و با تعویض هر ۳ روز یک بار، قرار گرفتند. پس از گذشت یک هفته، ریشه‌های سفید گیاهان برای تعیین فعالیت آنزیم پراکسیداز (PO) در سه بخش محلول(SPO)، یونی(IPO) و کووالانی(CPO)، محتوای لیگنین و قند ریشه برداشت شدند. همزمان با برداشت ریشه، کلروفیل برگ گیاهان نیز در شرایط گل‌خانه‌ای اندازه‌گیری شد. نتایج حاصل نشان داد که فعالیت بخش محلول(SPO) و کووالانی پراکسیداز(CPO) به همراه محتوای لیگنین در تیمار با منگنز اضافی (۰/۹ میلی‌مولار) کاهش یافت. از طرف دیگر فعالیت بخش یونی پراکسیداز (IPO) به همراه محتوای کلروفیل برگ در تیمار با منگنز اضافی افزایش یافت؛ اما این افزایش معنی‌دار نبود. میزان قند محلول ریشه ها نیز در تیمار با منگنز اضافی افزایش یافت. بر اساس نتایج به دست آمده پیشنهاد می‌شود که منگنز اضافی ممکن است اثرات مفیدی بر رشد گیاه چای از طریق کاهش چوبی شدن دیواره سلولی وبه دنبال آن تحریک رشد داشته باشد.

مقدمه

فلزات سنگین آلاینده‌های مهمی محسوب می‌شوند که حضورشان در طبیعت ناشی از فعالیت‌های مختلف انسانی در زمینه‌های صنعت، کشاورزی، استخراج معدن و غیره است. این فلزات می‌توانند برای مدت‌های نامحدودی باقی بمانند و باعث وارد آمدن صدمات جبران ناپذیری به طبیعت شوند[۱]، [۲]، [۳].

فلزات سنگین نظیر مس، کبالت، روی، آهن، منگنز و نیکل جزو عناصر ریزمغذی هستند و گیاهان برای

کلمات کلیدی: گیاه چای، منگنز، پراکسیداز، لیگنین، قند، کلروفیل

[1]-*Camellia sinensis* L. assamica × sinensis

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

کامل کردن دوره زندگی خود به این عناصر نیاز دارند. افزایش غلظت این عناصر در خاک حتی به مقدار بسیار کم نیز می‌تواند به شدت مسموم کننده باشد[٤]. آسیب به ریشه، به تأخیر انداختن رشد ساقه، زرد شدن برگ‌ها، مهار سنتز کلروفیل و کاهش در میزان فتوسنتز از جمله آثار زیان‌بار ناشی از سمیت منگنز است[٥]،[٦]. همچنین منگنز می‌تواند به عنوان یک فلز واسطه منجر به ایجاد استرس اکسیداتیو در گونه‌های گیاهی تحت سمیت منگنز شود. بدین ترتیب که سمیت ناشی از فلزات سنگین نظیر منگنز می‌تواند منجر به افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن[١] مانند رادیکال‌های سوپراکسید($O^{\cdot}_2^-$)، رادیکال‌های هیدروکسیل($OH^{\cdot}$) و پراکسید هیدروژن(H_2O_2) گردد[٧]. تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) در سلول، در شرایط طبیعی، بسیار کم و به شدت تحت کنترل است[٨]. القای آنزیم پراکسیداز(PO) پاسخ عمومی گیاهان عالی به مقادیر سمی فلزات سنگین است[٩]. این آنزیم قادر به حذف توده پراکسید هیدروژن از جایگاه‌های مختلف سلول از جمله دیواره سلولی است[٧]. همچنین پراکسیداز(PO) با واسطه پراکسید هیدروژن، نقش مهمی در پلیمریزاسیون منومرهای فنلی در سنتز لیگنین و همچنین ایجاد پیوندهای کووالانسی بین لیگنین و کربوهیدرات‌های دیواره سلولی دارد[١٠]. پژوهش حاضر در خصوص بررسی تاثیر مقدار اضافی منگنز بر فعالیت آنزیم پراکسیداز(PO) در سه بخش محلول(SPO)، یونی(IPO) و کووالانسی(CPO)، تعیین محتوای لیگنین و قند ریشه به همراه اندازه‌گیری میزان کلروفیل برگ در گیاه کامل چای است.

مواد و روش ها

مواد گیاهی و شرایط رشد

قلمه‌های ریشه‌دار شده دو ساله چای[٢] تهیه شده از موسسه تحقیقات چای لاهیجان به مدت یک ماه در محلول هوگلند تغییر یافته در یک سیستم هیدروپونیک هوادهی شده در شرایط گلخانه‌ای در دمای متوسط ٣ ° C ± ٢٧ و شدت نور $١٠١/٥\ \mu mol.\ m^{-2}\ s^{-1}$ رشد داده شدند[١١]. محلول غذایی به کار رفته شامل این موارد است (مقادیر به میلی‌مولار است):

$(NH_4)_2SO_4$, ٠/٧١٣; NH_4NO_3, ٠/٧٣; KH_2PO_4, ٠/١; K_2SO_4, ٠/٤٦; $CaCl_2$, ٠/٥; Fe-EDTA, ٠/٠٣٢; H_3BO_3, ٠/٠٤٦; $CuSO_4$, ٠/٠٠٢; $MnSO_4$, ٠/٠٩; Na_2MoO_4, ٠/٠٠٢٦; $ZnSO_4$, ٠/٠٠٩١; $MgSO_4$, ٠/٤١

pH محلول معادل ٤/٢ تنظیم, و محلول غذایی هفته‌ای یک‌بار تعویض شد. گیاهان بعد از گذراندن دوره پیش تیمار، تحت تیمارهای یک هفته‌ای با منگنز اضافی به فرم $MnCl_2.4H_2o$ باغلظت نهایی ٠/٩ میلی‌مولار

١-Reactive Oxygen Species; ROS ٢-*Camellia sinensis* L. assamica × sinensis

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

(۱۰ برابر غلظت پایه)، با تعویض هر ۳ روز یک بار، قرار گرفتند. پس از گذشت یک هفته، ریشه‌های گیاهان برداشت و در نیتروژن مایع تثبیت و تا زمان آنالیزهای بیوشیمیایی در فریزر C °۸۰- نگهداری شدند.

سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز(PO)

سنجش فعالیت پراکسیداز(PO) در۳ بخش محلول، یونی و کووالانی صورت گرفت. نمونه‌های منجمد به میزان۰/٤ گرم در۳ میلی‌لیتر بافر سدیم فسفیت[۱] ٦۰ میلی‌مولار با pH ٦/۱ عصاره گیری شدند. همگنای حاصل در دور۱۵۰۰۰ گرم در دقیقه، به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ٤°C سانتریفوژ شدند. بخش رویی برای سنجش فعالیت بخش محلول پراکسیداز(SPO) و رسوب حاصل، برای اندازه‌گیری فعالیت بخش یونی(IPO) و کووالانی پراکسیداز(CPO) مورد استفاده قرارگرفت.

فعالیت SPO در مخلوط واکنش حاوی بافر سدیم فسفیت ٦۰ میلی‌مولار با pH ٦/۱، Guaiacol ۲۸ میلی‌مولار، H_2O_2 ٥ میلی‌مولار و عصاره آنزیمی و با محاسبه افزایش جذب در طول موج ٤۷۰نانومتر در دقیقه به ازای هر میلی‌گرم پروتئین در عصاره آنزیمی محاسبه شد. به رسوب حاصل از سانتریفوژ مرحله اول، ۲ میلی‌لیتر $CaCl_2$ ۰/۲ مولار اضافه شد و به مدت ۲ ساعت بر روی شیکر چرخان(۱۲۳ rpm) در دمای اتاق قرار داده شد. بعد از ۲ ساعت، مخلوط حاصل صاف شده، مایع رویی برای اندازه‌گیری فعالیت بخش یونی و رسوب حاصل برای اندازه‌گیری فعالیت بخش کووالانی آنزیم پراکسیداز مورد استفاده قرارگرفت. فعالیت IPO در مخلوط واکنش حاوی بافر سدیم فسفیت ٦۰ میلی‌مولار با pH ٦/۱، Guaiacol ۲۸ میلی‌مولار، H_2O_2 ٥ میلی‌مولار و عصاره آنزیمی و با محاسبه افزایش جذب در طول موج ٤۷۰ نانومتر در دقیقه به ازای هر میلی‌گرم پروتئین در عصاره آنزیمی محاسبه شد. به رسوب حاصل از صاف شدن مرحله قبل، ۱ میلی‌لیتر بافر سدیم فسفیت ٦۰ میلی‌مولار با pH ٦/۱ ریخته، با کمک ورتکس[۳] مخلوط شده و از مخلوط(رسوب و بافر) برای اندازه‌گیری مستقیم فعالیت CPO استفاده شد. مخلوط واکنش مطابق موارد ذکر شده در مورد SPO و IPO بود. لازم به ذکر است که فعالیت بخش CPO به صورت تغییر در جذب در طول موج ٤۷۰ نانومتر در مدت۱دقیقه به نسبت وزن خشک دیواره محاسبه شد. به این منظور باقیمانده مخلوط(رسوب و بافر) با مقداری آب مقطر شست و شو داده شد و در کروزه‌های چینی از قبل توزین شده در آون ۷۰°C به مدت ۷ الی ۸ ساعت خشک شد. اختلاف وزن کروزه‌های چینی، قبل و بعد از خشک شدن، وزن خشک دیواره را مشخص کرد[۱۲].

سنجش پروتئین

در همه موارد اندازه‌گیری پروتئین مطابق روش برادفورد[٤][۱۳] با استفاده از آلبومین سرم گاوی(BSA) به عنوان استاندارد صورت گرفت.

۱-Na-Phosphate ۲ -Guaiacol ۳ –Vortex ٤-Bradford

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

سنجش لیگنین

ابتدا دیواره سلولی نمونه‌های گیاهی استخراج شد. به این منظور, نمونه‌های ریشه‌های گیاه کامل به میزان ٤ گرم در آب عصاره‌گیری شدند و همگنای حاصل در دور ۱۰۰۰ گرم به مدت ۱۵دقیقه سانتریفوژ شد. رسوب حاصل دو بار و هر بار به مدت ۳۰ دقیقه با ٤ حجم اتانول شست و شو داده شد و پس از صاف شدن، ۱۰ حجم مخلوط متانول- کلروفرم با نسبت ۲:۱ به آن اضافه شد. پس از ۱۲ ساعت رسوبا ت حاصل صاف شدند به مدت ۱ ساعت در استون قرار داده شدند؛ سپس مجدداً صاف شدند و سرانجام در معرض هوا خشک شدند. محتوای لیگنین آن‌ها با استفاده از روش استیل بروماید اندازه‌گیری شد[١٤]. پودر خشک شده دیواره ساییده شده سپس از غربال‌هایی با منافذ ۱۵۰میکرون عبور داده شد. ٦ میلی‌گرم از پودر نرم دیواره در ۲/۵ میلی‌لیتر مخلوط حاوی ۲۵ درصد(w/w) استیل بروماید در اسید استیک و ۰/۱ میلی‌لیتر هیپوکلریک اسید ۷۰ درصد در حمام آب‌گرم ۷۰°C به مدت۳۰ دقیقه قرار گرفت و در فواصل زمانی ۱۰ دقیقه تکان داده شدند. بعد از سرد کردن نمونه‌ها در یخ، مخلوط حاصل پس ازصاف شدن به بالن ژوژه‌های ۲۵ میلی‌لیتری حاوی ۵ میلی‌لیتر NaOH ۲ مولار و ٦ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال اضافه شده و با اسید مذکور به حجم ۲۵ میلی‌لیتر رسانده شدند. محتوای لیگنین با اندازه‌گیری جذب در طول موج ۲۸۰ نانومتر و با استفاده از ضریب جذب ویژه[۱] ($SAC = 20.0\ g^{-1}lit\ cm^{-1}$) محاسبه شد.

اندازه‌گیری قند محلول ریشه

نمونه‌های منجمد به میزان ۰/۱ الی ۰/۲ گرم در ۳ میلی‌لیتر آب مقطر عصاره گیری شدند. همگنای حاصل به کمک قیف و کاغذ صافی صاف شد. برای اندازه‌گیری قند نمونه، به۵۰ میکرولیتر همگنای صاف شده ۰/۵ میلی‌لیتر فنل ۵ درصد و ۲/۵ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۹۸ درصد اضافه شد. بلافاصله بعد از افزودن اسید سولفوریک، واکنش گرمازای شدیدی همراه با تولید رنگ نارنجی ایجاد می‌شود. لذا ضروری است بعد از افزودن اسید، مخلوط واکنش ۱۰ دقیقه در دمای اتاق (۲۷°C) بماند تا خنک شود. منحنی استاندارد بااستفاده از غلظت‌های مختلف گلوکز از ۰ تا ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ترسیم شد. جذب استاندارد ها به همراه جذب قند کل نمونه با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ٤۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. مقدار قند نمونه، بر مبنای وزن تر نمونه ها تعیین شد[۱۵].

اندازه‌گیری کلروفیل برگ

برای این منظور بعد از اتمام دوره تیمار, کلروفیل برگ گیاهان با استفاده از دستگاه دیجیتالی کلروفیل‌متر[۲] مدل

۱-Specific Absorption Coefficient ۲-Chlorophyll meter

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

SPAD-502 ساخت ژاپن در شرایط گل‌خانه‌ای در دمای متوسط ۲۷ ±۳ °C و شدت نور $\mu M.m^{-2}S^{-1}$ ۱۰۱/۵ اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری مقدار منگنز ریشه‌های گیاه کامل با استفاده از دستگاه جذب اتمی

مقادیر یک‌سانی(۰/۵ گرم) از نمونه‌های کنترل و تیمار در کروزه‌های چینی کوچک به مدت۲ ساعت در دمای ۲۵۰°C قرار گرفت. پس از آن دمای کوره به ۵۵۰°C رسانیده شد و اجازه داده شد نمونه ها به مدت ۲/۵ الی۳ ساعت در این دما بمانند. به خاکستر حاصل پس از سرد شدن۱میلی‌لیتر از محلول آب و HCl ۱۲ نرمال به نسبت۱:۱ اضافه شد و در حمام شن۱۱۰°C گذاشته شد. پس از خشک شدن کروزه‌ها به هر یک ۵ میلی‌لیتر HCl ۱ نرمال اضافه شد. آنگاه جذب محلول حاصل با استفاده از دستگاه جذب اتمی[۱] مدل(Shimadzu AA-670) ساخت ژاپن اندازه‌گیری شد. قابل ذکر است که استانداردهای منگنز با استفاده از $MnCl_2.4H_2o$ در محدوده غلظت‌های ۰ تا ۴۰ppm تهیه شد.

محاسبات آماری

همه آزمایش‌های یادشده حداقل با ۳ تکرار مستقل هر یک با ۳ نمونه صورت گرفت. معنی‌دار بودن یافته‌های حاصل با استفاده از t. Test و $P < ۰/۰۵$ ارزیابی شد.

نتایج

فعالیت آنزیم پراکسیداز (PO)

سنجش فعالیت این آنزیم در۳ بخش محلول، یونی و کووالانی صورت گرفت. فعالیت آنزیمی بخش محلول (SPO) و کووالانی پراکسیداز (CPO) در تیمار با منگنز اضافی (۰/۹ میلی‌مولار) به طور معنی‌داری ($p < ۰/۰۵$) در مقایسه با شاهد(۰/۰۹ میلی‌مولار) کاهش نشان دادند (شکل۱Aو ۱B). در مقابل، فعالیت آنزیمی بخش یونی (IPO) در تیمار با منگنز اضافی افزایش یافت, اما این افزایش معنی‌دار نبود (شکل۱C).

درصد چوبی شدن دیواره[۲]

درصد چوبی شدن دیواره در سلول‌های ریشه گیاه کامل چای در تیمار با منگنز اضافی در مقایسه با شاهد، کاهش یافت, اما این کاهش معنی‌دار نبود(شکل ۲).

۱-flame emission ۲ -Lignification

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

میزان قند محلول ریشه

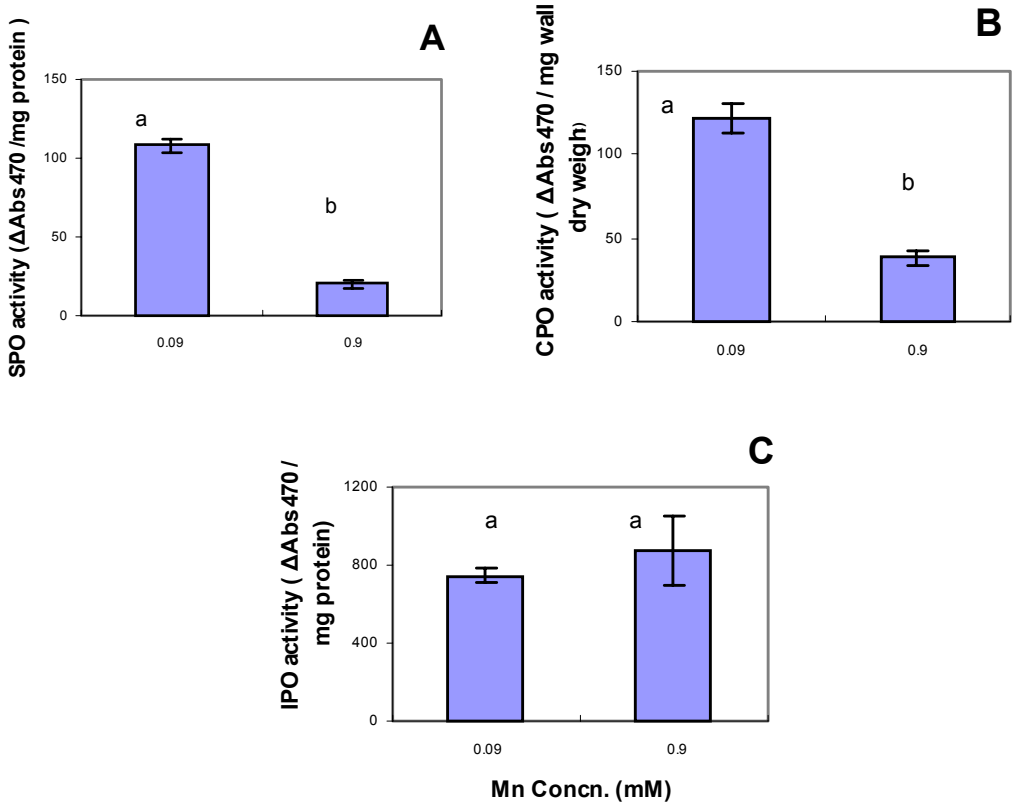
میزان قند محلول ریشه در تیمار با منگنز اضافی در مقایسه با شاهد افزایش معنی‌داری($p < ۰/۰۵$) نشان داد(شکل۳).

کلروفیل برگ

میزان کلروفیل برگ در تیمار با منگنز اضافی افزایش یافت, اما این افزایش معنی‌دار نبود(شکل ٤).

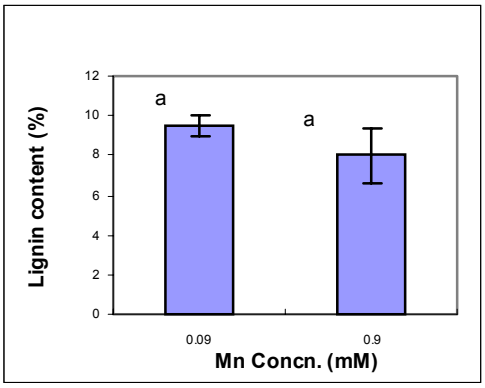
جذب منگنز توسط ریشه‌های گیاه کامل چای

جذب منگنز توسط ریشه‌های گیاه کامل چای در تیمار با منگنز اضافی در شکل ٥ نشان داده شده است. این جذب معادل ۰/٥ درصد از منگنز داده شده به ریشه‌های گیاه است.

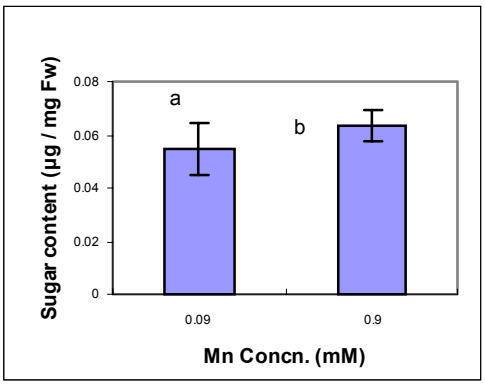


شکل ۱- فعالیت آنزیمی SPO(A)، CPO(B) و IPO(C) در ریشه های گیاه کامل چای در تیمار با مقادیر مختلف منگنز

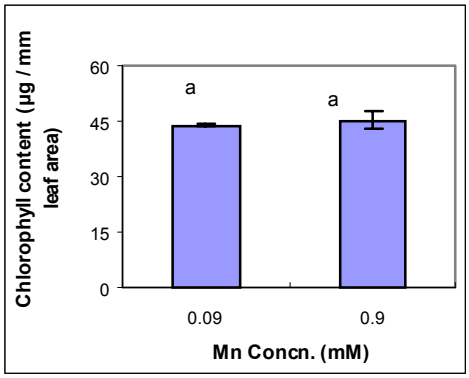
[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]



شکل ۲- میزان لیگنین ریشه های گیاه کامل چای در تیمار با مقادیر مختلف منگنز



شکل ۳-میزان قند محلول ریشه های گیاه کامل چای در تیمار با مقادیر مختلف منگنز

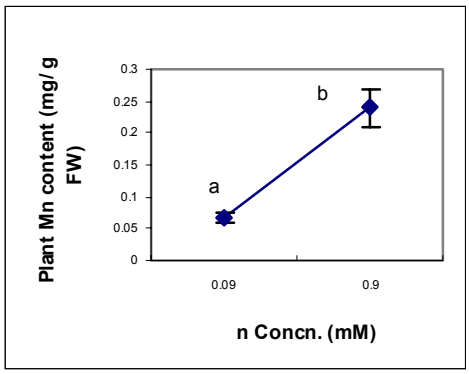


شکل ٤- میزان کلروفیل برگهای گیاه کامل چای در تیمار با مقادیر مختلف منگنز

بحث

پراکسیداز (PO) یکی از مهم‌ترین آنزیم‌هایی است که در پاسخ به شرایط استرس در گیاهان فعالیت آن افزایش می‌یابد. در گیاهان این آنزیم اساساً در دیواره سلولی، شبکه آندوپلاسمی، دستگاه گلژی و واکوئل‌ها قرار

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]



شکل ٥- جذب منگنز توسط ریشه های گیاه کامل چای

دارد و این پراکندگی، مربوط به نقش‌های فیزیولوژیکی متفاوتی است که بر عهده دارد[١٦]. همچنین PO نقش مهمی در پلیمریزاسیون منومرهای فنلی در سنتز لیگنین و نیز ایجاد پیوندهای کووالانسی بین لیگنین و کربوهیدرات‌های دیواره سلولی دارد[١٠]. در پژوهش حاضر، فعالیت بخش محلول پراکسیداز (SPO)، که مربوط به شرایط استرس است[١٦]، در تیمار با منگنز اضافی کاهش نشان داد و همان‌گونه که انتظار می‌رفت محتوای منگنز ریشه‌های گیاه کامل چای در تیمار با منگنز اضافی ٤ بار بیش‌تر از محتوای منگنز در نمونه‌های شاهد است. بنا بر این کاهش فعالیت SPO نشان می‌دهد که گیاه چای احتمالاً توانسته است مقادیر اضافی فلز منگنز را تحمل کند و در نتیجه شرایط استرس چندانی را احساس نکرده است. از طرف دیگر، دو بخش IPO و CPO در پلیمریزاسیون منومرهای فنلی در سنتز لیگنین و نیز ایجاد پیوندهای کووالانسی بین لیگنین و کربوهیدرات‌های دیواره سلولی نقش دارند[١٦]، [١٧]. از همین روی افزایش فعالیت IPO و کاهش فعالیت CPO مطابق شکل‌های ١C و ١B و از طرف دیگر کاهش محتوای لیگنین(شکل ٢) در تحقیق حاضر، در پاسخ به کاربرد منگنز اضافی می‌تواند نشانه دخالت بیش‌تر CPO در سنتز لیگنین باشد. کاهش لیگنین نیز به نوبه خود می‌تواند منجر به افزایش قابلیت گسترس دیواره سلولی و به دنبال آن تحریک رشد، به تأخیر افتادن فرایند پیری و مرگ در گیاه شود[١٠]. همچنین افزایش معنی‌دار قند در تیمار با منگنز اضافی(٠/٩ میلی‌مولار) در ریشه‌های گیاه چای(شکل ٣)، احتمالاً نشان دهنده اثرات مفید غلظت به کار رفته منگنز بر سیستم ماده سازی گیاه است که در نتیجه آن میزان فتوسنتز در گیاه افزایش می‌یابد. بدنبال افزایش فتوسنتز، قند بیش‌تری در گیاه ساخته می‌شود که به سیستم ریشه‌ای انتقال می‌یابد. افزایش کلروفیل نیز در تیمار با منگنز اضافی در گیاه چای(شکل ٤)، نشان‌دهنده اثر مفید غلظت به کار رفته منگنز بر میزان سنتز کلروفیل است که در نتیجه آن فتوسنتز نیز در گیاه افزایش می‌یابد. نتایج به دست آمده پیشنهاد می‌کند که مقدار اضافی منگنز می‌تواند منجر به تحریک رشد گیاه چای از طریق کاهش میزان چوبی شدن دیواره سلولی گردد.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

منابع

1. G. Santandrea, S. Schiff and A. Bennici**,** Effects of manganese on *Nicotiana* species cultivated in vitro and characterization of regenerated Mn- tolerant tobacco plants, Plant Sci, 132 (1998) 71-82.
2. S. Verma and R. Dubey, Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants, Plant Sci, 164 (2003) 645-655.
3. M. Prasad and H. Freitas, Removal of toxic metals from solution by leaf, stem and root phytomass of Quercus ilex L. (holly oak), Environmental Pollution, 110 (2000) 277-283.
4. L. Taiz and E. Zeiger, Plant Physiology(2002), 3d Ed. pp. 752, Sinauer associated, Inc. Sunderland, Massachusetts.
5. J.F. Petolino and G.B. Collins, Manganese toxicity in tobacco (*Nicotiana tobacum* L.) callus and seedlings, Plant physiol, 118 (1985)139-144.
6. S.M. Macfie and G.J. Taylor, The effect of excess manganese on photosynthetic rate and concentration of chlorophyll in *Triticum aestivum* grown in solution culture, Plant physiol, 85 (1992) 467-475.
7. K. Demirevska-Kepova, L. Simova-Stoilova, Z. Stoyanova, R. Holzer and U. Feller, Biochemical changes in barley plants after excessive supply of copper and manganese, Environmental and Experimental Botany (2004) In press (available On line).
8. J. Dat, S. Vandenabeele, E. Vranova, M. Van Montagu, D. Inze and F. Van Breusegem, Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. CMLS, 57 (2000) 779-795.
9. F. Van Assche and H. Clijsters, Effects of metals on enzyme activity in plants, Plant Cell Environ, 13 (1990)195-206.
10. S. Fry, Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms, Anul. Rev. Plant Physiol, 37 (1986) 165-186.
11. S. Konishi, S. Miyamoto and T. Taki, Stimulatory effects of aluminium on tea plants grown under low and high phosphorus supply, Soil Sci. Plant Nutr, 31(1985) 361-368.
12. F. Ghanati, A. Morita and H. Yokota, Induction of Suberin and Lignin Content by Excess Boron in Tobacco Cells, Plant Sci, 168 (2005)397-405.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

13. M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Anal Biochem, 72 (1976) 248-254.
14. K. Iiyama and A. Wallis, Determination of Lignin in Herbaceous Plants by an Improved Acetyl Bromide Procedure, J. Sci. Food Agri, 51 (1990) 145-161.
15. M. Dubois, K. Gilles, J. Hamilton, P. Rebers and F. Smith, Colorimetric method for determination of sugars and related substances, Anal. Chem, 28 (1956) 350-356.
16. T. Pandolfini, R. Gabbrielli and C. Comparini, Nickel toxicity and peroxidase activity in seedlings of *Triticum aestivum* L, Plant Cell Environ, 15 (1992)719-725.
17. F.J. Castillo, C. Penel and H. Greppin, Peroxidase release induced by ozone in sedum album leaves: involvement of Ca^{+2}, Plant Physiol, 74(1984) 846-851.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]