نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۴، شماره ۱، نیمسال اول ۱۳۸۹ ، ص. ۵۸-۵۳
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

Journal of Horticultural Science
Vol. 24, No. 1, Spring-Summer 2010, P. 53-58
ISSN: 2008 - 4730

اثر هومیک اسید بر تجمع کادمیوم، نیترات و تغییرات فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز در کاهو

مریم حقیقی[1*]-محسن کافی[2]

تاریخ دریافت: ۸۷/۱۱/۱۳
تاریخ پذیرش: ۸۸/۱۱/۱۰

چکیده

از آنجایی که در بین سبزیجات برگی کاهو از مهمترین منابع جذب کننده فلزات سنگین و نیترات می‌باشد لذا در این تحقیق سعی بر آن شده است که با استفاده از هومیک اسید جذب کادمیوم کاهش یافته و اثر این ماده آلی بر جذب و متابولیسم نیترات در کاهو پیگیری شود. از این رو آزمایشی در محیط کشت حاوی پیت/پرلیت طراحی شد و گیاهان با محلول هوگلند همراه با دو غلظت کادمیوم (۲ و ۴ میلی گرم در لیتر) و هومیک اسید (۱۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر) آبیاری شد. نتایج نشان داد همراه با افزایش غلظت کادمیوم در محیط کشت، غلظت کادمیوم در برگ افزایش و میزان پروتئین و وزن تر برگ کاهش یافت. اما غلظت N، P، نیترات و فعالیت نیترات ردوکتاز تفاوت معنی داری نداشتند. با افزایش غلظت هومیک اسید، وزن تر، غلظت نیتروژن و پروتئین و فعالیت نیترات ردوکتاز افزایش و غلظت کادمیوم برگ کاهش یافت. اثر استفاده همزمان هومیک اسید و کادمیوم نشان داد که هومیک اسید باعث کاهش جذب کادمیوم توسط گیاه و در نتیجه کاهش اثرات سمی‌آن بر تغییرات فیزیولوژیکی و وزن کاهو شد. همچنین استفاده هومیک اسید باعث تجمع نیترات در کاهو نشد. آزمایش های تکمیلی در آینده در سایر محیط های کشت برای توصیه استفاده از هومیک اسید در فرایند تولید کاهو در شرایط آلودگی به فلزات سنگین ضروری به نظر می‌رسد.

واژه های کلیدی: نیتروژن، فسفر، نیترات، فلزات سنگین، نیترات ردوکتاز

مقدمه

منابع اصلی کسب نیتروژن برای گیاه به صورت نیترات و آمونیوم می‌باشند. اما کاربرد زیاد کودهای نیتروژنه توسط کشاورزان برای افزایش محصول باعث تجمع نیترات در گیاه می‌شود (۹). یکی از راههای کاهش این عارضه استفاده از کودهای آلی نیتروژنه به جای کودهای شیمیایی است. هومیک اسید ماده آلی است که دارای عناصر غذایی چون فسفر و نیتروژن می‌باشد و همچنین باعث افزایش جذب دیگر عناصر غذایی چون N، P، K، Fe، Ca می‌شود (۶).

آلودگی سبزیجات به فلزات سنگین از نگرانیهای بزرگ متخصصان علوم تغذیه می‌باشد. گزارشهای بسیاری نشان می‌دهد که هومیک اسید باعث کاهش جذب فلزات سنگین چون Cu، Zn ، Cd از طریق باند کردن آنها می‌شود (۱۲). کاهش قابلیت دسترسی فلزات سنگین برای جذب توسط گیاه را که نوعی تثبیت عناصر سنگین[3] در محیط ریشه است اما توسط مواد آلی صورت میگیرد را اصطلاحاً هومیفیکیشن[4] گویند که از طریق باند کردن این فلزات با گروههای کربوکسیل هومیک اسید صورت می‌گیرد (۱). تحقیقات زیادی برای کاهش اثرات سمی فلزات سنگین انجام شده است و از مواد باند کننده مختلفی چون DTPA, EDTA[5] و هومیک اسید استفاده شده است اما در این بین هومیک اسیدها مورد توجه خاص هستند زیرا در گروه مواد آلی قرار دارند (۱). اگرچه گزارشهای زیادی از اثر هومیک اسید بر جذب عناصر غذایی وجود دارد اما بر حسب اطلاع ما گزارشی در خصوص اثر هومیک اسید بر جذب و متابولیسم نیترات در کاهو و واکنش نیترات ردوکتاز به عنوان اولین آنزیم دخیل در متابولیسم نیترات موجود نمی‌باشد. از آنجایی که هومیک اسید قابلیت افزایش جذب بعضی از عناصر غذایی را دارد. فرضیه ما بر این بود که هومیک اسید احتمالاً می‌تواند باعث افزایش جذب نیترات نیز بشود. توصیه مصرف هومیک اسید در فرایند تولید کاهو که جاذب قوی نیترات است بدون آگاهی از اثر آن بر جذب نیترات صحیح نمی‌باشد. از

۱- استادیار گروه علوم باغبانی، دانشگاه شیراز
۲- دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشگاه تهران
(*- نویسنده مسئول: Email: Haghighi@shirazu.ac.ir)

3 - Phytostabilisation
4 - Humification
5 - Ethylenediamin eteraacetic

آنجایی که سبزیجات از مهمترین منابع روزانه انتقال آلودگی فلزات سنگین و نیترات به انسان می‌باشند در این تحقیق سعی شد تا اثر هومیک اسید (به عنوان یک ماده موثر در کاهش جذب کادمیوم) بر جذب و متابولیسم نیترات بررسی شود و تغییراتی که پس از استفاده از هومیک اسید و کادمیوم بر چرخه متابولیسم نیترات در کاهو ایجاد می‌شود برای اولین بار پرداخته شود. با توجه به حساس بودن آزمایشهای فیزیولوژی و پیچیده بودن ساختار فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی خاک و بویژه تأثیر ظرفیت تبادل کاتیونی آن، آزمایش حاضر در محیط هیدروپونیک صورت گرفت اما بدیهی است در آینده برای قابل توصیه شدن آن برای کشاورزان، آزمایشهای تکمیلی در محیط خاک ضروری به نظر می‌رسد.

مواد و روش ها

شرایط کشت و تیمارهای آزمایشی

بذرهای کاهو رقم (*Lactuca sativa* var Italy) در مخلوط ورمیکولیت/پرلیت (۱/۲ v/v) کاشته شد و سپس نشاها در مرحله ۲-۳ برگی به سیستم کشت بدون خاک شامل گلدانهایی با مخلوط پیت/پرلیت (۱/۱ v/v) منتقل گردید و در گلخانه با دمای حداقل و حداکثر۱۸-۲۵ نگهداری شدند محلول غذایی طبق فرمول هوگلند آماده و با هر بار آبیاری در اختیار گیاه قرار داده می‌شد. کادمیوم به صورت $CdCl_2$ به محلول غذایی با ۲ غلظت ۲ و۴ میلی گرم در لیتر و هومیک اسید تهیه شده از جنگلهای جینیان چین با غلظت ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر اضافه شد. اسیدیته محلول توسط سود و اسید کلریدریک حدود ۶ تنظیم گردید. آزمایش به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۷ تکرار انجام گردید. داده ها با نرم افزار SAS آنالیز گردید و میانگینهای به دست آمده به روش آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح ۰/۰۵ مقایسه شدند.

اندازه گیری فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز و نیترات

اندازه گیری آنزیم نیترات ردوکتاز به روش فابیو و همکاران (۷) انجام شد و بر حسب ماکرومول نیتریت بر گرم وزن تر در ساعت[1] بیان شد. میزان نیترات در ماده تر بر طبق روش کاتالدو و همکاران (۴) انجام شد و بر حسب ماکرومول نیترات بر گرم وزن تر[2] بیان شد.

اندازه گیری کادمیوم برگها

میزان کادمیوم برگها پس از خاکستر شدن در دمای ۵۵۰ درجه سانتی گراد به مدت ۵ ساعت و افزودن اسید کلردریک ۱ نرمال به کمک دستگاه ICP[3] اندازه گیری شد.

اندازه گیری پروتئین کل

میزان پروتئین کل بر اساس تغییر رنگ توسط کوماسی بریلیانت بلو[4] به دست آمد. محلول واکنش شامل ۰/۰۵ گرم کوماسی بریلیانت بلو است که در ۲۵ میلی لیتر اتانول ۹۵٪ و ۵۰ میلی لیتر اسید فسفریک ۸۵٪ حل شد. سپس به کمک آب مقطر به حجم نهایی ۵۰۰ میلی لیتر رسانده شد. برای سنجش میزان پروتئین کل، ۱۵ میکرولیتر از عصاره نمونه به ۳ میلی لیتر از محلول واکنش افزوده شد و جذب در طول موج ۵۹۵ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر قرائت شد. میزان پروتئین کل از منحنی استاندارد رسم شده به کمک پروتئین خالص آلبومین بووین[5] به دست آمد (۱۳).

نتایج

اثر کادمیوم بر روی زی توده گیاه و جذب کادمیوم در جدول ۱ نشان داده شده است. وزن تر گیاه به ترتیب ۵۱ و ۱۸ درصد به ترتیب در غلظت ۲ و ۴ میلی گرم بر لیتر کادمیوم کاهش یافت. سطوح مختلف کادمیوم بر روی میزان نیتروژن، فسفر و نیترات گیاه اثری نداشت اما با افزایش غلظت کادمیوم محلول غذایی میزان کادمیوم تجمع یافته در بافت گیاه نیز افزایش یافت (شکل ۱). کادمیوم بر فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز اثری نداشت اما باعث کاهش پروتئین برگها شد.

زمانیکه از هومیک اسید استفاده شد تفاوت معنی داری در وزن تر کاهو مشاهده شد به این صورت که وزن تر ۲۷ و ۱۳ درصد به ترتیب در غلظتهای ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر هومیک اسید در مقایسه با شاهد افزایش یافت. غلظت کادمیوم برگ در حضور هومیک اسید بسیار کم بود اما با تغییر غلظتهای مختلف هومیک اسید تغییر معنی داری نکرد. بیشترین مقدار پروتئین و فعالیت نیترات ردوکتاز تحت تأثیر هومیک اسید ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر حاصل شد. میزان نیترات بافت گیاه تحت تأثیر هومیک اسید کاهش یافت در حالیکه میزان نیتروژن و فسفر تغییر معنی داری نداشت.

بحث

غلظت کادمیوم در قسمت هوایی گیاه به طور چشمگیری با افزایش غلظت کادمیوم محلول غذایی افزایش یافت. اما زمانیکه از هومیک اسید استفاده شد غلظت کادمیوم در گیاه کاهش یافت پس هومیک اسید باعث کاهش جذب کادمیوم شد اما باید به دو نکته توجه داشت اولا" هومیک اسید در غلظتهای بالا دارای این اثر

1 - µmol NO2 .g-1 f.w. h-1
2 - µmol NO3–·g–1 f w

3 - Inductively Coupled Plasma
4 - Coomassie brilliant blue
5 - Albumin bovine

می‌باشد. این تفاوت اثر در آزمایشی که بر روی تنباکو نیز انجام شد نیز ثابت کرد که تنها با افزایش غلظت هومیک اسید میزان جذب کادمیوم کاهش یافت. ثانیاً طبق همین گزارش جذب کادمیوم در غلظتهای کم کادمیوم در بستر (۰، ۵، ۱۰ و ۱۵ میلی گرم در کیلوگرم خاک) تحت تأثیر هومیک اسید کاهش می‌یابد اما در غلظتهای خیلی زیاد کادمیوم، حتی هومیک اسید نیز نمی تواند کاملاً موثر باشد و از جذب کادمیوم جلوگیری موثری داشته باشد (۱۶). این تحقیق نیز ثابت کرد غلظت ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر هومیک اسید باعث کاهش معنی داری در غلظت کادمیوم برگها می‌شود و به اندازه کافی برای این مقدار سمیت کاهو در بستر کافی می‌باشد و میزان جذب کادمیوم را به زیر حد خطرناک برای سلامتی انسان (۰/۱ میلی گرم بر کیلوگرم وزن تر گیاه)(۲۳)، کاهش می‌دهد. زیرا میزان کادمیوم ۲۲/۷۵ و ۳۰/۳۶ میلی گرم در گرم وزن خشک در تیمارهای۲ و ۴ میلی گرم بر لیتر کادمیم در حضور ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر هومیک اسید بود.

در این آزمایش نیز نشان داده شد که در غلظت ۲ و ۴ میلی گرم در لیتر کادمیوم با اضافه کردن هومیک اسید به محیط کشت میزان جذب کادمیوم کاهش یافت. طبق نتایج حاصله اگرچه هومیک اسید باعث کاهش جذب فلزات سنگین توسط گیاه می‌شود اما از طرف دیگر باعث افزایش جذب نیتروژن نیز در کاهو شده است. هومیک اسید با افزایش رشد ریشه و سطح تارهای کشنده باعث می‌شود که جذب عناصری چون پتاسیم و نیتروژن و آهن افزایش یابد (۱۸). بعضی گزارشات بیان می‌کند که اثر فلویک اسید بر روی ریشه بیش از هومیک اسید است. مواد هومیکی شامل فلویک اسید تقریبا همیشه باعث افزایش جذب فسفر توسط گیاه می‌شوند. در کاهو میزان فسفر تغییر معنی داری نداشت اما نیتروژن افزایش یافت. با توجه به نتایج ذکر شده دلیل احتمالی آن نوع هومیک اسید مصرفی در این آزمایش و درصد هومیک اسید به فلویک اسید آن می‌باشد از طرفی چون کاهو رشد سریع و کوتاه مدتی دارد نیاز به جذب نیتروژن بیشتری نسبت به فسفر دارد.

از نظر فیزیولوژی افزایش رشد به این دلیل است که مواد هومیکی باعث افزایش سطح ریشه و از طرفی افزایش جذب برخی مواد غذایی از جمله نیتروژن که در رشد بسیار موثر است می‌شود. افزایش نیتروژن و عناصر دیگر باعث افزایش میزان کلروفیل و فتوسنتز گیاه شده (۲۱) و از این طریق رشد را افزایش می‌دهد. روتان و اسکتینز (۲۰) مشاهده کردند رشد در گیاهان خیار تیمار شده با هومیک اسید است افزایش یافت (۲۰). در این آزمایش نیز میزان کلروفیل، فتوسنتز و رشد کاهو تحت تأثیر مواد هومیکی تجاری افزایش یافت.

با اثری که هومیک اسید بر جذب نیتروژن و فسفر و برخی دیگر از عناصر دارد این نگرانی وجود دارد که آیا هومیک اسید باعث افزایش جذب نیترات که یکی از آلوده کننده های مهم سبزیجات است نیز در حد تهدید کننده برای سلامتی بشر می‌شود؟

میزان نیترات قسمت هوایی زمانیکه از هومیک اسید استفاده شد نسبت به شاهد کاهش یافت. گزارش شده است که هومیک اسید می‌تواند در جذب نیترات اثر داشته باشد. طبق تحقیقات کاکسو و همکاران (۵) بر روی گندم نشان داد که هومیک اسید با وزن مولکولی کم جذب نیترات توسط ریشه را افزایش داد اما این افزایش جذب توسط ریشه باز هم کمتر از یون نیترات به تنهایی است. اما از طرفی زمانی که از هومیک اسید در غلظت بالا و یا زمانی که از هومیک اسید با وزن مولکولی بالا استفاده شد جذب نیترات کاهش یافت آنها معتقد بودند که هومیک اسید بر بیان مولکولی پروتئینهای دخیل در جذب نیترات در ریشه اثر دارد زیرا هومیک اسید با کمی‌اسیدی کردن محیط باعث فعال شدن ژن *AtNrt 1:1* در آرابیدوپسیس که کد کننده ناقل پروتئینی نیترات در ریشه است می‌شود. همچنین آنها بیان کردند که هومیک اسید به اندازه یون نیترات بر فعالیت نیترات ردوکتاز گندم اثری ندارد. نتایج مشابه توسط کاکسو و همکاران (۵) نیز در گندم به دست آمد آنها نیز دلیل افزایش جذب نیترات توسط هومیک اسید با وزن مولکولی کم را کاهش اسیدیته محیط ریشه و سهولت در داخل شدن همزمان[1] نیترات و H^+ به داخل ریشه می‌شود، دانستند. نتایج مشابه در جو نیز به دست آمد (۱۸). اما دلیل مغایر بودن نتایج تحقیق حاضر (عدم افزایش جذب نیترات در اثر کاربرد هومیک اسید) با آنچه توسط بعضی از محقق های به دست آمد را میتوان در نوع و غلظت هومیک اسید مصرفی دانست. همانطور که ذکر شد افزایش جذب نیترات در غلظت کم و توسط هومیک اسید با وزن مولکولی کم حاصل شده اما در جایی که غلظت و وزن مولکولی هومیک اسید افزایش یافت مانند نتایج حاصله در این تحقیق، جذب نیترات کاهش یافت (۵).

برای بررسی تغییر فیزیولوژیکی که در گیاه باعث این کاهش اثر هومیک اسید در جذب نیترات می‌شود، فعالیت اولین آنزیمی‌که در متابولیسم نیترات دخیل است یعنی نیترات ردوکتاز پیگیری شد. نتایج این آزمایش نشان داد که هومیک اسید باعث افزایش فعالیت نیترات ردوکتاز شد که میتواند سریعاً نیترات را تبدیل به آمونیوم در گیاه کرده و آن را وارد متابولیسم گیاهی کند و از تجمع آن جلوگیری نماید (۱۵). از طرفی هومیک اسید باعث افزایش نیتروژن کل در گیاه شده است که با توجه به کاهش نیترات در گیاه بیان کننده این مطلب است که یا جذب آمونیوم نسبت به نیترات افزایش یافته است و یا فعالیت آنزیمی‌دخیل در متابولیسم نیترات افزایش و باعث احیاء سریع نیترات در گیاه و ورود به ساختار گیاه شده است. گزارشات محققان دیگر بیان می‌کند هومیک اسید بر آنزیمهای دخیل در متابولیسم نیتروژن و

1 - Symport

ساخت پروتئین اثر دارد (۱۵). بلافاصله پس از اینکه گیاه نیترات جذب کرد توسط آنزیمهای احیا کننده، احیا شده و در ساخت ماکرومولکولهای تشکیل یافته از نیتروژن شرکت می‌کند. میزان تغییرات نیترات در گیاه وابسته به عواملی مختلفی از جمله مقدار نیترات در محیط کشت دارد اما به هر حال به نظر می‌رسد هومیک اسید باعث فعال شدن آنزیم هایی می‌شود که نقش کاهش نیترات و افزایش سنتز پروتئین را به عهده دارد (۱۵).

با افزایش غلظت کادمیوم محلول غذایی میزان پروتئین کل کاهش یافت (جدول ۲). تحقیقات نشان می‌دهد سلولهای گیاه زمانیکه تحت هر نوع تنش محیطی (گرما، فلزات سنگین، شوری...) قرار می‌گیرند، شروع به ساخت پروتئینهای تنش[1] می‌کند. این پروتئینها انواع مختلف دارند از جمله hsp100، hsp90، hsp70 ، hsp60 با وزن مولکولی بالا به مقدار فراوان در گیاهان مختلف مشاهده شده است (۲۲ و ۲۴). انواع پروتئینهایی با وزن مولکولی کمتر حدود ۱۷۰۰۰ تا ۳۰۰۰۰ و نوع سوم به نام Ubiquitin (فقط ۷۶ اسید آمینه) که دارای قدرت حفاظت کنندگی بالایی داشت نیز درگیاهان وجود دارد (۱۰) . پس از اینکه کادمیوم باعث تغییر شکل و دفرمه شدن پروتئینهای سلول می‌شود hsp70 افزایش می‌یابد. این پروتئین و خصوصاً Ubiquitin تمایل زیادی به چسبیدن به پروتئینهای دفرمه شده دارند و به آنها کمک می‌کنند تا شکل اصلی خود را دوباره پیدا کنند و این کار را از طریق استقرار مجدد پروتئینهای نافرم به غشاهای سلولی مناسب انجام می‌دهند (۱۱). اختلال در فعالیت پروتئینهای تنش Ubiquitin باعث نکروزیس برگهای تنباکو شد (۲). افزایش پروتئینهای تنش تحت تأثیر افزایش کادمیوم در محیط کشت لاینهای مقاوم لوبیا[2] (۱۴)، تنباکو[3] (۸)، در برنج[4] (۱۹) نیز گزارش شده است. نتیجه گیری کلی از تحقیق های فوق نشان داد که پروتئینهای تنش فقط در غلظتهای بالای کادمیوم و یا در ارقام مقاوم ظهور می‌یابد. این پروتئینها صدمات وارده به سایر پروتئینهای سلول و غشا سلولی را تقلیل داده و یا ترمیم می‌کنند (۱۷).

اسید ثابت نشد. زیرا با افزایش هومیک اسید به محیط کشت کاهو تحت استرس کادمیوم نه تنها جذب کادمیوم کاهش یافت بلکه خطر تجمع نیترات برای نیز وجود نداشت.

جدول۱- اثر سطوح مختلف کادمیوم در محیط کشت بر میزان نیتروژن، فسفر، پروتئین، نیترات و نیترات ردوکتاز در برگ کاهو

صفات اندازه گیری شده	غلظت کادمیوم mgL^{-1}		
	۰	۲	٤
وزن تر اندام هوایی (g)	۱۲۰/۰۲ a	۱۰۶/۰۴ b	۷۶/۵۶ c
نیتروژن($\mu g\ g^{-1}$)	۰/۴۲۵ a	۰/۴۱۹ a	۰/۴۰۳ a
فسفر($\mu g\ g^{-1}$)	۱/۱۵۰ a	۱/۰۷۱ a	۱/۰۷۴ a
پروتئین($\mu g\ g^{-1}$)	۰/۹۹۵a	۰/۷۳۹b	۰/۹۴۲ab
نیترات($\mu mol\ NO_3\ .g^{-1}\ f.w$)	۰/۱۷۲a	۰/۱۸۲a	۰/۱۶۰a
نیترات ردوکتاز ($\mu mol\ NO_2\ .g^{-1}\ f.w.\ h^{-1}$)	۰/۱۸۰a	۰/۱۷۹a	۰/۱۶۷a

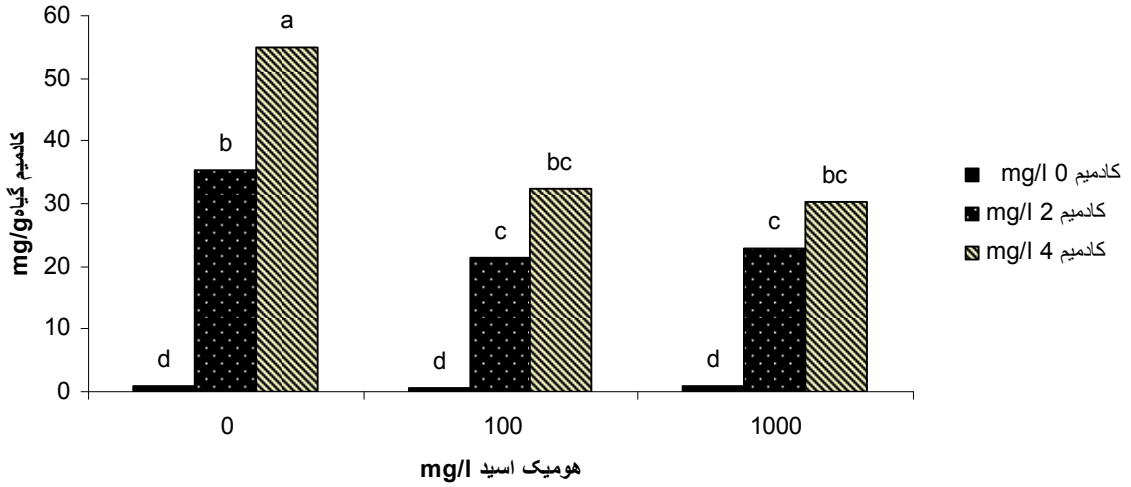
†در هر سطر، میانگین های دارای حروف مشترک، در سطح احتمال ۵٪ آزمون دانکن اختلاف معنی داری ندارند.

1 - Heat shock proteins (hsps, hsc)
2 - Phaseolus vulgaris
3 - Nicotiana plumbaginifolia
4 - Oryza sativa

جدول۲- اثر سطوح مختلف هومیک اسید در محیط کشت بر میزان نیتروژن، فسفر، پروتئین، نیترات و نیترات ردوکتاز در برگ کاهو

صفات اندازه گیری شده	غلظت هومیک اسید mgL^{-1}		
	۰	۱۰۰	۱۰۰۰
وزن تر اندام هوایی(g)	۹۰/۷۹b	۱۰۹/۳۳a	۱۰۲/۴۹a
نیتروژن($\mu g\ g^{-1}$)	۰/۳۸۵ b	۰/۴۳۹ a	۰/۴۲۳ a
فسفر($\mu g\ g^{-1}$)	۱/۰۱۵ a	۱/۱۵۶ a	۱/۱۲۵ a
پروتئین($\mu g\ g^{-1}$)	۰/۷۲۴b	۰/۷۰۶b	۰/۸۶۴a
نیترات($\mu mol\ NO_3\ .g^{-1}\ f.w$)	۰/۱۸a	۰/۱۶b	۰/۱۶b
نیترات ردوکتاز ($\mu mol\ NO_2\ .g^{-1}\ f.w.\ h^{-1}$)	۰/۱۳۷b	۰/۰۴۶c	**۰/۳۴۳a**

†در هر سطر، میانگین های دارای حروف مشترک، در سطح احتمال ۵٪ آزمون دانکن اختلاف معنی داری ندارند.



شکل ۱- اثر متقابل غلظتهای مختلف هومیک اسید و کادمیم بر مقدار کادمیم برگ

منابع

1- Alberts J.J., Alberts, Takacsa M. and Pattanayekc M. 2000. Influence of IHSS standard and reference materials on copper and mercury toxicity to *Vibrio fischeri*. Acta Hydrochem. Hydrobiol. 28. 428–435.

2- Bachmair A., Becker F., Masterson R.V., and Schell J. 1990. Perturbation of the ubiquitin system causes leaf curling, vascular tissue alterations and necrotic lesions in a higher plant. EMBO J. 9: 4543–4549.

3- Cannons A.C., Barber M.J., and Solomonson L.P. 1993. Expression and characterization of the hemebinding domain of Chlorella nitrate reductase. J. Biol. Chem. 268:3268–71.

4- Cataldo D.A., Haroon M., Schrader L.E., and Youngs V.L., 1975.Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. Soil Sci. Plant Anal. 6: 71–80.

5- Cacco G., Attina` E., Gelsomino A., and Sidari M. 2000. Effect of nitrate and humic substances of different molecular size on kinetic parameters of nitrate uptake in wheat seedlings. Journal of Plant Nutrition and Soil Science. 163: 313–320.

6- Delfine S; Tognetti R.; Desiberio E. and alvino A. 2005. Effect of foliar application of N and humic acids on growth and yield of durum Wheat. Agron. Sustain. Dev. 25: 183-191.

7- Fabio M. Da Mattaa JoseÂ A.T., do Amaralb, Alemar B. Renaca. 1998. Growth periodicity in trees of *Coffea*

arabica L. in relation to nitrogen supply and nitrate reductase activity.Field Crops Research 60 : 223±229.

8- Fenik S.I., Solodushko V.G., Trofimyak T.B., Blume Y.B. 1997. Cadmium-tolerance in Nicotiana plumbaginifolia depends on synthesis of both phytochelatin and cadmium-binding proteins. J. Exp. Bot. 48, 99.
9- Hallberg GR. 1989. Nitrate in ground water in the United States. In Nitrogen Management and Ground Water Protection, ed. RF Follet, pp. 35–74.
10- Hershko A. 1988. Ubiquitin-mediated protein degradation. J.Biol. Chem. 263, 15237–15240.
11- Jungmann J., Reins H.-A., Schobert C., Jentsch S. 1993. Resistance to cadmium mediated by ubiquitin-dependent proteolysis. Nature 361, 369–371.
12- Lguirati A., Elmousadik A., Hafidi M. 2004. Contribution alade marche de re´ habilitation des sites de´ charges au Maroc. In: Proceedings of the First International Symposium on the Management of Liquid and Solid Residues (Malisore), Mohammadia, Morocco, 26–27, p. 131.
13- Lowery H., Rosebrottgh N.J., Farr A.L., and Randall R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.
14- Marchetti S., and Leita L. 1995. Risposta sporofitica e gametofitica allo stress da cadmio in Pisum sativum. In: Atti XXXIX Convegno Annuale Societa` Italiana di Genetica Agraria,Vasto Marina, Italy, pp. 207–208.
15- Mehta and H. S. Srivastava.1980.Comprative stability of ammonium and nitrate induced nitrate Reductase activity in maize leaves. P. Photochemistry. Vol. 19, pp.
16- Michael W.H. Evangelou, Hatice Daghan, and Andreas Schaeffer. 2004. The influence of humic acids on the phytoextraction of cadmium from soil. Chemosphere 57 207–213.
17- Panaretou B., and Piper P.W. 1992. The plasma membrane of yeast acquires a novel heat shock protein (hsp30) and displays a decline in proton-pumping ATPase levels in response to both heat shock and the entry to stationary phase. Eur. J. Biochem. 206, 635–640.
18- Piccolo Nardi A.S., and Coxcheri G. 1992. Structural characteristic of humic substance as related to nitrate uptake and growth regulation in plant system. Soil Bioi. Biochem. Vol. 24, No. 4, pp. 373.-380.
19- Prasad M.N.V. 1997. Trace metals. In: Prasad, M.N.V. (Ed.), Plant Ecophysiology. Wiley, New York, pp. 207–249.
20- Rauthan B.S., and Schnitzer M. 1981. Effects of a soil fulvic acid on the growth and nutrient content of Cucumber (*Cucumis sativus*) plants. Plant and Soil 63: 491
21- Sladky Z. 1959. The effect of extracted humus substances on growth of tomato plants. Biologia Plantarum 1, 142–150.
22- Torabian E. 1999. The effect of sewage sludge on the absorption of heavy metals on the vegetable of south of Iran. Soil and water. 16:2.
23- Vierling E. 1991. The roles of heat shock proteins in plants. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 42, 579–620.
24- Waters E.R., Lee G.J., and Vierling E. 1996. Evolution, structure and function of the small heat-shock proteins in plants. J. Exp. Bot. 47, 325–338.