

AKÜ FEMÜBİD 20 (2020) 031001 (374-381)

AKU J. Sci. Eng. 20 (2020) 031001 (374-381)

DOI: 10.35414/akufemubid.695420

Araştırma Makalesi / Research Article

Krom Stresine Maruz Kalan Mısırdaki Dışsal Sistein Uygulamasının Etkileri

Hakan TERZİ*, Mustafa YILDIZ

Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Afyonkarahisar

* Sorumlu yazar e-posta: hakanterzi81@gmail.com ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0003-4817-1100>
e-posta: mustafa_yildizus@yahoo.com ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-6819-9891>

Geliş Tarihi: 27.02.2020

Kabul Tarihi: 02.06.2020

Öz

Sistein (Cys), kükürt metabolizmasının ilk organik kükürtlü bileşimidir. Cys dahil kükürt metabolizmasının ürünleri, bitkilerin ağır metal ve oksidatif strese karşı cevaplarında biyolojik fonksiyonlara sahiptir. Bu nedenle bu çalışmada, mısır (*Zea mays* L. cv. Bora) fidelerinin yapraklarında Cys'in krom (Cr) stresinin etkilerini hafifletme üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Hidroponik olarak yetiştirilen fidelerin köklerine 7 gün süreyle Cr stresi (100 µM) ve Cr ile kombine şekilde Cys (500 µM) uygulanmıştır. Cr stresi büyümede azalma, kloroz ve yapraklarda kıvrılma gibi toksisite semptomlarına neden olmuştur. Cr stresi, bağıl su içeriğini (BSİ), δ-aminolevulinik asit dehidrataz (ALAD) aktivitesini, klorofil ve protein içeriklerini azaltmıştır. Diğer taraftan, Cr yapraklarda süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) aktivitelerini azaltırken, peroksidaz (POD) aktivitesini artırmıştır. İlave olarak, Cr malondialdehit (MDA) birikimi ve sistein içeriğini arttırmıştır. Kök ortamına dışsal Cys uygulaması, büyümedeki Cr teşvikli inhibisyonu azaltmıştır. Dışsal Cys uygulaması Cr stresi koşullarında klorofil birikimini ve sistein içeriğini artırmıştır. Ayrıca Cys uygulaması, SOD ve CAT aktivitelerini arttırmış ve Cr teşvikli MDA birikimini önemli düzeyde azaltmıştır. Bu sonuçlar, dışsal Cys uygulamasının Cr stresinin neden olduğu oksidatif stresin olumsuz sonuçlarını azalttığını göstermektedir.

Anahtar kelimeler

Antioksidan enzimler;
Krom stresi; Mısır;
Sistein; Tolerans

Effects of Exogenous Cysteine Application on Maize Exposed to Chromium Stress

Abstract

Cysteine (Cys) is the first organosulfur compound of sulfur metabolism. The products of sulfur metabolism including Cys have biological functions in responses to heavy metal stress and oxidative stress. In this study, therefore, the effects of Cys on alleviating chromium (Cr) toxicity in the leaves of maize (*Zea mays* L. cv. Bora) seedlings were investigated. Hydroponically grown seedlings were subjected to Cr stress (100 µM) and in combination with Cys (500 µM) for 7 days. Cr stress resulted in toxicity symptoms such as reduced growth, chlorosis, and rolling in leaves. Cr stress decreased the relative water content (RWC), δ-aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) activity, and chlorophyll and protein contents. On the other hand, Cr decreased activities of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) in leaves, while increased the activity of peroxidase (POD). In addition, Cr increased the accumulation of malondialdehyde (MDA) and cysteine contents. Exogenous application of Cys to rooting media alleviated Cr-induced growth suppression. Exogenous Cys promoted the chlorophyll accumulation and cysteine content under Cr stress. Moreover, application of Cys increased the activities of SOD and CAT, and markedly diminished Cr-induced MDA accumulation. These results suggest that the exogenous application of Cys reduced the negative consequences of oxidative stress caused by Cr stress.

Keywords

Antioxidant enzymes;
Chromium stress;
Maize; Cysteine;
Tolerance

1. Giriş

Artan endüstriyel faaliyetler, çevreye aşırı miktarlarda toksik metallerin yayılmasına neden olmakta ve bu durum tarımsal alanların kirlenmesine yol açmaktadır. Krom (Cr) tarımsal topraklarda en çok bulunan ikinci inorganik kirleticidir ve bitkiler için son derece toksiktir (Zhao *et al.* 2016). Mutajenik ve kanserojenik özellikleri nedeniyle, tarımsal toprakların Cr ile kirlenmesi önemli bir çevresel problem haline gelmiştir (Seth *et al.* 2012). Birçok bitki türünde Cr stresi, bitki büyümesini azaltmakta, yapraklarda kloroza neden olmakta ve verimde inhibisyona neden olmaktadır (Ali *et al.* 2015, Cai *et al.* 2019). Cr'un bitkilerde neden olduğu stres kısmen reaktif oksijen türlerinin (ROT) artmasıyla ilişkilidir (Pandey *et al.* 2009). Diğer taraftan, bitkiler antioksidan metabolit ve enzimlerden oluşan bir antioksidan savunma sistemi geliştirmişlerdir (Noctor *et al.* 2012).

Yüksek derecede toksik olan Cr kısa sürede gıda zincirine dahil olmakta ve böylece insan sağlığı için önemli risk oluşturmaktadır. Bu nedenle, kirlenmiş çevresel koşullarda daha güvenli gıda üretimi büyük endişe konusudur. Bu nedenle, ürün verimliliğini artırmak ve Cr stresinin etkilerini azaltmanın yanı sıra sağlık risklerini en aza indirmeye yardımcı olabilecek şekilde bitkilerdeki Cr içeriğini azaltmak için farklı yaklaşımlara gereksinim vardır. Bu bağlamda, ağır metal stresinin üstesinden gelmek için farklı bileşiklerin kullanılması uygun yollardan biri olabilir. Örneğin bazı bitki türlerinde selenyum, silikon ve glisinbetain gibi uygulamaların Cr stresinin olumsuz etkilerini hafiflettiği bildirilmiştir (Qing *et al.* 2015, Ali *et al.* 2015, Tripathi *et al.* 2015).

Sistein (Cys), bitkilerdeki kükürt özümlemesinin ilk organik bileşimidir (Takahashi *et al.* 2011) ve bitkilerde ağır metal toleransında rol oynayan glutatyon (GSH) ve fitoşelatinler (PC'ler) gibi çok sayıda biyomolekül için fonksiyonel bir öncü görevi görmektedir (Noctor *et al.* 2012). Birçok çalışmada, çeşitli abiyotik ve biyotik streslere karşı bitki toleransını arttırmada Cys'in yanı sıra GSH gibi kükürt özümlemesi ile ilgili bileşiklerin yararlı rolü olduğu gösterilmiştir (Qiu *et al.* 2013, Fang *et al.* 2016). Krom stresinin bitkiler üzerindeki

etkileri kapsamlı şekilde araştırılmış olmasına karşın, bitkilerde Cys ve Cr etkileşimi ile ilgili daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Ekonomik önemi ve geniş üretim alanı nedeniyle mısır (*Zea mays* L.) dünyadaki en önemli tarımsal bitkilerden biridir (Shiferaw *et al.* 2011). Mısır bitkilerinde Cr alımının yanı sıra fizyolojik özellikleri ve antioksidatif savunma mekanizmaları üzerindeki etkilerini araştıran birkaç çalışma bulunmasına karşın (Anjum *et al.* 2017, Adhikari *et al.* 2020), dışsal Cys uygulamasının etkilerini araştıran bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle, bu çalışmada Cr stresine maruz kalan mısır fidelerinde dışsal Cys uygulamasının etkisinin fizyolojik ve biyokimyasal verilerle değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2. Materyal ve Metot

2.1 Bitki materyali ve yetiştirme koşulları

Mısır (*Zea mays* L. cv. Bora) tohumları ticari firmadan (MAY Tohumculuk) temin edilmiştir. Tohumlar %1 sodyum hipoklorür içeren çözeltilerde 10 dakika boyunca steril edilmiş ve 5 kez steril dH₂O ile yıkanmıştır. Steril edilmiş tohumlar, içerisinde dH₂O ile ıslatılmış iki kat filtre kağıdı bulunan çimlendirme kaplarında 48 saat karanlıkta çimlendirilmiştir. Homojen fideler, modifiye Hoagland besin çözeltisi (pH 6.0) bulunan polietilen kaplara transfer edilmiştir. Daha sonra fideler, kontrollü iklim kabininde (23±1 °C, %60 bağıl nem, 250 µmol foton m⁻² s⁻¹ ve 14:10 fotoperiyot) 3 gün büyütülmüştür. Bu süre sonunda fideler potasyum dikromat ve/veya Cys uygulamalarına maruz bırakılarak 4 farklı uygulama grubu oluşturulmuştur: (1) Kontrol (K), sadece besin çözeltisi; (2) Cys, 500 µmol; (3) Cr, 100 µmol ve (4) Cys+Cr, 500 µmol Cys +100 µmol Cr. Besin çözeltileri gün aşırı değiştirilmiştir. Uygulamaların 7. gününde bitkiler hasat edilmiş ve analizler için kullanılmıştır.

Yaprakların bağıl su içeriği (BSİ), Hayat vd. (2007)'ne göre belirlenmiştir. Bitkiler hasat edildikten sonra tamamen gelişmiş ikinci yaprakların taze ağırlıkları belirlenmiştir. Daha sonra yapraklar 48 saat deiyonize su içerisinde inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda yaprak

yüzeyindeki fazla su alınmış ve turgorlu ağırlık belirlenmiştir. Yaprakların kuru ağırlıkları, 48 saat 80°C'de inkübasyondan sonra kaydedilmiş ve BSi aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$BSi (\%) = \frac{\text{Taze ağırlık} - \text{Kuru ağırlık}}{\text{Turgorlu ağırlık} - \text{Kuru ağırlık}} \times 100$$

2.2 ALAD aktivitesi ve klorofil içeriği

Yapraklarda δ-aminolevulinik asit dehidrataz (ALAD) ekstraksiyonu, Naito vd. (1980)'ne göre gerçekleştirilmiştir. Taze yaprak dokuları, ditiyoteritol (DTT) içeren Tris-HCl tamponu (pH 8.2) içinde homojenize edilmiştir. Homojenat süzüldükten sonra santrifüj edilmiştir. Süpernatant ALA, DTT ve MgCl₂ içeren Tris-HCl tamponu ile 2.5 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. Reaksiyon, trikarboksilik asit ilave edilerek sonlandırılmıştır. Örnekler soğutulduktan sonra santrifüj edilmiş ve süpernatant Ehrlich'in reaktifi ile karıştırıldıktan sonra karışımın absorbansı 555 nm'de ölçülmüştür. Porfobilinojen (PBG) konsantrasyonu, Mauzerall ve Granick (1956)'e göre hesaplanmış ve ALAD aktivitesi, 37°C'de oluşan PBG nmol/mg protein/2.5 saat olarak ifade edilmiştir. Protein miktarı Bradford (1976)'a göre belirlenmiştir. Yaprak dokularından klorofiller metanol ile ekstrakte edilmiş ve Wellburn (1994)'e göre analiz edilmiştir.

2.3 Sistein ve MDA içerikleri

Lipid peroksidasyonu, malondialdehid (MDA) oluşumunun ölçülmesiyle belirlenmiştir (Heath and Packer 1968). Molar ekstinksiyon katsayısı ($\epsilon = 155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) yaprak dokularındaki MDA içeriğinin hesaplanması için kullanılmıştır.

Sistein, pembe renkli bir ürün oluşturmak üzere asit ninhidrin ile spesifik olarak reaksiyona girmektedir. Bu nedenle, Cys içeriği asit ninhidrin ayırıcını kullanan Gaitonde (1967)'nin metoduna göre belirlenmiştir. Taze yaprak dokuları (500 mg) %5 soğutulmuş perklorik asit içerisinde homojenize edilmiştir. Santrifügasyondan sonra süpernatantlar eşit hacimde ninhidrin ve asetik asit ile karıştırılmıştır. Karışımın absorbansı 560 nm'de belirlenmiş ve sistein miktarı kalibrasyon eğrisi kullanılarak hesaplanmış ve $\mu\text{mol g}^{-1}$ KA olarak ifade edilmiştir.

2.4 Antioksidan enzim aktiviteleri

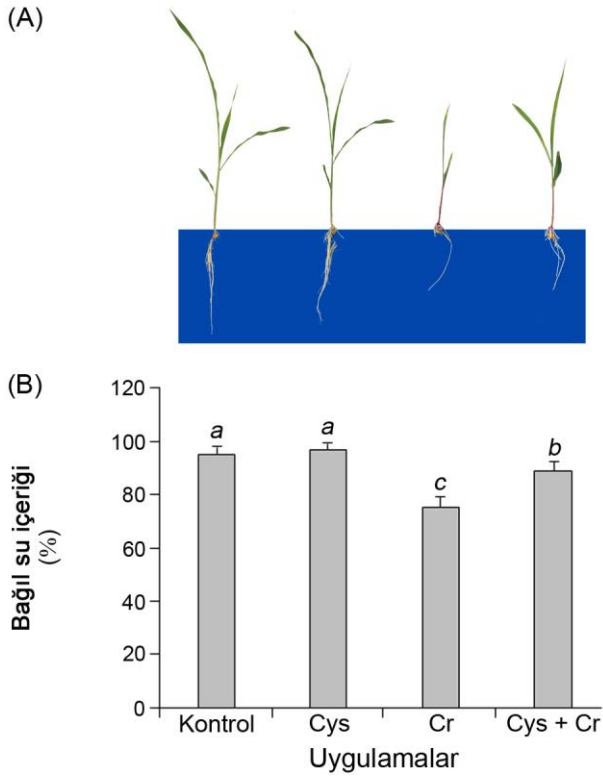
SOD (süperoksit dismutaz; EC 1.15.1.1) aktivitesi, ışıkta nitroblue tetrazolium tuzunun indirgenmesini engelleyebilme kabiliyeti izlenerek tespit edilmiştir (Beauchamp and Fridovich 1971). Yapraklardaki CAT (katalaz; EC 1.11.1.6) aktivitesi, H₂O₂'nin kaybolmasına bağlı olarak 240 nm'de absorbanstaki düşüş ölçülerek belirlenmiştir (Aebi *et al.* 1984). Yaprak dokusundaki POD (guaiakol peroksidaz; EC 1.11.1.7), guaiakol oksidasyonunun ürünü olan tetraguaiacol oluşumuna bağlı olarak 470 nm'deki absorbans değişikliği ölçülerek belirlenmiştir (Mika and Lüthje 2003).

2.5 İstatistiksel analizler

Deneylerden elde edilen veri ortalamalar SPSS paket programı (SPSS ver. 16) kullanılarak tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile analiz edilmiştir. Kontrol ve diğer üç uygulama arasındaki farklar %5 olasılık seviyesinde Duncan'ın çoklu karşılaştırma testi ile analiz edilmiştir ($p < 0.05$).

3. Bulgular ve Tartışma

Mısır yapraklarındaki Cr stresi semptomları büyüme ve bağıl su içeriği belirlenerek değerlendirilmiştir (Şekil 1). Cr stresi fide büyümesinde önemli bir azalmaya neden olmuştur (Şekil 1A) ($p < 0.05$). Cr stresi, BSi'deki azalma ile gösterildiği gibi yapraklardaki su dengesini bozmuştur ve bu sonuçlar Gill vd. (2013)'nin bulgularıyla benzerlik göstermiştir. Bununla birlikte, Cr stresi altındaki fidelere Cys uygulaması BSi değerlerini arttırmıştır. Ayrıca, dışsal Cys uygulamasının tek başına mısır yapraklarının BSi üzerinde önemli bir etkisi belirlenmemiştir (Şekil 1B). Dışsal Cys uygulamasının Cr toleransı üzerine bu pozitif etkisi Arabidopsis fidelerinde de belirlenmiştir (Fang *et al.* 2016). Bu durum Cys'in, bitki dokularında ağır metal alımını veya hareketini önleyerek bitki savunma sistemini geliştirmesinden kaynaklanabilir.

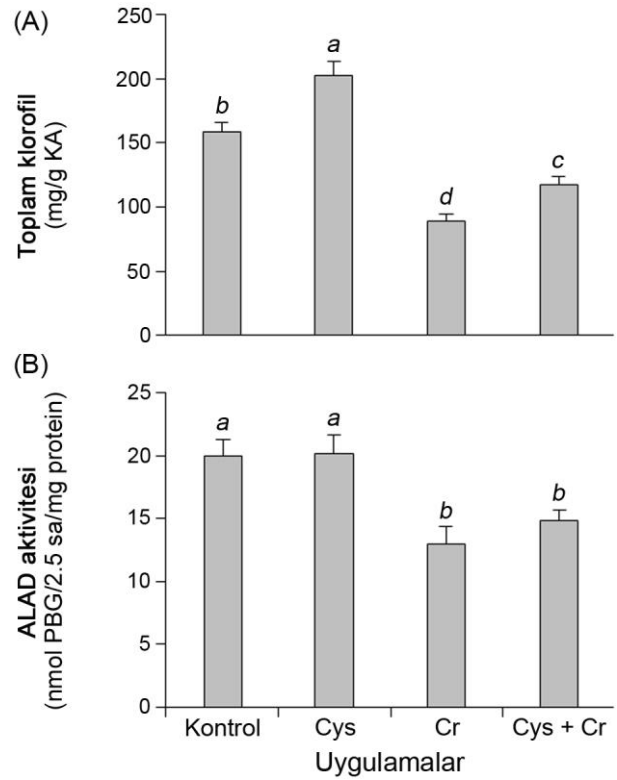


Şekil 1. Krom stresi ve dışsal Cys uygulamasının fide büyümesi (A) ve yaprak bağıl su içeriği (B) üzerine etkisi. Küçük harfler $p < 0.05$ düzeyinde uygulamalar arasında önemli farklılığı göstermektedir.

Bitkilerde Cr stresinin genel bir belirtisi klorozdur. Cr stresine maruz bırakılan mısır yapraklarında klorofil içeriğinde %43.5'lik önemli bir azalma belirlenmiştir ($p < 0.05$). Bitki dokularında artan Cr birikimine bağlı olarak fotosentetik pigment içeriğinin azaldığı bildirilmiştir (Shanker *et al.* 2005). Bununla birlikte, araştırmamızda dışsal Cys uygulaması Cr'un klorofil içeriği üzerindeki bu olumsuz etkisini hafifletmiştir (Şekil 2A). Gill vd. (2015), Cr stresinin çeltik yapraklarındaki klorofil içeriğini azalttığını ve Cr ile ALA birlikte uygulandığında bu olumsuz etkinin ortadan kalktığını bildirmiştir.

Klorofil biyosentezinde aminolevulinik asit dehidrataz (ALAD), iki ALA molekülünden porfobilinojenin oluşumunu katalize etmektedir. Ağır metaller karasal ve sucul bitkilerde ALAD aktivitesini azaltır ve bu durum klorofil biyosentezinin inhibisyonuna yol açmaktadır (Vajpayee *et al.* 2000). Bununla birlikte, Cr stresinin kükürt eksikliğine neden olarak S-adenozilmetiyonin miktarında ve dolayısıyla klorofil içeriğinde azalmaya neden olduğu belirtilmiştir

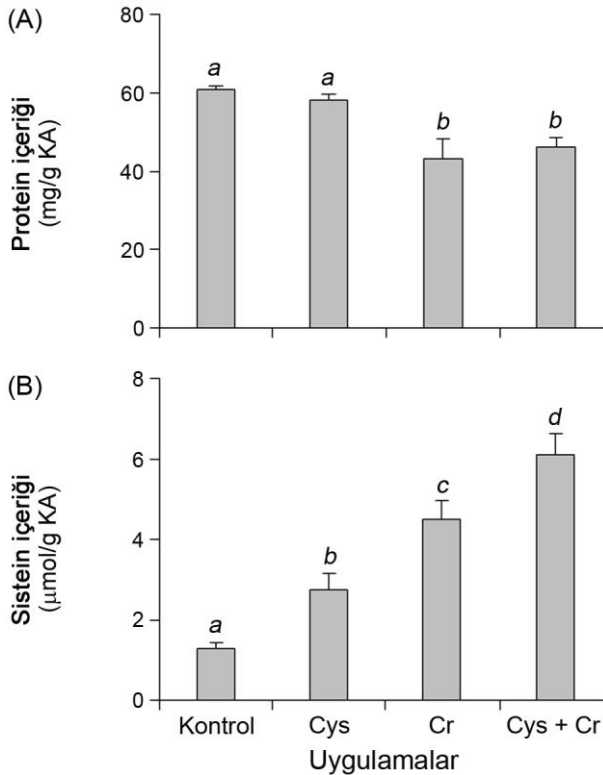
(Hoefgen and Nikiforova 2008). Mevcut araştırmada, Cr stresi ALAD aktivitesini azaltmış ve Cys uygulaması Cr stresinin bu etkisinde önemli bir değişikliğe neden olmamıştır (Şekil 2B). Vajpayee vd. (2000), ALAD aktivitesinin Cr stresine oldukça hassas olduğunu ve $10 \mu\text{M}$ gibi düşük Cr konsantrasyonunun ALAD aktivitesini ve klorofil içeriğini azalttığını göstermiştir. Dışsal Cys uygulaması içsel S metabolizmasını olumlu etkilemiş olmasına rağmen, reaktif oksijen türlerinin aşırı üretimi, reaksiyon merkezlerinin ve enzim aktivitesinin zarar görmesinden sorumlu olabilir.



Şekil 2. Krom stresi ve dışsal Cys uygulamasının toplam klorofil içeriği (A) ve ALAD aktivitesi (B) üzerine etkisi. Küçük harfler $p < 0.05$ düzeyinde uygulamalar arasında önemli farklılığı göstermektedir.

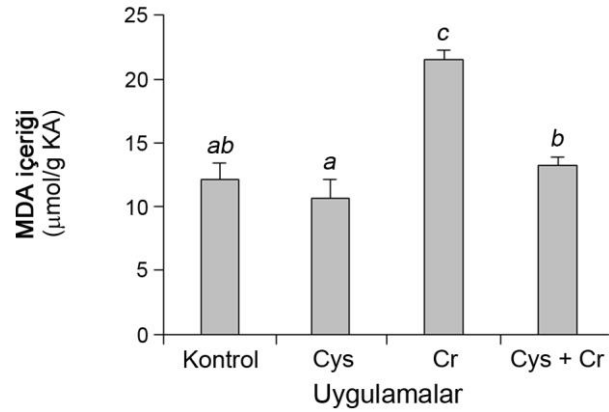
Cr stresi ve dışsal Cys uygulamasının protein içeriği ve içsel Cys içeriği üzerine etkisi Şekil 3'te gösterilmiştir. Cr stresi protein içeriğinde önemli azalmaya neden olurken ($p < 0.05$), bu etki Cys uygulaması ile değişmemiştir (Şekil 3A). Diğer taraftan, Cr stresi ve dışsal Cys uygulamaları içsel Cys içeriğinde kademeli bir artışa neden olmuştur (Şekil 3B). Bitkilerde önemli bir makro besin

elementi olan kükürt ilk olarak Cys'nin yapısında özümlemektedir. Ayrıca Cys ve ondan türetilen GSH, PC'ler ve metalotiyoneinler gibi çeşitli biyokimyasal bileşikler ağır metal savunma cevaplarında önemli rollere sahiptir (Droux 2004). Organik kükürtlü bir bileşik olan Cys sadece savunma ile ilişkili moleküllerin öncüsü değil, aynı zamanda bitkilerde endojen hidrojen sülfürün (H_2S) oluşumu için ana substrattır (Takahashi *et al.* 2011). H_2S ve Cys arasındaki etkileşim bitkilerin metal stresine verdikleri cevaplarda oldukça önemlidir. Arabidopsis'te, H_2S -Cys sisteminin özellikle antioksidan GSH'nin oluşumunu düzenleyerek ve ağır metal bağlayıcı peptidlerin (fitoşelatinler ve metalotiyoneinler) sentezini teşvik ederek Cr toleransını arttırdığı bildirilmiştir (Fang *et al.* 2016). Bu veriler ve bilgiler ışığında araştırmamız kapsamında, mısır fidelerinin Cr(VI) toleransında sistein biyosentez yollarının önemli bir rolü olduğu söylenebilir.



Şekil 3. Krom stresi ve dışsal Cys uygulamasının toplam protein (A) ve sistein (B) içerikleri üzerine etkisi. Küçük harfler $p < 0.05$ düzeyinde uygulamalar arasında önemli farklılığı göstermektedir.

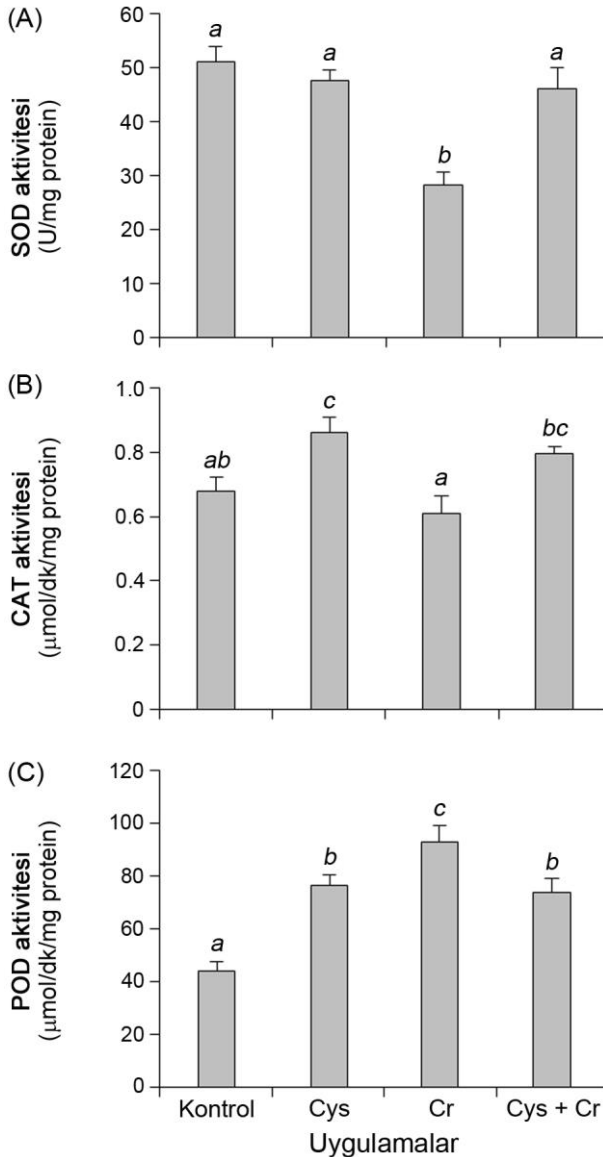
Bitki dokularındaki aşırı Cr birikimi, membran lipidlerinin peroksidasyonuna neden olan reaktif oksijen türlerinin oluşumu arttırmaktadır. MDA genellikle lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olarak tanımlanmaktadır (Singh *et al.* 2004). Mevcut araştırmada, Cr stresi MDA içeriğinde artışa neden olurken, dışsal Cys uygulaması bu etkiyi tersine çevirmiştir (Şekil 4). MDA içeriğindeki artış, Cr stresi altında artan ROT'ların üretimini göstermektedir. Bu sonuçlar, yaprak dokularında Cys uygulamasının Cr birikimini azaltarak ROT'ların üretimini azalttığını göstermektedir. Dışsal Cys'in membran lipidleri üzerine bu koruyucu rolü Arabidopsis fidelerinde de gösterilmiştir (Fang *et al.* 2016).



Şekil 4. Krom stresi ve dışsal Cys uygulamasının MDA içeriği üzerine etkisi. Küçük harfler $p < 0.05$ düzeyinde uygulamalar arasında önemli farklılığı göstermektedir.

Reaktif oksijen türlerinin aşırı üretimi, Cr dahil farklı stres faktörlerinin ortak bir sonucudur. Stres koşulları altında metabolik fonksiyonları korumak ve oksidatif hasarı engellemek için, ROT'ların üretimi ve temizlenmesi arasında bir denge gereklidir. ROT'ların seviyesi, SOD, CAT ve POD gibi antioksidan enzimler ve enzimatik olmayan düşük moleküler ağırlıklı antioksidanlardan oluşan bir antioksidan sistem tarafından kontrol edilmektedir (Schutzendubel and Polle 2002). Cr stresi altındaki bitkilerde SOD aktivitesi azalırken, bu etki dışsal Cys uygulaması ile ortadan kalkmıştır ($p < 0.05$) (Şekil 5A). Dışsal Cys uygulaması hem kontrol hem de Cr stresi altındaki bitkilerde CAT aktivitesini arttırmıştır ($p < 0.05$) (Şekil 5B). Bununla birlikte, Cr stresi yaprak dokularında POD aktivitesini arttırırken, bu fidelere

Cys uygulaması POD aktivitesinde azalmaya neden olmuştur ($p < 0.05$) (Şekil 5C). Ağır metallerin detoksifikasyonunda hücresel mekanizmalar biri de POD'un lokalize olduğu hücre çeperi ve vakuolde metal iyonlarının alıkonulmasıdır (Asada 1992). Dışsal Cys uygulamasına maruz kalan mısır fidelerinde daha düşük Cr birikiminin düşük POD aktivitesine neden olduğu ileri sürülebilir. Bu sonuçlar, dışsal Cys uygulamasının mısır bitkilerinin antioksidan kapasitesini düzenlediği ve dolayısıyla Cr stresini azalttığını göstermektedir.



Şekil 5. Krom stresi ve dışsal Cys uygulamasının SOD (A), CAT (B) ve POD (C) aktiviteleri üzerine etkisi. Küçük harfler $p < 0.05$ düzeyinde uygulamalar arasında önemli farklılığı göstermektedir.

4. Sonuç

Cys uygulaması ile Cr stresine bağlı oksidatif hasar azalmıştır. Bu durum, sistein içeriğindeki artış ve antioksidan enzimlerin değişken seviyeleri ile ilişkili olabilir. Lipid peroksidasyonundaki azalma ile dışsal Cys uygulamasının Cr kaynaklı oksidatif hasarı azaltmadaki koruyucu rolü ortaya konmuştur. Sonuç olarak, bu çalışma dışsal Cys uygulamasının antioksidan sistemi ve oksidatif stresi düzenleyerek mısır fideleri üzerinde Cr stresinin olumsuz etkilerini iyileştirdiğini göstermektedir.

5. Kaynaklar

- Adhikari, A., Adhikari, S., Ghosh, S., Azahar, I., Shaw, A.K., Roy, D., Roy, S., Saha, S. and Hossain, Z., 2020. Imbalance of redox homeostasis and antioxidant defense status in maize under chromium (VI) stress. *Environmental and Experimental Botany*, **169**, 103873.
- Aebi, H., 1984. Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology*, **105**, 121–126.
- Ali, S., Chaudhary, A., Rizwan, M., Anwar, H. T., Adrees, M., Farid, M. and Irshad, M.K., 2015. Alleviation of chromium toxicity by glycinebetaine is related to elevated antioxidant enzymes and suppressed chromium uptake and oxidative stress in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Environmental Science and Pollution Research*, **22**, 10669–10678.
- Anjum, S.A., Ashraf, U., Khan, I., Tanveer, M., Shahid, M., Shakoor, A. and Wang, L., 2017. Phyto-toxicity of chromium in maize: Oxidative damage, osmolyte accumulation, anti-oxidative defense and chromium uptake. *Pedosphere*, **27**, 262–273.
- Asada, K., 1992. Ascorbate peroxidase-a hydrogen peroxide scavenging enzyme in plants. *Physiologia Plantarum*, **85**, 235–241.
- Beauchamp, C. and Fridovich, I., 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, **44**, 276–287.
- Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**, 248–254.
- Cai, M., Hu, C., Wang, X., Zhao, Y., Jia, W., Sun, X., Elyamine, A.M. and Zhao, X., 2019. Selenium induces changes of rhizosphere bacterial characteristics and enzyme activities affecting

- chromium/selenium uptake by pak choi (*Brassica campestris* L. ssp. *Chinensis* Makino) in chromium contaminated soil. *Environmental Pollution*, **249**, 716–727.
- Droux, M., 2004. Sulfur assimilation and the role of sulfur in plant metabolism: a survey. *Photosynthesis Research*, **79**, 331–348.
- Fang, H., Liu, Z., Jin, Z., Zhang, L., Liu, D. and Pei, Y., 2016. An emphasis of hydrogen sulfide-cysteine cycle on enhancing the tolerance to chromium stress in *Arabidopsis*. *Environmental Pollution*, **213**, 870–877.
- Gaitonde, M.K., 1967. A spectrophotometric method for the direct measurement of cysteine in the presence of other naturally occurring amino acids. *Biochemical Journal*, **104**, 627–633.
- Gill, R. A., Ali, B., Islam, F., Farooq, M. A., Gill, M. B., Mwamba, T. M. and Zhou, W., 2015. Physiological and molecular analyses of black and yellow seeded *Brassica napus* regulated by 5-aminolivulinic acid under chromium stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, **94**, 130–143.
- Hayat, S., Ali, B., Hasan, S.A. and Ahmad, A., 2007. Brassinosteroid enhanced the level of antioxidants under cadmium stress in *Brassica juncea*. *Environmental and Experimental Botany*, **60**, 33–41.
- Heath, R.L. and Packer, L., 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplast I. Kinetic and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **125**, 189–198.
- Hoefgen, R. and Nikiforova, V., 2008. Metabolomics integrated with transcriptomics: assessing systems response to sulfur-deficiency stress. *Physiologia Plantarum*, **132**, 190–198.
- Mauzerall, D. and Granick, S., 1956. The occurrence and accumulation of δ -aminolevulinic acid and porphobilinogen in urine. *Journal of Biological Chemistry*, **219**, 435–446.
- Mika, A. and Lüthje, S., 2003. Properties of guaiacol peroxidase activities isolated from corn root plasma membranes. *Plant Physiology*, **132**, 1489–1498.
- Naito, K., Ebato, T., Endo, Y. and Shimizu, S., 1980. Effect of benzyladenine on δ -aminolevulinic acid synthetic ability and δ -aminolevulinic acid dehydratase: differential responses to benzyladenine according to leaf age. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, **96**, 95–102.
- Noctor, G., Mhamdi, A., Chaouch, S., Han, Y., Neukermans, J., MarquezGarcia, B., Queval, G. and Foyer, C.H., 2012. Glutathione in plants: an integrated overview. *Plant Cell and Environment*, **35**, 454–484.
- Pandey, V., Dixit, V. and Shyam, R., 2009. Chromium effect on ROS generation and detoxification in pea (*Pisum sativum*) leaf chloroplasts. *Protoplasma*, **236**, 85–95.
- Qiu, B., Zeng, F., Cai, S., Wu, X., Haider, S. I., Wu, F. and Zhang, G., 2013. Alleviation of chromium toxicity in rice seedlings by applying exogenous glutathione. *Journal of Plant Physiology*, **170**, 772–779.
- Qing, X., Zhao, X., Hu, C., Wang, P. and Zhang, Y., 2015. Selenium alleviates chromium toxicity by preventing oxidative stress in cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *Pekinensis*) leaves. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **114**, 179–189.
- Schutzendubel, A. and Polle, A., 2002. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal of Experimental Botany*, **53**, 1351–1365.
- Seth, C.S., Remans, T., Keunen, E., Jozefczak, K., Gielen, H., Opdenakker, K., Weyens, N., Vangronsveld, J. and Cuypers, A., 2012. Phytoextraction of toxic metals: a central role for glutathione. *Plant Cell and Environment*, **35**, 334–346.
- Shanker, A.K., Cervantes, C., Loza-Tavera, H. and Avudainayagam, S., 2005. Chromium toxicity in plants. *Environment International*, **31**, 739–753.
- Shiferaw, B., Prasanna, B.M., Hellin, J. and Baenziger, M., 2011. Crops that feed the world 6. Past successes and future challenges to the role played by maize in global food security. *Food Security*, **3**, 307–327.
- Singh, K.P., Mohan, D., Sinha, S. and Dalwani, R., 2004. Impact assessment of treated/untreated wastewater toxicants discharged by sewage treatment plants on health agricultural and environmental quality in the wastewater disposal area. *Chemosphere*, **55**, 227–255.
- Takahashi, H., Kopriva, S., Giordano, M., Saito, K. and Hell, R., 2011. Sulfur assimilation in photosynthetic organisms: molecular functions and regulations of transporters and assimilatory enzymes. *Annual Review of Plant Biology*, **62**, 157–184.

- Tripathi, D.K., Singh, V.P., Prasad, S.M., Chauhan, D.K., Kishore Dubey, N. and Rai, A.K., 2015. Silicon-mediated alleviation of Cr(VI) toxicity in wheat seedlings as evidenced by chlorophyll fluorescence, laser induced breakdown spectroscopy and anatomical changes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **113**, 133–144.
- Vajpayee, P., Tripathi, R.D., Rai, U.N., Ali, M.B. and Singh, S.N., 2000. Chromium (VI) accumulation reduces chlorophyll biosynthesis, nitrate reductase activity and protein content in *Nymphaea alba* L. *Chemosphere*, **41**, 1075–1082.
- Wellburn, A.R., 1994. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology*, **144**, 307–313.
- Zhao, X.M., Sobczyk, P.A., Zhao, L.P., Crawford, P. and Li, M.T., 2016. Chromium (VI) transport and fate in unsaturated zone and aquifer: 3D Sandbox results. *Journal of Hazardous Materials*, **306**, 203–209.