

Efecto del Cromo en el crecimiento *in vitro* de dos variedades híbridas de maíz (*Zea mays*)

González-Alejandre Magdalena, Carreón-Abud Yazmín, Martínez-Trujillo Miguel✉

Laboratorio de Genética y Microbiología. Facultad de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Francisco J. Múgica s/n. Col. Felicitas del Río. Morelia, Michoacán.

Resumen

El Cromo (Cr) es el séptimo metal más abundante en la corteza terrestre, varía entre los 100 y los 300 µg/g. Sin embargo, la inadecuada disposición de desechos provenientes de procesos industriales lo han convertido en un importante contaminante ambiental. Los componentes del cromo son perjudiciales para las plantas afectando su crecimiento y desarrollo, por lo que es necesario establecer estrategias para remover el metal de los suelos contaminados y a la vez proteger a las plantas para evitar la disminución de su productividad. En este trabajo, se utilizaron plantas de maíz de dos variedades híbridas, Puma PT3 Poncho y Albatros, para evaluar su tolerancia al Cromo en condiciones de crecimiento *in vitro*, resultando más tolerante en el follaje la variedad Puma, que aunque redujo su crecimiento en concentraciones de 100 a 1000 µM del metal, continuó con su crecimiento.

Palabras clave: Cromo, Maíz, Crecimiento.

Effect of Chromium on *in vitro* growth of two hybrid maize varieties

Abstract

Chromium (Cr) is the seventh most abundant metal in the earth's crust, its concentration varies from 100-300 µg/g. However, the improper disposal of waste from industrial processes have made this metal an important environmental contaminant. Once Cr is deposited in the soil or surface water, mostly it found in soluble form, forming precipitates or adsorbed to the solid fraction of soils and sediments. The chromium compounds are highly toxic to plants and are detrimental to their growth and development, so it is necessary to establish strategies to remove the metal from contaminated soil while protecting the plants to prevent loss of productivity. In this paper, two varieties of maize plants were used, Puma PT3 and Albatros, to assess their Cr tolerance under *in vitro* conditions, being more tolerant in the foliage the Puma variety; although its growth was reduced at 100 to 1000 µM Cr concentrations, they continued growing.

Key words: Chromium, Maize, Growth.

Introducción

El Cromo (Cr) es el séptimo metal más abundante en la corteza terrestre; varía de 100 a 300 µg/g, sin embargo, la inadecuada disposición de desechos provenientes de procesos industriales lo han convertido en un importante contaminante ambiental (Hayat *et al.*, 2011). El Cr es un metal de transición y su química no es sólo rica en la variedad de colores de sus compuestos, sino también en la variedad de estados de oxidación, los cuales van de -2 a +6, siendo las formas más estables y abundantes la trivalente Cr(III) y la hexavalente Cr(VI); los otros estados de valencia son inestables y de vida corta en los sistemas biológicos (Shupack, 1991). El Cr(VI) está asociado al oxígeno, para formar los oxianiones hidrocromato (HCrO_4^-), cromato (CrO_4^{2-}) o dicromato ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$), y en presencia de materia orgánica es reducido a Cr(III) (Shanker *et al.*, 2005). El Cr(III) es termodinámicamente muy estable, se encuentra formando óxidos, hidróxidos y sulfatos, y se le ha encontrado asociado a materia orgánica en suelos y ambientes acuáticos (Shanker *et al.*, 2005).

Estudios previos acerca de las interacciones de microorganismos y plantas con el Cr han proporcionado información sobre su transporte y acumulación; se ha reportado que el Cr(VI) se transporta activamente a través de las membranas celulares, tanto de procariontes como de eucariontes mediante transportadores de sulfato (Cervantes *et al.*, 2001). Los estudios de captación de Cr(VI)

en plantas de *A. thaliana* en medios suplementados con nutrientes minerales, sugieren que la captación es a través de los transportadores de sulfato y de fosfato (López-Bucio *et al.*, 2014). En el citoplasma, la toxicidad del Cr está principalmente relacionada con los procesos de reducción del Cr(VI) a Cr(III), por la acción tanto enzimática como no enzimática, pasando por estados inestables intermedios de Cr(V) y Cr(IV), en el cual se forman radicales libres generando estrés oxidativo y en consecuencia diversos efectos tóxicos para el ADN, lípidos y proteínas (Cervantes y Campos-García, 2007).

El impacto de la contaminación por Cr en la fisiología de las plantas depende de la especiación del metal, la cual es responsable de su movilización y su subsecuente entrada, así como del efecto celular subsiguiente (Shanker *et al.*, 2005). El Cr(VI) inhibe la germinación, causa necrosis y/o clorosis de las hojas, reducción del crecimiento de la raíz y en la producción de biomasa durante el desarrollo post-embrionario (Ortiz-Castro *et al.*, 2007). Este efecto está acompañado de la modificación en la expresión de genes que participan en las vías de señalización de hormonas, el metabolismo energético y la fotosíntesis, así como una deficiencia en la incorporación de nutrientes minerales y en el transporte de agua hacia el tallo (Dubey *et al.*, 2010; Martínez-Trujillo *et al.*, 2014). Por lo anterior, algunos efectos tóxicos del cromo podrían deberse a la inhibición del crecimiento de la raíz, que es el órgano que está en contacto directo con el suelo (Zayed *et al.*, 1998).

La contaminación del suelo y el agua por Cr y otros metales, requiere del desarrollo de diferentes estrategias para evitar el deterioro de los ecosistemas; una de las más utilizadas es la fitorremediación, que implica el uso de las

✉ Miguel Martínez Trujillo, codigogenetico@gmail.com

Laboratorio de Genética y Microbiología. Facultad de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Francisco J. Múgica s/n, Col. Felicitas del Río. C.P. 58030, Morelia, Michoacán. Tel: (443) 3 22 35 00 Ext. 4224, Fax: (443) 3 04 08 09.

plantas para eliminar o estabilizar metales y tiene la ventaja de que es una tecnología limpia basada en elementos que existen de forma natural (Delgadillo-López *et al.*, 2011). Hay varias estrategias para la fitorremediación, de los cuales los más utilizados es la fitoextracción, lo que permite la eliminación de contaminantes del suelo y su transporte a las partes aéreas de las plantas (Pilon-Simts, 2005). Para utilizar esta estrategia es conveniente que las plantas utilizadas tengan cierta tolerancia al compuesto tóxico y lo acumulen en sus tejidos, permitiendo así la movilización del metal a sitios donde no representen un riesgo para la población humana.

Si bien existen plantas que acumulan altas concentraciones de metales (i.e. metalofitas), éstas son de crecimiento lento y difíciles de cultivar a gran escala, para propósitos de fitoremediación (Pilon-Smits, 2005). La habilidad para acumular contaminantes es variable en diferentes especies vegetales, y aunque las especies hiperacumuladoras son preferidas, uno de los problemas que presentan es su bajo crecimiento y su baja producción de biomasa (Mulligan *et al.*, 2001), por lo que especies con alta producción de biomasa han sido consideradas. Aunque estas últimas plantas acumulan menos cantidad del contaminante por unidad de biomasa, la cantidad total del contaminante que puede ser removido es igual o mayor que en plantas acumuladoras (Marchiol *et al.*, 2007).

El maíz es una especie con un sistema radical abundante (Liedgens *et al.*, 2000; Hochholdinger *et al.*, 2004), que resulta ideal tanto para investigación básica como aplicada (Demostrables y Scanlon, 2004). Esta especie es ampliamente cultivada y las prácticas agrícolas para incrementar su productividad están bien establecidas; además hay diferentes variedades adaptadas a diferentes suelos y condiciones climáticas (Perales *et al.*, 2005). Existen diferentes variedades híbridas de maíz adaptadas para su crecimiento en el centro de México. De tal modo, en este trabajo se consideraron dos de éstas, las variedades Puma y Albatros, para determinar su tolerancia al Cr, analizando su crecimiento en condiciones *in vitro*.

Materiales y métodos

Material biológico

Se utilizaron semillas de maíz (*Zea mays*) híbrido Puma PT3 Poncho (en adelante llamada Puma) y Albatros de la empresa Sygenta®, las cuales se recomiendan para su siembra en la zona centro de la República Mexicana.

Desinfección de semillas

Las semillas se sometieron a una desinfección, utilizando cloro comercial Cloralex® al 50% v/v por 7 minutos, con agitación constante de los tubos de plástico Corning®, pasado este tiempo se desechó el cloro y se agregó alcohol etílico incubando durante 15 minutos manteniendo en agitación constante, finalmente se desechó el alcohol y se hicieron 7 lavados con agua desionizada estéril.

Germinación de semillas y uniformidad de talla

Las semillas fueron sembradas en placas Petri con medio de cultivo MS 0.2x (Murashige y Skoog 1962), suplementado con 1% de sacarosa y con 1% de agar. Se incubaron en una cámara de crecimiento (Percival AR95L) durante 6 días. Se determinó el porcentaje de germinación y la uniformidad de talla midiendo el crecimiento de la raíz principal.

Crecimiento de plantas en medios con Cr(VI)

Las semillas germinadas en medios MS 0.2x fueron seleccionadas con base en el tamaño de raíz (2 cm) y se transfirieron a frascos de 200 ml, con medios MS 0.2x suplementados con diferentes concentraciones de cromato de potasio: 0, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 800 y 1000 µM; la unidad experimental consistió de una caja de Petri con 3 semillas, de la cual se hicieron 6 repeticiones. Las plantas se dejaron crecer durante 8 días después de la transferencia.

Cuantificación del peso fresco de la raíz y la parte aérea

Las plantas crecidas en medios suplementados con Cr se cosecharon a los 10 días. Se determinó el peso fresco del sistema radical y del follaje por separado, utilizando una balanza analítica (Ohaus® New Jersey, USA), con una precisión de 0.0001 g.

Análisis estadísticos

Para todos los experimentos, los datos globales se analizaron estadísticamente en el programa SPSS10. Para evaluar las diferencias en el crecimiento de la raíz y la parte aérea en los diferentes tratamientos, se realizaron análisis de varianza y pruebas de significación de Tukey.

Resultados

Para determinar cuál variedad de maíz sería la adecuada para realizar las pruebas de crecimiento en medios con Cr, se determinó primeramente el porcentaje de germinación y la uniformidad del crecimiento de la raíz principal a los 3 días. Los resultados obtenidos se presentan en la **tabla 1**; la variedad Puma fue la que obtuvo mejor germinación y uniformidad de talla, seguida de Albatros y Canelo.

Para determinar el efecto del Cr en el crecimiento de las plantas de maíz se utilizaron las variedades Puma y Albatros;

Tabla 1. Germinación y uniformidad de talla en tres variedades de maíz

Variable	Variedad de maíz	
	Puma	Albatros
Semillas totales	30	30
Semillas germinadas	30	28
Porcentaje de germinación	100	93
Semillas con la misma longitud de la raíz ± 1 mm	30	18
Porcentaje de uniformidad de tamaño de la raíz	100	60

las semillas germinadas en medio MS 0.2x se seleccionaron por tamaño de la raíz emergida ($2\text{ cm} \pm 0.1$) para el trasplante en los medios con diferente concentración de Cr, y se dejaron crecer durante 8 días más. En la **figura 1** se muestran plantas representativas colectadas al final del experimento.

El peso fresco de las plantas crecidas en los medios con Cr se presenta en la **tabla 2**. El peso fresco de la parte aérea en la variedad Puma se redujo de manera significativa en $300\ \mu\text{M}$ (1.35 g) con respecto a las concentraciones menores (100 y $200\ \mu\text{M}$) que fueron estadísticamente iguales con respecto al control sin el metal (2.25 g); a partir de $400\ \mu\text{M}$ el peso fresco fue aún menor (0.69 g). En la variedad Albatros, desde la concentración de $100\ \mu\text{M}$ el peso de la parte aérea

disminuyó de manera significativa (1.83 g) con respecto al control sin el metal (2.91 g); tuvo otra disminución significativa en $200\ \mu\text{M}$ (1.20 g), con otras dos disminuciones significativas en 400 y $800\ \mu\text{M}$, con pesos de 0.6 y 0.51 g , respectivamente.

En la variedad Puma, el peso fresco de la raíz (**tabla 2**) disminuyó por efecto del Cr(VI) desde la concentración de $200\ \mu\text{M}$ (1.98 g) con respecto al control sin el metal (2.82 g), con sucesivas disminuciones significativas en $300\ \mu\text{M}$ (1.29 g) y $400\ \mu\text{M}$ (0.88 g). En la variedad Albatros el peso fresco de la raíz disminuyó de manera significativa en la concentración de $200\ \mu\text{M}$ (1.22), con respecto al control sin Cr(VI) (1.95 g), con otra disminución significativa en $400\ \mu\text{M}$ (0.87 g).



Figura 1. Plantas de maíz híbrido crecidas *in vitro* en medios con diferentes concentraciones de Cromo. A) Variedad Puma, B) Variedad Albatros. Las plantas son representativas de 18 individuos para cada tratamiento.

Tabla 2. Peso fresco de la parte aérea y de la raíz de plantas de maíz crecidas *in vitro* en diferentes concentraciones de cromato de potasio. Se presentan los promedios y el intervalo de confianza para $\alpha = 0.05$. Las letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas para los valores de una misma columna (Tukey, $P < 0.05$, $n=6$).

Cromato (μM)	Variedad Puma		Variedad Albatros	
	Parte aérea (g)	Raíz (g)	Parte Aérea (g)	Raíz (g)
0	2.25 ± 0.292 (a)	2.82 ± 0.367 (a)	2.91 ± 0.378 (a)	1.95 ± 0.257 (a)
100	2.52 ± 0.328 (a)	2.19 ± 0.285 (ab)	1.83 ± 0.238 (b)	1.96 ± 0.254 (a)
200	2.07 ± 0.269 (a)	1.98 ± 0.257 (b)	1.20 ± 0.156 (c)	1.22 ± 0.158 (b)
300	1.35 ± 0.176 (b)	1.29 ± 0.168 (c)	0.99 ± 0.129 (c)	1.20 ± 0.156 (b)
400	0.69 ± 0.089 (c)	0.88 ± 0.118 (d)	0.60 ± 0.078 (d)	0.87 ± 0.113 (c)
500	0.75 ± 0.098 (c)	0.81 ± 0.105 (d)	0.66 ± 0.086 (d)	0.78 ± 0.101 (c)
600	0.60 ± 0.078 (c)	0.69 ± 0.087 (d)	0.68 ± 0.090 (d)	0.63 ± 0.082 (cd)
800	0.48 ± 0.062 (d)	0.72 ± 0.093 (d)	0.51 ± 0.070 (e)	0.64 ± 0.083 (cd)
1000	0.51 ± 0.066 (d)	0.57 ± 0.074 (d)	0.30 ± 0.039 (e)	0.51 ± 0.068 (d)

Para comparar de una manera estandarizada cómo el Cr afectó el peso fresco de las plantas en las dos variedades de maíz se utilizaron porcentajes, considerando como 100% el control sin Cr en cada variedad. El porcentaje del peso fresco de la parte aérea (**Figura 2**) mostró diferencias significativas entre las dos variedades: en la concentración de 100 μM , los porcentajes fueron de 100 y 63% para Puma y Albatros, respectivamente; en la concentración de 200 μM fueron de 92 y 41%; y en la concentración de 300 μM fueron de 60 y 34%; a partir de 400 μM del metal las diferencias en los porcentajes de peso fresco entre ambas variedades de maíz fueron menores, aunque significativas y mayores en la variedad Puma; lo anterior demostró una menor afectación del peso fresco de la parte aérea por efecto del Cr(VI) en la variedad Puma. La disminución en el porcentaje del peso fresco de la raíz (**Figura 3**) fue similar en ambas variedades

de maíz en las concentraciones de 100 y 200 μM del metal, mostrando diferencias significativas en 300 μM (46 y 62%), 400 μM (31 y 45%) y 500 μM (29 y 40%), para Puma y Albatros, respectivamente; a partir de 600 μM no hubo diferencias significativas entre los porcentajes de los pesos de las dos variedades; lo anterior demostró una menor afectación del peso fresco de la raíz en la variedad Albatros en algunas de las concentraciones de Cr(VI).

Discusión

Todos los suelos poseen metales pesados como resultado de los procesos geológicos y edafogénicos y la aportación derivada de determinadas actividades humanas. El Cr es uno de los metales pesados que se depositan en el ambiente como desecho de las industrias del curtido de pieles y automotriz, entre otras (Shanker *et al.*, 2005).

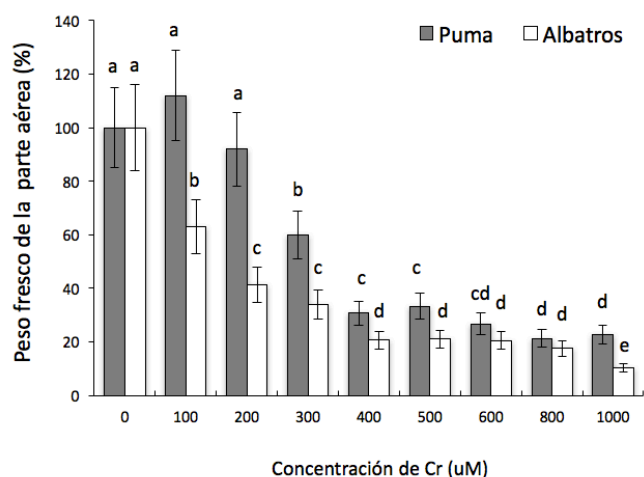


Figura 2. Peso fresco de la parte aérea de plantas de maíces híbridos Puma y Albatros, crecidas *in vitro* en medios con diferentes concentraciones de Cromo. Se indica el intervalo de confianza de la media para $\alpha=0.05$. Las letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas con la prueba de Tukey ($p<0.05$, $n=6$).

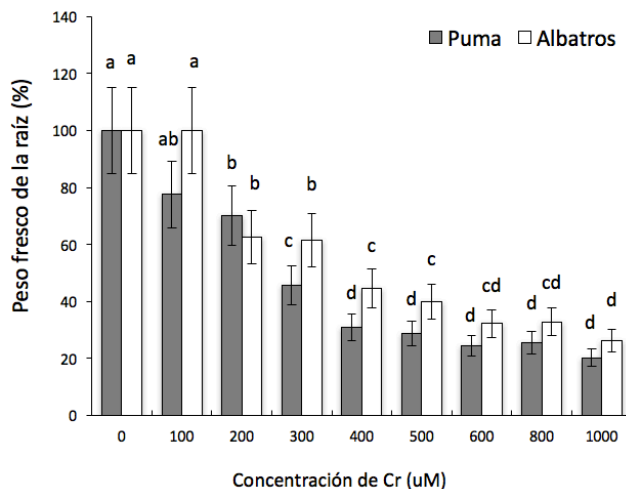


Figura 3. Peso fresco de la raíz de plantas de maíces híbridos Puma y Albatros, crecidas *in vitro* en medios con diferentes concentraciones de Cromo. Se indica el intervalo de confianza de la media para $\alpha=0.05$. Las letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas con la prueba de Tukey ($p<0.05$, $n=6$).

La fitoremediación es una de las tecnologías limpias para remover los metales pesados del ambiente, y el uso de plantas de rápido crecimiento y producción de biomasa es una de las ventajas de las gramíneas y otros cultivos (Pilon-Smits, 2005; Vamerli *et al.*, 2010). Sin embargo, su baja tolerancia a concentraciones elevadas de metales pesados debe ser analizada tanto en condiciones *in vitro*, así como en el suelo donde se crecerá.

En este trabajo se inició con el estudio de dos variedades de maíz germinadas y crecidas en condiciones *in vitro*: en las pruebas de germinación y crecimiento temprano, la variedad Puma tuvo mejor porcentaje de germinación y uniformidad de talla, con respecto a la variedad Albatros. Esto no significa que en las condiciones de campo para las que están recomendadas estas variedades se presente esta diferencia, considerando que Albatros se recomienda para zonas más frías dentro del altiplano mexicano, mientras que la variedad Puma es más utilizada en la región del Bajío, con temperaturas más altas. No obstante, para propósitos de evaluación en condiciones controladas, es favorable el tener una mejor germinación y un crecimiento uniforme, ya que el diseño experimental requerirá de menos individuos y por lo tanto un menor costo.

En las pruebas de crecimiento, considerando el peso fresco de la parte aérea y del follaje, las variedades Puma y Albatros fueron diferentes en su comportamiento, ya que mientras que la variedad Puma tuvo mejor crecimiento en el follaje, el crecimiento en la raíz fue mejor en Albatros en las concentraciones de 300-500 μM y similar en las otras concentraciones. La explicación de estas diferencias puede estar en los mecanismos bioquímicos y fisiológicos que presentan las plantas para tolerar concentraciones elevadas de metales, como son el almacenamiento en la vacuola, el transporte de la raíz a la parte aérea y la síntesis de enzimas que eliminan los compuestos altamente reactivos que se generan en los cambios de oxidación de los metales (Shanker *et al.*, 2005). En particular, consideramos que es posible que en la variedad Albatros el transporte del Cr de la raíz a la parte aérea (factor de translocación) sea mayor con respecto a la variedad Puma, lo que determina que en la variedad Albatros haya menor daño en la raíz y mayor daño en la parte aérea y que ocurra de manera contraria en la variedad Puma; esto se apoya con reportes de captación de Cr en diferentes variedades de maíz y especies cercanas, que aunque analizadas en sistemas experimentales diferentes (líquidos, sólidos, suelo) tienen valores de translocación diferentes (Martínez-Trujillo y Carreón-Abud, 2015).

Por lo anterior, considerando que en la fitoremediación es deseable que se desarrolle adecuadamente la parte aérea para remover con mayor facilidad el metal acumulado (Mahar *et al.*, 2016), la variedad Puma es prometedora, ya que su follaje es más abundante y aunque pudiera acumular menor cantidad de Cr con respecto a la variedad Albatros, la biomasa producida lo compensaría. Esta variedad es crecida actualmente en suelo agrícola de parcelas de maíz, suplementado con diferentes concentraciones de Cr y se analizará la captación de este metal.

Referencias

- Cervantes C, Garcia JC, Devars S, Corona FG, Tavera HL, Torres-Guzman JC, Sanchez RM** (2001) Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS. Microbiological Review* 25: 335-347.
- Cervantes C, Campos-García J** (2007) Reduction and efflux of chromate in bacteria. In DH Nies, S Silver (eds.), *Molecular Microbiology of Heavy Metals*. Springer-Verlag, Berlin.
- Delgadillo-López AE, González-Ramírez CA, Prieto-García F, Villagómez-Ibarra JR, Acevedo-Sandoval O** (2011) Fitorremediación: una alternativa para eliminar la contaminación. *Tropical and subtropical Agroecosystems* 14: 597-612.
- Demostrables J, Scanlon MJ** (2009) Maize (*Zea mays*): A model organism for basic and applied research in plant biology. *Cold Spring Harbor Protoc.* 10: doi: 10.1101/pdb.emo132.
- Dubey S, Misra P, Dwivedi S, Chatterjee S, Bag SK, Mantri S, Asif MH, Rai A, Kumar S, Shri M, Tripathi P, Tripathi RD, Trivedi PK, Chakrabarty D, Tuli R** (2010) Transcriptomic and metabolomic shifts in rice roots in response to Cr (VI) stress. *BMC Genomics* 11: 648-659.
- Hayat S, Khalique G, Irfan M, Arif Shafi Wani, Tripathi BN, Ahmad A** (2011) Physiological changes induced by chromium stress in plants: an overview. *Springer-Verlag*, 2-13.
- Hochholdinger F, Katrin W, Sauer M, Dembonsk D** (2004) Genetic dissection of root formation in maize (*Zea mays*) reveals root-type specific development programmes. *Annals of Botany* 93: 359-368.
- Liedgens M, Soldati A, Stamp P, Richner W** (2000) Root development of maize (*Zea mays* L.) as observed with minirhizotrons in lysimeters. *Crop Science* 40: 1665-1672.
- López-Bucio J, Hernández-Madriral F, Cervantes C, Ortiz-Castro R, Carreón-Abud Y, Martínez-Trujillo M** (2014) Phosphate relieves chromium toxicity in *Arabidopsis thaliana* plants by interfering with chromate uptake. *Biometals* 27: 363-370.
- Marchiol L, Fellet G, Perosa D, Zerbi G** (2007) Removal of trace metals by *Sorghum bicolor* and *Helianthus annuus* in a site polluted by industrial wastes: a field experience. *Plant Physiology and Biochemistry* 45: 379-387.
- Martínez-Trujillo M, Carreón-Abud Y** (2015) Effect of mineral nutrients on the uptake of Cr (VI) by maize plants. *New Biotechnology* 32: 396-402.
- Martínez-Trujillo M, Méndez-Bravo A, Ortiz-Castro R, Hernández-Madriral F, Ibarra-Laclette E, Ruiz-Herrera LF, Long TA, Cervantes C, Herrera-Estrella L, López-Bucio J** (2014) Chromate alters root system architecture and activates expression of genes involved in iron homeostasis and signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 86: 35-50.
- Mulligan CN, Yong RN, Gibbs BF** (2001) Remediation technologies for metal contaminated soils and groundwater: an evaluation. *Engineering Geology* 60: 193-207.
- Murashige T, Skoog FA** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Ortiz-Castro R, Martínez-Trujillo M, López-Bucio J, Cervantes C, Dubrovsky J** (2007) Effects of dichromate on growth and root system architecture of *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Science* 172: 684-691.

- Perales HR, Benz BF, Brush SB** (2005) Maize diversity and ethnolinguistic diversity in Chiapas, Mexico. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 102: 949-954.
- Pilon-Smits E** (2005) Phytoremediation. *Annual Review of Plant Biology* 56: 15-39.
- Shanker AK, Cervantes C, Loza-Tavera H, Avudainayagam S** (2005) Chromium toxicity in plants. *Environment International Journal* 31: 739-753.
- Shupack SI** (1991) The chemistry of chromium and some resulting analytical problems. *Environmental Health Perspectives* 92: 7-11.
- Vamerli T, Bandiera M, Mosca G** (2010) Field crops for phytoremediation of metal-contaminated land. A review. *Environmental Chemical Letters* 8: 1-17.
- Zayed AM, Lytle CM, Qian JH, Terry N** (1998) Chromium accumulation, translocation and chemical speciation in vegetable crops. *Planta* 206: 293-299.