تأثير بعض العناصر الانتقالية والسيلينيوم في انبات بذور الجرجير *Eruca sativa*Effect of some Transition Metals and Selenium on germination of *Eruca sativa* Seeds

هدى عبد الجليل ناصر

زهرة محمود الخفاجي

معهد الهندسة الوراثية والتقنيات الحيوية للدراسات العليا / جامعة بغداد

Huda A. Nasser

Zahra M. Al-Khafaji

Genetic Engineering & Biotechnology Institute for Postgraduate Studies/ University of Baghdad

المستخلص

تمت دراسة تأثير بعض العناصر الانتقالية وهي النيكل ، النحاس ، الزنك وعنصر السيلينيوم في انبات بذور نبات الجرجير *Eruca sativa* في الماء المقطر المعقم بتركيزات متدرجة (1 ، 10 ، 100 ، 500 ، 1000) جزء بالمليون لتغطي التراكيز في البيئات الطبيعية وكذلك التراكيز في البيئات الملوثة ، استمرت عملية التنبيت لمدة 5 أيام . ثم سجل عدد البذور النابتة . أشارت النتائج إلى تأثير عملية الانبات بشكل سلبي عند زيادة التراكيز . وكان التأثير الاكبر للأيونات اما التغير في الارقام الهيدروجينية فكان قليلا " ولم يتجاوز 7 % الا في حالة الزنك اذ بلغ 50 % . كان معامل الارتباط بين مؤشر الانبات والتركيز سالبا " على مدى التراكيز المستعملة ، اذ بلغ بالنسبة للنيكل -0.842 ، النحاس -0.965 ، الزنك -0.928 والسيلينيوم -0.603. ولذا يلاحظ ان العلاقة كانت معنوية ($P \leq 0.05$) ما عدا في حالة السيلينيوم . ومن النتائج التي تم الحصول عليها يمكن تدرج العناصر من الاكثر تأثيرا (سلبي) الى الاقل بالاتي : النيكل > النحاس > الزنك > السيلينيوم.

Abstract

The effect of some transition metals, Nickel, Copper, Zinc and Selenium elements on *Eruca sativa* seeds germination was studied. Concentration (1, 10, 100, 500, and 1000) ppm in sterile distilled water was used to cover the natural concentrations and the concentrations in polluted environments. Germination was recorded after 5 days. Results showed that there were inverse relationships between the number of germinated seeds and increasing in concentration of elements. The effect was mainly due to the elements, while the pH effect was very low and not exceeds 7 % except for Zinc solution which was about 50%. The correlation coefficient between germination and concentration were with negative values, it was for Nickel element -0.842, Copper -0.965, Zinc -0.928 and for Selenium -0.603. The values were statically significant except for selenium. According to the obtained results the elements can be ranked Nickel the less effect < Copper < Zinc < Selenium.

المقدمة

أدى التلوث بالمعادن الثقيلة الى ايجاد ازمة بيئية مخيفة ، اذ ان الاضرار لا تقع للانسان فقط وانما يكون واقعا على كل الانظمة الحيوية [1] . وهناك مصادر كثيرة لتلوث البيئة بالمعادن الثقيلة مثل عناصر المجموعة الانتقالية ، وتعد بعض العناصر الانتقالية ضرورية في الانظمة الحيوية فمثلا الزنك يدخل في تركيب بعض الانزيمات ومكونات خلوية اخرى . وكذلك الحال مع النحاس الذي يعد من ضروريات الانظمة الحيوية فهو من مكونات بعض البروتينات الخاصة في نقل الالكترونات اي المشاركة في عمليات الاكسدة والاختزال في المايكروبيولوجيا والبلاستيدات الخضراء والسيتوبلازم ، ويدخل النيكل في بعض الانزيمات والعوامل الخاصة بالايض اللاهوائي [2] . اما السيلينيوم فأن حاجة النباتات له ليست مطلقة وله علاقة وثيقة بتفاعلات تمثيل الكبريتات . والتراكيز العالية منه تؤثر في عمليات انبات البذور والنمو وتختلف النباتات في الاستجابة للسيلينيوم وامكانية تجميعه وتركيمه في الانسجة [3] .

وتتراوح تراكيز العناصر الثقيلة في التربة (اهم المكونات البيئية) الى حوالي 100,000 جزء بالمليون في المواقع الملوثة اذ يكون التلوث اما ناتجا من اصول جيولوجية او نتيجة لفعاليات الانسان او عند ارتفاع تراكيزها تؤدي الى اضطراب الانظمة البيئية على اليابسة والأنظمة المائية وتعد تراكيز المعادن مؤثرة في الانظمة البيئية فيما اذا زاد تركيزها عن الحدود الطبيعية للبيئات العادية وبالتالي تؤدي الى ايجاد ظروف اجهاد (stress) على الانظمة الحيوية [4] .

تستعمل النباتات وسائلًا للتحري عن التلوث بالمعادن الثقيلة ، اذ يهدف المهتمون بالبيئة الى حدس تأثير المواد غير الطبيعية في النباتات وذلك بدراسة التأثير في عملية انبات البذور [5] . وعملية الانبات التي تلي حالة سبات البذور من المظاهر المعقدة التي تتم السيطرة عليها بعدد كبير من الجينات التي تتأثر بالظروف البيئية المحيطة [6] . وهدفت الدراسة الى معرفة تأثير تراكيز متدرجة من المديات الطبيعية الى تراكيز عالية يمكن ان توجد في النباتات التي تعد ملوثة من عناصر النيكل ، النحاس ، الزنك كعناصر ممثلة للمجموعة الانتقالية في الجدول الدوري وعنصر السيلينيوم في انبات بذور الجرجير *Eruca sativa* .

المواد وطرق العمل

البذور: استعملت بذور الجرجير *Eruca sativa* احد نباتات العائلة الصليبية (Brassicaceae = Cruciferae) مشتاة من اسواق بغداد وهي من انتاج موسم العام السابق للدراسة .

المعادن المستعملة : استعملت املاح الزنك $ZnCl_2$ ، ونترات النيكل $Ni(NO_3)_2$ وكبريتات النحاس $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ، وعنصر السيلينيوم مصدرا لايونات المعادن .

واستعملت التراكيز (1 ، 10 ، 100 ، 500 ، 1000) جزء بالمليون لتمثل مستويات منخفضة والمدى الطبيعي والمستويات العالية الملوثة في ماء مقطر معقم وقيست الارقام الهيدروجينية للمحاليل .

طريقة التنبيت : تمت وفق الطرق المتبعة في مثل هذه الدراسات [5] اذ استعملت اطباق بتري الزجاجية بقطر 90 ملمتر بعد وضع طبقة من ورق الترشيح وتعقيمها . ثم تمت اضافة 5 مللتر من كل تركيز ، ووضعت 30 بذرة متجانسة الحجم سليمة المظهر في كل طبق وحضنت الاطباق في غرفة تراوحت درجة حرارتها 23 – 25 م واستعملت معاملة سيطرة مع كل تجربة باستعمال الماء المقطر بدلا من محاليل العناصر ووضعت الاطباق بشكل مستوي . تركت الاطباق لمدة 5 ايام ، ثم تم حساب البذور النابتة . اجريت التجارب لمرتين وبواقع خمس مكررات لكل تخفيف .

التحليل الاحصائي : تم حساب قيم معامل الارتباط Correlation coefficient (r) بين المؤشرات المقاسة على مستوى احتمالية (0.05) [7] .

النتائج والمناقشة

استعملت المحاليل المائية لايونات المعادن في هذه الدراسة لتكون جاهزة للنباتات نظرا لان الطين والتربة لهما سعة تبادلية كاتونية عالية [8] . وتوضح الاشكال (1 ، 2 ، 3 ، 4) تأثير التراكيز المختلفة من النيكل والنحاس والزنك والسيلينيوم على التوالي في عدد البذور النابتة لنبات الجرجير . اذ تم تسجيل عملية الانبات للبذور التي بزغ فيها الجذير [9] .

والملاحظ ان عدد البذور النابتة في معاملة السيطرة تراوحت بين 69 – 73 بذرة لكل 150 بذرة استعملت في التجربة ، اي ان نسبة الانبات تراوحت بين (46 – 48.7) % وتعد هذه النسبة منخفضة وذلك لان البذور المعدة للتسويق التجاري والتي يمكن ان تبذر يجب ان تكون نسبة انباتها اكثر من 90 % [10] . وقد تكون البذور المستعملة قد تم جمعها قبل تمام نضوج الاجنة او انها خزنت تحت ظروف غير ملائمة . وقد اختيرت بذور الجرجير لهذه التجربة لانها سريعة الانبات تحت الظروف الملائمة [11] .

وتشير النتائج بشكل عام الى ان عملية الانبات تتأثر بوجود المعادن ويتناقص عدد البذور النابتة بزيادة التراكيز ، ولكن عند التراكيز العالية هناك بعض الاختلافات ، فلاحظ عند استعمال التركيز 1000 جزء بالمليون كان الانبات 13 بالنسبة للنیکل و15 بالنسبة للنحاس ولكن ازدادت الى الضعف 32 عند استعمال الزنك في حين ان السيلينيوم لم يؤثر بشكل كبير في عدد البذور النابتة اذ وصلت عدد البذور النابتة عند اعلى تركيز الى 93 % من قيمة معاملة السيطرة . ومثل هذه النتائج مسجلة في بذور نبات الفجل *Raphanus sativus* فكل من النحاس 200 جزء بالمليون والنيكل 500 جزء بالمليون قد اثرت سلبا في عدد البذور النابتة ولكن كان النحاس اكثر تأثيرا من النيكل [12] وكذلك الحال مع فول الصويا *Glycine max* اذ كان للنحاس تأثير سلبي ليس في عملية الانبات فقط وانما على مؤشرات النمو الاخرى [13] . اما انخفاض تأثير السيلينيوم فقد يعكس امتلاك النباتات لأكثر من آلية لتمثيل مركبات السيلينيوم خاصة تلك التي لها علاقة بتمثيل الكبريتات والتراكيز العالية جدا (

والتي لم تستعمل في هذه الدراسة) تكون اكثر سمية من العناصر السامة مثل الزرنيخ والزنك فضلا عن ان الفروق بين تراكيز السيلينيوم الضرورية والسامة تكون قليلة ودرجة [3] .

وبصورة عامة فقد قسمت المعادن اعتمادا على علاقتها بالأنظمة الحيوية الى مجموعة اولى (A) وهي التي تكون لها الفة عالية للارتباط الى المجاميع الحاوية على الاوكسجين ، والمجموعة الثانية (B) التي بها الفة عالية للارتباط الى المجاميع الحاوية على النتروجين والكبريت ومجموعة ثالثة تقع بين الاثنين ويمكن ان تتصرف مثل المجموعة الاولى او الثانية ، وبشكل عام فإن المجاميع الثلاثة تصبح جميعها سامة عند تخطي الحد الحرج [4] ، وعملية الانبات كما ذكر انفا عملية معقدة جدا وتشمل بعض الخطوات التي تضم العديد من التفاصيل التي تتأثر بالمعارف المستعملة ، فعملية الانبات تبدأ بالتشرب بالماء الذي يشمل ثلاثة اطوار ، الاول تشرب الماء من قبل البذور الجافة ويكون طور سريع ، يليه الطور الثاني المعتدل ، ثم الطور الثالث الذي يكون سريعا ويزامن عملية بزوغ الجذير ، والمرحلة الثانية هي نمو الاستطالة لمحور الجنين دون حصول انقسام خلوي [14] ، وبعد التشرب بمدة قد تصل الى (2 - 5) ساعة تعطى اشارات من الجنين التي تكون ضرورية لاضعاف الطبقات الخارجية المحيطة بالبذرة كما سجلت في نبات الرشاد *Lepidium sativum* الذي يعود الى العائلة التي ينتمي اليه الجرجير ، فضلا عن عملية التشرب تعطي اشارات لتخليق حامض الجبريليك Gibberelic acid الذي يتم تخليقه في مواقع مختلفة من الجنين [16] ويتراكم حامض الجبريليك الفعال حيويا قبيل بزوغ الجذير ويكون ضروريا لاستطالة خلايا الجنين للتغلب على مقاومة الاغلفة . ومن جهة ثانية فإن وجود المعادن الثقيلة التي لها جهود اكسدة واختزال خاصة بكل معدن تقوم بتغيير الرقم الهيدروجيني (كما سيأتي ذكره لاحقا) وهذه الظروف المستحدثة بوجود المعادن الثقيلة تؤثر في جهد الاغشية الخلوية مما يؤثر في عمليات تخليق الطاقة الخلوية ، فضلا عن حصول اكسدة دهون الاغشية Lipid peroxidation التي تؤدي الى تراكم الجذور الحرة بكميات كبيرة وبالتالي تؤثر في عمليات الانبات اي ان التأثير يكون نتيجة لإجهاد الأكسدة [9] .

وقد ادت اضافة تراكيز متزايدة من المعادن في اثناء تحضير المحاليل الى انخفاض الارقام الهيدروجينية كما موضح في الاشكال (5 ، 6 ، 7 ، 8) لكل من املاح النيكل والنحاس والزنك وعنصر السيلينيوم على التوالي .

ويلاحظ ان الارقام الهيدروجينية قد تأثرت بشكل مختلف اعتمادا على المعدن الذي ادى الى انحرافها عن الارقام الهيدروجينية المسجلة لمعاملة السيطرة التي تراوحت بين 6.32 – 6.9 . والملاحظ ان الارقام الهيدروجينية قد ارتفعت في حالة التراكم الواطئة من النيكل وعادت للانخفاض عن المعاملة الضابطة عند التركيز الاعلى المستعمل (1000 جزء بالمليون) وهذا ادى الى جعل قيم معامل الارتباط غير مهمة معنويا على مستوى احتمالية ($P \leq 0.05$) اذ كانت قيمته (-0.672) ، والدراسات التي جرت لعنصر النيكل انه يصبح اكثرسمية في الارقام الهيدروجينية الحامضية في نبات الحنطة ، ونمطا مشابها يلاحظ في حالة النحاس ولكن الرقم الهيدروجيني بدأ بالانخفاض عند التركيز 10 جزء بالمليون وبلغ اقصاه عند التركيز الاعلى (1000 جزء بالمليون) الذي بلغ 3.72 مقارنة بمعاملة السيطرة التي كان الرقم الهيدروجيني لها 6.32 . اما الرقم الهيدروجيني بالنسبة لاملاح الزنك فكانت العلاقة طردية على طول الخط ولكن الرقم الهيدروجيني لم ينخفض بشكل كبير مقارنة بالنحاس ، اذ بلغ اقصى انخفاض له 4.29 ، ونمط مماثلا لوحظ بالنسبة للسيليوم ووصلت اقل قيمة عند التركيز الاعلى المستعمل 4.35 ، والارقام الهيدروجينية تؤثر في جاهزية المعدن .

وكما ذكر اعلاه ان عملية الانبات عملية معقدة جدا تشترك فيها عدة عوامل ومن اهمها الانزيمات سواء بشكل مباشر او غير مباشر ، ومن اهمها الانزيمات المحللة للجدران الخلوية مثل β -1,3-Glucanases الذي يوجد له اكثر من نظير (Isoforms) ويقوم بتحليل مركب β -1,3-Glucan الذي يعد من الطبقات الاساسية في اغلفة البذور ، ويتفكك المركب بتأثير الانزيم المذكور ليساعد في بزوغ الجذيرات ، ويستحث الانزيم بتأثير الظروف البيئية المحيطة قبيل عملية الانبات وينتج من ترجمة جزيئات mRNA المخزونة وتستخدم النباتات لاجراض اخرى . ومن الانزيمات المؤثرة الاخرى هي الانزيمات المحللة للكيتين Chitinases التي تستحث بشكل متزامن مع انزيمات β -1,3-Glucanases ، فضلا عن انزيمات اخرى تشارك في عملية الانبات والتي تكون تحت انظمة ودوائر تنظيم صارمة [17] الانزيمات المذكورة وخاصة β -1,3-Glucanases قد تؤثر بشكل مباشر او غير مباشر ، وفي الحالة الاخيرة – غير المباشرة – فهي تقوم باطلاق جزيئات مهيبة مكونة من مشقات الجدران الخلوية تساعد في اضعاف الطبقات الخارجية . ومن دراسة تأثير المعادن الثقيلة في بعض الانزيمات وجد ان تأثير النيكل والزنك يكون تأثيرهم اقل اعتمادا على الارقام الهيدروجينية في المدى المعتدل للحموضة (4.5 – 5) . وعلى العموم فان تأثير الرقم الهيدروجيني يعتمد على اضافة البروتونات الى بعض الحوامض الامينية الموجودة في المواقع الفعالة للانزيمات ، لذلك يلاحظ ان فعالية الانزيمات تثبط نتيجة للتعقيد الحاصل في المواقع الفعالة بتأثير المعادن الثقيلة وتغير الارقام الهيدروجينية ولذلك فان هذين العاملين يجب ان تؤخذ بنظر الاعتبار سوية عند دراسة تأثير البيئة المحيطة [18] .

ومن ملاحظة تأثير التغير في الارقام الهيدروجينية وتداخلها في عمليات الانبات الموضحة في الاشكال (9 ، 10 ، 11 ، 12) والخاصة بعنصر النيكل والنحاس والزنك والسيليوم على التوالي .

يلاحظ ان العلاقة موجبة وان قيم الارتباط كلها موجبة وان كانت غير مهمة معنويا" ما عدا في حالة الزنك (P ≤ 0.05) إذ أن عدد البذور النابتة تزداد عندما تكون الارقام الهيدروجينية مرتفعة كما موضح في جدول (1) .

جدول (1) : علاقات عدد البذور النابتة مع التراكيز المستعملة والارقام الهيدروجينية			
المعاملة	R ²	معامل الارتباط (r)	الاهمية الاحصائية لل (r) والملاحظات
النكل	0.7089	-0.842	** اثر التركيز بحدود 50 %
النحاس	0.9311	-0.965	** اثر التركيز بشكل كبير (حوالي 87 %)
الزنك	0.8605	-0.928	** اثر التركيز بحدود 74 %
السلينيوم	0.3641	-0.603	* التأثير غير مهم معنويا" وهو حوالي 13 %
التركيز x الرقم الهيدروجيني			
النكل	0.4514	-0.672	*
النحاس	0.3577	-0.598	*
الزنك	0.4627	-0.680	*
السلينيوم	0.4889	-0.699	*
الانبات x الرقم الهيدروجيني			
النكل	0.2839	+0.538	* تأثير الرقم الهيدروجيني قليل (5 %) والسمية تعود بحملها لايونات المعدن
النحاس	0.2771	+0.526	* تأثير الرقم الهيدروجيني قليل (7 %) والسمية تعود بحملها لايونات المعدن
الزنك	0.7023	+0.838	** اثر الرقم الهيدروجيني في خفض عدد البذور النابتة بنسبة تصل الى 50 %
السلينيوم	0.1794	+0.424	* تأثير الرقم الهيدروجيني قليل ولا يتعدى 3 %
قيمة معامل الارتباط (r) الجدولية لأربع درجات حرية = 0.811 على مستوى احتمالية (P < 0.05)			
* غير مهمة معنويا"			
** مهمة معنويا"			

اضافة الى ما ذكر اعلاه فإن عملية الانبات تخضع لتأثير عوامل اخرى منها الهرمونات النباتية غير حامض الجبريليك ومنها الملونات الستيرويدية Brassinosteroids وتوجد في مناطق مختلفة من النبات ومنها اغلفة البذور وهذه تعد من المركبات الفعالة في تقليل امتزاز وتراكم المعادن الثقيلة والعناصر المشعة [19] . اذ تساعد في تنظيم نضوجية الاغشية الخلوية للايونات المعدنية وذلك بتأثيرها في الصفات الالكترونية للأغشية ونضوجيتها وتركيبها والتأثير في فعالية الانزيمات المرتبطة بالأغشية [1] وهذا ينطبق عندما تكون التراكيز واطنة ويمكن للنبات تحملها ولكن عند التراكيز العالية من المعادن والذي يفوق تحمل النبات يكون التأثير غير متخصص . ومن العوامل الداخلية الاخرى التي تؤثر في عملية الانبات والتي تتأثر بدورها بالعوامل البيئية المحيطة هو الاثلين والذي يساعد في عدد من العمليات الحيوية التي تجري في النبات ، والا هم هنا - اي في

عملية الانبات – فهو يؤثر في استطالة خلايا الجذير والمساعدة في انشقاق السويداء – في حالة وجودها في البذور – وعمليات حث انتاج الاثلين تتأثر بوجود ايونات الكالسيوم اثناء عملية الانبات ولذلك فهي تؤثر في شبكات التواصل داخل الخلايا ونقل الاشارات [20]. وكذلك السايتوكينينات Cytokinins التي تؤثر في النمو مباشرة بعد الانبات وترافق ذروة تراكمها تراكم الانزيم الاميلز – الفا وهذا يمكن ان يساعد في انقسام الخلايا ونمو الجذور البازغة .

وكحصيلة عامة يلاحظ ان عملية الانبات هي حالة توازن نهائية بين العوامل المشجعة والاخرى المثبطة مثل حامض Absciscic acid التي تكون اهدافها الاجنة وغللاف البذرة (Testa) والتي تتداخل مع الظروف البيئية مثل المعادن الثقيلة [15]. والحقيقة ان اغلب التفسيرات الجزئية استنتجت من استعمال نبات العرنبه *Arabidopsis thaliana* احد كاسيات البذور يعود الى العائلة الصليبية اذ توجد قواعد معلوماتية حيوية حول مكنون النسخ Transcriptome او المكنون البروتيني Proteome والتي يمكن ان تستعمل منطلقاً لتفسير النتائج للنباتات الاخرى خاصة افراد العائلة الصليبية .

ومن نتائج الدراسة الحالية يمكن ترتيب العناصر المستعملة وفق تأثير تركيزها يعود الى السيلينيوم الاقل تأثير يليه الزنك ، ثم النحاس ، ثم النيكل . كما ان الدراسة توضح ان استعمال بذور الجرجير السريع الانبات يمكن ان تستعمل مؤشراً لتحديد المناطق الملوثة بالمعادن الثقيلة ، وباجراء تجارب عديدة يمكن الحصول على صورة اوضح ووضع النتائج التي يتم الحصول عليها بصورة معادلات رياضية قد يستدل منها بشكل غير مباشر على الحدود السامة او الملائمة في بيئة ما بعد توفير غطاء او قاعدة احصائية جيدة .

المصادر

1. Sharma, P. and Bhardwaj, R. 2007. Effect of 24- epibrassinolide on seed germination, seedling. growth and heavy metal uptake in *Brassica juncea* L. Gen. Appl. Plant. Physiol. 33:59-73.
2. Fargasova, A. 2004 .Toxicity Comparison of some possible toxic metals (Cd ,Cu ,Pb ,Se ,Zn) on young seedlings of *Sinapis alba* L. Plant Soil Environ. 50:33-38.
3. Lauchi , A . 1993. Selenium plants: uptake, functions and environmental toxicity. Bot. Acta . 106 : 445 – 468 .
4. Sharma, S. and Dietz, K. 2006 . The Significance of amino acid and amino acid – derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress .J.Expt.Bot.57:711-726.
5. Noe, G. and Zedler, J. 2000. Differential effects of four abiotic factors on the germination of salt marsh annuals. Am. S. Bot.87:1679-1692.
6. Koornneef, M., Bentsink, L. and Hilhorst, H. 2002. Seed dormancy and germination. Curr. Opin. Plant Biol. 5:33-36.
7. محمد ، نعيم ثاني وخاشع محمود الراوي ومؤيد احمد يونس ووليد خضير المراني . 1986. مبادئ الاحصاء. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي . جامعة بغداد / العراق .
8. Porebska, G. and Ostrowska , A . 1999. Heavy metals in wild plants: implications for phytoremediation . Polish J . Environ. Studies 8 : 433 – 442 .
9. Debeaujon, I ., Leon- Kloosterziel, K. and Koornneef, M. 2000 . Influence of the testa and seed dormancy, germination, and longevity in *Arabidopsis*. Plant Physiol. 122: 403-414.
10. Pieta- Filho, G. and Ellis, R. 1991. The development of seed quality in spring barely in four environments. A germination and longevity. Seed Sci. Res. 1: 163–177.
11. مطلوب، عدنان ناصر ، وعز الدين سلطان محمد وكريم صالح عبدول. 1989 . انتاج الخضر- الجزء الاول- وزارة التعليم العالي والبحث العلمي / جامعة الموصل / العراق.

12. Rajshree, G., Shashikala, K., Usha, J. and Dinesh, S. 2001 . Effect of copper and nickel on seed germination and seedling growth of *Raphanus sativus*_var. Pusa chetki. Indian J. Environ. Sci.5: 93-96.
13. Subramani , S . , Selvaraja , S . , Lakshmanachary , S . 2001. Influnce of copper sulphate on growyh and yield of soybean (*Glycine max*) L .Mem. Eco. Env. Conserv . 7 : 101 – 104 .
14. Mauz, B., Muller, K., Kucera, B., Volke, F. and Leubner-Metzger, G. 2005. Water uptake and distribution in germinating tobacco seeds investigated *inivo* by nuclear magnetic resonance imaging .Plant Physiol. 138:1538-1551.
15. -Kucera, B., Chon, M. and Leubner-Metzger, G. 2005. Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. Seed Sci. Res. 15:281-307.
16. Muller, K. , Tintelont , S . and Leubner-Metzger , G . 2006. Endosperm – limited brassicaceae seed germination: Absciscic acid inhibits embryo-induced endosperm weaking of *Lepidium sativum* (Cress) and endosperm repture of cress and *Arabodopsis thaliana*. Plant Cell Physiol. 47: 864 – 877.
17. Leubner- Metzger, G. 2003. Functions and regulation of β -1.3-glucanases during seed germination, dormancy release and after ripening. Seed Sci Res. 13: 17-34.
18. Geiger, G., Furrer, G., Funk, F., Brandl, H. and Schulin, R. 1999. Heavy metal effects on beta – glucosidase activity influenced by pH and buffer systems. J. Enzyme Inhib. 14:365-379.
19. Bajguz, A. 2000. Blockage of heavy metal accumulation in *Chlorella vulgaris* cells by 24- epibrassinolide. Plant. Physiol. Biochem. 38:797-801.
20. Nicolas, C. , Deprada , M . , Lorenzo, O. , Nicolas , G . and Rodriguez , D . 1998. Absciscic acid and stress regulate the expression of calmodulin in germinating chick-pea seeds . Physiologia Plantarum 104: 379 – 384.