تخفيف الإجهاد التأكسدي المتسبب عن الكادميوم في عقل وبادرات الماش Vigna radiata L. Wilczek بالتجهيز الخارجي لحامض الإسكوربيك

عبدالله ابراهيم شهيد ، اسراء عبدالامام الرياحي
جامعة بابل / كلية العلوم / قسم علوم الحياة

الخلاصة

تهدف الدراسة الى تبيان دور حامض الاسكوربيك AsA في تخفيف الاجهاد التاكسدي المتسبب عن سمية الكادميوم بدلالة المؤشرات الفسلجية و البايوكيميائية (تركيز الكلوروفيلات، تركيز الكاروتينات ، معدل النتح ، تركيز المغنسيوم ، تركيز البرولين ، تركيز الكلوتاثيون ، فعالية الانزيم كلوتاثيون ردكتيز) في عقل الماش . بينت النتائج ان المعاملة بـ Cd لا تؤثر في محتوى total chlorophyll و chl.a اضافة الى معدل النتح، و خلال ذلك يحدث انخفاض معنوي في تركيز الكاروتينات و المغنسيوم و البروتين في حين يزداد معنوياً تركيز البرولين و الكلوتاثيون مقارنة بعقل السيطرة العامة (ماء التناضح العكسي R.O. water) كما وجد زيادة معنوية في فعالية الانزيم Glutathione reductase (GR) في الاوراق الاولية لبادرات الماش و جذورها و كذلك الاوراق الاولية و السويقات تحت الفلقية hypocotyls للعقل بوجود الكادميوم مقارنة بعينة السيطرة. ان ازالة سمية الكادميوم بتجهيز $AsA + CdCl_2$ تزامنت مع زيادة محتوى total chlorophyll و chl.a و carotenoides و Mg^{+2} و معدل النتح مقارنة بالسيطرة العامة و تساوى محتوى البروتين مع عينة السيطرة تقريباً بينما انخفض معنوياً محتوى البرولين و الكلوتاثيون و فعالية الانزيم GR في الاوراق الاولية و جذور بادرات الماش و كذلك الاوراق الاولية و هايبوكوتيل العقل مقارنة بعينة $CdCl_2$ و التي قاربت عينة السيطرة في الاوراق الاولية و جذور البادرات لكن فعالية الانزيم GR لا زالت اعلى مقارنة بعينة السيطرة في الاوراق الاولية و هايبوكوتيل العقل .

Abstract

The aim of this study is to elucidate the role of ascorbic acid in attenuating Cadmium toxicity that caused the oxidative stress in terms of physiological and biochemical parameters (chlorophylls and carotenes concentration (conc.) , transpiration rate, Mg conc. ,proline conc. ,glutathione conc. , activity of glutathione reductase enzyme) in mung bean cuttings .Cd treatment insignificantly effect total chlorophyll and chl.a conce. in addition to transpiration rate.Meanwhile, significant decline in carotenoides, Mg^{+2} and protein conc. whereas significant increase in proline and GSH conc. compared to general control (reversed osmosis water). Besides ,Significant increase in Glutathion reductase (GR) activity in primery leaves and roots of mung bean seedlings as well as in leaves and hypocotyls of cuttings in presence of Cd compared to control. Detoxification of Cd by treatment of $AsA+CdCl_2$ was coincided with increasing total chlorophyll,chl.a , carotenoides, Mg^{+2} conc. and transpiration rate compared to general control whereas,the protein conc. was approximatly equal to control and significant decline in proline, GSH conc. and GR activity in leaves and roots of mung bean seedlings as well as in leaves and hypocotyls of the cuttings compared to $CdCl_2$ which approximately approaches the control in leaves and roots of the seedlings but the activity of GR still higher than control in leaves and hypocotyls of the cuttings

Key wards: Adventitious rooting, Anti-oxidant defense mechanism, Ascorbic acid , Cadmium , Mung bean cuttings, Oxidative stress, Toxicity

المقدمة

يعد اجهاد العناصر الثقيلة من الشدود غير الحيوية abiotic stresses والتي تتضمن عناصر عالية السمية و من ضمنها عنصر الكادميوم الذي ينبعث الى المحيط الخارجي عن طريق محطات الطاقة و انظمة التسخين و المصانع التي تستخدم المعادن في صناعاتها و الاسمدة الفوسفاتية وعوادم السيارات (Benavides *et al*., 2005) و يكون الكادميوم اواصر مع مجاميع Sulphydryl و N,O ولهذا يعد Cysteine والمركبات التي تحتوي مجاميع sulphydrayl كالمخلبيات النباتية (Glutathione وphytochelatins و غيرها) والعديد من الحوامض العضوية مثل Citrate في العصير الخشبي Xylem sap (PH 6-5) كعوامل مهمة لنقل الكادميوم من الجذور الى السيقان (Hasan *et al*., 2009) . لقد ذكر Shi و Cai (٢٠٠٨) أن

معاملة نبات الفول السوداني (*Arachis hypogaea*) بالـ Cd يسبب تثبيط معدل صافي البناء الضوئي net photosynthetic rate نتيجة خفض التوصيل الثغري stamatal conductance ومحتوى صبغات البناء الضوئي وتغير تركيب الورقة وتقليل معدل النتح وهذا ربما يتسبب عن دور الـCd في تكشف الورقة عن مظهر مشابه لأوراق نباتات الصحراء و يعد تحلل الكلوروفيل والتفاف الأوراق والتقزم من الاعراض الرئيسية والظاهرة لتسمم النبات بالـ Cd و يسبب نقص الحديد تحلل الكلوروفيل Chlorosis ايضا (Haghiri, 1973). و قد وجد شهيد و الرياحي (a ٢٠١٢) ان التراكيز الواطئة جدا من Cd تكون محفزة للنمو خصوصا اذا ترافقت مع وجود المغذيات النباتية .ان تداخل المعدن metal interaction في المجاميع المرتبطة ligand groups في الانزيمات يوضح بشكل كبير قابليتها السمية، وان تثبيط الانزيمات ربما يعود إلى حجب المجاميع ذات الفعالية التحفيزية catalytically active groups أو مسخ البروتين (Das *et al*., 1997).

لأيون الكادميوم القدرة على تثبيط واحيانا تحفيز العديد من الانزيمات المضادة للاكسدة ومنها انزيم glutathione reductase (GR) وهو انزيم معدني metallo enzyme يشترك في دورة AsA-GSH التي تحمي الخلايا من الضرر التاكسدي بابقاء نسبة عالية من الكلوتاثيون المختزل الى الكلوتاثيون المؤكسد (GSH/GSSG) (Noctor and Foyer,1998) . وان التقارير المرتبطة بتأثير الكادميوم على انزيم GR غير متطابقة اذ لوحظ نقصانه في نبات *Calystegia sepium* (Lyubenova *et al*., 2007) وزيادته في نبات زهرة الشمس (Gallego *et al*., 1996) و لم يلاحظ تغيير في نبات الحنطة (*et al*.,٢٠٠٧ Yannarelli) . ان الكادميوم لا ينتج reactive oxygen species (ROS) لكنه يولد اجهاداً تأكسدياً بتعارضه مع نظام الدفاع المضاد للأكسدة (Benavides *et al*.,2005) و تؤدي اضافة البرولين و glycinebetain من الخارج للنباتات المجهدة بالكادميوم الى استعادة السلامة الفيزيائية للغشاء الخلوي وزيادة الفعاليات الأنزيمية لدورة AsA-GSH ، وتبين ان هذه القابلية تكون اقوى في البرولين منها في الـ betain (Islam *et al*., 2009). ويشارك البرولين في اعادة تكوين الكلوروفيل وفي تنشيط دورة كربس و تكوين مصادر الطاقة (Roman *et al*., 2003). وفي دراسة أجريت على قابلية نبات الماش لتجميع البرولين بوجود الأجهاد المعدني ، وجد ان الـ Cd هو الأقوى تحفيزا من بين بقية العناصر المدروسة (Co, Zn, Pb) و ان الـ Zn هو الأقل تحفيزا (Arora and Saradhi , 2010) و يعد الگلوتاثيون من اهم دفاعيات النبات ضد ضرر الـ ROS و يوجد غالبا بشكله المختزل GSH في الأنسجة النباتية (Jimenez *et al*., 1998) .

و في الغالب يسبب التعرض للمعادن الثقيلة استنزافاً حاداً للـ GSH كما في نبات الرز المعرض للـ Cd (Hsu and Kao, 2004) . وقد تصاحب الزيادة في تركيز الـ Cd زيادة في تركيز الـ GSH كما في نبات *Brassica juncea* (Qadir *et al*., 2004) و البزاليا *Pisum sativum* (Metwally *et al*., 2005) يعد حامض الأسكوربيك مضاد اكسدة اولي antioxidant primary (و هو الذي يقوم بأزالة الجذر الحر مباشرة بمنح الكترون او ذرة هيدروجين) و كذلك مضاد اكسدة ثانوي secondary antioxidant (و هو الذي يمنع نشوء الاكسدة بأزالة العامل المحفز للأكسدة oxidative catalyst ، ويلعب دور مهم في توليد α- tocopherol (فيتامين E) من جذر (tocopheroxyl) (TO˙H)في الأغشية و الدهون البروتينية lipoproteins و بهذا يوفر حماية للأغشية الخلوية Foyer and Noctor 2005 و يشارك AsA في بناء الجدار الخلوي و ربما الأنقسام الخلوي (Conklin, 2001) و في دورة AsA-GSH وفي وقاية فعالية الأنزيمات و حفظها، تلك التي تحتوي ايونات المعادن الأنتقالية ضمن تركيبها prosthetic transition metal ions (Noctor and Foyer,1998). ان النقص في محتوى حامض الأسكوربيك يسبق حدوث تحلل

الكلوروفيل، ويرتبط بزيادة monodehydro ascorbate (MDA) في الاوراق (Chao *et al.,* 2010) . و يتناقص محتوى AsA بوجود Cd في الجذور والعقد الجذرية لفول الصويا (Ballestrasse *et al.,* 2001 *Glycine max*) وفي البلاستيدات الخضر في نبات الخيار *Cucumis sativus* (Zhang *et al.,* 2003) و الخردل *Brassica campestris* (Anjum *et al.,*2008)

المواد وطرائق العمل

استعملت في هذه الدراسة بذور نبات الماش المحلية *Vigna radiata* (L.) wilczek للموسم الزراعي ٢٠٠٩- ٢٠١٠ من محافظة بابل قضاء المحاويل . و غسلت البذور لعدة مرات بماء الحنفية الجاري ، ثم نقعت لمدة ١٢ ساعة (over night) و زرعت في نشارة الخشب sawdust (المغسولة و المعقمة مسبقا) بأستعمال احواض بلاستيكية مثقبة بابعاد ١٩ ×١٤×٦ سم. أجريت التجارب تحت الظروف المختبرية القياسية بأضاءة مستمرة و شدة ضوئية ١٥٠٠-١٨٠٠ لوكس و درجة حرارة ١±٢٥ ° م و رطوبة نسبية ٦٠-٧٠ ٪ في غرفة النمو growth cabinet نوع Binder GMbH

تركت البادرات تنمو لحين وصولها عمر ١٠ ايام (مرحلة الاتساع التام للاوراق الاولية) ثم انتخبت البادرات المتماثلة مظهريا حسب طريقة (Hess,1961) ، والتي تمتاز بأحتوائها على برعم طرفي و زوج من الاوراق الاولية كاملة الاتساع و سويقة جنينية فوق الفلق epicotyl و سويقة جنينية تحت الفلق hypocotyl بطول ٣ سم تحت موقع ندب الفلق cotyledonary nodes و ذلك بعد ازالة المجموع الجذري و يعامل الجزء القاعدي للعقل بمحاليل الأختبار لمدة ٢٤ ساعة ثم تجرى القياسات المطلوبة. حضرت المحاليل باستخدام ماء التناضح العكسي reversible osmosis (R.O.) اذ حضر محلول كلوريد الكادميوم بتركيز 1.5 ppm (التركيز السام) و محلول حامض الاسكوربيك بالتركيز ٢٠٠ ppm (التركيز الامثل / تجارب تمهيدية).

تم قياس الكلوروفيل حسب طريقة (Mackinney,1941) و قدر تركيز الكلوروفيل بالمايكروغرام/ مل حسب المعادلات الآتية Arnon (١٩٤٩):

$$\text{Total chlorophyll } (\mu g / ml) = 20.2(A\ 645) + 8.02(A663)$$

$$\text{Chl.a}(\mu g / ml) = 12.7(A663) - 2.69(A645)$$

و تم قياس تركيز الكاروتينات في الاوراق بأستخدام معادلة Lichtenthaler and Welburn(1983) تحت طول موجي ٤٧٠ nm :

$$\text{Carotenoid } (\mu g / ml) = (1000\ A470 - 3.27[Chl.a] - 104[Chl.b]) / 229$$

اذ ان A 645 الامتصاص الضوئي بطول موجة ٦٤٥ نانومتر

A 663 الامتصاص الضوئي بطول موجة ٦٦٣ نانومتر

A 470 الامتصاص الضوئي بطول موجة ٤٧٠ نانومتر

حدد تركيز المغنسيوم في الاوراق حسب طريقة Yoshida و جماعته سنة (١٩٧٦) و حللت بجهاز طيف الأنبعاث الذري Atomic absorption spectrophotometer (AAS) و حسب المعادلة :

$$Mg\ conc.(mg/l) = \frac{\text{Extract volume}}{\text{Calibration reading} \times \text{Sample weight}}$$

ولقياس البروتين استخدمت طريقة Bishop و جماعته (1985) اذ يتفاعل البروتين مع ايون النحاس في كبريتات النحاس $CuSO_4$ في محلول البايوريت لأعطاء اللون البنفسجي الذي يمتص الضوء بطول موجي ٥٥٥ نانومتر ، و هو اللون الناتج من تكوين مركب معقد بين ذرة النحاس و الاصرة الببتيدية peptide bond.

اتبعت طريقة Bates و جماعته (١٩٧٣) في قياس البرولين و طريقة Ellman (١٩٥٩) لقياس محتوى الـ GSH في الاوراق الاولية.

قدرت فعالية الانزيم glutathion reductase (GR) حسب Teisseire و Guy (2000) و بين انها الزيادة في الامتصاصية عند طول موجي ٤١٢ نانومتر و الناتجة من اختزال 5,5-dithiobis (2- nitrobenzoic acid) (DTNB) الى 2-nitro-5-thiobenzoic acid (TNB) ..

تحسب فعالية الانزيم بالمعادلة التالية:

$$\text{Enzyme activity}(U/mg)=\frac{\Delta A/_t \times Vt \times 1000}{E \times Vs \times d}$$

$$=\frac{\Delta A/_{15sec} \times 0.3 \times 1000}{6.22 \times 005 \times 1}$$

اذ ان:

ΔA= الفرق بين الامتصاصيتين
U= وحدة (unit) من الفعالية لكل ملغم من البروتين .
t = الزمن
Vt = حجم المحلول الكلي
Vs = حجم المحلول للعينة
E = معامل الامتصاصية (6.22)
d = معامل التخفيف

التحليل الاحصائي

استعمل التصميم العشوائي الكامل Completely Randomized Design (CRD) في جميع التجارب لغرض التحليل الاحصائي و اعتمدت قيمة .L.S.D للمقارنة بين المعاملات على مستوى احتمالية (0.05) بأستخدام تحليل التباين analysis of variance (ANOVA) و انجزت ببرنامج SPSS ver.10 لجميع التجارب و على انفراد .

النتائج

دور الـ AsA في إزالة سمية الـ $CdCl_2$ بدلالة الكلورفيلات والكاروتينات في أوراق عقل الماش.

يشير الجدول ١ إلى ان معاملة عقل الماش بالتركيز السام ($CdCl_2$ ppm 1.5) (شهيد و الرياحي ، ٢٠١٢ a) لتجذير العقل لم يؤثر معنوياً في محتوى Total chl, chl.a ، بينما اختزل معنوياً محتوى الكاروتينات إلى ٠.٢٣ مايكروغرام/ مل مقارنة بالسيطرة ٠.٥٤ مايكروغرام/مل أي انخفضت إلى ٤٢.٥ %.أما تجهيز العقل بالتركيز الامثل (AsA ppm 200) لتجذير العقل فقد زاد معنوياً كل من chl.a و total chl بينما لم تكن معنوية مع الكاروتينات.هذا ومن جانب آخر فان تجهيز AsA مع $CdCl_2$ سوية قد أزال سمية الـ Cd معنوياً بدلالة جميع المؤشرات المدروسة.

جدول ١: دور الـ ASA في إزالة سمية الـ $CdCl_2$ بدلالة تركيز الكلوروفيلات و الكاروتينات (ملغم/مل)

المعاملة (٢٤ ساعة)	Total chl. (µg/ml)	Chl.a (µg/ml)	Carotenoides (µg/ml)
Control R.O. water	8.99	4.9	0.54
$CdCl_2$	9.18	5.5	0.23
AsA	11.59	6.8	0.62
AsA+ $CdCl_2$	12.21	7.6	0.83
L.S.D.(0.05)	2.02	1.02	0.12

دور الـ AsA في إزالة سمية الـ $CdCl_2$ بدلالة تركيز Mg في أوراق عقل الماش.

يبين الجدول ٢ ان معاملة العقل بكلوريد الكادميوم 1.5 جزء بالمليون تخفض وبشكل معنوي محتوى أوراق العقل من المغنسيوم $2.116\ mg.l^{-1}$ مقارنة بعينه السيطرة $2.371\ mg.l^{-1}$ ، اما معاملة العقل بحامض الاسكوربك 200 ppm لوحده او مع كلوريد الكادميوم فقد أظهرت زيادة معنوية $2.699\ mg.l^{-1}$ و $2.711\ mg.l^{-1}$ على التوالي مما يؤكد ازالة سمية الكادميوم.

جدول ٢ : دور الـ AsA في ازالة سمية $CdCl_2$ بدلالة تركيز Mg (ملغم/لتر) في الاوراق الاولية لعقل الماش.

المعاملة(٢٤ ساعة)	تركيز المغنسيوم ($mg.\ l^{-1}$)
Control (R.O water)	2.371
$CdCl_2$	2.116
AsA	2.699
AsA+ $CdCl_2$	2.711
LSD(0.05)	٠.١٩

دور الـ AsA في ازالة سمية الـ $CdCl_2$ بدلالة معدل النتح في أوراق عقل الماش:

في الجدول ٣ تم توضيح تأثير $CdCl_2$ بتركيز 1.5 ppm في معدل نتح عقل الماش عند المعاملة لمدة ٢٤ ساعة. اذ أدت المعاملة بكلوريد الكادميوم إلى خفض غير معنوي لمعدل النتح 0.01647 مل/عقلة/ساعة مقارنة بعينة السيطرة 0.02023 مل/عقلة/ساعة وادت المعاملة بـ AsA إلى زيادة غيرمعنوية في معدل النتح 0.02147 مل/عقلة/ساعة مقارنة بسيطرة الماء R.O. water. اما تجهيز العقل بـ AsA + $CdCl_2$ معاً فقد سبب رفع معدل النتح معنوياً مقارنة بعينة $CdCl_2$ و من جانب آخر تساوت مع عينة السيطرة R.O. waterو بهذا تؤكد ازالة سمية الكادميوم.

جدول ٣: دور الـ AsA في ازالة سمية $CdCl_2$ بدلالة معدل النتح (مل/ عقلة/ساعة) في الاوراق الاولية لعقل الماش.

المعاملة (٢٤ ساعة)	معدل النتح ml/cutting/h
Control (R.O water)	0.02023
CdCl2	٠.٠١٦٤٧
AsA	٠.٠٢١٤٧
AsA+ $CdCl_2$	٠.٠٢٢٤٧
LSD(0.05)	٠.٠٠٥٥

دور الـ AsA في إزالة سمية الـ $CdCl_2$ بدلالة تركيز البروتين في أوراق عقل الماش

يبين الجدول ٤ ان معاملة عقل الماش بكلوريد الكادميوم ادى الى نقصان معنوي في بروتين الاوراق حيث بلغت 0.0840 ملغم/غم مقارنة بعينة السيطرة 0.1290 ملغم/غم ، اما تجهيز AsA مع كلوريد الكادميوم فقد حسن محتوى الاوراق من البروتين0.1047 ملغم /غم لدرجة قاربت عينة السيطرة 0.1267 ملغم/غم مما يؤكد ازالة سمية كلوريد الكادميوم.

جدول ٤: دور الـ AsA في إزالة سمية الـ $CdCl_2$ بدلالة تركيز البروتين (ملغم/غم وزن طري) في اوراق عقل الماش.

المعاملة(٢٤ ساعة)	تركيز البروتين (mg/g)
Control (R.O water)	٠.١٢٩٠
CdCl2	٠.٠٨٤٠
AsA	0.1047
AsA+ $CdCl_2$	٠.١٢٦٧
LSD (0.05)	0.0196

دور الـ AsA في إزالة سمية الـ $CdCl_2$ بدلالة تركيز البرولين في أوراق عقل الماش

يوضح الجدول ٥ تأثير الاجهاد المعدني لكلوريد الكادميوم في تركيز أوراق عقل الماش من البرولين اذ ادت المعاملة بـ $CdCl_2$ إلى زيادة معنوية في تركيز البرولين 0.3579 mg/l مقارنة بعينة السيطرة 0.2093 mg/l وان المعاملة بـAsA لوحده او مع الـ Cd سوية لم تخفض إنتاج الأوراق من البرولين 0.2797 , 0.3146 mg/l على التوالي بل بقيت معنوياً اكبر من تركيز البرولين في أوراق العقل المتمثلة بعينة السيطرة 0.2093 mg/l .

جدول ٥ : دور الـ **AsA** في إزالة سمية الـ **$CdCl_2$** بدلالة تركيز البرولين في أوراق عقل الماش (ملغم/ لتر) .

المعاملة(٢٤ ساعة)	تركيز البرولين (mg/l)
Control (R.O water)	٠.٢٠٩٣
$CdCl_2$	٠.٣٥٧٩
AsA	٠.٢٧٩٧
AsA+ $CdCl_2$	٠.٣١٤٦
LSD (0.05)	٠.٠٢٥٩

تأثير المعاملة بكلوريد الكادميوم و حامض الاسكوربك على تركيز أوراق عقل الماش من الكلوتاثيون GSH.

يبين الجدول ٦ تأثيرالمعاملة بكلوريد الكادميوم على تركيز أوراق العقل من الكلوتاثيون المختزل اذ سبب زيادة معنوية في تركيز الكلوتاثيون GSH 30.69 ppm مقارنة بعينة السيطرة 28.42 ppm إلا أن المعاملة بـ AsA لوحده أدت إلى أنخفاض تركيز الكلوتاثيون بشكل معنوي 27.82 ppm و كذلك الحال عندما تجهز مع $CdCl_2$ سوية مقارنة بعينة السيطرة $CdCl_2$ الا انها ساوت او اصبحت غير معنوية مع السيطرة العامة.

جدول ٦ : دور الـ AsA في إزالة سمية الـ $CdCl_2$ بدلالة تركيز أوراق عقل الماش من الكلوتاثيون GSH (جزء بالمليون) .

المعاملة(٢٤ ساعة)	تركيز الكلوتاثيون(ppm)
Control (R.O water)	٢٨.٤٢
$CdCl_2$	٣٠.٦٩
AsA	٢٧.٨٢
AsA+$CdCl_2$	٢٨.٩٣
LSD	١.٣٥٦

دور الـ **AsA** في إزالة سمية الـ **$CdCl_2$** بدلالة فعالية الأنزيم **Glutathione reductase (GR)** في بادرات و عقل الماش.

يشير الجدول ٧ إلى أن أوراق البادرات المعاملة بـ $CdCl_2$ بتركيز 1.5 ppm أظهرت زيادة معنوية في فعالية الأنزيم كلوتاثيون ردكتيز (GR) U / mg protein ١٥٨.٤٦ مقارنة بعينة السيطرة U / mg protein١٤٦.٤١ وان معاملة البادرات بـ AsA+$CdCl_2$ سبب انخفاض معنوي في الفعالية U / mg protein١٤٧.٣٣ مقارنة بالمعاملة $CdCl_2$ إلا أنها كانت مساوية معنوياً لعينة السيطرة. أن جذور البادرات المعاملة بـ $CdCl_2$ قد أظهرت زيادة معنوية في فعالية الانزيم GR بلغت 132.22 U / mg protein مقارنة بفعالية الإنزيم في جذوربادرات عينة السيطرة 121.43 U / mg protein ، إلا أن المعاملة بـ ASA+ $CdCl_2$ سببت انخفاض معنوي في فعاليةالأنزيم 125.73 U / mg protein في جذور البادرات مقارنة بعينة $CdCl_2$ولكنها اقتربت من فعالية الأنزيم في عينة السيطرة العامة. و سجلت معاملة العقل بكلوريد الكادميوم زيادة معنوية في فعالية الانزيم في الاوراق 147.57 U / mg protein و هايبوكوتيل العقل 129.08 protein U/mgمقارنة بعينة السيطرة 136.65 U / mg protein و 123.10 U/mg protein على التتالي و مقارنة ببقية المعاملات ، الا ان معاملة العقل بـ AsA + $CdCl_2$ ادت الى انخفاض الفعالية معنوياً في الاوراق 143.61 U / mg protein و في هايبوكوتيل العقل 127.58 U / mg protein مقارنة بعينة الكادميوم إلا انها لا زالت أعلى معنوياً من عينة السيطرة ومن عينة المعاملة بـ AsA لوحدة .

جدول 7 : دور الـ AsA في إزالة سمية الـ $CdCl_2$ بدلالة فعالية الأنزيم Glutathione reductase (GR) في بادرات و عقل الماش (وحدة / ملغم بروتين).

المعاملة(٢٤ ساعة)	فعالية الانزيم GR (U/mg protein)			
	Cuttings hypocotyls	Cuttings leaves	Seedlings roots	Seedlings leaves
Control (R.O. water)	123.10	136.65	121.43	١٤٦.٤١
$CdCl_2$	129.08	147.57	132.22	١٥٨.٤٦
AsA	120.19	137.47	113.82	142.75
AsA + $CdCl_2$	127.58	143.61	125.73	١٤٧.٣٣
LSD (0.05)	1.476	1.723	2.981	١.٠٤٧

المناقشة

لقد تم قياس الكلوروفيلات لاوراق العقل المعاملة بـ AsA + $CdCl_2$ (جدول ١) لدعم دور الاسكوربيك في أزالة سمية الكادميوم اذ رفعت تلك المعاملة تركيز الكلوروفيل الكلي و كلوروفيل a مقارنة بسيطرة R.O. Water و يعود ذلك الى دور AsA في تقليل انتاج ROS ومنع تثبيط عملية البناء الضوئي فضلا عن كونها تمنع تغيرات العضيات وموت البلاستيدات الخضر (Bi *et al.*, 2009; Nyitrai *et al.*, 2009) كما انها تتفق مع ما ذكره Nyitrai و جماعته (٢٠٠٩) الى ان التراكيز الواطئة من الكادميوم تضاد عملية الشيخوخة وتزيد محتوى الكلوروفيل وفعالية البناء الضوئي . ان عدم تأثر محتوى الكلوروفيل بوجود الكادميوم في هذه الدراسة جاء متوافقا لدراسة Haag وجماعته (١٩٩٩) اذ لم يتأثر البناء الضوئي و تركيز الكلوروفيل في نبات الخردل الهندي *Brassica juncea* صنف vitasso المعامل ب Cd(NO3)2 وبالتركيز µM ٢٥. ان انخفاض محتوى الكلوروفيل بوجود زيادة من الـ Cd سجلت في نوع *Riccia* sp. من قبل Prasad وجماعته (٢٠٠٤) الذي استنتج ان التركيز العالي من الكادميوم يثبط تكوين الكلوروفيل بتعارضه انتاج protochlorophyllide وبما ان الكاروتينات تحمي الكلوروفيل من التحطم بالاكسدة الضوئية لذا فان قلة انتاج الكاروتينات مع زيادة الكادميوم له نتائج خطيرة على صبغة الكلوروفيل.

وبخصوص الكاروتينات، فان العقل المعاملة بكلوريد الكادميوم تناقص فيها محتوى الكاروتينات معنوياً وهذا يدل على استهلاكه في ازالة الاجهاد المتولد عن الكادميوم (Smirnoff,2005)، وقد ادت المعاملة بـ AsA + $CdCl_2$ الى زيادة معنوية مقارنة بعينة R.O. water وعينة AsA وهذا يقترح الدور التحفيزي للـ AsA مع التركيز الواطئ من الكادميوم للنظام الدفاعي المضاد للاكسدة . اذ ان زيادة الكاروتينات وحماية الاغشية الحية وزيادة بناء الكلوروفيل الذي اتضح من القياسات التي تمت على اوراق العقل و التي تكون اكثر تحفيزا مما لو جهزت بـ AsA لوحده أي كأستنتاج فان AsA قد ازال سمية الكادميوم. ان فقدان الكلوروفيل هو احد المؤشرات لعدم كفاية النظام الدفاعي المضاد للاكسدة لمواجهة سمية المعدن الناتجة عن اضطراب التنظيم deregulation الفسلجي للنبات (Smirnoff,2005).

ان معاملة العقل بكلوريد الكادميوم سبب انخفاض معنوي في محتوى الأوراق من المغنسيوم الا ان وجود حامض الاسكوربك مع الكادميوم ازال السمية و أحدث زيادة معنوية في محتوى المغنسيوم مقارنة بعينة السيطرة R.O. water أي ان وجود الكادميوم وحامض الاسكوربك قد حسن تركيز $CdCl_2$ و كذلك السيطرة العامة

المغنسيوم في أوراق العقل (جدول ٢). ان انخفاض تركيز المغنسيوم في أوراق عقل الماش بوجود الكادميوم جاءت متوافقة مع نتائج Sandalio وجماعته (٢٠٠١) اذ حصل انخفاض محتوى المغنسيوم بازدياد تركيز $CdCl_2$ اذ بلغت ٢٦.٥٣ ملغم/لترعند التركيز ٥٠ مايكرومولاري مقارنة بعينة السيطرة ٥٠.٣٥ ملغم/لترفي الأوراق اما في الجذور فقد بلغت ٢٣.٣٦ ملغم /لتر مقارنة بعينة السيطرة ٦٨.١٧ ملغم/لتر في نبات البزاليا.

يعد المغنسيوم من العناصر المغذية الكبرى و له دور في تفعيل بعض الانزيمات المهمة مثل ATPases و carboxylase ribulose 1,5-biphosphate (RUBP) و RNA polymerase و protein kinases (Cakmak and kirkby, 2008). وللمغنسيوم دور اساسي في تصدير اللحاء phloem export لنواتج البناء الضوئي من الاوراق الى الجذور ، ويسبب نقص المغنسيوم زيادة مطردة في تجمع الكربوهيدرات في الأوراق (Hermans *et al*., 2004) و بالتالي منع وصولها الى الجزء القاعدي من العقل ،حيث الحاجة لها . ان معدل النتح لأوراق العقل المعاملة بـ Cd لم يتأثر و ان المعاملة AsA + $CdCl_2$ (المعاملة المزيلة لسمية الكادميوم) ادت الى رفع معدل النتح معنويا مقارنة بالـ $CdCl_2$ (جدول ٣) و ان الزيادة في معدل النتح بسبب AsA سببت زيادة في معدل البناء الضوئي و الذي يتضح من قياس الكلوروفيل (جدول ١).

ان نتائج الدراسة الحالية المتعلقة بمعدل النتح جاءت متوافقة مع نتائج Sandalio وجماعته سنة (٢٠٠١) اذ انخفض معدل النتح لنبات البزاليا .*Pisum sativum* L بوجود $CdCl_2$ ورافق ذلك انخفاض محتوى الكلوروفيل في الأوراق. ولقد بين Salt وجماعته (١٩٩٥) ان الكادميوم يسبب النقص في معدل النتح والسبب هو غلق الثغور وبالرغم من حدوث نقص في التوصيل الثغري stomatal conductance بوجود الكادميوم الا انه يفيد في تحديد نقل الكادميوم خلال مجرى النتح . ان تاثير Cd على النتح معقد ويعتمد في الظاهر على تركيز المعدن ونوع النبات و وقت المعاملة وبهذا يسبب الكادميوم نقص في النتح في نبات *Picea abies* (Schlegel *et al*.,1987) .

على الرغم من ان الكادميوم من المعادن التي توصف بكونه non-redox metal فهي لا تنتج ROS مباشرة (Benavides *et al*., 2005) وان للكادميوم القابلية على التداخل مع النظام المضاد للاكسدة عند الظروف الاجهادية واحباط النظام الدفاعي بانتاج كميات كبيرة من ROS مما يؤدي الى تحورات كبيرة ومختلفة في البروتين (Cargnelutti *et al*., 2006) .ان اختزال النمو بتجهيز الكادميوم ناتج من تثبيط بناء البروتين (Foy *et al*.,1978) حيث لوحظت سمية المعدن في نباتات المحاصيل بفقدان مستويات البروتين الطبيعية (Dubey and Dwivedi , ١٩٨٧) .

لقد أدت معاملة عقل الماش بـ $CdCl_2$ الى نقصان معنوي في تركيز البروتين في الأوراق مقارنة بعينة السيطرة . ان وجود حامض الاسكوربك مع الكادميوم حسن تركيزه في الأوراق لدرجة قاربت عينة السيطرة مما يؤكد ازالة السمية بمضاد الاكسدة فيتامين C (جدول ٤). ان نقصان البروتين الذي اشارت اليه النتائج قيد الدراسة بوجود الكادميوم تتوافق مع نتائج Gonçalves وجماعته (٢٠٠٧) في ان الكادميوم شجع الاكسدة العالية للبروتين بزيادة تكوين الكاربونيل وهذا يتفق مع Aravind و Prasad (٢٠٠٥) و Rellán-Alvarez و جماعته (٢٠٠٦) والذين لاحظوا تجمع الكاربونيل في نباتي *Ceratophyllum demersum* و *Zea mays* على التتالي والمعرضة لاجهاد الكادميوم.

كما يشير الجدول 5 الى دور AsA في ازالة سمية الكادميوم بدلالة الحامض الاميني proline الذي بينت العديد من البحوث تجمعه تحت ظروف الاجهاد ومنها اجهاد المعادن الثقيلة. اذ كانت هنالك زيادة معنوية في تركيز البرولين في اوراق العقل المعاملة بـ $CdCl_2$ مقارنة بعينة السيطر R.O water وادى تجهيز AsA مع

$CdCl_2$ الى انخفاض معنوي في تركيز البرولين مقارنة بعينة $CdCl_2$ وبهذا فقد ازال حامض الاسكوربيك سمية الكادميوم.

يزداد البرولين بشدة في اوراق نبات *Atriplex halimus* بوجود Cd+NaCl و Cd+KCl وهذا يرتبط بالتنظيم الاوزموزي (Lefévre *et al*., 2009). لقد وجد Arora و Saradhi (٢٠١٠) ان معاملة البادرات بعمر ٤ ايام بـ ٢.٥ ملي مولاري من $Cd(NO_3)_2$ يستحثها لتجميع مستويات عالية من البرولين في سيقانها مقارنة ببادرات السيطرة وان تجمع البرولين يكون اكثر في البادرات المعرضة للكادميوم بوجود الضوء مقارنة بالظلام مما يقترح ان الضوء او فعالية البناء الضوئي للبادرات ربما تكون مسؤولة عن استحثاث الزيادة في مستوى البرولين.

ولتركيز الكلوتاثيون الخلوي تاثير كبير في اهميته كمضاد للاكسدة وهو مختلف بشكل كبير تجاه الكادميوم وهنالك دليل قوي يشير الى ان ارتفاع تركيز الكلوتاثيون يرتبط بقدرة النبات في مواجهة الاجهاد التاكسدي المستحث بالمعدن (Freeman *et al*., 2004)، ولقد لوحظ ارتفاع معنوي لتركيز الكلوتاثيون في اوراق عقل الماش المعاملة بكلوريد الكادميوم ١.٥ جزء بالمليون و ادت المعاملة بـ AsA+$CdCl_2$ الى خفض تركيز GSHبشكل مساوي لعينة السيطرة R.O. water (جدول ٦) و هذا يدل على زوال الاجهاد المتسبب عن الكادميوم . ان وجود زيادة من ناتج دورة AsA-GSH وهو حامض الاسكوربك المختزل ادى الى تثبيط انتاج الـ GSH المختزل الذي تتمثل وظيفته في هذه الدورة في اختزال dehydroascorbate (DHA) الى AsA بوجود الانزيم DHA reductase (Foyer and Halliwell,1976).كذلك فان ارتفاع تركيز الكلوتاثيون دليل على نشاط الجهاز الدفاعي المضاد للاكسدة ضمن التركيز الواطئ للكادميوم وهو دليل على كفائته في ازالة سمية المعدن ويتوقع انخفاض تركيز الكلوتاثيون بزيادة تركيز الكادميوم. بينما انخفاض تركيز GSH يعزى الى الانتفاع منه في بناء الاسكوربيت او الى تفاعله المباشر بين GSH مع Cd (Pietrini *et al*., 2003).

اشار الجدول ٧ الى ان المعاملة بكلوريد الكادميوم تؤدي الى زيادة معنوية في فعالية الانزيم GR في اوراق وجذور البادرات والاوراق الاولية والسويقة تحت الفلقية للعقل .الا ان المعاملة بـ AsA و $CdCl_2$ خفضت فعالية الانزيم في الاوراق الاولية والسويقة تحت الفلقية للعقل و الأوراق الاولية والجذور للبادرات مقارنة بعينة $CdCl_2$ الا انها لازالت اعلى معنويا من عينة السيطرة في العقل وتتساوى تقريبا مع عينة السيطرة في البادرات اذ اشارت تلك النتائج الى ازالة حامض الاسكوربيك لسمية الكادميوم بتقليل فعالية الانزيم المضاد للأكسدة مقارنة بالنباتات المعاملة بـ Cd وان اعلى فعالية للانزيم كانت في اوراق البادرات واقلها في السويقة تحت الفلقية لعقل الماش.ان النتائج قيد الدراسة في قياس انزيم GR جاءت مرادفة لقياس GSH ولقد سجل Freeman وجماعته (٢٠٠٤) ارتفاع كبير لفعالية الانزيم مصاحبة لزيادة GSH لمنح المقاومة لعنصر النيكل المسبب للاجهاد التاكسدي في النبات المفرط في تجميع النيكل *Thelaspi goesingens* .

و على ما يبدو فأن قلة فعالية الانزيم GR في الجذور مقارنة بفعاليته في الاوراق ناتج من تعرض الجذور المباشرلـ Cd و اخذها لنسبة عالية منه واحتجازه فيها مقارنة بالاوراق التي ينتقل اليها نسبة قليلة من الـ Cd عن طريق الانسجة الوعائية في الساق وبذلك يكون الاجهاد التأكسدي اكبر في الجذور مما في الاوراق ويفوق قدرة النظام الدفاعي المضاد للأكسدة و لذلك تكون فعالية الانزيم GR اقل في الجذور مما في الاوراق وكذلك الحال مع السويقة تحت الفلقية لعقل الماش الساقية المعرضة مباشرة للكادميوم تكون فيها فعالية الانزيم GR اقل مما في الاوراق لنفس السبب آنف الذكر.

ان الزيادة غير المعنوية في تركيز الكلوروفيل و الانخفاض غير المعنوي لمعدل النتح مقارنة مع عينة السيطرة (وهما مؤشران يرتبطان بشكل مباشر بعملية البناء الضوئي والذي تعتمد عليه ديمومة النبات) بوجود الـ

Cd بتركيز ١.٥ جزء بالمليون ،أشارت إن عملية تكوين الجذور العرضية هي عملية حساسة للغاية و تتأثر بتراكيز واطئة من الكادميوم وهو عنصر معروف بسميته العالية . اذ تشير اغلب الدراسات إلى إن إضافة الـ Cd إلى وسط النمو يسبب تحلل الكلوروفيل chlorosis وتثبيط معدل النتح وان بقائهما في دراستنا الحالية بشكل مقارب لعينة السيطرة يعزى إلى دور مضادات الأكسدة الإنزيمية (GR) واللاإنزيمية (GSH) التي ارتفعت بوجود الكادميوم عند التركيز 1.5 جزء بالمليون دليلا على مقاومة العقلة لإجهاد الكادميوم الذي يمكن الاستدلال على وجوده من زيادة تركيز البرولين وانخفاض تركيز البروتين في اوراق العقلة المعاملة بكلوريد الكادميوم مقارنة بعينة السيطرة.

المصادر

شهيد ، عبد الله ابراهيم و اسراء عبد الامام الرياحي (2012 a) تاثير المستويات الواطئة من الكادميوم في تحسين نمو البادرات و استجابة التجذير في عقل الماش المشتقة منها . مجلة الفرات للعلوم الزراعية . ٤ (٢) : ٠٠ – ٠٠ . (مقبول النشر)

شهيد ،عبد الله ابراهيم و اسراء عبد الامام الرياحي (2012 b) هل لحامضي السالسليك و الاسكورييك فعلاً تآزرياً مع الاوكسين في عملية تكوين الجذور العرضية في عقل نبات الماش. مجلة الفرات للعلوم الزراعية ٤ (٣) : ٠٠ –٠٠ (مقبول للنشر).

Anjum, N.A., Umar, S., Ahmad, A. & Iqbal, M.(2008) Responses of components of antioxidant system in mung bean genotypes to cadmium stress. *Communications in Soil Sci. Plant anal.,39*:2469-2483.

Aravind, P. & Prasad, M.N.V.(2005) Cadmium- zinc interactions in a hydroponic system using *Ceratophyllum demersum* L. : adaptive ecophysiology , biochemistry and molecular toxicology. *Braz.J.Plant Physiol., 17*:3-20.

Arnon, D.T.(1949) Copper enzymes in isolated chloroplast polyphenol oxidase in *Beta vulgaris. Plant Physiol.,24*:1-15.

Arora, S. & Saradhi, P.P.(2010) Light induced enhancement in proline levels in *Vigna radiate* exposed to environmental stress. *Aust.J. Plant Physiol.,22*:383-386.

Ballestrasse, K., Gardey, L., Gallego, S.M. & Tomaro, M.L.(2001) Response of antioxidant defence system in soy bean nodules and roots subjected to cadmium stress. *Aust. J. Plant Physiol., 28*:497-504.

Bates, L.S., Waldren, R.P. & Teare, I.D.(1973) Rapid determination of free proline for water stress studies . *Plant and Soil, 39*:205-208.

Benavides, M.P., Gallego, S.M. & Tomaro, M.L.(2005) Cadmium toxicity in plants . *Braz.J.Plant Physiol.,17*:49-55.

Bi, Y.H., Chen, W.L., Zhang, W.N., Zhou, Q., Yun, L.J. & Xiang, D.(2009) Production of reactive oxygen species , impairment of photosynthetic function and dynamic changes in mitochondria are early events in cadmium induced cell death in *Arabidopsis thaliana.Biol.Cell,101*:629-643.

Bishop, M.C., Dben-Von Laufer & Fody, E.P.(1985) Clinical Chemistry Principles.Procedures and Correlations. pp.181-182.

Cakmak, I. & Kirkby, E.(2008) Role of magnesium in carbon partitioning and alleviating photooxidative damage . *physiologia plantarum,133*:692-704.

Cargnelutti, D., Tabaldi, L.A., Spanevello, R.M., Jucoski, G.O. & Battisti, V.(2006) Mercury toxicity induces oxidative stress in growing cucumber seedlings . *Chemosphere,65*:999-1006.

Chao, Y.Y. and Hong, C.H. & Kao, C.H.(2010) The decline in ascorbic acid contents is associated with cadmium toxicity of rice seedlings. *Plant Physiol.Biochem., 48*:374-381.

Conklin, P.L.(2001) Recent advancesin the role and biosynthesis of ascorbic acid in plants.*Plant Cell and Environment,24*:383-394.

Das, P., Samantaray, A. & Roul, G.R.(1997) Studies on cadmium toxicity in plants: a review. *Environ.Pollut.,98*:28-36.

Dubey, R.S. & Dwivedi, R.S.(1987) Effect of heavy metal on seed germination and seedling growth of soy bean.*Nat.Acad.Letters,10*:121-124.

Ellman, G.L.(1959) Arch.Biochem.Biophys., 822-870.

Foy, C.D., Chaney, R.L. & White, M.G. (1978) The physiology of metal toxicity in plants. *Ann. Rev.Plant .Physiol.,29*:511-566.

Foyer,C.H. & Halliwell, B. (1976) The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplast : A preposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta ,133*:21-25.

Foyer, C.H. & Noctor, G. (2005) Redox homeostasis and antioxidant signalling: A metabolic interface between stress perception and physiological responces. *Plant Cell, 17*:1866-1875.

Freeman, J.L., Persan, M.W., Nieman, K., Albercht, C., Peer, W., Pickering, L.J. & Salt, D.E.(2004) Increased glutathione biosynthesis plays a role in nickel tolerance in *Thlaspi* nickel hyperaccumulatores . *Plant Cell, 16*: 2176-2191.

Gallego, S.M., Benavides, M.P. & Tomaro, M.T.(1996) Effect of heavy metal ion excess on sun flower leaves:Evidence for involvement of oxidative stress . *Plant Sci., 121*:151-159.

Gonçalves, J.F., Becker, A.G., Cargnelutti, D., Tabaldi, L.A., Pereira, L.B., Battisti, V., Spanevello, R.M., Morsch, V.M., Nicoloso, F.T. & Schetinger, R.C.(2007) Cadmium toxicity causes oxidative stress and induces response of the antioxidant system in cucumber seedlings. *Braz.J. Plant Physiol., 19*:223-232.

Haag, K.A., Schafer, H.J., Heiss, S., Walter, C. & Rausch, T.(1999) Cadmium exposure in Brassica juncea causes a decline in transpiration rate and leaf expansion with out effect on photosynthesis. *J.Exp.Bot.,50*:1827-1835.

Haghiri, F.(1973) Plant uptake of cadmium as influenced by cation exchange capacity, organic matter,zinc and soil temperature. *J.Environ.Qual., 2*:93-96.

Hasan, S.A., Fariduddin, Q., Ali, B., Hayat, S. & Ahmad, A.(2009) Cadmium: Toxicity and tolerance in plants. *J. Environ. Biol., 30*:165-174.

Hermans, C., Johnson, G.N., Strasser, R.J. & Verbruggen, N.(2004) Physiological characterization of magnesium deficiency in suger beet:acclimation to magnesium differentially affects photosystems I and II . *Planta ,220*:344-355.

Hess, C.E.(1961) The mung bean bio assay for detection of root promoting substances. *Plant Physiol., 36*: suppl. 21.

Hsu, Y.T. & Kao, C.H.(2004) Cadmium toxicity is reduced by nitric oxid in rice leaves. *Plant Growth Regul., 42*:227-238.

Islam, M.M., Hoque, M.A., Okuma, E.,Jannate, R., Banu, M.N.A., Jahan, M.S., Nakamura, y. & Murata, Y.(2009) Proline and glycine betain confer cadmium tolerance on tobacco bright yellow-2 cells by increasing Ascorbate-Glutathione cycle enzyme activities. *Bio. Sci. Biotechnol.Biochem., 73*:2320-2323.

Jimenez, A., Hernandez, J.A., Pastori, G., Del Rio, L.A. & Sevilla, F. (1998) Role of the Ascorbate-Glutathione cycle of mitochondria and peroxysomes in the senescense of pea leaves. *Plant Physiol., 118*:1327-1335.

Lefévre, I., Marchal, G., Meerts, P., Corréal, E. & Lutts, S.(2009) Chloride salinity reduces cadmium accumulation by the Mediterranean halophyte species *Atriplex halimus* L., *Environ.Exp.Bot.,65*:142-152.

Lichtenthaler, H.K. & Wellburn, A.R.(1983) Determinations of total carotenoides and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochem. Soc. Trans., 11*:591-592.

Lyubenova, L., Götz, C., Golan-Goldhirsh, A. & Schröder, P.(2007) Direct effect of Cd on glutathione S-transferase and glutathione reductase from *Calystegia sepium*. *Int.J.Phytoremed., 9*:465-473.

Mackinney, G.(1941) Absorption of light by chlorophyll solutions. *J.Biol.Chem.,140*:315-322.

Metwally, A., Safronova, V.I., Bellimov, A.A. & Dietz, K.J.(2005) Genotypic variation of the response to cadmium toxicity in *Pisum sativum* L. *J.Exp.Bot.,56*:167-178.

Noctor, G. & Foyer, C.H.(1998) Ascorbate and glutathione :Keeping active oxygen under control. *Annu.Rev.Plant Physiol.Plant Mol. Biol., 49*:249-279.

Nyitrai, P., Czovek, P., Ovari, M. & Keresztes, A.(2009)Signalling mechanism mediating the anti-senescence effect of low-concentration chemical stressors sprayed on to bean seedling. *Environ.Exp.Bot., 66*:501-506.

Pietrini, F., Ianelli, M.A., Pasqualini, S. & Massacci, A.(2003) Interaction of cadmium with glutathione and photosynthesis in developing leaves and chloroplast of *phragmitis australis* (cav.) Trin. Exsteudel. *Plant Physiol., 133*:829-837.

Prasad, S., Dwivedi, R., Zeeshan, M. & Singh, R.(2004) UV-B and cadmium induced changes in pigments, photosynthetic electron transport activity, antioxidant levels and antioxidative enzyme activities of *Riccia* sp.Acta physiol.*Plant,26*:423-430.

Qadir, S., Qureshi, M.I.,Javed, S. & Abdin, M.Z.(2004) Genotypic variation in phytoremedation potential of Brassica juncea cultivars exposed to Cd stress. *Plant Sci., 167*:1171-1181.

Rellán-Alvarez, R., Ortega-Villasante, C., Alvarez-Fernández, A.,Del-Campo, F.F. & Hernández, L.E.(2006) Stress responces of *Zea mays* to cadmium and mercury. *Plant Soil,279*:41-50.

Roman, O., Vazquez, E., Fernandez, M., Felipe, M. & Zornoza, P.(2003) Cadmium stress in white lupine: effects on nodule structure and functioning. *Plant Physiol.,161*:911-919.

Salt, D.E., Prince, R.C., Pickering, I.J. & Raskin, I.(1995) Metabolism of cadmium mobility and accumulation in Indian mustard. *Plant Physiol.,109*:1427-1433.

Sandalio, L.M., Dalurzo, H.C., Gómez, M., Romero-Puertas, M.C. & Del Rio, L.A. (2001) Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plant. *J.Exp.Bot., 52*:2115-2126.

Schlegel, H., Godbold, D.L. & Hüttermann, A.(1987)Whole plant aspects of heavy metal induced changes in CO_2 uptake and water relations of spruce *(Picea abies*) seedlings. *Physiol. Plant.,69*:265-270.

Shi, G.R. & Cai, Q.S.(2008) Photosynthetic and anatomic responses of pea nut leaves to cadmium stress.*Photosynthetica, 46*:627-630.

Smirnoff, N. (2005) Antioxidants and reactive oxygen species in plants.Blackwell Publishing Ltd.

Teisseire, H. & Guy, V.(2000) Copper-induced changes in antioxidant enzymes activities in fronds of duck weed (*Lemna minor*) .*Plant Sci.,153*:65-72.

Yannarelli, G.G., Fernández-Alvarez, A.J., Santa-Cruz, D.M. & Tomaro, M.L.(2007) Glutathione reductase and isoforms in leaves and roots of wheat plants subjected to cadmium stress. *Phytochemistry, 68*:505-512. *Phytochemistry, 68*:505-512.

Yoshida, S., Forno, D.A., Cock, J.H. & Gomez, K.A.(1976) Laboratory manual for physiological studies of rice . IRRI, Philippines (cited in:Niaz, M. & Rasul, E. (1998) Aquatic macrophytes as biological indicators for pollution management studies. *Pak.J.Biol.Sci.,1*:332-334.

Zhang, F.Q., Shi, W.Y., Jin, Z.X. & Shen, Z.G.(2003) Response of antioxidative enzyme in cucumber chloroplast to cadmium toxicity. *J.Plant Nutr.,26*:1779-1788.