Archive of SID

بررسی اثر کودهای بیولوژیک، هومیک اسید و نانو پلیمر سوپرجاذب بر برخی صفات فیزیولوژیکی گیاه یونجه یکساله (*Medicago scutellata*) تحت تنش کادمیوم

مرتضی محمدی [۱*]، داوود حبیبی [۲]، محمدرضا اردکانی [۳] و احمد اصغرزاده [٤]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد رشته زراعت دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج؛ m_mohammadi.kiau@yahoo.com

۲- استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج

۳- استاد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج

٤- استادیار، موسسه تحقیقات خاک و آب ایران

چکیده

این پژوهش به منظور بررسی تاثیر جداگانه و توام باکتری‌های محرک رشد گیاه به صورت mix (*Azotobacter crococom*، *Azospirillum lipoferum*)، (*Pseudomonas putida*) و قارچ میکوریزا (*Glomus intraradices*) به همراه هومیک اسید و پلیمر سوپر جاذب در بهبود شرایط رشد و همچنین محتوای کلروفیل، میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت و ظرفیت بیومارکرهای تخریبی در گیاه یونجه یکساله (*Medicago scutellata*) در شرایط سمیت فلز سنگین کادمیوم صورت پذیرفت. این آزمایش در پاییز سال ۱۳۸۸ در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در چهار تکرار انجام شد. فاکتور اول در این آزمایش سطوح فلز سنگین کادمیوم، که به ترتیب شامل (۰- ۴۰ - ۸۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک $CdCl_2$) و فاکتور دوم این آزمایش ترکیبات تیماری (باکتری‌های محرک رشد، قارچ میکوریزا، هومیک اسید و پلیمر سوپرجاذب) در ۱۶ سطح بود. نتایج آزمایش حاکی از این امر بود که با افزایش غلظت کادمیوم در خاک میزان محتوای کلروفیل a، b و a+b کاهش معنی‌داری از خود نشان داد ($P < 0.05$) و همچنین میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت و ظرفیت بیومارکرهای تخریبی مورد مطالعه به طور معنی‌داری افزایش پیدا کردند ($P < 0.05$). با افزایش کادمیوم خاک و جذب این عنصر در گونه یونجه یکساله ظرفیت هر یک از نشاندارکنندگان زیستی، مالون دی آلدهید (MDA)، دی تیروزین و دی هیدروکسی گوآنوزین (8-oH-DG) افزایش معنی‌داری را نشان داد ($P < 0.05$) به طوری که این افزایش ناشی از اثرات سمی کادمیوم به ترتیب بر لیپید آلدهیدی، پروتئین و هسته سلولی بود همچنین روندی کاهشی در محتوای کلروفیل a، کلروفیلb و کلروفیل کل (a+b) در بالاترین غلظت کادمیوم (۸۰ میلی‌گرم در کیلوگرم) به کار برده شده در خاک مشاهده شد. فعالیت و عملکرد سه آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAD) و گلوتاتیون پراکسیداز (GPX) در پاسخ به سمیت ناشی از کادمیوم در اندام هوایی گونه مورد مطالعه افزایش معنی داری را نشان داد ($P < 0.05$) .با توجه به اثرات متقابل فاکتورهای آزمایش مشاهده شد که تیمارهای [b_5 (کاربرد پلیمر سوپرجاذب + باکتری‌های محرک رشد) و b_9(کاربرد باکتری‌های محرک رشد + هومیک اسید)] در بالاترین سطح سمیت کادمیوم (۸۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک)دارای کمترین فعالیت آنزیم SOD، CAT و GPX بودند.

واژه های کلیدی: کادمیوم، MDA ، SOD ، آنزیم آنتی اکسیدانت، تنش اکسیدی ، GPX.

۱- آدرس نویسنده مسئول: کرج، مهرشهر، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، دانشکده کشاورزی، گروه زراعت.

* دریافت: ۸۹/۷/۱۸ و پذیرش: ۸۹/۹/۱۰

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

فلزات سنگین آلاینده‌های محیطی مهمی هستند که در خاک وجود دارند به طوری که ممکن است در نتیجه فعالیت‌های بشری مقادیر این فلزات در نواحی طبیعی و کشاورزی به حد سمی برسد. این عناصر در ایجاد تنش اکسیدی در گیاهان مشارکت دارند (Luis et al.,1983) ، به این ترتیب که با ایجاد گونه‌های گونه‌های فعال اکسیزن اکسیژن(ROS) که محصول متابولیسم هوازی‌اند و شامل ترکیباتی مثل سوپراکسید، پراکسید، اکسیژن اتمی و رادیکال‌های هیدروکسیل می‌باشند طی واکنش‌های انتقال الکترون در میتوکندری‌ها، کلروپلاست‌ها و پراکسی‌زوم‌ها تولید می‌گردند و در صورتیکه غلظت آنها تنظیم نشود می‌توانند سبب آسیب به پروتئین، غشاء و DNA شوند (Davey et al., 2005). برخی از یون‌ها با ویژگی‌های شدید ردوکس مانند مس و شاید یون‌هایی که فاقد این ویژگی‌ها هستند مانند روی و کادمیوم به عنوان آغاز کننده‌های پراکسیداسیون لیپید غشاء و تحریک کننده‌های تولید گونه‌های فعال اکسیژن شناخته شده‌اند (Sharma et al.,2004). غلظت اضافی کادمیوم به دلیل افزایش گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) در بخش‌های زیر سلولی موجب افزایش تنش اکسیدی می‌شود. کادمیوم جذب کاتیون‌ها توسط گیاهان از طریق تاثیر بر قابلیت دسترسی آنها یا کاهش جمعیت میکروبی خاک تغییر می‌دهد (Benavides et al.,2005). باز شدن روزنه‌ها، تعرق و فتوسنتز تحت تاثیر کادمیوم قرار می‌گیرد با این وجود، مکانیسم‌های سمیت کادمیوم هنوز به طور کامل شناخته نشده است (Sanita toppi and Gabrielli,1999). ممانعت از عمل احیای آهن III در ریشه، منجر به کمبود آهن II و در نتیجه کاهش فتوسنتز می‌شود. به طور کلی کادمیوم در جذب، انتقال و استفاده از عناصر کلسیم، منیزیم، فسفر، پتاسیم و آب توسط گیاه اختلال ایجاد می‌کند. کادمیوم جذب نیترات و انتقال آن از ریشه‌ها به اندام هوایی را از طریق ممانعت از فعالیت نیترات ردآکتاز کاهش می‌دهد (Benavides et al.,2005). میزان جذب کادمیوم توسط گیاه به عواملی نظیر غلظت در خاک، قابلیت زیست فراهمی، ماده‌ی آلی، pH ، پتانسیل اکسید و احیاء، درجه حرارت و غلظت عناصر دیگر وابسته است و کادمیوم در جذب با حامل‌های انتقال دهنده‌ی غشایی عناصر غذایی پتاسیم، کلسیم، منیزیم آهن، منگنز، مس، روی و نیکل رقابت می‌کند (Benavides et al.,2005). یکی از مهمترین دلایل کاهش محتوای کلروفیل تخریب آن بوسیله گونه های فعال اکسیژن (ROS) می‌باشد (Navari – lzzo et al., 1998). پراکسیداسیون لیپید نیز به دلیل فعالیت لیپوکسی‌ژنازها افزایش می‌یابد، آنیون فعال سوپراکسید می‌تواند با پراکسید هیدروژن واکنش داده و رادیکال بسیار فعال هیدروکسیل که مسئول پراکسیداسیون لیپید می‌باشد را ایجاد نماید (Garnczarska and Ratajczak, 2000). مالون دی آلدهید (MDA) فراوان ترین محصول حاصل از تجزیه لیپید آلدهیدی به شمار می‌آید. بیش از ٪ ۷۵ مالون دی آلدهید (MDA) اندازه‌گیری شده از اسیدهای چرب سه زنجیره‌ای غیر اشباع مانند اسید α – لینولئیک به دست می‌آید (Davey et al., 2005). در تحقیق علی و همکاران ۲۰۰۳ بر گونه *Salix acmophylla Bioss* اثرات سرب، نیکل و مس نشان داد که هر سه فلز مورد مطالعه سبب کاهش ظرفیت کل کلروفیل بسته به میزان غلظت فلز شدند. اثرات نامطلوب فلزات در این مورد به صورت Pb < Ni < Cu بود ، به علاوه کاهش ظرفیت کل کلروفیل با افزایش سطح مالون دی آلدهید (MDA) همراه بود (Ali et al., 2003). دی تیروزین نیز به عنوان یک ماده نشان‌دار کننده زیستی برای اکسیداسیون پروتئین همبستگی نزدیکی با میزان تنش دارد (Boojar and Goodarzi, 2007). بنابر این گیاهانی که در مجاورت تنش فلز سنگین قرار دارند اغلب با تنش اکسیداتیو روبرو می‌شوند (Sharma et al., 2004). گیاهان برای محافظت از خود در مقابل آسیب‌های ناشی از رادیکال‌های آزاد دارای سیستم آنتی اکسیدانت هستند (Groppa et al., 2007). اهمیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت به توانایی

www.SID.ir

Archive of SID

آنها برای از بین بردن ROS و در نهایت جلوگیری از بروز کردن آسیب‌های اکسیدی مربوط می‌باشد (Khatun et al., 2008). مقاومت گیاهان به فلز سنگین به توانایی آنها در محدود کردن فلزات سنگین به دیواره‌های سلولی، سنتز اسمولیت‌ها و فعالسازی سیستم تدافعی آنتی اکسیدانتی مربوط می‌باشد (Sharma and Dubey, 2005). از آنجایی که فلزات سنگین منجر به تولید اکسیژن‌های رادیکال آزاد (ROS) هستند عناصر و موادی که دارای قابلیت‌های آنتی اکسیدانتی هستند، می‌توانند از بروز آسیب‌های اکسیدی ناشی از فلزات سنگین جلوگیری کرده و محافظت به عمل آورند (Gaetke and Chow, 2003). گفته می‌شود که آنزیم‌های آنتی اکسیدانت، سیستم‌های تدافعی مهمی برای گیاهان و جهت مقابله با تنش اکسیدی ناشی از فلزات به شمار می‌ایند (Ali et al., 2003). این سیستم از آنزیم‌های آنتی اکسیدانتی ذیل تشکیل شده است ، آسکوربات پراکسیداز (APOX)، گلوتاتیون ردوکتاز (GR)، سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و ترکیبات غیر آنزیمی مانند (آسکوربیک اسید ، کارتنوییدها ، α – توکوفرول). شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد آنتی اکسیدانت‌ها در گیاه نخود که تحت تیمار کادمیوم (Cd) قرار داشتند در مکانیسم‌های سم زدایی ایفای نقش می‌نمایند (Groppa et al., 2007). بنابراین از آنجایی که گیاهان دارای تعدادی مولکول‌های آنتی اکسیدانت و آنزیم‌هایی هستند که از آنها در مقابل آسیب‌های اکسیدی محافظت می‌نمایند برای محافظت در مقابل اثرات سمی گونه‌های فعال اکسیژن به عملکرد ترکیبی SOD ، CAT و POX نیاز است (Garnczarska and Ratajczak, 2000). سوپراکسید دیسموتازها (SOD) ، عبارتند از آنزیم‌های فلزی که عدم تناسب رادیکال‌های آزاد سوپراکسید را به پراکسید هیدروژن و اکسیژن کاتالیز می‌کند و به نظر می‌رسد که نقش مهمی را در حفاظت از سلولها در مقابل اثرات زیانبخش غیر مستقیم ناشی از این رادیکال ها بر عهده دارند (Luis et al., 1983). پراکسید هیدروژن برای گیاهان سمی است زیرا هم به عنوان یک اکسید کننده عمل می‌کند و هم به عنوان یک کاهنده (Ali et al., 2003) . بنابراین سطح H_2O_2 درون سلولی توسط تعداد زیادی از آنزیم‌ها کنترل می‌شود که مهمترین این آنزیم‌ها عبارتند از کاتالاز و پراکسیداز، گلوتاتیون پراکسیداز از غشاء لیپید در معرض آسیب‌های اکسیدی محافظت کرده و از پراکسیدازهای آلی سمیت زدایی می‌کنند این ماده همچنین بر روی هیدروپراکسیدازهای آلی نیز عمل می‌کند (Boojar and Goodarzi, 2007) . البته نرخ تولید (ROS) وابسته به گونه، مدت تنش، سن گیاه و مهمتر از همه شدت تنش می‌باشد(Navari – lzzo et al., 1998). گونه‌های گیاهی از استراتژی‌های خاصی برخوردارند که آنها را قادر به رشد و نمو در خاک‌های آلوده به فلزات می‌نماید (Gardea-Torresdey et al., 2005). محققان مشاهده کردند که برخی از گیاهان قادر به رشد در مکانهایی هستند که خاک آنها حاوی مقادیر زیادی از عناصر سنگین یا ترکیبات سمی دیگر است به طوری که غلظت این فلزات بسیار بیشتر از مقادیر معمول می‌باشد (Peralta et al., 2001). یکی از تکنیک‌های پاکسازی و احیاء مواد زائد سمی عبارت است از استفاده از گیاهان مقاوم به فلزات سنگین (Sudhakar et al., 1992). در گیاهان رنگدانه‌های فتوسنتزی به طور عمده برای گرفتن نور و تولید انرژی کاهش یافته در گیاهان مهم هستند. گزارشات زیادی نشان دادند که تنش آبی، توانایی کاهش غلظت کلروفیل‌ها و کارتنوئیدهای بافت را دارد و این کاهش به طور عمده با تولید ROS ها در تیلاکوئید انجام می‌گیرد. اما، گزارشاتی که بهبود حجم رنگدانه ها را در شرایط تنش آبی نشان بدهد کاملاً کم و نادر هستند. گزارشاتی نیز نشان دادند که کاربرد خارجی برازینولد، یونیکونازول و متیل جاسمونیک در گیاه ذرت، تحمل به تنش را با افزایش فعالیت SOD، CAT و GPX افزایش داد(Jaleel et al, 2009). در اثر ایجاد تنش، گونه‌های فعال اکسیژن تولید می‌شود فلزات سنگین باعث استرس اکسیداتیو و تولید اکسیژن فعال از طریق اختلال در روند

www.SID.ir

Archive of SID

تنفس و فتوسنتز می‌شوند (Shaw et al., 2004). مثلاً گزارش شده است در اثر مواجهه با آلومینیوم در سویا میزان سوپراکسید دیسموتاز و مالون دی آلدهید افزایش یافت و گزارش‌های مشابهی در مورد لوبیا، جو و گوجه فرنگی تحت تاثیر مس نیز وجود دارد (Shaw et al., 2004). اکسیژن فعال از طریق فرآیندهای اکسید کنندگی محتویات سلول، اثرات مخرب جدی بر گیاه می‌گذارد که نتیجه آن پیری زودرس، افزایش نفوذپذیری و نشت یون‌ها از غشای سلولی، پیری، تخریب کلروفیل و کاهش فتوسنتز، پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء، اکسیداسیون پروتئین‌ها ممانعت آنزیمی و آسیب به DNA و RNA در گیاهان است (Mittler, 2002). اولین فعالیت این ترکیبات مخرب اثر بر غشاء می‌باشد. رادیکال‌های آزاد اکسیژن یا واکنش‌های پراکسیداسیون لیپیدها، در غشاء گیاهی به طور انتخابی اسیدهای چرب غیر اشباع را تجزیه خواهند کرد و باعث تجمع آلدهیدها، هیدروکربن‌ها و ... می‌شود. مالون دی‌آلدهید محصول پراکسیداسیون لیپیدها است. بنابراین برای سنجیدن میزان تنش وارد شده به سلول‌های گیاهی و پی بردن به دخیل بودن رادیکال‌های آزاد اکسیژن در نتیجه تنش، مالون دی‌آلدهید که نتیجه پراکسیداسیون لیپیدی است را اندازه‌گیری می‌کنند. گیاه دارای مکانیزم‌های متفاوتی جهت حذف یا کاهش این ترکیبات مخرب می‌باشد. یکی از سیستم‌های تدافعی افزایش آنتی اکسیدانتهایی چون آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز است که قادرند اکسیژن‌های رادیکال آزاد را حذف، خنثی یا تمیز کنند (Bayer et al., 1991). فعالیت این آنزیم‌ها در گیاه در مواجهه با تنش‌های محیطی افزایش می‌یابد و از این طریق مقاومت گیاه را به این شرایط افزایش می‌دهد (Scandialos, 1993). باکتری‌ها اثر تنش را از طریق مکانیسم دفاعی دیگری کاهش می‌دهند، که از بالا رفتن فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت جلوگیری کرده است. زیرا فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت تنها مکانیسم دفاعی گیاه در کاهش خسارت‌های اکسیداتیو نیست ممکن است باکتری‌ها ازطریق سنتز پرولین نیز در کاهش خسارت‌های ناشی از رادیکال‌های آزاد و تنش اکسیداتیو نقش داشته باشند. Omar (۲۰۰۹) نیز کاهش در فعالیت آنزیم SOD را در گیاهچه‌های جو تلقیح شده با باکتری آزوسپیریلوم را گزارش کرد. گزارش شده که آسمولیت‌ها مانند پرولین نقش مهمی را در تنظیم اسمزی ایفا می‌کنند و همچنین از طریق جاروب کردن ROS ها از سلول ها حفاظت می‌کنند (Reddy et al., 2004). در تحقیقی مشاهده کرد که کاربرد ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر هومیک اسید یا فولیک اسید تنفس برگ و ریشه و میزان کلروفیل برگ‌ها را افزایش داد. همین نتیجه از پاشش محلول آبی هومیک اسید بر روی بگونیا نیز به دست آمد. افزایش وزن خشک در بگونیای محلول پاشی شده با هومیک اسید را به خاطر افزایش کلروفیل و در نتیجه افزایش فتوسنتز دانستند باید توجه داشت که افزایش سنتز کلروفیل به تنهایی موجب افزایش فتوسنتز نمی‌شود. البته نرخ تولید (ROS) وابسته به گونه، مدت تنش، سن گیاه و مهمتر از همه شدت تنش می‌باشد (Navari-Izzo et al.,1998). یکی از راههای افزایش ذخیره آب در خاک استفاده از پلیمرهای سوپرجاذب است که آب را در موقع نیاز در اختیار ریشه گیاه قرار می‌دهد(Pawlowski *etal.*,2009). پلیمرسوپرجاذب یا هیدروژل ، شبکه‌های سه بعدی با پیوندهای عرضی ، حل نمی‌شوند و قادرند صدها برابر وزن خشکشان آب را جذب و ذخیره نمایند(Kiatkamjornwong, 2007). پلیمرهای سوپر جاذب که در کشاورزی استفاده می‌شوند ژل‌های پلی الکترولیت هستند که از آکریلامید (AM) ، آکریلیک اسید (AA) و آکریلات پتاسیم تشکیل شده‌اند(Zohuriaan-Mehr and Kabiri, 2008) و در باغها، فضای سبز و کشاورزی استفاده برای حفظ و ذخیره رطوبت بکار می‌روند و آب را به کندی به خاک آزاد می‌کنند (Orzeszyna et al., 2006). پلیمرهای سوپرجاذب از طریق افزایش ظرفیت نگهداری آب در خاک (Akhter et al., 2004) کاهش شستشوی آب و مواد غذایی موجود در خاک (Adams and Lockaby, 1987)، کاهش

www.SID.ir

Archive of SID

میزان تبخیر از سطح خاک (Akhter et al., 2004) و افزایش تهویه خاک (Orzeszyna et al., 2006) موجب رشد و نمو بهتر گیاهان و در نتیجه افزایش عملکرد در شرایط نرمال و تنش‌می‌شوند. Huttermann و همکاران (۱۹۹۹) گزارش کردند که افزودن سوپرجاذب به خاک شنی، ظرفیت نگهداری آب در خاک را افزایش داده و گیاهچه‌های *Pinus halepensis* تیمار شده با سوپرجاذب در طی تنش مقاومت به خشکی و رشد بهتری نسبت به گیاهچه‌های شاهد (بدون سوپرجاذب) دارند. با توجه به مطالب فوق، تحقیق حاضر به منظور بررسی تاثیر کودهای بیولوژیک و هومیک اسید و پلیمر سوپر جاذب بر محتوی کلروفیل a، b و a+b و همچنین فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانت و ظرفیت بیومارکرهای نخریبی در گونه مورد مطالعه صورت پذیرفت تا بتوان با استفاده از ترکیبات فوق قدمی در جهت مقاومت گونه‌های گیاهی به این عناصر سمی و همچنین بهبود فرآیند گیاه پالایی خاکهای آلوده به این عناصر برداشت.

مواد و روش ها

این تحقیق در سال ۱۳۸۸ در گلخانه تحقیقاتی واقع در مزرعه آموزشی و تحقیقاتی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج انجام شد. طبق نتایج آزمایش خاک ، بافت خاک مورد آزمایش لومی‌شنی، با هدایت الکتریکی ۵/۸۲ دسی زیمنس بر متر، میزان کربن آلی ۰/٦ ٪ ، میزان ازت کل ۰/۰٥٤ ٪ و مقدار کادمیوم خاک ۰/۰۵ میلی گرم در کیلوگرم خاک بود. خاک گلدانهایی که دارای تیمار پلیمر سوپرجاذب بودند ابتدا با مقدار مشخصی پلیمر سوپرجاذب (۵ گرم پلیمر + ٤۰۰ سی سی آب، برای هر گلدان) کاملاً مخلوط شد. نمک کلرید کادمیوم ($CdCl_2$) با غلظت‌های مشخص توسط افشانه به خاک اضافه شد و بعد از گذشت مدت یک ماه (به دلیل هموژن شدن نمک فلز سنگین با خاک) در تاریخ ۱۵ بهمن ۱۳۸۸ کاشت صورت گرفت. گیاه مورد آزمایش یونجه یکساله (*Medicago scutellata*) در نظر گرفته شد. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در چهار تکرار صورت پذیرفت. در این آزمایش فاکتور A سطوح فلز سنگین کادمیوم که شامل غلظت‌های ۸۰-٤۰-۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک نمک کلرید کادمیوم ($CdCl_2$) و فاکتور B ترکیبات تیماری (کاربرد پلیمر سوپرجاذب، باکتری‌های محرک رشد، قارچ میکوریزا و هومیک اسید) در ١٦ سطح که شامل: ۱. کاربرد پلیمر نانو سوپر جاذب ۲. کاربرد باکتریهای ازتوباکتر و آزوسپریلیوم و سودوموناس ۳. کاربرد قارچ میکوریزا ٤. کاربرد هومیک اسید ۵. کاربرد پلیمر نانو سوپر جاذب + کاربرد باکتریهای ازتوباکتر و آزوسپریلیوم و سودوموناس ٦. کاربرد پلیمر نانوسوپر جاذب + کاربرد قارچ میکوریزا ۷. کاربرد پلیمر نانو سوپر جاذب + کاربرد هومیک اسید ۸. کاربرد باکتریهای ازتوباکتر و آزوسپریلیوم و سودوموناس + کاربرد قارچ میکوریزا ۹. کاربرد باکتریهای ازتوباکتر و آزوسپریلیوم و سودوموناس + کاربرد هومیک اسید ۱۰. کاربرد قارچ میکوریزا + کاربرد هومیک اسید ۱۱. کاربرد پلیمر نانو سوپر جاذب + کاربرد باکتریهای ازتوباکتر و آزوسپریلیوم و سودوموناس + کاربرد قارچ میکوریزا ۱۲. کاربرد پلیمر نانو سوپر جاذب + کاربرد باکتریهای ازتوباکتر و آزوسپریلیوم و سودوموناس + کاربرد هومیک اسید ۱۳. کاربرد پلیمر نانو سوپر جاذب + کاربرد قارچ میکوریزا + کاربرد هومیک اسید ١٤. کاربرد باکتریهای ازتوباکتر و آزوسپریلیوم و سودوموناس + کاربرد قارچ میکوریزا + کاربرد هومیک اسید ۱۵. کاربرد پلیمر نانو سوپر جاذب + کاربرد باکتریهای ازتوباکتر و آزوسپریلیوم و سودوموناس + کاربرد قارچ میکوریزا + کاربرد هومیک اسید ١٦. عدم کاربرد موارد فوق (شاهد) می‌باشد. گونه‌های باکتری‌های مورد استفاده در این آزمایش شامل (*Azotobacter crococum*) ، (*Azospirillum lipoferum*) و (*Pseudomonas putida*) به صورت ترکیب (mix) و همچنین گونه مربوط به قارچ میکوریزا (*Glomus intraradices*) بود که توسط بخش بیولوژی خاک

www.SID.ir

Archive of SID

موسسه تحقیقات خاک و آب جدا و خالص سازی شد. هر میلی لیتر از مایه تلقیح دارای 10^7 سلول زنده و فعال از هر جنس باکتری بود. ماده حامل قارچ میکوریزا، خاک فسفات بود. در فروردین ماه ۱۳۸۹ از هر گلدان نمونه‌ای تهیه و جهت انجام آزمایشات به آزمایشگاه منتقل شد.

اندازه گیری میزان فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز(SOD): جهت محاسبه این فاکتور ۳ عدد برگ در هنگام صبح قبل از گرم شدن هوا از مزرعه برداشت شد. سعی بر آن بود که برگها کاملاً جوان و گسترده باشند برگها داخل نایلون اتیکت گذاری شده، قرار گرفتند و در ظرفی که کف آن از یخ پوشیده شده بود قرار داده شدند و به آزمایشگاه منتقل گردیدند. سپس توسط روش Misra و همکاران (۱۹۷۲) میزان تغییرات این آنزیم تعیین شد. ابتدا محلول بافر تریس(حاوی فسفات دی سدیک، pH= ۷/۲) به همراه ۱/۳ میلی مول EDTA و ۰/۱ میلی مول کربنات منو سدیک تهیه شد و سپس از اپی نفرین با غلظت ۰/۲۵ میلی مول به عنوان سوبسترا استفاده شد، سپس محلول تهیه شده را به آن اضافه کرده، تغییرات جذب نوری حاصله از اکسیداسیون اپی نفرین،به عنوان فعالیت آنزیمی ارزیابی گردید و از آنزیم استاندارد و خالص جهت استاندارد نمودن نتایج استفاده شد که واحد آن قادر به اکسیداسیون ۰/۵ میلی مول اپی نفرین در یک دقیقه باشد.

اندازه گیری میزان فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT): جهت محاسبهٔ این فاکتور از برگهای جوان و توسعه یافته استفاده شد و سپس توسط روش (Paglia and Valentine, 1987) میزان تغییرات آنزیم تعیین گردید. نمونه برگها پس از شستشو با آب مقطر بلافاصله در محلول بافرفسفات- تریس ۰/۱۶ مول (pH= ۷/۵) وارد و خرد و هموژن شدند. سپس حجم مشابه بافر حاوی دیجیتونین آنزیم هضم کنندهٔ دیواره اضافه نموده تا فرآیند هضم غشاء و دیواره‌های سلولی صورت گیرد. در آخر میزان ml ۰/۵ از محلول هموژن برای سنجش پروتئین توسط روش(Lowry et al., 1951) برداشته شد و مقدار پروتئین آن بر حسب میلی گرم بر میلی لیتر تعیین گردید. در باقیماندهٔ محلول استخراجی فوق مقدار هر یک از آنزیم ها به روش خاصی تعیین گردید. در این روش شدت حذف آب اکسیژنه به عنوان سوبسترا ارزیابی شد. بافر زمینه برای انجام کار حاوی ۰/۱۷ میلی مول فسفات دی سدیک (pH= ۷/۵) به همراه ۰/۱۵ مول EDTA، ۰/۱۱ میلی مول کلرید منیزیم در نظر گرفته شد. واحد فعالیت آنزیم کاتالاز معادل نسبت تبدیل آب اکسیژنه در مدت ۱ دقیقه به هنگام پیشرفت واکنش درجه اول در نظر گرفته شد.

اندازه گیری میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز (GPX): در ابتدا برگهای منتقل شده به آزمایشگاه با آب مقطر شستشو داده شد. بلا فاصله در بافر فسفات تریس ۰/۱۶ مولار با pH=۷/۵ وارد شده و سپس خرد و هموژن گردید. آنگاه اجازه داده شد در حضور حجم مشابه از همان بافر حاوی دیجیتونین و آنزیم هضم کننده، دیواره،فرآیند هضم غشاء و دیوارهٔ سلول انجام شود. در پایان مقدار ۰/۵ میلی لیتر از محلول هموژن برای سنجش پروتئین برداشت شد و مقدار پروتئین آن بر حسب میلی گرم بر میلی لیتر تعیین گردید. سپس در باقیمانده محلول استخراجی مقدار آنزیم گلوتاتیون اندازه گیری شد (روش Paglia and Valentine, 1987) عصارهٔ استخراجی به محلول بافر حاوی فسفات منوپتاسیک ۰/۵۶ مول (pH=۷/۵)، همراه ۱/۲ میلی مول EDTA و یک میلی مول $NaNO_3$ و ۰/۲ میلی مول NADPH وارد شد. سپس به آن ۰/۲ میلی لیتر گلوتاتیون احیاء به همراه ۰/۱ میلی مول از آب اکسیژنه اضافه گردید. بلافاصله میزان اکسداسیون NADPH که از طریق تعیین مقدار تغییر جذب در ۳۴۰ نانو متر در ۳۰ درجه سانتیگراد توسط دستگاه اسپکتر و فتومتر(مدل z -u shimadzu – u ۱۰۰) اندازه گیری شد، همزمان یک محلول بلانک حاوی تمام مواد فوق بدون حضورعصاره استخراجی برای

www.SID.ir

Archive of SID

تصحیح و حذف خطاهای احتمالی مورد استفاده قرار گرفت. یک واحد از فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسید از معادل مقدار آنزیمی که بتواند یک میکرومول از سوبسترا NADPHرا در یک دقیقه کاتالیز کند در نظر گرفته شد. برای استاندارد شدن از نمونه آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز استاندارد استفاده شد(Paglia and Valentine,1987).

سنجش مالون دی آلدئید (MDA): برای این منظوراز روش کروماتوگرافی HPLC بر اساس روش استون و سیدنی (۱۹۸۷) استفاده شد. عصاره‌ای که برای سنجش-8 oH-dG مصرف شد بر اساس روش تیو بار بتوریک اسید با MDA مورد استفاده قرار گرفت. محصول این واکنش پس از عاری شدن از پروتئین بوسیله تری کلرواستیک اسید ۱۲ مول به ستون سیلکاژل اکتادسیل منتقل شد. پس از به تعادل رسیدن ستون، این ستون با فاز متحرک شامل فسفات بافر خاصی متانول شستشو شد و پیک MDA دراسپکتروفتومتر با دتکتورمرئی در طول موج ۵۳۲ نانو متر شناسائی و بر اساس سطح زیر منحنی پیک اندازه گیری گردید. جهت استاندارد شدن مالون دی آلدئید خالص با نسبت های مختلف در بافر شستشو و منحنی استاندارد رسم گردید (Steven, 1987).

سنجش دی تیروزین: جهت اندازه گیری دی تیروزین، دو برگ از گیاه جدا شد و با آب مقطر شستشو داده شد و بلافاصله در با فرفسفات تریس ۰/۱٦ مولار با pH=۷/۵ وارد و خرد و هموژن گردید، آنگاه اجازه داده شد حجم مشابه از همان بافر حاوی دیجیتوتین و آنزیم هضم کننده دیواره فرآیند هضم غشاء دیواره سلول صورت گیرد. در پایان مقدار ۰/۵ میلی لیتر در محلول هموژن برای سنجش توسط روش استون و سیدنی (۱۹۸۷) برداشته شد و مقدار پروتئین بر اساس میلی گرم بر میلی لیتر تعیین گردید، پس از آن در باقیمانده محلول مقدار دی تیروزین براساس روش فوق مورد ارزیابی قرار گرفت. در این روش میزان فعالیت براساس واکنش به مایع کروماتوگرافی ارزیابی گردید. بافر زمینه برای کارحاوی تریس اسیدکلریدریک با pH= ۷/۲، ۰/۲ میلی مول بر لیتر سدیم دی سدیک است.

سنجش دی هیدروکسی گوآنوزین: عصاره بدست آمده جهت سنجش دی هیدروکسی گوانوزین(8-oH-dG) بر اساس روش Bogdanov و همکاران (۱۹۹۹) انجام شد. در این مورد عصاره را از ستون کربن شماره ۸ (C_8) عبور داده، این ستون مخصوص جذب پورین هاست. پس از به تعادل رسیدن و عبور تمامی حلال موجود در عصاره آنگاه ستون با عبور از فاز متحرک جدید حاوی Tris Hcl با pH= 8/2 ماده 8-oH-dG ازاین ستون خارج شد و به ستون جدید کربن ۸ منتقل گردید. پس از به تعادل رسیدن، ستون با فاز متحرک حاوی آدنوزین با غلظت ۰/٦۵ مول شستشو شد. این امر سبب جدا شدن اختصاصی ماده مورد نظر به عنوان یک پیک اختصاصی شده به طوریکه این پیک به دستگاه دتکتور از نوع Colometric منتقل و شناسایی گردید. مقدار 8-oH-dG به صورت نسبت خاص از کل پیک های پورینی ارزیابی می‌گردد.

جداسازی عصاره برای(8-oH-dG): بافت مورد نظر توزین و پس از تعیین نسبت کل پروتئین یک قسمت از بافت در محلول بافرفسفات بی کربنات (منوسدیک) ۱/٦ مول با pH=۷/٤ خرد و سپس به سرعت در حضور یخ و شرایط سرد هموژن گردید. به محلول هموژن از ماده دی متیل سو لفو کساید به غلظت ۰/٤ مول اضافه شد. پس از اضافه کردن بافر جدید به نام استات منو سدیک با pH=۵/٦ آن را در برابر آب مقطر به مدت ٦ ساعت دیالیز و سپس محتوای باقی مانده در ۱۵۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. محلول بالایی در اسپکتروفتومتر به ترتیب در طول موجهای ۲۸۰ و ۲٦۰ نانو متر جذب گردید. آنگاه با اضافه کردن تری کلرو استیک اسید ۰/۳۵ مول از پروتئین عاری شد. این محلول پس از سانتریفوژ در ۳۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شده و محلول بالایی

www.SID.ir

Archive of SID

جهت سنجش 8-oH-dG مورد استفاده قرار گرفت (Bogdanov et al.,1999).

محتوای کلروفیل a و b : جهت اندازه‌گیری کلروفیل b و a ابتدا ۰/۵ گرم برگ از هر گلدان انتخاب و درون یک هاون چینی ریخته و به آن یک گرم سولفات منیزیم و ۱۰ میلی لیتر استون ۱۰۰٪ اضافه می کنیم و آنقدر در هاون سائیده تا خمیری شل حاصل گردد. هاون مربوطه را در داخل ظرف آب و یخ قرار داده و آزمایشگاه حتی الامکان تاریک شد تا فعل و انفعالات شیمیایی به حداقل برسد. سپس خمیر شل حاصله را برداشته در داخل سانتریفوژ با ۲۵۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۵ دقیقه قرار می‌دهیم سپس مقدار۱سی‌سی‌از این عصاره هموژن (سوپرنانت) را با ۹ میلی لیتر استن رقیق کرده و ۳ میلی‌لیتر از آن را داخل‌سل-های دستگاه اسپکتروفتومتر ریخته و در طول موجهای ٦٦٣ نانومتری برای کلروفیل a و ٦٤٧ نانومتر برای کلروفیل bمیزان جذب نور قرائت شد و از فرمولهای زیر کلروفیل b a, بدست آمد (Arnon, 1949). دستگاه قبل از آزمایش با استون خالص کالیبره گردید.

$$Chl.a(mgl^{-1}) = (12.25 \times A663 - 2.79 \times A647) \times D$$

$$Chl.b(mgl^{-1}) = (21.5 \times A647 - 5.1 \times A663) \times D$$

D = ضخامت سل‌های دستگاه اسپکتوفوتومتر

روش تجزیه و تحلیل اطلاعات: تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماری SAS (ver 9.1) و نمودارها توسط نرم افزار Excel رسم شد، مقایسه میانگین داده‌ها توسط آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ٥٪ صورت پذیرفت.

نتایج و بحث

سمیت کادمیوم برای گیاه یونجه یکساله (*Medicago scutellata*) از طریق اندازه‌گیری غشاء لیپیدی و محتوای کلروفیل مورد ارزیابی قرار گرفت. در این راستا فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز ، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز که حمایت کننده‌ی گیاهان، تحت سمیت ناشی از عناصر سنگین است برآورد گردید. نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان می‌دهد که بین سطوح مختلف کادمیوم و کاربرد کودهای بیولوژیک، هومیک اسید و پلیمر سوپر جاذب و همچنین اثر متقابل فاکتورهای آزمایش، بر صفات اندازه‌گیری شده اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ درصد وجود دارد. با توجه به شکل‌های۱، ۲ و ۳ که نشان دهنده اثر متقابل فاکتورهای آزمایش بر محتوای کلروفیل a، b و a+b می‌باشد، مشاهده می‌شود که با افزایش غلظت کادمیوم، محتوای کلروفیل a، b و a+b نیز در گونه‌ی مورد مطالعه کاهش می‌یابد به طوری که بیشترین کاهش کلروفیل a، b و a+b مربوط به بالاترین غلظت کادمیوم (۸۰ میلی گرم در کیلوگرم خاک $CdCl_2$) است. با توجه به شکل‌های فوق بهترین تیمارها از لحاظ کمترین کاهش محتوای کلروفیل نسبت به سایر تیمارها، تیمارهای b_2 و b_8 [b_2 (کاربرد باکتری‌های محرک رشد) و b_8 (کاربرد باکتری‌های محرک رشد + قارچ میکوریزا)] می‌باشد. به طوری که محتوای کلروفیل a (شکل ۱)، برای تیمارهای b_2 و b_8 در بالاترین سطح سمیت کادمیوم به ترتیب حدود ۱۷/۲٦ و ۱۷/۸۵درصد بیشتر از تیمار شاهد بود. با توجه به شکل ۲ ، محتوای کلروفیل b برای تیمارهای b_2 و b_8 در بالاترین سطح سمیت کادمیوم به ترتیب حدود ۱۵/٦۵ و ۱٦/۳۹ درصد بیشتر از تیمار شاهد بود. همچنین با توجه به شکل ۳ میزان کلروفیل کل (a+b) برای تیمارهای فوق به ترتیب حدود ۱٦/٤۲ و ۱۷/۱۱ درصد بیشتر از تیمار شاهد در بالاترین غلظت کادمیوم (۸۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک $CdCl_2$) بود. کادمیوم با جلوگیری از سنتز کلروفیل تاثیر منفی بر فرآیند فتوسنتز دارد . سرب با جلوگیری از جذب عناصر ضروری مثل Mg ، Fe از سنتز کلروفیل جلوگیری می‌کند، دستگاه فتوسنتز به دلیل لیگاندهای پروتئینی – S– N تخریب می‌شود و افزایش فعالیت کلروفیلاز نیز سبب افزایش تخریب کلروفیل در شرایط سمیت سرب می‌شود

www.SID.ir

Archive of SID

(Sharma and Dubey , 2005). بنابراین یکی از دلایل کاهش کلروفیل افزایش گونه‌های فعال اکسیژن ناشی از کادمیوم بوده است، به نظر می‌رسد تنش کادمیوم در گیاه قادر به مهار بیوسنتز کلروفیل و تجزیه آن در گونه مورد مطالعه بوده است.

در بررسی اثر کلرید نیکل و سولفات کادمیوم بر وضعیت کلروفیل گیاهان آبزی گونه‌هایی نظیر *Ceratophyllum demersum*، *Lemna trisulca*، *Myriophyllum spicatum* حاکی از آن بود که به دلیل جایگزینی این عناصر سنگین با منیزیم موجود در مرکز حلقه پورفیرینی مقدار کلروفیل کاهش می‌یابد (Kupper *etal*., 1996).

شارما و همکاران(۲۰۰۳) اظهار داشتند کاربرد باکتری سودوموناس در لوبیای در شرایط تنش خشکی میزان کلروفیل a، b و کل را افزایش داد. با توجه به شکل‌های ۱، ۲ و۳ در شرایط شاهد (عدم سمیت کادمیوم) بهترین تیمار از لحاظ محتوای کلروفیل a، b و a+b ، تیمار b_{15} (کاربرد پلیمر نانو سوپر جاذب + کاربرد باکتریهای ازتوباکتر ، آزوسپریلیوم و سودوموناس + کاربرد قارچ میکوریزا + کاربرد هومیک اسید) است، که دارای بالاترین میزان کلروفیل در مقایسه با سایر تیمارها است.

آنزیم سوپراکسید دیسموتاز حمایت کننده‌ی گیاهان در شرایط تنش فلزات سنگین، برای مقابله با گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) تولیدی در شرایط تنش می‌باشد. با توجه به شکل ٤ ، ٥ و ٦ که نشان دهنده‌ی فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و کاتالاز (CAT) و گلوتاتیون پراکسیداز (GPX) است، با افزایش غلظت کادمیوم در خاک میزان فعالیت آنزیم‌های (SOD)، (CAT) و (GPX) نیز افزایش یافت. کادمیوم سبب القاء فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت مذکور در گونه مورد مطالعه بسته به میزان غلظت فلز شده است، به طوری که بیشترین فعالیت این آنزیم نیز در بالاترین سطح سمیت کادمیوم (۸۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک $CdCl_2$) مشاهده شد.

در اثر شرایط تنش، اکسیژن فعال، در گیاه افزایش می‌یابد در این شرایط گیاه مکانیسم‌های متفاوتی را برای حذف و از بین بردن این گونه‌های فعال اکسیژن به کار می‌گیرد، به نظر می‌رسد که فعال شدن آنزیم‌های (SOD)، (CAT) و (GPX) در پاسخ به اثرات مخرب اکسیژن‌های تولید شده از کادمیوم در این گونه گیاهی بوده است. کنترل سطح اکسیژن‌های مخرب توسط این آنزیم‌ها در شرایط ماندگار مکانیزم حفاظتی مهمی در مقابل تنش اکسیدی در سلول می‌باشد زیرا ترکیبات به عنوان پیشگامی برای مشتقات سمی‌تر یا فعال‌تر عمل می‌کنند (Khatun et al., 2008). با توجه به شکل ٤، ٥ و ٦ مشاهده شد که تیمارهای [b_5 (کاربرد پلیمر سوپرجاذب + باکتری‌های محرک رشد) و b_9(کاربرد باکتری‌های محرک رشد + هومیک اسید)] نیز دارای کمترین فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز ، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز نسبت به تیمار شاهد در بالاترین سطح سمیت کادمیوم (۸۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک $CdCl_2$) است. احتمالاً این نتیجه نشان دهنده این مطلب است که باکتری‌ها اثر تنش فلز سنگین را از طریق مکانیسم دفاعی دیگری کاهش می‌دهند، که از بالا رفتن آنزیم SOD جلوگیری کرده است. زیرا فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت تنها مکانیسم دفاعی گیاه در کاهش خسارت های اکسیداتیو نیست و تولید پرولین نیز می‌تواند عامل دیگری در کاهش خسارت‌های اکسیداتیو باشد. عُمَر (۲۰۰۹) نیز کاهش در فعالیت آنزیم SOD را در گیاهچه‌های جو تلقیح شده با باکتری آزوسپیریلوم را گزارش کرد. شکل ۷، ۸ و ۹ که نشان دهنده‌ی ظرفیت بیومارکر تخریبی مالون دی آلدهید (MDA) ، دی تیروزین و دی هیدروکسی گوآنوزین می‌باشد که به ترتیب میزان پراکسیداسیون لیپید ، پروتئین و هسته سلولی در گونه مورد مطالعه را نشان می‌دهد. همانگونه که مشاهده می‌شود پراکسیداسیون لیپید، پروتئین و هسته سلولی تحت سمیت کادمیوم از یک معادله خطی پیروی می‌کند به طوری که با زیاد شدن مقادیر کادمیوم،

www.SID.ir

Archive of SID

ظرفیت مالون دی آلدهید (MDA)، دی تیروزین و دی هیدروکسی‌گوآنوزین نیز افزایش یافته است.

واسطه‌های سمی و مولکولهای ROS طول عمر کوتاهی داشته و اندازه‌گیری مستقیم آنها مشکل است، اندازه‌گیری بیومارکرهای تخریبی که محصولات ناشی از تنش اکسیداتیو روش دیگری برای کنترل تنش اکسیدی می‌باشد. دی تیروزین به عنوان یک ماده نشاندار کننده زیستی برای اکسیداسیون پروتئین به واسطه ROS و مالون دی الدئید (MDA) به عنوان یک ماده نشاندار کننده زیستی برای پراکسیداسیون لیپید، همبستگی نزدیکی با میزان تنش اکسیدی دارند. این دو ماده به منظور کنترل سطح ROS و محافظت از سلولها، دارای چند آنتی اکسیدان با جرم مولکولی کم(مثل آسکوربات ،گلوتاتیون ،ترکیبات فنولی،توکروفرول‌ها) و چند آنزیم جاروب کننده ROS هستند که مجدداً فرم فعال آنتی اکسیدانت را تولید می‌کنند، همچنین آسیب‌هایی که توسط آنها ایجاد شده‌اند را کاهش می‌دهند (Boojar and Goodarzi, 2007). زمانی که دفاع آنتی اکسیدانتی کاهش می‌یابد یا تشکیل رادیکال‌های آزاد افزایش می‌یابد، در این گونه موارد حالتی موسوم به استرس اکسیداتیو پدید می‌آید. استرس اکسیداتیو منجر به آسیب بافتی می‌شود. هنگامی که استرس اکسیداتیو رخ می‌دهد پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع، لیپیدها افزایش می‌یابد و در اثر حمله رادیکال‌های آزاد به لیپیدها، آلدئیدهای گوناگونی از جمله مالون دی آلدئید ایجاد می‌شود. زهانگ و همکاران (۲۰۰۶) گزارش کردند که میزان MDA در شرایط تنش کمبود آب در برگ‌های گیاه سویا افزایش پیدا می‌کند. در شکل‌های ۷، ۸ و ۹ مشاهده می‌شود که تیمارهای [b_5 (کاربرد پلیمر سوپرجاذب + باکتری‌های محرک رشد) و b_9(کاربرد باکتری‌های محرک رشد + هومیک اسید)] نیز دارای کمترین ظرفیت مالون دی‌آلدهید می‌باشند. در تیمارهای حاوی باکتری، میزان بیومارکرهای تخریبی و آنزیم‌های آنتی اکسیدانت کاهش پیدا کردند. احتمالاً این نتیجه نشان دهنده این مطلب است که باکتری‌ها اثر تنش فلز سنگین را از طریق مکانیسم دفاعی دیگری به غیر از آنزیم‌های آنتی اکسیدانت، کاهش می دهند که از بالا رفتن حجم بیومارکرهای تخریبی و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت جلوگیری کرده است. گزارش شده که اسمولیت‌ها مانند پرولین نقش مهمی را در تنظیم اسمزی ایفا می‌کنند و همچنین از طریق جاروب کردن ROSها از سلول‌ها حفاظت می‌کنند (Reddy et al., 2004). به طور کلی بر اساس نتایج این آزمایش تلقیح جداگانه و یا توام باکتری‌های محرک رشد (PGPR) و قارچ میکوریزا می‌تواند سمیت و اثرات مخرب فلزات سنگین را کاهش دهد و همچنین از این طریق می‌توان باعث کاهش تخریب گیاهان در خاکهای آلوده به فلزات سنگین شد که خود می‌تواند یکی از عوامل موفقیت گیاه پالایی باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

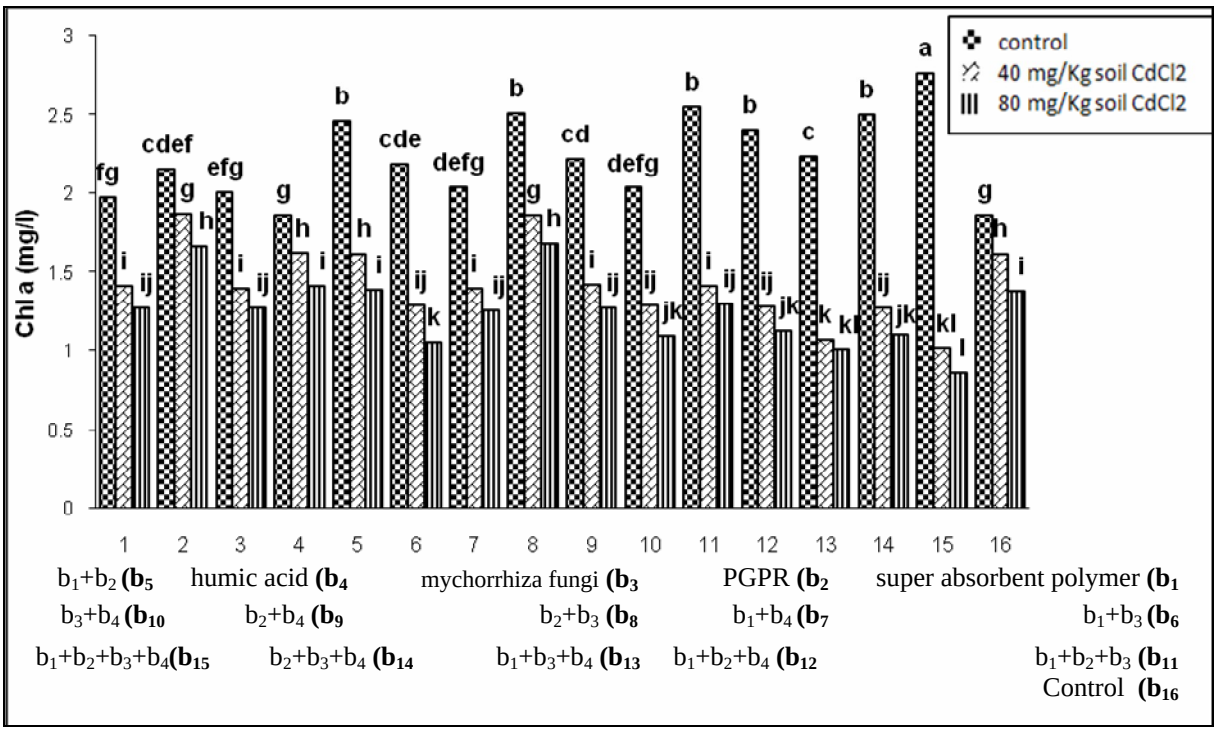
جدول ۱ –تجزیه واریانس صفات اندازه گیری شده (میانگین مربعات)

منابع تغییرات	درجه آزادی	سوپر اکسید دیسموتاز SOD	کاتالاز CAT	گلوتاتیون پراکسیداز GPX	مالون دی آلدئید MDA	دی تیروزین Dityrosin	دی هیدرکسی گوانوزین 8-oH-DG	Chla	Chlb	Chl a+b
سطوح فلز کادمیوم (A)	۲	۱۳۲۸۸۵۸۷.۱۵**	۱۲۲۵۴۴.۹۵**	۹۸۳۱.۶**	۱۲۲۹۳۱.۸۳**	۲۶۴۷۰۵.۰۴**	۳۴۶۹۲.۹۳**	۱۷.۳۶**	۱۸.۱۸**	۷۱.۰۹**
ترکیبات تیماری (پلیمر سوپرجاذب ، باکتری‌های محرک رشد ، قارچ میکوریزا و هیومیک اسید) (B)	۱۵	۳۶۲۷۷۸.۳۲**	۳۶۰۵.۸۶**	۲۴۶.۸۳**	۳۹۹۳.۵۹**	۸۷۷۵.۸۷**	۹۸۷.۹۷**	۰.۲۹**	۰.۳**	۱.۱۸**
اثر متقابل (A×B)	۳۰	۱۹۸۴۴۹.۴۹**	۱۹۳۴.۷۶**	۱۲۸.۱۴**	۲۱۰۵.۹۱**	۵۲۶۱.۵۲**	۵۳۴.۵**	۰.۲۱**	۰.۲۲**	۰.۸۷**
ضریب تغییرات (Coeff Var)		۱۰.۹۲	۹.۲۳	۱۲.۵۳	۹.۵۹	۸.۹۵	۱۰.۷۶	۷.۱۲	۸.۰۹	۶.۱۵

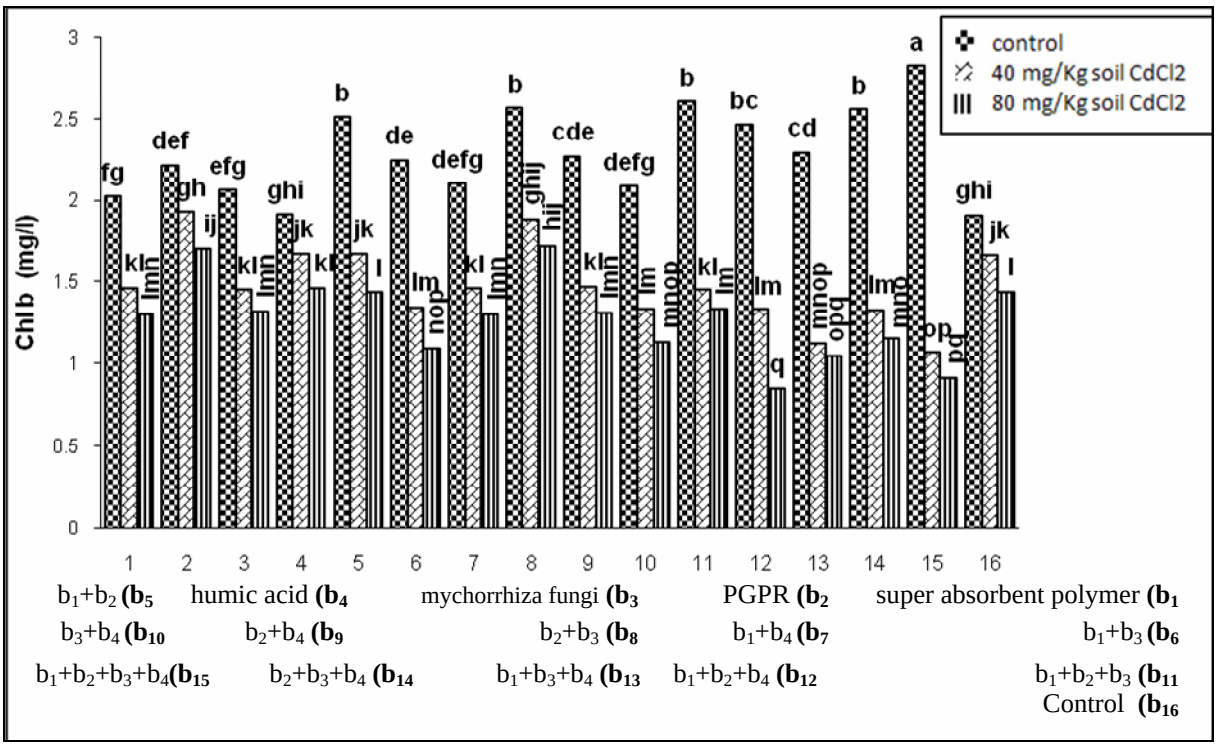
**: در سطح ۰.۰۱ درصد معنی‌دار *: در سطح ۰.۰۵ درصد معنی‌دار n.s : غیر معنی‌دار

www.SID.ir

Archive of SID



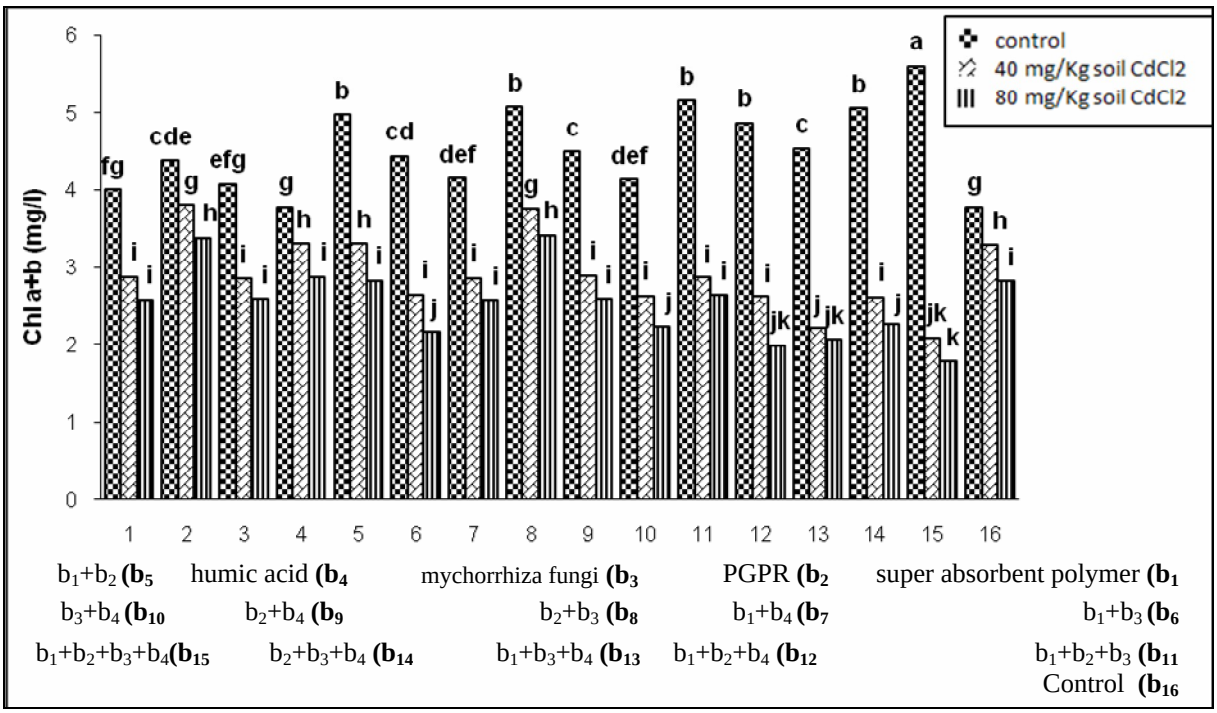
شکل۱- مقایسه میانگین اثرات متقابل سطوح مختلف کادمیوم و کاربرد کاربرد کودهای بیولوژیک، هومیک اسید و پلیمر سوپرجاذب بر محتوای کلروفیلa



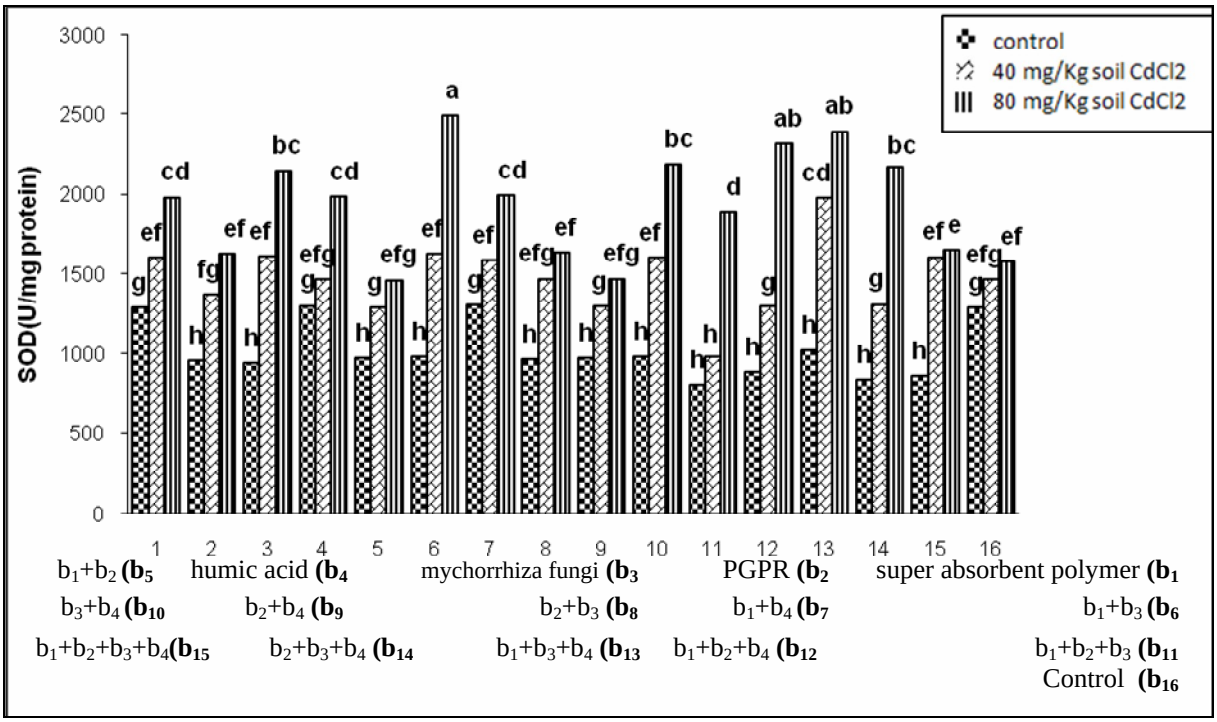
شکل۲- مقایسه میانگین اثرات متقابل سطوح مختلف کادمیوم و کاربرد کاربرد کودهای بیولوژیک، هومیک اسید و پلیمر سوپرجاذب بر محتوای کلروفیل b

www.SID.ir

Archive of SID



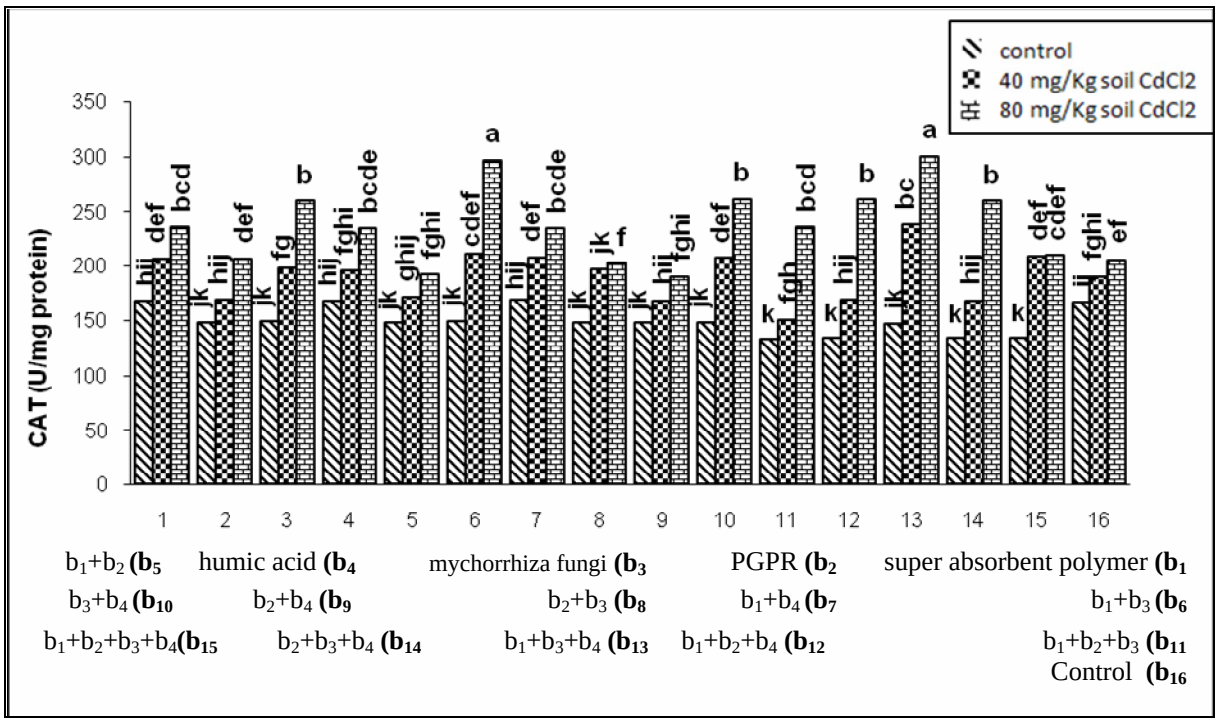
شکل۳- مقایسه میانگین اثرات متقابل سطوح مختلف کادمیوم و کاربرد کاربرد کودهای بیولوژیک، هومیک اسید و پلیمر سوپرجاذب بر محتوای کلروفیل a+b



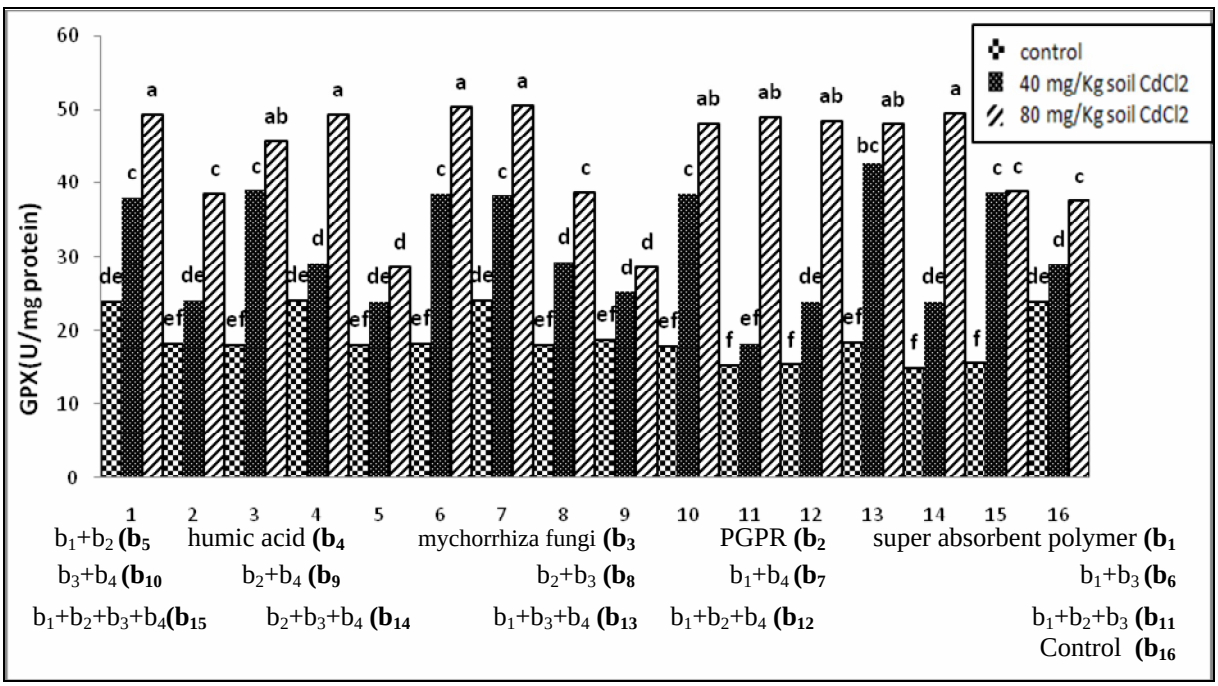
شکل۴- مقایسه میانگین اثرات متقابل سطوح مختلف کادمیوم و کاربرد کاربرد کودهای بیولوژیک، هومیک اسید و پلیمر سوپرجاذب بر فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز

www.SID.ir

Archive of SID



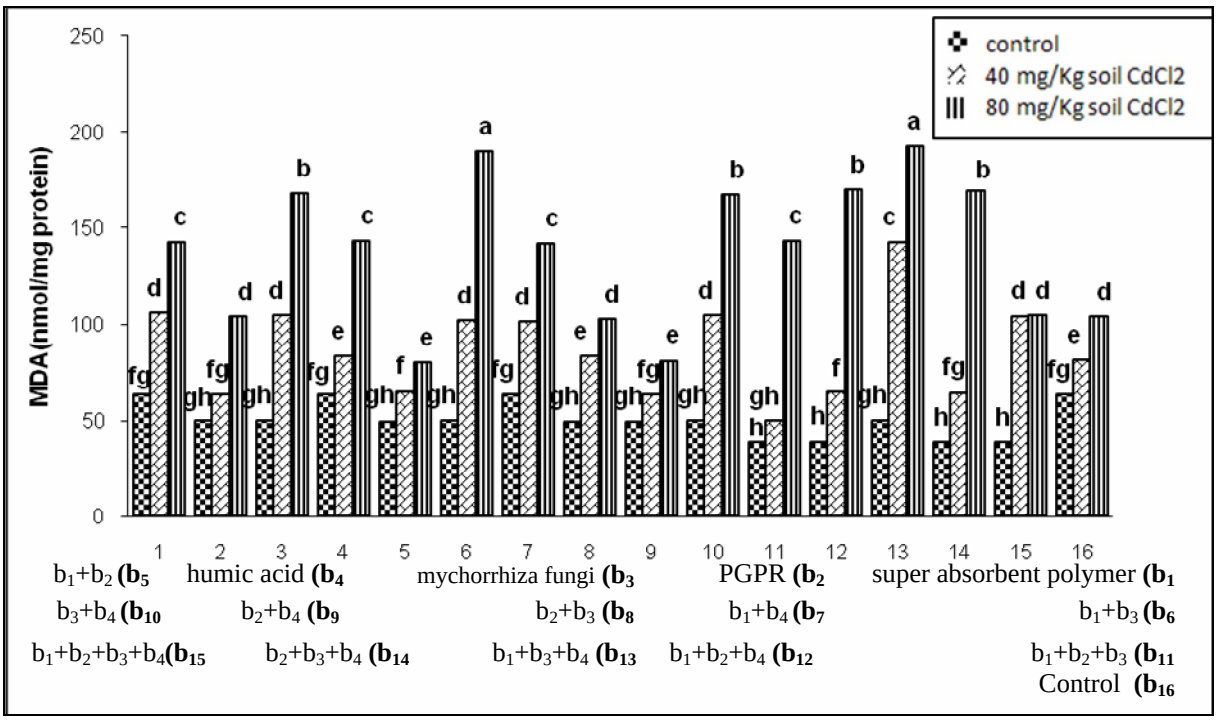
شکل۵- مقایسه میانگین اثرات متقابل سطوح مختلف کادمیوم و کاربرد کاربرد کودهای بیولوژیک، هومیک اسید و پلیمر سوپرجاذب بر فعالیت آنزیم کاتالاز



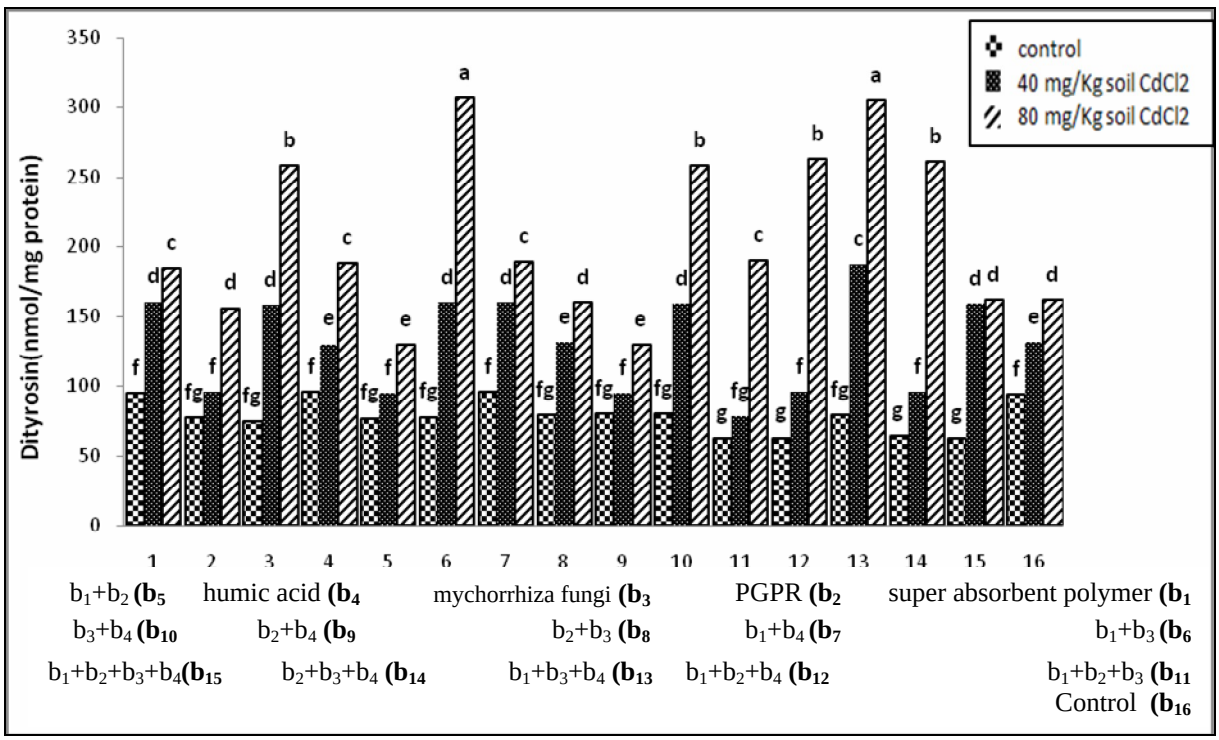
شکل۶- مقایسه میانگین اثرات متقابل سطوح مختلف کادمیوم و کاربرد کاربرد کودهای بیولوژیک، هومیک اسید و پلیمر سوپرجاذب بر فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز

www.SID.ir

Archive of SID



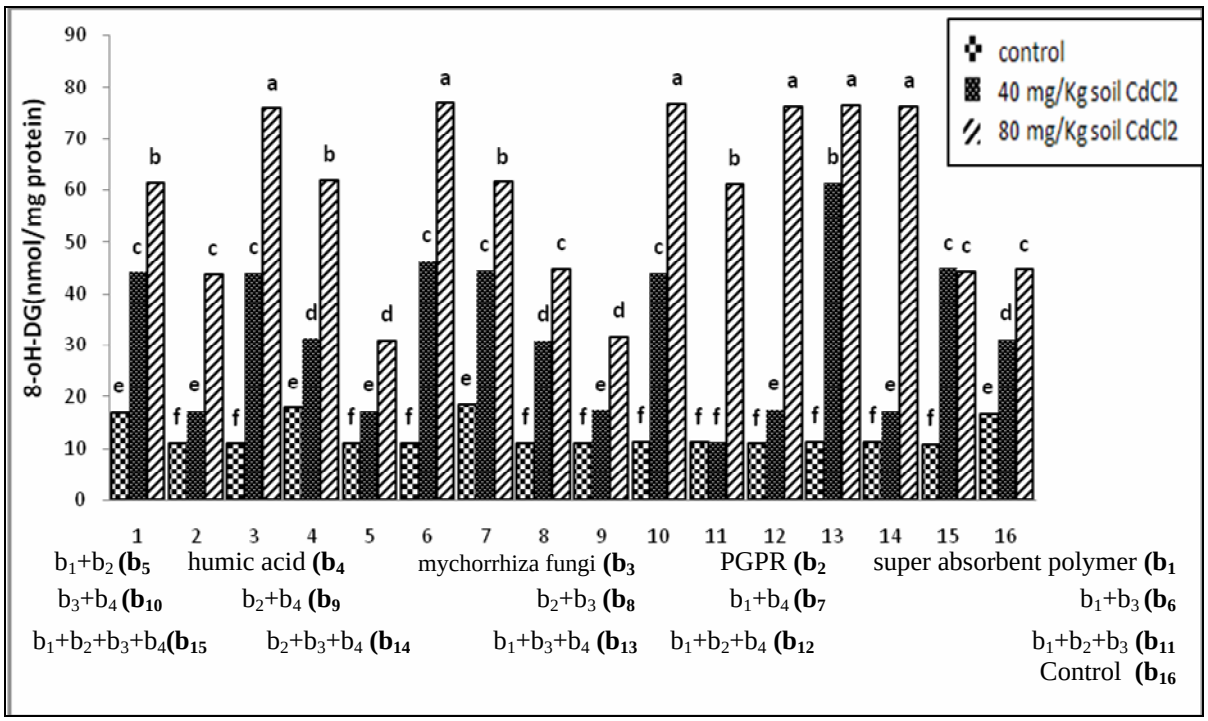
شکل۷- مقایسه میانگین اثرات متقابل سطوح مختلف کادمیوم و کاربرد کودهای بیولوژیک، هومیک اسید و پلیمر سوپرجاذب بر ظرفیت مالون دی آلدهید



شکل۸- مقایسه میانگین اثرات متقابل سطوح مختلف کادمیوم و کاربرد کودهای بیولوژیک، هومیک اسید و پلیمر سوپرجاذب بر ظرفیت دی تیروزین

www.SID.ir

Archive of SID



شکل۹- مقایسه میانگین اثرات متقابل سطوح مختلف کادمیوم و کاربرد کاربرد کودهای بیولوژیک، هومیک اسید و پلیمر سوپرجاذب بر ظرفیت دی هیدروکسی گوآنوزین

فهرست منابع:

1-Adams, J. C., Lockaby, B.G., 1987. Commercial produced superabsorbent material increases water- holding capacity of soil medium. Tree planters Notes. 38(1):24-25.

2-Akhter, J. Mahmood, K. Malik, K.A. Marden, A., Ahmad, M., Iqbal, M. M., 2004. Effects of hydrogel amendment on water storage of sandy loam and loam soils and seedling growth of barley, wheat and chickpea. Plant soil Environment. 50:463-469.

3-Ali, B. M. P. Vajpayee, R. D. Tripathi, U. N. Rai, S. N. Singht, S. P. Singhg .2003 . phytoremediation of lead, nickel and copper by *salix acmophylla boiss* : Role of Antioxidant Enzymes and Antioxidant substances . Bull. Environ. Contam. Toxicol.70 :462-469.

4-Arnon, D. I. 1949. Copper enzyme in isolated chloroplast, polyphenol oxidase in *Beta vulgaris* . Plant physiology, 24 :1-15.

5-Bayer, W. J. Imlay and I. Fridovich . 1991. Superoxide dismutase. Prog. Nucl. Acid Res. 40:221-253.

6-Benavides, M.P. Gallego, S.M. and M. L. Tomaro., 2005. Cadmium toxicity in plants Braz., J. plant physiol., 17(1):21-34.

7-Bogdanov, M. B., M. F. Beal, D. R. Mccabe, R. M. Griffin and W.R. Matson. 1999. A carbon column based LCEC approach to routine 8-hydroxy-2-deoxyguanosine measurements in urine and other biological matrices. Free Rad Biol. Med. 27: 647-666.

8-Davey, M.W. E. Stals, B. Panis, J. Keulemans,R. L. Swennen. 2005. High Throughput determination of malondialdehyde in plant tissues .Analytical Biochemistry 347 :201-207.

9-Gaetke, L. M., C. K. Chow. 2003. Copper toxicity oxidative stress and antioxidant nutrients. Toxicology, 189: 197-163.

www.SID.ir

Archive of SID

10-Gardea–Torresdey, J. L., J. R. Peraha–Videa, G. D. L. Rosa, J. G. Parsons. 2005. Phytoremediation of heavy metals and study of the metal coordination by x-ray absorption spectroscopy. Coordination Chemistry Reviews, 24, 1979- 1810.
11-Garnczarska, M., L .Ratajczak .2000.Metabolic responses of lemna minor to lead ions,II . Induction of antioxidant enzymes in roorts. Acta Physiologiae Plantarum, 22: 249-432.
12-Groppa, M.D., M.L. Tomaro., M.P. Benarides. 2007. Polyamines and heavy metal stress: the antioxidant behavior of spermine in cadmium and copper treated wheat leaves. Biometals, 20:185-195.
13-Jaleel, C. A., P. Manivannan, A. Wahid, M. Farooq, H. J. Al-Juburi, R. Somasundarm and R. Panneersel Vam. 2009. Drought stress in plants: A review on morphological characterisistics and pigments composition. International Journal of Agriculture & Biology. 11(1): 100-105.
14-Khatun, S., M. Babar Ali, E.J. Hahn, K.Y. Paek. 2008. Copper toxicity in withania somnifera: Growth and antioxidant enzymes response of in vitro grown plants. Environmental and Experimental Botany, 64: 279-285.
15-Kiatkamjornwong, S., 2007. Superabsorbent polymers and superabsorbent polymer composites. Science Asia. 33:39-43.
16-Kupper, H. Kiipper, F. and Spiller, M. 1996. Environmental relevance of heavy metal-substituted chlorophylls using the example of water plants. Journal of Experimantal Botany, 47:259-266.
17-Huttermann, A., Zommorodi, M., Reise, K., 1999. Addition of hydrogels to soil for prolonging the survival of *pinus halpensis* seedlings subjected to drought. Soil & Tillage Research. 50:295-304.
18-Lowry, O., A. Rosebrough and R. Randall. 1951. Protein measurment with folin phenol reagent. Journal, Biological Chemistry. 193, 680-685.
19-Luis, A. Del Rio, Dianas. Lyon, Imreolah, Bruce Glick and Marvinl. Salin, 1983. Immunocytochemical evidence for a peroxisomal localization of manganese superoxide dismutase in leaf protoplasts from a higher plant. Planta, 158:216-224.
20-Mashhadi Akbar boojar, M., F. Goodarzi. 2007. The copper tolerance strategies and the role of antioxidative enzymes in three plant species grown on copper mine. Chemosphere, 67, 2138-2147.
21-Misra, H. P. and I. Fridovich. 1972. The generation of superoxide radical during auto oxidation. J. Biol. Chem. 247:6960-6966.
22-Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends in Plant Sci. 9:405-410.
- Navari-Izzo, F., Quartacci, M. F., Pinzino, O., Dalla Vecchia, F., Sgherii C. L. M., 1998. Thilakoid- bound and stromal antioxdative enzymes in wheat treated with exess copper. Plant physiology. 104:630 – 638.
23-Omar, M. N. A., M. E. H. Osman, W. A. Kasim and L.A. Abd El-Daim. 2009. Improvement of salt tolerance mechanisms of barley cultivated under salt stress using *Azospirillum brasilense*. pp: 133.
24-Orzeszyna, H., Garlikowski, D., Pawlowski, A., 2006. Using of geocomposite with superabsorbent synetic polymers as water retention element in vegetative laters. Institute of Agrophysics, Polish Academy of Sciences. 20:201-206.
25-Paglia, D. E. and W. N. Valentine. 1987. Studies on the quantitative and qualitative characterization of glutathion proxidase. J. Lab. Med. 70 : 158-165.
26-Pawlowski, A., Lejcus, K., Garlikowski, D., Orezesyna, H.,2009. Geocomposite with superabsorbent as an element improving water availability for plants on slopes. Geophysical Research Abstracts. 11:1-2.

www.SID.ir

Archive of SID

27-Peralta, J. R., J. L. Gardea–Torresdey, K. J. Tiemann, E. Gomez, S. Arteaga, E. Rascon, J. G. Parsons. 2001. Uptake and effects of five heavy metals on seed Germination and plant Growth in Alfalfa (medicago sativa L.). Environmental, contamination, and Toxicology, 66: 727-734.

28-Reddy, A. R., K. V. Chaitanya and M. Vivekanandan. 2004. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. Journal of Plant Physiology. 161: 1189-1202.

29-Sanita di Toppi, L. and R. Gabbrielli., 1999. Response to Cadmium in higher plants. Environ. EXP. Bot41:105-130.

30-Scandialos JC. 1993. Oxygen stress and superoxide dismutase. Plant Physiol. 101:7-12.

31-Sharma, A., B. n. Johri, A. K. Sharma and B. R. Glick. 2003. Plant growth promoting bacterium *Pseudomonos* sp. Strain GRP3 influences iron acquisition in mungbean. Soil Biol. 35: 887-894.

32-Sharma, S.S., S. kaul, A. metwally, K.C. Goyal, I. Finkemeier, K.J. Dietz. 2004. Cadmium toxicity in barley (*Hordeum vulgar*) as affected by varying Fe nutritional status. Plant Science. 166:1287-1295.

33-Sharma P. and R.S. Dubey. 2005. Lead Toxicity in plants. Plant physiol. 17:35-52.

34-Shaw, B.P., S.K. Sahu, and R.K. Mishra. 2004. Heavy metal induced oxidative damage in terrestrial plants. In: M.N.V. Prasad. Heavy metal in plants. 2th edition. Narosa publishing house. India. Pp. 85-125.

35-Sladky, Z. 1959. The application of extracted humus substances to over ground parts of plants . Biol. Plant. 1:199-204.

36-Sladky, Z. and V. Tichy.1959. application of extracted humus substances to over ground parts of plants . Biol. Plant.1:9-15.

37-Steven, H. and M. H. Sidney. 1987. Lipid peroxidase in samples as measured by liquid chromatography. Separeathion or malondialdehyde tiobarbituric acid. Elin. Chem. 32: 214-220.

38-Sudhakar, C., L. Syamalabai, and K. Veeranjaneyulu. 1992. Lead tolerance of certain legume species grown on lead ore tailings. Agriculture, ecosystems and environment, 41, 253-261.

39-Zhang, M., L. Duan, X. Tian, Z. He, J. Li, B. Wang and Z. Li. 2006. Uniconazole-induced tolerance of soybean to water deficit stress in relation to changes in photosynthesis, hormones and antioxidant system. Journal of Plant Physiology. 164: 709-717.

40-Zohuriaan-Mehr, M. J., Kabiri, K., 2008. Superabsorbent polymer materials: a review. Iranian Polymer Journal. 17(6):451-477.

www.SID.ir