Archive of SID

تأثیرات غلظتهای سمی کادمیوم بر میزان گره زایی و تثبیت ازت سوشهای مختلف باکتری سینوریزوبیوم ملیلوتی(وحشی و دارای پلازمید) در گیاه یونجه (*Medicago sativa*)

محمد حافظی[۱،۲،*]، عبدالحمید نمکی شوشتری[۱]، زهرا اسرار[۱] و مسعود ترکزاده[۲]

[۱] کرمان، دانشگاه شهید باهنر، دانشکده علوم، بخش زیست شناسی

[۲] کرمان، مرکز بین المللی علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی

تاریخ دریافت: ۸۵/۱۱/۲۱ تاریخ پذیرش: ۸۸/۱/۱۸

چکیده

کادمیوم فلزی سنگین با سمیت بالا برای موجودات زنده است که به طور عمده به واسطه فعالیتهای صنعتی و استفاده از کودهای شیمیایی در خاک انباشته می‌شود. به منظور بررسی تأثیر این عنصر بر فرآیند تثبیت زیستی ازت و یافتن سوشهای باکتریایی مقاوم تر، تأثیر این عنصر بر رشد، گره‌زایی و فعالیت همزیستی چهار سویه متفاوت از باکتری سینوریزوبیوم ملیلوتی مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور، این سوشها در محیط مایع TY با غلظتهای مختلف کلرید کادمیم کشت داده شده و میزان رشد سوشها به روش کدورت سنجی اندازه‌گیری شد. سپس تأثیر کادمیوم بر همزیستی گیاه و باکتری، با کاشت بذر های یونجه (رقم بمی) در شرایط استریل در گلدانهای محتوی پرلیت بررسی شد. گیاهان در مرحله سه برگی، با باکتریهای فوق تلقیح شدند و این گلدانها به مدت دو ماه در اتاق رشد با شرایط ١٦ ساعت نور و دامنه دمایی ٢٢- ١٨ درجه سانتی گراد نگهداری شده و با محلول FP (فاقد ازت) دارای غلظتهای مختلف کلرید کادمیوم تیمار شدند. پس از این مدت تعداد و وزن تر گرهکها ، طول ریشه و وزن خشک ریشه و گیاه کامل، محتوای پروتئین ریشه و بخش هوایی، میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی و میزان فعالیت نیتروژنازی گرهکها، اندازه گیری شد. ، نتایج آزمایشات فوق نشان داد که میزان رشد، فعالیت گره‌زایی و تثبیت ازت در گرهکهای گیاهان تلقیح شده با تمام سوشها با بالا رفتن غلظت کادمیوم کاهش می‌یابد، اما میزان این کاهش در سوشهای متفاوت اختلاف معنی داری دارد؛ به طوری که سوش*Sm nif* K⁻(pSRK9) بیشترین حساسیت به کادمیوم را داراست. باکتریهای *Sm* WT، *Sm nif* H⁻(pSRK9) و *Sm*WT(pSRK9) دارای رشد بیشتری در حضور کادمیوم در مقایسه با سوش *Sm nif* K⁻(pSRK9) هستند. سوش باکتریایی *Sm* WT(pSRK9) دارای توانایی رشد، همراه با قدرت گره‌زایی و تثبیت ازت بالاتری در حضور کادمیوم است. گیاهانی که توانایی بیشتری برای تثبیت بیولوژیک ازت داشته باشند، توانایی بالاتری برای سنتز ترکیبات حفاظتی دارند؛ حفظ سیستم فتوسنتزی گیاه در برابر استرس اکسیداتیو ناشی از تنش کادمیم را می‌توان یکی از مهمترین دلایل رشد بهتر گیاهانی دانست که سیستم تثبیت ازت فعالتری در مقایسه با سایر گیاهان دارند.

واژه های کلیدی: سینوریزوبیوم ملیلوتی، کادمیوم، گره زایی، یونجه

[*] نویسنده مسئول، تلفن تماس: ۰۹۱۳۱۸٤٦٦٤۸، پست الکترونیک: m_hafez_fara@yahoo.com

مقدمه

فلزات سنگین گروهی از فلزات با چگالی بالاتر از ۵g/cm^3 نظیر کادمیم (Cd)، کرم (Cr)، جیوه (Hg)، سرب (Pb)، آلومنیوم(Al)، روی (Zn) و ... هستند. این عناصر را از مهمترین آلاینده های زیست محیطی می‌دانند. غلظت این عناصر درخاک بسته به منشاء مواد تشکیل دهنده خاک و فعالیتهای صنعتی انسان تغییر می کند (٦). افزایش غلظت برخی از فلزات سنگین نظیر کادمیوم، کرم، مس، نیکل و روی در خاک تعادل اکوسیستمها را تحت تأثیر قرار می

www.SID.ir

Archive of SID

دهد. هر چند میزان سمی این عناصر در خاک به ندرت مشاهده می شود، اما فعالیتهای کشاورزی و صنعتی انسان نظیر استخراج معادن، فاضلابهای صنعتی واستفاده از کودهای فسفاته (دارای ناخالصی کادمیوم) منجر به افزایش روز افزون این عناصر در خاک می شوند (۲ و ۲۲). تأثیر این فلزات بر فرآیندهای فیزیولوژیک گیاهان قابل توجه است. این عناصر دارای تحرک نسبتاً بالا و سمیت در غلظتهای نسبتاً پایین هستند. با جذب اضافی این عناصر توسط گیاهان، فرآیند های فیزیولوژیک نظیر تنفس، فتوسنتز، رشد سلولی وتعادل آبی گیاه، متابولیسم ازت و تغذیه معدنی گیاه تحت تأثیر قرار می گیرند که نتیجه آن کاهش رشد و ماده زنده گیاه است (۲ و ۸). توانایی تشکیل گرهک و تثبیت زیستی ازت تحت تنشهای مختلف محیطی نظیر گرما، خشکی، شوری و فلزات سنگین کاهش می یابد(٤، ۷ و ۱۱). تأثیر کادمیوم بر فعالیت مریستمهای رویشی گیاهان (۲)، میزان فتوسنتز و فعالیت آنزیمهای مؤثر در تثبیت ازت (۱۵)، و نیز حساسیت رشد و بقای باکتریهای ریزوبیوم به سمیت کادمیوم گزارش شده است(۱٦، ۱۸ و۲۲). نشان داده شده که تأثیر کادمیوم بر گره زایی بیش از آنکه به خاطر تأثیر بر رشد و بقای ریزوبیومها باشد به دلیل مهار رشد و فعالیت متابولیکی اندامهای گیاهی و در نتیجه مهار بروز همزیستی است (۱۳) یونجه یکی از گیاهان علوفه ای است که بیشترین سطح زیر کشت علوفه را در ایران به خود اختصاص داده است. این گیاه در فرآیند همزیستی با باکتری سینوریزوبیوم ملیلوتی (*Sinorhizobium melliloti*) توانایی تشکیل گرهکهای تثبیت کننده ازت را داشته و پتانسیل تثبیت ازت این همزیستی را تا ۲۰۰ کیلوگرم در هکتار دانسته اند(۳). تأثیر استرس کادمیم بر رشد و متابولیسم گیاه یونجه در تحقیقات بسیاری مورد مطالعه قرار گرفته و گزارش شده که کادمیم با تأثیر بر سیستم آنزیمی، ساختارهای غشایی و متابولیسم گیاه، نهایتاً باعث کاهش بیومس تولیدی، کاهش طول ساقه و ریشه و نهایتاً متوقف شدن کامل رشد این گیاه می‌شود (۱٤،۱۳). گزارش شده است که این گیاه توانایی بالایی در جذب و نگهداری فلزات سنگین در غلظتهای مختلف داشته و استفاده از این گیاه به منظور جذب زیستی (Biofiltration) و تصفیه زیستی (Phytoextraction) خاکها از آلودگی کادمیم نیز مورد مطالعه قرار گرفته است (۹). بنابراین یافتن سوشهای باکتریایی خاصی که در چنین مناطقی بتوانند منجر به گره زایی و رشد بهتر این گیاه شوند مفید خواهد بود. در این طرح سعی شد تأثیر کادمیوم بر رشد، گره زایی و تثبیت ازت گیاه یونجه و نیز میزان رشد و گره زایی سوشهای مختلف باکتری *Sinorhizobium melliloti* در حضور کادمیوم مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روشها

آماده سازی باکتریها: باکتری *Agrobacterium tumefaciens* متعلق به خانواده ریزوبیاسه است که وجود سیستم تثبیت ازت در آن گزارش شده است(۳). سیستم تثبیت ازت این باکتری در پلازمید pSRK9 توسط شوشتری به سوش وحشی و موتانتهای *Sinorhizobium melliloti* منتقل شده است (۱۷). این سوشها شامل یک سوش وحشی(*S.m* WT)، یک سوش وحشی دارای پلازمید(*S.m* WTpSRK9) و دو سوش دارای پلازمید جهش یافته در ژنهای ساختمانی آنزیم نیتروژناز سینوریزوبیوم، (*nif* H & *nif*K)، یعنی سوشهای ($nifK^-$)(*S.m* pSRK9) و *S.m* $nifH^-$ (pSRK9) بود. باکتریهای جهش یافته فوق در صورتی که فاقد پلازمید باشند، (*S.m* $nifH^-$ و *S.m* $nifK^-$) فاقد توانایی ایجاد گره فعال و تثبیت ازت می باشند (۳ و۱۷). به منظور آماده سازی سوشهای مختلف باکتریایی، این سوشها از محیط خزانه (stab) خارج گردیده و بر روی محیط کشت جامد TY (شامل باکتو تریپتون، باکتواکستراکت، کلرید کلسیم و آگار) که محتوی آنتی بیوتیک تتراسایکیلین (۱۰μg/ml) برای انتخاب سوشهای محتوی پلازمید بود، کشت داده شده و برای

www.SID.ir

Archive of SID

رشد کافی، به مدت تقریبی ۷۲ ساعت در انکوباتور ۲۸ درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

اندازه گیری میزان رشد سوشهای مختلف در حضور کادمیوم: بدین منظور، محیط کشت مایع (فاقد آگار) میکروبی TY با غلظتهای مختلف: µM ۱۰۰۰و۵۰۰ ، **۲۰۰، ۱۰۰، ۰** کلرید کادمیوم با سه تکرار تهیه شده و باکتریها از محیط جامد به این محیط ها منتقل گردید. سپس به مدت تقریبی ٦۰ ساعت در انکوباتور چرخان با دور گردش rpm ۲۰۰ و دمای ۲۸ درجه سانتی گراد نگهداری شده و پس از گذشت این مدت OD (کدورت محیط کشت) هر یک از نمونه ها **در** طول موج nm ٦۰۰ خوانده شد (۳).

آماده سازی محیط کشت گلدانی: برای مطالعه بهتر تأثیر کادمیوم از پرلیت به عنوان بستر رشد بذرهای یونجه استفاده گردید (۱۲). پرلیتها پس از شستشو و آبگیری کامل، در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد و فشار ۱۵ پاسکال به مدت ۲۰ دقیقه استریل شده و به گلدانهایی با حجم تقریبی ٤۰۰ml که به وسیله متانول ضد عفونی شده بودند منتقل شدند.

آماده سازی، کاشت بذر و آبیاری گلدانها: بذرهای یکسان یونجه (رقم بمی) از مرکز تحقیقات بذر و نهال کرج تهیه گردید. برای استریل شدن، ابتدا به مدت ۲ دقیقه در اتانول ۹۰ درصد و سپس به مدت تقریبی ۲۰ دقیقه در هیپو کلریت سدیم ۱۰ درصد قرار گرفتند و پس از چندین مرتبه شستشو با آب مقطر استریل، حدود ۱۰ بذر به هر گلدان منتقل گردید. گلدانها در اتاق رشدی با شرایط ۱٦/۸ ساعت شب/روز، دمای ۲۲/۱۸ درجه سانتی گراد شب/روز و شدت نور ۱٤۰۰۰ لوکس (با لامپهای سدیم هالید) نگهداری شدند. تا زمان رسیدن به مرحله سه برگی گیاهان به صورت روزانه با آب مقطر استریل و به صورت هفتگی با محلول غذایی Fåhraeus Plant (FP) (فاقد ازت) شامل مواد زیر آبیاری شدند:(۳)

$CaCl_2$ (360mM), $MgSO_4$ (330mM), KH_2PO_4 (220mM), Na_2HPO_4 (310mM), Fe-Citrate (7mM) H_2BO_3 (40mM), $CuSO_4$ (0.5mM), $MnSO_4$ (13mM), $ZnSO_4$ (1mM), & NaMoO4 (4mM)

تلقیح باکتریها در محیط اطراف ریشه گیاهان: در زمانی که گیاهان به مرحله سه برگی رسیدند، ابتدا محیط کشت مایع TY با شرح فوق تهیه و باکتریها از محیطهای جامد به درون لوله ها منتقل شدند، (یک کلنی به ازای هر ml ۵ محیط مایع) و این محیطها به مدت تقریبی ۷۲ ساعت درون انکوباتور چرخان با دمای ۲۸ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. پس از این مدت محتوی لوله ها سانتریفوژ شده، محیط TY رویی دور ریخته شد، و هم حجم آن محیط FP استریل اضافه گردید. در زمان تلقیح ۵ گیاه در هر گلدان نگهداشته شده و بقیه بیرون کشیده شدند. سپس از محیط محتوی باکتری فوق ml ۱ بازای هر گیاه، کنار ریشه گیاه تزریق گردید (۳).

تیمار گیاهان با کلرید کادمیوم: سه روز پس از تزریق باکتریها به گلدانها، محلول کلرید کادمیوم با غلظتهای: µM ۲۰۰و۱۰۰،۵۰، ۰،۲۵ تهیه شده و به محیط FP اضافه گردید، گلدانها به ازای دو روز محلول دهی (هر گلدان ۲۵ml در روز) یک روز توسط آب مقطر شستشو داده شدند. تمامی محلولها قبل از استفاده اتوکلاو شدند.

سنجش پارامترها:هشت هفته پس از نگهداری گلدانها در شرایط فوق، گیاهان از گلدانها خارج شده و پارامتر های زیر اندازه گیری شدند:

اندازه گیری پارامترهای مورفولوژیک: پس از خارج کردن گیاهان از گلدانها، طول ریشه، وزن خشک گیاه کامل و ریشه، تعداد گرهکها و میانگین وزن گرهکها در هر تیمار مورد سنجش قرار گرفتند.

اندازه گیری پارا مترهای بیوشیمیایی: میزان پروتئین کل ریشه و بخش هوایی به روش برادفورد(۵)، و میزان رنگیزه

www.SID.ir

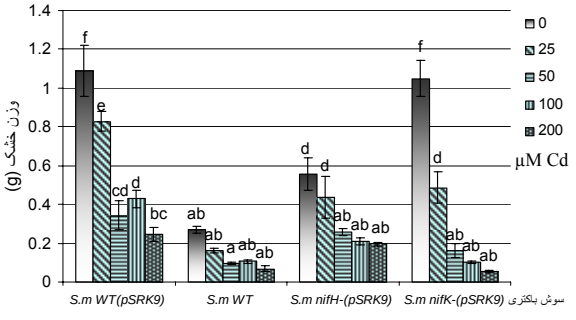
Archive of SID

های فتوسنتزی به روش Lichtenthaler (۱) اندازه گیری شد. سپس بر اساس منحنیهای استاندارد میزان این ترکیبات بر اساس میلی گرم بر گرم وزن تر گزارش گردید. در تمام سنجشهای فوق از دستگاه اسپکتروفتومتر مدل WPA UV-Visible استفاده گردید.

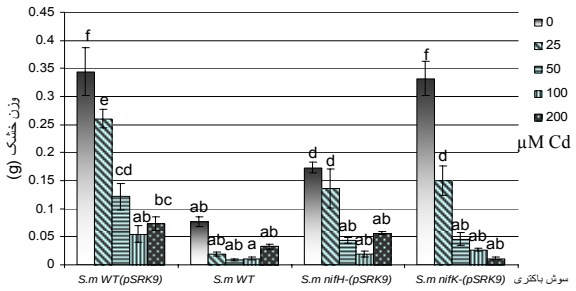
اندازه گیری میزان فعالیت آنزیم نیتروژناز گرهکها (تست احیای استیلن): فعالیت آنزیم نیتروژناز گرهکها، بر اساس میزان تبدیل استیلن به اتیلن اندازه گیری می شود. بدین منظور از هر گروه تیماری، سه گیاه انتخاب گردیده، و درون شیشه های ml ۳۰۰ درپوش دار قرار داده شد.۱۰ درصد از هوای درون هر شیشه به وسیله سرنگ خارج شده و هم حجم آن گاز استیلن تزریق گردید، شیشه ها به مدت ۹۰ دقیقه در شرایط آزمایشگاه نگهداری شده و سپس ml ۱ از هوای درون هر نمونه به دستگاه کروماتوگرافی گازی(GC) مدلAgilent 115-34h ، در دمای کوره ۹۰ درجه سانتی گراد، دمای آشکار ساز ۲۵۰ درجه سانتی گراد و دمای محفظه تزریق ۲۰۰ درجه سانتی گراد تزریق شده و با استفاده از ستون اختصاصی اتیلن-استیلن:GSQ 115-34h2 پیکهای بازیابی اتیلن خالص، در شرایط مذکور در زمان ۱/۹ ثانیه به دست آمد. بر اساس سطح زیر منحنی پیکهای به دست آمده، میزان اتیلن ناشی از احیای استیلن در هر گروه، براساس منحنیهای استاندارد محاسبه گردید(٤ و ۱۷). داده های فوق در قالب یک طرح عاملی با بلوکهای کامل تصادفی، به وسیله نرم افزار آماری SPSS با آزمون LSD و دانکن مورد تحلیل آماری قرار گرفتند.

نتایج

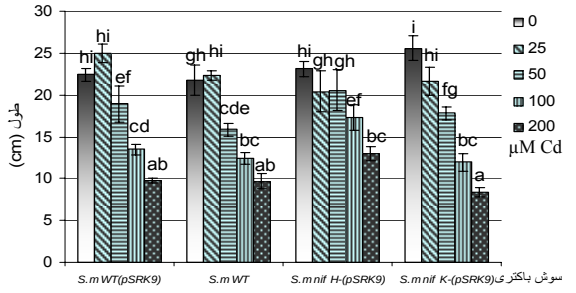
تغییرات وزن خشک ریشه و گیاه کامل و طول ریشه: مقایسه میانگینهای وزن خشک گیاه کامل و وزن خشک ریشه گیاهان، نشان دهنده کاهش معنی دار این شاخصها با افزایش غلظت کادمیوم بود. این کاهش در مورد گیاهان تلقیح شده با سوشهای مختلف، متفاوت بود. گیاهان تلقیح شده با سوش *nif*K$^-$(pSRK9) بیشترین کاهش وزن را نشان دادند(شکلهای ۱ و ۲). طول ریشه های تحت استرس کادمیوم در تمام سوشها کاهش معنی داری یافت اما گیاهان تلقیح شده با سوش *nif*H$^-$(pSRK9) کاهش کمتری نسبت به سایر گیاهان متحمل شدند(شکل ۳).



شکل ۱ – تأثیر سوش باکتریایی و کادمیوم بر وزن خشک گیاه کامل



شکل ۲ – تأثیر سوش باکتریایی و کادمیوم بر وزن خشک ریشه گیاهان تحت تیمار



شکل ۳– تأثیر سوش باکتریایی و کادمیوم بر طول ریشه گیاهان مقایسه میانگینها با آزمون دانکن انجام گرفته و حروف غیر مشترک تفاوت معنی دار در سطح ۰/۰۵ را نشان می دهد.

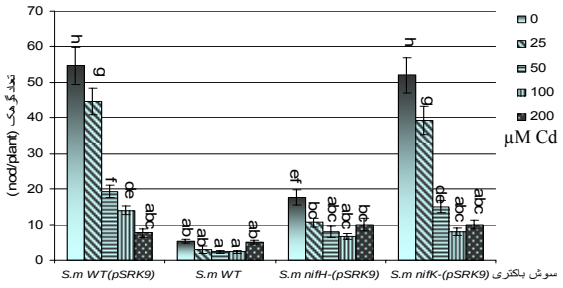
شمارش تعداد گرهکها و میانگین وزن تر آنها: مقایسه آماری تعداد گرهکهای هر سوش در هر تیمار نیز نشان دهنده کاهش وابسته به سوش و معنی دار تعداد گرهکها با افزایش غلظت کادمیوم است(شکل ٤). مقایسه میانگین وزن تر گرهکها نیز کاهش وزن گرهکهای تیمار شده با

www.SID.ir

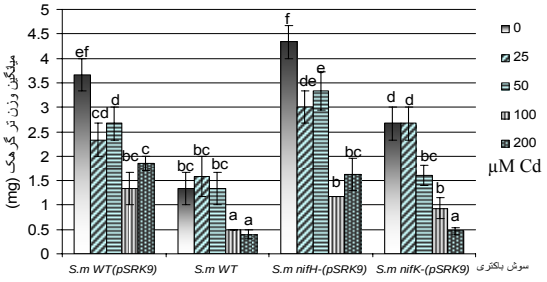
Archive of SID

کادمیوم در مقایسه با گروههای شاهد را نشان داد اما میزان حساسیت سوشها متفاوت بود. اختلاف سوشهای WT(pSRK9) و (*nif*H⁻(pSRK9 در این شاخص معنی دار نبود (شکل ۵).

میزان فعالیت آنزیم نیتروژناز: اندازه گیری میزان فعالیت آنزیم نیتروژناز در هر گروه تیماری، نشان داد که با افزایش غلظت کادمیوم فعالیت این آنزیم به شکل معنی داری کاهش می یابد. سوشهای WT(pSRK9) و (*nif*K⁻ pSRK9) در غلظت ۲۵µM کادمیوم کاهش بیشتری نسبت به سوش(*nif*H⁻(pSRK9 دارند. و سوش WT در این غلظت افزایش فعالیت این آنزیم را نشان داد. غلظتهای بالاتر کادمیوم منجر به مهار فعالیت آنزیم در تمام سوشها گردید(شکل ٦).

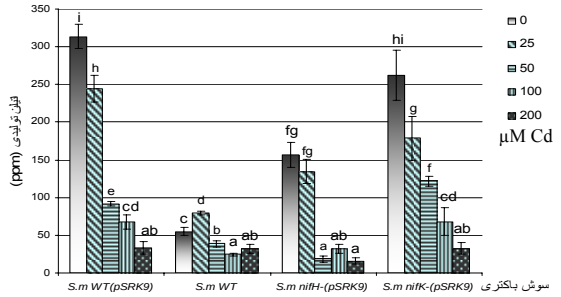


شکل ٤ – تأثیر سوش باکتریایی و کادمیوم بر میزان گره زایی



شکل ۵ – تأثیر سوش باکتریایی و کادمیوم بر میانگین وزن گرهکها

میزان پروتئین کل ریشه و بخش هوایی: مقایسه میزان پروتئین کل ریشه در تیمارهای مختلف، افزایش معنی دار این شاخص را در ریشه های تحت تنش در غلظتهای ابتدایی نشان می دهد. این افزایش در سوش WT(pSRK9 تا غلظت ۱۰۰ µM و برای سوشهایWT و *nif*K⁻ (pSRK9) تا غلظت ۵۰ µM کلرید کادمیوم مشاهده شد.



شکل ٦ – تأثیر سوش باکتریایی و کادمیوم بر فعالیت نیتروژنازی گرهکها درگیاهان تحت تیمار. مقایسه میانگینها با آزمون دانکن انجام گرفته و حروف غیر مشترک تفاوت معنی دار در سطح ۰/۰۵ را نشان می دهد.

افزایش میزان پروتئین در ریشه گیاهان تلقیح شده با سوش *nif*H⁻(pSRK9) مشاهده نشد. غلظتهای بالاتر کادمیوم موجب کاهش میزان پروتئین ریشه در تمام سوشها شد (شکل۷). اما میزان پروتئین کل بخش هوایی در تمام تیمارها در حضور کادمیوم کاهش یافت. در این مورد گیاهان تلقیح شده با سوش (WT(pSRK9 نسبت به سایر سوشها، بیشترین تولید پروتئین بخش هوایی را در حضور کادمیوم از خود نشان دادند (شکل ۸).

میزان رنگیزه های فتوسنتزی: بررسی تغییرات کلروفیل کل و کاروتنوئیدها در حضور غلظتهای مختلف کادمیوم نشان دهنده کاهش میزان این رنگیزه ها با افزایش غلظت کادمیوم در گیاهان تلقیح شده با تمام سوشها بود. تنها تغییرات کاروتنوئیدها در سوش WT معنی دار نبود (شکلهای ۹ و ۱۰).

میزان رشد باکتریها در حضور کادمیوم: بررسی تغییرات ناشی از تأثیر کادمیوم بر رشد سوشهای مختلف ریزوبیوم نشان داد که رشد تمام این سوشها تحت تأثیر کادمیوم کاهش می یابد. سوش(*nif*K⁻(pSRK9 نسبت به سایرین حساسیت بیشتری به کادمیوم نشان می دهد(شکل ۱۱).

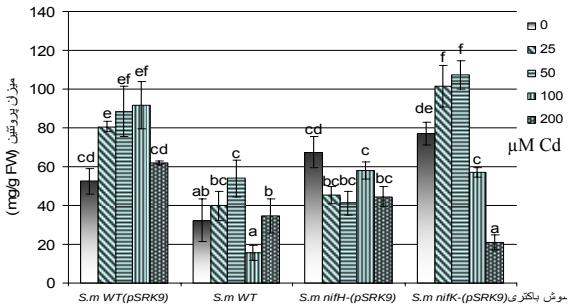
بحث و نتیجه گیری

تأثیر کادمیوم بر رشد و گره زایی باکتریها: اندازه گیری رشد باکتریها در غلظتهای مختلف کادمیوم نشان داد که

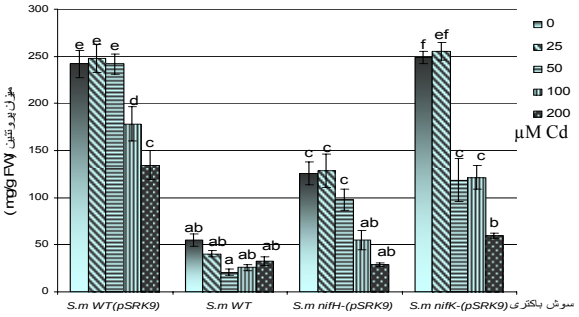
www.SID.ir

Archive of SID

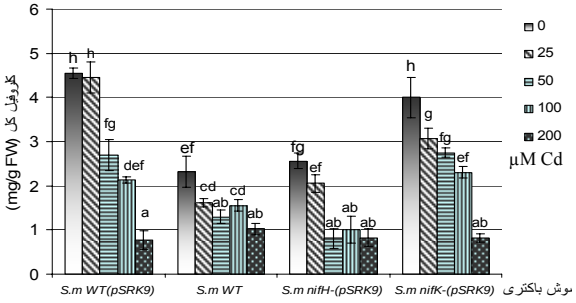
کادمیوم در غلظتهای کمتر از ۱۰۰µM تأثیر معنی داری بر رشد سوشها ندارد اما با افزایش غلظت کادمیوم، رشد تمام سوشها به مقادیر متفاوت کاهش می یابد(شکل ۱۱).



شکل ۷ – تأثیر سوش باکتریایی و کادمیوم بر محتوای پروتئین کل ریشه

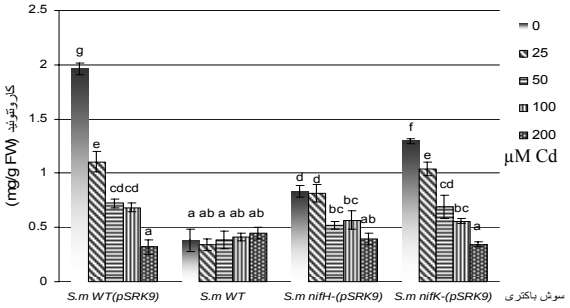


شکل ۸ – تأثیر سوش باکتریایی و کادمیوم بر محتوای پروتئین بخش هوایی



شکل ۹ – تأثیر سوش باکتریایی و کادمیوم بر محتوای پروتئین محتوای کلروفیل کل در گیاهان تحت تیمار. مقایسه میانگینها با آزمون دانکن انجام گرفته و حروف غیر مشترک تفاوت معنی دار در سطح ۰/۰۵ را نشان می دهد.

باکتریهایی که با نگهداری کادمیوم در محیط خارج سلولی ویا کده بندی درون سلولی محیط داخل سلولی را از این استرس محافظت می کنند توانایی بالاتری در مقاومت به کادمیوم دارند(١٦). یکی از مهمترین نقشهای باکتریها در فرآیند گره زایی تولید پروتئینهایی موسوم به فاکتور های Nod است که در پاسخ به ترشح ترکیبات فلاونوئیدی گیاه میزبان به طور اختصاصی سنتز می شوند(۲۰). کادمیوم به صورت آزاد، با اتصال به گروههای سولفیدریل پروتئینها، ساختار و عملکرد آنها را تحت تأثیر قرار می دهد(۲)، بنابرین احتمالاً تغییر در ساختار پروتئینهای سیگنال نظیر فاکتور های Nod از دلایل کاهش توانایی گره زایی باکتریهای غیر مقاوم به کادمیوم است. در مراحل آغازین گره زایی ترکیبات مختلف دیواره سلولی باکتریایی نظیر ترکیبات پلی ساکاریدی نقش مهمی در شناسایی و اتصال باکتری به تار کشنده دارند (۱۰ و ۲۰) و اتصال کادمیوم به دیواره سلولی باکتریها نیز گزارش شده است(۲۱). بنابراین تجمع کادمیوم در دیواره سلولی باکتریها ممکن است با تأثیر بر این ساختارها، بر اتصال باکتری به تار کشنده مؤثر باشد. در این آزمایش نیز سوش *nifK*⁻(pSRK9) که بیشترین کاهش رشد در حضور کادمیوم را دارد (شکل ۱۱)، بیش از سایر سوشها (نسبت به گروه شاهد خود) کاهش میزان گره زایی را نشان می دهد(شکل ٤).

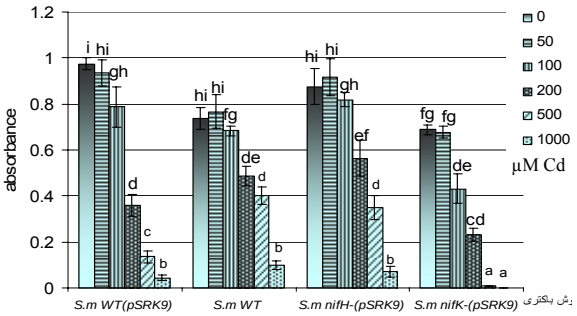


شکل ۱۰ – تأثیر سوش باکتریایی و کادمیوم بر میزان کاروتنوئیدهای گیاهان تحت تیمار

تأثیر کادمیوم بر برخی شاخصهای رشد گیاهی: مطالعه تأثیر کادمیوم و سوش باکتریایی بر وزن خشک گیاه کامل، وزن خشک ریشه و طول ریشه نشان داد که افزایش غلظت کادمیوم باعث کاهش این پارامتر ها در گیاهان تلقیح شده با تمام سوشها شده و میزان این کاهش با سوش باکتری ارتباط معنی داری دارد (شکلهای ۱، ۲ و۳).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱۱ – تأثیر کادمیوم بر رشد سوشهای مختلف مقایسه میانگینها با آزمون دانکن انجام گرفته و حروف غیر مشترک تفاوت معنی دار در سطح ۰/۰۵ را نشان می دهد.

کاهش بیوماس و طول اندام هوایی در نتیجه حضور فلزات سنگین می تواند به دلیل تأثیر بازدارنده این فلزات بر رشد طولی ریشه و کاهش جذب مواد معدنی باشد (۲ و ۱۹). طبق گزارشات کادمیوم با تأثیر مستقیم بر تقسیم سلولها در منطقه مریستمی باعث کاهش رشد ریشه می شود(۲). میزان رشد ریشه در این آزمایش نیز با افزیش کادمیوم به شدت مهار شد (شکل ۳). یکی از مهمترین مراحل فعال شدن سیستم تثبیت ازت، مراحل آغازین تشکیل گرهک است. این مرحله با ایجاد یک بافت مریستمی مولد گرهک همراه است و تأثیر بازدارنده کادمیوم بر فعالیت بافت مریستمی می تواند دلیل کاهش تعداد و وزن گرهکها در حضور کادمیوم باشد (شکلهای ٤ و٥). چنین تأثیری در آزمایشات دیگری نیز گزارش شده است (۱۲، ۱۵ و ۱۸). ازآنجا که در این آزمایش گیاهان در محیط فاقد نیتروژن پرورش داده می شدند، تأثیر بازدارنده کادمیوم بر تشکیل و رشد گرهکها، مستقیماً تنها منبع ازت این گیاهان را تحت تأثیر قرار داده و بنابراین مهار رشد و سایر فعالیتهای متابولیکی نیازمند ازت، اجتناب ناپذیر به نظر می رسد. یکی از بارزترین اثرات کادمیوم القاء استرس اکسیداتیو در بافتهای گیاهی است (۲ و ٤) که منجر به القاء پیری در گرهکها نیز می شود و بدین ترتیب باعث افزایش پراکسیداسیون لیپیدها و مهار آنزیم پراکسیداز گرهکها و نهایتاً کاهش ازت تثبیت شده می شود (٤).

تأثیر کادمیوم بر میزان فعالیت آنزیم نیتروژناز: کادمیوم فعالیت آنزیم نیتروژناز گرهکها را کاهش می دهد(٤، ١٤و١٥)، و این پدیده با تأثیر کادمیم بر جذب Mo وFe به عنوان کوفاکتور های آنزیم نیتروژناز همراه است (۲ و ٤). آنزیم نیتروژناز حساسیت بالایی به میزان اکسیژن داشته و با توجه به هوازی بودن باکتریهای ریزو بیوم، تنظیم میزان اکسیژن موجود در گرهکها توسط لگ- همو گلوبین ضروری است. مطالعات نشان داده که کادمیوم باعث تخریب لگ-هموگلوبین در بافت گرهک می شود (٤ و١٥). این پدیده به انضمام ایجاد رادیکالهای آزاد اکسیژن توسط کادمیوم می توانند از عوامل باز دارنده فعالیت آنزیم نیتروژناز در حضور کادمیوم باشند. چنین تأثیری در این آزمایش نیز مشاهده شد (شکل ٦).

تأثیر کادمیوم بر میزان پروتئین ریشه و بخش هوایی:. افزایش غلظت کادمیوم موجب تغییر در محتوای پروتئین ریشه و بخش هوایی نیز گردید (شکلهای۷ و ۸). یکی از مکانیسمهای مقاومت گیاهان به استرس فلزات سنگین تولید پروتئینهایی موسوم به پروتئینهای تنشی می باشد. افزایش میزان پروتئین در بافتهای تحت تنش در مطالعات دیگر نیز گزارش شده (۲ و ۱۵) و آن را به افزایش سنتز mRNA پروتئینهای تنشی از خانواده چاپرونها و نیز سنتز فیتوکلاتینها مربوط دانسته اند. از آنجا که تجمع کادمیوم در ریشه به مراتب بیشتر از بخش هوایی است (۲ و ۲۲) بنابراین افزایش میزان پروتئینهای تنشی را می توان از عوامل بالا برنده محتوای کل پروتئین ریشه های تحت تنش دانست. اما در نهایت غلظتهای بالاتر کادمیوم با تأثیر بر مسیر های متابولیکی سنتز پروتئین (۱۵) و نیز میزان ازت تثبیت شده (٤ و ۱۵ و ۲۲)، پروتئین کل ریشه را کاهش می دهند. گروههای تیماری که چنین افزایشی را در محتوای پروتئین ریشه دارند، در سایر شاخصهای رشد نیز نسبت به سایر گروهها برتری نشان می دهند (شکلهای ۱ و ۷). اندازه گیری میزان پروتئین کل بخش هوایی، کاهش

www.SID.ir

Archive of SID

وابسته به کادمیوم این پروتئینها را نشان می دهد (شکل ۸). در مطالعات آمده که بخش هوایی کمتر از ریشه تحت استرس کادمیوم قرار می گیرد (۲و۲۲) بنابرین احتمالاً تخصیص پروتئینهای تنشی به این اندام کمتر از ریشه خواهد بود و کاهش محتوای پروتئین بخش هوایی این گیاهان می تواند به دلیل کاهش میزان ازت تثبیت شده و فتوسنتز گیاه تحت تأثیر کادمیوم و نیز تخصیص میزان بیشتر پروتئین به اندام تحت تنش (ریشه) باشد.

تأثیر کادمیوم بر میزان رنگیزه ها: محتوای کلروفیل کل گیاهان نیز در گیاهان تلقیح شده با تمام سوشها کاهش نشان داد (شکل ۹). گزارشات زیادی مبنی بر کاهش سنتز رنگیزه ها در حضور کادمیوم وجود دارد، این کاهش را به اثر بازدارنده کادمیوم بر جذب آهن و منگنز و نیز مهار آنزیمهای دارای گروههای سولفیدریل شرکت کننده در مسیر بیوسنتز رنگیزه ها توسط کادمیوم نسبت داده اند (۲ و ۱۵). چنین تأثیری در این تحقیق نیز مشاهده شد، و پاسخ متفاوت سوشهای مختلف به این اثر کادمیوم می تواند به دلیل تفاوت در میزان نیتروژن در دسترس گیاه برای سنتز پروتئینها و سایر ترکیبات حفاظتی نظیر پرولین باشد. کاهش میزان کاروتنوئیدها تحت تنش کادمیوم نیز گزارش شده که آن را با نقش کاروتنوئیدها در سمیت زدایی کلروفیلهای برانگیخته مربوط می دانند (۲). در واقع کاهش در میزان کاروتنوئید به نوعی معرف میزان مقاومت گیاه در برابر استرس اکسیداتیو القاء شده با کادمیوم است. در این تحقیق نیز گیاهان تلقیح شده با سوش WT(pSRK9) بیشترین کاهش در میزان کاروتنوئید و در عین حال بیشترین محتوای کلروفیل را در مقایسه با گیاهان تلقیح شده با سایر سوشها (در غلظت ۲۵ μM کلرید کادمیوم) نشان می دهند که با نتایج فوق الذکر منطبق است (شکلهای ۹ و ۱۰).

از مجموع نتایج فوق چنین بر می آید که تأثیر سوشهای باکتریایی فوق بر میزان ازت تثبیت شده تحت استرس کادمیوم معنی دار بوده و در این میان سوش WT(pSRK9) دارای بیشترین قابلیت رشد، و تثبیت ازت در حضور کادمیوم را دارد. گیاهان تلقیح شده با سوش باکتریایی *nif*K⁻(pSRK9) اگر چه در شرایط فاقد کادمیوم داری شاخصهای رشدی قابل مقایسه با گیاهان تلقیح شده با سوش WT(pSRK9) هستند اما افزایش تدریجی غلظت کادمیوم، رشد و فعالیتهای متابولیک این گیاهان را بیشتر تحت تأثیر قرار می دهد که نشان دهنده حساسیت بیشتر این سوش به تنش کادمیوم است.

منابع

۱- انتشاری، ش، کلانتری، م خ، ،قربانلی م و ترکزاده م،(۱۳۸٤)، تأثیر باند های مختلف اشعه فرابنفش بر رنگیزه های موجود در برگ سویا، مجله زیست شناسی ایران ۱۸ (۱): ۸٤-۷۷

۲- علومی، ح، کلانتری، م خ، (۱۳۸۲)، اثر کادمیوم بر برخی پارامترهای رشد و القاء تنش اکسیداتیو در گیاه کلزا، پایان نامه دوره کارشناسی ارشد، بخش زیست شناسی دانشگاه شهید باهنر کرمان

۳- مطهری م، نمکی شوشتری ع، کلانتری م خ، (۱۳۸۳)، بررسی اثرات تنش شوری روی سیستم تثبیت ازت اگروباکتریوم تومافاشینس در دو رقم گیاه یونجه بمی و آمریکایی، مجله زیست شناسی ایران ۱۷(۱): ٤۸-۳٤

4- Balestrasse,K.B, Gallego,S.M, (2004), Cadmium-induced senescence in nodules of soybean (*Glycine max* L.) plant. Plant and Soil, 269: 373-381

5- Bradford,M.M (1976), A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantits of proteins utilizing the principles of protein –dye binding. Analytical Biochemistry, 72: 248- 254

6- Bruemmer, GW; Gerth, J; Herms, U, (1986), Heavy metal species, mobility and availability in soils. Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde, 49(4): 382-398

7- Chen,Y.X, Yang, Y (2003), Effect of cadmium on nodulation and N_2-fixation of soybean in

www.SID.ir

Archive of SID

contaminated soils. Chemosphere, 50 (6):781-787

8- Chugh, L.K, Sowhney,S.K (1995), Effect of Cadmium on germination amylases and rate of respiration of germinating pea seeds. Environmental pollution, 92(1):1-5

9- Gardea- Torresdey, J. L., Tiemann, K. J., Gamez, G. and Dokken, K. (1999). Effects of chemical competition for multi-metal binding by *Medicago sativa*_alfalfa. Journal of Hazardous Materials, 69: 41–51

10- Gonzales, J.E, York,G.M (1996), *Rhizobium melilot*i exopolysaccharides: synthesis and symbiotic function. Gene, 179 (1): 141-146

11- Hamdi, H.Z, (1999), *Rhizobium*-Legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. Microbiology and Molecular Biology Review, 63(4): 968-989

12- Hernandez.L.E, Grate, A, (1995), Effect of Cadmium on nitrogen fixing pea plants grown in perlite and vermiculite. Journal of Plant Nutrition, 18 (2): 287-803

13- Ibekw A.M, Angel, J.S, (1996), Zinc and cadmium toxicity to *alfalfa* and its microsymbiont. Journal of Environmental Quality, 25 (5): 1032-1040

14- Porter J R., Sheridan P R,(1981), Inhibition of nitrogen fixation in alfalfa, by arsenate, heavy metals, fluride, and acid rain. Plant Physiology, 68: 143-148

15- Prasad MNV, and Strzatka K (eds). (2002). Physiology and biochemistry of metal toxicity and tolerance in plants. Kluwer Academic Pub, Dordrecht., pp: 432

16- Maria,E, Figueria, A.P, (2005), Cadmium tolerance plasticity in *Rhizobium Legominosarum* bv.viciae: glutathione as a detoxifying agent. Canadian J Microbiology, 51: 7-14

17- Namaki shoushtari A, (1997), Genetics and molecular characterization of Agrobacterium Nitrogen fixation system. School of Biology, University of Leeds, England

18- Neumann,H, Kirchhoff, A.B (1998), Toxicity testing of heavy metals with rhizobium-legume symbiosis: high sensitivity to cadmium and arsenic compounds. ESPR-Environmental Science & Pollution, 5(1): 28-36

19- Vassilev,A, Yordanov, I, (1997), Reductive analysis of factors limiting growth of Cadmium-treated Plants: A review. BULG.J .Plant physiology, 23(3-4): 114-133

20- Xavier, P, Staehelin, C, (2000), Molecular basis of symbiotic promiscuity. Microbiology and Molecular Biology Review, 64 (1): 180-201

21- Zhengwe, Z, Wei, F (2005), Responses of *Azorhizobium caulinodans* to cadmium stress. FEMS Microbiology Ecology

22- Zornoza,P, Vazquez, S, (2002), Cadmium stress in nodulated white Lupin: Strategies to avoid toxicity. Plant physiology & Biochemistry, 40: 1003-1009

www.SID.ir

Archive of SID

Effects of toxic concentrations of Cadmium on nodulation and nitrogen fixation of different strains of *Sinorhizobium meliloti* in *Medicago sativa*

Hafezi M.[1,2], Shoushtari A.N.[1], Asrar Z.[1] , and Torkzadeh M.[2]

[1] **Biology Dept., Faculty of Science, Shahid Bahonar University, Kerman, I.R. of IRAN**

[2] **International Center of Science, High Technology and Environmental Science, Kerman, I.R. of IRAN**

Abstract

Cadmium is a heavy metal with high biological toxicity which accumulates in soil usually by using chemical fertilizers or industrial pollutants. In order to study the effects of cadmium on biological nitrogen fixation and finding more resistant strains, the effects of cadmium on microbial growth, nodulation and symbiotic function of four different strains of *Sinorhizobium meliloti* were considered. They were cultured in TY liquid medium with different concentrations of $CdCl_2$ and their growth was measured by OD (Optical Density) test. More over the effect of cadmium on legume-*rhizobium* symbiosis was studied by culturing the germinated alfalfa seeds in perlit medium. Plants at three leaves stage were infected by *Sm* strains mentioned above and the pots were placed in a growth chamber with 16 h light, 18-22˚C temperature and 50% humidity for eight weeks. After this time the number and weight of nodules, root length, root and whole plants dry weight; root and shoot total proteins, photosynthetic pigments content, and nitrogenase activity were measured. The results showed decrease of growth, nodulation and N2 fixation ability of all *Sm* strains, by increasing Cd concentration. But there were significant differences between strains; so that *Sm nif*K$^-$(pSRK9) has the most sensitivity to Cd. *Sm* WT, *Sm* WT (pSRK9) and *Sm nif*H$^-$(pSRK9) growth egregiously in presence of cadmium compare to *Sm nif*K$^-$(pSRK9). *Sm* WT (pSRK9) has more nodulation and N_2 fixation ability in presence of cadmium. Plants with the more nitrogen fixation ability have the more ability for protective component biosynthesis. Protection of the photosynthetic system against oxidative stress may be one of the reasons that cause better growth of the plants with active nitrogen fixing system, compare to others.

Keywords: *alfalfa (Medicago sativa), Cadmium, nodulation, Sinorhizobium meliloti*,

www.SID.ir