مجله زارعت و اصلاح نباتات
جلد ۶، شماره ۲، تابستان ۱۳۸۹
صفحات ۷۹-۶۵

تأثیر کودهای بیولوژیک، هومیک اسید و پلیمر سوپر جاذب بر محتوای کلروفیل، غشاء لیپیدی و فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز در گونه گیاهی یونجه یکساله (*Medicago scutellata*) تحت سمیت کادمیوم

مرتضی محمدی[۱]، داوود حبیبی[۲]، محمدرضا اردکانی[۳]، احمد اصغرزاده[۴]

چکیده

بعضی از گونه‌های گیاهی از قابلیت مقاومت در برابر شرایط تنش محیطی برخوردار بوده، به طوری که با مکانیزم عمل خود مانع از تولید بیشتر اکسیژن‌های رادیکال آزاد شده و یا با اکسیژن‌های رادیکال آزاد تولیدی مقابله می‌کنند. اولین گام در اجرای استراتژی گیاه پالایی شناسایی گونه‌های گیاهی است که قادر به مقاومت در برابر فلزات سنگین می‌باشد و همچنین شناسایی عواملی که باعث افزایش مقاومت این گیاهان در برابر شرایط سمیت فلزات سنگین و موفقیت گیاه پالایی می‌شود. بر این اساس به منظور بررسی نقش کودهای بیولوژیک، پلیمر سوپرجاذب و هومیک اسید بر برخی صفات فیزیولوژیک گیاه یونجه یکساله، آزمایشی در سال ۱۳۸۸ در قالب فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی در چهار تکرار روی گیاه یونجه یکساله (*Medicago scutellata*) انجام شد که در این آزمایش فاکتور اول، سطوح فلز سنگین کادمیوم که شامل (۸۰-۴۰-۰ میلی گرم در کیلوگرم خاک CdCl2) و فاکتور دوم شامل ترکیبات تیماری (باکتری‌های محرک رشد گیاه، قارچ میکوریزا، هومیک اسید و پلیمر سوپرجاذب) در ۱۶ سطح می‌باشد. نتایج آزمایش حاکی از این بود که در تیمار شاهد (بالاترین غلظت کادمیوم بدون استفاده از کودهای بیولوژیک، پلیمر سوپرجاذب و هومیک اسید) محتوای کلروفیل کل و غشاء لیپیدی تحت سمیت عنصر کادمیوم کاهش پیدا کرد. فعالیت بیشتر آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و کاتالاز (CAT) با افزایش غلظت کادمیوم مانع از تولید بیشتر اکسیژن‌های رادیکال آزاد در این گونه‌ی گیاهی شد. همچنین همبستگی بین ظرفیت مالون دی آلدهید (MDA) که وسیله‌ای برای اندازه‌گیری فرآیند پراکسیداسیون لیپید است، با آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز مثبت بود بدین معنی که افزایش ظرفیت این بیومارکر نشان دهنده‌ی تولید بیشتر اکسیژن رادیکال آزاد برای تخریب غشاء لیپیدی در شرایط شاهد (بالاترین غلظت کادمیوم بدون استفاده از کودهای بیولوژیک، پلیمر سوپرجاذب و هومیک اسید) است که با افزایش فعالیت آنزیم (SOD) و (CAT)، برای حذف بیشتر اکسیژن‌های مخرب همراه بود. با افزایش غلظت کادمیوم روندی کاهشی برای محتوای کلروفیل a، b و a+b وجود داشت، به طوری که این کاهش در بالاترین غلظت کادمیوم (۸۰ میلی گرم در کیلوگرم در خاک CdCl2) مشاهده شد. در تیمارهایی که باکتری‌های محرک رشد و میکوریزا به صورت توام و جداگانه (تیمار b2 و b8) استفاده شده بود، میزان کاهش سنتز کلروفیل کمتر از تیمار شاهد بود. تیمارهای] b5 (کاربرد پلیمر سوپرجاذب + باکتری‌های محرک رشد) و b9 (کاربرد باکتری‌های محرک رشد + هومیک اسید)[دارای کمترین فعالیت آنزیم SOD و CAT بودند و این امر می‌تواند به این دلیل باشد که باکتری‌های محرک رشد به غیر از دفاع آنتی اکسیدانتی از طریق مکانیسمی دیگری مانند تولید پرولین، با اکسیژن‌های رادیکال آزاد مقابله کرده و باعث کاهش پراکسیداسیون لیپید شده و از این طریق گیاه را در برابر سمیت کادمیوم مقاوم کرده است. و همچنین در این تیمارها کمترین میزان بیومارکر مالون دی آلدهید نسبت به تیمار شاهد دیده شد، این امر نشان دهنده‌ی کاهش پراکسیداسیون لیپید و همچنین مقابله بیشتر با اکسیژن‌های مخرب تولیدی در تیمارهای فوق می‌باشد

کلمات کلیدی: کودهای بیولوژیک، کادمیوم، مالون دی آلدهید، سوپراکسید دیسموتاز، آنزیم آنتی اکسیدانت، کلروفیل

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج
۲- استادیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج
۳- استاد دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج
۴- استادیار موسسه تحقیقات خاک و آب

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

فلزات سنگین آلاینده‌های محیطی 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 آلاینده‌ها از منابع متعدد انسانی شامل پسماندها و فاضلاب‌های صنعتی، روناب شهری، کاربرد لجن فاضلاب، استفاده از قارچ‌کش‌های کشاورزی، زباله‌های خانگی و... حاصل می‌شوند. این عناصر در ایجاد تنش اکسیدی در گیاهان مشارکت دارند (Groppa et al.,2007)، به این ترتیب که با ایجاد گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) که محصول متابولیسم هوازی‌اند و شامل ترکیباتی مثل سوپراکسیدها، پراکسید، اکسیژن اتمی و رادیکال‌های هیدروکسیل می‌باشند طی واکنش‌های انتقال الکترون در میتوکندری‌ها، کلروپلاست‌ها و پراکسی زوم‌ها تولید می‌گردند و در صورتی که 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 حتی یون‌هایی که فاقد این ویژگی‌ها هستند مانند روی و کادمیوم به عنوان آغاز کننده‌های پراکسیداسیون لیپید و غشاء و تحریک کننده‌های تولید گونه‌های فعال اکسیژن شناخته شده‌اند (Sharma et al.,2004) که گفته می‌شود غلظت اضافی کادمیوم به دلیل افزایش گونه های فعال اکسیژن (ROS) در بخش‌های زیر سلولی موجب تنش اکسیدی می‌شود (Khatun etal.,2008).

سرب علاوه بر سمیت زیادی که برای انسان دارد اثرات سویی نیز بر جوانه‌زنی بذر، رشد گیاه و فرآیند فتوسنتز دارد (Lin et al.,2009) همچنین سرب باعث کاهش طول ریشه، کاهش تولید بیومس، جلوگیری از سنتز کلروفیل ۲ و نیز تخریب سلول و آسیب به کروموزوم (Garnczarska and Ratajczak,2000)، کاهش جذب مواد معدنی و عدم تعادل در جذب آب و تغییر ساختمان و نفوذپذیری غشاءهای سلولی می‌شود (Estrella-Gomez et al.,2009).

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 خشکی را با افزایش فعالیت SOD، CAT و GPX افزایش داد (Jaleel et al, 2009).

در آزمایش قربانلی و همکاران در سال (۱۳۸۵) غلظت کلروفیل‌های a وb گیاه کلزا در پاسخ به تیمارهای کلرید مس(۰، ۱۰۰، ۳۰۰ و ۵۰۰ میکرومولار کلرید مس)کاهش معنی داری یافت. بدین ترتیب، تنش کلرید مس باعث کاهش معنی‌دار غلظت کلروفیل a وb در هردو رقم کلزای مورد آزمایش (هایولا و پی اف) شد.در صورتی که در محیط فاقد کلرید مس، غلظت کلروفیل در رقم هایولا بیش تر از رقم پی اف بود. اثر کاهنده تنش کلرید مس بر غلظت کلروفیل در Trebouxia erici و عدسک ریشه: Spirodela pdyrrhiza و آفتابگردان Helianthus annus و کلم Brassica oleracea و علف تابستانه Koeleria splendus نیز گزارش شده است.

یکی از مهمترین دلایل کاهش کلروفیل‌ها تخریب آنها به وسیله‌ی گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) می‌باشد.

(Navari-Izzo et al.,1998)

پراکسیداسیون لیپید نیز به دلیل فعالیت لیپوکسی‌ژناز افزایش می‌یابد. مالون دی آلدهید (MDA) فراوان‌ترین محصول حاصل از تجزیه لیپید آلدهیدی به شمار می‌آید (Davey et al.,2005). در تحقیق علی و همکاران ۲۰۰۳ بر روی گونه Salix acmophylla Bioss اثرات سرب، نیکل و مس بر این گونه گیاهی نشان داد که هر سه فلز مورد مطالعه سبب کاهش ظرفیت کل کلروفیل ۲ بسته به میزان غلظت فلز شدند. به علاوه کاهش ظرفیت کل کلروفیل با افزایش سطح مالون دی آلدهید (MDA) همراه بود. گزارشاتی وجود دارد که نشان

Archive of SID

www.SID.ir

می‌دهد تجمع فلزات سنگین در بافت‌های گیاهی منجر به تولید رادیکالهای آزاد می‌شود که سبب پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء می‌گردند. به علاوه، عدم استحکام غشاء همبستگی مستقیمی با تولید MDA دارد که یکی از محصولات تجزیه اسیدهای چرب غیر اشباع (پلیمری) غشاءهاست. بنابراین، سطوح بالای MDA که تحت تنش فلزی در گونه S. acmophylla مشاهده می‌شوند، به پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء مربوط هستند که توسط گونه‌های فعال اکسیژن که در شرایط تنش فلزی تولید می‌شوند، ایجاد می گردد (Ali etal.,2003).

بنابراین گیاهانی که در مجاورت تنش فلزات سنگین قرار دارند اغلب با تنش اکسیداتیو روبرو می‌شوند (Sharma etal.,2004). گیاهان برای محافظت از خود در مقابل آسیب‌های ناشی از رادیکال‌های اکسیژنی دارای یک سیستم دفاعی آنتی اکسیدانتی هستند (Groppa etal.,2007). اهمیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت به توانایی آنها در از بین بردن ROS و در نهایت جلوگیری از بروز آسیبهای اکسیدی مربوط می‌باشد. سیستم آنتی اکسیدانتی متشکل از چند آنزیم از جمله سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و گلیکول پراکسیداز (G-POD) است. رادیکال‌های سوپراکسید تولید شده با عملکرد SOD به H2O2 تبدیل شده و فعالیت آنزیم‌های APX,CAT,G-POD و GPX از تجمع H2O2 جلوگیری می‌نماید. بنابراین تعدیل بین تولید ROS و از بین رفتن آن، بقاء سیستم را تعیین می کند (عابدی و پاک‌نیت، ۱۳۸۷).

مقاومت گیاهان نسبت به سرب به توانایی آنها در محدود کردن سرب به دیواره‌های سلولی، سنتز اسمولیت‌ها و فعالسازی سیستم تدافعی آنتی اکسیدانتی مربوط می‌باشد (Sharma and Dubey , 2005). از آنجایی که عناصر سنگین قادر به کاتالیز کردن و تسریع ایجاد ROS است عناصر و موادی که دارای قابلیت‌های آنتی اکسیدانتی هستند می‌توانند از بروز آسیب‌های اکسیدی ناشی از عناصر 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 سنگین به شمار می‌آیند (Ali et al.,2003).

سوپراکسید دیسموتاز (SOD) عبارت است از آنزیمی 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 رادیکالها بر عهده دارند. (Luis et al.,1983) پاسخ گیاهان به تنش‌های محیطی در سطوح مرفولوژیک، آناتومی، سلولی و مولکولی متفاوت است (Yamaguchi et al.,2002). توانایی گیاهان برای سازش به تنش‌های محیطی بستگی به نوع، شدت و مدت تنش و همچنین گونه گیاهی و مرحله وقوع تنش دارد. گیاهان در شرایط تنش به دو شکل، اجتناب از تنش یا تحمل تنش مقاومت می‌کنند گیاه برای مقابله با شرایط تنش مواد مختلفی چون آنزیم‌های آنتی اکسیدانت و... تولید می‌کند (آخوندی، ۱۳۸۲ ; Nielsen and Orcutt,1996 ; Safarnejad,2004).

در اثر ایجاد تنش، گونه‌های فعال اکسیژن تولید می‌شود فلزات سنگین باعث استرس اکسیداتیو و تولید اکسیژن فعال از طریق اختلال در روند تنفس و فتوسنتز می‌شوند (Shaw etal.,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 etal.,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

Archive of SID

www.SID.ir

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 خشکی 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 خسارت‌های اکسیداتیو نیست ممکن است باکتری‌ها ازطریق سنتز پرولین نیز در کاهش خسارت‌های ناشی از رادیکال‌های آزاد و تنش اکسیداتیو نقش داشته باشند(مسلمی،۱۳۸۹). عُمَر (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). اسلادکی (۱۹۵۹) 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. اسلادکی و تیچی (۱۹۵۹) 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). در این تحقیق به بررسی میزان فعالیت مهمترین آنزیم‌های آنتی اکسیدانتی و برخی از صفات فیزیولوژیک گیاهی و نقش کودهای بیولوژیک، هومیک اسید و پلیمر سوپرجاذب و همچنین همبستگی بین این صفات در خاک‌های آلوده به کادمیوم پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

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 لومی شنی، با هدایت الکتریکی ۵/۸۲ دسی زیمنس بر متر، میزان کربن آلی ۰/۶ ٪، میزان ازت کل ۰/۰۵۴ ٪ 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 + ۴۰۰ سی سی آب، برای هر گلدان) کاملاً مخلوط شد (مسلمی و همکاران، ۱۳۸۸). نمک کلرید کادمیوم (CdCl2) 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 ۸۰-۴۰-۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک نمک کلرید کادمیوم (CdCl2) و فاکتور B ترکیبات تیماری (کاربرد پلیمر سوپرجاذب، باکتری‌های محرک رشد، قارچ میکوریزا و هومیک اسید) در ۱۶ سطح که شامل: ۱. کاربرد پلیمر نانو سوپر جاذب ۲.

Archive of SID

www.SID.ir

کاربرد باکتریهای ازتوباکتر و آزوسپریلیوم و سودوموناس ۳. کاربرد قارچ میکوریزا ۴. کاربرد هومیک اسید ۵. کاربرد پلیمر نانو سوپر جاذب + کاربرد باکتریهای ازتوباکتر و آزوسپریلیوم و سودوموناس ۶. 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 ۱۴. 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 ۱۶. عدم کاربرد موارد فوق (شاهد) می‌باشد. گونه‌های باکتری‌های مورد استفاده در این آزمایش شامل (Azospirillum) lipoferum،(Azotobacter crococum) و (Pseudomonas putida) به صورت ترکیب (mix) و همچنین گونه مربوط به قارچ میکوریزا (Glomus intraradices) بود که توسط بخش بیولوژی خاک موسسه تحقیقات خاک و آب جدا و خالص سازی شد. هر میلی لیتر از مایه تلقیح دارای ۱۰۷ 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 میسرا 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.

سنجش مالون دی آلدئید. (MDA) برای این منظوراز روش کروماتوگرافی HPLC بر اساس روش اِستون 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.

اندازه گیری میزان فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT)

جهت محاسبهٔ این فاکتور از برگهای جوان و توسعه یافته استفاده شد و سپس توسط روش (پاگلیا و والنتین، ۱۹۸۷) میزان تغییرات آنزیم تعیین گردید. نمونه برگها پس از شستشو با آب مقطر

Archive of SID

www.SID.ir

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 ۰/۵ ml از محلول هموژن برای سنجش پروتئین توسط روش (1951., lowry et al) 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.

محتوای کلروفیل a و b

جهت اندازه‌گیری کلروفیل b و aابتدا 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 و برداشته در داخل سانتریفوژ با ۲۵۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۵ دقیقه قرار می‌دهیم سپس مقدار۱ سی‌سی از این عصاره¬ هموژن (سوپرنانت) را با ۹ میلی لیتر استن داخل سل¬های دستگاه اسپکتروفتومتر ریخته و در طول موجهای ۶۶۳ نانومتری برای کلروفیل a و ۶۴۷ نانومتر برای کلروفیل bمیزان جذب نور قرائت شد و از فرمولهای زیر کلروفیلa, b بدست آمد. (Arnon,۱۹۴۹)

دستگاه قبل از آزمایش با استون خالص کالیبره گردید.

$$Chl.a(mgl^{-1}) = (12.25 \times A663 - 2.79 \times A647) \times D$$
$$Chl.b(mgl^{-1}) = (21.5 \times A647 - 5.1 \times A663) \times D$$

ضخامت سل‌های دستگاه اسپکتوفوتومتر = D

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 ۵٪ 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 و کاتالاز 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 (CdCl2) است.

با توجه به شکل‌های فوق بهترین تیمارها از لحاظ کمترین کاهش محتوای کلروفیل نسبت به سایر تیمارها، تیمارهای b2 و b8 [b2 (کاربرد باکتری‌های محرک رشد) و b8 (کاربرد باکتری‌های محرک رشد + قارچ میکوریزا)] می‌باشد. به طوری که محتوای کلروفیل a (شکل ۱)، برای تیمارهای b2 و b8 در بالاترین سطح سمیت کادمیوم به ترتیب حدود ۱۷/۲۶ و ۱۷/۸۵درصد بیشتر از تیمار شاهد بود. عباس زاده و همکاران(۱۳۸۶) گزارش کردند در شرایط بدون تنش، مقدار

Archive of SID

www.SID.ir

کلروفیل a و کلروفیل کل در بیشترین مقدار خود قرار دارند و با اعمال تنش میزان کلروفیل a و کل کاهش می‌یابد.

با توجه به شکل ۲، محتوای کلروفیل b برای تیمارهای b2 و b8 در بالاترین سطح سمیت کادمیوم به ترتیب حدود ۱۵/۶۵ و ۱۶/۳۹ درصد بیشتر از تیمار شاهد بود. همچنین با توجه به شکل ۳ میزان کلروفیل کل (a+b) برای تیمارهای فوق به ترتیب حدود ۱۶/۴۲ و ۱۷/۱۱ درصد بیشتر از تیمار شاهد در بالاترین غلظت کادمیوم (۸۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک CdCl2) بود. کادمیوم با جلوگیری از سنتز کلروفیل تاثیر منفی بر فرآیند فتوسنتز دارد.

سرب با جلوگیری از جذب عناصر ضروری مثل Fe، Mg 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 (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 et al., 1996).

احمدی و بیکر(۱۳۷۹) کاهش در پروتئین‌های غشایی خاص (پروتئین کلروفیل a/b برداشت کننده نور) در شرایط تنش خشکی، افزایش در فعالیت آنزیم کلروفیلاز و پراکسیداز را از عوامل مؤثر در کاهش کلروفیل در شرایط تنش آبی یا خشکی ذکر کردند. همچنین بیان کردند که کاهش سبزینه‌گی برگ در شرایط تنش طولانی مدت ممکن است تا حدودی به خاطر کاهش جریان نیتروژن به بافتها و تغییر در فعالیت آنزیم‌هایی مثل نیترات ریداکتاز باشد.

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 محتوی کلروفیل a، b و a+b، تیمار b15 (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 ۴ و ۵ که نشان دهنده‌ی فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و کاتالاز (CAT) است، با افزایش غلظت کادمیوم در خاک میزان فعالیت آنزیم‌های (SOD) و (CAT) 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 CdCl2) 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) و (CAT) 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 جدول ۲ که نشان دهنده‌ی همبستگی بین صفات

Archive of SID

www.SID.ir

است، مشاهده می‌شود که همبستگی منفی بین کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل کل با آنزیم‌های (SOD) و (CAT) است، به طوری که با کم شدن مقدار کلروفیل فعالیت آنزیم‌های مذکور افزایش یافته است که احتمالاً این افزایش در پاسخ به تولید اکسیژن‌های رادیکال آزاد ناشی از کادمیوم بوده است. به علاوه افزایش پراکسیداسیون لیپید نیز با افزایش این آنزیم‌ها همراه بود. با توجه به شکل ۴ و ۵ مشاهده شد که تیمارهای [b5 (کاربرد پلیمر سوپرجاذب + باکتری‌های محرک رشد) و b9 (کاربرد باکتری‌های محرک رشد + هومیک اسید)] نیز دارای کمترین فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز نسبت به تیمار شاهد در بالاترین سطح سمیت کادمیوم (۸۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک CdCl2) است. احتمالاً این نتیجه نشان دهنده این مطلب است که باکتری‌ها اثر تنش فلز سنگین را از طریق مکانیسم دفاعی دیگری کاهش می دهند، 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 ۶ که نشان دهنده‌ی ظرفیت بیومارکر تخریبی مالون دی آلدهید (MDA) که نشان دهنده‌ی میزان پراکسیداسیون لیپید است را نشان می‌دهد. همانگونه که مشاهده می‌شود پراکسیداسیون لیپید تحت سمیت کادمیوم از یک معادله خطی پیروی می کند به طوری که با زیاد شدن مقادیر کادمیوم، ظرفیت مالون دی آلدهید (MDA) نیز افزایش یافته است. 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(پوراسماعیل، ۱۳۸۵). زهانگ و همکاران (۲۰۰۶) گزارش کردند که میزان MDA در شرایط تنش کمبود آب در برگ‌های گیاه سویا افزایش پیدا می‌کند. در شکل ۶ مشاهده می‌شود که تیمارهای [b5 (کاربرد پلیمر سوپرجاذب + باکتری‌های محرک رشد) و b9 (کاربرد باکتری‌های محرک رشد + هومیک اسید)] نیز دارای کمترین ظرفیت مالون دی آلدهید می‌باشند. در تیمارهای حاوی باکتری، میزان MDA 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 MDA 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). با توجه به جدول ۲ همبستگی مثبت بین ظرفیت مالون دی آلدهید و آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز وجود دارد که نشان دهنده‌ی آن است که با افزایش ظرفیت بیومارکرها فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت که یک سیستم دفاعی است نیز افزایش یافت. 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.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول۱- تجزیه واریانس تاثیر سطوح مختلف کادمیوم و کاربرد کودهای بیولوژیک، هومیک اسید و پلیمر سوپرجاذب بر فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، ظرفیت مالون دی آلدهید و محتوی کلروفیل a، b و a+b در گیاه یونجه یکساله (Medicago scutellata).

Table1. ANOVA of different levels of cadmium and application of biologic fertilizers, humic acid and superabsorbent polymer on SOD activity, MDA and Chl (a,b,a+b) content in annual medic (Medicago scutellata).

			میانگین مربعات (MS)				
Chl a+b	Chlb	Chla	مالون دی آلدئید MDA	کاتالاز CAT	سوپر اکسید دیسموتاز SOD	درجه آزادی df	منابع تغییرات S.O.V
71.09**	18.18**	]17.36**	122931.83**	122544.95**	13288587.15**	2	سطوح فلز سنگین کادمیوم (A) levels of cadmium (A)
1.18**	0.30**	0.29**	3993.59**	3605.86**	362778.32**	15	ترکیبات تیماری (پلیمر سوپرجاذب ، باکتری‌های محرک رشد ، قارچ میکوریزا و هومیک اسید) (B) treatmants (application PGPR, mychorrhiza fungi, humic acid and superabsorbent polymer) (B)
0.87**	0.22**	0.21**	2105.91**	1934.76**	198449.49**	30	اثر متقابل (A×B)
6.15	8.09	7.12	9.59	9.23	10.92		C.V (%)

** معنی دار در سطح ۱ درصد، * معنی دار در سطح ۵ درصد، ns معنی دار نیست.

Ns,*,**: Non Significant and Significant at 5% and 1% levels of probability.

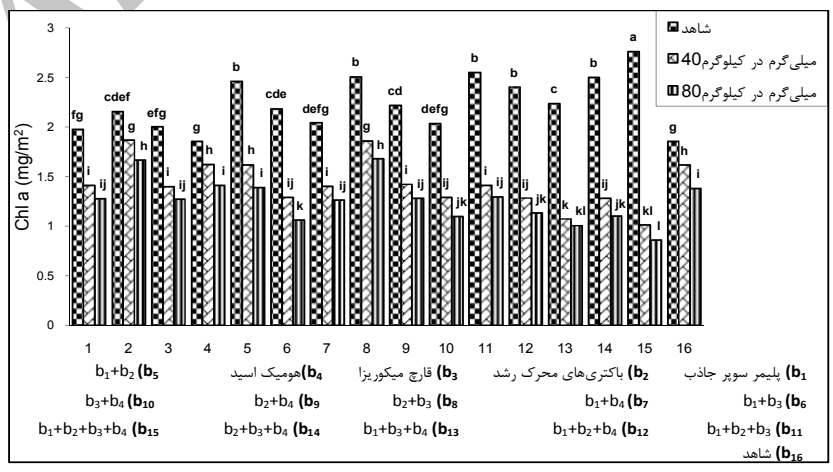
جدول ۲- ضرایب همبستگی ساده صفات مورد مطالعه.

Table 3- Simple correlations coeffcients for traits.

	SOD	CAT	MDA	Chl a	Chl b	Chl a+b
SOD	1					
CAT	0.880**	1				
MDA	0.925**	0.919**	1			
Chl a	-0.776**	-0.742**	-0.746**	1		
Chl b	-0.782**	-0.742**	-0.752**	0.963**	1	
Chl a+b	-0.787**	-0.749**	-0.756**	0.990**	0.991**	1

** معنی دار در سطح ۱ درصد، * معنی دار در سطح ۵ درصد، ns معنی دار نیست.

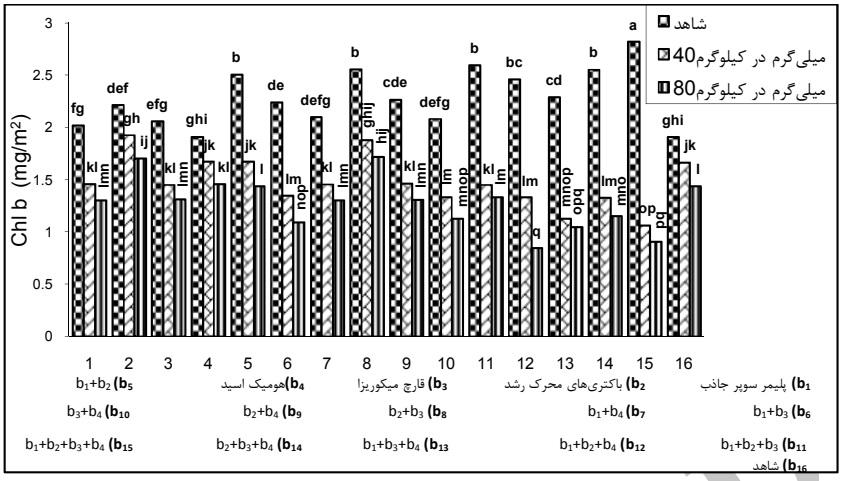
Ns,*,**: Non Significant and Significant at 5% and 1% levels of probability.



شکل۱-مقایسه میانگین اثرات متقابل سطوح مختلف کادمیوم و کاربرد کاربرد کودهای بیولوژیک، هومیک اسید و پلیمر سوپرجاذب بر محتوی کلروفیل a

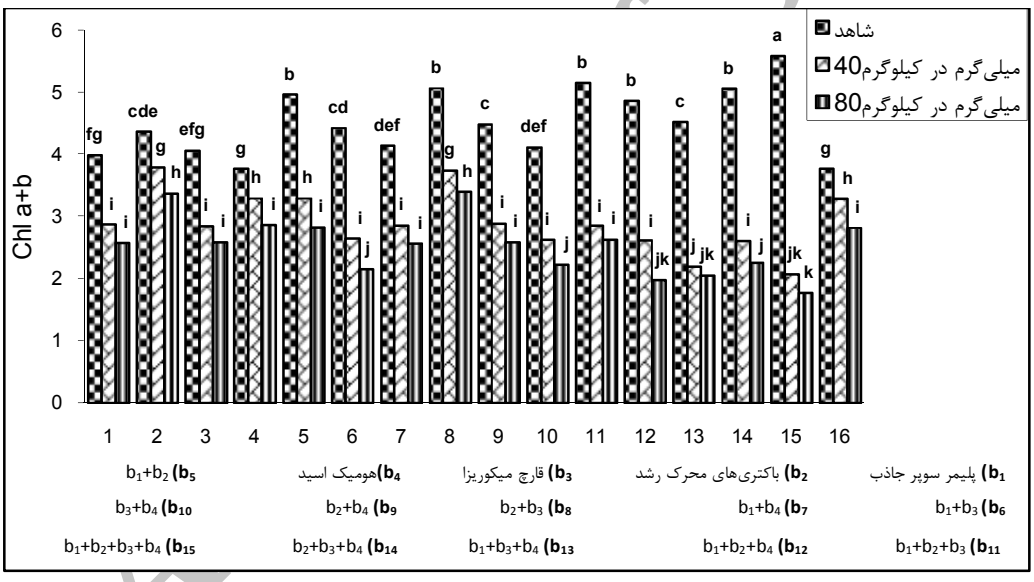
Figure 1. Mean comparison interaction of different levels of cadmium and application of biological fertilizers, humic acid and superabsorbent polymer on Chl(a) content.

www.SID.ir



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

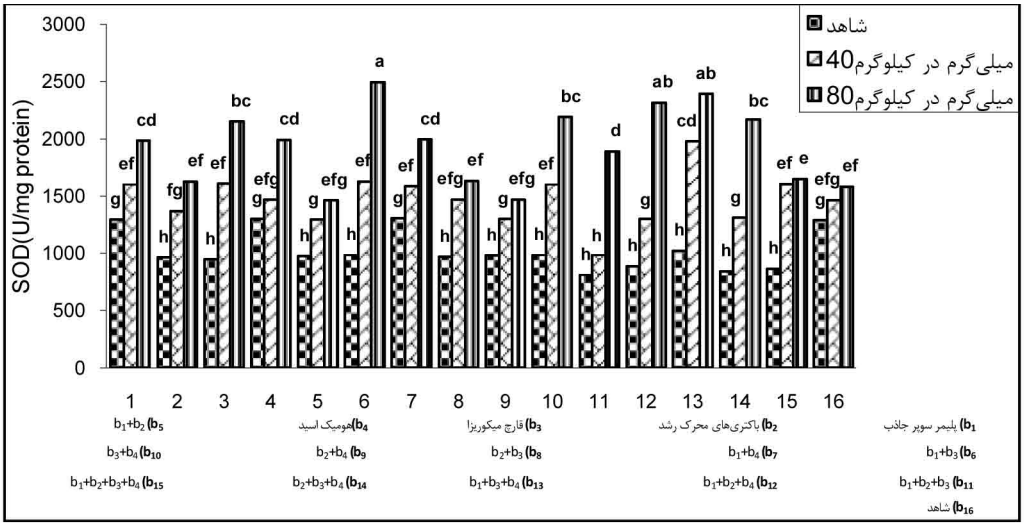
Figure 2. Mean comparison interaction of different levels of cadmium and application of biological fertilizers, humic acid and superabsorbent polymer on Chl(b) content.



شکل۳- مقایسه میانگین اثرات متقابل سطوح مختلف کادمیوم و کاربرد کاربرد کودهای بیولوژیک، هومیک اسید و پلیمر سوپرجاذب بر محتوی کلروفیل کل

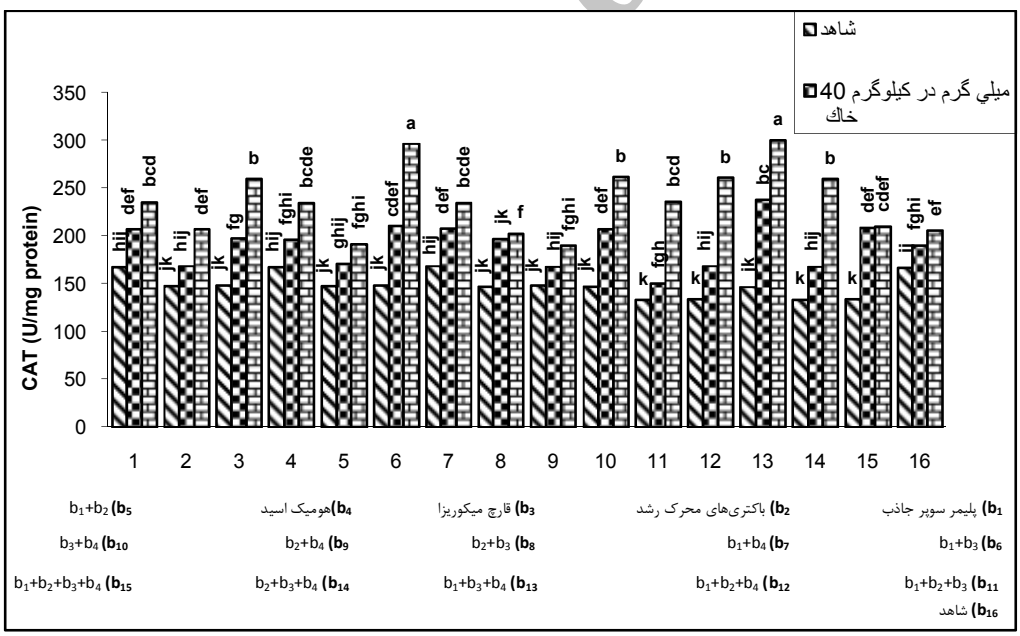
Figure 3. Mean comparison interaction of different levels of cadmium and application of biological fertilizers, humic acid and superabsorbent polymer on Chl(a+b) content.

www.SID.ir



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

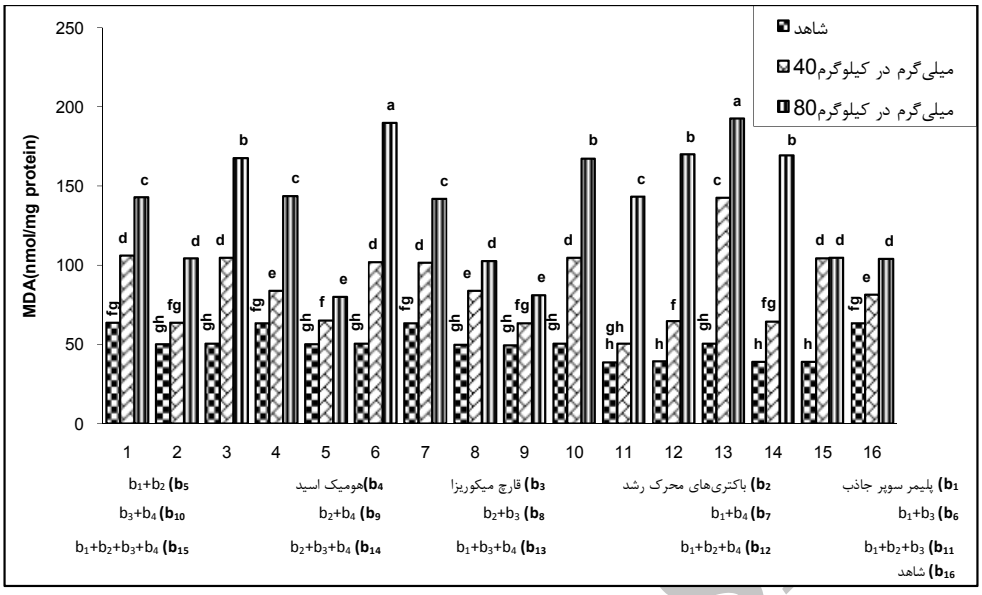
Figure 4. Mean comparison interaction of different levels of cadmium and application of biological fertilizers, humic acid and superabsorbent polymer on SOD activity.



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

Figure 5. Mean comparison interaction of different levels of cadmium and application of biological fertilizers, humic acid and superabsorbent polymer on CAT activity.

www.SID.ir



شکل۶- مقایسه میانگین اثرات متقابل سطوح مختلف کادمیوم و کاربرد کاربرد کودهای بیولوژیک، هومیک اسید و پلیمر سوپرجاذب بر ظرفیت مالون دی آلدهید

Figure 6. Mean comparison interaction of different levels of cadmium and application of biological fertilizers, humic acid and superabsorbent polymer on MDA content.

Archive of SID

www.SID.ir

فهرست منابع References

آخوندی، م. ۱۳۸۲. بررسی عکس العمل یونجه (*Medicago sativa* L.) به تنش خشکی در مراحل جوانه زنی و گیاهچه‌ای. پایان نامه کارشناسی ارشد فیزیولوژی گیاهی، دانشکده علوم دانشگاه فردوسی مشهد. ۲۰۱ صفحه.

احمدی، ع.، د. آ. بیکر. ۱۳۷۹. عوامل روزنه ای و غیر روزنه ای محدود کننده فتوسنتز در گندم در شرایط تنش خشکی. مجله علوم کشاورزی ایران. جلد ۳۱، شماره ۴، صفحات ۸۲۵- ۸۱۳

پوراسماعیل، پ. ۱۳۸۵. بررسی تأثیرات پلیمرسوپرجاذب بر کارایی مصرف آب و عملکرد در لوبیای قرمز. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج.

عباس زاده، ب.، ا. شریفی عاشورآبادی، م. ح. لباسچی، م. نادری حاجی باقرکندی و ف. مقدمی. ۱۳۸۶. اثر تنش خشکی بر میزان پرولین، قندهای محلول، کلروفیل و آب نسبی (RWC) بادرنجبونه (*Melissa officinalis* L.).فصلنامه علمی- پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران. جلد ۲۳، شماره ۴، صفحات ۵۱۳-۵۰۴.

عابدی، ط.، ح. پاک نیت. ۱۳۸۷. اثر تنش خشکی بر عملکرد و آنزیم های آنتی اکسیدانت در پنج رقم کلزای بهاره (*Brassica napus* L). دهمین کنگره علوم زراعت و اصلاح نباتات ایران.

قربانلی، م.، میقانی، ف.، اسدالهی، ب. ۱۳۸۶. اثر تنش مس کلرید بر غلظت کلروفیل، انباشتگی کربو هیدرات و برخی از شاخص های رشد در دو رقم کلزا (*Brassica napus* L.). پژوهش و سازندگی. ۷۶، ۱۴۱-۱۳۴.

مسلمی، ز.، حبیبی، د.، اصغر زاده، ا.، اردکانی م.ر.، محمدی، ع.، محمدی، م. ۱۳۸۸. بررسی اثر باکتری‌های محرک رشد و پلیمر سوپرجاذب بر مقاومت به خشکی ذرت. اولین همایش منطقه‌ای مدیریت منابع آب و خاک و نقش آن در کشاورزی. دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهر قدس. ص ۱۳۷.

مسلمی، زهرا. ۱۳۸۹. بررسی تأثیر پلیمرسوپرجاذب و کودهای زیستی (PGPR) بر رشد و عملکرد ذرت تحت شرایط تنش خشکی و نرمال. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج.

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.

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

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

Brunet J., A. Repellin,G. Varrault, N. Terrync,Y. Zuily-fodil. 2008. lead accumulation in the roots of grass pea (lathyrus sattivusl): anovel plant for phytoremediation systems? C.R Biologies,331,864.

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.

Efeoglu, B., Y. Ekmekci and N. Cicek. 2009. Physiological responses of three maize cultivars to drought stress recovery. South African Jornal of Botany. 75: 34-42.

Estrella-Gomez, N., D. Mendoza-Cozatl., R.Moreno-Sanchez., D.Gonzalez-Mendoza.,O.Zapata-Perez.,

Archive of SID
www.SID.ir

A.Martinez-Hernandez., J.M.Santiamaria.2009. the pb-hyperaccumulator aquatic fern salvinia minima baker, responds to pb+2 by increasing phyochelatins via changes in smpcs expression and in ohytochelatin synthase activity. Aquatic Toxicology , 91, 320-328.

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

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.

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.

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.

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.

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.

Levitt, J., 1980. Response of Plants to Environmental Stresses, Vol. 2, Water, Radiation, Salt and Other Stresses, Academic Press, New York, 650p.

Lin, C.J. Liu., T. Zhu., L. Sheng., D. Wang. 2009. Soil amendment application levels. Environmental and Experimental Botany, 65:410-416.

Lowry, O., A. Rosebrough and R. Randall. 1951. Protein measurment with folin phenol reagent. Journal, Biological Chemistry. 193, 680-685.

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.

Misra, H. P. and I. Fridovich. 1972. The generation of superoxide radical during auto oxidation. J. Biol. Chem. 247:6960-6966.

Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends in Plant Sci. 9:405-410.

27- Morgan, J. M. 1988. The use of coleoptiles responses to osmoregulation; growth and yield. Annals of Botany. 62:193-198.

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.

Nilsen, E. T. and D. M. Orcutt. 1996. Physiology of plants under stress (Abiotic factors). Jhon Wiley & Sons pub.

Archive of SID

www.SID.ir

New York.

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.

Paglia, D. E. and W. N. Valentine. 1987. Studies on the quantitative and qualitative characterization of glutathion proxidase. J. Lab. Med. 70: 158-165.

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.

Safarnejad, A. 2004. Characterization on of somaclones of alfalfa (Medicago sativa L.) for drought tolerance. J. Agric. Sci. Technol. 6:121-127.

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

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

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.

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.

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.

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

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

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.

Yamaguchi shinozaki, K., M. Kasuga and Q. Liu. 2002. Biological mechanisms of drought stress tolerance. Photosynthica 38(1): 171-186.

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.

Archive of SID

www.SID.ir