Archive of SID

مجله زارعت و اصلاح نباتات
جلد ۷، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۰
صفحات ۱۲-۱

بررسی اثر سرب و باکتری‌های محرک رشد بر فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز در گیاه کلزا

Effect of lead and plant growth promoting rhizobacteria on activity of CAT, SOD and GPX enzymes in winter oilseed rape

توحید نورالوندی[1*]، داود حبیبی[2]، رامتین محمدورزی[1]، کیارش رضایی[1]، مهدی صادقی شعاع[1] و مهتاب بلادی[3]

چکیده

فلزات سنگین با درجات سمیت متفاوت به طور مداوم وارد محیط شده و آنرا آلوده می کنند. برخی گیاهان با ویژگی جذب مقدار زیادی از فلزات سنگین شناسایی شده اند که می توانند خاک را پاکسازی کنند. به منظور مطالعه اثر باکتری های محرک رشد بر تغییرات میزان سرب و آنزیم های آنتی اکسیدانت در گیاه کلزا آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی در چهار تکرار در سال ۱۳۸۹ در دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج به اجراء در آمد. تیمارهای آزمایشی شامل باکتری‌های محرک رشد در پنج سطح: سطح یک: عدم تلقیح باکتری (شاهد)، سطح دو: تلقیح با باکتری آزوسپریلوم، سطح سه: تلقیح با باکتری ازوتوباکتر، سطح چهار: تلقیح با باکتری سودوموناس، سطح پنج: تلفیق باکتری‌ها (ازتوباکتر، آزوسپیریلوم و سودوموناس) ۲- سطوح سرب در چهار سطح: شامل(صفر، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۷۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم خاک) بودند. نتایج حاکی از آن بود که اثر متقابل سطوح باکتری‌های محرک رشد و سرب در سطح احتمال آماری ۱٪ بر فعالیت آنزیم های SOD، CAT و GPX معنی دار بودند. افزایش غلظت سرب کاهش معنی دار در سطح احتمال آماری ۱٪ بر فعالیت آنزیم های SOD، CAT و GPX و کاربرد باکتری‌های محرک رشد سبب افزایش معنی دار در سطح ۱٪ بر فعالیت صفات مذکور داشت. به طور کل کاربرد باکتری های محرک رشد با افزایش غلظت سرب سبب جذب بیشتر آن و در نتیجه باعث تولید آنزیم های آنتی اکسیدانت بالاتر نسبت به شاهد گردید.

واژه‌های کلیدی: گیاه پالایی، سرب، باکتری های محرک رشد، کلزا، آنزیم آنتی اکسیدانت

۱- عضو انجمن علمی زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج،کرج، ایران
۲- دانشیار دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج،کرج،ایران
۳- دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج، ایران
(* نویسنده مسئول: e-mail:tohid.nooralvandi@rocketmail.com)

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

فلزات سنگین آلاینده های محیطی هستند که در خاک وجود دارند به طوری که ممکن است در نتیجه فعالیت های بشری مقدار این فلزات در نواحی طبیعی و کشاورزی به حد سمی برسد. این آلاینده ها از منابع متعدد انسانی شامل پسماندها و فاضلاب های صنعتی، رواناب شهری، کاربرد لجن فاضلاب، استفاده از فارچ کش های کشاورزی و... حاصل می گردند. این عناصر در ایجاد تنش اکسیدی در گیاهان دخالت 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 رادیکال های هیدروکسیل می باشند طی واکنش های انتقال الکترون در میتوکندری ها، کلروپلاست ها و پراکسی زوم ها تولید می گردند و در صورتی که غلظت آنها تنظیم نشود می‌توانند سبب آسیب به پروتئین، غشاء و DNA شوند (Davey *et al.*,2005).

گیاه پالایی یکی از روش های زیست پالایی خاک ها است که در دهه های اخیر به آن توجه زیادی شده است در این روش از گیاهان مقاوم جهت پالایش خاک های آلوده به ترکیبات آلی و معدنی استفاده می‌گردد. مزیت هایی که این روش نسبت به سایر روش ها دارد عبارتند از سادگی، ارزان بودن و امکان بهره گیری در سطح وسیع می باشد. در این روش انتخاب گیاه از اهمیت ویژه ای برخوردار می باشد. انتخاب گیاه وابسته به شرایط اقلیمی و همچنین میزان آلودگی می‌باشد(Klute,1986;Mattine *et al.*,2003). عناصری که بالاترین خطر را برای محیط زیست دارند برلیم، کادمیم، مس، جیوه، نیکل، سرب و سلنیم می باشند (Knox *et al.*,1999). کلزا با نام علمی (*Brassica napus L.*) گیاهی یکساله و از تیره چلیپاییان یکی از مهمترین گیاهان زراعی و با تولید بیوماس(زیست توده) بالا است که در سطح دنیا جهت استخراج روغن کشت می شود و از بیشترین میزان رشد سالانه در بین روغن های گیاهی مهم جهان برخوردار می باشد. کلزا پس از سویا و نخل روغنی در جایگاه سوم تولید قرار دارد. (Downy, 1990; AL-Barrak, 2006)

آنزیم های آنتی اکسیدان سیستم های تدافعی مهمی برای گیاهان و جهت مقابله با تنش اکسیدی ناشی از فلزات به شمار می روند(Ali and *et al.*, 2003).

سیستم آنتی اکسیدانی متشکل از چند آنزیم از جمله سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و... است. رادیکال های سوپراکسید تولید شده با عملکرد SOD به H_2O_2 تبدیل شده و فعالیت آنزیم های APX (آسکوربات پراکسیداز)، CAT(کاتالاز)، POD -G (گایاکول پراکسیداز) و گلوتاتیون پراکسیداز از تجمع H_2O_2 جلوگیری می نماید، بنابراین تعادل بین تولید ROS و از بین رفتن آن، بقاء سیستم را تضمین می کند(Khatun *et al.*, 2008). این آنزیم ها در یک سری از فرایندهای بیولوژیکی مورد نیاز برای رشد، نمو و حفاظت مشارکت دارند(Gaetke and Chow, 2003)، و از جانداران در مقابل آسیب‌های اکسیدی محافظت به عمل می‌آورند(Garnczarska and Ratajczak, 2000). سوپر اکسید دیسموتازها عبارتند از گروهی از آنزیم‌های فلزی که عدم تناسب رادیکال‌های آزاد سوپر اکسید (O_2^-) را به پراکسید هیدروژن و اکسیژن کاتالاز می‌کنند (Ali *et al.*, 1983). کاتالاز نیز پراکسید هیدروژن را حذف می‌کند (Scandalios,1997). گلوتاتیون پراکسیداز(GPX) یک آنتی اکسیدان کاملاً شناخته شده است که نقش مهمی در سیستم تدافعی در مقابل رادیکال‌های آزاد در گیاه ایفا می‌کند. گلوتاتیون پراکسیدازهای آلی سمیت زدایی می‌کند. این ماده همچنین بر روی هیدرو پراکسیدازهای آلی نیز عمل می‌کند.

(Mashadi akbar boojar and Goodarzi, 2007)

تحریک بیان GPX در رابطه با افزایش پراکسیداسیون لیپید قرار دارد و از طریق سطوح زیاد MDA مشخص می شود. GPX پراکسیدهای لیپید را به الکل های مربوطه کاهش می دهد (Sharma *et al.*, 2004). غلظت سرب خاک تا فاصله ۱ الی ۳ کیلومتری از صنایع ذوب فلز، ۱۵ بار بیش از غلظت اولیه سرب در

www.SID.ir

Archive of SID

خاک همان محدوده می باشد (Carlton and martin, 1982).

بروکس و همکاران بیان نموده‌اند که گیاهان بیش تجمع دهنده فلزات سنگین (hyperaccumulator) قادرند بیشتر از ۰/۱ درصد مس، کادمیوم، سرب، نیکل و کبالت یا ۱ درصد از روی یا منگنز را در خود جمع نمایند و برای سایر فلزات نادر این مقدار برابر با ۰/۰۱ درصد وزن خشک آنها می باشد (Brooks *et al*., 1990).

در تحقیقات قبلی، گیاهان زراعی همچون جو، یونجه، خردل، تربچه، آفتابگردان، بادام زمینی، انواع لوبیا، کرچک و.. را به عنوان اصلاح کننده‌های گیاهی مناسب برای فلزات سنگینی همچون کادمیوم، سرب و نیکل معرفی نموده‌اند (Beladi *et al*.,2011; Ali *et al*.,2003; Yancheshmeh *et al*.,2011).

در مطالعه‌ای مقایسه توان اصلاح آلودگی خاک توسط ۴ گیاه یونجه،کرچک، آفتابگردان و خردل در برابر آلودگی ناشی از کادمیوم و سرب بررسی و مشخص گردید که عکس العمل هر گونه در برابر هر یک از فلزات سنگین متفاوت است به گونه‌ای که در آلودگی ناشی از کادمیوم، آفتابگردان بیشترین توانایی را جهت تجمع دادن، دارا بود و در آلودگی ناشی از سرب خردل و آفتابگردان بیشترین میزان این عناصر را در خود جای داده بودند و کمترین میزان تجمع در کرچک مشاهده شد.

(Niu *et al.*, 2007)

ژو و همکاران در مطالعه خود به این نتیجه رسیدند که گیاه لوبیا یک انباشتگر مناسب برای آلودگی ناشی از کادمیوم می‌باشد که البته این خاصیت بستگی به وضعیت ژنتیکی ارقام دارد (Zhu *et al*., 2007). باکتری های محرک رشد گیاهان(PGPR) گروهی از باکتری ها هستند که به طور فعالی ریشه‌های گیاهان را کلونیزه کرده و رشد گیاه را افزایش دهند (Sminoff,1993). این باکتری ها می توانند از اثرات پاتوژن های گیاهی و تنش های محیطی مانند تنش فلزات سنگین گیاهان را محافظت نمایند (Bai *et al*.,2003). PGPR ها ترکیبات تولید ترکیبات محرک رشد گیاهان شامل فیتوهورمون هایی نظیر اکسین ها، سیتوکینین ها و جیبرلین‌ها را می‌کنند (Garcia *et al*.,2001).

در ضمن این‌ها تولید سیدروفورها و پپتیدهای ضد باکتری می‌کنند که از فعالیت عوامل پاتوژنیک جلوگیری می‌کنند (Maurhofer et al.,1999) علاوه بر این مواد می‌توان از تولید اسیدهای آلی، ACC deaminase، تنظیم مسیرهای متابولیکی خاص نظیر تثبیت نیتروژن و جذب فسفر نیز نام برد(Idris *et al*.,2004). از باکتری‌ها می‌توان در زیست پالایی (Bioremediation) خاک‌های آلوده به عناصر کمیاب کمک گرفت. اثر متقابل بین میکروب‌ها و ریشه گیاهان (ریزوسفر) به طور وسیعی بر روی رشد و بقای گیاهان اثر می‌گذارد (Rajkumar and Freitas,2008). اثر متقابل گیاه و باکتری‌ها به دلیل پتانسیل میکروارگانیسم‌ها برای تجمع زیستی فلزات سنگینی از جمله سرب از محیط های آلوده و یا اثر آنها بر تحرک بیشتر فلزات و در نهایت بهبود جذب فلزات و رشد گیاه همراه است (Glick,2010). تعداد زیادی از باکتری‌های همزیست گیاهی از جمله سودوموناس ها، ریزوبیوم‌ها، ازتوباکترها و... شناسایی شده اند که پالایش گیاهی را در خاک‌های آلوده با افزایش رشد و سلامت گیاه بهبود می‌بخشند و آنها نقش تاثیرگذاری بر بهبود پالایش گیاهی دارند.

(Kuffner *et al*.,2008;Compant *et al*.,2010;Grandlik *et al*.,2008;Dary *et al*.,2010;Kidd *et al*.,2009)

آنگوس و ریان اعلام کردند که ازتوباکتر جذب عناصر، مخصوصاً عناصر غیر متحرک مانند فسفر روی و مس را در گیاه افزایش می‌دهد و عملاً بیوماس ریشه و ساقه را افزایش و رشد گیاه را بهبود می بخشند (Angus and ryan, 2003). مالکوا و همکاران گزارش کردند که آزوسپیریلوم تحت شرایط خاک های آلوده به فلزات سنگین می‌تواند غلظت فلز را در ساقه کاهش داده و گیاه را محافظت کند (Malkova *et al*., 2003). محققان نشان دادند که باکتری‌ها از جمله سودوموناس‌ها مقاومت در گیاه را افزایش داده و همچنین از غشاهای سلولی و آوندها محافظت می‌کند.

(Hsieh *et al*., 2009;Yancheshmeh *et al*.,2011.)

www.SID.ir

Archive of SID

مواد و روش‌ها

این آزمایش به منظور بررسی مولکولی مقاومت به فلز سنگین سرب در کلزای تلقیح شده با باکتری‌های محرک رشد (سودوموناس، ازتوباکتر و آزوسپریلیوم) و با غلظت‌های متفاوت سرب در خاک به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در ۴ تکرار در شرایط گلخانه‌ای در مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج با مختصات جغرافیایی موقعیت ۳۵ درجه و ۵۵ دقیقه عرض جغرافیایی و ۵۰ درجه و ۵۴ دقیقه طول جغرافیایی با ارتفاع ۱۳۱۳ متر از سطح دریا اجرا شد. میزان رطوبت نسبی گلخانه ۵۷ درصد و حداقل درجه حرات ۱۵/۵ درجه سانتی‌گراد و حداکثر ۳۰ درجه سانتی‌گراد بود. نمونه خاک از زمین‌های مزرعه تحقیقاتی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج برداشت شد. بافت خاک شنی لومی با pH خاک آزمایش ۷/۱، EC برابر با ۲/۹($ds.m^{-1}$)، ماده آلی ۱/۳ درصد و میزان عناصر سرب، مس و روی به ترتیب برابر با ۲، ۰/۷۱ و ۱/۱ میلی گرم بر کیلوگرم خاک بود. به منظور انجام این آزمایش از گلدان های پلاستیکی ۵ کیلوگرمی(با ارتفاع ۱۵ سانتی متر و قطر ۲۰ سانتی متر) و در مجموع تعداد ۱۶۰ عدد گلدان متناسب با تعداد کل تیمارها استفاده شد، غلظت های مورد نظر عنصر را با توجه به ظرفیت گلدان‌ها و براساس میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک تهیه و دو ماه قبل از کاشت گیاه، آلوده سازی خاک گلدان‌ها با فلز سنگین سرب (نیترات سرب) به صورت اسپری کردن و به منظور بومی سازی سرب در خاک صورت گرفت. پس از آن خاک مورد مطالعه از الک ۵ میلیمتری عبور داده شد و خاک گلدان‌ها به طور مساوی به مقدار ۵ کیلوگرم در نظر گرفته شد.

فاکتورهای آزمایشی عبارت بودند از: ۱- استفاده از باکتری‌های محرک رشد در پنج سطح، شامل سطح یک: عدم تلقیح باکتری (شاهد)، سطح دو: تلقیح با باکتری آزوسپریلوم (*Azosprillum crocucum*)، سطح سه: تلقیح با باکتری ازوتوباکتر، سطح چهار: تلقیح با باکتری سودوموناس (*P.Putida*)، سطح پنج: تلقیح با باکتری‌های (ازوتوباکتر، آزوسپریلوم و سودوموناس) ۲- سطوح سرب در چهار سطح، شامل (۰، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۷۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک) سرب ($Pb(NO_3)_2$).

بذور به صورت سطحی با محلول ۱/۵ درصد حجمی هیپوکلریت سدیم برای ۱۰دقیقه ضد عفونی و با آب استریل شستشو داده شدند. مصرف باکتری‌های محرک رشد به طریق بذر مال کردن انجام گردید که در آن مقدار مناسب از بذرهای کلزا با مقدار مناسب از باکتری‌های محرک رشد آغشته گشت. باکتری‌های فوق از بانک میکروبی بخش تحقیقات بیولوژی خاک موسسه تحقیقات خاک و آب تامین شدند. تعداد ۷ عدد بذر کلزا (رقم ساری گل) با قوه نامیه ۹۶ درصد که با باکتری‌های محرک رشد تلقیح شده بودند با فواصل یکسان از یکدیگر و در عمق ۲/۵-۲ سانتی متری خاک در هر گلدان کشت شدند که به هر بذر مقدار ۱۰ میلی بر لیتر ($10\ m\ L^{-1}$) از سوسپانسیون باکتریایی اضافه شد(هر میلی لیتر از مایه تلقیح دارای ۱۰۷ سلول زنده و فعال از هر جنس باکتری بود) و گلدان ها در همان روز آبیاری شدند. آبیاری های بعدی در زمان های معین و براساس حفظ آب به میزان ۶۰ درصد ظرفیت زراعی انجام گرفت. بر اساس وضعیت حاصلخیزی خاک نیتروژن، فسفر و پتاسیم مورد نیاز گیاه زراعی قبل از کشت و در طول دوره رشد به آن داده شد.

در پایان با استفاده از نرم افزار SAS تجزیه واریانس‌ها انجام گرفت و با استفاده از آزمون دانکن میانگین‌ها مقایسه میانگین‌ها صورت گرفت و نمودارها نیز به وسیله نرم افزار EXCEL ترسیم گردیدند.

اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز[1] (SOD)

جهت محاسبه این فاکتور ۳ عدد برگ از هر گیاه در هنگام صبح برداشت شد. سعی بر آن بود که برگ ها کاملاً جوان و

1. Superoxide Dismutase (SOD)

www.SID.ir

Archive of SID

گسترده باشند برگ‌ها داخل نایلون اتیکت گذاری شده قرار گرفتند و سپس در یخدانی که کف آن از یخ پوشیده شده بود قرار داده شدند و به آزمایشگاه منتقل گردیدند. سپس توسط روش (Misra and Fridorich, 1972) 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 به عنوان سوبسترا استفاده شدند، سپس محلول تهیه شده را به آن اضافه کرده، تغییرات جذب نوری حاصله از اکسید اکسیژن اپی نفرین، به عنوان فعالیت آنزیمی ارزیابی شده و از آنزیم استاندارد و خالص جهت استاندارد نمودن نتایج استفاده گردید که واحد آن قادر به اکسیداسیون ۰/۵ میلی مول اپی نفرین در یک دقیقه بود.

اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز[1] (GPX)

در ابتدا برگ‌های منتقل شده به آزمایشگاه با آب مقطر شستشو داده شدند. بلافاصله در بافر فسفات تریس ۰/۱۶ مولار با pH=۷/۵ وارد شده سپس خرد و هموژن شدند. آنگاه اجازه داده شد در حضور حجم مشابه از همان بافر حاوی دیجیتونین و آنزیم هضم کننده، دیواره، فرآیند هضم غشاء و دیواره 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 به روش پاگلیا و ولنتاین(Paglia and Valentine,1987) اندازه‌گیری شد. عصاره استخراجی به محلول بافر حاوی فسفات منو پتاسیک 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 اکسیداسیون NADPH که از طریق تعیین مقدار تغییر جذب در ۳۴۰ نانومتر در ۳۰ درجه سانتی‌گراد توسط دستگاه اسپکترو فتومتر (مدل z-u-shimadzu-u100) اندازه‌گیری گردید. همزمان یک محلول بلانک حاوی تمام مواد فوق بدون حضور عصاره استخراجی برای تصحیح و حذف خطاهای احتمالی مورد استفاده قرار گرفت. یک واحد از فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز معادل مقدار آنزیمی که بتواند یک میکرومول از سوبسترا NADPH را در یک دقیقه کاتالیز کند در نظر گرفته شد. برای استاندارد شدن از نمونه آنزیم گلوتاتیون پراکسید از استاندارد استفاده شد.

اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم کاتالاز[2] (CAT)

جهت محاسبه این آنزیم از برگ های جوان و توسعه یافته استفاده شد و سپس توسط روش پاگلیا و ولنتاین (Paglia and valentine,1987) میزان تغییرات آنزیم تعیین گردید به این صورت که نمونه برگ ها پس از شستشو با آب مقطر بلافاصله در محلول بافر فسفات تریس ۰/۱۶ مول در pH=۷/۵ وارد، خرد و هموژن شدند. سپس حجم مشابه بافر حاوی دیجیتونین آنزیم هضم کننده دیواره اضافه نموده تا فرآیند هضم غشاء و دیواره‌های سلولی صورت گیرد. در آخر به میزان ۰/۵ میلی لیتر از محلول هموژن برای سنجش پروتئین توسط روش (Lowry,1951) برداشته شد و مقدار پروتئین آن بر حسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تعیین گردید. در باقیمانده 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.

1. Catalase (CAT)

2. Glutation Peroxidase (GPX)

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج و بحث:

فعالیت آنزیم‌های سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و گلوتاتیون پراکسیداز (GPX)

نتایج حاصل از تجزیه واریانس (جدول۱) نشان داد که اثر متقابل سطوح سرب و باکتری‌های محرک رشد بر میزان فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز در سطح یک درصد معنی دار است. نتایج به دست آمده از جدول مقایسه میانگین‌ها (شکل۱) نشان داد که بیشترین میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز با میزان فعالیت ۲۱۱۰/۲۵ و ۲۰۶۹/۵ واحد فعالیت بین المللی بر میلی‌گرم پروتئین(u/mg protein) از تیمار تلفیقی به ترتیب شاهد سرب با تلفیق باکتری های محرک رشد و ۲۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک سرب با تلفیق باکتری های محرک رشد به دست آمد. ضمن آنکه کمترین میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز به میزان ۷۳۷/۵ واحد بین المللی بر میلی‌گرم پروتئین و در تیمار تلفیقی شاهد باکتری با ۷۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم سرب در خاک حاصل شد (شکل۱).

سرب با جلوگیری از جذب عناصر ضروری مثل سنتز کلروفیل جلوگیری می کند، دستگاه فتوسنتز به دلیل لیگاندهای پروتئینی S-N- تخریب شده و افزایش فعالیت کلروفیلاز نیز سبب افزایش تخریب کلروفیل در شرایط سمیت سرب می‌شود (Sharma and Dubey,2005). آنزیم سوپراکسید دیسموتاز حمایت کننده‌ی گیاهان در شرایط تنش فلزات سنگین، برای مقابله با گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) تولیدی در شرایط تنش می‌باشد. در اثر شرایط تنش، اکسیژن فعال در گیاه افزایش می‌یابد که در این شرایط گیاه مکانیسم‌های متفاوتی را برای حذف و از بین بردن این گونه‌های فعال اکسیژن به کار می‌گیرد، به نظر می رسد فعال شدن آنزیم های SOD، CAT و GPX در پاسخ به اثرات مخرب اکسیژن‌های تولید شده از سرب در این گونه گیاهی بوده است. کنترل سطح اکسیژن های مخرب توسط این آنزیم ها در شرایط ماندگار مکانیسم مهمی در مقابل تنش اکسیدی در سلول است زیرا ترکیبات به عنوان پیشگامی برای مشتقات سمی تر یا فعال تر عمل می‌کنند (Khatun et al.,2009).

نتایج حاصل از تجزیه واریانس (جدول۱) نشان داد که اثر متقابل سطوح سرب و باکتری‌های محرک رشد بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در سطح احتمال آماری یک درصد معنی دار است. کاتالاز و پراکسیداز، پراکسیداز هیدروژن را کاملا از بین می برند به عبارتی قادر به هضم و حذف H_2O_2 است (Garnczarska and Ratajczak 2000; Khatun *et al.*, 2008). نتایج به دست آمده از جدول مقایسه میانگین‌ها (شکل۲) نشان داد که بیشترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز با میزان فعالیت ۳۴۳، ۳۳۸/۷۵، ۳۳۳/۵ و ۳۳۷ واحد فعالیت بین المللی بر میلی‌گرم پروتئین(u/mg protein) و به ترتیب از تیمارهای شاهد سرب با باکتری سودوموناس، تیمار تلفیق باکتری‌ها و شاهد سرب، تیمار تلفیق باکتری ها و ۲۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم سرب در خاک و نیز تیمار تلفیق باکتری‌ها و ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم سرب در خاک به دست آمدند. ضمن آنکه کمترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز به میزان ۱۸۶ واحد بین المللی بر میلی‌گرم پروتئین و در تیمار عدم مصرف باکتری های محرک رشد با ۷۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم سرب در خاک بود (شکل۲).

از جمله آنزیم‌های محیطی که در مقابله با تنش‌های محیطی نقش مهمی را ایفا می‌کند گلوتاتیون پراکسیداز می باشد که کاهش پراکسید ئیدروژن را با استفاده از گلوتاتیون احیاء شده (GSH) کاتالاز می‌کند و بدین ترتیب از سلول ها در برابر آسیب های ناشی از اکسایش حفاظت می‌کند (قربانی قوژدی و مقدم، ۱۳۸۴). GPX یک آنتی‌اکسیدان کاملا شناخته شده است که نقش مهمی در سیستم تدافعی در مقابل رادیکال‌های آزاد در گیاه ایفا می‌کند گلوتاتیون پراکسیداز از غشاء لیپید در معرض آسیب های اکسیدی محافظت کرده و از پراکسیدازهای آلی سمیت زدایی می‌کند. این ماده همچنین بر روی هیدروپراکسیدازهای آلی نیز عمل می‌کند (Mashhadi akbarboojar and Goodarzi,2007). نتایج تجزیه واریانس(جدول۱) نشان داد که اثر متقابل سطوح سرب و باکتری‌های محرک رشد بر میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون

www.SID.ir

Archive of SID

پراکسیداز در سطح احتمال آماری یک درصد معنی‌دار است. براساس جدول مقایسه میانگین‌ها (شکل۳) مشاهده می‌شود که بیشترین میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز به میزان فعالیت ۱۵۴/۲۲، ۱۵۳/۲۵، ۴۹/۸۲ و ۱۵۴/۷۵ واحد فعالیت بین المللی بر میلی‌گرم پروتئین (u/mg protein) و به ترتیب در تیمارهای تلفیق باکتری‌های محرک رشد و عدم مصرف سرب، تیمار باکتری سودوموناس و عدم مصرف سرب، تیمار تلفیق باکتری ها و ۲۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم سرب در خاک و نیز تیمار تلفیق باکتری‌ها و ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم سرب در خاک به دست آمدند. در آزمایشات مختلف در رابطه با فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت گزارشات متناقضی منتشر شده است، در برخی موارد در اثر تنش فعالیت این آنزیم‌ها افزایش و در برخی موارد دیگر کاهش می‌یابد (Navari-Izzo *et al*.,1996). نتایج کوهلر بر روی کاهو نشان داد که در شرایط نرمال (بدون تنش) گیاهچه‌های تلقیح شده با باکتری میزان فعالیت آنزیم کاتالاز کمتری را نسبت به تیمار شاهد (بدون باکتری) نشان داد (Kohler,2009). عمر(Omar,2009) نیز کاهش در فعالیت آنزیم کاتالاز را در گیاهچه‌های جو تلقیح شده با باکتری آزوسپیریلوم را گزارش کرد. احتمالا این نتایج حاکی از این است که در موارد ذکر شده باکتری‌ها اثر تنش را از طریق مکانیسم دیگری کاهش داده‌اند که از بالارفتن آنزیم‌ها و به خصوص کاتالاز جلوگیری کرده‌اند. راماچاندرا (Ramachandra,2004)، عمان (۱۳۸۳)، ساعی (۱۳۸۳) و شافعی (۱۳۸۴) نیز به این نتیجه رسیدند که در شرایط تنش خشکی فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت افزایش می‌یابد. همچنین گزارشاتی مبنی بر تغییر در الگوی فعالیتی آنزیم های آنتی اکسیدانت در شرایط تنش عناصر سنگین و دیگر تنش های غیر زنده موجود می باشد (Matewally *et al*.,2003).

مطالعات کافی و مهدوی دامغانی (۱۳۷۹) بر روی ارقام جو زراعی، گندم، سویا و نخود نشان می‌دهد که فعالیت کاتالاز جهت کاهش اثرات بد ناشی از تنش‌های مختلف موثر می باشد.

نتیجه‌گیری کلی

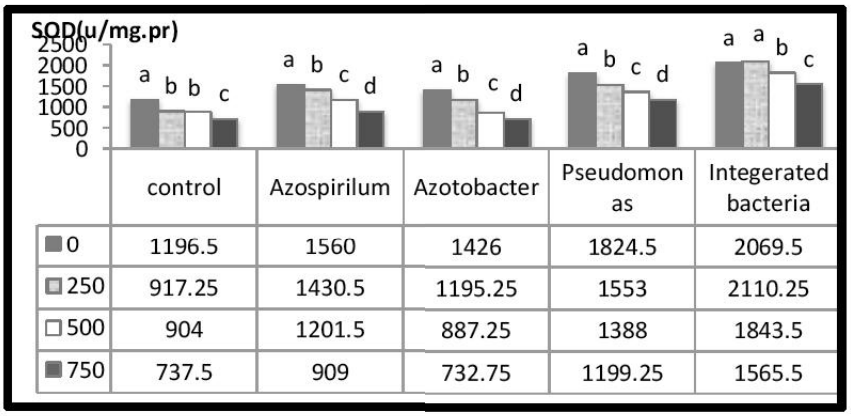
براساس نتایج باکتری‌های محرک رشد از طریق مکانیست تولید آنزیم‌های آنتی اکسیدانت از قبیل SOD، CAT و GPX اثر تنش فلز سنگین سرب را کاهش می‌دهند و این در حالی است که در زمان عدم حضور و کاربرد باکتری‌های محرک رشد گیاه نتوانسته از این طریق واکنش دهد و سطوح بالای سمیت سبب کاهش آنتی اکسیدانت ها شده و در واقع در اینجا گیاه از مکانیسم دیگری احتمالا استفاده کرده که یکی از این مکانیسم ها می‌تواند بالا بردن میزان هورمون‌های گیاهی بوده باشد. می‌توان بیان داشت تحت شرایط تنش باکتری ها کمک بیشتری به جذب عنصر سنگین و نیز عناصر غذایی کرده و سبب تولید بیوماس بیشتر و رشد بهتر گیاه بوده‌اند. پس باکتری‌های محرک رشد با بهبود سطح جذب عناصر غذایی، تولید فیتو هورمون‌ها، سیدروفورها، اسیدهای آلی و... (Maurhofer *et al*.,1999) سبب رشد بهتر گیاه و بهبود فعالیت‌های آنزیمی گیاه در شرایط تنش سرب شدند (Bai *et al*.,2003) در حالی که افزایش غلظت سرب در گیاه کلزا به دلیل اثرات منفی آن بر فعالیت‌های گیاه و جلوگیری از تولید آنزیم‌ها و نیز مکانیسم مقاومتی دیگری که این گیاه تحت شرایط سمیت از خود نشان داده است باشد، زیرا فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت تنها مکانیسم دفاعی گیاه در کاهش خسارت‌های اکسیداتیو نیست و بالا بردن پرولین و هورمون‌های گیاهی نیز می تواند عامل دیگری در کاهش خسارت‌های اکسیداتیو باشد.

سپاسگزاری:

از انجمن علمی زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج به دلیل تامین هزینه‌های مربوط به طرح پژوهشی اینجانب نهایت سپاسگزاری و امتنان را دارم.

www.SID.ir

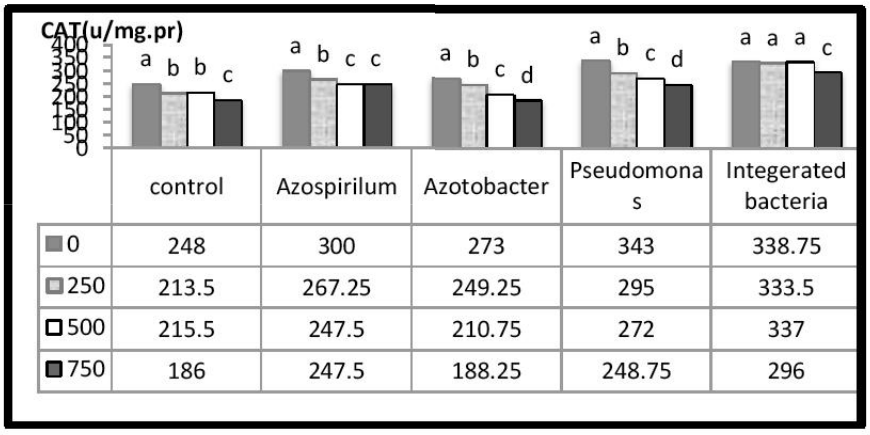
Archive of SID



	control	Azospirilum	Azotobacter	Pseudomonas	Integerated bacteria
0	1196.5	1560	1426	1824.5	2069.5
250	917.25	1430.5	1195.25	1553	2110.25
500	904	1201.5	887.25	1388	1843.5
750	737.5	909	732.75	1199.25	1565.5

شکل۱- بررسی سطوح سرب و باکتری های محرک رشد بر فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز

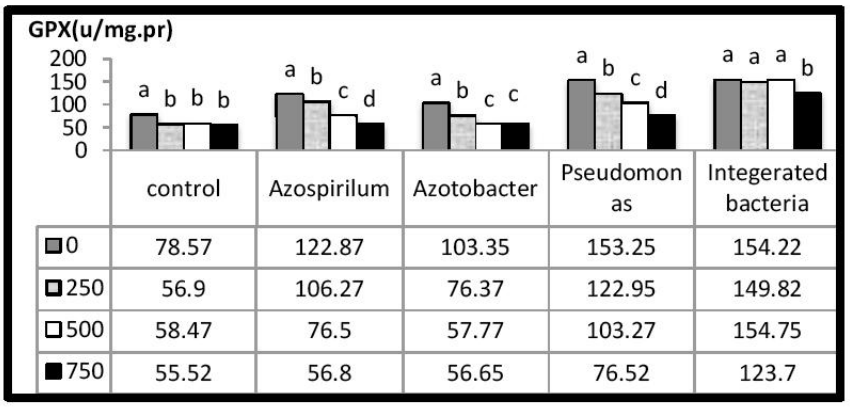
Fig1. Interaction effects of lead levels and plants growth promoting rhizobacteria on SOD enzyme activity



	control	Azospirilum	Azotobacter	Pseudomonas	Integerated bacteria
0	248	300	273	343	338.75
250	213.5	267.25	249.25	295	333.5
500	215.5	247.5	210.75	272	337
750	186	247.5	188.25	248.75	296

شکل۲- بررسی اثر متقابل سطوح سرب و باکتری های محرک رشد بر فعالیت آنزیم کاتالاز

Fig 2. Interaction effects of plants growth promoting rhizobacteria and lead levels on Catalaz enzyme activity



	control	Azospirilum	Azotobacter	Pseudomonas	Integerated bacteria
0	78.57	122.87	103.35	153.25	154.22
250	56.9	106.27	76.37	122.95	149.82
500	58.47	76.5	57.77	103.27	154.75
750	55.52	56.8	56.65	76.52	123.7

شکل۳- بررسی اثر متقابل سطوح سرب و باکتری های محرک رشد بر فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز

Fig 3. Interaction effects of plants growth promoting rhizobacteria and lead levels on Glutation Proxidase enzyme activity

www.SID.ir

Archive of SID

جدول۱- تجزیه واریانس صفات مورد مطالعه

Table. 1: Analysis of variance for studied traits

عوامل تغییرات (S.O.V)	درجه آزادی(df)	میانگین مربعات(MS) کاتالاز Catalase	گلوتاتیون پراکسیداز Glutathion Peroxidase	سوپراکسید دیسموتاز Superoxide Dismutase
A (باکتری های محرک رشد)	4	32253/03**	17774/9**	2305628/5**
B (سرب سطوح)	3	19320/71**	8405/6**	1278124/03**
A*B (اثر متقابل سطوح سرب و باکتری)	12	684/3**	635**	27579/76**
Error (خطا)	57			
ضریب تغییرات (C.V%)		3.92	6.93	3.44

* و**:به ترتیب، معنی دار در سطح احتمال پنج و یک درصد

*,**:significant at 5 & 1% levels for probability, respectively

www.SID.ir

Archive of SID

References **فهرست منابع**

ساعی،م.۱۳۸۳. بررسی برخی صفات مورفولوژیکی با تحمل به خشکی ارقام مختلف سورگوم علوفه ای. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج.

شافعی، س.۱۳۸۴. مطالعه تأثیر تنش کمبود آب بر برخی از خصوصیات فیزیولوژیکی ، عملکرد و اجزای عملکرد ارقام مختلف سویا. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج.

عمان، ع. ۱۳۸۳. بررسی تاثیر تنش خشکی بر عملکرد و اجزاء عملکرد برخی صفات فیزیولوژیکی در ژنوتیپ های مختلف آفتابگردان آجیلی. پایان نامه کارشناسی ارشد دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج.

قربانی قوژدی، ح و ع.، لادن مقدم.۱۳۸۴. مقدمه ای بر تنش های اکسایشی و کرنش های گیاهی. انتشارات مؤسسه نشر دواوین. ۱۴۲صفحه.

کافی، م. و مهدوی، ع. و دامغانی. ۱۳۷۹. ترجمه مکانیسم های مقاومت گیاهان به تنش های محیطی.انتشارات دانشگاه فردوسی.

Al-Barrak, Kh. M. 2006. Irrigation interval and nitrogen level effects on growth and yield of canola.

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

Bai, Y., X. Zhou, and D.L. Smith, 2003. Enhanced soybean plant growth resulting from coinoculation of Bacillus strains with Bradyrhizobium japonicum. Crop Sci., 43: 1774-1781.

Beladi, M. D.Habibi. A.Kashani. F.Paknejad. T.Nooralvandi. 2011. Phytoremediation of lead and copper by sainfoin(Onobrychis vicifolia):Role of antioxidant enzymes and biochemical biomarkers.American-Eurasian J.Agric.Sci.,10(3):440-449.

Brooks,R.R.,Reeves,R.D.,Baker,A.J.M.,Rizzo,J.A.and ferreria,H.D. 1990. The Brazilian serpentine plant expedition .National geographic research.6(2):205-219.

Compant S, Clement C, Sessitsch A. 2010. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. Soil. Biol. Biochem., 42: 669–678.

Dary M, Chamber-Perez MA, Palomares AJ, Pajuelo E. 2010. In situ phytostabilisation of heavy metal polluted soils using Lupinus luteus inoculated with metal resistant plant-growth promoting rhizobacteria. J. Hazard. Mater., 177: 323–330.

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.

Downey, R. K. 1990. Canola: A quality brassica oilseed . J. Agric. Res. 15(1): 211-215.

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

Garcia de Salamone, I.E., R.K. Hynes and L.M. Nelson, 2001. Cytokinin production by plant growth promoting rhizobacteria and selected mutants. Can. J. Microbiol., 47: 404-411.

Garnczarska, M., L. Ratajczak. 2000. Metabolic responses of Lemna minor to lead ions, II. Induction of antioxi-

www.SID.ir

Archive of SID

dant enzymes in roots. Acta physiologiae plantarum, 22: 429-432.

Glick BR. 2010. Using soil bacteria to facilitate phytoremediation. Biotechnol. Adv., 28: 367–374.

Grandlic CJ, Mendez MO, Chorover J, Machado B, Maier RM. 2008. Plant growth-promoting bacteria for phytostabilization of mine tailings. Int. J. Environ. Sci. Technol., 42: 2079–2084.

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.

Hsieh,J.L.,C.Y.Chen,M.H.Chiu,M.F.Chein,J.S.Chang,G.Endo,C.C.Huang.2009. bacterial mercuric ion binding protein in plant for phytoremediation Expressing aof Heavy metals.J.of Hazarous Materials.161: 920-925.

Idris R, Trifonova R, Puschenreiter M, Wenzel WW, Sessitsch A.2004. Bacterial communities associated with flowering plants of the Ni hyperaccumulator Thlaspi goesingense. Appl. Environ. Microbiol., 70: 2667–2677.

Khatun, S., M. B. Ali, E. J. Hahn, K. Y. Paek. 2008. Cooper toxicity in withania somnifera: Growth and antioxidant enzymes responses of in vitro grown plants. Journal of Experimental Botany, 47, 259-266.

Klute, A., 1986. "Method of soil analysis." Part1: Physical methods. Soi. Sci SOC. Ameri. J. PP: 432-449.

Knox, A. S., A. P. Gamerdignger. D. C. Adriano, R. K. Kolla and T. Kaplan. 1999. Sources and practices contributing to soil contamination. PP. 53- 62. In: T. Kaplan(Ed) Bioremediation of contaminated soils, Am. Soc. Agron., Madison, WI.Garbisu, C. and I. Alkorta., 2001; Phytoextraction: acosteffective plant based technology for the removal of metals from the environment. Bioresource Technology, 779 (2001) PP: 229- 236.

Kohler, J., J. Antonio Hernandes, F. Caravaca, A. Roldan. 2009. Induction of antioxidant enzymes is involved in the greater effectiveness of a PGPR versus AM fungi with respect to increasing the tolerance of lettuce to severe salt stress. Enviromental and Experimental Botany 65. p: 245-252.

Kuffner M, Puschenreiter M, Wieshammer G, Gorfer M, Sessitsch A.2008. Rhizosphere bacteria affect growth and metal uptake of heavy metal accumulating willows. Plant Soil., 304: 35–44.

Kupper,H.Küpper,F.and Spiller,M.1996. Environmental relevance of heavy metal-substituted chlorophylls using the example of water plants. Journal of Experimental Botany, 47, 259-266

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

Malcova,R.,M.Vosatka and M.Gryndler.2003. Effects of inoculation with Glomus intraradices on lead uptake by (Zea mays L.) and (Agrostis capilaris L.) Applied Soil Ecol.23: 255-26.

Mashhadi Akbar boojar. M., F. Goodarzi. 2007. The copper tolerance staregies and the role of antioxidative enzymes in three plant species grown on copper mine. Chemosphere, 67, 2138-2147.

Matewally, A.,I.Finkemeir.M. Georgi, K –j.Dietz, (2003). Salicylic acid alleviates cadmiumtoxicity in barley seedlings, Plant Physiol. 132,272-281.

Mattina, M. J.I., Lannucci-Berger,W.,Musante. C., White,J.C., 2003; Concurrent plant uptake of havey metal and persistent organic poIlutants from soil. Environmental Pollution

Maurhofer, M., C. Keel, U. Schnider, C. Voisard, D. Hass and G. Defago, 1999. Influence of enhanced antibiotic production in Pseudomonas fluorescens strain CHAO on its disease suppressive capacity. Phytopathology, 82: 190-195.

www.SID.ir

Archive of SID

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

Navari-Izzo, F., Quartacci, M. F., Pinzino, O., Dalla Vecchia, F., Sgherii C. L. M., 1998. Thilakoid-bound and stromal antioxidative enzymes in wheat treated with exess copper. Plant physiology. 104: 630-638.

Niu, Z. X., L. Sun, Y. Sun, L. I. H. Wang. 2007. Evaluation of phytoextracting cadmium and lead by sunflower, ricinus, alfalfa and mustard in hydroponic culture. Journal of Environmental Sciences 19: 961–967.

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 glutation proxidase.J.Lab.Med.70:158-165.

Rajkumar M, Ae N, Prasad MNV, Freitas H 2010. Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. Trends. Biotechnol., 28: 142–149.

Ramachandra. R., chaitanya, K.V., P.P., Jutur and K. Sumithra. 2004. Differential antioxidative response to weather Stress among five mulberry Cultivars. Environement and Experimental Botany.

Reeres, R. D., and A. J. M Baker., 1999; Metal-accunulating plant. In phytorememediation of toxic metals: Using plants to clean up the environment, eds. I.Raskin and B. D. Ensley, PP 1930; John Wiley& Sons Inc, New York, NY.

Ryan,M.H.and J.F.Angus.2003. Arbuscular mycorrhizae in wheat and field pea crops on a low P soil:Increased Zn-uptake but no increase in P uptake or yield.Plant Soil.250: 225-239.

Scandalios J.G. 1997. Molecular genetics of superoxide dismutase in plants. In Scandalios, J.G. (ed.). Oxidative Stress and The Molecular Biology of Antioxidant Defenses. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 527-568.

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

Sharma, S, and K. Dietz. 2006. The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress. Journal of Experimental Botany. 57: 711–726.

Yancheshmeh, J., K.Khavazi., E.Pazira and M.Solhi. 2011. Evaluation of inoculation of plant growth-promoting rhizobacteria on cadmium and lead uptake by canola and barley. African Journal of Microbiology Research.5(14):1747-1755.

Zhu,Y.,H.Yu, J.L.Wang,W.Fang,J.G.Yuan , and Z.Y.Yang. 2007. Heavy metal accumulations of 24 bean cultivars grown in soil contaminated with cd alone and with multiple metals (Cd, Pb, and Zn).J.of Agric.and Food Chemistry.55: 1045-1052.

www.SID.ir