Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 15:09 IRST on Monday November 20th 2017

القاء مکانیسم دفاعی آنتی اکسیدان در گیاهچه‌های فستوکا تلقیح شده با قارچ *Glomus intraradices* تحت تنش سمیت نیکل

معصومه رفیعی دمنه، لیلا شبانی و مجید شریفی تهرانی

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۴/۲۸؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۶/۱۷)

چکیده:

تنش فلزات سنگین در گیاهان به ایجاد تنش اکسیداتیو و تولید گونه‌های اکسیژن فعال منجر می‌شود. گیاهان برای تعدیل این تنش دفاع آنتی اکسیداتیو از جمله افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان را در پیش می‌گیرند. در این مطالعه نقش قارچ میکوریز آربسکولار *Glomus intraradices* به عنوان یکی از میکروارگانیسم‌های همزیست با گیاه بر برخی شاخص‌های رشد و فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان تحت تنش سمیت فلز سنگین نیکل بررسی شد. در این آزمایش گیاهچه‌های فستوکا به دو حالت آلوده به قارچ (M^+) و عاری از آن (-M) تحت ۴ غلظت نیکل (۰، ۳۰، ۹۰ و ۱۸۰ میلی گرم در کیلوگرم) در خاک استریل به مدت سه ماه کشت داده شد. نتایج آزمایش نشان داد که تیمار نیکل باعث کاهش وزن تر و طول اندام هوایی شد در حالی که این شاخص‌های رشد در گیاهچه‌های فستوکای M^+ بیشتر از انواع -M آنها بود. با افزایش غلظت نیکل شاخص نشت الکترولیتی غشاء افزایش یافت و مقدار آن در گیاهچه‌های فستوکا M^- بیشتر از گیاهان M^+ بود. همچنین نتایج حاصل از اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان نشان داد حضور قارچ، سبب افزایش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، گایاکول پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز در شرایط سمیت نیکل شد اما تأثیری بر فعالیت آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز نداشت. حضور قارچ همچنین بر فعالیت آنزیم گلوتاتیون اس ترانسفراز اثر منفی داشت. حضور قارچ *Glomus intraradices* در گیاهچه‌های فستوکا باعث تقویت سیستم آنتی اکسیدن شده و همچنین اثرهای منفی سمیت نیکل را در این گیاهچه ها کاهش داد.

واژه های کلیدی: آنزیم آنتی اکسیدان، فسکیوی بلند، قارچ میکوریز آربسکولار، نیکل.

مقدمه:

قارچ‌های میکوریز آربسکولار میکروارگانیسم‌های خاک هستند که همزیستی دو طرفه با اکثر گیاهان عالی برقرار می کنند. همزیستی میکوریز آربسکولار تقریباً در همه نوع آب و هوا و بوم‌ها از جمله خاک‌های مختل شده و مشتق شده از فعالیت‌های معدنی رخ می‌دهد (Enkhtuya *et al*., 2000). کلونیزاسیون این قارچ‌ها با کورتکس ریشه گیاهان و توسعه میسلیوم خارجی آن‌ها، باعث گسترش ریشه‌های گیاه به خاک‌های اطراف می‌شود و جذب عناصر پرنیاز (مثل نیتروژن و فسفر) و کم نیاز (مثل مس و روی) را افزایش می‌دهد (Smith and Read, 2008). به عبارت دیگر تحت شرایط سطوح بالای فلزات ضروری، یا در

*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: lshabani@gmail.com

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 15:09 IRST on Monday November 20th 2017

حضور غلظت‌های سمی آن‌ها، قارچ‌های میکوریز آربسکولار قادرند سمیت فلزات را در گیاهان تعدیل کنند (Leyval *et al*., 2002). با وجود نقش مهمی که این قارچ ها در ارتباط گیاه با محیط خاک ایفا می‌کنند، تاکنون گزارش‌های اندکی بر درک مکانیسم‌های سلولی که سمیت فلزات سنگین را در گیاه کنترل می‌کنند ارائه شده است (Göhre and Paszkowski, 2006; Hildebrandt *et al*., 2007; Gonzalez-Guerrero *et al*., 2009). در غلظت‌های بالای فلزات سنگین در خاک، قارچ میکوریز آربسکولار راهکارهایی برای غیر متحرک کردن فلزات به کار می‌برد. این راهکارها شامل رسوب به همراه پلی فسفات در خاک، جذب فلزات سنگین در دیواره سلولی قارچ و کلات کردن آن در قارچ، ترشح گلیکوپروتئین غیر محلول گلومالین و اتصال آن به فلزات سنگین در خاک، اتصال فلزات سنگین به کیتین در دیواره سلولی قارچ و کاهش غلظت آن در خاک هستند (Göhre and Paszkowski, 2006).

نیکل یکی از عناصر ضروری کم نیاز برای گیاهان است و نقش آن در رشد و به ویژه فعالیت آنزیم اوره آز به اثبات رسیده است. اما نیکل به عنوان یک فلز سنگین به ویژه در غلظت‌های بالا موجب بروز تنش اکسیداتیو می‌شود (Woźniak and Błasiak, 2002). قرارگیری سلول‌ها در معرض گونه‌های اکسیژن فعال منجر به پراکسیداسیون لیپید، تغییر ساختار غشای سلول‌ها، بازدارندگی رشد گیاه، نابودی ماکرومولکول‌های بیولوژیکی، نشت یون و در هم گسیختن رشته DNA می‌شود (Quartacci *et al*., 2001). یکی از مکانیسم‌های پاکروبی گونه‌های اکسیژن فعال در گیاهان، فعالیت آنزیم‌ها از جمله سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، آسکوربات پراکسیداز (APX) و گلوتاتیون ردوکتاز (GR) است (Schützendübel and Polle, 2002). سوپراکسید دیسموتاز دیسموتاسیون دو مولکول سوپراکسید را به آب و اکسیژن کاتالیز می‌کند، کاتالاز در رفع پراکسید هیدروژن دخالت می‌کند، آسکوربات پراکسیداز با کمک آسکوربات به عنوان دهنده الکترون پراکسید هیدروژن را به آب احیا می‌کند (Asada, 1992)، و گلوتاتیون ردوکتاز در کنترل درونی پراکسید هیدروژن از طریق چرخه اکسید و ردوکتاز که گلوتاتیون و آسکوربات در آن دخیل اند نقش ایفا می‌کند (Smith *et al*., 1989). آنزیم گلوتاتیون اس ترانسفراز (GST) در سم زدایی مواد داخلی (متابولیت های داخل سلولی) و خارجی (داروها، حشره کش ها و فلزات سنگین) از طریق تشکیل کانجوگه گلوتاتیون دخالت دارد (Hayes and Pulford, 1995).

تاکنون تحقیقات زیادی در زمینه تأثیر تنش فلزات سنگین بر فعالیت سیستم آنتی اکسیدان گیاهان صورت گرفته (Abdel Latef, 2011; Ahmed *et al*., 2010)، ولی اثر قارچ میکوریز بر پاسخ آنتی اکسیدانی گیاهان به سمیت فلزات سنگین کمتر مورد توجه قرار گرفته است. آلودگی روبه افزایش زمین‌های مرتعی و کشاورزی با فلزات سنگین، لزوم بررسی آسیب‌های احتمالی پوشش‌های گیاهی این مناطق و راه‌های افزایش مقاومت آنها را در برابر تنش فلزات سنگین برای ما آشکار می‌کند. لذا در این پژوهش نقش همزیستی قارچ *Glomus intraradices* بر کاهش اثرات سمیت نیکل در گیاه فسکیوی بلند با تاکید بر فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان بررسی می‌گردد.

مواد و روش‌ها

کشت بذر و اعمال تیمار به خاک: پس از ضدعفونی بذرهای گیاه *Festuca arundinaceae* رقم vigor، به منظور جوانه زنی به ظروف پتری منتقل شدند. بذرهای جوانه زده در گلدان‌های حاوی ماسه استریل کاشته شد و از مایه تلقیح قارچ *Glomus intraradices* (تهیه شده از شرکت زیست فناور توران، سمنان) برای تلقیح بذرهای فستوکا استفاده گردید. گیاهچه‌ها به دو صورت بدون قارچ و تلقیح با قارچ با غلظت‌های کنترل، ۳۰، ۹۰ و ۱۸۰ میلی گرم در کیلوگرم نیکل تیمار شدند. انتخاب این غلظت‌ها با توجه به غلظت‌های معمول و ایجاد کننده سمیت نیکل در گیاهان مشابه صورت گرفت (Khalid and Tinsley, 1980). گلدان‌ها در گلخانه در شرایط کنترل شده نگهداری شدند و پس از سه ماه گیاهچه‌ها جهت بررسی وزن تر و طول

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 15:09 IRST on Monday November 20th 2017

اندام هوایی، درصد نشت الکترولیتی غشاء و میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان (کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز، گایاکول پراکسیداز، گلوتاتیون ردوکتاز و گلوتاتیون اس ترانسفراز) برداشت شدند.

سنجش صفات مورفولوژیکی: ابتدا نمونه‌ها شسته شده و رطوبت اضافی آن با کاغذ صافی گرفته شد. وزن تر اندام هوایی گیاهان پس از قطع ریشه‌ها از محل طوقه بر حسب گرم اندازه گیری شد. متوسط طول اندام هوایی از محل طوقه تا نوک برگ‌ها در تیمارهای مختلف با خط کش اندازه گیری و بر حسب سانتی‌متر گزارش شد.

درصد نشت الکترولیتی غشا: مقدار۰/۱ گرم از بافت برگ از هرتکرار را به دقت شسته و سپس در لوله آزمایش درپوش دار محتوی ۵ میلی لیتر آب دوبار تقطیر قرار داده شد. این لوله‌ها به مدت ۱/۵ ساعت در دمای اتاق قرار داده شدند. هدایت الکتریکی آنها با استفاده از EC متر (CONSORT C933) اندازه گیری شد. پس از آن به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد در حمام آب گرم قرار گرفتند. نمونه‌ها سرد شده به مدت ۳ دقیقه در دور ۱۵۰۰g در دمای اتاق سانتریفوژ شدند و دو مرتبه هدایت الکتریکی آنها اندازه گیری شد. درصد هدایت الکتریکی مطابق رابطه زیر محاسبه شد. EC_1 و EC_2 هدایت الکتریکی محلول‌ها به ترتیب قبل و بعد از جوشیدن هستند (Hara, 2010).

$$EC = \frac{EC_1}{EC_2} \times 10$$

تهیه عصاره آنزیمی: به منظور استخراج آنزیم ۰/۱ گرم از بافت تازه برگ گیاهچه‌های شاهد و تحت تیمار در هاون چینی حاوی ۱/۵ میلی لیتر محلول بافر عصاره‌گیری سالین فسفات با pH= ۷/۸ سائیده شد. عصاره‌های حاصل به مدت ۲۰ دقیقه و با دور rpm ۱۳۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شدند. از محلول رویی جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان استفاده گردید.

سنجش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان: به منظور تعیین فعالیت آنزیم کاتالاز مقدار ۵۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی با ۹۵۰ میکرولیتر از محلول واکنش حاوی ۱۰mM آب اکسیژنه در بافر PBS مخلوط گردید و منحنی کاهش جذب در طول موج ۲۴۰ نانومتر در مدت ۱۲۰ ثانیه رسم گردید. یک واحد از فعالیت آنزیم کاتالاز بر اساس سرعت مصرف $1\mu mol\ min^{-1}$ آب اکسیژنه در دمای ۲۵ °C بیان گردید(Aebi *et al*., 1983).

سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز به روش Beyer و Fridovich (۱۹۸۷) صورت گرفت. یک میلی لیتر مخلوط واکنش شامل بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی مولار (pH=۷/۸)، متیونین (۹/۹ میلی مولار)، تریتون X-100 (۰/۰۲۵ درصد)، نیتروبلوتترازولیوم (۵۷ میکرو مولار) و ۲۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی به همراه ۱۰ میکرولیتر ریبووفلاوین (۰/۰۰۴ درصد) در لوله آزمایش ریخته شد. مخلوط حاصل به مدت ۷ دقیقه در یک محفظه دارای دو لامپ فلورسنت ۲۰ وات قرار داده شد. افزایش در جذب به واسطه تشکیل فورمازان در طول موج ۵۶۰ نانومتر خوانش شد. طبق شرایط توصیف شده افزایش در جذب در نمونه بدون عصاره آنزیمی معادل ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شدو فعالیت آنزیم با تعیین درصد ممانعت در دقیقه محاسبه گردید. ۵۰ درصد ممانعت معادل با ۱ واحد فعالیت آنزیم در نظر گرفته شد.

مخلوط واکنش برای اندازه‌گیری آنزیم گایاکول پراکسیداز مطابق با روش Lin و Kao (۱۹۹۹) حاوی ۳ میلی لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با pH= ۷، ۳/۳۵ میکرولیتر گایاکول ۹ میلی‌مولار و ۴/۵۱ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۱۹ میلی‌مولار و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی در کوت مخلوط شد. کینتیک جذب در طول موج ۴۷۰ نانومتر در دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول ۱ دقیقه اندازه‌گیری شد. یک واحد فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز به عنوان مقدار آنزیمی که باعث تشکیل ۱ میکرومولار تتراگایاکول در دقیقه می شود، تعریف شد.

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز از طریق کاهش در جذب ۲۹۰ نانومتر به مدت ۶۰ ثانیه اندازه گیری شد. مخلوط سنجش شده حاوی ۶۲۵ میکرولیتر بافر فسفات

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 15:09 IRST on Monday November 20th 2017

حاوی EDTA، ۱۷۵ میکرولیتر آسکوربیک‌اسید، ۵۰ میکرولیتر H_2O_2، ۵۰ میکرولیتر BSA و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی است (Nakano and Asada, 1987).

مخلوط واکنش برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز مطابق با روش Foyer و Halliwell (۱۹۷۶) حاوی ۲۵۰ میکرولیتر بافر پتاسیم فسفات (۱۰۰ میلی مولار،pH=۷/۸)، ۵۰ میکرولیتر گلوتاتیون اکسید شده (۱۰ میلی مولار)، ۱۲۰ میکرولیتر NADPH (۱ میلی مولار) و ۴۸۰ میکرولیتر آب مقطر است. به مخلوط واکنش حاصل ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی افزوده و مصرف NADPH در یک دقیقه در طول موج ۳۴۰ نانومتر در دستگاه اسپکتروفتومتر کینتیک خوانش شد.

فعالیت آنزیم گلوتاتیون اس ترانسفراز مطابق با روش Carmagnol (۱۹۸۱) اندازه گیری شد. به این صورت که منحنی کاهش جذب در ۳۴۰ نانومتر ناشی از اکسیداسیون گلوتاتیون در مدت ۵ دقیقه رسم گردید. مخلوط واکنش برای اندازه گیری حاوی ۱۰۰ میلی مولار بافر فسفات سدیم (pH=۶/۵)، ۷۵ میلی مولار گلوتاتیون، ۳۰ میلی مولار ۱- کلرو ۲و۴- دی نیترو بنزن (CDNB) در اتانول بود. واکنش با افزودن ۲۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی شروع شد.

تجزیه و تحلیل آماری: این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی در ۳ تکرار اجرا گردید. در این حالت ۴ غلظت نیکل (کنترل، ۳۰، ۹۰ و ۱۸۰) و دو حالت قارچ (با و بدون میکوریز) به عنوان فاکتورها در نظر گرفته شد. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم افزار SAS و MSTATC انجام گرفت و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون حداقل تفاوت معنی دار (LSD) (P<۰/۰۵) مشخص شد.

نتایج:

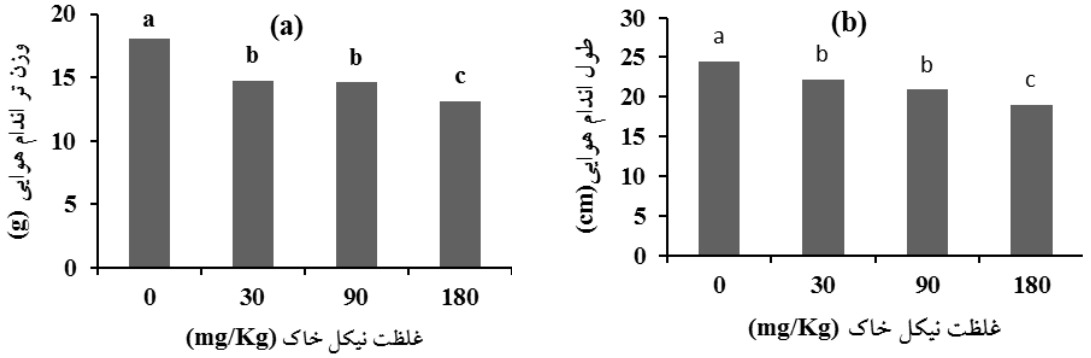
تأثیر نیکل و قارچ *G. intraradices* هر کدام به طور جداگانه بر وزن تر و طول اندام هوایی معنی دار بود. نتایج نشان داد که تیمار نیکل باعث کاهش وزن تر و طول اندام هوایی گیاهچه‌های فستوکا شد. با افزایش غلظت نیکل در خاک، کاهش معنی داری در شاخص وزن تر و طول اندام هوایی بترتیب برابر ٪۲۷/۳ و ٪۲۲/۴ مشاهده شد و کمترین میزان وزن تر و طول اندام هوایی در بالاترین غلظت نیکل (۱۸۰ میلی گرم بر کیلوگرم) مشاهده شد (شکل ۱). تأثیر قارچ *G. intraradices* نیز بر این شاخص‌ها معنی دار بود. گیاهچه‌های تلقیح شده با قارچ (+M) بترتیب ٪۱۴ و ٪۷ وزن تر و طول اندام هوایی بیشتری نسبت به گیاهچه‌های فاقد قارچ (-M) نشان دادند (شکل ۲). تأثیر متقابل نیکل و قارچ بر شاخص‌های وزن تر و طول اندام هوایی معنی دار نبود.

تأثیر دو متغیر نیکل و قارچ هر کدام به طور جداگانه، بر درصد نشت الکترولیتی غشا در گیاهچه‌های فستوکا معنی دار ($p<0.05$) بود. با افزایش غلظت نیکل خاک میزان نشت الکترولیت غشا نسبت به شاهد ۲/۷ برابر افزایش نشان داد (شکل ۳). در گیاهچه-های فستوکای M^+ درصد نشت الکترولیتی غشا ٪۲۱ کمتر از گیاهچه‌های فستوکای M^- بود (شکل ۴).

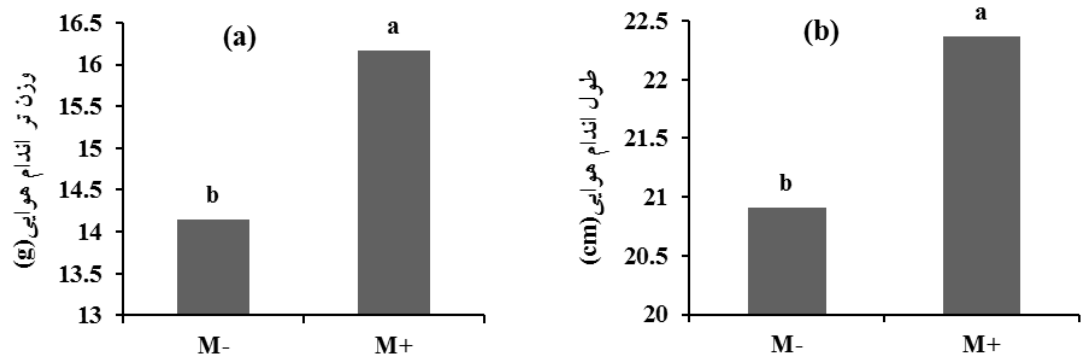
اثر متقابل نیکل و قارچ مایکوریز بر فعالیت آنزیم کاتالاز معنی دار بود (شکل ۵-a). گیاهچه‌های فستوکا M^+ فعالیت بیشتری از آنزیم کاتالاز را نسبت به گیاهچه‌های فستوکا M^- داشتند. به طوری‌که فعالیت این آنزیم در گیاهچه های آلوده با قارچ *G. intraradices* نسبت به گیاهچه‌های فاقد قارچ ۲/۲ برابر در شاهد، ٪۲۹ در تیمار ۹۰ میلی گرم بر کیلوگرم و ٪۲۵/۶ در تیمار ۱۸۰ میلی گرم بر کیلوگرم، افزایش معنی دار نشان داد. در گیاهچه‌های M^- با افزایش غلظت نیکل روند فعالیت آنزیم به صورت افزایشی بود و بالاترین فعالیت آنزیم در تیمار ۹۰ میلی گرم بر کیلوگرم نسبت به شاهد مشاهده شد (٪۵۵/۶). در گیاهچه‌های فستوکا M^+ با افزایش غلظت نیکل روند کاهشی معنی داری در تیمارهای ۹۰ میلی گرم بر کیلوگرم(٪۷/۸) و ۱۸۰ میلی گرم بر کیلوگرم (٪۲۸) با شاهد مشاهده شد.

تأثیر تیمار نیکل بر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز معنی دار بود، اما قارچ *G.intraradices* بر فعالیت این

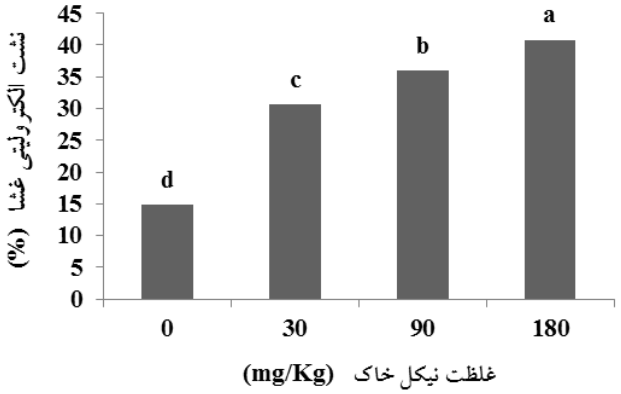
Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 15:09 IRST on Monday November 20th 2017



شکل ۱- مقایسه میانگین شاخص وزن تر اندام هوایی (a) و طول اندام هوایی (b) در سطوح مختلف تیمار نیکل در گیاهچه‌های فسکیوی بلند. حروف متفاوت بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است.



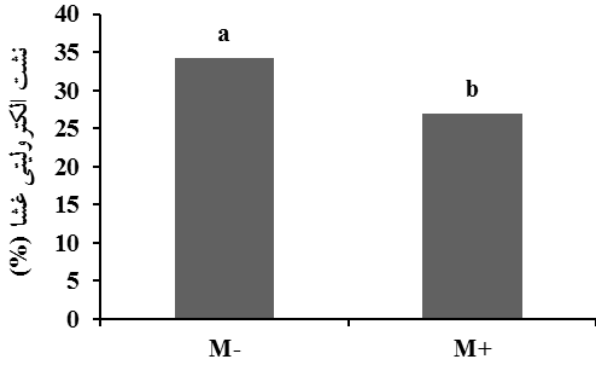
شکل ۲- مقایسه میانگین وزن تر اندام هوایی (a) و طول اندام هوایی (b) در گیاهچه‌های حاوی قارچ (+M) و فاقد قارچ (-M) فسکیوی بلند. حروف متفاوت بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است.



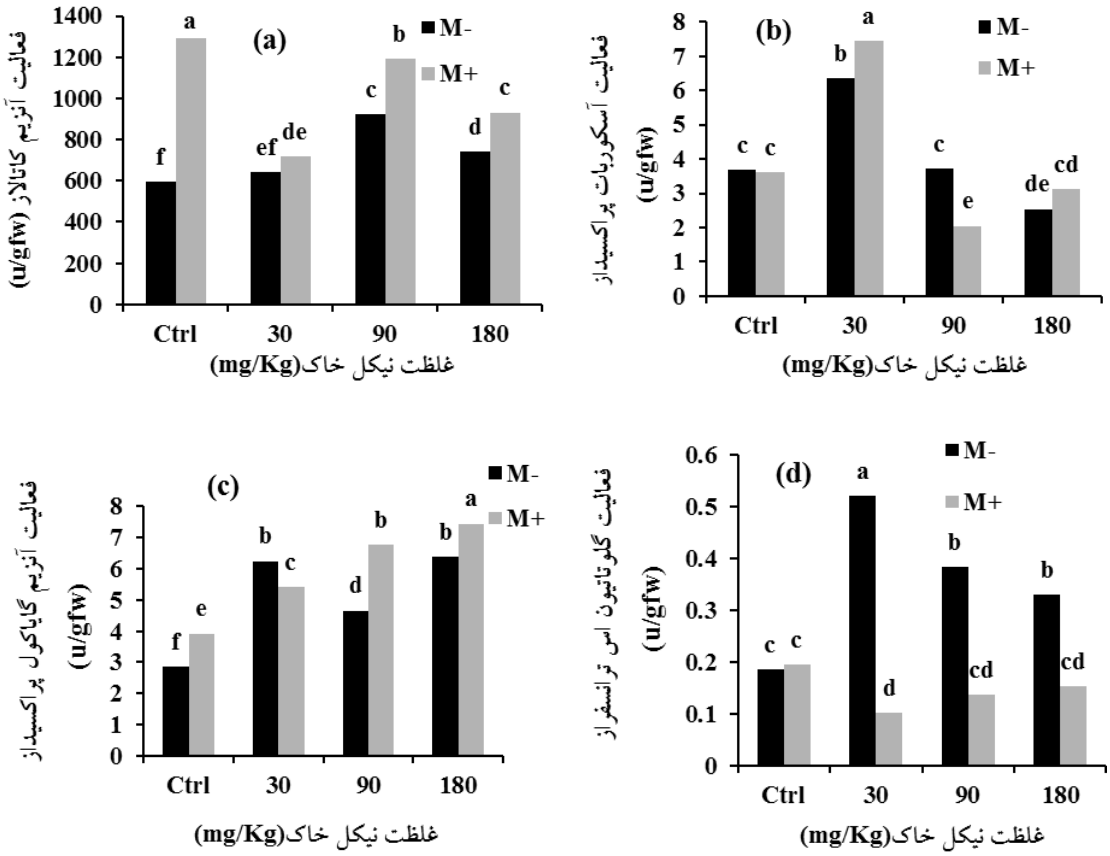
شکل ۳- مقایسه میانگین نشت الکترولیتی غشا در سطوح مختلف تیمار نیکل گیاهچه‌های فسکیوی بلند. حروف متفاوت بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است.

آنزیم تأثیر معنی داری نداشت. در گیاهچه‌های فستوکای -M و +M بیشترین فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در تیمار ۳۰ میلی گرم بر کیلوگرم مشاهده شد و به ترتیب ۷۳/۴٪ و ۲ برابر نسبت به شاهد افزایش نشان دادند. با

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 15:09 IRST on Monday November 20th 2017



شکل ۴- مقایسه میانگین نشت الکترولیتی غشا در گیاهچه‌های حاوی قارچ (+M) و فاقد قارچ (-M) فسکیوی بلند. حروف متفاوت بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است.

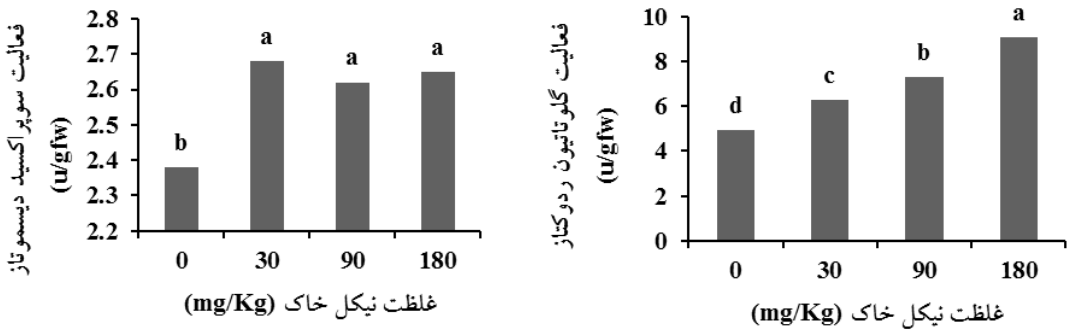


شکل ۵- برهمکنش نیکل و قارچ *G. intraradices* بر فعالیت آنزیم کاتالاز (a)، آسکوربات پراکسیداز (b)، گایاکول پراکسیداز (c) و گلوتاتیون اس ترانسفراز (d) در فسکیوی بلند. (حروف غیر یکسان بیانگر اختلاف معنی‌دار میانگین‌ها در سطح ۰/۰۵ آزمون LSD است).

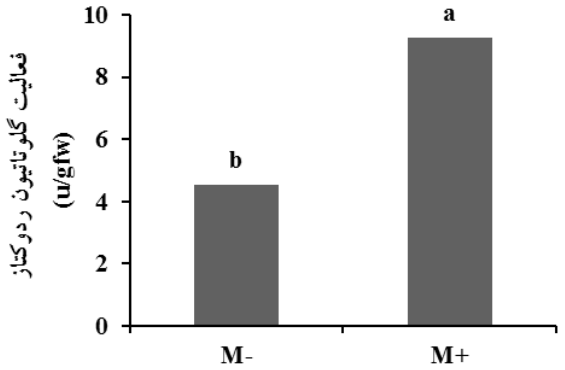
افزایش غلظت نیکل (غلظت‌های ۹۰ و ۱۸۰ میلی گرم بر کیلوگرم) فعالیت آنزیم در گیاهچه‌های فستوکا -M و +M کاهش یافت (شکل ۵-b).

در گیاهچه‌های M^+ با افزایش غلظت نیکل روند افزایشی معنی‌داری در فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز مشاهده شد. به طوری‌که فعالیت این آنزیم در تیمار ۱۸۰میلی گرم

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 15:09 IRST on Monday November 20th 2017



شکل ۶- مقایسه میانگین فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (a) و گلوتاتیون ردوکتاز (b) در سطوح مختلف تیمار نیکل در گیاهچه‌های فسکیوی بلند. حروف متفاوت بیانگر اختلاف معنی دار در سطح ۰/۰۵ است.



شکل ۷- مقایسه میانگین فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز در گیاهچه های حاوی قارچ (+M) و فاقد قارچ (-M) فسکیوی بلند. حروف متفاوت بیانگر اختلاف معنی دار در سطح ۰/۰۵ است.

بر کیلوگرم نسبت به شاهد ٪۹۰ افزایش نشان داد. در حالی‌که در گیاهچه‌های M^- هر یک از تیمارهای نیکل نسبت به شاهد تفاوت معنی داری داشتند ولی روند منظمی بین آن‌ها مشاهده نشد. به طوری‌که در تیمارهای ۳۰ و ۱۸۰ میلی گرم بر کیلوگرم نسبت به شاهد ۲/۲ برابر و در تیمار ۹۰ میلی گرم بر کیلوگرم نسبت به شاهد، ٪۶۳ افزایش در فعالیت این آنزیم مشاهده شد (شکل ۵- c).

مطابق شکل (۵-d) در گیاهچه‌های M^-، بیشترین فعالیت آنزیم گلوتاتیون اس ترانسفراز در تیمار ۳۰ میلی گرم بر کیلوگرم نیکل مشاهده شد که ۲/۸ برابر نسبت به شاهد افزایش نشان داد و در تیمارهای ۹۰ و ۱۸۰ میلی گرم بر کیلوگرم نسبت به شاهد ۲ برابر افزایش نشان داد. فعالیت آنزیم گلوتاتیون اس ترانسفراز در گیاهچه‌های فستوکای M^- در مقایسه با گیاهچه‌های M^+ بالاتر بود. با افزایش غلظت نیکل در خاک تغییری در فعالیت این آنزیم در گیاهچه‌های آلوده به قارچ مشاهده نشد.

نیکل تأثیر معنی داری بر فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون ردوکتاز نشان داد. به طوری‌که با افزایش غلظت نیکل خاک فعالیت این آنزیم‌ها به ترتیب ٪۱۲/۶ و ٪۸۳/۲ نسبت به شاهد افزایش نشان داد (شکل ۶). حضورقارچ *G.intraradices* در گیاهچه های فستوکا تاثیری بر فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز نداشت ولی فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز را تا ۲ برابر نسبت به گیاهان فاقد قارچ افزایش داد (شکل ۷). برهمکنش نیکل و قارچ بر فعالیت این دو آنزیم در گیاهچه‌های فستوکا معنی دار نبود.

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 15:09 IRST on Monday November 20th 2017

بحث:

گزارش شده است که فلزات سنگین از جمله نیکل در غلظت‌های زیاد باعث کاهش وزن تر و خشک ریشه، ساقه و برگ گیاهان می‌شوند. در این راستا Hartley و همکاران (۱۹۹۹) با مطالعه روی کاج و Yang و همکاران (۱۹۹۶) با مطالعه روی جو و برنج گزارش کردند که طول ریشه و اندام هوایی این گیاهان با افزایش غلظت نیکل کاهش می‌یابد. نتایج حاصل از این پژوهش نیز نشان دهنده کاهش وزن تر و طول اندام هوایی گیاهچه‌های فستوکا با افزایش غلظت نیکل بود. به نظر می رسد که آستانه سمیت نیکل در گیاهچه‌های فستوکای ۳۰ میلی گرم بر کیلوگرم است. غلظت‌های سمی نیکل از طریق تغییر در ساختار غشای سلول‌های ریشه و کاهش سطوح جذب‌کننده آب، منجر به کاهش پتانسیل آب گیاه شده که تأثیر منفی بر فرآیندهای فیزیولوژیکی نظیر تعرق، تنفس، فتوسنتز و در نهایت کاهش رشد گیاه را به دنبال داشته است (Fuentes *et al*., 2007). از سوی دیگر یکی از علت‌های مهم آسیب بافتی در گیاهانی که در معرض فلزات سنگین قرار می‌گیرند، ایجاد تنش اکسیداتیو است. رادیکال‌های اکسیژن عمدتاً در کلروپلاست و میتوکندری تولید می‌شوند و ایجاد آسیب‌های اکسیداتیو بر چربی‌ها، پروتئین‌ها و نوکلئیک اسیدها، سبب اختلال در متابولیسم طبیعی سلول، اختلال در فرآیندهای مهم تنفس و فتوسنتز و کاهش رشد می‌شود (Mishra *et al*., 2006). از طرفی مشخص شده است که همزیستی گیاهان با میکروارگانیسم‌های خاک از جمله قارچ‌های میکوریز، پاسخ‌های گیاه را به تنش فلزات تغییر می‌دهد و تحمل گیاه را در خاک‌های آلوده به فلزات افزایش می‌دهد (Göhre and Paszkowski, 2006). در این پژوهش، کلونیزاسیون میکوریزی شاخص های وزن تر و طول اندام هوایی را در مقایسه با گیاهچه های فاقد قارچ (M-) در خاک‌های آلوده به نیکل افزایش داده است، که نشان دهنده کارایی همزیستی است. کاهش قابلیت سمیت فلزات از طریق اثرگذاری قارچ بر جذب فلزات، منفعتی است که میکوریز به گیاهان رشد یافته در خاک‌های آلوده به فلزات می‌بخشد (Andrade *et al*., 2008). به عنوان مثال عدم تحرک مس در ساختار قارچ مانند هیف برون ریشه ای، یا اتصال فلزات به گلومالین در حفاظت از انتقال مس به بافت گیاه نقش دارد. بنابراین قارچ میکوریز آربسکولار به عنوان یک سد بیولوژیکی فعال عمل می‌کنند (Toler *et al*., 2005).

غشای پلاسمایی گیاه اولین ساختار زنده است که هدف سمیت فلزات سنگین قرار می‌گیرد. به نظر می‌رسد افزایش پراکسید هیدروژن در گیاهان تحت تنش فلز سنگین با تحریک واکنش Haber – Weiss و تولید رادیکال هیدروکسیل موجب پراکسیداسیون لیپیدها و آسیب‌های غشایی شود (Mittler, 2002). با افزایش غلظت نیکل درصد نشت الکترولیتی غشاء در گیاهچه‌های فستوکا افزایش نشان داد. بهم ریختگی غشاء در پاسخ به فلزات سنگین بصورت افزایش در نشت الکترولیتی غشاء توسط محققان گزارش شده است (Iqbal *et al*. 2010). Fodor و همکاران (۱۹۹۵) اثرات مستقیم مس و کادمیوم را بر ترکیب لیپید غشا گزارش کردند که مستقیما بر نشت پذیری غشا اثر دارند. افزایش نشت الکترولیتی غشا ناشی از رادیکال‌های اکسیژن فعال تولید شده در تنش اکسیداتیو است که بر لیپیدهای موجود در غشای سلول و اندامک های درون سلولی تاثیر گذاشته و پایداری، تمامیت و پیوستگی غشا را دچار اختلال می نماید.

نتایج حاصل از این پژوهش نشان دهنده کاهش درصد نشت اندام هوایی در گیاهچه‌های فستوکای آلوده با قارچ بود.به طور مشابه Kaya و همکاران (۲۰۰۹) نشان دادند که آلودگی میکوریزی به طور قابل توجهی نشت الکترولیتی غشاء را در گیاهان فلفل تحت تنش شوری کاهش داده است. این محققان عنوان کردند که احتمالا گیاهان فلفل آلوده به قارچ میکوریز دارای برخی مکانیسم‌های ویژه برای کاهش آسیب غشای سلول هستند.

گیاهان دارای مکانیسم‌های آنزیمی و غیر آنزیمی برای پاکسازی گونه‌های فعال اکسیژن و کاهش اثرات مضر آنها هستند. آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی می‌توانند به عنوان سیستم دفاعی مهمی در گیاهان در قبال تنش‌های اکسیداتیو ایجاد

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 15:09 IRST on Monday November 20th 2017

شده به وسیله فلزات بررسی شوند. در این تحقیق، افزایش در فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز، گایاکول پراکسیداز، گلوتاتیون ردوکتاز و گلوتاتیون اس ترانسفراز تحت تنش نیکل مشاهده شد.افزایش فعالیت آنزیم SOD احتمالا می تواند نتیجه ای از تاثیر مستقیم یون‌های فلزات سنگین و تاثیر غیر مستقیم وساطت شده با افزایش مقادیر رادیکال‌های سوپراکسید و همچنین سنتز از نو پروتئین آنزیم باشد (Verma and Dubey 2003). افزایش مشابهی در فعالیت آنزیم SOD در پاسخ به کادمیوم در توت سفید (Tewari *et al*. 2008) گزارش شده است. فعالیت آنزیم کاتالاز هماهنگ با فعالیت آنزیم SOD نقش حفاظتی مهمی در فرایند پاکروبی H_2O_2 و O_{2-} دارد، به دلیل اینکه نقش آنها در متابولیسم سلول مکمل یکدیگر است (Benavides *et al*. 2005). طبق تحقیقات Zhang و همکاران (۲۰۱۰) افزایش کادمیوم سبب القای فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در *Achnatherum inebrians* شده است. فعالیت بالای آنزیم آسکوربات پراکسیداز نقش آن را در سم زدایی ثابت H_2O_2 نشان می دهد (Zhou *et al*. 2008). همچنین افزایش در فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردکتاز در پاسخ به نیکل در برخی گیاهان از جمله گندم (Gajewska and Sklodowska, 2007) و قدومه (Schickler and Caspi, 1999) گزارش شده است. سنتز از نو پروتئین آنزیم ممکن است مسئول افزایش فعالیت آنزیم باشد (Baisak *et al*. 1994). در این تحقیق فعالیت آنزیم گلوتاتیون اس ترانسفراز (GST) در گیاهچه‌های فاقد قارچ با افزایش غلظت نیکل نسبت به شاهد افزایش یافت. نقش آنزیم GST در پاسخ به سمیت فلزات هنوز به طور کامل روشن نیست اما از آنجایی که فلزات سنگین مثل نیکل سبب افزایش پراکسیداسیون لیپیدی می‌شوند (Baccouch *et al*., 1998) می‌توان اینطور تصور کرد که این آنزیم در گیاهان تحت تنش فلزات سنگین می‌تواند در حذف محصولات سمی پراکسیداسیون لیپیدی نقش داشته باشد. در گیاهانی که در معرض غلظت‌های بالای نیکل قرار دارند آنزیم GST ممکن است در انتقال کمپلکس‌های فلز– فیتوکلاتین به واکوئل نیز نقش داشته باشد (Marrs and Walbot, 1997). Gajewska و همکاران (۲۰۰۶) افزایش معنی‌دار فعالیت GST در اندام هوایی گندم را تحت تنش نیکل گزارش کرده‌اند. این احتمال وجود دارد که نیکل موجود در ریشه‌ها باعث تجمع ترکیباتی مثل پراکسید هیدروژن شده که به عنوان یک مولکول پیام‌رسان به اندام‌های هوایی منتقل و باعث القای دفاع آنتی‌اکسیدان در برگ‌ها شده است.

نتایج این تحقیق نشان داد که گیاهچه‌های فستوکای M^+ فعالیت بیشتری از آنزیم‌های کاتالاز، گایاکول پراکسیداز (بجز در غلظت ۳۰ میلی گرم بر کیلوگرم نیکل) و گلوتاتیون ردوکتاز را نسبت به گیاهچه‌های فستوکای M^- داشتند و بر عکس فعالیت آنزیم گلوتاتیون اس ترانسفراز در گیاهچه‌های M^- بیشتر بود. نتایج به‌دست آمده از تحقیقات Becana و همکاران (۲۰۰۰) نشان داده است که فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز در گیاهان لگوم تلقیح شده با قارچ میکوریز آربسکولار نسبت به گیاهان تلقیح نشده افزایش بیشتری داشته است، و پیشنهاد کرده است که این اثر به کاهش آسیب اکسیداتیو مولکول‌های زیستی کمک می کنند. در تیمار گیاه فلفل با مس آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز، کاتالاز و گلوتاتیون ردوکتاز الگوهای فعالیت بالایی را در گیاهان تلقیح شده با قارچ *G. mosseae* نسبت به گیاهان فاقد قارچ نشان دادند و گیاهان حاوی قارچ نقش مثبتی علیه آسیب غشا نشان دادند (Marquez-Garcia and Cordoba, 2010). با بررسی نتایج این تحقیق مشاهده شد که در گیاهچه‌های فستوکا فعالیت آنزیم GST در گیاهان M^- بیشتر از گیاهان M^+ بود. با توجه به مشاهدات Yu و همکاران (۲۰۰۹) گیاهان میکوریزی تولید گونه‌های اکسیژن فعال را کاهش داده و بنابراین سنتز آنزیم‌های آنتی اکسیدان را کاهش می‌دهند. بنابراین به نظر می‌رسد که میزان گونه‌های فعال اکسیژن تولید شده در گیاهچه‌های M^- بیشتر از گیاهچه‌های M^+

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 15:09 IRST on Monday November 20th 2017

(همانگونه که نتایج مربوط به نشت الکترولیتی غشاء نشان می دهد) است و احتمالاً این امر به دلیل نقش قارچ در کاهش اثرات تنش از طریق کاهش انتقال نیکل از ریشه به اندام هوایی است. به هر حال، پیشنهاد شده است که سلول های قارچی در عمل همزیستی در درجه نخست نیاز به مقاومت در برابر استرس اکسیداتیو ناشی از فلزات سنگین دارند و نیز پیشنهاد شده که عمل اصلی پروتئین‌های قارچ میکوریزی در مقاوم‌سازی همزیستی گیاه–میکوریز آربسکولار در برابر فلزات سنگین شامل حفاظت در برابر استرس اکسیداتیو ناشی از فلز سنگین و برطرف نمودن گونه‌های فعال اکسیژن است (Ouziad *et al*., 2006).

نتیجه‌گیری کلی:

نتایج این بررسی نشان داد که القاء افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان کاتالاز، گایاکول پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز و نیز افزایش آستانه غیرفعال شدن آنزیم‌های آنتی اکسیدان آسکوربات پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز ناشی از سمیت با نیکل موجب بهبود سیستم آنتی‌اکسیداتیو شده است و تلقیح گیاهچه های فستوکا با قارچ *G. intraradices* از این طریق مقاومت بیشتر گیاه به شرایط تنش سمیت نیکل و بهبود رشد گیاهان میزبان را بدنبال داشته است.

تشکر و قدردانی:

این پروژه با حمایت معاونت پژوهشی دانشگاه شهرکرد انجام شده است، که بدین وسیله قدردانی می گردد. همچنین نویسندگان مقاله از قطب تنش های گیاهی دانشگاه اصفهان تشکر می نمایند.

منابع:

Abdel Latef, A. A. H. (2011) Influence of arbuscular mycorrhizal fungi and copper on growth, accumulation of osmolyte, mineral nutrition and antioxidant enzyme activity of pepper (*Capsicum annuum* L.). Mycorrhiza 21: 495-503.

Aebi, H. A. (1983) Catalase, in: Bergmeyer, H.U. (Ed.), Methods of enzymatic analysis, VerlagChemie, Deerfield Beach, FL.3: 273-286.

Ahmed, A., Hasnain, A., Akhtar, S., Hussain, A. and Abaid-Ullah, Y. G, Wahid, A and Mahmood, S. (2010) Antioxidant enzymes as bio-markers for copper tolerance in safflower (*Carthamus tinctorius* L). African Journal of Biotechnology 9: 5441-5444.

Andrade, S. A. L., Da Silveira, A. P. D., Jorge, R. A. and De Abreu, M. F. (2008) Cadmium accumulation in sunflower plants influenced by arbuscular mycorrhiza. International Journal of Phytoremediation 10: 1-13.

Asada, K. (1992) Ascorbate peroxidase–a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. Physiologia Plantarum 85: 235-241.

Baccouch, S., Chaoui, A. and Ferjani, E. E. (1998) Nickel-induced oxidative damage and antioxidant responses in Zea mays shoots. Plant Physiology and Biochemistry 36: 689-694.

Baisak, R., Rana, D., Acharya, P. B. and Kar, M. (1994) Alterations in the activities of active oxygen scavenging enzymes of wheat leaves subjected to water stress. Plant and Cell Physiology 35: 489-495.

Becana, M., Dalton, D. A., Moran, J. F., Iturbe-Ormaetxe, I., Matamoros, M. A. and C Rubio, M. (2000) Reactive oxygen species and antioxidants in legume nodules. Physiologia Plantarum 109: 372-381.

Benavides, M. P., S. M. Gallego, and Tomaro, M. L. (2005) Cadmium toxicity in plants. Brazilian Journal of Plant Physiology 17: 3–20.

Beyer Jr, W. F. and Fridovich, I. (1987) Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. Analytical Biochemistry 161: 559-566.

Carmagnol, F., Sinet, P.-M., Rapin, J. and Jerome, H. (1981) Glutathione-S-transferase of human red blood cells; assay, values in normal subjects and in two pathological circumstances: hyperbilirubinemia and impaired renal function. Clinica Chimica Acta 117: 209-217.

Enkhtuya, B., Rydlova, J. and Vosatka, M. (2000) Effectiveness of indigenous and non-indigenous isolates of arbuscular mycorrhizal fungi in soils from degraded ecosystems and man-made habitats. Applied Soil Ecology 14: 201-211.

Fodor, E., Szabo-Nagy, A. and Erdei, L. (1995) The effects of cadmium on the fluidity and H^+-ATPase activity of plasma membrane from sunflower and wheat roots. Journal of Plant Physiology 147: 87-92.

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 15:09 IRST on Monday November 20th 2017

Khalid, B. Y. and Tinsley, J. (1980) Some effects of nickel toxicity on rye grass. Plant and Soil 55: 139-144.

Leyval, C., Joner, E., Del Val, C. and Haselwandter, K. (2002) Potential of arbuscular mycorrhizal fungi for bioremediation. Mycorrhizal Technology in Agriculture: 175-186.

Lin, C. C. and Kao, C. H. (1999) NaCl induced changes in ionically bound peroxidase activity in roots of rice seedlings. Plant and Soil 216: 147-153.

Marquez-Garcia, B. and Cordoba, F. (2010) Antioxidative system in wild populations of andevalensis. Environmental and Experimental Botany 68: 58-65.

Marrs, K. A. and Walbot, V. (1997) Expression and RNA splicing of the maize glutathione S-transferase Bronze2 gene is regulated by cadmium and other stresses. Plant Physiology 113: 93-102.

Mishra, S., Srivastava, S., Tripathi, R., Govindarajan, R., Kuriakose, S. and Prasad, M. (2006) Phytochelatin synthesis and response of antioxidants during cadmium stress in *Bacopa monnieri* L . Plant Physiology and Biochemistry 44: 25-37.

Mittler, R. (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends in Plant Science 7: 405-410.

Nakano, Y. and Asada, K. (1987) Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts; its inactivation in ascorbate-depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical. Plant and Cell Physiology 28: 131-140.

Ouziad, F., Wilde, P., Schmelzer, E., Hildebrandt, U. and Bothe, H. (2006) Analysis of expression of aquaporins and Na^+ H^+ transporters in tomato colonized by arbuscular mycorrhizal fungi and affected by salt stress. Environmental and Experimental Botany 57: 177-186.

Quartacci, M. F., Cosi, E. and Navari-Izzo, F. (2001) Lipids and NADPH-dependent superoxide production in plasma membrane vesicles from roots of wheat grown under copper deficiency or excess. Journal of Experimental Botany 52: 77-84.

Schickler, H. and Caspi, H. (1999) Response of antioxidative enzymes to nickel and cadmium stress in hyperaccumulator plants of the genus *Alyssum*. Physiologia Plantarum 105: 39-44.

Schützendübel, A. and Polle, A. (2002) Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. Journal of Experimental Botany 53: 1351-1365.

Smith, I. K., Vierheller, T. L. and Thorne, C. A. (1989) Properties and functions of glutathione reductase in plants. Physiologia Plantarum 77: 449-456.

Foyer, C. H. and Halliwell, B. (1976) The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. Planta 133: 21-25.

Fuentes, D., Disante, K. B., Valdecantos, A., Cortina, J. and Vallejo, V. R. (2007) Sensitivity of Mediterranean woody seedlings to copper, nickel and zinc. Chemosphere 66: 412-420.

Gajewska, E. and Skłodowska, M. (2007) Effect of nickel on ROS content and antioxidative enzyme activities in wheat leaves. Biometals 20: 27-36.

Gajewska, E., Skłodowska, M., Słaba, M. and Mazur, J. (2006) Effect of nickel on antioxidative enzyme activities, proline and chlorophyll contents in wheat shoots. Biologia Plantarum 50: 653-659.

Göhre, V. and Paszkowski, U. (2006) Contribution of the arbuscular mycorrhizal symbiosis to heavy metal phytoremediation. Planta 223: 1115-1122.

Gonzalez-Guerrero, M., Benabdellah, K., Ferrol, N. and Azcon-Aguilar, C. (2009) Mechanisms underlying heavy metal tolerance in arbuscular mycorrhizas. Mycorrhizal Technology in Agriculture, Springer**:** 175-186.

Hara, M., Yatsuzuka, Y., Tabata, K. and Kuboi, T. (2010) Exogenously applied isothiocyanates enhance glutathione-S-transferase expression in *Arabidopsis* but act as herbicides at higher concentrations. Journal of Plant Physiology 167: 643-649.

Hartley, J. J., Cairney, W., Freestone, P., Woods, P. and Meharg A. A. (1999) The effects of multiple metal contaminations on ectomycorrhizal Scots pine (*Pinus sylvestri*s) seedlings. Environmental Pollution 106: 413-424.

Hayes, J. D. and Pulford, D. J. (1995) The Glut athione S-Transferase Supergene Family: Regulation of GST and the Contribution of the lsoenzymes to Cancer Chemoprotection and Drug Resistance Part I. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology 30: 445-520.

Hildebrandt, U., Regvar, M. and Bothe, H. (2007) Arbuscular mycorrhiza and heavy metal tolerance. Phytochemistry 68: 139-146.

Iqbal, N., Masood, A., Nazar, R., Syeed, S. and Khan, N. A. (2010) Photosynthesis, growth and antioxidant metabolism in mustard (*Brassica juncea* L.) cultivars differing in cadmium tolerance. Agricultural Sciences in China 9: 519-527.

Kaya, C., Ashraf, M., Sonmez, O., Aydemir, S., Tuna, A. L. and Cullu, M. A. (2009) The influence of arbuscular mycorrhizal colonisation on key growth parameters and fruit yield of pepper plants grown at high salinity. Scientia Horticulturae 121: 1-6.

Yang, X., Balagar, V. C., Martens, D. C. and Clark, R. B. (1996) Plant tolerance to Ni toxicity. Plant Nutrition 19: 73-85.

Yu, Y., Zhang, S., Huang, H., Luo, L. and Wen, B. (2009) Arsenic accumulation and speciation in maize as affected by inoculation with arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 57: 3695–3701.

Zhang, X., Fan, X., Li, C. and Nan, Z. (2010) Effects of cadmium stress on seed germination, seedling growth and antioxidative enzymes in *Achnatherum inebrians* plants infected with a *Neotyphodium* endophyte. Plant Growth Regulation 60: 91-97.

Zhou, Z. S., Wang, S. J. and Yang, Z. M. (2008) Biological detection and analysis of mercury toxicity to alfalfa (*Medicago sativa*) plants. Chemosphere 70: 1500-1509.

Smith, S. and Read, D. (2008) Mycorrhizal symbiosis. 3rd: Academic Press, San Diego.

Tewari, R. K., P. Kumar, and Sharma, P. N. (2008) Morphology and physiology of zinc-stressed mulberry plants. Journal of Plant nutrition and Soil Science 171: 286–294.

Toler, H., Morton, J. and Cumming, J. (2005) Growth and metal accumulation of mycorrhizal sorghum exposed to elevated copper and zinc. Water, Air, and Soil Pollution 164: 155-172.

Verma, S. and Dubey, R. (2003) Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. Plant Science 164: 645-655.

Wozniak, K. and Błasiak, J. (2002) Free radicals-mediated induction of oxidized DNA bases and DNA– protein cross-links by nickel chloride. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 514: 233-243.

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 15:09 IRST on Monday November 20th 2017