

## 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: ۱۳۹۲/۰۶/۱۷)

### 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 آنزیم‌های 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 فستوکا  $M^+$  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 گلوکاتایون ردوکتاز در شرایط سمیت نیکل شد اما تأثیری بر فعالیت آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز نداشت. حضور قارچ همچنین بر فعالیت آنزیم گلوکاتایون اس ترانسفراز اثر منفی داشت. حضور قارچ *Glomus intraradices* در گیاهچه‌های فستوکا باعث تقویت سیستم آنتی اکسیدان شده و همچنین اثرهای منفی سمیت نیکل را در این گیاهچه‌ها کاهش داد.

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

مقدمه:  
کلونیزاسیون این قارچ‌ها با کورتکس ریشه گیاهان و توسعه میسلیموم 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

قارچ‌های میکوریز آربسکولار میکروارگانیسم‌های خاک هستند که همزیستی دو طرفه با اکثر گیاهان عالی برقرار می‌کنند. 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).

گلوکاتایون ردوکتاز در کنترل درونی پراکسید هیدروژن از طریق چرخه اکسید و ردوکتاز که گلوکاتایون و آسکوربات در آن دخیل اند نقش ایفا می‌کند (Smith *et al.*, 1989). آنزیم گلوکاتایون اس ترانسفراز (GST) در سم زدایی مواد داخلی (متابولیت های داخل سلولی) و خارجی (داروها، حشره کش ها و فلزات سنگین) از طریق تشکیل کانسوجوگه گلوکاتایون 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 فناوری توران، سمنان) برای تلقیح بذرهای فسکوکا 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

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 گلوکاتایون ردوکتاز (GR) است (Schützendübel and Polle, 2002). سوپراکسید دیسموتاز دیسموتاسیون 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

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  $1 \mu\text{mol min}^{-1}$  آب اکسیژنه در دمای  $25^\circ\text{C}$  بیان گردید (Aebi et al., 1983).

سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز به روش Fridovich و Beyer (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-۱۰۰ (۰/۰۲۵ درصد)، نیتروبلوترازولیوم (۵۷ میکرو مولار) و ۲۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی به همراه ۱۰ میکرولیتر ریبوفلاوین (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 شد و 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 میلی مولار با pH=۷، ۳/۳۵ میکرولیتر گایاکول ۹ میلی مولار و ۴/۵۱ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۱۹ میلی مولار و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی در کوط 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 تترآگایاکول در دقیقه می شود، تعریف شد.

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

اندام هوایی، درصد نشت الکترولیتی غشاء و میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان (کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز، گایاکول پراکسیداز، گلوکاتایون ردوکتاز و گلوکاتایون 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 اندازه‌گیری شد. متوسط طول اندام هوایی از محل طوقه تا نوک برگ‌ها در تیمارهای مختلف با خط کش اندازه‌گیری و بر حسب سانتی‌متر گزارش شد.

**درصد نشت الکترولیتی غشا:** مقدار ۰/۱ گرم از بافت برگ از هر تکرار 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) اندازه‌گیری 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 اندازه‌گیری 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 ۱۳۰۰۰ rpm 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

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 گیاهچه‌های 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 طوری که فعالیت این آنزیم در گیاهچه‌های 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

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

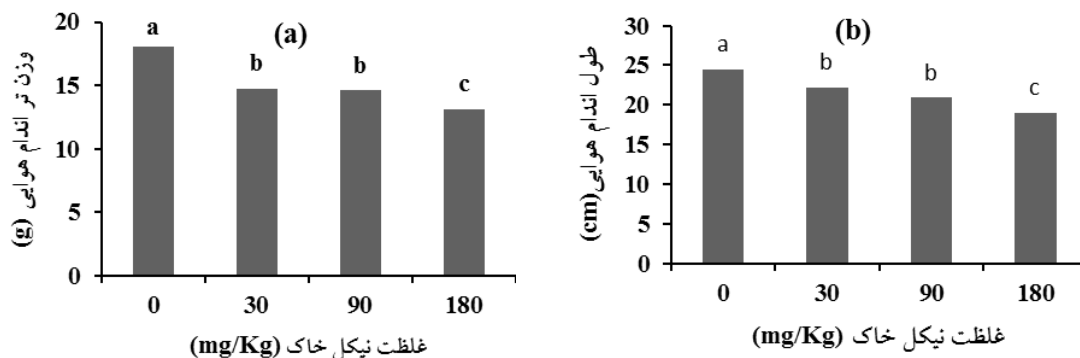
مخلوط واکنش برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم گلوکاتایون ردوکتاز مطابق با روش Halliwell و Foyer (۱۹۷۶) حاوی ۲۵۰ میکرولیتر بافر پتاسیم فسفات (۱۰۰ میلی مولار،  $pH=7/8$ )، ۵۰ میکرولیتر گلوکاتایون اکسید شده (۱۰ میلی مولار)، ۱۲۰ میکرولیتر NADPH (۱ میلی مولار) و ۴۸۰ میکرولیتر آب مقطر است. به مخلوط واکنش حاصل ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی افزوده و مصرف NADPH در یک دقیقه در طول موج ۳۴۰ نانومتر در دستگاه اسپکتروفوتومتر کیتیک خوانش شد.

فعالیت آنزیم گلوکاتایون اس ترانسفراز مطابق با روش Carmagnol (۱۹۸۱) اندازه‌گیری شد. به این صورت که منحنی کاهش جذب در ۳۴۰ نانومتر ناشی از اکسیداسیون گلوکاتایون در مدت ۵ دقیقه رسم گردید. مخلوط واکنش برای اندازه‌گیری حاوی ۱۰۰ میلی مولار بافر فسفات سدیم ( $pH=6/5$ )، ۷۵ میلی مولار گلوکاتایون، ۳۰ میلی مولار ۱- کلرو ۲- دی نیترو بنزن (CDNB) در اتانول بود. واکنش با افزودن ۲۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی شروع شد.

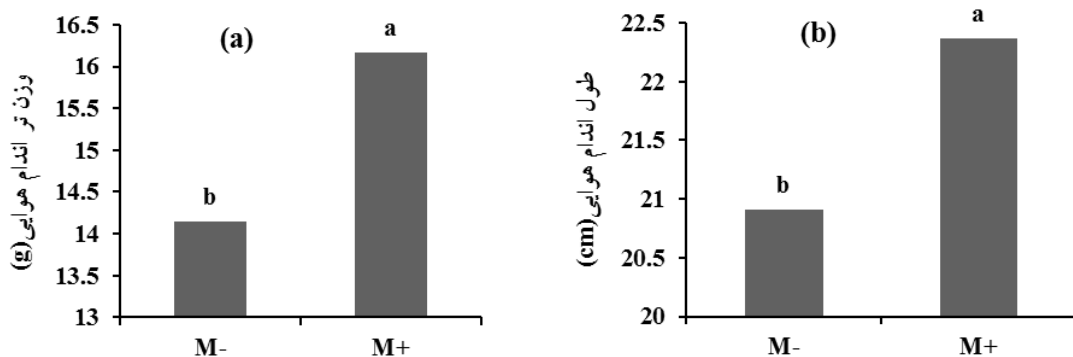
**تجزیه و تحلیل آماری:** این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در ۳ تکرار اجرا گردید. در این حالت ۴ غلظت نیکل (کنترل، ۳۰، ۹۰ و ۱۸۰) و دو حالت قارچ (با و بدون میکوریز) به عنوان فاکتورها در نظر گرفته شد. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم افزار SAS و MSTATC انجام گرفت و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون حداقل تفاوت معنی دار (LSD) ( $P < 0/05$ ) مشخص شد.

## نتایج:

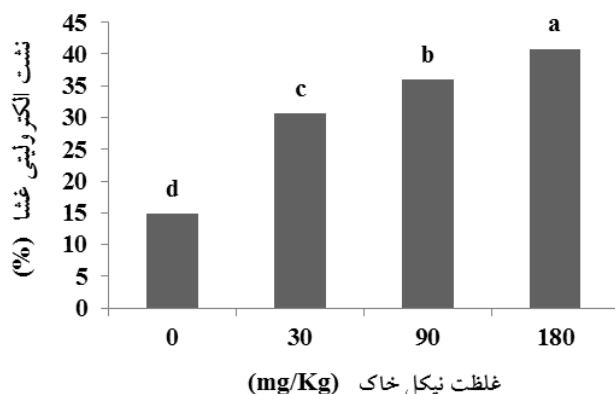
تأثیر نیکل و قارچ *G. intraradices* هر کدام به طور جداگانه بر وزن تر و طول اندام هوایی معنی دار بود. نتایج نشان داد که تیمار نیکل باعث کاهش وزن تر و طول اندام



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.



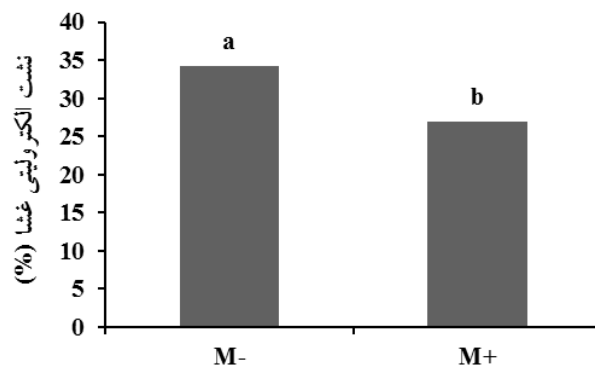
شکل ۲- مقایسه میانگین وزن تر اندام هوایی (a) و طول اندام هوایی (b) در گیاهچه‌های حاوی قارچ (M+) و فاقد قارچ (M-). حروف متفاوت بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است.



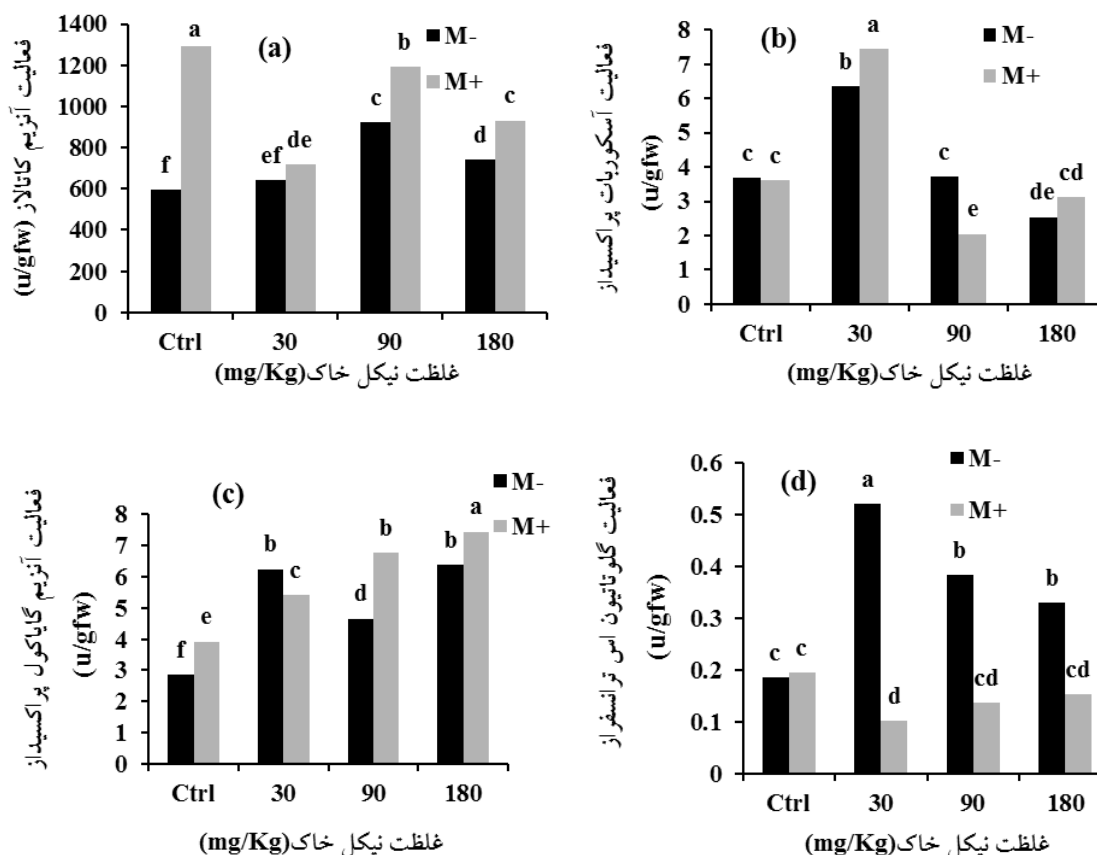
شکل ۳- مقایسه میانگین نشست الکترونی غشا در سطوح مختلف تیمار نیکل گیاهچه‌های فسکیوی بلند. حروف متفاوت بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است.

تیمار ۳۰ میلی گرم بر کیلوگرم مشاهده شد و به ترتیب ۷۳/۴٪ و ۲ برابر نسبت به شاهد افزایش نشان دادند. با

آنزیم تأثیر معنی داری نداشت. در گیاهچه‌های فستوکای M- و M+ بیشترین فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در



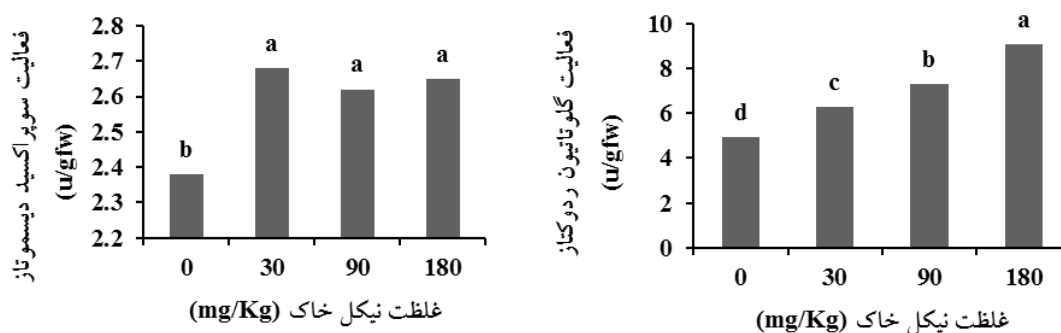
شکل ۴- مقایسه میانگین نشت الکترونی غشا در گیاهچه‌های حاوی قارچ (M+) و فاقد قارچ (M-) فسکیوی بلند. حروف متفاوت بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است.



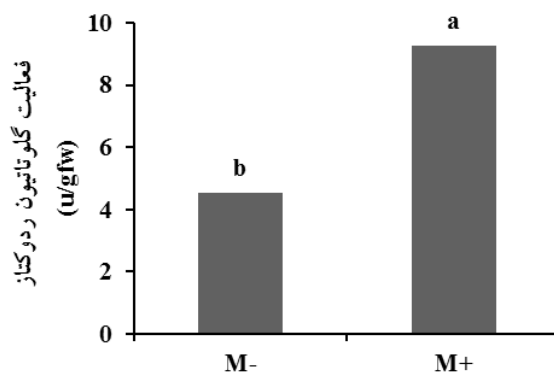
شکل ۵- برهمکنش نیکل و قارچ *G. intraradices* بر فعالیت آنزیم کاتالاز (a)، آسکوربات پراکسیداز (b)، گایاکول پراکسیداز (c) و گلو تاتیون اس ترانسفراز (d) در فسکیوی بلند. (حروف غیر یکسان بیانگر اختلاف معنی‌دار میانگین‌ها در سطح ۰/۰۵ آزمون LSD است).

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

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



شکل ۶- مقایسه میانگین فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (a) و گلو تاتیون 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 گلو تاتیون ردوکتاز در گیاهچه های حاوی قارچ (M+) و فاقد قارچ (M-) فسکیوی بلند. حروف متفاوت بیانگر اختلاف معنی دار در سطح ۰/۰۵ است.

M در مقایسه با گیاهچه‌های M<sup>+</sup> 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 گلو تاتیون ردوکتاز نشان داد. به طوری که با افزایش غلظت نیکل خاک فعالیت این آنزیم‌ها به ترتیب ۱۲/۶٪ و ۸۳/۲٪ نسبت به شاهد افزایش نشان داد (شکل ۶). حضور قارچ *G.intraradices* در گیاهچه های فستوکا تاثیری بر فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز نداشت ولی فعالیت آنزیم گلو تاتیون 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.

بر کیلوگرم نسبت به شاهد ۹۰٪ افزایش نشان داد. در حالی که در گیاهچه‌های M<sup>-</sup> هر یک از تیمارهای نیکل نسبت به شاهد تفاوت معنی داری داشتند ولی روند منظمی بین آنها مشاهده نشد. به طوری که 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<sup>-</sup> بیشترین فعالیت آنزیم گلو تاتیون 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 گلو تاتیون اس ترانسفراز در گیاهچه‌های فستوکای

## 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 می‌رسد 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 شاخص‌های وزن تر و طول اندام هوایی را در مقایسه با گیاهچه‌های 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 گلوپالین در حفاظت از انتقال مس به بافت گیاه نقش دارد. بنابراین قارچ میکوریز آریسکولار 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 مستقیماً 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 اندامک‌های درون سلولی تأثیر گذاشته و پایداری، تمامیت و پیوستگی غشا را دچار اختلال می‌نماید.

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 احتمالاً 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



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 گلوکاتایون ردوکتاز را نسبت به گیاهچه‌های فستوکای  $M^-$  داشتند و بر عکس فعالیت آنزیم گلوکاتایون 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 گلوکاتایون ردوکتاز در گیاهان لگوم تلقیح شده با قارچ میکوریز آریسکولار نسبت به گیاهان تلقیح نشده افزایش بیشتری داشته است، و پیشنهاد کرده است که این اثر به کاهش آسیب اکسیداتیو مولکول‌های زیستی کمک می‌کنند. در تیمار گیاه لفل با مس آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز، کاتالاز و گلوکاتایون 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  $M^+$

شده به وسیله فلزات بررسی شوند. در این تحقیق، افزایش در فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز، گایاکول پراکسیداز، گلوکاتایون ردوکتاز و گلوکاتایون اس ترانسفراز تحت تنش نیکل مشاهده شد. افزایش فعالیت آنزیم SOD احتمالاً می‌تواند نتیجه‌ای 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 می‌دهد (Zhou et al. 2008). همچنین افزایش در فعالیت آنزیم گلوکاتایون ردوکتاز در پاسخ به نیکل در برخی گیاهان از جمله گندم (Gajewska and Sklodowska, 2007) و قدمه (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 گلوکاتایون 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

گلوکاتایون 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 گیاهیچه 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.

(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 پروتئین های قارچ میکوریزی در مقاوم سازی همزیستی گیاه-میکوریز آریسکولار در برابر فلزات سنگین شامل حفاظت در برابر استرس اکسیداتیو ناشی از فلز سنگین و برطرف نمودن گونه های فعال اکسیژن است (Ouziad *et al.*, 2006).

### نتیجه گیری کلی:

نتایج این بررسی نشان داد که القاء افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان کاتالاز، گایاکول پراکسیداز و

### منابع:

- 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 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<sup>+</sup>-ATPase activity of plasma membrane from sunflower and wheat roots. *Journal of Plant Physiology* 147: 87-92.
- 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

- 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<sup>+</sup> H<sup>+</sup> 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 sylvestris*) seedlings. *Environmental Pollution* 106: 413-424.
- Hayes, J. D. and Pulford, D. J. (1995) The Glutathione S-Transferase Supergene Family: Regulation of GST and the Contribution of the Isoenzymes 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.