

تأثیر قارچ میکوریز *Glomus mosseae* بر رشد، ترکیبات فنلی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان تحت تنش مس در گیاه پسته (*Pistacia vera*)

نرگس روحانی^۱، فاطمه دانشمند^۱، آتوسا وزیری^{۱*}، مهرناز محمودی^۲، فاطمه صابر ماهانی^۳

^۱ گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام‌نور، ایران، ^۲ گروه زیست‌شناسی، واحد کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان

^۳ گروه شیمی، دانشگاه پیام‌نور، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۸/۰۳، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۸/۰۵/۰۹)

چکیده

یکی از روش‌های قابل استفاده برای کاهش اثرات مخرب ناشی از تنش مس استفاده از قارچ‌های میکوریز می‌باشد. این پژوهش برای تعیین اثر قارچ میکوریز *Glomus mosseae* بر رشد و بعضی پارامترهای فیزیولوژیکی گیاه پسته رقم احمد آقایی در پاسخ به افزایش غلظت مس خاک انجام گرفت. آزمایش مذکور به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه سطح مس (غلظت‌های صفر، ۳۰۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم در لیتر نترات مس) و در دو وضعیت میکوریزی و غیرمیکوریزی اجرا شد. در همه گیاهان شاهد و تیمار شده با مس، طول و وزن خشک ریشه و ساقه گیاهان میکوریزی از گیاهان غیرمیکوریزی بیشتر بود. همچنین مس منجر به کاهش محتوای کلروفیل a و b، کارتنوئیدها، پروتئین کل، غلظت فسفر، قند کل، پرولین و ترکیبات فنلی گردید اما همزیستی میکوریزی باعث افزایش معنی‌دار این شاخص‌ها گردید. تنش مس موجب افزایش پراکسیداسیون لیپیدها، میزان مالون دآلدئید (MDA)، هیدروژن پراکسید (H_2O_2)، فعالیت پراکسیداز (POD)، آسکوربات پراکسیداز (APX) و سوپراکسید دیسموتاز (SOD) در همه گیاهان گردید، اما میزان H_2O_2 و کاتالاز (CAT) در گیاهان میکوریزی به‌طور معنی‌داری کمتر از گیاهان غیرمیکوریزی بود. براساس نتایج میزان مس انتقال‌یافته از ریشه به بخش هوایی در پسته صرف نظر از وضعیت میکوریزی آن کمتر از یک ($TF \leq 1$) و فاکتور تجمع زیستی بیشتر از یک ($BCF \geq 1$) بود. بنابراین پسته می‌تواند تثبیت‌کننده (phytostabilizer) مس باشد و همزیستی با قارچ *Glomus mosseae* باعث تجمع بیشتر مس در ریشه گردید.

واژه‌های کلیدی: تنش اکسیداتیو، فاکتور انتقال، فلز سنگین، همزیستی

مقدمه

پیرامون ریشه‌های گیاه گسترش می‌یابند. این میسلیوم‌ها با افزایش تماس سطحی گیاه با محیط خاک، در جذب مواد مغذی پرمصرف (P و N) و نیز مواد مغذی کم‌مصرف (Cu و Zn) توسط گیاه مشارکت می‌کنند (Smith and Read, 2008; Saxena et al., 2017). از طرف دیگر، در شرایطی که سطح فلزات ضروری بالاتر

قارچ‌های میکوریز آربوسکولار (AM) (از قارچ‌های بیوتروف اجباری گیاهان عالی)، یکی از گسترده‌ترین گروه‌های میکروارگانیسم‌های خاک هستند (Barea, 1991). قارچ‌های AM کورتکس ریشه، اکثر گونه‌های گیاهی را آغشته کرده و میسلیوم‌های خارج سلولی را ایجاد می‌کنند که در خاک

* نویسنده مسئول، نشانی پست الکترونیکی: a_vaziri@pnu.ac.ir

طریق اتصال به گروه‌های سولفیدریل پروتئین‌های غشا یا از طریق افزایش میزان پراکسیداسیون لیپیدها به غشاهای سلولی آسیب وارد نماید (Liu *et al.*, 2004). گیاهان برای محافظت از خود در مقابل ROS و رادیکال‌های آزاد، سیستم‌های مؤثری را که شامل آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی است تکامل داده‌اند (Abdel Latef, 2011). گزارشات نشان داده‌اند که Cu فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند SOD، CAT، POD و APX را افزایش می‌دهد (Lombardi and sebastiani, 2005; Ahmed *et al.*, 2010). آنزیم SOD تبدیل دو مولکول سوپراکسید به اکسیژن و آب را کاتالیز می‌کند، آنزیم CAT در حذف H_2O_2 نقش دارد و آنزیم APX باعث احیای H_2O_2 به آب می‌گردد (Asada, 1992).

متابولیسم نیتروژن در پاسخ گیاه به تنش حاصل از فلزات نقش اصلی را ایفا می‌کند (Hatamian *et al.*, 2018, 2019). شماری از متابولیت‌های نیتروژنی نظیر اسیدآمینها می‌توانند به کاتیون‌های فلزی متصل شوند یا ROS تولیدشده در سلول‌ها در پاسخ به غلظت‌های مازاد فلزات را جمع‌آوری و پاکسازی نمایند (Groppa and Benavides, 2008). گزارشات نشان داده‌اند که تحت شرایط Cu اضافی برخی اسیدآمینها نظیر پرولین در گیاهان تجمع یافته و پیشنهاد گردیده که به‌عنوان یک جمع‌کننده ROS عمل می‌کنند یا در کلات کردن فلزات دخیل هستند (Sharma and Dietz, 2006; Souri, 2016). ترکیبات فنلی شامل گروه وسیعی از متابولیت‌های ثانویه گیاهی هستند که نقش مهمی در دفاع گیاهان در برابر تنش‌ها دارند. ترکیبات فنلی ماهیت آنتی‌اکسیدانی دارند و در تشکیل دیواره سلول و واکنش گیاهان در برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی مشارکت می‌کنند (Vierheilig and Pich, 2002).

پسته اهلی (*Pistacia vera*) متعلق به تیره Anacardiaceae و یکی از محصولات مهم تجاری در مناطق خشک و نیمه‌خشک است که با نام ایران در آمیخته و تولید آن در کشور ایران سابقه تاریخی و طولانی دارد. ایران با حدود ۴۳۱۰۰۰ هکتار سطح زیرکشت پسته و تولید سالانه ۱۹۲۰۰۰ تن محصول، بزرگ‌ترین کشور تولیدکننده پسته و رفسنجان

از سطح بهینه است، یا در حضور فلزات سمی، قارچ‌های AM قادرند میزان سمیت فلزی در گیاه را کاهش دهند (Leyval *et al.*, 2002). علیرغم نقش مهمی که قارچ‌های AM در تعاملات گیاه با فلزات خاک ایفا می‌کنند و حضور همیشگی قارچ‌های AM در محیط خاک، تنها اخیراً پیشرفت‌هایی در زمینه درک مکانیسم‌های سلولی مورد استفاده جهت کنترل فلزات سنگین و جلوگیری از سمیت آنها در گیاهان میکوریزی صورت گرفته است (Gohre and Paszkowski, 2006; Hildebrandt *et al.*, 2007; Gonzalez-Guerrero *et al.*, 2009).

در جهان امروز آلودگی فلزات سنگین و پالایش آنها به علت پایداری، غی قابل تجزیه‌بودن زیستی و تجمع زیستی آنها در بدن حیوانات و گیاهان از اهمیت قابل توجهی برخوردار بوده و یک مشکل زیست محیطی محسوب می‌شود (Khan *et al.*, 2014; Mani *et al.*, 2016; Shalini and Charu, 2018; Souri *et al.*, 2018). مس (Cu) از جمله مهم‌ترین فلزات سنگین است که کاربرد گسترده‌ای در صنایع الکتریکی و آب کاری فلزات دارد (Igwe and Abia, 2006). کودها، قارچ‌کش‌ها، علف‌کش‌ها و لجن‌های فاضلاب مقادیر زیادی مس به خاک اضافه می‌کنند که گاه کاهش حاصلخیزی و افت کیفیت محصولات کشاورزی را به دنبال دارد (Ariyakanon and Winaipanich, 2006). Cu عنصری ضروری برای رشد گیاه بوده و در بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیکی شامل فتوسنتز، تنفس، توزیع کربوهیدرات، تثبیت نیتروژن، متابولیسم پروتئین و فعالیت آنتی‌اکسیدانی نقش مهمی را ایفا می‌کند. در سطح سلولی، عنصر مس یکی از اجزای کاتالیتیکی و ساختاری بسیاری از آنزیم‌ها و پروتئین‌های دخیل در مسیرهای متابولیکی مختلف محسوب می‌شود (Pilon *et al.*, 2006). گیاهان معمولاً به منبع فراوانی از مس در خاک‌ها دسترسی دارند، اما این فلز در غلظت‌های بالا می‌تواند یک فاکتور تنش‌زا محسوب شود که پاسخ‌های فیزیولوژیکی را تحریک می‌کند. بنابراین غلظت مس در سلول‌ها بایستی در سطح پایینی نگه داشته شود (Yruea, 2005). تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و رادیکال‌های آزاد القاشده توسط مقادیر مازاد Cu می‌تواند از

شد. سپس بذور در لای پارچه‌ای نخی مرطوب در محیطی گرم (دمای 28 ± 1 درجه سانتی‌گراد) و تاریک قرار داده شدند تا جوانه بزنند. جوانه‌زنی بذرها پس از حدود یک هفته صورت گرفت. سپس بذره‌های جوانه‌زده به گلدان منتقل شدند. در هر گلدان (با ارتفاع ۱۲ سانتیمتر و قطر دهانه ۸ سانتیمتر) ۲ عدد بذر پسته کاشته شد. گلدان‌ها شامل پرلیت استریل بوده (Lee *et al.*, 2005) که نیمی از گلدان‌ها با قارچ میکوریز *Glomus mosseae* آغشته شدند. ماده تلقیح موردنظر از کلینیک گیاه پزشکی ارگانیک شهرستان اسدآباد همدان تهیه شد که فقط حاوی گونه *Glomus mosseae* میکوریزی به‌همراه ریشه، هیف و خاک بود. به این ترتیب که در زمان کاشت ۲۵ گرم ماده تلقیح قارچی در کنار هر بذر جوانه‌زده گذاشته و سپس روی آن با پرلیت پوشانده شد. گلدان‌ها در گلخانه، تحت شرایط نوری ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی، با شدت نور ۸۵۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه، رطوبت ۷۵ درصد و دمای 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد در روز و دمای 17 ± 2 درجه سانتی‌گراد در شب نگهداری شدند. در ابتدا با توجه به نیاز آبی آبیاری با آب مقطر صورت گرفت. زمانی که تعداد برگ‌ها به ۳ تا ۴ عدد رسید، آبیاری با محلول غذایی هوگلند ($5/8 \pm 0/1$ pH) آغاز شد. هر دو روز یکبار آبیاری با ۲۰ میلی‌لیتر محلول هوگلند (0.5 mM KNO_3 , $400 \text{ } \mu\text{M Ca}(\text{NO}_3)_2$, $10 \text{ } \mu\text{M Fe-EDTA}$, 0.2 mM MgSO_4 , $0.1 \text{ mM KH}_2\text{PO}_4$, $10 \text{ } \mu\text{M H}_3\text{BO}_3$, $2 \text{ } \mu\text{M MnCl}_2$, $2 \text{ } \mu\text{M ZnSO}_4$, $0.1 \text{ } \mu\text{M Na}_2\text{MoO}_4$ and $0.2 \text{ } \mu\text{M CuSO}_4$) صورت گرفت. در این فاصله برای جلوگیری از خشک شدن گلدان‌ها از آب مقطر برای آبیاری و جلوگیری از تجمع فلزات استفاده شد. هم زمان با شروع آبیاری با محلول غذایی هوگلند تیمار مس به صورت جداگانه نیز آغاز شد. اعمال تنش با ۲۰ میلی‌لیتر محلول نترات مس در غلظت‌های صفر، ۳۰۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم در لیتر تقریباً هر دو روز یکبار صورت گرفت.

گیاهان بعد از گذشت دو ماه از زمان کاشت جمع‌آوری شدند. به این ترتیب که ریشه و بخش هوایی گیاهان در گروه‌های تیماری مختلف جدا و صفات مورفولوژیکی شامل طول بخش هوایی و زمینی و نیز وزن خشک آنها اندازه‌گیری

بزرگ‌ترین مرکز تولید پسته در جهان است که در شمال غرب استان کرمان واقع شده است (Radmehr, 2010; Bagheri *et al.*, 2012). پسته احمد آقایی یکی از ارقام پر طرفدار پسته است که ویژگی درشتی میوه بادامی شکل و سفیدی پوست استخوانی این رقم سبب گسترش آن شده است (Gheibi and Javadi Khosraghi, 2006). با توجه به اهمیت اقتصادی قابل توجه پسته و اثرات سوء ناشی از تنش مس در مناطق پسته کاری به‌خصوص در اطراف کارخانجات صنعتی و معادن مس، از جمله معدن مس سرچشمه که که غلظت‌های بالایی از مس در خاک دارد (شمس‌الدین و همکاران، ۱۳۹۴) در جوار مناطق پسته کاری شهر رفسنجان در استان کرمان قرار دارد، راهکارهای افزایش مقاومت و تحمل گیاه در این مناطق باید مورد توجه بیشتری قرار گیرد. هدف از این مطالعه درک بهتر مکانیسم‌های کاهش تنش Cu در گیاهان پسته و نقش قارچ میکوریز در افزایش تحمل این گیاه به‌خصوص در این مناطق است. به این منظور، گیاه پسته با قارچ میکوریز *Glomus mosseae* تلقیح شده و با گیاهان فاقد میکوریز کشت شده تحت شرایط تنش ناشی از Cu مقایسه شدند. اثر قارچ میکوریز *Glomus mosseae* بر روی رشد، کلروفیل، کارتنوئیدها، قند محلول، پروتئین کل، محتوای پرولین، پراکسیداسیون لیپیدها، ترکیبات فنلی، فسفر کل و همچنین فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در گیاهان پسته تحت تأثیر غلظت‌های مختلف Cu بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

برای انجام این تحقیق از گیاه پسته رقم احمد آقایی استفاده شد. این تحقیق در قالب طرح کاملاً تصادفی به صورت فاکتوریل با سه تکرار انجام گردید. بذره‌های مذکور از مرکز تحقیقات پسته رفسنجان تهیه شد. برای جوانه‌زنی، بذره‌های سالم پسته بودند انتخاب و با آب مقطر چندین بار شسته شدند و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در محلول آب ژاول ۰.۵٪ ضدعفونی گردیدند. بعد از آن به مدت ۴۸ ساعت در آب مقطر در تاریکی خیس‌انده شدند. در طی این مدت نیز آب روی بذرها تعویض

گردید. در همین زمان مقداری از ریشه‌های ظریف انتهایی آنها برای بررسی میزان آغشتگی ریشه‌ها به قارچ میکوریز جدا و در محلول FAA (فرمالین، استیک اسید، الکل اتیلیک) نگهداری شدند. سایر نمونه‌ها نیز بعد از اندازه‌گیری صفات مورفولوژیکی، در نیتروژن مایع قرار گرفتند و در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد برای اندازه‌گیری پارامترهای فیزیولوژیک نگهداری شدند.

صفات مورفولوژیکی: طول ساقه و ریشه و وزن خشک اندام هوایی و ریشه گیاهان در گروه‌های تیماری مختلف اندازه‌گیری گردید. برای اندازه‌گیری وزن خشک، نمونه‌ها در فویل آلومینیومی پیچیده شده و به مدت ۷۲ ساعت در آون در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد خشک شد. سپس وزن خشک نمونه‌ها بر حسب میلی‌گرم بر گیاه گزارش گردید.

$$\text{Chla} = 12.25 A_{663.2} - 2.79 A_{646.8}$$

$$\text{Chlb} = 21.21 A_{646.8} - 5.1 A_{663.2}$$

$$\text{Car} = (1000A_{470} - 1.8 \text{ chla} - 85.02 \text{ Chl b}) / 198$$

قندهای محلول: میزان قندهای محلول اندامهای هوایی گیاه با استفاده از روش فنل سولفوریک اسید اندازه‌گیری شد (Kochert, 1978). در این روش به ۰/۱ گرم از ماده خشک اندامهای هوایی گیاه، ۱۰ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد اضافه گردید و به مدت یک هفته در یخچال نگهداری شد تا قندهای محلول آن جدا شود. پس از یک هفته از محلول رویی نمونه‌ها، یک میلی‌لیتر برداشته و حجم آنها با آب مقطر به ۲ میلی‌لیتر رسانده شد و پس از اضافه کردن یک میلی‌لیتر فنل ۵ درصد و ۵ میلی‌لیتر سولفوریک اسید غلیظ (۸۰ درصد) میزان جذب به وسیله اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۸۵ نانومتر خوانده شد و غلظت قند در هر نمونه با استفاده از منحنی استاندارد گلوکز بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن خشک محاسبه گردید.

پروتئین، تهیه عصاره پروتئینی: برای سنجش مقدار پروتئین، ابتدا پروتئین‌ها از اندام هوایی گیاه در دمای بین صفر تا ۴ درجه سانتی‌گراد استخراج شد. برای این منظور ۰/۵ گرم بافت فریز شده گیاهی در یک هاون چینی محتوی ۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با pH=۷/۲ که دارای اتیلن دی‌آمین تتراستیک اسید (EDTA) ۱ میلی‌مولار و پلی‌وینیل پیرولیدون (PVP) ۱ درصد بود، سائیده شد. عصاره حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در سانتریفوژ یخچال‌دار در ۱۴۰۰۰g و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. از محلول رویی برای سنجش پروتئین کل نمونه‌های مورد مطالعه استفاده گردید (محلول حاصل از هر نمونه در چندین میکروتیوب و در دمای ۲۰- درجه

در همین زمان مقداری از ریشه‌های ظریف انتهایی آنها برای بررسی میزان آغشتگی ریشه‌ها به قارچ میکوریز جدا و در محلول FAA (فرمالین، استیک اسید، الکل اتیلیک) نگهداری شدند. سایر نمونه‌ها نیز بعد از اندازه‌گیری صفات مورفولوژیکی، در نیتروژن مایع قرار گرفتند و در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد برای اندازه‌گیری پارامترهای فیزیولوژیک نگهداری شدند.

صفات مورفولوژیکی: طول ساقه و ریشه و وزن خشک

اندام هوایی و ریشه گیاهان در گروه‌های تیماری مختلف اندازه‌گیری گردید. برای اندازه‌گیری وزن خشک، نمونه‌ها در فویل آلومینیومی پیچیده شده و به مدت ۷۲ ساعت در آون در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد خشک شد. سپس وزن خشک نمونه‌ها بر حسب میلی‌گرم بر گیاه گزارش گردید.

تعیین میزان آغشتگی ریشه‌ها به قارچ *Glomus mosseae*:

رنگ‌آمیزی ریشه‌های واجد میکوریز و زیگولار-آربوسکولار و اندازه‌گیری میزان آغشتگی ریشه‌ها به این میکوریز با روش Rajapakse و همکاران (۱۹۹۲) و با استفاده از رنگ فوشین انجام شد. پس از شفاف‌سازی و رنگ‌آمیزی ریشه‌ها، قطعات ریشه رنگ‌آمیزی شده در ظروف پتری که در زیر آن کاغذ میلیمتری قرار داده شده بود، به‌طور تصادفی پخش شدند. پس از آن در زیر میکروسکوپ تشریحی (استریوسکوپ) نقاط برخورد ریشه با خطوط اصلی کاغذ و نیز تعداد نقاط برخوردی که واجد آغشتگی بودند شمارش شد و نسبت این نقاط آغشته به کل نقاط برخورد بر حسب درصد محاسبه گردید (Giovannetti and Moss, 1980).

تعیین غلظت مس و فسفر: مقدار ۰/۱ گرم از ماده خشک

گیاه (ریشه و اندام هوایی به‌صورت جداگانه) در نسبت مساوی نیتریک اسید و پرکلریک اسید غلیظ قرار گرفت و به‌خوبی هضم گردید. سپس محلول اسیدی حرارت داده شد تا بخارات آن خارج شود. در مرحله بعد حجم محلول با آب مقطر به ۵۰ میلی‌لیتر رسانده شد و به کمک کاغذ صافی صاف گردید. سپس میزان مس محلول به کمک دستگاه جذب اتمی و مقدار فسفر با روش مولیبدات-وانادات (Jones and Benton,)

سانتی‌گراد نگهداری گردید).

برای سنجش مقدار پروتئین از روش Bradford (۱۹۷۶) استفاده شد. به این منظور به لوله‌های آزمایش مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره پروتئینی و ۵ میلی‌لیتر معرف بیوره افزوده و سریعاً ورتکس شد. پس از دو دقیقه و قبل از یک ساعت جذب آنها با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول‌موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد.

غلظت پروتئین با استفاده از منحنی استاندارد با کمک آلبومین گاوی محاسبه و بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر محاسبه گردید.

رسم منحنی استاندارد: ابتدا غلظت‌های ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶،

۰/۸ میلی‌گرم در لیتر آلبومین گاوی ساخته شد و کلیه مراحل آزمایش بر روی آنها توسط معرف، همان‌طور که قبلاً در نمونه‌های مجهول توضیح داده شده بود، تکرار گردید. جذب هر یک در طول‌موج ۵۹۵ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر خوانده شد و منحنی استاندارد رسم و معادله خط محاسبه گردید.

تهیه معرف بیوره: به‌منظور تهیه معرف برادفورد، ۰/۱ گرم کوماسی بریلیانت بلو G250 در ۵۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۵٪ در مدت یک ساعت حل گردید. سپس ۱۰۰ میلی‌لیتر فسفریک اسید ۸۵٪ قطره قطره به آن افزوده شد. در پایان حجم کل محلول به کمک آب‌مقطر به یک لیتر رسانده شد، محلول حاصل با کاغذ صافی واتمن شماره یک صاف گردید. محلول حاصل به رنگ قهوه‌ای روشن بوده و ظرف در بسته آن تا یک ماه در دمای آزمایشگاه قابل نگهداری است، اما بهتر است معرف برادفورد تازه تهیه گردد. در صورت مشاهده ذرات رنگی و یا وجود رنگ آبی، این محلول جهت سنجش پروتئین قابل استفاده نمی‌باشد.

پراکسیداسیون لیپید: برای سنجش مقدار پراکسیداسیون لیپیدهای غشا، غلظت مالون دآلدئید (MDA) اندازه‌گیری گردید. اندازه‌گیری مالون دآلدئید به روش Heath و Packer (۱۹۶۹) انجام شد. طبق این روش ۰/۲ گرم از بافت فریز شده گیاه (برگ سوم) با ۵ میلی‌لیتر تری‌کلرو استیک اسید (TCA)

۰/۱ درصد سائیده شد. عصاره حاصل با استفاده از سانتریفوژ به‌مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰g سانتریفوژ شد. به یک میلی‌لیتر از محلول رویی حاصل از سانتریفوژ، ۴ میلی‌لیتر محلول تری‌کلرو استیک اسید (TCA) ۲۰ درصد که حاوی ۰/۵ درصد تیوباربیتوریک اسید (TBA) بود، اضافه شد. مخلوط حاصل به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد در حمام آب‌گرم حرارت داده شده سپس بلافاصله در یخ سرد شد و دوباره مخلوط به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰g سانتریفوژ گردید. شدت جذب این محلول با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول‌موج ۵۳۲ نانومتر خوانده شد. ماده موردنظر برای جذب در این طول‌موج، کمپلکس قرمز MDA-TBA است. جذب بقیه رنگیزه‌های غیراختصاصی در ۶۰۰ نانومتر تعیین و از این مقدار کسر گردید. برای محاسبه غلظت MDA از ضریب خاموشی معادل $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ استفاده شد و نتایج حاصل از اندازه‌گیری بر حسب نانومول بر گرم وزن تر محاسبه گردید.

هیدروژن پراکسید (H_2O_2): سنجش هیدروژن پراکسید با استفاده از روش Velikova و همکاران (۲۰۰۰) انجام شد. برگ سوم گیاه در حمام یخ با تری‌کلرو استیک اسید ۰/۱ درصد سائیده شد. عصاره در سانتریفوژ یخچال‌دار در ۱۰۰۰۰g برای ۱۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول رویی به ۰/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰ میلی‌مولار (pH=۷) و ۱ میلی‌لیتر یدید پتاسیم یک مولار اضافه گردید و جذب در طول‌موج ۳۹۰ نانومتر خوانده شد. مقدار هیدروژن پراکسید در هر نمونه با استفاده از منحنی استاندارد محاسبه شد و بر حسب میکرومول بر گرم وزن تر گزارش گردید.

تهیه عصاره آنزیمی: به این منظور یک گرم بافت تر برگ سوم در یک هاون چینی محتوی سه میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با pH=۷/۲ که شامل اتیلن دی‌آمین تترا استیک اسید (EDTA) ۱ میلی‌مولار، فنیل متان سولفونیل فلورید (PMSF) ۱ میلی‌مولار و پلی‌وینیل پیرولیدون (PVP) ۱ درصد بود، سائیده شد. عصاره حاصل به‌مدت ۱۵ دقیقه در سانتریفوژ یخچال‌دار در ۱۴۰۰۰g و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. از محلول رویی برای مطالعه فعالیت آنزیم‌ها استفاده گردید.

از روش Bradford (۱۹۷۶)، بیان گردید (Giannopolitis and Ries, 1977).

فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) (EC 1.11.1.6): سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز با استفاده از محاسبه کاهش جذب H_2O_2 (کاهش مقدار H_2O_2 در ۲۴۰ نانومتر و با روش Dhindsa و همکاران (۱۹۸۱) انجام شد. مخلوط واکنش شامل بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی مولار با $pH=7$ و هیدروژن پراکسید ۱۵ میلی مولار است. با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی به مخلوط ذکر شده، واکنش شروع می شود. شاهد برای صفر کردن دستگاه اسپکتروفتومتر شامل مخلوط واکنش اما فاقد عصاره آنزیمی بود. تغییرات جذب (یعنی تفاضل جذب در زمان شروع واکنش از جذب در زمان یک دقیقه)، پس از شروع واکنش محاسبه گردید. میزان H_2O_2 موجود در مخلوط واکنش پس از ۱ دقیقه با استفاده از ضریب خاموشی ($\epsilon=0.28 \text{ mMol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) و فرمول $A = \epsilon bc$ محاسبه شد که نشان دهنده میزان فعالیت آنزیم کاتالاز است. A معادل جذب خوانده شده، ϵ ضریب خاموشی، c غلظت H_2O_2 و b قطر کوت (۱ سانتی متر) است. فعالیت آنزیم به صورت واحد آنزیمی بر حسب مقدار پروتئین کل (میلی گرم) موجود در ۱۰۰ میکرولیتر عصاره به دست آمده از روش Bradford (۱۹۷۶)، در یک دقیقه محاسبه گردید. یک واحد آنزیمی کاتالاز مقدار آنزیمی است که ۱ میلی مول H_2O_2 را در یک دقیقه تجزیه می کند.

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX) (EC1.11.1.1): مخلوط واکنش شامل بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی مول با $pH=7$ ، آسکوربات ۰/۵ میلی مولار، H_2O_2 ۰/۱۵ میلی مولار، EDTA ۰/۱ میلی مولار و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. به دنبال اکسید شدن آسکوربات با شروع واکنش آنزیمی، کاهش جذب در ۲۹۰ نانومتر، دو دقیقه پس از شروع واکنش نسبت به زمان شروع واکنش محاسبه شد. با استفاده از تغییرات جذب در طول موج ۲۹۰ نانومتر، ضریب خاموشی آسکوربات ($2/8 \text{ mMol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) و فرمول $A = \epsilon bc$ ، میزان آسکوربات برجای مانده پس از ۲ دقیقه انجام واکنش آنزیمی

این محلول در فریزر با دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری گردید (Malickn and Singh, 1980).

فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) (EC 1.15.1.1): سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز با استفاده از سنجش مهار احیای نوری نیتروبلو تترازولیم (NBT) در ۵۶۰ نانومتر انجام گرفت. مخلوط واکنش نمونه ها شامل بافر فسفات ۵۰ میلی مولار با $pH=7$ ، NBT ۰/۰۷۵ میکرومولار، ۰/۱ میلی مولار Na-EDTA، ریپوفلاوین ۷۵ میکرومولار، متیونین ۱۳ میلی مولار و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی است. برای سنجش فعالیت این آنزیم علاوه بر شاهد (برای صفر کردن دستگاه اسپکتروفتومتر)، نیاز به نمونه کنترل نیز می باشد. میزان فعالیت آنزیم SOD در نمونه ها در مقایسه با کنترل سنجیده می شود. واکنش در عصاره های تهیه شده در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد با روشن شدن لامپ فلورسنت (۴۰w) آغاز شد و پس از ۸ دقیقه با خاموش کردن لامپ، واکنش متوقف گردید. لوله شاهد شامل مواد ذکر شده در فوق بود با این تفاوت که در آن، عصاره آنزیمی اضافه نگردید و در روشنایی نیز قرار نگرفت. در لوله کنترل نیز مخلوط واکنش ذکر شده وجود داشت با این تفاوت که به آن عصاره آنزیمی اضافه نشد ولی در نور قرار گرفت. بنابراین به دلیل عدم وجود آنزیم در کنترل، احیا NBT در حضور نور (احیا نوری) به طور ۱۰۰٪ در کنترل انجام و تمام نیتروبلو تترازولیم موجود در مخلوط واکنش در حضور نور به فورمازون تبدیل می شود. میزان جذب کنترل در ۵۶۰ نانومتر نشان دهنده ۱۰۰٪ احیای نوری NBT است و نیمی از آن معادل یک واحد آنزیمی است. بنابراین یک واحد آنزیمی سوپراکسید دیسموتاز مقدار آنزیمی است که موجب ۵۰ درصد ممانعت از احیا نوری نیتروبلو تترازولیم (با جلوگیری از تبدیل آن به فورمازون) می گردد. اختلاف جذب نمونه ها و کنترل در ۵۶۰ نانومتر نشان دهنده مهار احیا نوری NBT در حضور آنزیم SOD موجود در نمونه است. با استفاده از این اختلاف جذب، واحد آنزیمی نمونه ها محاسبه و فعالیت آنزیمی بر حسب واحد آنزیم در مقدار پروتئین کل (میلی گرم) در ۵۰ میکرولیتر عصاره (به دست آمده

به مدت ۱۵ تا ۲۰ ثانیه دو لایه مجزا تشکیل شد. میزان جذب لایه‌ی رنگی فوقانی که حاوی تولوئن و پرولین بود در ۵۲۰ نانومتر تعیین شد و برای محاسبه مقدار پرولین از منحنی استاندارد پرولین استفاده گردید و نتایج برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر محاسبه گردید.

ترکیبات فنلی: محتوای ترکیبات فنلی کل با روش Sonald

و Laima (۱۹۹۹) انجام گرفت. مقدار ۰/۱ گرم از برگ سوم گیاه را در ۵ میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد سائیده و به مدت ۲۴-۷۲ ساعت در تاریکی نگهداری شد. سپس به ۱ میلی‌لیتر محلول رویی ۱ میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد اضافه گردید و با آب مقطر دو بار تقطیر حجم محلول به ۵ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر معرف فولین ۵۰ درصد و ۱ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۵ درصد به آن اضافه گردید. مخلوط حاصل به مدت ۱ ساعت در تاریکی نگهداری شد و سپس جذب هر نمونه در طول موج ۷۲۵ نانومتر خوانده شد و با استفاده از گالیک اسید منحنی استاندارد ترسیم و غلظت ترکیبات فنلی کل بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر محاسبه گردید.

فاکتور انتقال (Translocation Factor): جهت ارزیابی

گیاهان به‌عنوان گیاه جذبی، فاکتور انتقال محاسبه شد. فاکتور انتقال نشان‌دهنده توانایی گیاه برای حرکت و جابجایی فلزات از ریشه به اندام هوایی است و از رابطه زیر به‌دست می‌آید (Jing et al., 2014).

فاکتور انتقال = غلظت فلز در ریشه / غلظت فلز در اندام هوایی

فاکتور تجمع زیستی (Bioconcentration Factor):

فاکتور تجمع زیستی برای محاسبه میزان تجمع فلزات سمی در گیاهان به‌واسطه مقایسه غلظت در محیط‌کشت خارجی (مثل خاک یا محیط هوگلند) استفاده می‌شود (Jing et al., 2014).

فاکتور تجمع زیستی = غلظت فلز در محلول هوگلند / غلظت فلز در اندام هوایی

تجزیه و تحلیل‌های آماری طبق آزمایش فاکتوریل با طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار صورت گرفت و داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS (نسخه ۱۶) تحت آنالیز واریانس قرار گرفته و

محاسبه شد. یک واحد آنزیمی آسکوربات پراکسیداز مقدار آنزیمی است که یک میلی‌مول آسکوربات را در یک دقیقه اکسید می‌کند (Nakano and Asada, 1981). فعالیت آنزیم بر حسب واحد آنزیم در مقدار پروتئین کل (میلی‌گرم) موجود در ۵۰ میکرولیتر عصاره به‌دست آمده از روش Bradford (۱۹۷۶)، گزارش شد.

فعالیت آنزیم پراکسیداز (POD) (EC 1.11.1.7):

سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز با استفاده از گایاکول و اندازه‌گیری میزان جذب تراگایاکل تشکیل‌شده از گایاکول در نتیجه فعالیت پراکسیداز، در ۴۷۰ نانومتر انجام گرفت. مخلوط واکنش شامل بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با pH=۷، هیدروژن پراکسید (۰/۳٪) و گایاکول (۰/۱٪) است. واکنش با افزودن ۲۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی به مخلوط واکنش در ۲۵ درجه سانتی‌گراد آغاز گردید. میزان جذب تراگایاکول (حاصل از اکسیدشدن گایاکول) در ۴۷۰ نانومتر در لحظه شروع واکنش پس از اضافه‌نمودن عصاره آنزیمی و پس از یک دقیقه خوانده شد. با استفاده از تغییرات جذب در یک دقیقه در ۴۷۰ نانومتر، ضریب خاموشی تراگایاکول ($\epsilon=25/5 \text{ mMol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) و فرمول $A = \epsilon bc$ ، مقدار تراگایاکول تشکیل‌شده محاسبه شد. این مقدار از تراگایاکول معادل فعالیت یک واحد آنزیم پراکسیداز است (Plewa et al., 1991). فعالیت آنزیم بر حسب واحد آنزیم در مقدار پروتئین کل (میلی‌گرم) موجود در ۲۰ میکرولیتر عصاره به‌دست آمده از روش Bradford (۱۹۷۶)، گزارش شد.

پرولین: برای اندازه‌گیری پرولین از روش Bates (۱۹۷۳)

استفاده شد. مقدار ۰/۰۲ گرم از بافت فریزشده گیاه (برگ سوم) در ۱۰ میلی‌لیتر محلول ۳ درصد سولفوسالسیلیک اسید سائیده و عصاره حاصل به مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰g سانتریفوژ شد. سپس ۲ میلی‌لیتر از مایع رویی را با ۲ میلی‌لیتر معرف نین‌هیدرین و ۲ میلی‌لیتر استیک اسید خالص مخلوط کرده و یک ساعت در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد در حمام آب‌گرم قرار گرفت سپس بلافاصله لوله‌های محتوی مخلوط در حمام یخ سرد گردید. بعد ۴ میلی‌لیتر تولوئن به مخلوط اضافه گردید و لوله‌ها به‌خوبی تکان داده شد. با ثابت نگه‌داشتن لوله‌ها

همزیستی کارآمد است.

آغشتگی میکوریزی ریشه‌های نهال‌های پسته با افزایش غلظت Cu در خاک به‌طور معنی‌داری کاهش پیدا کرد (جدول ۴) (شکل ۱). کاهش یا حتی مهار آغشتگی میکوریزی توسط فلزات سنگین توسط محققان متعددی گزارش شده است (Andrade et al., 2008; Marques et al., 2007). هر چند در برخی موارد در گیاهان در حال رشد در خاک‌های آلوده به فلزات سنگین آغشتگی میکوریزی بیشتری مشاهده گردید (Hildebrandt et al., 1999). این نتایج متغیر احتمالاً به نوع قارچ AM، گیاه مورد مطالعه و نیز خصوصیات خاک بستگی دارند.

بهبود ذخیره فسفر و رشد بیشتر در گیاهان میکوریزی، یکی از مفیدترین اثرات مشاهده‌شده در گیاهان در معرض تنش فلزات سنگین است (جدول ۵). اگر چه، تمامی این فواید تنها به بهبود وضعیت تغذیه گیاه مربوط نمی‌باشد. بدون حضور Cu یا در غلظت‌های کم آن (300 mg/l) غلظت‌های نسبتاً مشابهی از Cu در ریشه و بخش هوایی گیاهان مشاهده گردید اما با افزایش غلظت Cu، آغشتگی میکوریزی باعث کاهش جذب Cu توسط گیاهان شده و در مقایسه با گیاهان NM منجر به کاهش غلظت Cu در بخش هوایی می‌گردد و در نتیجه مقادیر زیادی از Cu در ریشه تجمع می‌یابد (جدول ۵). چنین تغییری در جذب Cu پیشنهاد می‌کند که تحت غلظت‌های بالای Cu، قارچ *G. mosseae* ممکن است تا اندازه‌ای قدرت تحمل گیاهان نسبت به Cu را افزایش دهد. با وجود تأثیر قارچ‌ها بر جذب فلزات توسط گیاهان، کاهش آسیب‌پذیری نسبت به سمیت فلزات، یکی از فواید میکوریزها است که در گیاهان در حال رشد در خاک‌های آلوده به فلزات مشاهده شده است (Andrade et al., 2008).

به‌طور کلی افزایش تحمل گیاه نسبت به فلزات سنگین توسط قارچ‌های میکوریزی از طریق چندین مکانیسم صورت می‌گیرد که عبارتند از:

۱- غیرمتحرک کردن فلزات سنگین توسط ترکیبات ترشح‌شده از قارچ‌ها مانند گلومالین که یک گلیکوپروتئین

اختلاف میانگین‌ها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح اطمینان ۹۵٪ مقایسه شدند.

نتایج و بحث

آنالیز آماری داده‌ها بر طبق جداول تجزیه واریانس (جدول ۱، ۲ و ۳) نشان از معنی‌دار بودن اثرات جداگانه مس و میکوریز بر صفات مورفولوژیک و فیزیولوژیک در سطح احتمال ۱ درصد است ($P \leq 0/01$). ولی اثرات متقابل مس و میکوریز بجز در مورد طول و وزن خشک ساقه، قند کل، مالون دالدئید و ترکیبات فنلی در بقیه موارد در سطح ۱ درصد معنی‌دار بود ($P \leq 0/01$) و در مورد پروتئین در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌دار ($P \leq 0/05$) بود.

طبق نتایج این تحقیق با افزایش غلظت Cu طول ریشه و ساقه و نیز وزن خشک ریشه و ساقه پسته‌های میکوریزی و غیرمیکوریزی به‌طور معنی‌داری کاهش یافت که البته پسته‌های تلقیح‌شده با *G. mosseae* به‌طور معنی‌داری رشد بیشتری داشتند (جدول ۴). اتساع دیواره و فراوانی مواد محلول برای ایجاد فشار اسمزی دو نیاز اساسی برای رشد و طویل شدن سلول هستند. تصور می‌شود که اتصال Cu^{2+} به‌صورت مستقیم یا با جایگزینی قسمتی از Ca^{2+} دیواره سلول انعطاف‌پذیری آن را کاهش می‌دهد که دلیلی بر اثبات کاهش رشد گیاه در حضور Cu اضافی است (Sesse et al., 2004). به‌خوبی مشخص شده است که ارتباط بین گیاهان و میکروارگانیزم‌های خاک شامل قارچ‌های میکوریز می‌تواند پاسخ‌های گیاهان به تنش‌های القاشده توسط فلزات را تغییر دهد به‌طوری که قدرت تحمل گیاهان در خاک‌های آلوده به فلزات را افزایش می‌دهند (Gohre and Paszkowski, 2006). با افزودن Cu به خاک، کاهش وزن خشک گیاه، طول ریشه و ساقه مشاهده شد. این نتیجه نشان می‌دهد که فرآیندهای متابولیکی ممکن است تحت تأثیر مقادیر بالای Cu در خاک دچار اختلال شوند. آغشتگی میکوریزی در مقایسه با گیاهان فاقد میکوریز باعث تحریک افزایش طول ریشه و ساقه و وزن خشک گیاه در سطوح بالای Cu می‌گردد که بیانگر وجود یک

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس درصد آغشتگی، شاخص‌های رشدی، میزان مس ریشه و ساقه و فسفر کل

P	میانگین مربعات					طول ریشه	درصد آغشتگی	درجه آزادی	منابع تغییر
	میزان مس ساقه	میزان مس ریشه	وزن خشک ساقه	وزن خشک ریشه	طول ساقه				
۱۰/۱۲۵**	۰/۷۴۵**	۰/۱۷۹ ^{ns}	۰/۰۱۴**	۰/۰۰۵**	۱۵۴۹/۳۸۹**	۸۹۷/۸۹۱**	۱۰۴۱۶/۰۵۶**	۱	میکوریز
۱۶/۰۵۳**	۱/۴۸۸**	۱۰/۴۹۵**	۰/۰۰۸**	۰/۰۰۲**	۱۵۴/۱۶۷*	۳۹۰/۸۵۲**	۲۰۴/۲۲۲**	۲	مس
۰/۹۳۸**	۰/۲۱۳ ^{ns}	۰/۱۱۰ ^{ns}	۰/۰۰ ^{ns}	۰/۰۰۱**	۷۰/۳۸۹	۲/۹۸۹	۲۰۴/۲۲۲**	۲	میکوریز × مس
۰/۰۰۳	۰/۰۶۳	۰/۵۰۰	۰/۰۰۱	۷/۱۸۲	۳۹/۰۸۳	۷/۴۵۱	۱/۵۰۰	۱۲	خطا

**، *، ns به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد و غیرمعنی‌دار

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس کلروفیل a، کلروفیل b، کاروتنوئیدها، قند کل، پروتئین کل، مالون دآلدئید، پرولین و ترکیبات فنلی

پرولین	میانگین مربعات					کلروفیل a	کلروفیل b	درجه آزادی	منابع تغییر
	مالون دآلدئید	پروتئین کل	قند کل	کاروتنوئیدها	کلروفیل b				
۲/۰۸۱**	۰/۳۰۹**	۵۷۴/۶۰۵**	۶۱۳/۰۸۳**	۲/۶۷۶**	۶/۶۷۳**	۱۹/۵۳۱**	۱	میکوریز	
۳/۱۹۴**	۰/۱۶۱**	۷۱۲/۸۶۵**	۸۳۶/۲۰۱**	۱/۹۴۳**	۷/۵۹۶**	۵۲/۳۴۳**	۲	مس	
۰/۴۷۶**	۰/۰۰۱ ^{ns}	۵/۰۵۵*	۰/۰۸۷ ^{ns}	۰/۶۵۲**	۰/۴۷۷**	۰/۴۹۴**	۲	میکوریز × مس	
۰/۰۰	۰/۰۰۲	۰/۷۸۵	۰/۶۷۰	۰/۰۲۹	۰/۰۴۳	۰/۰۷۴	۱۲	خطا	

**، *، ns به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد و غیرمعنی‌دار

جدول ۳- نتایج تجزیه واریانس ترکیبات فنلی، BCF, TF, APX, CAT, POD, SOD

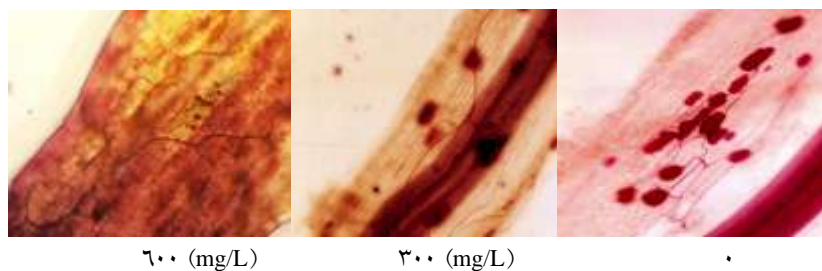
BCF	TF	APX	CAT	POD	SOD	ترکیبات فنلی	درجه آزادی	منابع تغییر
۲/۷۱۴**	۰/۳۷۰**	۰/۰۱۰**	۰/۰۰۲**	۰/۳۷۸**	۱۳۸/۴۴۵**	۰/۰۲۶*	۱	میکوریز
۱۰/۱۰۳**	۰/۰۸۹**	۰/۰۰۶**	۰/۰۰۵**	۰/۳۱۵**	۱۸۵/۸۹۰**	۱/۱۰۵**	۲	مس
۰/۷۵۰**	۰/۰۲۰**	۰/۰۰**	۰/۰۰**	۰/۰۳۶**	۰/۳۴۳**	۰/۰۰۱ ^{ns}	۲	میکوریز × مس
۰/۱۶۷	۰/۰۰	۰/۰۰	۴/۳۷۲	۰/۰۰	۰/۰۴۰	۰/۰۰	۱۲	خطا

**، *، ns به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد و غیرمعنی‌دار

Gohre and Paszkowski, 2006; Malekzadeh *et al.*, (2011).

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که میزان کلروفیل‌ها و کاروتنوئید برگ‌ها با افزایش غلظت مس محیط‌کشت در گیاهان میکوریزی و غیرمیکوریزی به‌طور معنی‌داری کاهش

غیرمحلول است در خاک آزاد شده و فلزات سنگین را به‌وسیله اتصال به خود غیرمتحرک می‌سازد، ۲- ته‌نشینی در گرانول‌های پلی‌فسفات در خاک، ۳- جذب سطحی به کیتین در دیواره سلول، ۴- کلاته‌شدن فلزات در داخل وزیکول‌های قارچی، ۵- تغییر در pH ریزوسفر و ۶- تغییر بیان ژن تحت شرایط تنش



شکل ۱- آغشتگی ریشه دانه‌های پسته احمد آقایی به قارچ *Glomus mosseae* در سطوح مختلف مس (میلی‌گرم بر لیتر) (تصاویر با بزرگنمایی ۴۰۰x است).

جدول ۴- اثر تیمار میکوریز (+ دارای میکوریز و - بدون میکوریز) و غلظت‌های مختلف مس بر طول ریشه و ساقه (سانتی‌متر) و وزن خشک ریشه و ساقه (گرم)

CuNO ₃ (mg/L)	وضعیت میکوریزی	درصد آغشتگی میکوریزی	طول ریشه	طول ساقه	وزن خشک ریشه	وزن خشک ساقه
۰	-	۵۹/۶۶ ± ۱/۲۰ ^a	۲۵ ± ۰/۵۷ ^d	۲۲/۵ ± ۳/۷۵ ^c	۰/۰۹ ± ۰/۰۰۳ ^{bc}	۰/۰۷۹ ± ۰/۰۰۶ ^{bc}
۰	+	۴۸/۳۳ ± ۰/۸۸ ^b	۳۹/۸۳ ± ۱/۹۶ ^b	۴۳/۵ ± ۱/۴۴ ^a	۰/۱۰۳ ± ۰/۰۰۲ ^{ab}	۰/۱۳ ± ۰/۲۵ ^{ab}
۳۰۰	-	۳۶/۳۳ ± ۰/۸۸ ^c	۳۵/۱۷ ± ۰/۱۶۶ ^{bc}	۲۳/۷۵ ± ۳/۹۶ ^c	۰/۰۵۸ ± ۰/۰۰۶ ^d	۰/۰۸۱ ± ۰/۰۰۶ ^{bc}
۳۰۰	+	۳۶/۳۳ ± ۰/۸۸ ^c	۴۷/۶ ± ۲/۵۸ ^a	۳۸/۱۶ ± ۱/۴۲ ^{ab}	۰/۱۱۳ ± ۰/۰۰۵ ^a	۰/۱۵ ± ۰/۰۱۰ ^a
۶۰۰	-	۳۶/۳۳ ± ۰/۸۸ ^c	۱۷/۷۹ ± ۰/۹۷ ^e	۱۲/۶۷ ± ۴/۴۸ ^d	۰/۰۴۷ ± ۰/۰۰۵ ^d	۰/۰۲۳ ± ۰/۰۱۳ ^d
۶۰۰	+	۳۶/۳۳ ± ۰/۸۸ ^c	۳۲/۸۳ ± ۱/۷۴ ^c	۳۱/۵ ± ۴/۹۱ ^{bc}	۰/۰۷۸ ± ۰/۰۰۶ ^c	۰/۰۷۱ ± ۰/۰۲۳ ^{cd}

حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون دانکن است.

جدول ۵- اثر تیمار میکوریز (+ دارای میکوریز و - بدون میکوریز) و غلظت‌های مختلف مس بر میزان مس ریشه و ساقه (میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) و فسفر کل گیاه (میلی‌گرم بر گرم وزن خشک)

CuNO ₃ (mg/L)	وضعیت میکوریزی	فسفر کل	میزان مس ساقه	میزان مس ریشه
۰	-	۳/۴۴ ± ۰/۰۰۶ ^c	۰/۴۲ ± ۰/۰۸۷ ^{cd}	۰/۴۹ ± ۰/۱۲۳ ^b
۰	+	۵/۷۵ ± ۰/۰۰۶ ^a	۰/۳۲ ± ۰/۰۷۳ ^d	۰/۶۷ ± ۰/۱۵۷ ^b
۳۰۰	-	۲/۹۸ ± ۰/۰۰۶ ^d	۰/۸۲ ± ۰/۰۰۳ ^{bc}	۱/۴۶ ± ۰/۰۷۲ ^b
۳۰۰	+	۴/۴۴ ± ۰/۰۰۶ ^b	۰/۵۴ ± ۰/۰۳۸ ^{bcd}	۱/۴ ± ۰/۴۳ ^b
۶۰۰	-	۱/۰۶ ± ۰/۰۰۶ ^f	۱/۷۶ ± ۰/۳۲ ^a	۲/۹۴ ± ۰/۴۳ ^a
۶۰۰	+	۱/۷۹ ± ۰/۰۰۶ ^e	۰/۹۳ ± ۰/۰۴۰ ^b	۳/۴ ± ۰/۲۳ ^a

حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون دانکن است.

می‌یابد که البته گیاهان میکوریزی دارای محتوای کلروفیل این افزایش در میزان محتوای کلروفیل در گیاهان میکوریزی بالاتری در مقایسه با گیاهان غیرمیکوریزی هستند (جدول ۶). ممکن است به دلیل جذب بهتر Mg^{2+} و فسفر توسط قارچ

جدول ۶- اثر تیمار میکوریز (+ دارای میکوریز و - بدون میکوریز) و غلظت‌های مختلف مس بر کلروفیل a و b (میلی‌گرم بر گرم وزن تر)، کارتنوئیدها (میلی‌گرم بر گرم وزن تر)، قند کل (میلی‌گرم بر گرم وزن خشک)، پروتئین کل (میلی‌گرم بر گرم وزن تر)

وضعیت میکوریزی	CuNO ₃ (mg/L)	کلروفیل a	کلروفیل b	کارتنوئیدها	قند کل	پروتئین کل
-	۰	۱۲/۶۵ ± ۰/۲۵ ^b	۴/۸۸ ± ۰/۰۴۹ ^b	۳/۴۷ ± ۰/۱۳۵ ^c	۵۰ ± ۰/۰۵۷ ^b	۶۰/۳۵ ± ۰/۰۵۴ ^b
+	۰	۱۴/۱۸ ± ۰/۰۴۲ ^a	۶/۴۸ ± ۰/۱۵ ^a	۴/۹۸ ± ۰/۱۲۷ ^a	۶۱/۵۵ ± ۰/۸۹ ^a	۷۲/۴۵ ± ۱/۰۶ ^a
-	۳۰۰	۷/۹۶ ± ۰/۰۹ ^e	۳/۶۶ ± ۰/۱۲۹ ^c	۳/۷۹ ± ۰/۰۰۳ ^b	۳۷/۶ ± ۰/۲۳ ^b	۴۹/۲۵ ± ۰/۰۸۶ ^c
+	۳۰۰	۱۰/۶۳ ± ۰/۲۴ ^c	۵/۱۵ ± ۰/۰۹۸ ^b	۴/۰۵ ± ۰/۰۴۶ ^b	۴۹/۱۱ ± ۰/۱۷ ^b	۶۱/۸۵ ± ۰/۰۸۶ ^b
-	۶۰۰	۶/۶۷ ± ۰/۰۹۸ ^f	۳/۱۵ ± ۰/۰۱۴ ^d	۲/۸۵ ± ۰/۰۳۲ ^d	۲۶/۲ ± ۰/۴۶ ^d	۴۰ ± ۰/۲۸ ^d
+	۶۰۰	۸/۷۲ ± ۰/۰۴۶ ^d	۳/۷۲ ± ۰/۱۸۷ ^c	۳/۴ ± ۰/۱۳۸ ^c	۳۸/۱۵ ± ۰/۴۹ ^c	۴۹/۲ ± ۰/۱۷ ^c

حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون دانکن است.

و تغییرات مشخص در بیان ژن‌هایی که در گیاهان میکوریزی رخ می‌دهد ممکن است توضیحی برای مشاهده غلظت‌های بالای پروتئین در برگ‌های پسته میکوریزی باشند (Recorbet *et al.*, 2013). القای ژن‌های کدکننده پروتئین‌های دخیل در تحمل فلزات سنگین در گیاهان میکوریزی توسط Hildebrandt و همکاران (۲۰۰۷) گزارش شده است و این امر ممکن است در ارتقای میزان تحمل فلزات در گیاهان میکوریزی نقش داشته باشد.

پرویلین یکی از اسمولیت‌های مهم درگیر در حفظ آب بافتها است. تجمع پرویلین و سایر اسمولیت‌ها به گیاهان برای حفظ پتانسیل آبی سلولی در محلول خاک کمک می‌کند (Hashem *et al.*, 2014). در مطالعه حاضر افزایش تجمع پرویلین به‌علت تنش Cu در برگ‌های گیاهان پسته میکوریزی و غیرمیکوریزی مشهود بود ولی در گیاهان پسته میکوریزی مقدار آن به‌طور معنی‌داری پایین‌تر بود (جدول ۷). بر همین اساس، تجمع بالای پرویلین در پاسخ به Cu در خاک بیانگر نقش سم‌زدایی این اسیدآمین در شرایط تنش Cu است یعنی جایی که محل تجمع بالای پرویلین القاشده توسط Cu به شمار می‌رود. پیش از این نیز مشاهده شده بود که پرویلین در گیاهان تحت شرایط تنش فلزات سنگین تجمع می‌یابد که این امر بر وجود نقش تنظیمی یا محافظتی پرویلین دلالت دارد (Sharma and Dietz, 2006; Fariduddin *et al.*, 2009).

میکوریز باشد که می‌تواند محتوای کلروفیل بالاتر در گیاهان میکوریزی را تأیید کند (Giri *et al.*, 2003; Andrade *et al.*, 2008). کاهش میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی در گیاهان تحت تیمار مس می‌تواند به دلیل آسیب‌های اکسیداتیو باشد. همچنین این کاهش در اثر بازدارندگی مراحل مختلف سنتز کلروفیل و رنگیزه‌های کارتنوئیدی (Hegedus *et al.*, 2001) و نیز مربوط به توقف عمل آنزیم‌های دخیل در سنتز کلروفیل و یا تجزیه کلروفیل است (Yruela, 2005). فلزات سنگین با بازدارندگی بیوسنتز پروتئین‌های کمپلکس LHClI در سطح رونویسی تشکیل این کمپلکس را مختل می‌نمایند. کاروتنوئیدها نقش حفاظتی در برابر تنش اکسیداتیو دارند به همین علت از بین می‌روند (Tziveleka *et al.*, 1999). این رنگیزه‌ها در سمیت‌زدایی کلروفیل نقش دارند و باعث کاهش اثرات سمی رادیکال‌های آزاد می‌شوند.

کل محتوای پروتئین در برگ‌های گیاهان میکوریزی در مقایسه با گیاهان غیرمیکوریزی بالاتر بود (جدول ۶) که با نتایج سایر محققان مطابقت دارد (Andrade *et al.*, 2008). الگوهای متفاوت فیزیولوژیکی و بیان پروتئین قبلاً در گیاهان میکوریزی در پاسخ به مواجهه با فلزات (Ouziad *et al.*, 2007; Hildebrandt *et al.*, 2005) یا تحت سایر تنش‌های غیرزیستی (Sannazzaro *et al.*, 2007) گزارش شده است. تحریک سنتز پروتئین‌های جدید توسط فرآیند میکوریزی شدن

جدول ۷- اثر تیمار میکوریز (+ دارای میکوریز و - بدون میکوریز) و غلظت‌های مختلف مس بر مالون دآلدئید (نانومول بر گرم وزن تر)، هیدروژن پراکسید (میکرومول بر گرم وزن تر)، پرولین (میلی‌گرم بر گرم وزن تر)، ترکیبات فنلی (میلی‌گرم بر گرم وزن تر)، فاکتور انتقال (TF) و فاکتور تجمع زیستی (BCF)

BCF	TF	ترکیبات فنلی	پرولین	هیدروژن پراکسید	مالون دآلدئید	وضعیت میکوریزی	CuNO ₃ (mg/L)
۲/۱±۰/۴۳ ^{abc}	۰/۸۶±۰/۰۱۲ ^a	۰/۳۳±۰/۰۰۵۷ ^f	۰/۶۳±۰/۰۰۵۷ ^d	۰/۳±۰/۰۰۵۷ ^e	۰/۵۶±۰/۰۰۵۷ ^b	-	.
۱/۶±۰/۳۶ ^c	۰/۴۸±۰/۰۰۶ ^d	۰/۳۹±۰/۰۱۲ ^e	۰/۲۹±۰/۰۰۵۷ ^f	۰/۰۹±۰/۰۰۵۷ ^f	۰/۲۸±۰/۰۰۷ ^d	+	
۲/۷۳±۰/۱۱ ^a	۰/۵۶±۰/۰۱۲ ^c	۰/۵۹±۰/۰۱۴ ^d	۰/۷۱±۰/۰۰۵۷ ^c	۰/۶±۰/۰۰۵۷ ^c	۰/۶۳±۰/۰۱۲ ^b	-	۳۰۰
۱/۷۸±۰/۱۲ ^b	۰/۴۰±۰/۰۲۴ ^e	۰/۶۶±۰/۰۱۲ ^c	۰/۳۴±۰/۰۰۵۷ ^e	۰/۴±۰/۰۰۵۷ ^d	۰/۴±۰/۰۱۲ ^c	+	
۲/۹۳±۰/۵۴ ^a	۰/۶۰±۰/۰۰۹ ^b	۱/۱۵±۰/۰۰۵۷ ^b	۲/۴۲±۰/۰۰۵۷ ^a	۱/۲±۰/۰۰۵۷ ^a	۰/۸۸±۰/۰۰۶ ^a	-	۶۰۰
۱/۵۵±۰/۰۶ ^b	۰/۲۸±۰/۰۰۶ ^f	۱/۲۵±۰/۰۰۵۷ ^a	۱/۰۹±۰/۰۰۵۷ ^b	۰/۸±۰/۰۰۵۷ ^b	۰/۶±۰/۰۰۵۷ ^b	+	

حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون دانکن است.

زنجریره انتقال الکترون ایجاد نماید (Lombardi and Sebadtiani, 2005). این یافته‌ها ممکن است کاهش قابل توجه محتوای کلروفیل برگ گیاهان پسته غیرمیکوریزی و بهبود آن در گیاهان میکوریزی را توجیه نمایند.

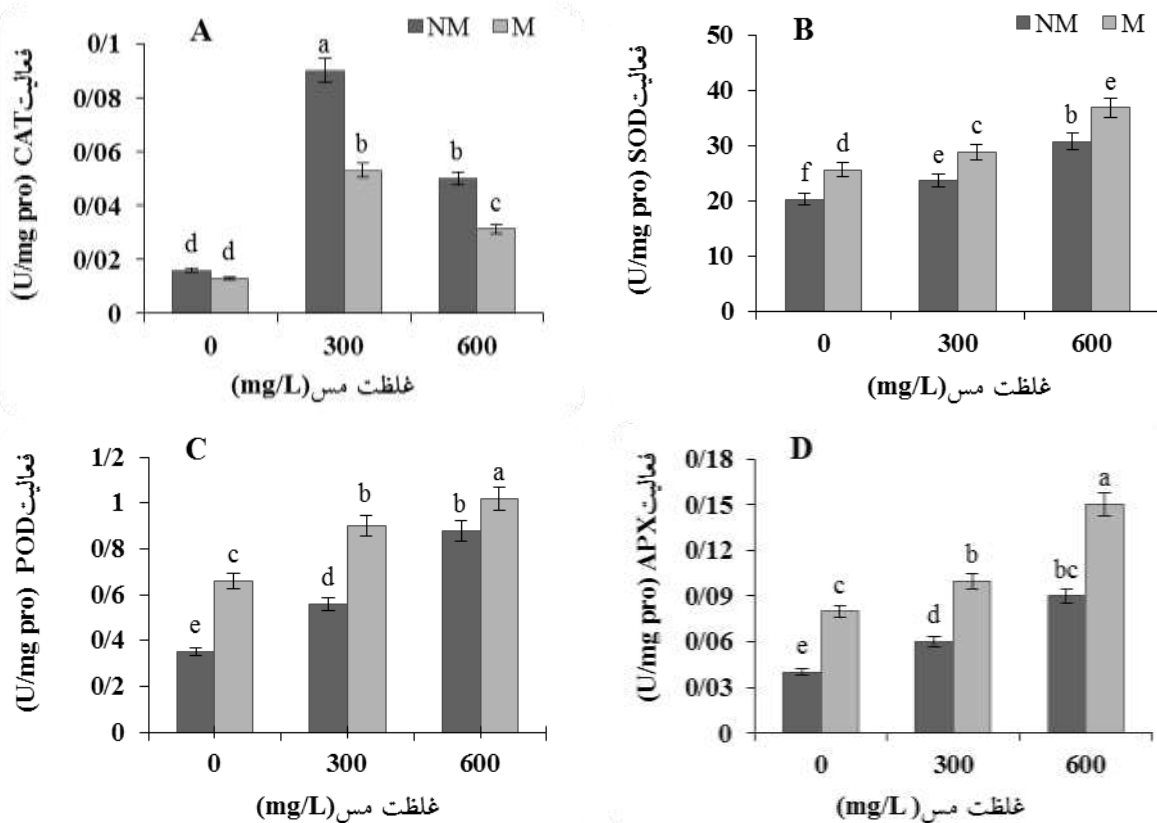
بر اساس نتایج این پژوهش با افزایش تنش مس میزان ترکیبات فنلی به‌طور معنی‌داری افزایش نشان می‌دهد (جدول ۷) که این افزایش ترکیبات فنلی در شرایط میکوریزی به‌طور معنی‌داری نسبت به وضعیت غیرمیکوریزی بالاتر بود.

افزایش فنل در گیاهان میکوریزی در این پژوهش با نتایج سایر محققین در گیاهان افدرا (Alqarawi et al., 2014)، باقلا (Abd-allah et al., 2014)، آفتابگردان (Hashem et al., 2014)، جو (Dudjak et al., 2004)، *Erica andevalensis* (2014)، و شاه‌دانه (Marquez-Garcia et al., 2012) و شاهدانه (Ahmad et al., 2015) مشابهت دارد.

ترکیبات فنلی تنش اکسیداتیو را اصلاح کرده و پایداری غشا را افزایش می‌دهند که منجر به حفظ رشد گیاه می‌گردند (Khattab, 2007). قرار گرفتن در معرض شرایط تنش‌زا باعث تنظیم فعالیت آنزیم‌های درگیر در بیوستز ترکیبات فنلی از بالا شده و منجر به حذف مؤثر رادیکال‌های سمی و رشد بهتر گیاه می‌گردد (Wada et al., 2014). از بین‌رفتن ROS توسط آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند SOD، CAT، APX و POD

نقش‌های پیشنهادی پرولین کاهش سطح رادیکال‌های آزاد تولیدشده در اثر سمیت مشابه نقش مولکول‌های دیگری مانند گلوکاتایون، آسکوربیک اسید یا آلفاتوکوفرول است. بر همین اساس پیشنهاد می‌شود که پرولین به‌عنوان یک شاخص مناسب برای سمیت Cu محسوب شود.

تحت تنش مس، پراکسیداسیون لیپید و تولید MDA و H₂O₂ در نتیجه تنش اکسیداتیو آغاز می‌گردد. در مطالعه حاضر، افزایش محتوی MDA و H₂O₂ حتی پس از قرارگرفتن در معرض مس پایین نیز قابل توجه بود (جدول ۷). افزایش MDA مشاهده‌شده در برگ‌های پسته نشانه وجود تنش اکسیداتیو است. گزارشات نشان دادند که Cu اضافی باعث افزایش فعالیت آنزیم لیپواکسیژنازی می‌شود (Ahmed et al., 2010) که فرآیند پراکسیداسیون لیپیدها را کاتالیز می‌کند و مشخصه آن افزایش سطح MDA است. کاهش رشد گیاهان به‌دنبال سمیت با فلزات سنگین با آسیب‌های فراساختاری و تغییرات فیزیولوژیکی ناشی از تنش اکسیداتیو مرتبط است. چنین شرایط تنش سلولی می‌تواند منجر به افزایش تولید ROS و متعاقباً آسیب‌های برگشت‌ناپذیر به ماکرومولکول‌ها گردد (Lombardi and Sebadtiani, 2005). همچنین پیشنهاد شده است که تولید ROS به‌دلیل سمیت Cu ممکن است آسیب‌هایی به غشاهای تیلاکوئیدی وارد کرده و تغییراتی را در



شکل ۱- اثر تیمار میکوریز (M دارای میکوریز و NM بدون میکوریز) و غلظت‌های مختلف مس بر فعالیت آنزیم‌های کاتالاز (A)، سوپراکسید دسموتاز (B)، پراکسیداز (C) و آسکوربات پراکسیداز (D) بر حسب واحد بر میلی‌گرم پروتئین

دارد، در اجزای مختلف سلولی نظیر سیتوزول و پلاستیدها یافت می‌شود و احتمالاً در تنظیم دقیق میزان ROS لازم برای پیام‌رسانی مشارکت می‌کند. بنابراین، افزایش فعالیت APX در گیاهان تیمار شده با Cu بیانگر افزایش تولید H_2O_2 بوده است. افزایش قابل توجه فعالیت آنزیم پاکسازی H_2O_2 ، پراکسیداز (POD)، همزمان با افزایش مس در گیاهان غیرمیکوریزی و میکوریزی مشاهده شد (شکل ۲). در ریشه گیاهان تلقیح‌شده با قارچ *G. mosseae* به دلیل انباشتن فلز مس در داخل ریشه‌های قارچی، تولید H_2O_2 افزایش می‌یابد و در نتیجه گیاهان میکوریزی به دلیل داشتن H_2O_2 بیشتر فعالیت آنزیم POD شدیدتر است که در پژوهش‌های سایر محققین نیز این مورد گزارش شده است (Ling-Zhi *et al.*, 2011; Malekzadeh *et al.*, 2012; Alqarawi *et al.*, 2014).

به نظر می‌رسد که افزایش سطوح POD از سلول گیاهی در برابر اکسیداسیون رادیکال آزاد محافظت می‌کند، که به گیاه برای

صورت می‌گیرد. در مطالعه حاضر، تیمار گیاهان پسته با Cu منجر به افزایش فعالیت این آنزیم‌ها گردید (شکل ۲) که می‌تواند نشانه شروع سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی باشد (Marquez-Garcia and Cordoba, 2010). علاوه بر این، آنزیم‌های SOD، APX و POD در گیاهان میکوریزی و در حضور مقادیر سمی Cu فعالیت بیشتری را در مقایسه با گیاهان غیرمیکوریزی نشان دادند در حالی که CAT در گیاهان میکوریزی فعالیت کمتری نشان داد (شکل A، B، C، D).

SOD، یک آنزیم آنتی‌اکسیدانی است که در فرآیند دفاع سلولی علیه ROS نقش مهمی را ایفا می‌کند (Sharma *et al.*, 2012) و CAT مهم‌ترین آنزیمی است که میزان H_2O_2 را در سلول‌ها کاهش می‌دهد. Cu به‌طور خاص مخرب غشا است (Ahmed *et al.*, 2010) و تحریک فعالیت SOD در گیاهان میکوریزی تیمار شده با Cu بیانگر نقش محافظتی آن در برابر آسیب‌های غشایی است. APX که در تبدیل H_2O_2 به آب نقش

بعد دیگری که در مورد جذب فلز می‌توان مطرح کرد نحوه جذب فلز به ریشه‌ها است. تا زمانی که یک اختلاف شیب غلظت فلز میان درون و بیرون ریشه‌ها حاکم باشد، Cu با پدیده جذب غیرفعال و در جهت شیب غلظت وارد ریشه‌ها می‌شود ولی با افزایش غلظت Cu داخل ریشه، جذب عمدتاً به شکل فعال ادامه پیدا خواهد کرد.

با توجه به این که جذب فعال بامصرف انرژی انجام گرفته و وابسته به فعالیت‌های متابولیکی گیاه است، با افزایش غلظت Cu خاک و به تبع آن مسمومیت سلول‌های گیاهی و کاهش فعالیت‌های متابولیکی، به‌طور کلی، جذب Cu از محلول خاک به ریشه‌ها کاهش می‌یابد. مکانیسم مطرح دیگر در این زمینه، تحریک سیستم فنولیک گیاه به‌واسطه آغشتگی میکوریزی است که در نتیجه، تیول‌هایی مثل گلوکاتیون تشکیل می‌شوند. این ترکیب‌ها از نظر ساختاری با فیتوکلاتین‌ها ارتباط دارند و با تشکیل پیوند با فلز سنگین علاوه بر ممانعت از بروز مسمومیت در گیاه، در سمیت‌زدایی خاک‌های آلوده نیز از طریق جذب و تجمع بالای فلزات سنگین در گیاه، نقش مهمی ایفا می‌کنند (Marquez et al., 2007). فاکتور تجمع زیستی (BCF) نشان‌دهنده غلظت آلاینده‌ها در گیاهان در مقایسه با غلظت‌های زیست‌محیطی است (Wang et al., 2013). براساس مطالعه انجام‌گرفته مشخص شد که مقدار فاکتور تجمع زیستی در گیاهان میکوریزی به‌طور معنی‌داری پایین‌تر از گیاهان غیرمیکوریزی است (جدول ۷). تجمع عنصر در گیاه بستگی به ویژگی‌های گیاه، گونه و اندام گیاهی و اثرات متقابل فلزات سنگین و سمیت آنها دارد این فاکتور نشان‌دهنده توانایی گیاه در تجمع فلز خاص نسبت به غلظت آن در محیط‌کشت گیاه است. اگر میزان $BCF \geq 1$ گیاه توانایی مناسبی برای جذب و انتقال عنصر دارد. از آنجا که در پسته $TF \leq 1$ و $BCF \geq 1$ بود. بنابراین پسته می‌تواند تثبیت‌کننده (phytostabilizer) مس باشد. نتایج حاصل از پژوهش حاضر با نتایج بررسی انجام‌شده در گیاه بادام زمینی مطابقت دارد (Nareshkumar et al., 2015).

نتیجه‌گیری

انطباق با عوامل تنش‌زا کمک خواهد کرد (Sai Kachout, 2010). فاکتور انتقال (TF) محاسبه‌شده نشان می‌دهد که با افزایش غلظت مس در خاک فاکتور انتقال در گیاهان میکوریزی و غیرمیکوریزی افزایش نشان می‌دهد (جدول ۷) که البته در گیاهان میکوریزی فاکتور انتقال به‌طور معنی‌داری پایین‌تر از گیاهان غیرمیکوریزی بود. در پژوهش‌های انجام‌شده توسط سایر محققین نیز روی جذب فلزات سنگین توسط گیاه شبدر سفید این فاکتور در گیاهان میکوریزی ۱۰ تا ۲۰ برابر کمتر از گیاهان غیرمیکوریزی گزارش شده است (Madani et al., 2013). مکانیسم‌های مقاومتی گیاهان به فلزات سنگین شامل دو استراتژی ممانعت از جذب و یا تجمع فلز در اندام گیاه است (Zou and Song, 2004). به‌طوری که در استراتژی تجمع $(TF \geq 1)$ گیاه مقادیر بالاتری از فلز را به اندام هوایی منقل می‌کند و تنها مقادیر ناچیزی در ریشه ذخیره می‌شود و در استراتژی ممانعت از جذب $(TF \leq 1)$ مقادیر بالاتری از فلز در ریشه ذخیره می‌شود (Sun et al., 2009). نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که در پسته $TF \leq 1$ است. صرف نظر از تأثیر ساختارهای قارچی در کمپلکس‌کردن فلز و کاهش انتقال به بخش هوایی عوامل دیگری می‌توانند دلیلی برای کاهش انتقال فلز باشند. یکی از دلایلی که می‌توان برای کاهش انتقال به بخش هوایی گیاهان بیان کرد با توجه به این که انتقال فلز به اندام هوایی از طریق آوندهای چوبی صورت می‌گیرد و عامل انتقال در این آوندها، شیب هیدروستاتیک و شیب پتانسیل آب است، بنابراین با کاهش رشد گیاهان در اثر افزایش غلظت Cu، میزان تبخیر و تعرق کاهش و میزان انتقال در این آوندها نیز کاهش می‌یابد (Kholdbryn and Islamzadeh, 2002). با توجه به اثر بازدارنده فلز سنگین بر شدت فتوسنتز، تولید کربوهیدرات‌ها کاهش می‌یابد و به تبع آن میزان انتقال این مواد در ریشه‌ها نیز کم می‌شود. از طرف دیگر کربوهیدرات‌ها سوبسترای اصلی برای تنفس هستند، بنابراین با کاهش میزان فتوسنتز تأمین کربوهیدرات‌ها برای ریشه‌ها و حتی قارچ همزیست محدود شده و تنفس آنها کاهش می‌یابد (Amanifar et al., 2010).

شرایط تنش متوسط Cu بود که نه تنها رشد گیاه را تحریک نمود بلکه باعث افزایش محتوای کلروفیل، قند، پروتئین، تجمع اسمولیت‌ها و فسفر گیاه نیز گردید که همگی گویای فعالیت مکانیسم‌های سودمندی در این راستا هستند و پیشنهاد می‌کنند که این ارتباط همزیستی می‌تواند به گیاهان پسته برای مقابله با اثرات Cu بالا در خاک کمک نماید. لازم به ذکر است که سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی دیگری نیز ممکن است در سمیت‌زدایی Cu نقش داشته باشند و بایستی در مطالعات آینده مورد توجه قرار گیرند.

تفاوت‌های چشم‌گیری میان گیاهان پسته میکوریزی و غیرمیکوریزی در پاسخ به افزایش میزان Cu در خاک مشاهده گردید. آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی القاشده توسط Cu در گیاهان عمدتاً با *G. mosseae* مرتبط بوده و تجمع پرولین و افزایش سطح MDA بارزترین پاسخ به افزایش Cu در گیاهان غیرمیکوریزی به‌شمار می‌آید. همچنین در مطالعه حاضر مشخص شد که در شرایط غلظت بالای Cu، گیاهان پسته میکوریزی غلظت Cu کمتری را در ریشه و به‌ویژه بخش هوایی نشان می‌دهند و گیاهان تلقیح‌شده با *G. mosseae* از رشد بهتری برخوردار بودند. علاوه بر این، *G. mosseae* قادر به حفظ یک همزیستی میکوریزی کارآمد با گیاهان پسته در

منابع

شمس‌الدین، ه.، جلالی، و. و جعفری، ا. (۱۳۹۴) ارزیابی شاخص‌های آلودگی زیست‌محیطی در اطراف کارخانه مس سرچشمه. مهندسی زراعی. مجله علوم کشاورزی ۵۳: ۳۷-۳۸.

- Abd-allah, E. F., Hashem, A., Alqarawi, A. A. and Alwathnani Hend, A. (2014) Alleviation of adverse impact of cadmium stress in sunflower (*Helianthus annuus* L.) by arbuscular mycorrhizal fungi. *Pakistan Journal of Botany* 47: 785-795.
- Abdel Latef, A. A. (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.
- Ahmed, H., Hasanain, A., Akhtar, S., Hussain, A., Abaid-ullah, Y. G., Wahid, A. and Mahmood, S. (2010) Antioxidant enzymes as bio-markers for copper tolerance in sunflower (*Carthamus tinctorius* L.). *African Journal of Biotechnology* 9: 5441-5444.
- Ahmad, A., Hadi, F. and Ali, N. (2015) Effective phytoextraction of cadmium (Cd) with increasing concentration of total phenolics and free proline in *Cannabis sativa* (L) plant under various treatments of fertilizers, plant growth regulators and sodium salt. *International Journal of Phytoremediation* 17: 56-65.
- Alqarawi, A. A., Abd-Allah, E. F. and Hashem, A. (2014) Alleviation of salt-induced adverse impact via mycorrhizal fungi in *Ephedra aphylla* Forssk. *Journal of Plant Interaction* 9: 802-810.
- Amanifar, S., Aliasgharzag, N., Najafi, N., Oustan, Sh. and Bolandnazar, S. (2010) Effect of *Arbuscular mycorrhizal* Fungi on lead phytoremediation by sorghum (*Sorghum bicolor* L.). *Journal of Soil and Water* 22: 155-170.
- Andrade, R. A. and Abreu, M. F. (2008) Cadmium accumulation in sunflower plants influenced by *Arbuscular Mycorrhiza*. *International Journal of Phytoremediation* 10: 1-13.
- Ariyakanon, N. and Winaipanich, B. (2006) Phytoremediation of copper contaminated soil by *Brassica juncea* (L.) czerne and *Bidens Alba* (L.) DC. var. radiata. *Journal of Science Research Chulalongkorn University* 31: 49-56.
- Asada, K. (1992) Ascorbate peroxidase—a hydrogen peroxide scavenging enzyme in plants. *Plant Physiology* 85: 235-241.
- Bagheri, V., Shamshiri, M., Shirani, H. and Roosta, H. (2012) Nutrient uptake and distribution in mycorrhizal pistachio seedlings under drought stress. *Journal of Agriculture Science Biochemistry* 14: 1591-1604.
- Barea, J. M. (1991) Vesicular-arbuscular mycorrhizae as modifiers of soil fertility. In: *Advances in Soil Science* (ed. Stewart, B. A.) Pp. 1-40. Springer, New York.
- Bates, L. S., Wladren, P. R. and Tear, D. T. (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil* 39: 205-207.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Dhindsa, R. S. and Motowe, W. (1981) Drought tolerance in two mosses: Correlation with enzymatic defense against lipid peroxidation. *Journal of Experimental Botany* 32: 79-91.
- Dudjak, J., Lachman, J., Miholova, D., Kolihoiva, D. and Pivec, V. (2004) Effect of cadmium on polyphenol content in young barley plants (*Hordeum vulgare* L.). *Plant, Soil and Environment* 50: 471-477.

- Fariduddin, Q., Yusuf, M., Hayat, S. and Ahmad, A. (2009) Effect of 28-homobrassinolide on antioxidant capacity and photosynthesis in *Brassica juncea* plants exposed to different levels of copper. *Journal Environmental and Experimental Botany* 66: 418-424.
- Gheibi, M. B. and Javadi Khosraghi, S. (2006) Applicable basis of pistachio orchards cultivation and maintenance. Applicable agricultural science publication. (In Farsi).
- Giannopolitis, C. N. and Ries, S. K. (1977) Superoxide dismutase I. occurrence in higher plants. *Plant Physiology* 59: 309-314.
- Giovannetti, M. and Mosse, B. (1980) An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular infection in roots. *New Phytologist* 84: 489-500.
- Giri, B., Kapoor, R. and Mukerji, G. K. (2003) Influence of Arbuscular Mycorrhizal fungi and salinity on growth, biomass and mineral nutrition of *Acacia auriculiformis*. *Biology and Fertility of Soils* 38: 170-175.
- Göhre, V. and Paszkowski, U. (2006) Contribution of the arbuscular mycorrhizal symbiosis to heavy metal phytoremediation. *Planta* 223: 1115-1123.
- Gonzalez-Guerrero, M., Benabdellah, K. and Ferrol, N. (2009) Mechanisms underlying heavy metal tolerance in arbuscular mycorrhizas. In: *Mycorrhizas: Functional Processes and Ecological Impact*. (eds. Azcon-Aguilar, C., Barea, J. M., Gianinazzi, S., Gianinazzi-Pearson, V.) Pp.107-122. Springer, Berlin.
- Groppa, M. and Benavides, M. (2008) Polyamines and abiotic stress: recent advances. *Amino Acids* 34: 35-45.
- Hashem, A., Abd-Allah, E. F., Alqarawi, A. A., El-Didamony, G., Alwhibi Mona, S., Egamberdieva, D. and Ahmad, P. (2014) Alleviation of adverse impact of salinity on faba bean (*Vicia faba* L.) by arbuscular mycorrhizal fungi. *Pakistan Journal Botany* 46: 2003-2013.
- Hatamian, M., Rezaie Nejad, A., Kafi, M., Souri, M. K. and Shahbazi, K. (2018) Interactions of lead and nitrate on growth characteristics of ornamental judas tree (*Cercis siliquastrum*). *Open Agriculture* 3: 386-392.
- Hatamian, M., Nejad, A. R., Kafi, M., Souri, M. K. and Shahbazi, K. (2019) Growth characteristics of ornamental judas tree (*Cercis siliquastrum* L.) seedlings under different concentrations of lead and cadmium irrigation water. *ACTA Scientiarum Polonorum-Hortorum Cultus* 18: 87-96.
- Heath, R. L. and Packer, L. (1969) Photoperoxidation in isolated chloroplast I kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archive of Biochemistry and Biophysics* 125: 189-198.
- Hegedus, A., Erdel, S. and Horvath, G. (2001) Comparative studies of 22 Ho detoxifying enzymes in green and greening barley seedling under cadmium stress. *Plant Science* 160: 1085-1093 .
- Hildebrandt, U., Kaldorf, M. and Bothe, H. (1999) The zinc violet and its colonization by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Physiology* 154: 709-717.
- Hildebrandt, U., Regvar, M. and Bothe, H. (2007) Arbuscular mycorrhiza and heavy metal tolerance. *Phytochemistry* 68: 139-146.
- Igwe, J. C. and Abia, A. A. (2006) A bioseparation process for removing heavy metals from waste water using biosorbents. *African Journal of Biotechnology* 5: 1167-1179.
- Jing, Y., Cui, H., Li, T. and Zhao, Z. (2014) Heavy metal accumulation characteristics of Nepalese alder (*Alnus nepalensis*) growing in a lead-zinc spoil heap, Yunnan, south-western China. *iForest-Biogeosciences and Forestry* 7: 204-208.
- Jones, J. and Benton, J. (2001) *Laboratory Guide for Conducting Soil Tests and Plant Analysis*. CRC Press.
- Khan, K., Khan, H., Lu Y., Ihsanullah, I., Nawab, J., Khan, S., Shah, N. S., Shamsad, I. and Maryam, A. (2014) Evaluation of toxicological risk of foodstuffs contaminated with heavy metals in Swat, Pakistan. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 108: 224-232.
- Khattab, H. (2007) Role of glutathione and polyadenylic acid on the oxidative defense systems of two different cultivars of canola seedlings grown under saline conditions. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 1: 323-334.
- Kholdbryn, B. and Islamzadeh, T. (2002) Mineral nutrition of higher plants. In two volumes Shiraz University Press, (In Persian).
- Kochert, G. (1978) Carbohydrate determination by the phenol sulfuric acid method. In: *Hand Book of Physiological Methods*. (ed. Helebust, J. A. and Craigie, J. S.) Pp. 96-97. Cambridge Univ press, Cambridge.
- Lee, Y. J. (2005) Development of nutrient film technique culture system for arbuscular mycoeehizal plants. *Hortscience* 40: 378-380.
- Leyval, C., Joner, E. J. and del Val, C. (2002) Potential of arbuscular mycorrhizal fungi for bioremediation. In: *Mycorrhizal Technology in Agriculture* (eds. Gianinazzi, S., Schuepp, H., Barea, J. M., Haselwandter, K., et al) Pp. 175-186. Birkhauser, Basel.
- Lichtenthaler, H. K. and Wellburn, A. R. (1985) Determination of total carotenoids and chlorophyll a and b of leaf in different solvents. *Biological Society of Transaction* 11: 591-592.
- Ling-Zhi, L., Zong Qiang, G., Yu Long, Z. and Pei Jun, L. (2011) Cadmium accumulation and physiology of marigold (*Tagetes erecta* L.) as affected by arbuscular mycorrhizal fungi. *Pedosphere* 21: 319-327.

- Liu, J., Xiong, Z. T., Li, T. Y. and Huang, H. (2004) Bioaccumulation and ecophysiological responses to copper stress in two populations of *Rumex dentatus* L. from copper contaminated and noncontaminated sites. *Environmental and Experimental of Botany* 52: 43-51.
- Lombardi, L. and Sebastiani, L. (2005) Copper toxicity in *Prunus cerasifera*: growth and antioxidant enzymes responses of in vitro grown plants. *Plant Science* 168: 797-802.
- Madani, A., Lakzian, A., Haghnia, Gh. and Khorasani, R. (2013) Contribution of external hyphae of Arbuscular Mycorrhizal fungi to transfer cadmium, zinc and phosphorus to white clover. *Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources. Water and Soil Science* 17: 37-46.
- Malekzadeh, E., Alikhani, A. H., Savaghebi-Fioozabadi, R. G. and Zarei, M. (2011) Influence of Arbuscular Mycorrhizal fungi and an improving growth bacterium on Cd uptake and maize growth in Cd-polluted soils. *Spanish Journal of Agricultural Research* 9: 1213-1223.
- Malekzadeh, P., Farshian, S. H. and Ordubadi, B. (2012) Interaction of arbuscular mycorrhizal fungus (*Glomus intraradices* and *Glomus etunicatum*) with tomato plants grown under copper toxicity. *African Journal of Biotechnology* 11: 10555-10567.
- Malickn, C. P. and Singh, M. B. (1980) *Plant Enzymology and Histo-Enzymology*. Kalyani Publishers, New Delhi, India.
- Mani, D., Kumar, C. and Patel, N. K. (2016) Integrated micro-biochemical approach for phytoremediation of cadmium and lead contaminated soils using *Gladiolus grandiflorus* L. cut flower. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 124: 435-446.
- Marquez-Garcia, B. and Cordoba, F. (2010) Antioxidative system in wild of *Erica andevalensis*. *Journal of Environmental and Experimental Botany* 68: 58-65.
- Marquez, A. P. G. C., Oliveira, R. S., Samardjieva, A. K., Pisarra, J., Rangel, A. O. S. S. and Castro, P. M. L. (2007) *Solanum nigrum* grown in soil contaminated soil: Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on zinc accumulation and histolocalisation. *Environmental Pollution* 45: 691-699.
- Marquez-Garcia, B., Fernandez-Recamales, M. A. and Cordoba, F. (2012) Effects of cadmium on phenolic composition and antioxidant activities of *Erica andevalensis*. *Journal of Botany* 2012: 6.
- Nakano, Y. and Asada, K. (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology* 22: 867-880.
- Nareshkumar, A., Nagamallaiah, G. V., Pandurangaiah, M., Kiranmai, K., Amaranathareddy, V., Lokesh, U., Venkatesh, B. and Sudhakar, C. (2015) Pb-Stress induced oxidative stress caused alterations in antioxidant efficacy in two groundnut (*Arachis hypogaea* L.) cultivars. *Agricultural Sciences* 6: 1283-1297.
- Ouziad, F., Hidebrandt, U., Schmelzer, E. and Bothe, H. (2005) Differential gene expressions in arbuscular mycorrhizal-colonized tomato grown under heavy metal stress. *Journal Plant Physiology* 162: 634-649.
- Pilon, M., Abdel-Ghany, S. E., Cohu, C. M., Gogolin, K. A. and Ye, H. (2006) Copper cofactor delivery in plant cells. *Current Opinion in Plant Biology* 19: 256-263.
- Plewa, M. J., Smith, S. R. and Wanger, E. D. (1991) Diethyldithiocarbamate suppresses the plant activation of aromatic amines into mutagens by inhibiting tobacco cell peroxidase. *Mutant Research* 247: 57-64.
- Radmehr, A. (2010) The results of a sample survey design horticultural products in 1387. Ministry of Agriculture, Tehran. (in Farsi).
- Rajapakse, S., Ghton, C. R. E. and Miller, J. J. (1992) Methods for studying vesicular –arbuscular mycorrhizal root colonization and related root physical properties. *Methods in Microbiology* 24: 301-316.
- Recorbet, G., Abdallah, C., Renaut, J., Wipf, D. and Dumas-Gaudot, E. (2013) Protein actors sustaining arbuscular mycorrhizal symbiosis: Underground artists break the silence. *New Phytologist* 199: 26-40
- Sai Kachout, S., Ben Mansoura, A. J. C., Leclerc, J. C., Mechergui, R., Rejeb, M. N. and Ouerghi, Z. (2010) Effect of heavy metals on antioxidant activities of *Artiplex Hortensis* and *A. rosea*. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry* 9: 444-457.
- Sannazzaro, A. I., Echeverria, M., Alberto, E. O., Ruiz, O. A. and Menendez, A. B. (2007) Modulation of polyamine balance in *Lotus glaber* by salinity and arbuscular mycorrhizal. *Plant Physiology and Biochemistry* 45: 39-46.
- Saxena, B., Shukla, K. and Giri, B. (2017) "Arbuscular mycorrhizal fungi and tolerance of salt stress in plants," In: *Arbuscular Mycorrhizas and Stress Tolerance of Plants* (ed. Wu, Q. S.) Pp. 67-97. Springer, Singapore.
- Shalini, T. and Charu, L. (2018) Heavy metal stress, signaling, and tolerance due to plant-associated microbes: An overview. *Frontiers in Plant Science* 9: 1-12.
- Sharma, S. S. and Dietz, K. J. (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.
- Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S. and Pessarakli, M. (2012) Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany* 2012: 1-26.
- Smith, S. E. and Read, D. J. (2008) *Mycorrhizal symbiosis*, 3rd Ed. Elsevier, New York.

- Sesse, B. A., Genet, P., Dunand, F. V., Toussaint, M. L., Epron, D. and Badot, P. M. (2004) Effect of copper on growth in cucumber plants and its relationships with carbohydrate accumulation and changes in ion content. *Plant Sciences* 166: 1213-1218.
- Sonald, S. F. and Laima, S. K. (1999) Phenolics and cold tolerance of *Brassica napus*. *Plant Agriculture* 1: 1-5.
- Souri, M. K. (2016) Aminocheilate fertilizers: the new approach to the old problem. A review. *Open Agriculture* 1: 118-123.
- Souri, M. K., Alipanahi, N., Hatamian, M., Ahmadi, M. and Tesfamariam, T. (2018) Elemental profile of heavy metals in garden cress, coriander, lettuce and spinach, commonly cultivated in Kahrizak, South of Tehran-Iran. *Open Agriculture* 3: 32-37.
- Sun, Y., Zhou, Q. X., Liu, W. T. and Wang, L. (2009) Joint effects of arsenic, cadmium on plant growth and metal bioaccumulation: A potential Cd hyperaccumulator and As-Excluder *Bidens pilosa* L." *Journal of Hazardous Materials* 161: 808-14.
- Tziveleka, L., Kaldis, A., Hegedus, A., Kissimon, J., Prombonal, A. Horvath, G. and Arjyroidi Akoyou, J. (1999) The effect of Cd on chlorophyll and light – harvesting complex II biosynthesis in greening plants. *Natural Forschende* 54: 740-745.
- Vierheilig, H. and Piche, Y. (2002) Signalling in arbuscular mycorrhiza: Facts and hypotheses. In: *Flavonoids in Cell Functions* (eds. Buslig, B. and Manthey, J.) Pp. 23-39. Kluwer Academic, New York.
- Velikova, V., Yordanov, I. and Edreva, A. (2000) Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain treated bean plants, protective role of exogenous polyamines. *Plant Sciences* 151: 59-66.
- Wada, K. C., Mizuuchi, K., Koshio, A., Kaneko, K., Mitsui, T. and Takeno, K. (2014) Stress enhances the gene expression and enzyme activity of phenylalanine ammonia-lyase and the endogenous content of salicylic acid to induce flowering in pharbitis. *Journal of Plant Physiology* 171: 895-902.
- Wang, T. X., Yin, Z. H., Zhang, W., Peng, T. and Kang, W. Y. (2013) Chemical constituents from *Psoralea corylifolia* and their antioxidant alpha-glucosidase inhibitory and antimicrobial activities. *China Journal of Chinese Materia Medica* 38: 2328-2333.
- Yruela, I. (2005) Copper in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17: 145-156.
- Zhou, Q. X. and Song, Y. F. (2004) *Principles and Method of Treating Contaminated Soil Remediation*, Science Press, Beijing.

Influence of *Glomus mosseae* mycorrhizal fungus on growth, Phenolic compounds and antioxidant enzymes activity of Pistachio (*Pistacia vera*) under Copper stress

Narges Rohani¹, Fatemeh Daneshmand¹, Atousa Vaziri*¹, Mehrnaz Mahmoudi², Fatemeh Saber Mahani³

¹ Department of Biology, Payam-e-Noor University, Iran

² Department of Biology, Faculty of science, Islamic Azad University, Kerman, Iran

³ Department of Chemistry, Payam-e-Noor University, Iran

(Received: 25/10/2018, Accepted: 31/07/2019)

Abstract

One of the most suitable methods for reducing the effects of copper (Cu) stress is the use of mycorrhizal fungus. This research was conducted to study the effect of *Glomus mosseae* mycorrhizal fungus on growth and some physiological parameters of pistachio (*Pistacia vera*) in response to increasing soil Cu concentration. The experiment was carried out as factorial in a completely randomized design with three levels of Cu (0, 300, 600 mg/L CuNO₃) and two levels of mycorrhizal inoculation (inoculated and non-inoculated). According to the results, the mycorrhizal colonization percentage was significantly higher in the control compared to the Cu treatments. In all plants treated with Cu, the length and dry weight of the roots and shoots of mycorrhizal plants were higher than non-mycorrhizal plants. Cu stress also reduced the content of chlorophyll a and b, carotenoids, total protein, phosphorus concentration, total sugars, proline and phenolic compounds, but mycorrhizal symbiosis led to significant increase of these parameters. Cu stress increased the peroxidation of lipids, malondialdehyde (MDA), hydrogen peroxide (H₂O₂), peroxidase (POD), ascorbate peroxidase (APX) and superoxide dismutase (SOD) in all plants. However, the levels of MDA, H₂O₂ and catalase (CAT) in mycorrhizal plants were significantly lower than non-mycorrhizal plants. According to the results the amount of Cu transferred from roots to stems (Translocated Factor) in pistachio, regardless of mycorrhizal colonization, was less than one (TF_≤1) and the Bioconcentration factor was greater than one (BCF ≥ 1), so pistachio can be a Cu stabilizer and symbiosis with *Glomus mosseae* caused the accumulation of more Cu in the roots.

Keywords: Heavy metal, Symbiosis, Oxidative stress, Translocation factor

Corresponding author, Email: a_vaziri@pnu.ac.ir