

بررسی برهمکنش تیمارهای زیستی و غیر زیستی بر تغییرات آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیر آنزیمی در گیاه گشنیز (*Coriandrum sativum*) تحت تنش سرب

حمیده فاطمی^{۱*} و بهروز اسماعیل پور^۲

ایران، اردبیل، دانشگاه محقق اردبیلی، گروه باغبانی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۹/۰۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۱/۱۲

چکیده

این مقاله به بررسی اثرات کاربرد همزمان سیلیسیم و تیمارهای بیولوژیکی بر فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیر آنزیمی و پراکسیداسیون لیپیدها تحت تنش سرب می‌پردازد. این مطالعه در آزمایش گلدانی برای تعیین اثرات چهار غلظت سرب (۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ پی پی ام) و سه غلظت سیلیسیم (۰، ۱/۵ و ۳ میلی‌مولار) و چهار سطح تیمار بیولوژیک (بدون تلقیح، جدایه ۶ و ۱۹ باکتری و میکوریز) بر گیاه گشنیز انجام شد. صفات مورد اندازه‌گیری در این پژوهش شامل بیومس گیاهی، فعالیت آنزیم کاتالاز، پراکسیداز، سوپراکسیددیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز، مالون دآلدئید، فنل، فلاونوئید و آنتی‌اکسیدان بود. نتایج حاصل از این پژوهش حاکی از کاهش معنی‌دار بیومس گیاهی در اثر غلظت‌های مختلف سرب بود، علاوه بر این محتوی مالون دآلدئید، فعالیت آنزیم پراکسیداز، فنل، فلاونوئید و آنتی‌اکسیدان همسو با افزایش غلظت سرب افزایش یافت اما سرب تنها تا غلظت ۵۰۰ پی پی ام توانست فعالیت آنزیم کاتالاز و سوپراکسیددیسموتاز را افزایش دهد. نکته قابل توجه برهمکنش تیمارهای ریزجانداران با تیمار محلول‌پاشی با نانو ذرات سیلیسیم بود که در اکثر صفات سبب افزایش آن‌ها شد.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، سیلیسیم، گشنیز

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۵۳۵۸۲۶۵۰، پست الکترونیکی: ha.fatemi@yahoo.com

مقدمه

دهند (۵۴). با توجه به سمیت بالقوه و پایدار بودن فلزات سنگین، خاک‌هایی که آلوده به چنین عناصری هستند، به‌طور جدی سلامت محیط زیست را تهدید می‌کنند (۵۶).

در بین فلزات سنگین، سرب بعلاوه حضور در هر سه بخش خاک، آب و هوا دارای اهمیت ویژه‌ای است، علاوه بر این سرب به راحتی توسط سیستم ریشه‌ای گیاه جذب شده و سمیت آن برای گیاه بین ۲ تا ۲۰ برابر سایر فلزات سنگین می‌باشد، از اینرو به عنوان یکی از جدی‌ترین تهدیدات برای گیاهان و سایر موجودات زنده در نظر گرفته می‌شود (۴۵ و ۷). یکی از آسیب‌های مهم بافتی که به دنبال قرارگیری گیاهان در معرض سرب ایجاد می‌شود، افزایش انباشته شدن انواع مختلف رادیکال‌های اکسیژن‌های

در حال حاضر امنیت غذایی به عنوان یکی از جدی‌ترین چالش‌های جوامع محسوب می‌شود، جمعیت جهان اکنون تقریباً ۷ میلیارد نفر است که طی ۵۰ سال آینده به ده میلیارد نفر نزدیک می‌شود (۳۰)، که این مسئله موجب افزایش تقاضا برای تولید مواد غذایی جهانی خواهد شد. انتظارات بیشتر تولیدات کشاورزی در هر واحد مسکونی سبب تخریب زمین‌های موجود، گسترش کشاورزی به مناطق حاشیه‌ای و استفاده از انواع خاک برای تولید محصول بیشتر خواهد شد. اکثر این مناطق و زمین‌ها، آلوده به طیف وسیعی از آلاینده‌ها می‌باشند که فلزات سنگین مانند کادمیوم، سرب، کروم، مس، منگنز و روی سهم عمده‌ای از آلودگی این خاک‌ها را به خود اختصاص می‌-

مطالعات محققین زیادی نشان می‌دهد که ریزوباکتری‌های محرک رشد (PGPR) رشد، عملکرد و بسیاری از فرآیندهای درونی گیاه را تقویت می‌کنند (۱ و ۲۲). این باکتری‌ها با راه‌کارهای مختلفی از جمله تولید انواع ویتامین‌ها، اسیدهای آمینه و هورمون‌های گیاهی، تولید سیدروفور و همچنین تولید آنزیم ACC دامیناز، رشد و عملکرد گیاهان را می‌افزایند (۴۵). نتایج پژوهش‌های مختلف نشان داده افزودن این باکتری‌ها به خاک‌های آلوده به فلزات سنگین می‌تواند اثرات تنش را کاهش داده و به رشد و عملکرد گیاهان در این خاک‌ها کمک کند (۳۱ و ۳۸). در کنار این باکتری‌ها، قارچ‌های میکوریز نیز دارای کارکرد چندمنظوره در بوم‌نظام‌های زراعی هستند؛ به‌طوری که سبب بهبود کیفیت فیزیکی خاک (از طریق گسترش ریشه‌های قارچ)، کیفیت شیمیایی خاک (از طریق افزایش جذب عناصر غذایی) و کیفیت بیولوژیک خاک (از طریق شبکه غذایی خاک) می‌گردند (۱۶). علاوه بر این هاوس و فستر (۳۴) معتقدند ریشه‌هایی که با میکوریز کلونیزه شده‌اند، توانایی تجمع رادیکال‌های اکسیژن را در خود دارند (۳۴)، البته محققین دیگر چند ژن در میکوریز را در تخفیف تنش اکسیداتیو در گیاهان موثر می‌دانند (۶۴). بنابراین نکته قابل توجه، تایید نقش حفاظتی ایجاد شده در حضور میکوریز در برابر تنش اکسیداتیو القا شده توسط فلزات سنگین در گیاهان است (۴۰ و ۶۸).

تکنیک‌های بسیاری در تخفیف اثرات منفی فلزات سنگین توصیه شده است (۶۱)، استفاده از کود سیلیسیم در کشاورزی یکی از گزینه‌های بالقوه پایدار برای کاهش تنش‌های زیستی در گیاهان مختلف است (۲۳). با اینکه سیلیسیم بخش عمده‌ای از خاک را به عنوان سیلیکات یا سیلیکات آلومینیوم تشکیل می‌دهد، اما گیاهان قادر به جذب مستقیم آن نیستند (۸۱). یکی از اثرات مهم اثبات شده سیلیسیم حفاظت گیاه در برابر تنش‌های غیرزیستی مانند فلزات سنگین، تشعشع و... است (۲۳)، سایر محققین نیز افزایش فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، سوپراکسید

فعال مانند سوپراکسید، پراکسید هیدروژن و رادیکال هیدروکسیل و در نهایت ایجاد تنش اکسیداتیو است (۵۱ و ۶۶). تنش اکسیداتیو سبب تاثیرات مخربی مانند جلوگیری از تولید ATP، آسیب به اسیدهای نوکلئیک (۸۱) و غشای سلولی (۷۱) می‌شود. علاوه بر این، رادیکال‌های فعال اکسیژن با حمله به آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان باعث مهار این آنزیم‌ها می‌شوند (۱۷). همچنین این رادیکال‌ها از سوی دیگر با تحریک ACC سنتاز منجر به افزایش غلظت اتیلن می‌شوند، اتیلن به همراه مولکول نشانگر حاصل از پراکسیداسیون چربی غشا باعث القاء ژن‌های درگیر در بیوستنز متابولیت‌های ثانویه می‌گردد (۷۶). به‌طور کلی، سمیت زدایی رادیکال‌های آزاد در برابر تنش‌ها در گیاهان به دو سیستم آنزیمی و غیر آنزیمی دسته‌بندی می‌شوند (۲۶). این سیستم شامل آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند کاتالاز (CAT)، آسکوربات پراکسیداز (APX)، سوپراکسیددیسموتاز (SOD)، گایاکول پراکسیداز (GPX) و فنل پراکسیداز (POX) و سیستم آنتی‌اکسیدانی غیر آنزیمی شامل آسکوربات، آلفاتوکوفرول، کاروتنوئیدها، ترکیبات فنلی، پرولین و گلوکوتایون می‌باشد (۶۸).

باتوجه به اینکه تولید آنتی‌اکسیدان‌ها یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌های درون سلولی برای تخفیف اثرات تنش در گیاهان می‌باشند، به‌نظر می‌رسد تیمارهایی که بتوانند این مکانیسم را تعدیل نمایند، می‌توانند از این طریق، اثرات مثبتی را بر گیاهان رشد کرده در مناطق آلوده بگذارند. باتوجه به اثرات مخرب زیست محیطی فلزات سنگین بنظر می‌رسد کاربرد تیمارهای دوست‌دار محیط زیست، کم هزینه با کارایی بالا بسیار ضروری است. ریزموجودات خاکری می‌توانند به حفظ کارایی گیاه در شرایط تنش‌زا کمک شایانی کنند و از آنجایی که درک تحمل تنش، مکانیسم سازگاری و واکنش موثر هستند، می‌توان آن‌ها را به عنوان مدل‌های عالی برای طراحی و ساخت گیاهان جهت مقابله با تنش‌ها مانند فلزات سنگین (۲۴) مورد استفاده قرار داد.

از مناطق سبزیکاری تهیه و به مدت شش ماه در شرایط خشک و تر با نمک سرب مخلوط شدند و پس از نمونه برداری و حصول اطمینان از آلوده بودن خاک‌ها با غلظت-های مختلف جهت آزمایش مورد استفاده قرار گرفت. باکتری‌های مورد نظر از آزمایشگاه خاکشناسی دانشگاه محقق اردبیلی تهیه شد که از جدایه‌های مقاوم به فلزات سنگین بودند. مشخصات باکتری‌ها و ویژگی‌های محرک رشدی آن‌ها به اختصار در جدول ۱ آورده شده است. در ابتدا باکتری‌ها در محیط نوترینت براث کشت و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد انکوبه که جمعیت آن‌ها $(CFU\ ml^{-1})$ $6/2 \times 10^8$ بود. بذور گیاه گشنیز (*Coriandrum sativum*, L) تهیه شده از مرکز تحقیقات استان همدان که قبلاً با هیپوکلریت سدیم پنج درصد ضدعفونی شده بود در شرایط استریل به محیط کشت حاوی باکتری اضافه شده و به مدت یک ساعت بر روی شیکر قرار داده شدند و به منظور تثبیت بهتر آن‌ها بر روی بذور مدتی در شرایط استریل قرار داده شدند، سپس بذور موردنظر در گلدان‌های ده کیلویی (۲۰*۲۵*۳۰) حاوی خاک‌هایی که قبلاً آلوده شده بودند، کشت شدند. قارچ میکوریز گونه *Glomus mosseae* از آزمایشگاه خاکشناسی دانشگاه رفسنجان تهیه شد و در پنج سانتی‌متری زیر محل کشت بذر با خاک مخلوط گردید. تمامی گلدان‌ها در شرایط محیطی یکسان با دمای میانگین ۲۵ درجه سانتیگراد و رطوبت ۴۰ درصد نگهداری شدند. پس از رشد گیاهان و تشکیل سومین برگ حقیقی محلول‌پاشی با نانو ذرات سیلیسیم در سه مرحله به فاصله هر دو هفته صورت گرفت. خصوصیات نانو ذرات سیلیسیم تهیه شده از شرکت نانو سانی در جدول ۲ ذکر شده است.

دیسموتاز و کاتالاز را در گیاهان پاک چوی، پنبه، موز و برنج تحت تنش فلزات سنگین گزارش کرده‌اند (۸۰). علاوه‌براین سیلیسیم تحت تنش فلزات سنگین می‌تواند آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی را نیز در گیاهان مختلف نیز افزایش دهد (۷۰ و ۷۹).

گیاه گشنیز (*Coriandrum sativum* L.)، گیاهی علفی، دارویی از خانواده Apiaceae است که از مناطق مدیترانه و خاورمیانه سرچشمه می‌گیرد، از تمام قسمت‌های این گیاه برای درمان اختلالات مختلف در سیستم‌های پزشکی در تمدن‌های مختلف در سراسر جهان استفاده شده است (۶۷). ایران بعد از هند و روسیه رتبه سوم تولید گشنیز در جهان است که از لحاظ اقتصادی نیز بسیار حائز اهمیت است.

باتوجه به اینکه فعال‌سازی آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌های دفاعی در گیاهان تحت تنش فلزات سنگین است و کاربرد تکی هر کدام از تیمارهایی مورد بررسی به تایید سایر محققین رسیده است، به‌نظر می‌رسد که کاربرد همزمان سیلیسیم و باکتری‌های محرک رشد و میکوریز می‌تواند سبب افزایش مقاومت و القا این سیستم‌ها در گیاه گشنیز شود، با تاکید به این مسئله این پژوهش طرح ریزی و انجام شد.

مواد و روشها

این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار سطح تنش سرب (۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ پی‌پی‌ام سرب)، چهار سطح از ریزجانداران (جدایه ۶، ۱۹ باکتری و قارچ میکوریز) و سه سطح محلول‌پاشی با نانو ذرات سیلیسیم (۰، ۱/۵ و ۳ میلی‌مولار) بود. خاک مورد نظر

جدول ۱- خواص محرک رشدی جدایه‌های برتر

نام	نام علمی	اکسین ($mg.L^{-1}$)	حل‌کنندگی فسفات نامحلول ($mg.L^{-1}$)	ZnO ($mg.L^{-1}$)	ZnCO ₃ ($mg.L^{-1}$)	سیدروفور ($mg.L^{-1}$)	HCN*
جدایه ۶	<i>B. Ceruse strain 264ZG5</i>	۳/۴۱	۳۹۲	۴/۷	۱۲/۷	۱.۴۸	۱
جدایه ۱۹	<i>B. thuringiensis isolate 2T22</i>	۲/۶۲	۲۸۱	۰	۰	۱.۷۱	۱

*۱: عدم تولید ۲: تولید کم ۳: تولید متوسط

جدول ۲- خصوصیات ساختاری نانو ذرات سیلیسیم

ICP	TGA	اندازه	درصد خلوص	سطح فعال (g/cm^3)
4.9 ± 0.09	5 ± 0.02	۲۵-۳۰	۹۸	۴۱۴۶۱

USA) به مدت یک دقیقه ثبت گردید. فعالیت آنزیمی با استفاده از فرمول قانون بیر لامبرت و ضریب خاموشی $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ بر حسب $\mu\text{Mol/g FW.min}$ محاسبه شد.

فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز: فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز بر اساس روش گیانپولیتی و همکاران (۲۸) اندازه‌گیری شد. بر اساس این روش سه میلی لیتر مخلوط واکنش حاوی بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی مولار (pH=7/8)، متیونین ۱۳ میلی-مولار، نیتروبلوترازولیوم ۷۵ میکرومولار، ریوفلاوین ۲۰ میکرومولار، EDT ۰/۱ میکرومولار و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. نمونه-های آنزیمی به مدت ۱۵ دقیقه در مقابل نور ۵۰۰۰ لوکس قرار داده شد و بلافاصله پس از آن جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۶۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفوتومتر Genway مدل ۶۷۰۵ (Genway Biotech, USA) قرائت شد. فعالیت آنزیمی با استفاده از فرمول قانون بیر لامبرت ضریب خاموشی $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ بر حسب $\mu\text{Mol/g FW.min}$ محاسبه شد.

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز: بدین منظور ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی را به بافر فسفات ۵۰ میلی مولار حاوی اسید آسکوربیک ۰/۵ میلی مولار افزوده و کاهش جذب با دستگاه اسپکتروفوتومتر Genway مدل ۶۷۰۵ (Genway Biotech, USA) در طول موج ۲۹۰ نانومتر دو دقیقه پس از شروع واکنش محاسبه شد. فعالیت آنزیمی با استفاده از فرمول قانون بیر لامبرت ضریب خاموشی $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ بر حسب $\mu\text{Mol/g FW.min}$ محاسبه شد (۵۵).

اندازه‌گیری مالون دی‌آلدئید: سنجش مالون دی‌آلدئید به روش هیت و پاکر (۳۵) انجام شد. بر طبق این روش ۰/۲ گرم از بافت تازه برگ‌های توپین شد و در هاون چینی حاوی پنج میلی‌لیتر تری کلرو استیک اسید (TCA) ۰/۱ درصد،

اندازه‌گیری فاکتورهای آزمایش: پس از طی دوره رشدی بوته‌های گشنیز برداشت و به آزمایشگاه برای اندازه‌گیری بیومس (وزن تر بوته) منتقل شدند، این صفت به کمک ترازوی دیجیتال انجام شد.

اندازه‌گیری فعالیت برخی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان: استخراج عصاره پروتئینی: بدین منظور در ابتدا ۰/۵ گرم بافت تازه گیاهی با ۱ میلی‌لیتر بافر فسفات (pH=7) سانیده و به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۴۰۰۰ و دمای ۴ درجه سانتی-گراد سانترفیوژ شد و روشناوری برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌ها در مراحل بعد در دمای ۷۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد (۱۰).

فعالیت آنزیم پراکسیداز: فعالیت آنزیم با استفاده از روش (۳۶) اندازه‌گیری شد، بدین منظور به حجم مساوی از بافر آب اکسیژنه (۲۲۵ میلی‌مولار) و بافر گایاکول (۴۵ میلی-مولار) مقدار ده میکرولیتر عصاره آنزیمی اضافه شد و منحنی تغییرات جذب در طول موج ۴۷۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفوتومتر Genway مدل ۶۷۰۵ (Genway Biotech, USA) در طول یک دقیقه ثبت شد. فعالیت آنزیمی با استفاده از فرمول قانون بیر لامبرت و با ضریب خاموشی گایاکول پراکسیداز $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ بر حسب $\mu\text{Mol/g FW.min}$ محاسبه شد.

فعالیت آنزیم کاتالاز: اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز نیز به روش چنس و ماهلی (۱۹) انجام شد، به این صورت که پنج میکرولیتر عصاره آنزیمی را به ۴۹۵ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم حاوی EDTA ۰/۱ میلی‌مولار و H_2O_2 ده میلی مولار افزوده و منحنی تغییرات در طول موج ۴۲۵ نانومتر ثبت شد. فعالیت آنزیمی به صورت تغییرات جذب بر زمان در طول موج ۲۴۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفوتومتر Genway مدل ۶۷۰۵ (Genway Biotech, USA)

در رابطه بالا A0 جذب نمونه شاهد و At جذب نمونه مورد آزمایش است.

اندازه‌گیری محتوی آسکوربیک اسید: برای اندازه‌گیری آسکوربیک اسید از برگ گشنیز از روش اومیه و همکاران (۵۸) استفاده شد، بدین منظور یک گرم از نمونه‌های پودر شده در ۱ میلی‌لیتر تری کلرو استیک اسید ۱۰ درصد هضم گردیدند و به مدت ۲۰ دقیقه در ۲۱۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. از محلول روشناور ۱۰ میکرولیتر برداشته شد و یک میلی‌لیتر معرف دی نیترو فنیل هیدرازین - سولفات مس - تیورآ شش میلی‌مولار اضافه و به مدت سه ساعت در بن‌ماری در دمای ۳۱ درجه سانتیگراد قرار گرفتند. سپس ۱۱۰ میکرو لیتر اسید سولفوریک ۴۱ درصد به نمونه‌ها اضافه شد و جذب نمونه‌ها و استاندارد در طول موج ۱۲۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. محتوای ویتامین ث براساس منحنی استاندارد معادل میلی-گرم اسید آسکوربیک در ۱۰۰ گرم تر نمونه محاسبه گردید.

تجزیه آماری: در پایان تجزیه واریانس داده‌های حاصل از این آزمایش با استفاده از روش ANOVA و مقایسه میانگین با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد با نرم-افزار آماری SAS 9.4 انجام شد.

نتایج

تاثیر تلقیح با باکتری‌های محرک رشد و قارچ میکوریز و محلول‌پاشی نانو ذرات سیلیسیم بر آنتی اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی در گیاه گشنیز تحت تنش سرب: نتایج تجزیه واریانس حاصل از تاثیر تیمارهای تنش سرب و تلقیح با باکتری‌های محرک رشد گیاهی و قارچ میکوریز و محلول‌پاشی نانوذرات سیلیسیم نشان داد که تاثیر تنش سرب، محلول‌پاشی نانوذرات سیلیسیم و تلقیح با باکتری-های محرک رشد گیاه و قارچ میکوریز و اثرات متقابل دوگانه و سه‌گانه آن‌ها بر میزان بیومس گیاهی، فنل،

ساییده شد و عصاره حاصل با استفاده از دستگاه سانتریفیوژ به مدت پنج دقیقه در ۵۰۰۰ دور سانتریفیوژ گردید. به یک میلی‌لیتر از محلول رویی، چهار میلی لیتر محلول تری کلرو استیک اسید ۲۰ درصد که حاوی ۰/۵ درصد تیو باربیتوریک اسید بود، افزوده شد. مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس بلافاصله در یخ خرد شده سرد گردید. دوباره مخلوط سرد شده به مدت ده دقیقه در ۵۰۰۰ دور سانتریفیوژ گردید. سپس شدت جذب نور در طول موج ۵۲۳ نانومتر خوانده شد. جذب بقیه رنگیزه‌های غیراختصاصی در ۶۰۰ نانومتر تعیین و از این مقدار کسر گردید. برای محاسبه غلظت مالون دی آلدئید از ضریب خاموشی معادل $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ استفاده گردید و نتایج حاصل از اندازه‌گیری بر حسب میکرومول بر گرم وزن تر محاسبه گردید.

سنجش محتوای ترکیبات فنلی تام، فلاونوئید و ظرفیت آنتی اکسیدانی: برای سنجش محتوی ترکیبات فنلی، فلاونوئید و آنتی‌اکسیدان ابتدا عصاره‌گیری انجام شد. اندام هوایی گیاهان بلافاصله پس از انتقال به آزمایشگاه در سایه خشک شدند و عصاره به روش لین و همکاران (۴۲) آماده شد. عصاره ده درصدی متانولی به روش خیساندن آماده شد و پس از سانتریفیوژ در مراحل بعدی از این عصاره استفاده شد.

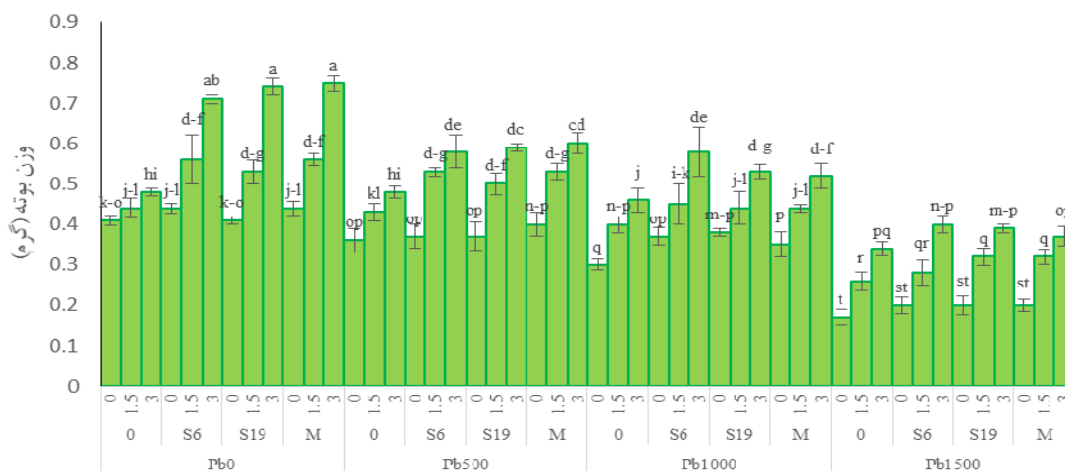
محتوای فنلی با روش ماروینا همکاران (۴۸) و با استفاده از معرف فولین-سیوکالتو بر حسب میلی‌گرم اسید گالیک بر وزن خشک نمونه و محتوای فلاونوئیدی بر اساس روش بکتو و همکاران (۱۱) بر حسب میلی‌گرم کوئرستین بر وزن خشک نمونه و همین‌طور فعالیت پاکسازی رادیکال-های آزاد DPPH بر اساس آکواه و همکاران (۳) اندازه-گیری و از رابطه زیر ظرفیت آنتی اکسیدانی محاسبه شد.

$$\text{درصد ظرفیت آنتی اکسیدانی} = (A_0 - At) / A_0 \times 100$$

از کودهای بیولوژیک و محلول‌پاشی با نانوذرات سیلیسیم توانست اثرات نامطلوب ناشی از آلودگی فلز سنگین سرب را کاهش دهد به‌طوری‌که بیشترین بیومس گیاهان گشنیز (۰/۷۵ گرم) در اثر تلقیح با قارچ میکوریز *G. mosseae* و محلول‌پاشی با غلظت سه میلی مولار نانوذرات سیلیسیم در شرایط بدون سرب حاصل شد که با گیاهان تلقیح شده با باکتری جدایه ۶ و ۱۹ و محلول‌پاشی غلظت مشابه از نانوذرات سیلیسیم در شرایط بدون آلودگی سرب تفاوت معنی‌داری نداشت و کمترین بیومس (۰/۱۷ گرم) نیز در گیاهان تلقیح و محلول‌پاشی نشده در بالاترین غلظت ۱۵۰۰ پی‌پی‌ام سرب حاصل شد.

فلاونوئید، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، مالون دی‌آلدئید، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان کاتالاز، پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز در سطح احتمال یک و پنج درصد معنی‌دار بود و بر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز و میزان آسکوربیک اسید تنها اثرات ساده سرب معنی‌دار بود (جدول ۳).

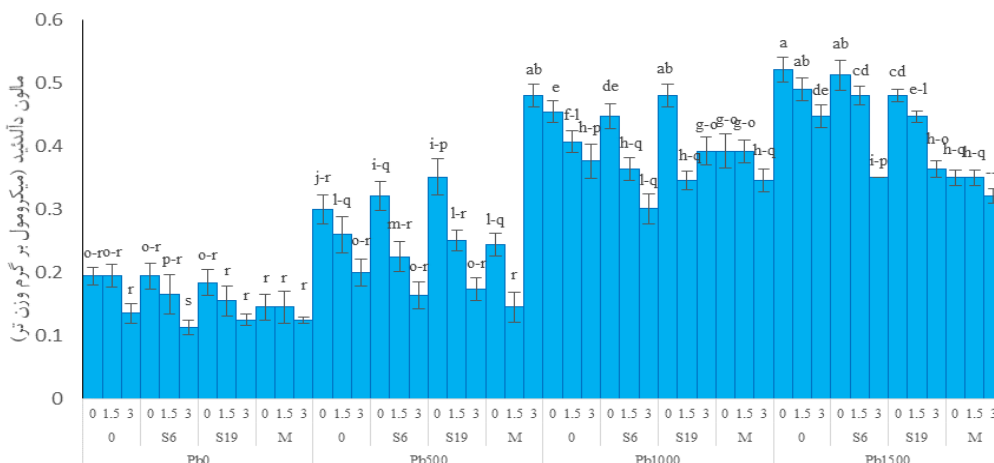
بیومس (وزن بوته): مطابق شکل ۱ که با افزایش غلظت سرب بیومس گشنیز به طور معنی‌داری کاهش یافت و در گیاهان پرورش یافته در خاک حاوی ۱۵۰۰ پی‌پی‌ام سرب در مقایسه با گیاهانی که در خاک بدون سرب رشد کرده بودند، حدود ۳۸ درصد کاهش وزن مشاهده شد. استفاده



شکل ۱- اثر متقابل ریزجاندان و محلول‌پاشی با نانو ذرات سیلیسیم بر صفت وزن تر بوته گیاه گشنیز تحت تنش سرب. در این شکل Pb₀: ۰ میلی گرم بر کیلوگرم سرب، Pb₅₀₀: ۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم سرب، Pb₁₀₀₀: ۱۰۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم سرب، Pb₁₅₀₀: ۱۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم سرب. S6: تلقیح با *Bacillus cereus* strain 264ZG5، S19: تلقیح با *Bacillus thuringiensis* isolate 2 T2، M: تلقیح با میکوریز گونه *Glomus mosseae*. حروف متفاوت در هر صفت بیان‌کننده معنی‌دار بودن میانگین‌ها در سطح احتمال ۵ درصد توسط آزمون LSD می‌باشد.

تیمارهای تلقیح با کودهای بیولوژیک در شرایط بدون محلول‌پاشی سیلیسیم در این سطح از آلودگی سرب را نداشت (شکل ۲) و کمترین میزان تولید مالون دی‌آلدئید (۰/۱۱۳ میکرومول بر گرم وزن تر) در گیاهان پرورش یافته در خاک بدون آلودگی سرب و تلقیح شده با باکتری جدایه ۶ و محلول‌پاشی با ۳ میلی مولار نانو ذرات سیلیسیم حاصل شد.

مالون دی‌آلدئید: محتوی مالون دی‌آلدئید با افزایش غلظت سرب در گیاه گشنیز به طور معنی‌داری افزایش یافت و بیشترین میزان برای این ماده (۰/۵۹۹ میکرومول بر گرم وزن تر) در گیاهان پرورش یافته در خاک حاوی ۱۵۰۰ پی‌پی‌ام سرب یافت شد که هیچ‌گونه تیمار تلقیح با کودهای بیولوژیک و محلول‌پاشی با نانوذرات سیلیسیم را دریافت نکرده بود که تفاوت معنی‌داری با گیاهان تحت



شکل ۲- اثر متقابل ریزجانداران و محلول‌پاشی با نانو ذرات سیلیسیم محتوی مالون دآلیدید در گیاه گشنیز تحت تنش سرب. در این شکل Pb_0 : ۰ میلی گرم بر کیلوگرم سرب، Pb_{500} : ۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم سرب، Pb_{1000} : ۱۰۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم سرب، Pb_{1500} : ۱۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم سرب. S6: تلقیح با *Bacillus cereus* strain 264ZG5، S19: تلقیح با *Bacillus thuringiensis* isolate 2 T2، M: تلقیح با میکوریز گونه *Glomos mosseae*. حروف متفاوت در هر صفت بیان‌کننده معنی‌دار بودن میانگین‌ها در سطح احتمال ۵ درصد توسط آزمون LSD می‌باشد.

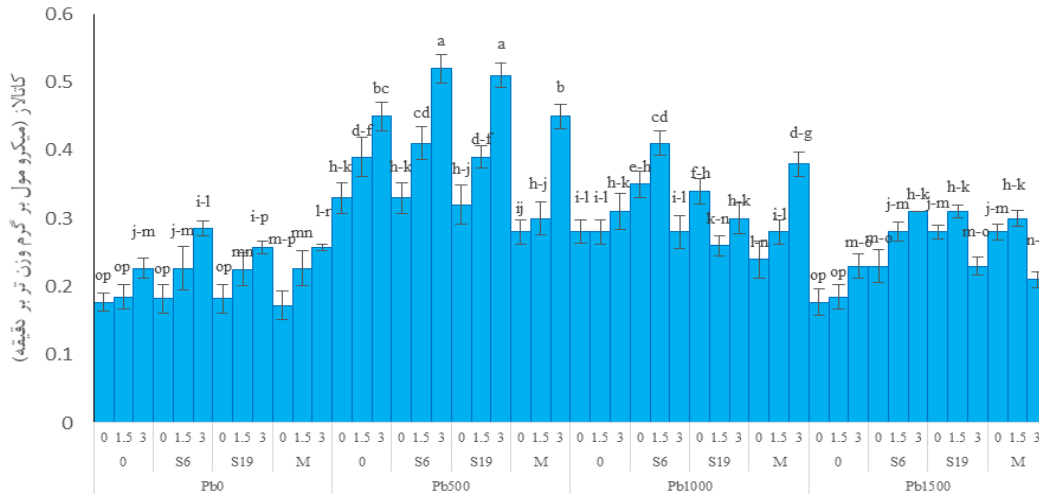
آنزیم پراکسیداز: مطابق شکل ۴ افزایش غلظت فلز سرب در بسترکاشت، میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز گیاه گشنیز به طور معنی‌داری افزایش یافت و در گیاهان پرورش یافته در بسترهای حاوی ۱۵۰۰ پی‌پی‌ام سرب در مقایسه با گیاهان رشد کرده در بستر بدون آلودگی سرب افزایش یافت. بیشترین میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز برگ گیاهان گشنیز (۰/۵۴ میکرومول بر گرم وزن تر بر دقیقه) در تیمار ترکیبی تلقیح با جدایه ۶ باکتری و محلول‌پاشی با غلظت ۳ میلی‌مولار نانوذرات سیلیسیم در شرایط آلودگی با غلظت ۱۵۰۰ پی‌پی‌ام سرب حاصل شد و کمترین میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز (۰/۱۱۲ میکرومول بر گرم وزن تر بر دقیقه) نیز در گیاهان رشد کرده در غلظت ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام سرب تلقیح شده با میکوریز و بدون محلول‌پاشی با نانوذرات سیلیسیم، مشاهده شد.

آنزیم سوپراکسید دیسموتاز: جدول مقایسه میانگین تاثیر تیمارها نشان داد که با افزایش غلظت فلز سرب در بسترکاشت، میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز گیاه گشنیز به طور معنی‌داری افزایش یافت و در گیاهان پرورش

فعالیت آنزیم کاتالاز: با توجه به مقایسه میانگین تاثیر تیمارها مشخص می‌شود که با افزایش غلظت سرب میزان فعالیت آنزیم کاتالاز گیاه گشنیز به طور معنی‌داری افزایش یافت و این افزایش در گیاهان پرورش یافته در خاک حاوی ۱۵۰۰ پی‌پی‌ام سرب در مقایسه با گیاهانی که در خاک بدون سرب رشد کرده بودند چشمگیر بود. به عبارت دیگر بیشترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز (۰/۵۲ میکرومول بر گرم وزن تر بر دقیقه) در گیاهان پرورش یافته در شرایط آلودگی با غلظت ۵۰۰ پی‌پی‌ام سرب حاصل شد که با جدایه ۶ باکتری تلقیح شده و تحت تیمار محلول‌پاشی با غلظت سه میلی‌مولار نانوذرات سیلیسیم قرار گرفته بودند که تفاوت معنی‌داری با گیاهان تلقیح شده با جدایه ۱۹ باکتری و محلول‌پاشی شده با همان غلظت نانوذرات سیلیسیم نداشتند (شکل ۲) و کمترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز (۰/۱۷۲ میکرومول بر گرم وزن تر بر دقیقه) در گیاهان شاهد و گیاهان تیمار شده با ۱۵۰۰ پی‌پی‌ام حاصل شد که اختلاف معنی‌داری با گیاهان تلقیح شده با جدایه های ۶ و ۱۹ و بدون تلقیح در شرایط مشابه اختلاف معنی‌داری نداشت (شکل ۳).

سیلیسیم در شرایط آلودگی با غلظت ۵۰۰ پی‌پی‌ام سرب عنصر سنگین سرب حاصل شد و کمترین میزان فعالیت این آنزیم (۰/۲۱۰ و ۰/۲۰۷ میکرومول بر گرم وزن تر بر دقیقه) نیز در گیاهان رشد کرده در شرایط ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام آلودگی خاک با سرب با تیمار میکوریز و جدایه ۱۹ باکتری بدون محلول‌پاشی با نانو ذرات سیلیسیم حاصل شد.

یافته در بسترهای حاوی ۵۰۰ پی‌پی‌ام سرب در مقایسه با گیاهان رشد کرده در شاهد میزان آنزیم سوپراکسید دیسموتاز ۲۳۰ درصد افزایش یافت (شکل ۵). بیشترین میزان فعالیت این آنزیم در گیاهان گشنیز (۲/۴۰ میکرومول بر گرم وزن تر بر دقیقه) در تیمار ترکیبی بدون تلقیح با ریزجانداران و محلول‌پاشی با ۳ میلی‌مولار نانوذرات

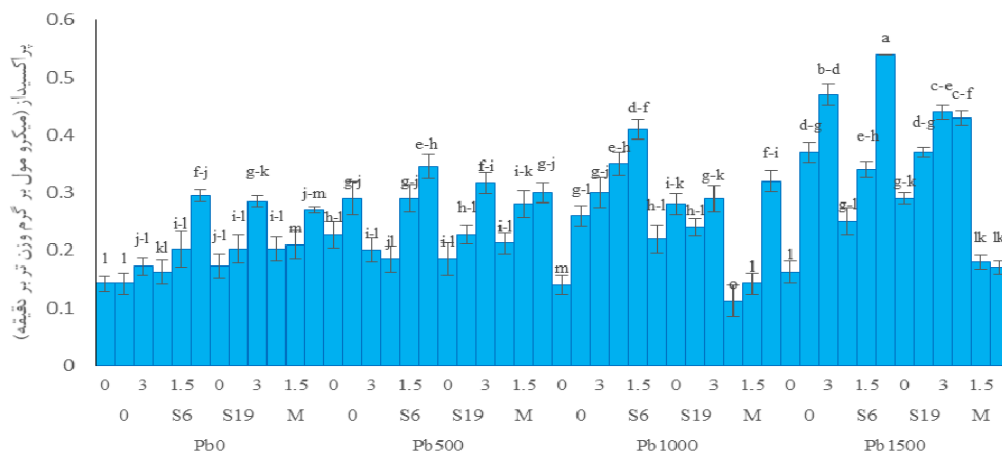


شکل ۳- اثر متقابل ریزجانداران محرک رشد و میکوریز و محلول‌پاشی با نانو ذرات سیلیسیم بر فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاه گشنیز تحت تنش سرب. در این شکل Pb0: پی‌پی‌ام سرب، Pb500: ۵۰۰ پی‌پی‌ام سرب، Pb1000: ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام سرب، Pb1500: ۱۵۰۰ پی‌پی‌ام سرب. S6: تلقیح با *Bacillus cereus* strain 264ZG5: تلقیح با *Bacillus thuringiensis* isolate2 T2: تلقیح با میکوریز گونه *Glomos mosseae*. حروف متفاوت در هر صفت بیان‌کننده معنی‌دار بودن میانگین‌ها در سطح احتمال ۵ درصد توسط آزمون LSD می‌باشد.

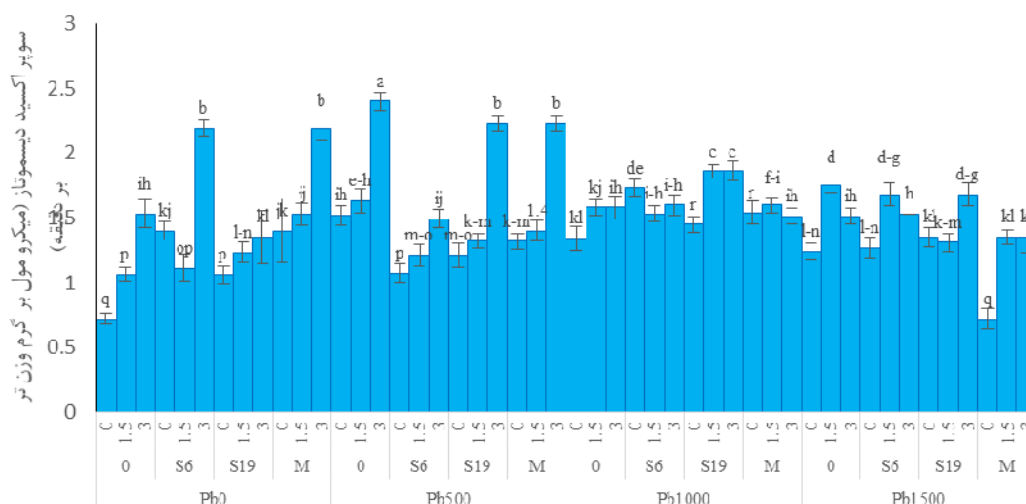
جدول ۳- نتایج تجزیه واریانس تیمارهای آزمایشی بر آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی در گیاه گشنیز تحت تنش سرب

میانگین مربعات								Df	منابع تغییرات	
آنتی‌اکسیدان	فلاونوئید	فنل	ویتامین ث	مالون دآلدئید	آسکوربات‌پراکسیداز	سوپراکسیددیسموتاز	پراکسیداز	کاتالاز	بیومس	
۷۶۶,۷**	۴۰۷۲,۹**	۲۹۹,۶۱**	۱۰۸۴۲۵*	۰,۳۶۹**	۱۳,۳۴*	۱,۰۶۲**	۰,۱۳۲**	۰,۰۶۹**	۰,۳۷**	۳ (Pb) تنش سرب
۸۱,۹۸**	۴۶۵,۹۰**	۲۱۲۸,۸**	۱۲۰۳۴۲ ^{ns}	۰,۱۸۴**	۱۳,۳۳ ^{ns}	۱,۳۸۶**	۰,۰۹۲**	۰,۶۱۴**	۰,۰۳۹**	۳ ریزجانداران محرک رشد (B)
۱۵۸,۸**	۱۴۹۵,۷**	۱۶۱,۷۱*	۱۲۷۹۲۶ ^{ns}	۰,۰۹۵**	۱۳,۶۱ ^{ns}	۱,۰۶۳**	۰,۰۵۷**	۰,۳۰۷**	۰,۴۴۸**	۲ نانو ذرات سیلیسیم (Si)
۲۶۹,۲**	۷۰۸,۵۷**	۱۱۶۹,۷۱**	۱۱۸۳۲۳ ^{ns}	۰,۴۸۹**	۱۲,۸۷ ^{ns}	۱,۶۵۲**	۰,۱۲۱**	۰,۱۷۰**	۰,۱۶۷**	۹ Pb×B
۱۲۸,۱**	۲۰۶,۷۹**	۴۰۹,۱۵**	۱۲۴۸۰۹ ^{ns}	۰,۱۹۷**	۱۳,۵۲ ^{ns}	۱,۱۳۲**	۰,۰۴۴**	۰,۱۲۵**	۰,۰۱۵**	۶ Pb×Si
۱۶۱,۳**	۱۷۰,۹۴**	۳۹۹,۲۸**	۱۲۴۰۱۸ ^{ns}	۰,۱۴۵**	۱۳,۵۳ ^{ns}	۰,۸۸۲*	۰,۰۳۲**	۰,۰۴۵**	۰,۰۱۹**	۶ Si×B
۸۱,۲۷**	۲۹۲,۹۳**	۴۲۱,۷۸**	۱۲۶۴۹۸ ^{ns}	۰,۱۵۵**	۱۳,۲۸ ^{ns}	۰,۳۲۵**	۰,۰۱۶**	۰,۰۵۸**	۰,۰۲۸**	۱۸ Pb×B×Si
۳,۲۰	۳,۴۸	۶,۴۵	۲۵,۳	۲۷,۴۶	۱۳,۵۷	۴,۶۲	۱۰,۵۵	۲۵,۹۷	۱۴,۲۵	ضریب تغییرات

ns: *، ** به ترتیب عدم تفاوت معنی‌داری، معنی‌داری در سطح ۱ و ۵ درصد.



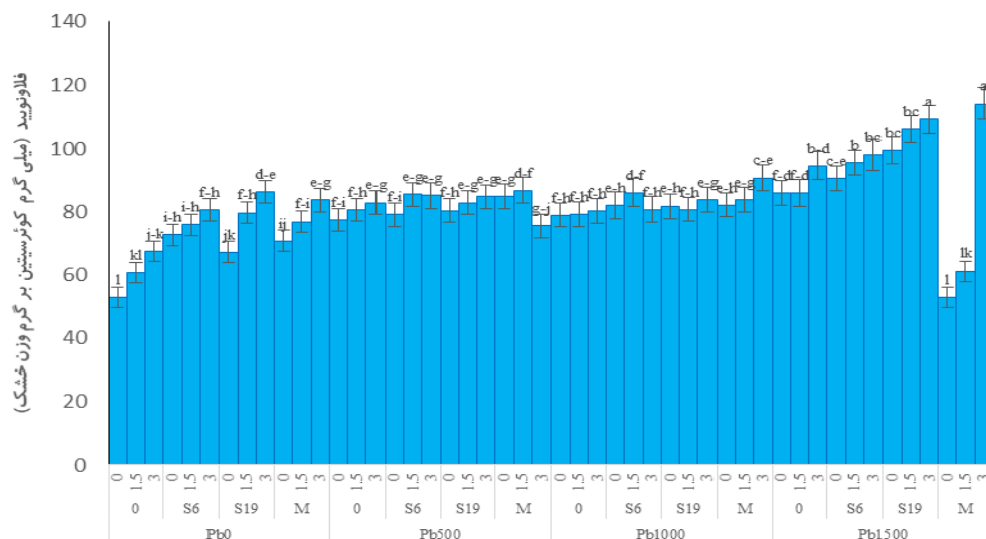
شکل ۴- اثر متقابل ریزجانداران و محلول‌پاشی با نانو ذرات سیلیسیم بر فعالیت آنزیم پراکسیداز در گیاه گشنیز تحت تنش سرب. در این شکل Pb₀. پی‌پی‌ام سرب، Pb₅₀₀: ۵۰۰ پی‌پی‌ام سرب، Pb₁₀₀₀: ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام سرب، Pb₁₅₀₀: ۱۵۰۰ پی‌پی‌ام سرب. S6: تلقیح با *Bacillus cereus* strain 264ZG5. S19: تلقیح با *Bacillus thuringiensis* isolate2 T2. M: تلقیح با میکوریز گونه *Glomos mosseae*. حروف متفاوت در هر صفت بیان‌کننده‌ی معنی‌دار بودن میانگین‌ها در سطح احتمال ۵ درصد توسط آزمون LSD می‌باشد.



شکل ۵- اثر متقابل ریزجانداران و محلول‌پاشی با نانو ذرات سیلیسیم بر فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در گیاه گشنیز تحت تنش سرب. در این شکل Pb₀: ۰ پی‌پی‌ام سرب، Pb₅₀₀: ۵۰۰ پی‌پی‌ام سرب، Pb₁₀₀₀: ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام سرب، Pb₁₅₀₀: ۱۵۰۰ پی‌پی‌ام سرب. S6: تلقیح با *Bacillus cereus* strain 264ZG5. S19: تلقیح با *Bacillus thuringiensis* isolate2 T2. M: تلقیح با میکوریز گونه *Glomos mosseae*. حروف متفاوت در هر صفت بیان‌کننده‌ی معنی‌دار بودن میانگین‌ها در سطح احتمال ۵ درصد توسط آزمون LSD می‌باشد.

مولار نانوذرات سیلیسیم محلول‌پاشی شده بودند، یافت شد در حالی که با گیاهان تیمار شده با جدایه ۱۹ با ۳ میلی-مولار نانو ذرات سیلیسیم در خاک حاوی ۱۵۰۰ پی‌پی‌ام اختلاف معنی‌داری نداشت (شکل ۶) و کمترین میزان فلاونوئید (۵۲/۸۲ میلی‌گرم کوئرستین بر گرم‌وزن‌خشک) در گیاهان شاهد مشاهده شد (شکل ۶).

محتوی فلاونوئید: مقایسه میانگین تاثیر تیمارها نشان می‌دهد که با افزایش غلظت سرب میزان فلاونوئید در گیاه گشنیز به‌طور معنی‌داری افزایش یافت و بیشترین میزان برای این صفت (۱۱۴/۲۳) میلی‌گرم کوئرستین بر گرم-وزن‌خشک) در گیاهان پرورش یافته در خاک حاوی ۱۵۰۰ پی‌پی‌ام سرب که با قارچ میکوریز تلقیح شده و با ۳ میلی-

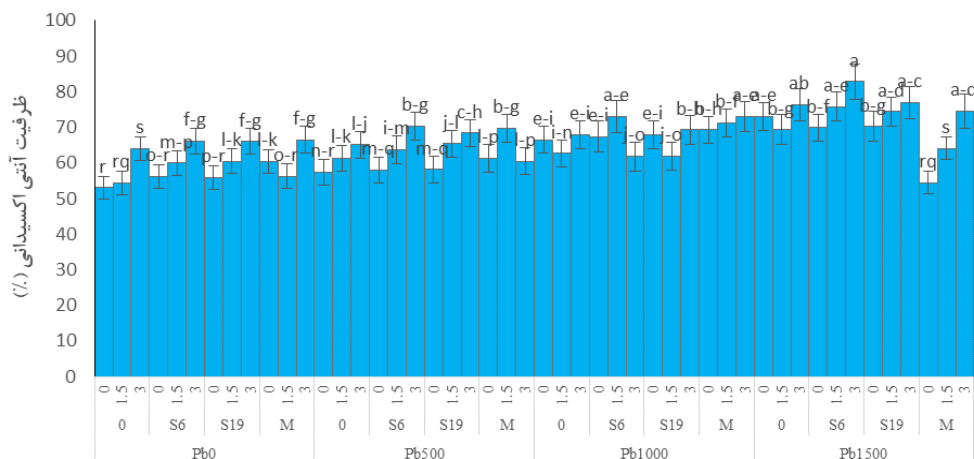


شکل ۶- اثر متقابل ریزجاندران و محلول‌پاشی با نانو ذرات سیلیسیم بر محتوی فلاونوئید در گیاه گشنیز تحت تنش سرب. در این شکل Pb_0 : پی- پی ام سرب، Pb_{500} : پی‌پی‌ام ۵۰۰، Pb_{1000} : پی‌پی‌ام ۱۰۰۰، Pb_{1500} : پی‌پی‌ام ۱۵۰۰، S6: تلقیح با *Bacillus cereus* strain، M: تلقیح با *Bacillus thuringiensis* isolate2 T2، S19، 264ZG5: تلقیح با میکوریز گونه *Glomos mosseae*. حروف متفاوت در هر صفت بیان‌کننده‌ی معنی‌دار بودن میانگین‌ها در سطح احتمال ۵ درصد توسط آزمون LSD می‌باشد.

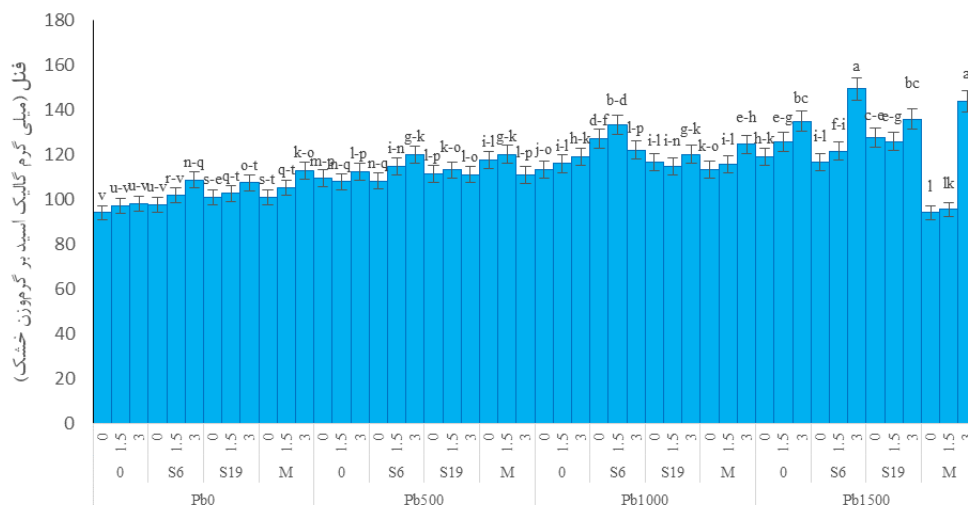
آنتی‌اکسیدانی تام گیاه گشنیز به طور معنی‌داری افزایش یافت و در گیاهان پرورش یافته در بسترهای حاوی ۱۵۰۰ پی‌پی‌ام سرب در مقایسه با گیاهان رشد کرده در بستر بدون آلودگی سرب ظرفیت آنتی‌اکسیدانی ۱۴ درصد افزایش یافت (شکل ۸). بیشترین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان گشنیز (۸۲/۸۶ درصد) در تیمار ترکیبی تلقیح با جدایه ۶ باکتری و محلول‌پاشی با غلظت ۳ میلی‌مولار نانوذرات سیلیسیم در شرایط آلودگی با غلظت ۱۵۰۰ پی‌پی‌ام سرب عنصر سنگین سرب حاصل شد و کمترین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی (۴۶/۰۴ درصد) نیز در گیاهان رشد کرده در شرایط بدون آلودگی خاک با سرب حاصل شد که با هیچ یک از کودهای بیولوژیک تلقیح نشده و محلول-پاشی با نانوذرات سیلیسیم نیز در مورد آنها انجام نشده بود (شکل ۸).

فنل: شکل ۷ نشان داد که با افزایش غلظت عنصر سنگین سرب در بسترکاشت، میزان فنل گیاه گشنیز به طور معنی-داری افزایش یافت و در گیاهان پرورش یافته در بسترهای حاوی ۱۵۰۰ پی‌پی‌ام سرب در مقایسه با گیاهان رشد کرده در بستر بدون آلودگی سرب میزان فنل ۲۶ درصد افزایش یافت (شکل ۷). بیشترین میزان فنل برگ گیاهان گشنیز (۱۴۹/۴۳ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم وزن خشک) در تیمار ترکیبی تلقیح با جدایه ۶ باکتری و محلول‌پاشی با ۳ میلی‌مولار نانوذرات سیلیسیم در شرایط آلودگی با غلظت ۱۵۰۰ پی‌پی‌ام سرب عنصر سنگین سرب حاصل شد و کمترین میزان فنل (۹۴/۲ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم - وزن خشک) نیز در گیاهان رشد کرده در شرایط بدون آلودگی خاک با سرب حاصل شد که با هیچ یک از کودهای بیولوژیک تلقیح نشده و محلول‌پاشی نانوذرات سیلیسیم نیز در مورد آنها انجام نشده بود.

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام: شکل ۸ نشان داد که با افزایش غلظت عنصر سنگین سرب در بسترکاشت، ظرفیت



شکل ۷- اثر متقابل ریزجاندران و محلول‌پاشی با نانو ذرات سیلیسیم بر محتوی فنل در گیاه گشنیز تحت تنش سرب. در این شکل Pb_0 : پی‌پی‌ام سرب، Pb_{500} : ۵۰۰ پی‌پی‌ام سرب، Pb_{1000} : ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام سرب، Pb_{1500} : ۱۵۰۰ پی‌پی‌ام سرب. S6: تلقیح با *Bacillus cereus* strain 264ZG5، S19: تلقیح با *Bacillus thuringiensis* isolate2 T2، M: تلقیح با میکوریز گونه *Glumus mosseae*. حروف متفاوت در هر صفت بیان‌کننده‌ی معنی‌دار بودن میانگین‌ها در سطح احتمال ۵ درصد توسط آزمون LSD می‌باشد.



شکل ۸- اثر متقابل ریزجاندران و محلول‌پاشی با نانو ذرات سیلیسیم بر محتوی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام در گیاه گشنیز تحت تنش سرب. در این شکل Pb_0 : پی‌پی‌ام سرب، Pb_{500} : ۵۰۰ پی‌پی‌ام سرب، Pb_{1000} : ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام سرب، Pb_{1500} : ۱۵۰۰ پی‌پی‌ام سرب. S6: تلقیح با *Bacillus cereus* strain 264ZG5، S19: تلقیح با *Bacillus thuringiensis* isolate2 T2، M: تلقیح با میکوریز گونه *Glumus mosseae*. حروف متفاوت در هر صفت بیان‌کننده‌ی معنی‌دار بودن میانگین‌ها در سطح احتمال ۵ درصد توسط آزمون LSD می‌باشد.

بحث و نتیجه‌گیری

خاصیت بسیار سمی برای گیاهان است که با تخریب سلول‌ها، ایجاد اختلال در سیستم فیزیولوژیکی گیاهان و نیز کاهش جذب آب و برخی عناصر غذایی، رشد و عملکرد گیاهان را تحت تاثیر قرار می‌دهد (۶۸). سرب به دلیل انباشت زیاد در بخش‌های سطحی خاک به راحتی در

مطابق نتایج حاصل از این پژوهش بیومس گیاهی بشدت تحت تاثیر غلظت‌های مختلف سرب قرار گرفت و با افزایش میزان سرب بیومس گیاهی کاهش یافت. سرب بعنوان یکی از آلاینده‌های مهم اکوسیستم خشکی با

یکی از اولین آنزیم‌های درگیر در این فرآیند است که در این پژوهش مقادیر آن بخصوص در غلظت‌های بالاتر سرب افزایش قابل ملاحظه‌ای داشته است، در واقع این آنزیم مقادیر O_2^{2-} را تعدیل می‌نماید زیرا بعنوان یکی از اولین مشتقات تولید شده در شرایط تنش می‌باشد و قابلیت تولید به مشتقات با خطرات بالاتر مثل پراکسی نیتريت را دارد، همچنین افزایش فعالیت آنزیم به دلیل افزایش سوپراکسید می‌باشد که سبب افزایش سنتز *de novo* از پروتئین‌های آنزیمی می‌شود احتمالاً یون‌های سوپراکسید از طریق نقش سیگنالی سبب افزایش بیان ژن‌های سوپراکسیددیسموتاز می‌شوند (۷۵). آنزیم دیگری که همسو با سوپراکسید دیسموتاز سبب پاکسازی پراکسید هیدروژن در گیاه می‌شود آنزیم کاتالاز است، زیرا فعالیت آنزیم سوپراکسید منجر به تولید پراکسید هیدروژن می‌شود، در گیاه گشس نیز میزان فعالیت این آنزیم افزایش می‌یابد، این آنزیم در شرایط تنش اکسیداتیو فعال می‌شود و قادر به هضم و حذف رادیکال‌های اکسید هیدروژن می‌باشد (۲۹)، در تحقیق صورت گرفته بر روی گیاه لیف (۳۷) و برنج سرب سبب افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز شد. افزایش فعالیت کاتالاز در تیمار با فلزات سنگین به دلیل افزایش تولید سوبسترای آن مانند پراکسید هیدروژن در سلول‌های گیاهی و به منظور مقابله با شرایط تنش می‌باشد (۲۹). البته در تحقیق صورت گرفته در گیاه برنج با افزایش غلظت سرب فعالیت آنزیم کاتالاز همانند این پژوهش کاهش یافت که این نشان می‌دهد که فعالیت سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانتی وابسته به غلظت سرب است (۳۳). در واقع در غلظت‌های بالاتر تولید پراکسید هیدروژن و رادیکال‌های آزاد دیگر در سلول به شدت زیاد است لذا ممکن است در اثر مکانیسم‌هایی مانند بازدارندگی در متابولیسم، غیرفعال شدن آنزیم، تغییر در اجتماع زیر واحدهای آنزیم و از طرفی ممکن است فعال شدن پروتئازهای پراکسی‌زومی فعالیت آنزیم کاتالاز کاهش می‌یابد (۷۵). همچنین کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز در

دسترس گیاهان قرار می‌گیرد (۵۳). یکی از اولین مکانیسم‌های سرب تاثیر بر ریشه گیاه مانند تغییرات نامطلوب در ظاهر ریشه‌های تیمار شده با سرب از جمله قهوه‌ای شدن ریشه، لیگنینی شدن، ممانعت از رشد، کاهش قابلیت ارتجاع دیواره سلولی و کاهش بیوماس است، که بدین طریق سیستم جذب گیاه را مختل کرده و بر رشد گیاه موثر است (۵ و ۱۷).

میزان پراکسیداسیون لیپیدها در گیاه گشس نیز تحت تنش سرب بویژه در غلظت‌های بالاتر افزایش قابل ملاحظه‌ای نشان داد، این افزایش نشان از پراکسیداسیون لیپیدها در گیاه گشس نیز تحت تنش سرب دارد، در واقع زمانی رادیکال‌های آزاد اکسیژن از حالت نرمال خارج می‌شوند سبب افزایش تولید مالون دآلدئید در گیاه خواهد شد (۵۷) که یکی از بیومارکرها برای نشان دادن حالت تنش است. در تحقیق انجام شده در گیاه شاهی (۹) و باقلای (۷۸) پرورش یافته تحت غلظت‌های مختلف فلز سرب مشخص شد که وجود عناصر سنگین در محیط کشت گیاه موجب کاهش رشد و آشفستگی در متابولیسم گیاه به دلیل افزایش فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز شده که با تخریب لیپیدهای غشای سلول بر محتوای مالون دی‌آلدئید و پراکسید هیدروژن گیاهان تحت تنش شد.

مطابق نتایج حاصل از این پژوهش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان کاتالاز، پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز در گیاه گشس نیز بطور معنی داری تحت تاثیر تنش سرب در تمامی سطوح قرار گرفت، اما نتوانست آنزیم آسکوربات پراکسیداز را تحت تاثیر قرار دهد، تنش اکسیداتیو ممکن است در گیاهان زمانی که در معرض تنش‌های زیستی و غیرزیستی مانند تنش فلزات سنگین قرار گیرند رخ دهد (۲). در واقع سیستم آنتی‌اکسیدانتی آنزیمی یکی از مکانیسم‌های اصلی سمیت زدایی فلزات سنگین در گیاهان می‌باشند که میزان فعالیت این آنزیم‌ها بسته به مدت و نوع تنش، گونه گیاهی و بخش‌های گیاهی متفاوت است، سوپراکسید دیسموتاز

بالا بودن فعالیت آنتی‌اکسیدانی بعضی از عصاره‌ها می‌باشد. شواهد موجود ارتباط مثبتی بین میزان ترکیبات فنلی و قدرت آنتی‌اکسیدانی بسیاری از گیاهان را نشان می‌دهد، در طول تنش فلزات سنگین ترکیبات فنلی مانند شلاتور (Chelator) عمل کرده و از سوی دیگر می‌توانند به‌طور مستقیم گونه‌های اکسیژن فعال را پاک‌سازی کنند (۵۰). یکی از بزرگترین گروه‌های ترکیبات فنلی فلاونوئیدها هستند که به‌طور وسیعی در تمام سلسله گیاهی حضور دارند. فلاونوئیدها هم به عنوان عوامل آنتی‌اکسیدان و هم به عنوان ترکیبات کلاته‌کننده فلزات، نقش مهمی در ایجاد تحمل نسبت به تنش فلزات سنگین در گیاهان به عهده دارند (۴۹).

در این پژوهش تلقیح با باکتری‌های محرک رشد و میکوریز تاثیر مثبتی بر بیومس گیاه گشنیز گذاشت بطوریکه بالاترین بیومس در گیاهان تلقیح شده با جدایه ۶ باکتری و یا میکوریز همراه با محلول‌پاشی با ۳ میلی‌مولار سیلیسیم حاصل شد. پونامیا و همکاران (۶۴) گزارش کردند مایه‌زنی قارچ *G. mosseae* سبب افزایش رشد و عملکرد گیاهان علفی در خاک‌های آلوده به سرب می‌شود. برای مثال بافیل (۹) گزارش کردند که استفاده از قارچ *Glomus sp.* در خاک‌های آلوده به سرب سبب افزایش رشد و عملکرد ریشه‌های گیاه اکالیپتوس می‌شود. باکتری‌ها محرک رشد نیز از طرق مختلفی مانند تولید انواع ویتامین‌ها، اسیدهای آمینه و هورمون‌های گیاهی، تولید سیدروفور و همچنین تولید آنزیم ACC‌دآمیناز، رشد و عملکرد گیاهان را می‌افزایند (۴۵). نتایج پژوهش‌های مختلف نشان داده افزودن این باکتری‌ها به خاک‌های آلوده به فلزات سنگین می‌تواند اثرات تنش را کاهش داده و به رشد و عملکرد گیاهان در این خاک‌ها کمک کند (۳۱ و ۳۸).

از مهم‌ترین روش‌های کاهش اثرات منفی تنش، راه‌کارهای بیولوژیکی است (۸)، در میان کودهای زیستی متنوع باکتری‌های محرک رشد گیاهی، مواد معدنی حل‌کننده

غلظت‌های بالا احتمالاً به دلیل غیرفعال شدن آنزیم توسط رادیکال‌های اکسیژن، کاهش سنتز آنزیم و دلیل دیگری برای کاهش فعالیت آنزیمی باشد (۵۱). همچنین کاتالاز آنزیمی است که حاوی آهن است و سرب سبب کاهش سنتز هم می‌شود و از این‌رو فعالیت کاتالاز در غلظت بالا کاهش می‌یابد (۲۷).

همچنین فعالیت آنزیم پراکسیداز نیز تحت غلظت‌های مختلف سرب در گیاه گشنیز شدت افزایش یافت، این آنزیم اثر مخرب یون‌های سوپراکسید را دفع می‌کند (۶۰). در واقع پراکسیدازها با تبدیل پراکسید هیدروژن به آب از گیاه محافظت می‌کنند و همچنین در مورفوژن و اکسیداسیون اکسین نیز نقش دارند. افزایش فعالیت این آنزیم نیز در تیمار گیاه برنج با ۲۰۰ میکرومولار سرب تایید شده است (۶۱). در واقع با افزایش سرب موجب افزایش آزاد شدن آنزیم‌های پراکسیداز واقع در دیواره سلول می‌شوند (۴۷ و ۲۱). این افزایش احتمالاً یک واکنش حفاظتی برای به تاخیر انداختن پیری است زیرا آنزیم پراکسیداز واکنش‌های که سبب حفاظت گیاهان در مقابل آسیب رادیکال‌های آزاد می‌شود را کاتالیز می‌کند (۱۳).

تنش سرب در گیاه گشنیز آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی را نیز تحت تاثیر قرار داد و در اکثر موارد بجز ویتامین ث سبب افزایش چشمگیر این آنتی‌اکسیدان‌ها شد، تنش فلزات سنگین سبب بیوسنتز ترکیبات فنلی می‌شود، این ترکیبات بطور طبیعی نیز در گیاه وجود دارند و نقش‌های ساختاری و ایجاد رنگ و ... دارند اما برخی از این ترکیبات نقش آنتی‌اکسیدانی داشته و در شرایط تنش در سلول‌های گیاهی سنتز می‌شوند، فلاونوئیدها، آنتوسیانین‌ها، تانن‌ها، هیدروکسیسینامیک استرها و لیگنین‌ها جزء متابولیت‌های ثانویه حاصل از مسیر فنیل پروپانویید می‌باشند که در بافت‌های گیاهی به وفور یافت می‌شوند، در واقع این مسیر، مسیر اصلی بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه در سلول می‌باشد (۷۸). بالا بودن ترکیبات فنلی دلیل عمده

که تلقیح باکتری‌ها در شرایط استرس زا باعث کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز می‌شود. در تحقیق دیگر بر تلقیح با باکتری‌های گونه باسیلوس با کاهش پراکسیداسیون لیپیدها و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و آمیلاز و پروتئیناز، این اثر تنش را کاهش داده و باعث رشد گیاه در خاک آلوده به فلزات سنگین می‌شوند (۶۰).

گزارش شده است که سیلیسیم به طور مثبتی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان را تحت تاثیر قرار داد (۴)، افزایش در میزان فعالیت آنزیم‌های برگ‌های همزمان با تحریک ایزوفرم‌های مربوطه تحت شرایط تنش گزارش شده است (۷۴). اثرات مثبت سیلیسیم بر روی تغییرات القاء شده به وسیله تنش در خسارت اکسیداتیو به رنگدانه‌های فتوسنتزی، پروتئین‌ها، لیپیدها و فعالیت برخی آنزیم‌ها را در گیاه گندم رشد یافته در گلدان بررسی شده است. نتایج بررسی آن‌ها نشان داد که کاربرد سیلیسیم در مقایسه با تیمار شاهد، فعالیت برخی آنزیم‌های پاد اکسایشی، اسیدهای چرب اشباع نشده لیپیدها، میزان رنگدانه‌های فتوسنتزی و پروتئین‌های محلول را تحت تنش افزایش می‌دهد (۴۳). عبارت دیگر سیلیسیم باعث افزایش جذب کربن خالص، سرعت هدایت روزنه‌ای، مقدار تعرق و فعالیت آنزیم‌های پاد اکسایشی در گیاه می‌شود (۶۲). میتال و همکاران (۵۲) در آزمایشی نشان دادند که بهبود عملکرد فعالیت کلزا تحت تنش، مربوط به افزایش در فعالیت آنزیم کاتالاز و پراکسیداز در اثر محلول‌پاشی با سیلیسیم بوده است. اثر تحریکی سیلیسیم بر روی آنتی‌اکسیدان‌ها در گیاه گندم (۱۲)، پنبه (۲۵) تحت تنش کادمیوم و در موز (۱۴) و تحت تنش سرب گزارش شده است. در واقع سیلیسیم با تحریک سیستم آنتی‌اکسیداتی در گیاه و تشکیل کمپلکس با فلزات سنگین و انتقال فلزات سنگین به اندام‌هایی نظیر واکوئل سلول‌های گیاهی باعث کاهش اثرات تنش و سمیت فلزات سنگین در گیاهان می‌شود (۴۱). علاوه بر این گزارش شده است که سیلیسیم محتوی مالون دی‌آلدئید، پراکسید هیدروژن و نشت الکترولیتی در شاخه‌ها و ریشه‌های

خاک، هورمون‌های گیاهی، آنزیم‌ها و متابولیت‌های ثانویه مختلف را در گیاهان تولید می‌کنند که باعث تسریع در رشد و توسعه گیاه و محافظت از گیاهان در برابر تنش فلزات سنگین مختلف می‌گردد. در واقع باکتری‌ها به‌عنوان یک کاتابولیسم عمل می‌کنند، علاوه بر این فعالیت آنزیم‌هایی مانند سوپراکسیداز و کاتالاز را افزایش می‌دهند (۱۵). با توجه به نقش مهم آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز در حذف رادیکال سمی پراکسید هیدروژن در شرایط تنش‌های مختلف، بنابراین افزایش فعالیت این آنزیم در اثر تلقیح باکتری، می‌تواند عاملی مؤثر در حذف گونه‌های فعال اکسیژن و در نتیجه افزایش مقاومت گیاهان به تنش باشد. تیمارهای زیستی در گیاه گشنیز سبب تغییر در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیداتی شد به‌طوری‌که بیشترین تاثیر را میکوریز و جدایه ۶ باکتری نشان دادند که در اکثر تیمارها اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. بطورمثال در گیاهان تلقیح شده با باکتری فعالیت آنزیم‌ها به خصوص آنزیم کاتالاز در پاسخ به تنش‌های اکسیداتیو بیشتر از گیاهان شاهد بود (۴۴). این نتایج در مورد گیاهان گوجه فرنگی (۶۵)، تربچه (۲۰)، اسفناج (۵۹)، برنج (۶۰) و کلم پیچ (۶۳) همخوانی دارد. رفیعی دمنه و همکاران (۶۶) در بررسی القا مکانیسم دفاعی آنتی‌اکسیدان در گیاهچه‌های فستوکا تلقیح شده با قارچ میکوریز تحت تنش نیکل اظهار کردند حضور قارچ، سبب افزایش فعالیت آنزیم گلوکاتایون ردوکتاز در شرایط سمیت نیکل می‌شود. حضور قارچ *Glomus intraradices* در گیاهچه‌های فستوکا باعث تقویت سیستم آنتی‌اکسیدان شده و همچنین اثرهای منفی سمیت نیکل را در این گیاهچه‌ها کاهش داد. وانگ و همکاران (۷۹) معتقد بودند که تلقیح باکتریایی سبب سنتز آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان را تحریک می‌کند. این احتمال وجود دارد که تولید متابولیت‌ها از طریق باکتری‌های محرک رشد، از جمله هورمون‌ها، نقش مهمی در تحریک و بیان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی داشته باشد (۷۲). گونزالز-مندوزا و همکاران (۳۲) گزارش داد

ترین مکانیسم‌های مقاومت یعنی آنتی‌اکسیدان‌ها بود. نکته بعدی کاربرد همزمان ریزجانداران و سیلیسیم بود که در موارد بسیار محدود در گیاهان دیگر در تنش‌های دیگر فلزات سنگین بررسی شده بود اما مکانیسم اصلی کاربرد این دو بایکدیگر هنوز ناشناخته است. نویسندگان این مقاله معتقدند که کاربرد همزمان این دو در ابتدا آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی تاثیر بیشتری گذاشته و سبب افزایش تمامی آنتی‌اکسیدان‌های اندازه‌گیری شده اما در آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی تنها آنزیم پراکسیداز توانست تا غلظت‌های بالای سرب واکنش خوبی نشان دهد هرچند آنزیم کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز در غلظت‌های پایین سرب بسیار خوب عمل کردند. در این پژوهش جدایه ۶ باکتری و محلول‌پاشی با ۳ میلی‌مولار سیلیسیم نتایج درخشانتری داشت که احتمالاً بعلاوه خواص محرک رشدی بالاتر این جدایه بود هرچند در بسیاری از صفات با میکوریز اختلاف معنی‌داری نشان نداد. البته تایید این قضایای ذکر شده نیاز به مطالعات بیشتر در گیاهان دیگر و خصوصاً در بحث مولکولی می‌باشد.

گیاهان پنبه تحت تنش کادمیوم، روی و سرب را کاهش می‌دهد (۶). به‌طور مشابه، کاربرد سیلیسیم محتوای پراکسید هیدروژن و مالون دآلدئید در اسفناج، برنج، گندم و ریشه در تنش روی، کادمیم، آهن، بور، آرسنیک و منگنز را کاهش می‌دهد (۷۳ و ۱۸). همچنین کاربرد سیلیسیم باعث افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی (گلوکاتایون، پروتئین غیر تیئولی و اسید آسکوربیک در خیار، برنج و پاک‌چوی تحت تنش منگنز و کادمیوم شد (۷۷). علاوه بر این سیلیسیم ممکن است نقش اضافی در افزایش مقاومت به وسیله میانجی‌گری متابولیسم ترکیبات فنولیکی داشته باشد. گزارش شده که تیمار با سیلیسیم در گیاه ذرت مقدار ترکیبات فنولیکی را به میزان پنج برابر افزایش داده است، سیلیسیم با سازوکارهایی مانند تغییرات آناتومی در بافت‌های گیاهی که ناشی از تجمع فیتولیت‌ها هستند، اثر تنش‌های غیرزیستی را کاهش و استحکام گیاه را افزایش می‌دهد و حرکت آب و مواد غذایی را تسهیل می‌کند (۳۹).

در این پژوهش تنش سرب سبب کاهش معنی‌دار بیومس گیاهی در گیاه گشنیز شد، از آنجاییکه مکانیسم‌های زیادی در این قضیه درگیر هستند، هدف ما بررسی یکی از مهم-

منابع

- 1- Adesemoye AO, Torbert HA, Kloepper, JW. 2008. Enhanced plant nutrient use efficiency with PGPR and AMF in an integrated nutrient management system. *Canadian Journal of Microbiology*. 54(10): 876-886.
- 2- Adrees M, Ali S, Rizwan M, Zia-ur-Rehman M, Ibrahim M, Abbas F, Farid M, Qayyum MF, Irshad M.K. 2015. Mechanisms of silicon-mediated alleviation of heavy metal toxicity in plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 119: 186-197.
- 3- Akowuah G, Ismail Z, Norhayati I, Sadikun A. 2005. The effects of different extraction solvents of varying polarities on polyphenols of *Orthosiphon stamineus* and evaluation of the free radical-scavenging activity. *Food chemistry*. 93:311-317.
- 4- Al-aghaby K, Zhu Z, Shi Q. 2005. Influence of silicon supply on chlorophyll content, chlorophyll fluorescence, and antioxidative enzyme activities in tomato plants under salt stress. *Journal of plant nutrition*. 27: 2101-2115.
- 5- Almeida A, Valle RR, Mielke MS, Gomes FP. 2007. Tolerance and prospection of phytoremediator woody species of Cd, Pb, Cu and Cr. *Brazilian Journal of Plant Physiology*. 19: 83-98.
- 6- Anwaar SA, Ali S, Ali S, Ishaque W, Farid M, Farooq MA, Najeeb U, Abbas F, Sharif M. 2015.
- 7- Arshad M, Shaharoon B, Mahmood T. 2008. Inoculation with *Pseudomonas* spp. containing ACC-deaminase partially eliminates the effects of drought stress on growth, yield, and ripening of pea (*Pisum sativum* L.). *Pedosphere*. 18:611-620.
- 8- Bacilio M, Rodriguez H, Moreno M, Hernandez J-P, Bashan Y. 2004. Mitigation of salt stress in wheat seedlings by a gfp-tagged *Azospirillum*

- lipoferum. *Biology and Fertility of Soils*.40:188-193.
- 9- Bafeel SO, 2008. Contribution of mycorrhizae in phytoremediation of lead contaminated soils by *Eucalyptus rostrata* plants. *World Applied Science Journal*. 5(4): 490-498.
 - 10- Beauchamp C, Fridovich I. 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical biochemistry*. 44(1): 276-287.
 - 11- Beketov E, Pakhomov V, Nesterova O. 2005. Improved method of flavonoid extraction from bird cherry fruits. *Pharmaceutical Chemistry Journal*.39: 316-318.
 - 12- Bélanger RR, Benhamou N, Menzies JG, 2003. Cytological evidence of an active role of silicon in wheat resistance to powdery mildew (*Blumeria graminis* f. sp. tritici). *Phytopathology*. 93(4): 402-412.
 - 13- Bhardwaj P, Chaturvedi A.K, Prasad P. 2001. Effect of Enhanced Lead and Cadmium in soil on Physiological and Biochemical attributes of *Phaseolus vulgaris* L. *Natural Science*. 7(8):63-75.
 - 14- Bharwana S, Ali S, Farooq M, Iqbal N, Abbas F, Ahmad M. 2013. Alleviation of lead toxicity by silicon is related to elevated photosynthesis, antioxidant enzymes suppressed lead uptake and oxidative stress in cotton. *Journal of Bioremediation and Biodegradation*.4.
 - 15- Bianco C, Defez R. 2009. *Medicago truncatula* improves salt tolerance when nodulated by an indole-3-acetic acid-overproducing *Sinorhizobium meliloti* strain. *Journal of experimental botany*.60: 3097-3107.
 - 16- Cardoso IM, Kuyper TM. 2006. Mycorrhizal and tropical soil fertility. *Agricultur Ecosystem Environment*. 116: 72-84.
 - 17- Ceneci S, Cierci IH, Yildiz M, Zay C, Bozda A, Terzi H. 2010. Lead contamination reduces chlorophyll biosynthesis and genomic template stability in *Brassica rapa* L. *Environmental and Experimental Botany*. 67(3): 467-473.
 - 18- Chalmardi ZK, Abdolzadeh A, Sadeghipour HR. 2014. Silicon nutrition potentiates the antioxidant metabolism of rice plants under iron toxicity. *Acta physiologiae plantarum*.36: 493-502.
 - 19- Chance B, Maehly AC. 1955. [136] Assay of catalases and peroxidases.
 - 20- Chen H, Zheng C, Tu C, Shen Z. 2000. Chemical methods and phytoremediation of soil contaminated with heavy metals. *Chemosphere*.41: 229-234.
 - 21- Dey SK, Dye J, Petra S, Pothole D. 2007. Change in the antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in wheat seedling exposed to Cadmium and Lead stress. *Brazilian Journal Plant physiology*. 19(1): 53-60.
 - 22- Egamberdieva D, Kakhramon D, Stephan W, Abeer H, Elsayed F. 2017. Impact of soil salinity on the plant-growth-promoting and biological control abilities of root associated bacteria. *Saudi journal of biological sciences* 24(7): 1601-1608.
 - 23- Epstein E. 2009. Silicon: its manifold roles in plants. *Annals of Applied Biology*. 155(2):155-160.
 - 24- Etesami H, Beattie GA. 2017. Plant-microbe interactions in adaptation of agricultural crops to abiotic stress conditions. In: *Probiotics and Plant Health*. Springer. 163-200.
 - 25- Farooq M, Wahid A, Kobayashi N, Fujita D, Basra S. 2009. Plant drought stress: effects, mechanisms and management. In: *Sustainable agriculture*. Springer. 153-188.
 - 26- Foyer CH, Souriau N, Perret S, Lelandais M, Kunert KJ, Pruvost C, Jouanin L. 1995. Overexpression of glutathione reductase but not glutathione synthetase leads to increases in antioxidant capacity and resistance to photoinhibition in poplar trees. *Plant physiology*. 109(3): 1047-1057.
 - 27- Frcal N, Gurcr-Orthan H, Aykin-Burns A. 2001. Toxic Metals and Oxidative Stress Part1: Mechanisms Involved in Metal Induced Oxidative Damage. *Medical Chemistry*.1(6): 529-39
 - 28- Giannopolitis CN, Ries SK. 1977. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. *Plant physiology*.59:309-314.
 - 29- Gill SS, Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinert in abiotic stress in crop plants. *Plant Physiol. Biochem*. 2010;48(12):909-30.
 - 30- Glick BR. 2014. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological Research*.169:30-39.
 - 31- Glick BR. 2003. Phytoremediation: synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment. *Biotechnology advances*. 21(5): 383-393.
 - 32- Gonzalez-Mendozaa D, Quiroz-Moreno A, Medrano REG, Grimaldo-Juarez O, Zapata-Perez O. 2009. Cell viability and leakage of

- electrolytes in *Avicennia germinans* exposed to heavy metals *Zeitschrift für Naturforschung*. 64:391-394
- 33- Gwozdz EA, Przymusinski R, Rucinska R, Deckert J. 1997. Plant cell responses to heavy metals: molecular and physiological aspects. *Acta physiologica. Plant*. 19(4):459-65.
- 34- Hause B, Fester T. 2005. Molecular and cell biology of arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Planta*. 221(2): 184-196.
- 35- Heath R.L. and Packer L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125: 189-198.
- 36- In BC, Motomura S, Inamoto K, Doi M, Mori G. 2007. Multivariate analysis of relations between preharvest environmental factors, postharvest morphological and physiological factors and vase life of cut Asami Red roses. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*. 76 (1): 66-72.
- 37- Jiang N, Luo X, Zeng J, Yang Z. 2010. Lead toxicity induced growth and antioxidant responses in *Luffa cylindrica* seedlings. *International Journal of Agriculture of biology*. 12(2):205-10.
- 38- Khan AG. 2005. Role of soil microbes in the rhizospheres of plants growing on trace element contaminated soils in phytoremediation. *Journal of Trace Element Medical Biology*. 18: 355-364.
- 39- Kidd, P.S., M. Llugany, C. Poschenrieder, B. Gunse and J. Barcelo. 2001. The role of root exudates in aluminium resistance and silicon-induced amelioration of aluminium toxicity in three varieties of maize (*Zea mays* L.). *J. Exp. Bot*. 52: 1339-1352.
- 40- Lanfranco L, Bianciotto V, Lumini E, Souza M, Morton JB, Bonfante P. 2001. A combined morphological and molecular approach to characterize isolates of arbuscular mycorrhizal fungi in *Gigaspora* (Glomales). *New Phytologist*. 152(1): 169-179.
- 41- Liang Y, Sun W, Si J, Römheld V. 2005. Effects of foliar and root applied silicon on the enhancement of induced resistance to powdery mildew in *Cucumis sativus*. *Plant Pathology*. 54: 678-685.
- 42- Lien EJ, Ren S, Bui H-H, Wang R. 1999. Quantitative structure-activity relationship analysis of phenolic antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine*. 26:285-294.
- 43- Liu D, Zou J, Meng Q, Zou J, Jiang W. 2009. Uptake and accumulation and oxidative stress in garlic (*Allium sativum* L.) under lead phytotoxicity. *Ecotoxicology*. 18:134-143.
- 44- Lucas JA, Garcia-Cristobal J, Bonilla A, Ramos B, Gutierrez-Manero J. 2014. Beneficial rhizobacteria from rice rhizosphere confers high protection against biotic and abiotic stress inducing systemic resistance in rice seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*. 82:44-53.
- 45- Ma Y, Rajkumar M, Zhang C, Freitas H. 2016. Beneficial role of bacterial endophytes in heavy metal phytoremediation. *Journal of Environmental Management*. 174:14-25.
- 46- Ma Y, Prasad MNV, Rajkumar M, Freitas H. 2011. Plant growth promoting rhizobacteria and endophytes accelerate phytoremediation of metalliferous soils. *Biotechnology Advance*. 29: 248-258.
- 47- Malecka A, Piechalak A, Mensinger A, Hanc D, Baralkiewicz D, Tomaszewska, B. 2012. Antioxidative Defense System in *Pisum sativum* Roots Exposed to Heavy Metals (Pb, Cu, Cd, Zn). *Polish Journal Environment Studies*. 21(6): 1721-30
- 48- Marinova D, Ribarova F, Atanassova M. 2005. Total phenolics and total flavonoids in Bulgarian fruits and vegetables. *Journal of the University Chemical Technology and metallurgy*. 40: 255-260.
- 49- Matsouka I, Beri D, Chinou I, Haralampidis K, Spyropoulos CG. 2011. Metals and selenium induce medicarpin accumulation and excretion from the roots of fenugreek seedlings: a potential detoxification mechanism. *Plant and soil*. 343: 235-245.
- 50- Michalak A. 2006. Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Polish Journal of Environmental Studies*. 15.
- 51- Mishra S, Srivastava S, Tripathi R, Govindarajan R, Kuriakose S, Prasad M. 2006. Phytochelatin synthesis and response of antioxidants during cadmium stress in *Bacopa monnieri* L. *Plant Physiology and Biochemistry*. 44: 25-37.
- 52- Mittal S, Kumari N, Sharma V. 2012. Differential response of salt stress on *Brassica juncea*: photosynthetic performance, pigment, proline, D1 and antioxidant enzymes. *Plant Physiology and Biochemistry*. 54:17-26.
- 53- Munns R, Husain S, Rivelli AR, James, RA, Condon AG, Lindsay MP, Lagudah ES,

- Schachtman DP, Hare R. A. 2002. Avenues for increasing salt tolerance of crops and the role of physiologically based selection traits. *Plant Soil*. 247: 93-105.
- 54- Nagajyoti P, Lee K, Sreekanth T. 2010. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environmental chemistry letters*.8: 199-216.
- 55- Nakano Y, Asada K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and cell physiology*.22: 867-880.
- 56- Nascimento CWA, Xing B. 2006. Phytoextraction: a review on enhanced metal availability and plant accumulation. *Scientia agricola*.63: 299-311.
- 57- Noman A, Ali S, Naheed F, Ali Q, Farid M, Rizwan M, Irshad MK. 2015. Foliar application of ascorbate enhances the physiological and biochemical attributes of maize (*Zea mays* L.) cultivars under drought stress. *Archives of Agronomy and Soil Science*.61: 1659-1672.
- 58- Omaye ST, Turnbull JD, Sauberlich HE. 1979. Selected methods for the determination of ascorbic acid in animal cells, tissues, and fluids. In: *Methods in enzymology*. Elsevier. p. 3-11.
- 59- Pandey N, Pathak GC, Pandey DK, Pandey R. 2009. Heavy metals, Co, Ni, Cu, Zn and Cd, produce oxidative damage and evoke differential antioxidant responses in spinach. *Brazilian Journal of Plant Physiology*.21: 103-111.
- 60- Pandey S, Ghosh PK, Ghosh S, De TK, Maiti TK. 2013. Role of heavy metal resistant *Ochrobactrum* sp. and *Bacillus* spp. strains in bioremediation of a rice cultivar and their PGPR like activities *Journal of Microbiology* 51: 11-17
- 61- Peng Y, Huang H, Zhang Y, Kang C, Chen S, Song L, Liu D, Zhong C. 2018. A versatile MOF-based trap for heavy metal ion capture and dispersion. *Nature communications*.9:187.
- 62- Polanco LR, Rodrigues FA, Nascimento KJ, Cruz MF, Curvelo CR, DaMatta FM, Vale FX. 2014. Photosynthetic gas exchange and antioxidative system in common bean plants infected by *Colletotrichum lindemuthianum* and supplied with silicon. *Tropical Plant Pathology*. 39: 35-42.
- 63- Posmyk M, Kontek R, Janas K. 2009. Antioxidant enzymes activity and phenolic compounds content in red cabbage seedlings exposed to copper stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*.72: 596-602.
- 64- Punamiya P, Datta R, Sarkar D, Barber S, Patel M, Da P. 2010. Symbiotic role of *Glomus mosseae* in phytoextraction of lead in vetiver grass. *Journal of Hazardous Material*. 177: 465-474.
- 65- Quiroga M, Guerrero C, Botella MA, Barceló A, Amaya I, Medina MI, Alonso FJ, de Forchetti SM, Tigier H, Valpuesta V. 2000. A tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin. *Plant physiology*.122: 1119-1128.
- 66- Rodrigues Ferreira R, Francisco Fornazier R, Pierre Vitória A, Lea PJ, Antunes Azevedo R. 2002. Changes in antioxidant enzyme activities in soybean under cadmium stress. *Journal of Plant Nutrition*.25: 327-342.
- 67- Sahib, N.G., Anwar, F., Gilani, A.H., Hamid, A.A., Saari, N. and Alkharfy, K.M., 2013. Coriander (*Coriandrum sativum* L.): A potential source of high value components for functional foods and nutraceuticals A review. *Phytotherapy Res*. 27, 1439-1456.
- 68- Schutzendubel A, Polle A. 2002. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal of experimental botany*. 53(372): pp.1351-1365.
- 69- Shahid M, Dumat C, Pourrut B, Sabir M, Pinelli E. 2014. Assessing the effect of metal speciation on lead toxicity to *Vicia faba* pigment contents. *Journal of Geochemical Exploration*, 144: 290-297.
- 70- Sharma P, Dubey RS. 2005. Lead toxicity in plants. *Brazilian journal of plant physiology*. 17: 35-52.
- 71- Shi X, Zhang C, Wang H, Zhang F. 2005. Effect of Si on the distribution of Cd in rice seedlings. *Plant and Soil*, 272(1-2): 53-60.
- 72- Singh HP, Batish DR, Kaur S, Arora K, Kohli RK. 2006. α -Pinene inhibits growth and induces oxidative stress in roots. *Annals of Botany*. 98: 1261-1269.
- 73- Smith TK, Lund EK, Parker ML, Clarke RG, Johnson IT. 2004. Allyl-isothiocyanate causes mitotic block, loss of cell adhesion and disrupted cytoskeletal structure in HT29 cells *Carcinogenesis* 25:1409-1415.
- 74- Tripathi P, Tripathi RD, Singh RP, Dwivedi S, Goutam D, Shri M, Trivedi PK, Chakrabarty D. 2013. Silicon mediates arsenic tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) through lowering of arsenic uptake and improved antioxidant defence system. *Ecological engineering*. 52: 96-103.

- 75- Ullah A, Mushtaq H, Ali H, Munis MFH, Javed MT, Chaudhary HJ. 2015. Diazotrophs-assisted phytoremediation of heavy metals: a novel approach. *Environmental Science and Pollution Research*. 22: 2505-2514.
- 76- Verma S, Dubey RS. 2003. Lead toxicity induces lipidperoxidation and alters the activities of antioxidant growing rice plants. *Plant Science*. 164:1489-1498.
- 77- Vessey JK. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and soil*. 255: 571-586.
- 78- Vogt T. 2010. Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular plant*. 3: 2-20.
- 79- Wang YC, Qu GZ, Li HY, Wu YJ, Wang C, Liu GF, Yang CP. 2009. Enhanced salt tolerance of transgenic poplar plants expressing a manganese superoxide dismutase from *Tamarix androssowii* *Molecular Biology Reports* 37:1119.
- 80- Wang S, Wang F, Gao S. 2015. Foliar application with nano-silicon alleviates Cd toxicity in rice seedlings. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(4): 2837-2845.
- 81- Zeng G, Zhang J, Chen Y, Yu Z, Yu M, Li H, Liu Z, Chen M, Lu L, Hu C. 2011. Relative contributions of archaea and bacteria to microbial ammonia oxidation differ under different conditions during agricultural waste composting. *Bioresource technology*, 102(19): 9026-9032.

Investigation of biological and non-biological interaction on enzymatic and non-enzymatic antioxidant of coriander (*Coriandrum sativum*) under Pb stress condition

Fatemi H. and Esmailpour B.

Dept. of Horticultural Sciences, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, I.R. of Iran

Abstract

In order to increase vegetable productivity by improving environmental conditions, this article investigates the effects of stimulates exogenous of silicon and biological treatment on the activities of major antioxidant enzymatic and non-enzymatic and on lipid peroxidation under Pb stress. This study was conducted in pot experiment to determine the effects of four Pb concentrations (0, 500, 1000, and 1500 ppm) at three different concentrations of silicon (Si) (0, 1.5 and 3 mM) and PGPR (non-inoculated, isolated 6 and 19 and mycorrhiza) on a coriander (*Coriandrum sativum*). The traits measured in this study included plant biomass, catalase, peroxidase, superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, malondialdehyde, phenol, and flavonoid and antioxidant capacity. The results of this study showed a significant decrease in plant biomass at different concentrations of Pb. In addition, the content of malondialdehyde, peroxidase, phenol, and flavonoid and antioxidant activity increased with increasing Pb concentration but catalase and superoxide dismutase activity only up to 500 ppm Pb was able to increase. The interaction of microorganism with foliar treatment with silicon nanoparticles, which increased in most traits.

Key words: Antioxidant enzyme, Silicon, Coriander