نشریه علمی زیست‌شناسی خاک / جلد ۱۱ / شماره ۱ / ۱۴۰۲/ص۸۵-۹۹
dx.doi.org/10.22092/sbj.2023.358940.238

اثر قارچ *Serendipita indica* و باکتری *Sinorhizobium meliloti* بر رشد گیاه یونجه (*Medicago sativa L.*) در خاک آهکی آلوده به روی

لیلا تابنده*، مژگان سپهری و مهدی زارعی

محقق بخش تحقیقات خاک و آب، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان فارس؛ سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شیراز، ایران؛ **ltabande@gmail.com**

استادیار گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز؛ **m.sepehri@yahoo.com**

دانشیار گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز؛ **m.zarei@yahoo.com**

دریافت: ۱۴۰۱/۳/۲۵ و پذیرش: ۱۴۰۱/۸/۱۱

«مقاله پژوهشی»

چکیده

افزایش سطح آلودگی فلزات سنگین در خاک، با ورود به زنجیره غذایی انسان، به عنوان یکی از پر مخاطره‌ترین مسائل زیست‌محیطی جوامع بشری تبدیل شده است. استفاده از یک فناوری ارزان و بی‌خطر از قبیل گیاه‌پالایی و با همزیستی مناسب بین گیاه و ریزجانداران محرک رشد گیاه، می‌تواند گامی موثر بر افزایش کارایی این فناوری باشد. در مطالعه حاضر، اثرات تلقیح انفرادی و توام قارچ Serendipita indica و باکتری Sinorhizobium meliloti بر یونجه کشت شده در یک خاک آلوده به غلظت‌های مختلف روی (۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک)، مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که، بالاترین سطح آلودگی روی، به ترتیب با کاهش شدید ۵۳/۵، ۷۱، ۲۵/۲ و ۶۰/۲ درصدی وزن خشک اندام هوایی، ریشه، غلظت فسفر و آنزیم کاتالاز گیاهی و افزایش ۱۷۴/۵، ۵۶/۶، ۶۰/۲ و ۳۶/۶ درصدی مقدار پراکسیدهیدروژن، مالون-دی‌آلدهید، آنزیم پراکسیداز و سوپراکسیددسموتاز همراه بود، تحت این شرایط، تلقیح توام قارچ و باکتری در مقایسه با سایر تیمارهای میکروبی، علاوه بر افزایش جذب فسفر گیاه، با کاهش انتقال روی از ریشه به اندام هوایی و تحریک سیستم آنزیم-های اکسیداتیو گیاهی مانند کاتالاز، منجر به کاهش مقدار پراکسیدهیدروژن و مالون‌دی‌آلدهید شد که متعاقباً با بهبود خصوصیات رشدی گیاه همراه بود. بنابراین تلقیح توام قارچ و باکتری با کاهش بیشتر pH خاک ریزوسفری و افزایش قابلیت جذب روی و تثبیت آلودگی در ریشه یونجه، می‌تواند، نقش مهمی در تعیین کمیت، کیفیت و امنیت غذایی یونجه به عهده داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های اکسیداتیو، تثبیت گیاهی، فاکتور انتقال، مالون‌دی‌آلدهید

* آدرس ایمیل نویسنده مسئول: ltabande@gmail.com

مقدمه

آلودگی محیط زیست به فلزات سنگین، یکی از موضوعات چالش‌انگیز در جهان امروز است که با توسعه سریع کشاورزی و صنایع به یک معضل بزرگ در جهان تبدیل شده است. عنصر روی جزء یکی از فلزات سنگین می‌باشد که به عنوان عنصر کم مصرف ضروری در تغذیه گیاه شناخته شده است و در بسیاری از واکنش‌های آنزیمی، فرایندهای متابولیکی، واکنش‌های اکسایش-کاهش و همچنین سم زدایی سوپراکسیدها، نقش‌های اساسی ایفا می‌کند (کاکمک، ۲۰۰۰). ولیکن، آنچه وجود این ترکیبات در محیط زیست را به عنوان یکی از آلاینده-های مهم زیست‌محیطی تبدیل کرده است، افزایش شدید و ناگهانی سطح این ترکیبات، تحت تأثیر استفاده فراوان از کودهای شیمیایی درخاک‌های دارای مقدار آهک و pH بالا و ماده آلی کم، آفت‌کش‌ها، لجن فاضلاب شهری، آبیاری با پساب فاضلاب شهری، فعالیت‌های صنعتی مانند استخراج معادن، صنایع آبکاری، لاستیک‌سازی و رنگ‌سازی، است (تنگ و همکاران، ۲۰۰۹)

که به دلیل عدم تجزیه در طبیعت و پایداری در محیط زیست، علاوه برکاهش فعالیت میکروبی و بروز تغییرات گسترده‌ای براکوسیستم خاک (هاشم و همکاران، ۲۰۱۶)، می‌توان به ایجاد اختلال در جذب و انتقال عناصر معدنی به گیاه (ونگ و همکاران، ۲۰۰۹)، تولید اکسیژن-های فعال و ایجاد آسیب اکسیداتیو در گیاهان (پندی و همکاران، ۲۰۰۹)، پراکسیداسیون لیپیدها، تجزیه غشا، آسیب به DNA ، پروتئین‌ها و کربوهیدرات‌ها اشاره نمود (آژینا و همکاران، ۲۰۱۷) و در نهایت با جذب توسط گیاهان و ورود به زنجیره غذایی، بر سلامت اجزای اصلی این زنجیره (گیاه، دام و انسان) اثر گذاشته و به عنوان یک تهدید جدی برای جوامع بشری محسوب می‌شود (شاه و بلوزروا، ۲۰۰۹). از این رو ممانعت و یا حذف بیش از حد فلزات سنگین درخاک امری ضروری و مهم است. به منظور جلوگیری از ورود و تجمع فلزات سنگین به منابع آب و خاک، روش‌های متعدد فیزیکی، شیمیایی و زیستی در دنیا تحت بررسی قرار گرفته است. اغلب این روش ها، پر هزینه بوده و منجر به تخریب بیشتر محیط زیست می‌شوند. در بین تکنیک‌های متعدد در حذف آلودگی خاک، گیاه‌پالایی (نظیر استخراج و تثبیت گیاه) خاک‌های آلوده به فلزات سنگین از جمله فناوری‌های سبز و دوست‌دار محیط‌زیست است، که از لحاظ اقتصادی مقرون‌به‌صرفه و از لحاظ انرژی کم هزینه می‌باشد و کارایی آنها جهت حذف فلزات سنگین از خاک آلوده می-تواند با استفاده از میکروارگانیسم‌های محرک رشد گیاه افزایش یابد (گلیک و همکاران، ۲۰۱۰). بطوریکه، باکتری‌ها و قارچ‌های محرک رشد گیاه در محیط ریزوسفری خاک آلوده به فلزات سنگین، با بهبود رشد گیاهان،تنش مربوط به سطوح سمی فلزات سنگین را کاهش داده و باعث افزایش استخراج و تثبیت فلزات سنگین در گیاهان می‌شوند (کید و همکاران، ۲۰۱۷).

یونجه (Medicago sativa L.) لگوم چند ساله-ای با ریشه‌های عمیق که به طور گسترده در جهان رشد می‌کند و عمدتاً توانایی بالایی در رشد و جذب فلزات سنگین دارا هستند (پرالتا- ویدا و همکاران، ۲۰۰۴) یکی از عوامل کارایی مؤثر این گیاه در گیاه‌پالایی، همزیستی این گیاه با ریزوبیوم است. ریزوبیوم، از مهمترین باکتری-های ریزوسفری محرک رشد گیاه است که با تثبیت زیستی نیتروژن و افزایش قدرت باروری خاک و تولید محصول، توانسته است نقش بسزایی در افزایش کارایی گیاه‌پالایی داشته باشد (فگورزی و همکاران، ۲۰۱۸; باندیوپادیای و همکاران، ۲۰۱۵). در تحقیقات پیشین، گزارش‌هایی از همزیستی مؤثر بین لگوم و ریزوبیوم، به نوان یک روش جدید و مؤثر در به کارگیری فعل و انفعالات گیاه-میکروب برای فرایند گیاه‌پالایی، به ویژه تثبیت گیاهان انجام گرفته است (هائو و همکاران، ۲۰۱۴). ولیکن باید در نظر گرفته شود که استفاده ترکیبی از ریزوبیوم با سایر باکتری‌ها و قارچ‌های محرک رشد گیاه،

می‌تواند اثرات هم‌افزایی[1] بر بهبود عملکرد گیاه و افزایش کارایی گیاه‌پالایی داشته باشد (دری و همکاران، ۲۰۱۰) و یا ممکن است بدلیل رقابت بین مایه‌تلقیح‌ها و جمعیت بومی، اثر تقویتی بر رشد گیاه را کاهش دهد. بنابراین، چالش چگونگی ترکیب مایه‌تلقیحی از ریزوبیوم با سایر ریزجانداران محرک رشد گیاه، باید به نحوی باشدکه بدون ایجاد مشکلات زیست‌محیطی دیگر، منجر به حداکثر کارایی گیاه‌پالایی گردد (هائو و همکاران، ۲۰۱۴).

شناسایی قارچ‌های میکوریزی و همزیستی آن با گیاهان، نقش بسزایی در افزایش تحمل گیاهان میزبانشان در برابر تنش‌های زنده و غیرزنده محیطی نشان داده است. از قارچ‌های محرک رشد گیاه، Serendipita indica به عنوان یک قارچ اندوفیت شبه میکوریزی شناخته شده است (ویس و همکاران، ۲۰۰۴) که با افزایش جذب آب و عناصر غذایی (وارما و همکاران، ۲۰۱۲; زوکارو و همکاران، ۲۰۰۹ و یاداو و همکاران، ۲۰۱۰) و افزایش فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی در گیاه (زارع و همکاران، ۲۰۱۳; باگوات و همکاران، ۲۰۰۸) منجر به بهبود رشد گیاه در برابر عوامل استرس‌زای محیطی می‌شود. این قارچ، با قابلیت کشت در محیط آزمایشگاهی (لیو و همکاران، ۲۰۲۰) و دامنه وسیعی از انواع گیاهان میزبان، از قارچ‌های میکوریزی متمایز شده است (پشکان و برگهوفر، ۲۰۰۴).

با توجه به اهمیت باکتری S. meliloti (هائو و همکاران، ۲۰۱۴) و قارچ اندوفیت S. indica (سپهری و خطابی، ۲۰۲۰) بر افزایش کارایی گیاه‌پالایی عناصر سنگین و از طرف دیگر، با توجه به اهمیت خاک ریزوسفری، به دلیل طیف وسیعی از ترشحات ریشه‌ای و میکروبی و افزایش قابلت استفاده عناصر غذایی در خاکهای آهکی، به عنوان مکانی برای نمایش دقیق ارتباط بین خاک و گیاه و ریزجانداران در نظرگرفته می‌شود (متقیان و حسین‌پور، ۲۰۱۳).

بنابراین، در این تحقیق، تلاش می‌شود تا مطالعاتی در ارتباط با تلقیح انفرادی و یا مشترک ریزجانداران مذکور بر پاسخ‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه یونجه کشت‌شده در خاک‌های ریزوسفری آلوده به سولفات روی، صورت گیرد و اینکه آیا تلقیح گیاه یونجه با دو ریزجاندار محرک رشد گیاه، تا چه حدی می‌تواند آسیب-های ناشی از تنش اکسیداتیو حاصل از آلودگی به روی در گیاه را، کاهش دهد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های خاک از عمق ۰ الی ۳۰ سانتی‌متری لایه سطحی خاک مزارع ایستگاه چیتگران در منطقه باجگاه شیراز جمع‌آوری گردید و پس از عبور از الک دو میلی‌متری، خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آنها طبق روش‌های متداول اندازه‌گیری گردید (امامی، ۱۳۷۵).

جهت حذف هر گونه جمعیت میکروبی، خاک-ها در اتوکلاو به مدت ۲۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس استریل شدند (فرزانه و همکاران، ۲۰۰۹). قبل از کشت، تلقیح میکروبی و سطوح مختلف روی از منبع سولفات (۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک خشک) به خاک‌ها اضافه شدند. جهت تکمیل واکنش بین روی و خاک، نمونه‌ها به مدت سه ماه در دمای اتاق و با حفظ رطوبت در حد ظرفیت زراعی، نگه‌داری شدند. کشت خالص قارچ S. indica از محیط کشت کمپلکس و بر طبق روش قبولی و همکاران (۲۰۱۳) انجام شد. جدایه باکتری در بین سویه‌های برتر S. meliloti که قبلاً بر اساس توانایی تولید آمینوسیکلوپروپان-۱-کربوکسیلات (ACC) دی آمیناز، اسید ایندول-۳- استیک اسید (IAA)، تثبیت نیتروژن و تولید سیدروفور غربال شده بودند، انتخاب گردید، بطوریکه سویه انتخاب شده دارای ژن‌های مؤثر در گره زدن و تثبیت زیستی نیتروژن بود (سپهری و خطابی، ۲۰۲۰) و برای تهیه مایه‌تلقیح باکتری از روش سلیم و همکاران (۲۰۱۷) استفاده شد.

[1] Synergic effects

جدول ۱- برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک تحت مطالعه

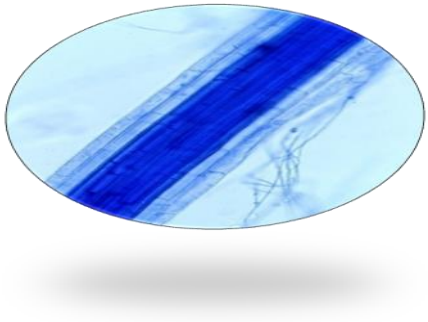
بافت[12]	فسفر[11]	پتاسیم[10]	مس[9]	منگنز[8]	آهن[7]	روی[6]	کربن آلی[5]	کربنات کلسیم معادل[4]	ظرفیت تبادل کاتیونی[3]	قابلیت هدایت الکتریکی[2]	پ‌هاش[1]
										نسبت خاک به آب	
										$dS\ m^{-1}$	
				$mg\ Kg^{-1}$			%		$cmol^{+}kg^{-1}$		
Clay Loam	۸/۸	۳۷۲	۱/۴۴	۸/۵	۸/۵	۰/۹۸	۰/۴۱	۴۲/۵	۱۵	۰/۳۵	۸/۳

1.pH 2.EC_e(electrical conductivity) 3.CEC (cation exchange capacity) 4.CCE(calcium carbonate equivalent) 5.OC (organic carbon) 6.Zn 7. Fe 8.Mn 9.Cu 10. K 11.p 12. texture

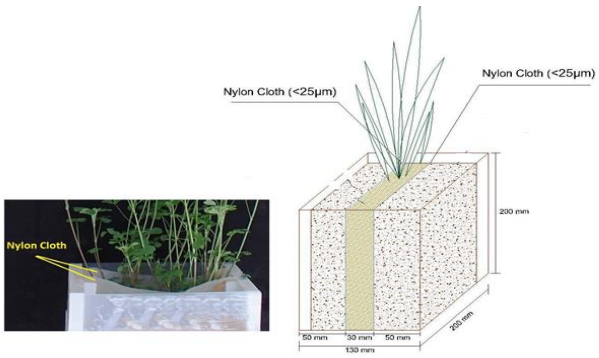
این پژوهش در گلخانه‌ی بخش علوم خاک دانشگاه شیراز، به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. تیمارها، شامل سطوح مختلف سولفات روی و فاکتور تلقیح میکروبی در چهار سطح (شاهد، قارچ S. indica ، باکتری S. meliloti و تلقیح توام قارچ و باکتری) بود. آزمایش در ۳۶ ریزوباکس با ابعاد ۲۰۰ میلی-متر، ۱۳۰ میلی‌متر، ۲۰۰ میلی‌متر (طول، عرض، ارتفاع) بر اساس طرح یوسف و چینو (۱۹۸۹) با برخی تغیرات جزئی انجام شد (شکل۱). ریزوباکس‌ها با استفاده از نایلون با قطر منافذ کمتر از ۲۵ میکرومتر به سه قسمت تقسیم گردید که در قسمت وسط یا مرکزی با ۳۰ میلی‌متر پهنا، به کشت یونجه اختصاص داده شد و بصورت یکنواخت با سه کیلوگرم خاک (تیمار شده و تیمار نشده با سولفات روی) پر شدند.

پس از آماده‌سازی بذرهای جوانه زده یونجه (M. sativa L.) از رقم همدانی، جهت اعمال تیمار قارچ، بذرها در محلول سوسپانسیون اسپور قارچ (۵×۱۰^{۷} اسپور در هر میلی‌لیتر) به مدت سه ساعت و با ۷۵ دور در دقیقه، بطور آرام تکان داده شده تا بذرهای جوانه زده کاملاً تلقیح یابند و به منظور تلقیح باکتری، یک میلی‌لیتر از محیط کشت باکتریایی مربوط به ۴۸ ساعت قبل (۵×۱۰^{۷} سلول در هر میلی‌لیتر محیط کشت مایع) به خاک اطراف بذرهای جوانه زده اضافه شد. همچنین برای تلقیح توآم قارچ و باکتری، پس از گذشت سه روز و اطمینان از نفوذ اسپورهای قارچ به درون ریشه، اعمال تیمار باکتری(۵×۱۰^{۷} سلول در هر میلی‌لیتر محیط کشت مایع) انجام گرفت. لازم به ذکر است، جهت ایجاد شرایط یکنواخت، به ریزوباکس های شاهد (غیر تلقیحی)، مقدار مساوی محیط باکتریایی و قارچی استریل اضافه شد. در شرایط گلخانه، کلیه ریزوباکس‌ها به مدت نه هفته، رطوبت آنها با آب مقطر در حد ظرفیت زراعی نگه‌داری شدند. ۱۴ روز پس از کاشت، نمونه برداری از ریشه گیاهان تلقیح شده با قارچ جهت اطمینان از برقراری همزیستی و تعیین میزان کلنیزاسیون ریشه به روش دیکسون و اسمیت (۱۹۹۸) صورت گرفت (شکل۲). پس از گذشت ۹ هفته و نمونه‌برداری از آخرین برگ جوان کاملا رشد یافته، غلظت مالون‌دی‌آلدهید به روش هیت و پکر (۱۹۶۸) و فعالیت انزیم‌های آنتی‌اکسیدان، پس از عصاره‌گیری بافت تازه برگ یونجه با بافر پتاسیم فسفات (اوزدن و همکاران، ۲۰۰۹)، اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز به روش شانس و ماهلی (۱۹۹۵) و سوپراکسیددسموتاز به روش بوچمپ و فریدوویچ (۱۹۷۱) انجام شد. علاوه بر این، پس از پایان رشد رویشی گیاه، اندام هوایی از محل طوقه قطع و پس از جداسازی ریشه، با آب مقطر شسته و به مدت سه روز در دمای ۶۵ درجه سلسیوس در آون خشک شده و وزن خشک اندام هوایی و ریشه گیاه یادداشت‌برداری شد و غلظت آهن، منگنز، مس و روی گیاه با اتمیک ابزوربشن (مدل شیمادزو AA670G، ژاپن) و همچنین فسفر گیاه به روش رنگ‌سنجی با دستگاه اسپکتروفتومتر طبق روش‌های مرسوم در آزمایشگاه خاک و آب مرکز تحقیقات کشاورزی، اندازه‌گیری شد (علی احیایی،۱۳۷۲).

در پایان، تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS 9.1 و مقایسه میانگین‌ها بر مبنای آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد از نظر آماری انجام شد.



شکل ۱- ریشه تلقیح شده با قارچ S. indica



شکل ۲- شماتیک ریزوباکس

نتایج

نتایج تجزیه واریانس (جدول۲) نشان داد که، اثر مستقل تنش آلودگی به سولفات روی و تلقیح میکروبی بر اکثر متغیرهای گیاهی تحت مطالعه، در سطح یـک درصد معنی‌دار بود و تلقیح میکروبی، تنها بر غلظت منگنز، مس و آنزیم سوپراکسیددسموتاز تأثیر معنی‌داری نشان نداد، ولیکن اثر متقابل عوامل آزمایشی، توانست اثر معنی‌داری در سطح ۵ درصد بر آنزیم سوپراکسید دسموتاز داشته باشد.

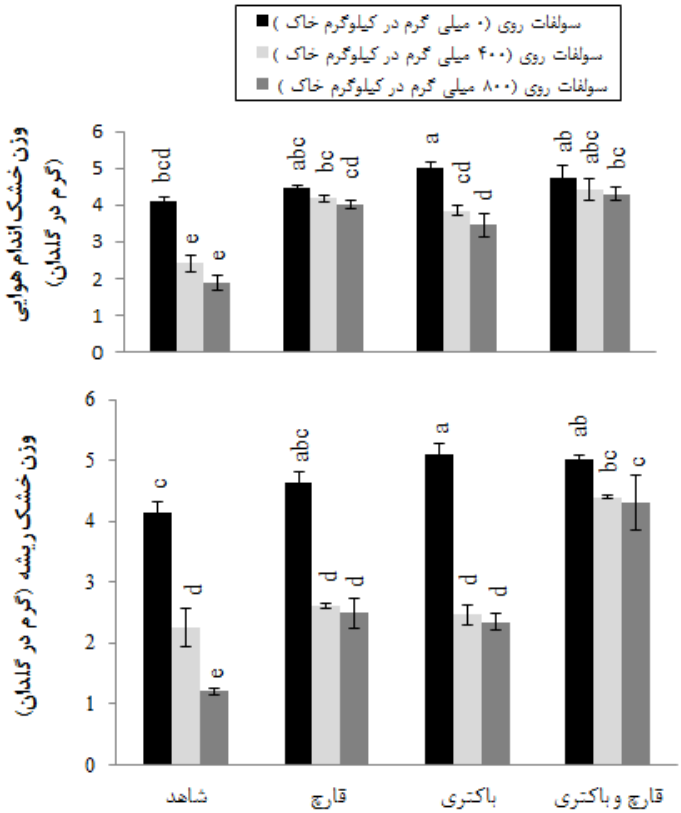
جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس اثر آلودگی روی و تلقیح میکروبی بر pH خاک ریزوسفری و برخی خصوصیات اندازه‌گیری شده در یونجه

متغیرها	منابع تغییرات				
	ضریب	خطا	آلودگی روی*تلقیح میکروبی	تلقیح میکروبی	آلودگی روی
	میانگین مربعات				
وزن خشک اندام هوایی	۹/۰۶	۰/۱۲۵	۰/۶۳**	۵/۱**	۴/۴**
وزن خشک ریشه	۱۰/۴	۰/۱۳	۰/۹۸**	۶/۴**	۱۵/۸**
غلظت روی اندام	۷/۳	۳۸/۴	۱۵۱/۹**	۲۵۰/۶**	۴۸۵۸۱**
غلظت روی ریشه	۱۴/۶	۳۹۸/۷	۲۱۹۷**	۸۵۳۱**	۱۲۳۳۶۴**
فاکتور انتقال روی	۱۴/۳	۰/۰۰۸۱	۰/۰۲۴*	۰/۱۹۵**	۰/۰۶۵**
غلظت فسفر اندام	۵/۷	۰/۰۰۰۲	۰/۰۰۰۳ ns	۰/۰۳**	۰/۰۰۱۶**
غلظت منگنز اندام	۱۷/۲	۱۰۳/۷	۴۶/۹ns	۲۴/۲۸ns	۴۴۶۰**
غلظت آهن اندام هوایی	۱۰/۶	۵۱/۲	۸۹/۹ ns	۷۳۶/۶**	۵۵۵۵**
غلظت مس اندام هوایی	۱۱/۳	۱/۲	۲/۸ ns	۰/۷۲ns	۵۹/۷**
آنزیم کاتالاز	۱۲/۴	۰/۰۰۰۵	۰/۰۲۲**	۰/۰۳**	۰/۰۰۴۳**
آنزیم پراکسیداز	۱۹/۱	۰/۶۲	۰/۵۸ns	۵/۹**	۹/۱**
آنزیم	۱۷/۲	۰/۰۰۲۶	۰/۰۰۶۸*	۰/۰۰۳۲ns	۰/۰۲۳**
مالون‌دی‌آلدهید	۲۲/۴	۲/۸	۲/۷۲ns	۲۳/۸**	۱۷/۴**
پراکسید هیدروژن	۲۰/۴	۰/۲۱	۲/۷**	۶/۵**	۱/۹**
pH خاک ریزوسفری	۰/۴۴	۰/۰۰۱۲	۰/۰۵**	۰/۲۷**	۰/۴۹**

*و**: به ترتیب نشان‌دهنده معنی‌داری بودن اثر عوامل آزمایشی در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد می‌باشند.

ns: بیانگر عدم معنی‌داری است.

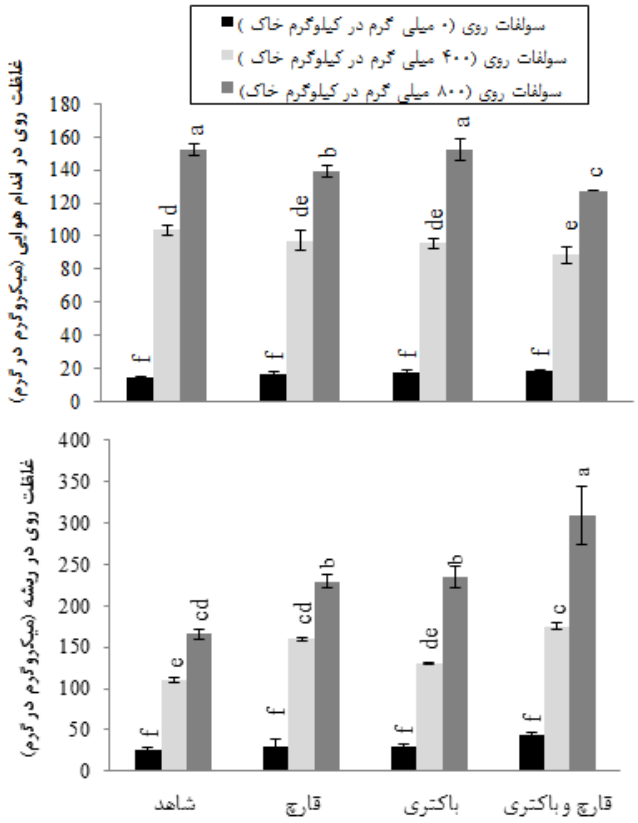
در بررسی نتایج مندرج در شکل ۳ مشخص گردید که تنش آلودگی روی، علاوه بر افت وزن خشک اندام هوایی، منجربه کاهش وزن خشک ریشه گیاهان تلقیحی و غیر تلقیحی (شاهد) شد. بطوریکه، بیشترین اثر کاهشی عملکرد، در بالاترین سطح روی (۸۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم) و به ترتیب با کاهش معنی‌دار ۵۳/۵ و ۷۱ درصدی در وزن خشک اندام هوایی و ریشه گیاه شاهد (عدم تلقیح میکروبی) مشاهده شد و در این شرایط، تلقیح میکروبی توانست نقش مؤثری بر کاهش افت وزن خشک ریشه و اندام هوایی یونجه نشان دهد، بطوریکه در بین تیمارهای میکروبی، تلقیح توأم قارچ و باکتری تنها با کاهش ۹/۶ و ۱۴/۲ درصدی وزن خشک اندام هوایی و ریشه گیاه، حداقل افت عملکرد گیاهان تحت تنش را نسبت به شرایط بهینه (عدم آلودگی) نشان دادند (شکل ۳).



شکل۳- اثر تنش آلودگی و تلقیح میکروبی بر وزن خشک اندام هوایی و ریشه (گرم در گلدان) گیاه یونجه

*ستون‌هایی که در یک حرف کوچک یکسان هستند از لحاظ آماری طبق آزمون دانکن، تفاوت معنی‌داری ندارند.

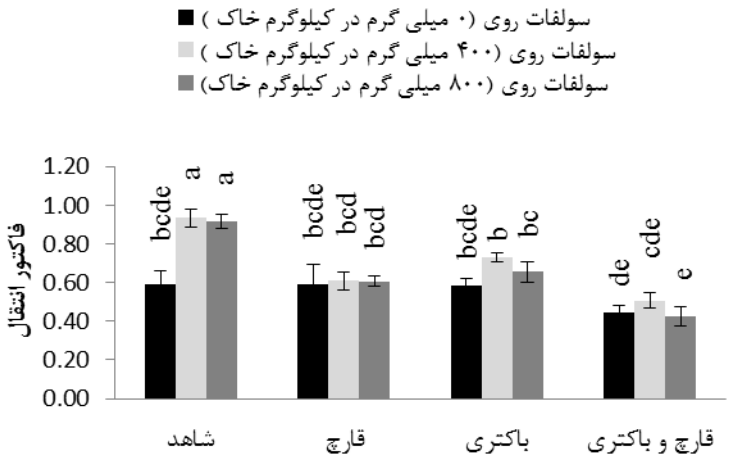
همانطور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود، سولفات روی، منجر به افزایش معنی‌دار غلظت روی در اندام هوایی و ریشه گیاهان تلقیح یافته و شاهد (عدم تلقیح میکروبی) شد. در بالاترین سطح آلودگی روی (۸۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم)، کمترین غلظت روی در اندام هوایی یونجه تلقیح شده با قارچ و باکتری و بیشترین غلظت و تجمع روی در ریشه تلقیح شده با همین تیمار میکروبی بدست آمد.



شکل۴- اثر تنش آلودگی و تلقیح میکروبی بر غلظت روی در اندام هوایی و ریشه یونجه (میلی‌گرم در کیلوگرم)

*ستون‌هایی که در یک حرف کوچک یکسان هستند از لحاظ آماری طبق آزمون دانکن، تفاوت معنی‌داری ندارند.

نتایج مندرج در شکل ۵ نشان می‌دهد که در شرایط آلوده به ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی‌گرم روی در کیلوگرم خاک، کلیه تیمارهای میکروبی با اثری مشابه، توانسته‌اند منجر به کاهش معنی‌دار مقدار انتقال روی از ریشه به اندام هوایی یونجه شوند و در بالاترین سطح آلودگی، تلقیح توآم قارچ و باکتری، کاهش ۵۴ درصدی مقدار فاکتور انتقال را نسبت به تیمار شاهد (عدم تلقیح میکروبی)، به خود اختصاص داد.



شکل ۵- اثر تنش آلودگی و تلقیح میکروبی بر فاکتور انتقال روی از ریشه به اندام هوایی یونجه

*ستون‌هایی که در یک حرف کوچک یکسان هستند از لحاظ آماری طبق آزمون دانکن، تفاوت معنی‌داری ندارند.

غلظت آهن، منگنز، مس و فسفر در اندام هوایی یونجه

نتایج مقایسه میانگین مندرج درجدول ۳ نشان می‌دهد که کاربرد سولفات روی در گیاهان شاهد (غیر-تلقیحی)، منجر به کاهش معنی‌دار (سطح یک درصد) غلظت آهن، منگنز، مس و فسفر گردید. طبق یافته‌های آندرسندر و کازگروو (۲۰۱۱) حد کفایت غلظت عناصر مس، منگنز، آهن و فسفر بر حسب میلی‌گرم در کیلوگرم ماده خشک گیاه یونجه به ترتیب برابر (۳۰-۳)، (۱۰۰-۲۰)، (۲۵۰-۳۰) و (۴۵/۲۵-۰/۰) است. از این رو، نتایج نشان داد که تحت شرایط آلوده، برخلاف کاهش غلظت عناصر تحت مطالعه در اندام هوایی گیاهان تلقیحی و غیرتلقیحی (شاهد)، غلظت کلیه عناصر به استثنای فسفر، در حد کفایت قرار داشته و آلودگی یونجه به سولفات روی، نتوانسته است اثرات مخربی ناشی از کمبود آنها در گیاه نشان دهد. در بین عناصر غذایی تحت مطالعه، تیمارهای میکروبی توانسته است از کاهش معنی‌دار غلظت فسفر و آهن گیاهی ممانعت کند و نقش مؤثری بر بهبود غلظت این عناصر در گیاهان تحت تنش آلودگی نشان دهند، بطوریکه در بالاترین سطح آلودگی روی (۸۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم)، کاربرد کلیه تیمارهای میکروبی با اثری یکسان، سبب افزایش ۸۶/۶ درصدی غلظت آهن و تلقیح انفرادی قارچ و توأم با باکتری، بطور میانگین، منجر به افزایش ۱۱۲/۵ درصدی غلظت فسفر گیاه شدند.

جدول ۳- مقایسه میانگین اثر تیمارهای روی و تلقیح میکروبی (قارچ S.indica و باکتری S.meliloti) بر غلظت فسفر، منگنز، آهن و مس یونجه (میلی‌گرم در کیلوگرم)

سطوح روی	تلقیح میکروبی				میانگین
	شاهد	قارچ	باکتری	قارچ و باکتری	
غلظت فسفر در اندام هوایی یونجه (میلی‌گرم در کیلوگرم)					
۰	۰/۱۷۷±۰/۰۰۸ d	۰/۲۸۸±۰/۰۰۵ ab	۰/۲۴۴±۰/۰۰۶ c	۰/۳۰۵±۰/۰۱۱ a	۰/۲۵۳ A
۴۰۰	۰/۱۶۸±۰/۰۱ d	۰/۲۹۰±۰/۰۰۱ ab	۰/۲۲۷±۰/۰۰۵ c	۰/۲۸۹±۰/۰۱ ab	۰/۲۴۳ A
۸۰۰	۰/۱۳۲±۰/۰۰۷ e	۰/۲۷۷±۰/۰۰۸ b	۰/۲۲۷±۰/۰۱۲ c	۰/۲۸۴±۰/۰۰۱ ab	۰/۲۳۰ B
میانگین	۰/۱۶۰ A	۰/۲۸۴ A	۰/۲۳۳ B	۰/۲۹۳ A	
غلظت منگنز در اندام هوایی یونجه (میلی‌گرم در کیلوگرم)					
۰	۷۸/۵۹±۲/۱ ab	۷۷/۰۲±۲/۴ ab	۷۹/۸±۰/۴ ab	۸۳/۵±۰/۵ a	۷۹/۷۳ A
۴۰۰	۵۸/۷±۵/۳ cd	۶۱/۴±۱۰/۸ bc	۵۲/۴۵±۱/۹ cd	۵۲/۸±۱۱/۹ cd	۵۶/۳۵ B
۸۰۰	۴۶/۶۶±۳/۸ cd	۳۹/۲۹±۲/۱ d	۳۹/۸±۹/۶ d	۴۰/۱±۱/۷ d	۴۱/۴۹ C
میانگین	۶۱/۳۴ A	۵۹/۲۴ A	۵۷/۳۶ A	۵۸/۸۳ A	
غلظت آهن در اندام هوایی یونجه (میلی‌گرم در کیلوگرم)					
۰	۸۴/۷۳±۳/۷ b	۹۴/۲۱±۳/۸ ab	۹۹/۴۷±۰/۴ a	۸۶/۳۱±۵/۹ b	۹۱/۱۸ A
۴۰۰	۴۷/۱۹±۳ d	۶۷/۸۹±۶/۱ c	۶۴/۰۳±۷/۲ c	۶۵/۲۶±۱/۹ c	۶۱/۰۹ B
۸۰۰	۲۹/۹۹±۱/۸ e	۵۶/۸۴±۱/۹ cd	۵۵/۵۲±۰/۵ cd	۵۵/۶۱±۵/۶ cd	۴۹/۴۹ C
میانگین	۵۳/۹۷ B	۷۲/۹۷ A	۷۳A	۶۹/۰۶A	
غلظت مس در اندام هوایی یونجه (میلی‌گرم در کیلوگرم)					
۰	۱۰/۶۱±۰/۶۴ bc	۱۱/۸۴±۰/۶۳ ab	۱۳/۵۹±۰/۶۳ a	۱۳/۱۴±۰/۴۴ a	۱۲/۳۰ A
۴۰۰	۹/۳۸±۰/۸۸ cd	۹/۲۱±۰/۳۵ cd	۸/۶۸±۰/۳۱ cd	۸/۵۱±۰/۴۶ d	۸/۹۵ B
۸۰۰	۸/۵۱±۰/۲۰ d	۷/۶۳±۰/۵۸ d	۷/۹۸±۰/۲۱ d	۸/۱۶±۰/۱۱ d	۸/۰۷ B
میانگین	۹/۵۰A	۹/۵۶ A	۱۰/۰۸ A	۹/۹۴ A	

اعداد دارای یک حرف مشترک از لحاظ آماری با آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد، فاقد اختلاف آماری معنی‌داری می‌باشند.

آنزیم‌های اکسیداتیو (کاتالاز، پراکسیداز، سوپراکسیددسموتاز)، پراکسیداسیون لیپیدی غشا (مالون‌دی‌آلدهید) و پراکسید هیدروژن

نتایج مندرج در جدول ۴ حاکی از آن است که، افزایش شدت تنش آلودگی، سبب تحریک سیستم فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و سوپراکسید دسموتاز و کاهش آنزیم کاتالاز شد. تحت شرایط آلوده، برخلاف اثر غیر معنی‌دار تلقیح میکروبی بر مقدار آنزیم سوپراکسیددسموتاز، تلقیح توأم قارچ و باکتری، منجر به افزایش معنی‌دار کاتالاز شد و در بالاترین سطح آلودگی (۸۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم)، کلیه تیمارهای میکروبی توانستند افزایش معنی‌داری در مقدار آنزیم پراکسیداز گیاهی نشان دهند. همانطور که در نتایج مقایسه میانگین-های پراکسیدهیدروژن و مالون‌دی‌آلدهید مشاهده می‌شود، متعاقباً با افزایش شدت تنش آلودگی و تجمع بیشتر مقدار پراکسیدهیدروژن در سلول‌های گیاهی، با تخریب بیشتر لیپیدهای غشایی و آزاد شدن مالون‌دی‌آلدهید همراه بود. بطوریکه کاربرد ۸۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم روی در گیاهان شاهد (بدون تلقیح میکروبی)، به ترتیب افزایش ۱۷۴ و ۶۵/۶ درصدی پراکسیدهیدروژن و مالون‌دی‌آلدهید مشاهده شد. تحت شرایط بهینه و بدون آلودگی (سطح صفر روی) تفاوت معنی‌داری در مقدار این دو متغیر بین گیاهان تلقیح شده و شاهد (عدم تلقیح میکروبی) بدست نیامد این در حالی است که با افزایش شدت تنش آلودگی، مقدار پراکسیدهیدروژن و متعاقباً مالون‌دی‌آلدهید گیاهان تلقیح شده کمتر از گیاهان شاهد (عدم تلقیح میکروبی) بود. البته، در این باره تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای میکروبی بدست نیامد و همگی در یک گروه آماری قرار داشتند و توانستند نقش مؤثری در کاهش تنش اکسیداتیو و آزادشدن پراکسید هیدروژن سلولی داشته باشند که طبیعتاً با کاهش تخریب غشای سلولی (مالون‌دی‌آلدهید) در گیاهان تحت تنش آلودگی به روی همراه بود.

pH خاک ریزوسفری

نتایج مندرج در جدول ۵ نشان می‌دهد که کاربرد روی نتوانسته است تفاوت معنی‌داری در مقدار پ‌هاش خاک ریزوسفری گیاهان شاهد و تلقیح شده با باکتری نشان دهد. این در حالی است که تلقیح انفرادی قارچ و توأم با باکتری با ارجحیت یکسان، کمترین مقدار پ‌هاش خاک ریزوسفری را به خود اختصاص دادند. بطوریکه، تلقیح انفرادی قارچ و توأم با باکتری در سطح ۴۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم نسبت به سطح صفر روی، به ترتیب با کاهش معنی‌دار ۰/۵۲ و ۰/۵۰ واحدی پ‌هاش و در سطوح بالاتر روی (۸۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم)، به ترتیب با کاهش معنی‌دار ۰/۵۵ و ۰/۶ واحدی پ‌هاش خاک ریزوسفری همراه بود.

بحث

آلودگی به عناصر سنگین یکی از عوامل تنش-زای محیطی غیر زنده است که می‌تواند با تأثیر بر برخی شاخص‌های رشدی گیاه از جمله وزن خشک اندام هوایی و ریشه، منجر به افت عملکرد گیاه شود. بطوریکه در بسیاری از تحقیقات، شاخص‌های رشدی، به عنوان معیاری جهت تحمل گیاهان در برابر عوامل تنش‌زای محیطی در نظر گرفته شده است.

جدول ۴- مقایسه میانگین اثر تیمارهای روی و تلقیح میکروبی (قارچ S.indica و باکتری S.meliloti) بر فعالیت آنزیم‌های اکسیداتیو، پراکسیدهیدروژن و مالون‌دی‌آلدهید اندام هوایی یونجه

سطوح روی	تلقیح میکروبی				میانگین
	شاهد	قارچ	باکتری	قارچ و باکتری	
آنزیم کاتالاز (میکرومول برگرم وزن تر در دقیقه)					
۰	۰/۱۴۷±۰/۰۰۲ d	۰/۲۸۳±۰/۰۰۷ ab	۰/۲۴۵±۰/۰۱۸ b	۰/۱۰۵±۰/۰۰۲ e	۰/۱۹۵ A
۴۰۰	۰/۱۱۱±۰/۰۰۳ de	۰/۱۹۷±۰/۰۰۶c	۰/۱۱۵±۰/۰۰۹ de	۰/۲۶۳±۰/۰۲۷ b	۰/۱۷۲ B
۸۰۰	۰/۰۵۸±۰/۰۰۳ f	۰/۱۸۴±۰/۰۲۱ c	۰/۰۸۲±۰/۰۱۳ ef	۰/۳۰۵±۰/۰۰۷ a	۰/۱۵۸ B
میانگین	۰/۱۰۶ C	۰/۲۲۱ A	۰/۱۴۷ B	۰/۲۲۴ A	
آنزیم پراکسیداز (میکرومول برگرم وزن تر در دقیقه)					
۰	۲/۱۱±۰/۲۱e	۴/۳۶±۰/۶۱ ac	۲/۴۳±۰/۱۱de	۳/۶۶±۰/۱۳ bd	۳/۱۴ B
۴۰۰	۳/۵۹±۰/۶۶ bd	۴/۷۸±۰/۲۸ ac	۴/۶۴±۰/۴۱ ac	۴/۹۳±۰/۳۱ ab	۴/۴۹ A
۸۰۰	۳/۳۹±۰/۲۶ ce	۵/۲۵±۰/۵۱ a	۴/۹۷±۰/۷۱ ab	۵/۴۷±۰/۲۳ a	۴/۷۷ A
میانگین	۳/۰۳ B	۴/۸ A	۴/۰۱ A	۴/۶۸ A	
آنزیم سوپراکسیددسموتاز (میکرومول برگرم وزن تر در دقیقه)					
آنزیم سوپراکسیددسموتاز					
۰	۰/۲۶±۰/۲۱ bd	ac۰/۳۱۶±۰/۰۰۹	۰/۲۳۲±۰/۰۲۲ cd	۰/۱۸۳±۰/۰۲۹ d	۰/۲۴۸ B
۴۰۰	۰/۲۹۵±۰/۰۳۷ ac	۰/۲۷۳±۰/۰۲۲ad	ac ۰/۲۹۵±۰/۰۶۸	۰/۳۶±۰/۰۰۵ a	۰/۳۰۶ A
۸۰۰	۰/۳۵۵±۰/۰۰۹ ab	۰/۳۶۶±۰/۰۰۶ a	۰/۳۱۳±۰/۰۲۶ ac	۰/۲۹۸±۰/۰۳۰ ac	۰/۳۳۳ A
میانگین	۰/۳۰۳A	۰/۳۱۸ A	۰/۲۸ A	۰/۲۸ A	
پراکسیدهیدروژن (میکرو مول برگرم وزن تر گیاه)					
۰	۱/۹۷±۰/۲۱ cd	۱/۷۱±۰/۱۴ cd	۱/۸۱±۰/۲۰ cd	۱/۷۱±۰/۱۴ cd	۱/۸ B
۴۰۰	۳/۱۳±۰/۲۲ b	۲/۰۲±۰/۲۵ cd	۲/۱۳±۰/۳۲ c	۲/۱۱±۰/۳۰ c	۲/۳۵ A
۸۰۰	۵/۴±۰/۴۱ a	۱/۷۷±۰/۳۴ cd	۱/۹۸±۰/۳۲ cd	۱/۷۰±۰/۰۴۷ d	۲/۵۸ A
میانگین	۳/۵A	۱/۸۳ B	۱/۹۷ B	۱/۶۶ B	
مالون‌دی‌آلدهید (نانو مول برگرم وزن تر گیاه)					
۰	۷/۱۵±۱/۰۹ bc	۶/۱۸±۰/۲۴ c	۶/۳۴±۰/۱۸ c	۵/۳±۰/۳۴ c	۶/۲۴ B
۴۰۰	۱۰/۱۵±۱/۳۵ ab	۵/۴۱±۱/۰۷ c	۷/۸±۱/۷۱ bc	۶/۲۷ ±۰/۴۸ c	۷/۴۱ AB
۸۰۰	۱۱/۸۴±۰/۶۸ a	۷/۵۶±۱/۱۴ bc	۸/۲۸±۱/۱۸ bc	۶/۹۱±۰/۶۵ c	۸/۶۵ A
میانگین	۹/۷۱ A	۶/۳۸ B	۷/۴۷ B	۶/۱۶ B	

اعداد دارای یک حرف مشترک از لحاظ آماری با آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد، فاقد اختلاف آماری معنی‌داری می‌باشند.

جدول ۵- مقایسه میانگین اثر تیمارهای روی و تلقیح میکروبی (قارچ S.indica و باکتری S.meliloti) بر پ‌هاش خاک ریزوسفری

سطوح روی - سولفات روی (میلی‌گرم در کیلوگرم)	تلقیح میکروبی				میانگین
	شاهد	قارچ	باکتری	قارچ و باکتری	
	پ‌هاش				
۰	۸/۲۲ a	۸/۱۶ a	۸/۱۹ a	۸/۱۶ a	۸/۱۸ A
۴۰۰	۸/۰۹ b	۷/۶۴ d	۸/۰۳ bc	۷/۶۶ d	۷/۸۵ B
۸۰۰	۸/۰۷ bc	۷/۶۱ de	۸/۰۱ c	۷/۵۶ e	۷/۸۱ C
میانگین	۸/۱۲ A	۷/۸۰ C	۸/۰۷ B	۷/۷۹ C	

اعداد دارای یک حرف مشترک از لحاظ آماری با آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد، فاقد اختلاف آماری معنی‌داری هستند.

گیاه یونجه بدلیل توسعه سیستم ریشه‌ای قوی، زیست توده بالا و همزیستی ریزوبیومی به عنوان یک گیاه مناسب در گیاه‌پالایی استفاده می‌شود (سپهری و خطابی، ۲۰۲۰) که در این تحقیق، علاوه بر اثر باکتری S.melilot ، تأثیر قارچ S.indica و تلقیح توأم قارچ و باکتری در سطوح بالای سولفات روی در ریزوسفر یونجه مورد بررسی قرار گرفت. طبق نتایج این تحقیق، با افزایش شدت تنش آلودگی از سطح ۴۰۰ به ۸۰۰ میلی‌گرم درکیلوگرم، افت شدید و معنی‌دار وزن خشک ریشه گیاهان نسبت به اندام هوایی مشاهده شد که می‌توان آن را معلول سطح بالای آلودگی و تماس مستقیم ریشه با آلاینده دانست. روی به عنوان عنصر ضروری در تغذیه گیاه نقش مهمی دارد اما در غلظت‌های بالا می‌تواند اثرات بازدارنده‌ای بر رشد گیاه داشته باشد (گراتائو و همکاران، ۲۰۰۵). البته pH خاک، در قابلیت دسترسی روی به بافت‌های گیاهی تأثیر زیادی دارد. خاک ریزوسفری در مقایسه با خاک توده، خصوصیات بیولوژیکی و شیمیایی متفاوتی در قابلیت دسترسی و جذب فلزات سنگین به عهده دارد (متقیان و حسین‌پور، ۲۰۱۳) که این تغییرات عمدتاً ناشی از تغییرات pH خاک از طریق ترشحات ریشه‌ای و میکروبی و یا ترکیب آنها است (کلمنت و همکاران، ۲۰۱۰). نتایج نشان داد که با کاهش pH خاک ریزوسفری در گیاهان تلقیح یافته علی الخصوص تلقیح انفرادی قارچ و توأم با باکتری، مقدار جذب روی در ریشه گیاه افزایش یافته است. تحقیقات نشان داده است که یکی از دلایل کاهش pH خاک ریزوسفری گیاهان تلقیحی با قارچ، ناشی از افزایش زیست‌توده ریشه و طبیعتاً افزایش ترشحات اسیدهای آلی بدلیل افزایش تولید ایندول ۳ استیک اسید (استرهمل و همکاران، ۲۰۱۶) و یا تولید بیشتر اتیلن (خطابی و همکاران، ۲۰۱۲) و یا جذب بیشتر یون آمونیم نسبت به یون نیترات و تثبیت بیولوژیکی بیشتر نیتروژن (هینسینگر و همکاران، ۲۰۰۳) در این گیاهان است که با اسیدی شدن خاک ریزوسفری همراه است. کاربرد کلیه تیمارهای میکروبی به‌ویژه در سطوح بالای روی، توانست بطور معنی‌داری از افت بیشتر وزن خشک اندام هوایی و ریشه بکاهد که مشابه با یافته‌های (آریاگادا و همکاران، ۲۰۰۵; کانوال و همکاران، ۲۰۱۶) است. همانطور که اشاره شد، تلقیح میکروبی با کاهش pH خاک و افزایش قابلیت دسترسی عناصر، منجر به جذب تجمع بیشتر روی در ریشه و غیر متحرک کردن آن در گره‌های باکتری (هائو و همکاران، ۲۰۱۴) و میسیلیوم قارچی (کانوال و همکاران، ۲۰۱۶) می‌شود و بدین ترتیب با کاهش انتقال روی از ریشه به اندام هوایی، تا حدی از اثرات سمیت روی در اندام هوایی گیاه کاهش می‌دهد.

در مقایسه بین تیمارهای میکروبی، تلقیح توأم قارچ و باکتری و در مرحله بعد تلقیح قارچ، بهتر از تلقیح باکتری، در افزایش تحمل گیاه در برابر عوامل تنش‌زای محیطی موفق بود. برخلاف افزایش وزن خشک اندام هوایی گیاه تلقیح یافته با باکتری در شرایط بهینه (عدم آلودگی)، کاربرد سطوح بالای سولفات روی، منجر به کارایی کمتر این باکتری نسبت به سایر تیمارهای میکروبی گردید. بطوریکه، در گیاهان تلقیح شده با باکتری همانند گیاهان بدون تلقیح، بیشترین تجمع روی در اندام هوایی گیاه مشاهده شد.

افزایش سطوح بالای روی، منجر به کاهش معنی‌دار غلظت آهن، منگنز، مس و فسفر گیاهان شاهد و تلقیح یافته گردید، به استثنای فسفر، غلظت سایر عناصر غذایی تحت مطالعه در محدوده نرمال و کفایت گیاه قرار داشت. بنابراین، افزایش سطوح روی، نتوانست اثرات قابل توجهی از کمبود آهن، منگنز و مس در گیاه نشان دهد و کمبود فسفر، تنها در گیاهان شاهد (تلقیح نیافته) و آلوده به سطوح بالای سولفات روی بدست آمد، که می‌توان آن را ناشی از اثرات آنتاگونیستی سطوح بالای روی در ایجاد اختلال در جذب فسفر گیاه دانست. در بررسی اثر تیمارهای میکروبی، تلقیح توأم قارچ و باکتری، با بهبود جذب فسفر، منجر به حمایت بیشتر گیاه در برابر تنش کمبود فسفر شد. تحقیقات نشان داد که افزایش مقدار

فسفر در گیاهان تلقیح یافته ناشی از افزایش جذب ازطریق ساختار میکوریزی بوده که شامل آربسکول‌ها و وزیکول‌ها است (اسمیت و رید، ۱۹۹۷).

آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نقش مهمی در افزایش مکانیسم دفاعی در برابر تولید گونه‌های اکسیژن فعال به عهده دارند (فویر و همکاران، ۲۰۰۵). طبق نتایج این تحقیق، تلقیح میکروبی در شرایط آلوده به سولفات روی، با افزایش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز، کاهش مقدار مالون‌دی‌آلدهید و همچنین تجمع بیشتر روی در ریشه گیاه و کاهش انتقال روی از ریشه به اندام هوایی یونجه و جذب بهتر عناصر غذایی به‌ویژه آهن و فسفر، توانسته است گیاه را در برابر صدمات ناشی از سمیت روی محافظت کند که این یافته مشابه با نتایج باندیوپادیای و همکاران (۲۰۱۵) است.

نتیجه‌گیری

نتایج نشان داد که، عامل اصلی کاهش وزن خشک اندام هوایی و ریشه گیاه ناشی از اثرات سمیت روی و انتقال آن به بافت‌های هوایی گیاه است که با تنش‌های اکسیداتیو و نهایتاً پراکسیداسیون لیپیدی غشا همراه بود. در بین تیمارهای میکروبی، تلقیح توأم قارچ و باکتری با بهبود جذب بیشتر عناصر غذایی (فسفر و آهن)، افزایش بیشتر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، به‌ویژه آنزیم کاتالاز، توانسته است با خنثی کردن اکسیژن‌های فعال سلولی، سبب تعدیل اثرات سمیت روی در گیاه شود.

سپاسگزاری

بدین وسیله از بخش علوم خاک و باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز جهت در اختیار قراردادن تجهیزات آزمایشگاهی و فضای گلخانه، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌گردد.

فهرست منابع

۱. امامی، آ. ۱۳۷۵. روش‌های تجزیه شیمیایی گیاه (جلد اول) نشریه شماره ۹۸۲، وزارت جهاد کشاورزی، موسسه تحقیقات خاک و آب، تهران، ایران.

۲. علی احیایی، م. و بهبهانی‌زاده، ع. آ. ۱۳۷۲. روش‌های تجزیه شیمیایی خاک وآب (جلد اول) نشریه شماره۸۹۳، وزارت جهاد کشاورزی، موسسه تحقیقات خاک و آب، تهران، ایران.

3. Ajina, T. Sallem, A. Haouas, Z. and Mehdi, M. 2017. Total antioxidant status and lipid peroxidation with and without in vitro zinc supplementation in infertile men. Andrologia 49(7): e12703.
4. Arriagada, C.A. Herrera, M.A. and Ocampo, J.A. 2005. Contribution of arbuscular mycorrhizal and saprobe fungi to the tolerance of Eucalyptus globulus to Pb. Water Air Soil Pollution 166:31-47.
5. Bandyopadhyay, S. Plascencia-Villa, G. Mukherjee, A. Rico, C.M. José-Yacamán, M. Peralta-Videa, J.R. and Gardea-Torresdey, J.L. 2015. Comparative phytotoxicity of ZnO NPs, bulk ZnO, and ionic zinc onto the alfalfa plants symbiotically associated with Sinorhizobium meliloti in soil. Science of the Total Environment 515: 60-69.
6. Beauchamp, C. and Fridovich, I. 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. Analytical biochemistry 44(1): 276-287.
7. Bhagwat, D.A. Killedar, S.G. and Adnaik, R.S. 2008. Anti-diabetic activity of leaf extract of Tridax procumbens. International Journal of Green Pharmacy 2(2).
8. Chakmak, I. 2000. Possible roles of zinc in protecting plant cells from damage by reactive oxygen. New Phytologist 146: 185-205.
9. Chance, B. and Maehly, A. C. 1955. [136] Assay of catalases and peroxidases. Methods in enzymology 2: 764-775.

10. Dary, M. Chamber-Pérez, M.A. Palomares, A. J. and Pajuelo, E. 2010. "In situ" phytostabilisation of heavy metal polluted soils using Lupinus luteus inoculated with metal resistant plant-growth promoting rhizobacteria. Journal of Hazardous Materials 177(1-3): 323-330.
11. Dickson, S. and Smith S.E .1998. Evaluation of vesicular-arbuscular mycorrhizal colonisation by staining. P. 77-83. In: Varma A (ed) Mycorrhiza manual, Springer-Verlag, Berlin.
12. Fagorzi, C., Checcucci, A., DiCenzo, G. C., Debiec-Andrzejewska, K., Dziewit, L., Pini, F., & Mengoni, A. (2018). Harnessing rhizobia to improve heavy-metal phytoremediation by legumes. Genes, 9(11), 542.
13. Farzaneh, M. Wichmann, S. Vierheilig, H. and Kaul, H.P. 2009. The effects of arbuscular mycorrhiza and nitrogen nutrition on growth of chickpea and barley. Pflanzenbauwissenschaften 13: 15–22.
14. Foyer, C.H. and Noctor, G. 2005. Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. Plant Cell Environment 28:1056-1071.
15. Glick, B.R. 2010. Using soil bacteria to facilitate phytoremediation. Biotechnology Advances 28:367-374.
16. Gratao, P. Polle, A. Lea, P. Azevedo, R. 2005. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. Funct Plant Biol 32:481-494.
17. Hao, X. Taghavi, S. Xie, P. Orbach, M. J. Alwathnani, H. A. Rensing, C. and Wei, G. 2014. Phytoremediation of heavy and transition metals aided by legume-rhizobia symbiosis. International Journal of Phytoremediation 16(2):179-202.
18. Hao, X. Xie, P. Johnstone, L. Miller, S. J. Rensing, C. and Wei, G. 2012. Genome sequence and mutational analysis of plant-growth-promoting bacterium Agrobacterium tumefaciens CCNWGS0286 isolated from a zinc-lead mine tailing. Applied and Environmental Microbiology 78(15):5384-5394.
19. Hashem, A. Abd_Allah, E.F. Alqarawi, A.A. Al Huqail, A.A. Egamberdieva, D. and Wirth, S. 2016. Alleviation of cadmium stress in Solanum lycopersicum L. by arbuscular mycorrhizal fungi via induction of acquired systemic tolerance. Saudi journal of Biological Sciences 23(2):272-281.
20. 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(1):189-198.
21. Hinsinger, P. Plassard, C. Tang, C. and Jaillard, B. 2003. Origins of root-mediated pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints: a review. Plant and Soil 248(1):43-59.
22. Kanwal, S. Bano, A. and Malik, R. N. 2016. Role of arbuscular mycorrhizal fungi in phytoremediation of heavy metals and effects on growth and biochemical activities of wheat (Triticum aestivum L.) plants in Zn contaminated soils. African Journal of Biotechnology 15(20):872-883.
23. Khatabi, B. Molitor, A. Lindermayr, C. Pfiffi, S. Durner, J. Von Wettstein, D. ... and Schäfer, P. 2012. Ethylene supports colonization of plant roots by the mutualistic fungus Piriformospora indica. PLoS One 7(4):e35502.
24. Kidd, P.S. Alvarez-Lopez, V. Becerra-Castro, C. Cabello-Conejo, M. and Prieto-Fernandez, A. 2017. Potential role of plant-associated bacteria in plant metal uptake and implications in phytotechnologies. p. 87-126. In: Advances in botanical research, Academic Press.
25. Liu, Y.A.N.G. Jin-Li, C.A.O. Zou, Y.N. Qiang-Sheng, W.U. and Kamil, K.U.Č.A. 2020. Piriformospora indica: a root endophytic fungus and its roles in plants. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca 48(1): 1-13.

26. Motaghian, H.R. and Hosseinpur, A.R. 2013. Zinc desorption kinetics in wheat (Triticum Aestivum L.) rhizosphere in some sewage sludge amended soils. Journal of soil science and plant nutrition 13(3):664-678.
27. Ozden, M. Demirel, U. and Kahraman, A. 2009. Effects of proline on antioxidant system in leaves of grapevine (Vitis vinifera L.) exposed to oxidative stress by H2O2. Scientia Horticulturae 119(2):163-168.
28. Pandey, N. Pathak, G. C. Pandey, D. K. and 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(2):103-111.
29. Peralta-Videa, J.R. De la Rosa, G. Gonzalez, J H. and Gardea-Torresdey, J.L. 2004. Effects of the growth stage on the heavy metal tolerance of alfalfa plants. Advances in Environmental Research 8(3-4):679-685.
30. Peškan-Berghöfer, T. Shahollari, B. Giong, P.H. Hehl, S. Markert, C. Blanke, V. ... and Oelmüller, R. 2004. Association of Piriformospora indica with Arabidopsis thaliana roots represents a novel system to study beneficial plant–microbe interactions and involves early plant protein modifications in the endoplasmic reticulum and at the plasma membrane. Physiologia Plantarum 122(4):465-477.
31. Saleem, M. Meckes, N. Pervaiz, Z. H. and Traw, M.B. 2017. Microbial interactions in the phyllosphere increase plant performance under herbivore biotic stress. Frontiers in microbiology 8: 41.
32. Sepehri, M. and Khatabi, B. 2020. Combination of Siderophore-Producing Bacteria and Piriformospora indica Provides an Efficient Approach to Improve Cadmium Tolerance in Alfalfa. Microbial Ecology 1-14.
33. Shah, V. and Belozerova, I. 2009. Influence of metal nanoparticles on the soil microbial community and germination of lettuce seeds. Water, Air, and Soil Pollution 197(1-4):143-148.
34. Smith, S.E. and Read, D.J. 1997. Mycorrhizal Simbiosis. Academic Press, London
35. Strehmel, N. Mönchgesang, S. Herklotz, S. Krüger, S. Ziegler, J. and Scheel, D. 2016. Piriformospora indica stimulates root metabolism of Arabidopsis thaliana. International Journal of Molecular Sciences 17(7):1091.
36. Tang, Y.T. Qiu, R.L. Zeng, X.W. Ying, R.R. Yu, F.M. and Zhou, X.Y. 2009. Lead, zinc, cadmium hyperaccumulation and growth stimulation in Arabis paniculata Franch. Environmental and Experimental Botany 66(1):126-134.
37. Undersander, D. and Cosgrove, D. 2011. Alfalfa management guide. American Society of Agronomy Crop Science Society of America Soil Science Society of America.
38. Varma, A. Bakshi, M. Lou, B. Hartmann, A. and Oelmueller, R. 2012. Piriformospora indica: a novel plant growth-promoting mycorrhizal fungus. Agricultural Research 1(2):117-131.
39. Wang, C. Zhang, S.H. Wang, P.F. Hou, J. Zhang, W.J. Li, W. and Lin, Z.P. 2009. The effect of excess Zn on mineral nutrition and antioxidative response in rapeseed seedlings. Chemosphere 75(11):1468-1476.
40. Weiss, M. Selosse, M.A. Rexer, K.H. Urban, A. and Oberwinkler, F. 2004. Sebacinales: a hitherto overlooked cosm of heterobasidiomycetes with a broad mycorrhizal potential. Mycological Research 108(9):1003-1010.
41. Yadav, V. Kumar, M. Deep, D.K. Kumar, H. Sharma, R. Tripathi, T. and Johri, A.K. 2010. A phosphate transporter from the root endophytic fungus Piriformospora indica plays a role in phosphate transport to the host plant. Journal of Biological Chemistry 285(34):26532-26544.
42. Youssef, R.A. and Chino, M. 1989. Root-induced changes in the rhizosphere of plants. II. Distribution of heavy metals across the rhizosphere in soils. Soil Science and Plant Nutrition 35(4):609-621.

43. Zarea, M. J. Chordia, P. and Varma, A. 2013. Piriformospora indica versus salt stress. p. 263-281. In Piriformospora indica. Springer, Berlin, Heidelberg.
44. Zuccaro, A. Basiewicz, M. Zurawska, M. Biedenkopf, D. and Kogel, K.H. 2009. Karyotype analysis, genome organization, and stable genetic transformation of the root colonizing fungus Piriformospora indica. Fungal Genetics and Biology 46(8):543-550.

Effect of Serendipita indica and Sinorhizobium meliloti on alfalfa plant growth (Medicago sativa L.) in a calcareous soil contaminated with zinc

L. Tabande*, M. Sepehri and M. Zarei

Ph.D., Soil and Water Research Department, Fars Agricultural and Natural Resources Research Center, AREEO, Shiraz, Iran; E-mail: **ltabande@gmail.com**
Assistant. Professor. Department of Soil Science, College of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran; E-mail: **m.sepehri@yahoo.com**
Associate Professor. Department of Soil Science, College of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran; E-mail: **m.zarei@yahoo.com**

Received June, 2022 and Accepted November, 2022

Abstract

Heavy metal accumulation in soils has been become one of the most dangerous environmental issues in human societies. The use of a cheap and safe technology such as phytoremediation with a proper symbiosis between plants and plant growth-promoting microorganisms, can be an effective step in phytoremediation technology. In the present study, the effects of individual and combined inoculation of Serendipita indica and Sinorhizobium meliloti on alfalfa grown in a contaminated soil with different concentrations of zinc (0, 400 and 800 mg kg−1 soil) were investigated. The results showed that the highest level of zinc contamination led to a significant decrease of 53.3%, 71%, 25.2% and 60.2 of shoot and root dry weight, Phosphorus concentration, and plant catalase enzyme respectively, it was also associated with an increase of 174.5, 56.6, 60.2 and 36.6% in the amount of hydrogen peroxide, malondialdehyde, peroxidase and superoxide desmutase enzymes. The combined inoculation of fungi and bacteria increased phosphorus absorption in the plant. In addition, this treatment reduced the transfer of zinc from the roots to the shoots and stimulated the system of plant oxidative enzymes such as catalase and reduced the amount of hydrogen peroxide and malondialdehyde, which increased the growth characteristics of the plant. Therefore, the combined inoculation of fungi and bacteria has an important role in alfalfa plant nutrition by reducing the pH of the rhizosphere soil and increasing the Zn absorption and increasing the Zn stabilization in alfalfa roots.

Keywords: Oxidative enzymes, Plant stabilization, Transfer factor, Malondialdehyde

* - Corresponding author's email: ltabande@gmail.com