



## تأثیر قارچ‌های آربوسکولار بر ویژگی‌های رشد و گره‌بندی گیاه یونجه با باکتری سینوریزوبیوم ملیوتنی در یک خاک آلوده به سرب

ستاره امانی‌فر<sup>1</sup>، ناصر علی‌اصغرزاد<sup>2</sup>، نصرت‌اله نجفی<sup>3</sup>، شاهین اوستان<sup>4</sup>، صاحبعلی بلندنظر<sup>5</sup>

1- دانشجوی دکتری بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

2,3,4- استاد، استادیار و دانشیار گروه خاکشناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

5- استادیار گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

[Amanifar.s@gmail.com](mailto:Amanifar.s@gmail.com)

### چکیده

همزیستی میکوریزی نه تنها در تغذیه معدنی گیاهان نقش دارد بلکه مقاومت گیاه را به تنش‌های محیطی از جمله آلودگی فلزات سنگین بهبود می‌بخشد. در این تحقیق تأثیر همزیستی با دو گونه قارچ گلوبوس اینترادیسز و گلوبوس موسه بر شاخص‌های رشد و گره‌بندی در گیاه یونجه در شرایط گلخانه‌ای مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش به صورت فاکتوریل شامل چهار سطح سرب (0، 200، 400 و 600 میلی‌گرم سرب بر کیلوگرم خاک) و سه سطح قارچ (دو گونه میکوریز و شاهد غیرمیکوریز) با چهار تکرار انجام شد. برای ایجاد تیمارهای سرب از نمک نترات سرب استفاده شد. بذور یونجه به‌طور یکنواخت با باکتری سینوریزوبیوم ملیوتنی تلقیح شدند. نتایج نشان داد تلقیح گیاه یونجه با هر دو گونه قارچ میکوریز، سبب تقویت همزیستی ریزوبیومی در غلظت‌های بالای سرب خاک گردید. همچنین در سطوح سمی سرب وزن خشک گیاهان، سطح برگ و شاخص کلروفیل گیاهان یونجه تلقیح شده با هر دو گونه قارچی، به‌طور معنی‌داری در مقایسه با گیاهان غیرمیکوریزی افزایش یافت.

کلمات کلیدی: سرب، ریزوبیوم، گره‌بندی، میکوریز آربوسکولار، یونجه

### مقدمه

غلظت‌های بالای فلزات سنگین سبب اختلال در متابولیسم گیاه می‌شود و آثار حاصل از آن بسته به نوع فلز سنگین، نوع گیاه و شرایط محیطی در هنگام وقوع تنش، متفاوت است. پر واضح است که سمیت فلزات سنگین وابسته به زیست‌فراهمی آنها است. در خاک‌های آلوده به فلزات سنگین، حضور ریزجاندارانی مانند قارچ‌های میکوریز آربوسکولار<sup>1</sup> در ریزوسفر، می‌تواند قابلیت دسترسی و سمیت فلزات سنگین را برای گیاه تغییر دهد و نقش اکولوژیک قابل توجهی در تثبیت فلزات سنگین توسط گیاه<sup>2</sup> در خاک‌های آلوده به این فلزات با ایجاد کمپلکس‌های نامحلول، ایفا کند و به نوبه خود به بقای گیاهان میکوریزی کمک کند (بیرو و تاکاس 2007). تأثیر فلزات سنگین بر همزیستی ریزوبیومی در لگوم‌هایی مثل یونجه بسته به نوع فلز سنگین، غلظت و زمان در معرض قرارگیری متفاوت خواهد بود (پادپال و همکاران 2007). فلزات سنگین به‌دلیل آثار بازدارنده‌ای که بر رشد و فعالیت باکتری‌های ریزوبیوم و گیاهان

<sup>1</sup>. Arbuscular mycorrhizae

2. Phytostabilization



میزبان آنها دارند، گره‌بندی و تثبیت نیتروژن سیستم‌های همزیست را به‌طور منفی تحت تأثیر قرار می‌دهند (پادیل و همکاران 2007؛ وسپر و همکاران 1977).

## مواد و روشها

برای انجام این تحقیق از یک خاک شنی نمونه‌برداری شده از عمق 0-20 سانتی‌متر، استفاده شد. خاک پس از گذراندن از غربال چهار میلی‌متری، به مدت چهار ساعت در داخل اتوکلاو (دمای  $121^{\circ}\text{C}$  و فشار 1/5 بار) استریل گردید و به گلدانهای پلاستیکی (1/5 کیلوگرم خاک در هر گلدان) منتقل شد. سطوح غلظت سرب شامل صفر، 200، 400، 600 میلی‌گرم سرب بر کیلوگرم خاک (به ترتیب  $\text{Pb}_0$ ،  $\text{Pb}_1$ ،  $\text{Pb}_2$  و  $\text{Pb}_3$ ) در خاک استریل بود (آن 2006؛ لاگروورف و همکاران 1973). نمک نیترات سرب لازم را در آب مقطر لازم برای رسیدن به حد رطوبت FC حل کرده و پس از گذراندن از فیلتر 0/45 میکرومتر به خاک اسپری شد و برای رسیدن به حالت تعادل، دو هفته در کیسه‌های پلاستیکی با حفظ رطوبت FC نگهداری شد. همچنین جهت یکسان سازی اثر نیترات، با در نظر گرفتن بیشترین تیمار سرب، غلظت‌های برابر از نیترات با استفاده از نمک نیترات سدیم در همه تیمارها ایجاد شد. بذور یونجه (*Medicago sativa* L.) پس از ضدعفونی سطحی، جوانه‌دار شدند. 50 گرم مایه تلقیح (شامل خاک رابزوسفری محتوی ریشه‌های میکوریزی، هیف‌های خارج ریشه‌ای و اسپورها) دو گونه قارچ گلموس اینترادایسز<sup>3</sup> و گلموس موسه<sup>4</sup> (به ترتیب Gi و Gm) با خاک سطحی گلدان‌ها مخلوط گردید (علی‌اصغرزاد و همکاران 2001). بذور یونجه جوانه‌دار، با مقدار معین از سوسپانسیون باکتری سینوریزوبیوم ملیلوتی<sup>5</sup> آغشته شد (یک میلی‌لیتر سوسپانسیون باکتری با جمعیت  $10^9$  سلول در هر میلی‌لیتر سوسپانسیون) و در عمق مناسب در گلدان‌ها کاشته شد (رائی‌پور و علی‌اصغرزاده 1386). در مورد گیاهان شاهد غیرمیکوریزی، همان مقدار مایه تلقیح قارچی استریل شده در اتوکلاو اضافه گردید. 100 روز پس از رشد، شاخص کلروفیل با دستگاه کلروفیل سنچ Spad-502 اندازه‌گیری و گیاهان برداشت شده و سطح برگ آنها تعیین شد. ریشه‌ها با آب فراوان شستشو شدند و درصد کلونیزاسیون تعیین شد (لیونگ و همکاران 2007). همچنین گره‌ها جداسازی و پس از خشک شدن (آون 80 درجه، 48 ساعت) به‌همراه سایر نمونه‌های گیاهی توزین شدند. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار MSTATC انجام شد.

## نتایج و بحث

نتایج نشان‌دهنده این امر است که در سطوح بالای سرب، همزیستی میکوریزی با هر دو گونه قارچی به‌طور معنی‌داری سبب افزایش وزن خشک گره گردیده است ولی در سطوح  $\text{Pb}_0$  و  $\text{Pb}_1$  تفاوتی بین گیاهان میکوریزی و غیر میکوریزی وجود ندارد (شکل 1). برخی محققان (کاسلا و همکاران 1988) اظهار داشته‌اند که باکتری‌های ریزوبیوم بر اثر سمیت فلزات سنگین، پلاسمید مربوط به گره‌بندی را از دست می‌دهند. بررسی‌ها نشان داده است گره‌بندی باکتری‌های تثبیت‌کننده نیتروژن و برقراری همزیستی میکوریزی حالت سینرژستی دارد و باکتری‌های تثبیت‌کننده نیتروژن علاوه بر تأمین نیتروژن برای گیاه، در رساندن نیتروژن به قارچ نیز نقش دارند (صالح‌القرنی 2006؛ آندراد و همکاران 2004). از دیگر دلایل اثر سینرژستی، می‌تواند تأمین فسفات توسط قارچ برای باکتری‌های تثبیت‌کننده نیتروژن در

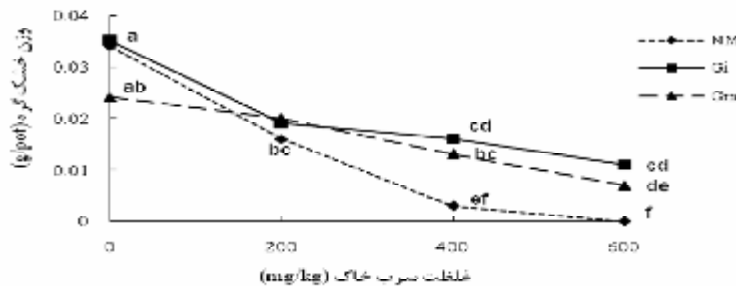
<sup>1</sup> *Glomus intraradices*

<sup>2</sup> *Glomus mosseae*

<sup>3</sup> *Sinorhizobium meliloti*



گره باشد. از طرف دیگر میزان گره‌بندی با ظرفیت فتوسنتزی گیاه و تشکیل مقادیر کافی از ترکیبات کربنی متناسب است، زیرا تثبیت نیتروژن فرآیندی است که نیاز به صرف مقادیر زیادی از مواد کربنی انرژی‌زا دارد (وانس و گانت 1992). با توجه به این مسئله می‌توان نتیجه گرفت که گیاهان میکوریزی به دلیل برخورداری از شرایط بهتر رشدی در مقایسه با گیاهان غیرمیکوریزی، میزان گره‌بندی بیشتری در سیستم ریشه‌ای دارند. همانطور که در جدول 1 مشاهده می‌شود شاخص‌های رشدی یونجه میکوریزی، به‌ویژه در سطوح بالای سرب، به‌طور معنی‌داری بیش از گیاهان غیر میکوریزی است. در این آزمایش نقش حمایتی قارچ Gi از گیاه یونجه در کلیه سطوح سرب کاملاً روشن بود. بالا بودن وزن خشک، شاخص کلروفیل و سطح برگ‌های گیاهان میکوریزی در مقایسه با گیاهان غیرمیکوریزی به‌ویژه در سطوح



شکل 1- اثر برهمکنش سطوح سرب و تیمارهای قارچی بر وزن خشک گره‌ها (NM، Gi و Gm به ترتیب شاهد غیر میکوریزی، گلوموس اینترارادیسز و گلوموس موسه).

$Pb_3$  و  $Pb_2$  عمدتاً به دلیل انتشار میسلیوم قارچ‌های AM و تشکیل یک سیستم جذب اضافی به صورت مکمل سیستم ریشه‌ای گیاه و تولید هورمون‌های محرک رشد گیاه مانند اکسین و سیتوکینین می‌باشد و همین امر سبب بهبود تغذیه و تقویت رشد گیاهان میکوریزی می‌گردد (نثومن و گیوگ 2004). تغذیه بهتر فسفر به عنوان یک عامل مهم، سبب رشد بهتر گیاهان میکوریزی می‌گردد و بطور کلی به نظر می‌رسد گیاهان میکوریزی شانس بیشتری برای بقا و رشد در شرایط خاک‌های آلوده به فلز سنگین داشته باشند (آندراد و همکاران 2004).  
جدول 1- تاثیر کلونیزاسیون میکوریزی و سطوح سرب بر سطح برگ‌ها، شاخص کلروفیل، وزن خشک ریشه‌ها و بخش هوایی.

درصد کلونیزاسیون ریشه‌ها	وزن خشک بخش هوایی (g pot <sup>-1</sup> )	شاخص کلروفیل	سطح برگ‌ها (cm <sup>2</sup> pot <sup>-1</sup> )	گونه قارچی	سطوح سرب
0/00 <sup>c</sup>	3/485 <sup>b</sup>	56/47 <sup>a</sup>	409/214 <sup>bc</sup>	NM	
40/68 <sup>a</sup>	4/91 <sup>a</sup>	58/35 <sup>a</sup>	634/94 <sup>a</sup>	Gi	Pb <sub>0</sub>
26/90 <sup>bc</sup>	3/265 <sup>bc</sup>	54/15 <sup>a</sup>	391/49 <sup>bcd</sup>	Gm	
0/00 <sup>c</sup>	2/307 <sup>de</sup>	55/20 <sup>a</sup>	294/78 <sup>def</sup>	NM	
38/58 <sup>a</sup>	2/820 <sup>cd</sup>	58/7 <sup>a</sup>	440/98 <sup>ab</sup>	Gi	Pb <sub>1</sub>
20/57 <sup>cd</sup>	2/365 <sup>dc</sup>	54/62 <sup>a</sup>	307/33 <sup>cde</sup>	Gm	
0/00 <sup>c</sup>	1/415 <sup>f</sup>	41/92 <sup>c</sup>	141/28 <sup>g</sup>	NM	
30/15 <sup>ab</sup>	2/258 <sup>e</sup>	56/57 <sup>a</sup>	260/99 <sup>ef</sup>	Gi	Pb <sub>2</sub>
18/33 <sup>d</sup>	2/247 <sup>f</sup>	54/65 <sup>a</sup>	204/70 <sup>fg</sup>	Gm	
0/00 <sup>c</sup>	0/517 <sup>g</sup>	33/97 <sup>d</sup>	55/03 <sup>h</sup>	NM	
18/50 <sup>d</sup>	1/377 <sup>f</sup>	49/02 <sup>b</sup>	153/247 <sup>g</sup>	Gi	Pb <sub>3</sub>
15/91 <sup>d</sup>	1/002 <sup>fg</sup>	43/75 <sup>c</sup>	146/134 <sup>g</sup>	Gm	



#### منابع

- رائی پور ل و علی اصغر زاد ن، 1386. اثرات متقابل باکتری‌های حل کننده فسفات و بردی رایزوبیوم ژاپنی‌کوم بر شاخص‌های رشد، غده‌بندی و جذب برخی عناصر غذایی در سویا. مجله علوم فنون کشاورزی و منابع طبیعی، شماره 40. صفحات 53-64.
- Aliasgharzadeh N, Saleh Rastin N, Towfighi H and Alizadeh A, 2001. Occurrence of arbuscular mycorrhizal fungi in saline soils of the Tabriz plain of Iran in relation to some physical and chemical properties of soil. *Mycorrhiza* 11: 119-122.
- An YJ, 2006. Assessment of comparative toxicities of lead and copper using plant assay. *Chemosphere* 62:1359-1365.
- Andrade SAL, Abreu CA, Abreu MF and Silveria APD, 2004. Influence of lead addition on arbuscular mycorrhiza and rhizobium symbiosis under soybean plants. *Applied Soil Ecology* 26: 123-131.
- Biro I and Takacs T, 2007. Effects of *Glomus mossea* strains of different origin on plant macro and micronutrient uptake in Cd polluted and unpolluted soils. *Acta Agronomica Hungarica* 55:1-10.
- Casella S, Frassinetti S, Lupi F and Squartini F, 1988. Effect of cadmium, chromium and copper on symbiotic and free living *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii. *FEMS Microbiology Letter* 49: 343-349.
- Lagerwerff JV, Armiger WH and Specht AW, 1973. Uptake of lead by alfalfa and corn from soil and air. *Soil Science* 115:455-460.
- Neuman E and Geouge E, 2004. Colonization with AMF *Glomus mosseae* enhanced phosphate uptake from dry soil in *Sorghum bicolor* (L.). *Plant and Soil* 261: 245-255.
- Leung HM, Ye ZH and Wong MH, 2007. Survival strategies of plants associated with arbuscular mycorrhizal fungi on toxic mine tailings. *Chemosphere* 66: 905-915.
- Paudyal SP, Aryal RR, Chauhan SVS and Maheshwari DK, 2007. Effect of heavy metals on growth of Rhizobium strains and symbiotic efficiency of two species of tropical legumes. *Scientific World* 5: 27-32.
- Saleh AI – Garni SM, 2006. Increased heavy metal tolerance of cowpea plants by dual inoculation of an arbuscular mycorrhizal fungi and nitrogen-fixer Rhizobium bacterium. *African Journal of Biotechnology* 5: 133-142.
- Vance CP and Gantt JS, 1992. Control of nitrogen and carbon metabolism in root nodules. *Plant Physiology* 85: 266-274.
- Vesper SJ and Widensaul TC, 1997. Effect of cadmium, nickel, copper, and zinc on nitrogen fixation by soybeans. *Water, Air, and Soil Pollution* 9:413-422.