نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۱، شماره ۵، آذر – دی ۱۳۹۶، ص. ۱۳۵۴-۱۳۴۰

Journal of Water and Soil
Vol. 31, No. 5, Nove.-Dec. 2017, p. 1340-1354

پیامد مایه‌زنی میکروبی بر رشد، جذب آهن و روی و پاسخ بیوشیمیایی بنگ‌دانه (*Hyoscyamus niger* L.) در تنش سرب

اکبر کریمی[۱]- حبیب خداوردیلو[۲*]- میرحسن رسولی صدقیانی[۳]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۸/۱۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۷/۱۱

چکیده

در این پژوهش پیامد مایه‌زنی قارچ ریشه‌های آربوسکولار (AMF) و باکتری‌های افزاینده رشد گیاه (PGPR) بر رشد، برخی ویژگی‌های بیوشیمیایی و جذب آهن و روی توسط گیاه بنگ‌دانه (*Hyoscyamus niger* L.) در آلودگی سربی خاک بررسی گردید. برای این کار یک نمونه خاک گزینش و به‌گونه یکنواختی با غلظت‌های گوناگون سرب (صفر، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک) از نمک نیترات سرب آلوده شد. سپس خاک آلوده شده سترون و با گونه‌های AMF (مخلوطی از زادمایه قارچ جنس *گلوموس* شامل گونه‌های *G. intraradices*، *G. mosseae* و *G. fasciculatum*) و PGPR (مخلوطی از باکتری‌های جنس *سودوموناس* شامل گونه‌های *P. putida*، *P. fluorescens* و *P. aeruginosa*) مایه‌زنی گردید. این پژوهش در گلخانه به‌گونه آزمایش فاکتوریل با دو فاکتور غلظت سرب (در ۴ سطح) و تیمار میکروبی (در ۳ سطح) در قالب طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی و در سه تکرار انجام شد. نتایج نشان داد با افزایش غلظت سرب در خاک درازی شاخساره، وزن خشک ریشه و شاخساره، رنگ‌دانه‌های فتوسنتزی، غلظت آهن و روی در شاخساره کاهش یافت و غلظت سرب در شاخساره، پرولین و قندهای محلول در گیاه افزایش یافت. مایه‌زنی AMF و PGPR سبب افزایش معنی‌دار ($P\leq۰/۰۵$) وزن خشک شاخساره، وزن خشک ریشه، رنگ‌دانه‌های کلروفیل و کاروتنوئید، پرولین، قندهای محلول و غلظت آهن و روی در شاخساره شد. ویژگی‌های بیوشیمیایی در تیمارهای AMF و PGPR اختلاف معنی‌داری ($P\leq۰/۰۵$) نداشتند. بنابراین می‌توان نتیجه‌گیری کرد که مایه‌زنی میکروبی مایه بهبود ویژگی‌های بیوشیمیایی گیاه و افزایش بردباری بنگ‌دانه در برابر آلودگی سرب می‌شود.

واژه‌های کلیدی: آلودگی سرب، باکتری‌های افزاینده رشد گیاه، قارچ‌ریشه‌های آربوسکولار، ویژگی‌های بیوشیمیایی

مقدمه

سرب یکی از فراوان‌ترین و زهری‌ترین فلزهای سنگین است که از راه‌های گوناگون به خاک راه یافته و بهداشت گیاهان، جانداران و مردم را به‌خطر می‌اندازد (۲۰ و ۲۴). گیاهان می‌توانند فلزهای فاز محلول خاک را جذب نمایند. این توانایی گیاهان به آن‌ها اجازه می دهد که فلزهای زهری مانند سرب را نیز جذب نموده و در بافت‌های خود بیاندوزند. بدین‌گونه گیاه در برابر آلودگی به این عنصر زهری هستند (۱).

غلظت‌های بالای سرب در خاک یکی از عوامل کم کننده رشد گیاهان است که می‌تواند جذب عناصر غذایی ضروری مانند آهن و روی و منگنز در گیاه را بکاهد (۳ و ۳۳). سرب در گیاهان سبب ناهنجاری متابولیکی و کاهش کارکرد شده و حتی می‌تواند مایه نابودی بسیاری از گونه‌های گیاهی شود (۲۴ و ۳۶). مقدار بالای سرب در کلروپلاست گیاهان می‌تواند با جلوگیری از فعالیت آنزیم‌های کارا در بیوسنتز کلروفیل، تثبیت دی‌اکسیدکربن (CO_2) و ترکیبات پروتئینی رنگدانه‌ها در فتوسیستم I و II، ساختار کلروپلاست گیاهان را ویران نموده و رشد و کارکرد گیاهان را بکاهد (۲۵). سرب در گیاهان سبب تخریب مولکول‌ها شده و به‌گونه مستقیم یا غیرمستقیم می‌تواند مایه پیدایش گونه‌های کارای اکسیژن (ROS) مانند رادیکال اکسیژن ($O_2^{\bullet-}$)، رادیکال هیدروکسیل ($HO^{\bullet}$) و پراکسید هیدروژن (H_2O_2) شود (۲۴ و ۳۶). گونه‌های کارای اکسیژن مایه ایجاد تنش اکسیداتیو، پراکسیداسیون لیپید، آسیب غشای یاخته‌ای و دگرگونی سوخت و ساز بیوشیمیایی یاخته‌ها و در پایان کاهش رشد گیاه می

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد علوم خاک، دانشگاه ارومیه و دانشجوی دکتری علوم خاک، دانشگاه شهید چمران اهواز
۲ و ۳- دانشیار و استاد گروه علوم خاک، دانشگاه ارومیه
(*- نویسنده مسئول: Email: h.khodaverdiloo@urmia.ac.ir)
DOI: 10.22067/jsw.v31i5.59472

شوند (۲۴ و ۳۶).

یکی از راهکارهای افزایش بردباری گیاهان و بهبود رشد آن‌ها در خاک‌های آلوده به سرب، همزیستی ریزسازواره‌های سودمند خاک مانند قارچ‌ریشه‌های آربوسکولار (AMF) و باکتری‌های افزاینده رشد گیاه (PGPR) با گیاهان است (۱۸، ۱۹ و ۳۶). قارچ‌ریشه‌های آربوسکولار یکی از مهم‌ترین ریزسازواره‌های خاک هستند که با بیش‌تر گیاهان در زیستگاه‌های گوناگون و در خاک‌های آلوده به فلزات‌سنگین روابط همزیستی دارند (۳۴). نتایج مطالعات گوناگون نشان داده که این قارچ‌ریشه‌ها در خاک‌های آلوده به فلزهای سنگین می‌توانند با راهکارهای گوناگونی از جمله بهبود جذب آب و عناصر غذایی (۱۰)، افزایش فعالیت آنزیم‌های خاک (۳۰) و تولید هورمون های افزاینده رشد گیاه بردباری و رشد گیاه را بیافزایند (۱۰). یانگ و همکاران (۳۶) گزارش کردند مایه‌زنی AMF سبب افزایش بردباری و رشد و کارکرد اقاقیا (*Robinia pseudoacacia* L.) در خاک‌های آلوده به سرب می‌شود. همچنین خداوردی‌لو و همکاران (۲۷) در اثر مایه‌زنی AMF رشد و ویژگی‌های فیزیولوژیکی گیاه مرتعی گل‌گندم در خاک آلوده به سرب بهبود می‌یابد. یافته‌های پژوهش رسولی صدقیانی و همکاران (۳۲) نیز نشان داد مایه‌زنی قارچ‌های *گلوموس* پیامدهای نامطلوب کادمیم در گیاه مرتعی خار زن‌بابا را کاسته و بردباری آن را در خاک‌های آلوده به کادمیوم می‌افزاید.

باکتری‌های ریزوسفری افزاینده رشد گیاه گروهی دیگر از ریزسازواره‌های سودمند خاک هستند که در شرایط تنش‌های محیطی می‌توانند همزیستی موثری با گیاهان پیدایش دهند (۲۷). نتایج پژوهش‌های گوناگون نشان داده PGPR در خاک‌های آلوده به فلزهای سنگین می‌توانند با تولید انواع اسیدهای آلی، سیدروفور، ویتامین‌ها، هورمون‌های افزاینده رشد گیاه و تولید آنزیم ACC دآمیناز و بهبود فعالیت آنزیمی، مایه بهبود جذب عناصر غذایی ضروری توسط گیاه شده و بردباری و کارکرد گیاهان را افزایش دهند (۲۷). جان‌محمدی و همکاران (۱۵) گزارش کردند مایه زنی PGPR کارکرد ارقام گوناگون گندم را در خاک‌های آلوده به سرب می‌افزاید. همچنین خداوردی‌لو و همکاران (۲۱) گزارش کردند بهره‌گیری از زادمایه باکتری‌های *سودوموناس* تا حدودی اثر زهری بودن سرب را در گیاه گل‌گندم کاسته و بردباری و کارکرد این گیاه را در خاک‌های آلوده به سرب را افزایش می‌دهد.

تاکنون پژوهش‌های گوناگونی در زمینه پیامد مایه‌زنی AMF و PGPR در رشد، جذب و اندوزش سرب توسط گیاهان گوناگون در خاک‌های آلوده انجام شده است. اما در مورد راه‌کارهای این ریزسازواره‌های خاک در کاهش زهری بودن سرب در گیاهان و تأثیر آن‌ها در ویژگی‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی گیاهان به ویژه گیاهان مرتعی مطالعات چندانی انجام نشده است و اطلاعات اندکی در این زمینه وجود دارد. بنابراین این پژوهش به‌منظور بررسی پیامد مایه‌زنی AMF و PGPR در رشد، جذب عناصر سرب، آهن روی و اندوخته نسبی آب گیاه (RWC) و برخی ویژگی‌های بیوشیمیایی گیاه مرتعی بنگ‌دانه، در یک خاک آلوده به سرب انجام شد.

مواد و روش‌ها

خاک بررسی شده از سری Inceptisols Typic Halaquepts Fine, mixed, mesic واقع در استان آذربایجان غربی نمونه‌برداری شد. این خاک پس از هواخشک شدن به دو بخش تقسیم گردید. یک بخش آن برای انجام آزمایش‌های فیزیکی و شیمیایی از الک دو میلی‌متری عبور داده شد و ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک به روش‌های استاندارد (۸) اندازه‌گیری شد. بخش دیگر خاک پس از عبور از الک پنج میلی‌متری با غلظت‌های گوناگون سرب شامل صفر، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم سرب بر کیلوگرم خاک آلوده شد. برای آلوده کردن خاک از نمک نیترات سرب $Pb(NO_3)_2$ بهره‌گیری شد (۱۹). بر پایه پژوهش های پیشین (۲۰)، خاک آلوده برای پنج ماه در برابر تناوب‌های تر و خشک شدن و برای ۱۸ ماه دیگر به گونه هواخشک نگهداری شد تا توزیع سرب در خاک به شرایط آلودگی طبیعی نزدیک‌تر شود.

نمونه‌های خاک آلوده شده در دو نوبت سترون شدند. خاک سترون به گلدان‌های سترون شده با گنجایش ۲/۵ کیلوگرم منتقل گردید. سپس مایه‌زنی قارچها شامل آمیخته‌ای از زادمایه قارچ جنس *گلوموس* (آمیخته گونه‌های *G. intraradices*، *G. mosseae* و *G. fasciculatum*) انجام شد. فراوانی اسپورهای قارچ زادمایه، ۲۵۰ اسپور در هر ۵۰ گرم زادمایه بود. برای تیمار باکتریایی، ۱۵ میلی‌لیتر از محیط کشت مایع Nutrient Broth دارای باکتری‌ها (آمیخته باکتری‌های جنس *سودوموناس* گونه‌های *P. putida*، *P. fluorescens* و *P. aeruginosa*) به گلدان‌ها مایه‌زنی گردید. فراوانی این باکتری‌ها نزدیک ($CFU\ ml^{-1}$) $۲/۶ \times ۱۰^۸$ بود (۱۹). باکتری‌های استفاده شده در این مطالعه دارای توانایی بالایی در تولید سیدروفور، آنزیم ACC دآمیناز، ترشح هورمون اکسین، ترشح اسیدهای آلی و انحلال فسفات‌های نامحلول بودند (۳۱). گونه‌های قارچ و باکتری از بانک میکروبی گروه علوم و مهندسی خاک دانشگاه ارومیه و بخش بیولوژی خاک مؤسسه تحقیقات خاک وآب کشورآماده شدند.

پس از رساندن رطوبت گلدان‌ها به گنجایش زراعی و کاربرد تیمارها کشت گیاه بنگ‌دانه (*Hyoscyamus niger* L.) انجام شد و گلدان‌ها در شرایط گلخانه نگه‌داری شدند. ابتدا در هر گلدان ۶ بذر از گیاه بنگ‌دانه با فواصل منظم کشت گردید. پس از جوانه‌زدن بذرها، ۳ بوته از گیاه در گلدان‌ها نگه‌داری شدند. در پایان ماه پنجم رشد، درازی شاخساره گیاه اندازه‌گیری شد و سپس شاخساره و ریشه‌های

گیاه جدا شدند. ریشه‌ها و بخش هوایی گیاه برای ۷۲ ساعت در آون در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس وزن خشک ریشه و شاخساره گیاه اندازه‌گیری گردید (۲۱). حدود یک گرم از ریشه‌های ریز و ظریف برای رنگ‌آمیزی جهت تعیین درصد کلنیزاسیون ریشه جداسازی شد و درصد کلنیزاسیون ریشه با روش رنگ‌آمیزی با محلول رنگی تریپان بلو و شمارش خطوط تلاقی شبکه اندازه‌گیری شد (۱۳).

در این پژوهش از روش اکسیداسیون تر برای عصاره‌گیری سرب از گیاه استفاده شد. برای اکسیداسیون تر، آمیزه‌ی اسیدنیتریک، اسیدپرکلریک و اسیدسولفوریک با نسبت حجمی ۴۰، ۴ و ۱ به کار رفت (۲۱) و غلظت سرب، آهن و روی با دستگاه جذب اتمی اسپکترومتری (Shimadzu6300 AA) اندازه‌گیری شد. برای بررسی پیامد تنش سرب در گیاه و همچنین پیامد مایه‌زنی میکروبی در این زمینه برخی ویژگی‌های بیوشیمیایی گیاه شامل اندازه‌های کلروفیل‌ها و کاروتنوئیدها (کاروتن و گزانتوفیل) به‌روش استخراج با استون ۸۰ درصد (۲۶) و اندوخته پرولین به‌روش بیتز و همکاران (۵) اندازه‌گیری شد. همچنین، مقدار قندهای محلول در گیاه به‌روش فنل اسیدسولفوریک تعیین گردید (۲۳). در این پژوهش برای اندازه‌گیری اندوخته نسبی آب برگ (RWC) از روش تورنر (۳۵) بهره‌گیری شد و سپس با بهره‌گیری از رابطه (۱) مقدار آن محاسبه شد:

$$RWC = \frac{FW - DW}{TW - DW} \times 100 \qquad (۱)$$

که در این رابطه FW، DW و TW به‌ترتیب وزن تر برگ، وزن خشک برگ و وزن برگ پس از تورژسانس می‌باشند.

این پژوهش به‌گونه فاکتوریل در قالب طرح پایه بلوک‌های کاملاً تصادفی و در سه تکرار انجام شد. تجزیه آماری داده‌ها با نرم‌افزار SAS و آزمون میانگین داده‌ها با بهره‌گیری از آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد انجام شد.

جدول ۱- غلظت نخستین برخی عناصر در خاک‌بررسی شده

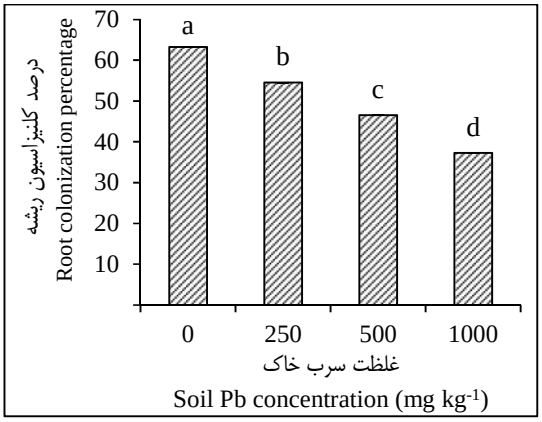
Table 1- Concentration of selected elements in the soil used for this study

ویژگی Property	مس کل Total Cu	روی کل Total Zn	آهن کل Total Fe	سرب کل Total Pb	بیکربنات محلول Soluble $HCO3^-$	کربنات محلول Soluble CO_3^{2-}	سدیم محلول Soluble Na^+	منیزیم محلول Soluble Mg^{2+}	کلسیم محلول Soluble Ca^{2+}	پتاسیم محلول Soluble K^+
واحد Unit	($mg\ kg^{-1}$)				($mg\ L^{-1}$)					
مقدار Value	14.11	62	295.5	21.4	5.6	0.8	23.8	0.4	1.2	0/0

جدول ۲- برخی ویژگی‌های فیزیکی وشیمیایی خاک‌بررسی شده

Table 2- Selected physico-chemical properties of the soil used for this study

ویژگی Property	واحد Unit	مقدار Value
شن Sand	$g\ kg^{-1}$	323
سیلت Silt	$g\ kg^{-1}$	403
رس Clay	$g\ kg^{-1}$	274
کلاس بافتی Texture class		لوم Loam
مواد آلی Organic matter	$g\ kg^{-1}$	26.9
گنجایش تبادل کاتیونی Cation exchange capacity (CEC)	$cmol_c kg^{-1}$	22.1
هدایت الکتریکی Electrical conductivity (EC_e)	$dS\ m^{-1}$	2.5
کربنات کلسیم معادل Calcium Carbonate Equivalent	%	30.5
اسیدیته Ph		8.1



شکل ۱- درصد کلنیزاسیون ریشه گیاه در سطوح گوناگون سرب در خاک

Figure 1- Root colonization percentageat different levels of Pb in soil

میانگین‌های دارای حروف مشترک بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن اختلاف معنی‌داری (P≤۰/۰۵) ندارند

Means similar letter(s) are not significantly different at 5% probability level, according to the Duncan's -test at 5% probability level (n = 3)

نتایج و بحث

ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک

جداول ۱ و ۲ به‌ترتیب غلظت اولیه عناصر در خاک و برخی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی خاک بررسی شده را نشان می‌دهند. این خاک دارای بافتی میانه، pH آن در بازه‌ی خاک‌های آهکی، کمی شور، غیر سدیمی (جدول ۲) و با توجه به اندازه پذیرفتنی گزارش شده در منابع (۷)، خاک ناآلوده به فلزهای سنگین بود (جدول ۱).

درصد کلنیزاسیون ریشه

شکل ۱ درصد کلنیزاسیون ریشه گیاه بنگ‌دانه را در تیمار AMF در سطوح گوناگون آلودگی سربی خاک نشان می‌دهد. در تیمارهای شاهد و PGPR کلنیزاسیون ریشه مشاهده نشد. درصد کلنیزاسیون ریشه گیاه با افزایش غلظت سرب در خاک به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. کاهش کلنیزاسیون ریشه احتمالاً به دلیل کاهش زیست‌توده و کارکرد ریشه گیاه و در نتیجه کاهش احتمالی ترشحات ریشه بود (جدول ۴). کاهش درصد کلنیزاسیون ریشه در خاک‌های آلوده به‌دلیل سمیت ناشی از فلزات سنگین برای اندام‌های قارچی، می‌باشد (۱۲). به‌گونه مشابه، نتایج پژوهش گاتای و همکاران (۱۲) نیز نشان داد آلودگی سرب در خاک درصد کلنیزاسیون ریشه را می‌کاهد.

شناسه‌های رویشی گیاه

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد اثر تیمارهای میکروبی، سطوح سرب و برهمکنش آن‌ها بر درازی شاخساره و وزن خشک ریشه و شاخساره گیاه معنی‌دار (P≤۰/۰۱) بود (جدول ۳). با افزایش غلظت سرب در خاک درازی شاخساره و وزن خشک شاخساره گیاه در تیمارهای شاهد و PGPR به‌گونه معنی‌داری (P≤۰/۰۵) کاهش یافت (جدول ۴). در حالی‌که در تیمار AMF کاهش درازی شاخساره در غلظت Pb_{250} معنی‌دار نبود. همچنین وزن خشک شاخساره در تیمار AMF تنها در Pb_{1000} کاهش معنی‌داری نشان داد. در همه اندازه‌های سرب در خاک، درازی شاخساره و ماده خشک شاخساره در تیمارهای AMF و PGPR به‌گونه معنی‌داری بیش‌تر از تیمار شاهد (بدون مایه‌زنی میکروبی) بود.

به‌گونه میانگین، مایه‌زنی AMF و PGPR وزن خشک شاخساره گیاه را به‌ترتیب ۶۴/۶ و ۳۰/۲ درصد افزود. وزن خشک ریشه گیاه نیز در همه تیمارها با افزایش غلظت سرب در خاک کاهش یافت. همچنین مایه زنی AMF و PGPR وزن خشک ریشه را به‌گونه معنی‌داری در مقایسه با تیمار شاهد افزایش داد. اگر چه در Pb_0 و Pb_{250} اختلاف وزن خشک ریشه در تیمارهای AMF و PGPR معنی‌دار نبود، اما در غلظت‌های بالای سرب در خاک (Pb_{500} و Pb_{1000}) این مقدار در تیمار AMF به‌گونه معنی‌داری بیش‌تر از تیمار PGPR بود (جدول ۴). کاهش وزن خشک ریشه و شاخساره گیاه در سطوح بالای سرب در خاک را می‌توان به کاهش سنتز پروتئین‌ها، ایجاد ناهنجاری در تنفس سلولی، فتوسنتز و فعالیت آنزیم‌های ضروری در متابولیسم طبیعی گیاه در پی زهری بودن سرب در گیاهان نسبت داد (۹). همچنین آلودگی سربی خاک مایه ایجاد ناهنجاری در جذب عناصر غذایی توسط ریشه گیاهان می‌شود. افزون بر این، سرب در گیاهان مایه ناهنجاری در تعادل تغذیه‌ای شده و به همین دلیل کارکرد گیاه را به‌گونه چشم‌گیری می‌کاهد (۳۳). این نتایج با نتایج بسیاری از پژوهش‌ها همانند بود (۴، ۹ و ۲۲) برای

نمونه، کنکی و همکاران (۹) گزارش کردند سرب از تقسیم سلول‌های مریستمی و رشد سلول‌های ریشه جلوگیری کرده و وزن خشک ریشه گیاهان را می‌کاهد. همچنین نتایج پژوهش خداوردی‌لو و همکاران (۲۱) نشان داد ارتفاع و وزن خشک ریشه و شاخساره گیاه مرتعی گل گندم با افزایش آلودگی سربی خاک کاهش می‌یابد. بیش‌تر بودن رشد و کارکرد گیاه در تیمارهای AMF و PGPR نسبت به تیمار شاهد به‌دلیل افزایش جذب عناصر غذایی ضروری توسط گیاه و بهبود شرایط تغذیه‌ای در پی مایه‌زنی میکروبی و همچنین تولید هورمون های محرک رشد گیاه توسط این ریزسازواره‌های سودمند خاک می‌باشد (۲۷).

جدول ۳- تجزیه واریانس اثر تیمارها بر درازی شاخساره و وزن خشک شاخساره و ریشه گیاه

Table 3- Variance analysis of the treatments effects on shoot length and dry weight of shoot and root

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	درازی شاخساره Shoot length	وزن خشک شاخساره Shoot dry weight	وزن خشک ریشه Shoot dry weight
میکروب Microbe	2	83.69**	5.15**	6.27**
سرب Lead	3	313.27**	7.49**	4.17**
میکروب × سرب Lead×Microbe	6	4.97**	0.46**	0.26**
خطا Error	22	0.65	0.033	0.054

جدول ٤- آزمون میانگین درازی شاخساره و وزن خشک شاخساره و ریشه گیاه در سطوح گوناگون سرب در خاک در تیمارهای AMF، PGPR و شاهد

Table 4- Mean comparison of shoot length and dry weight of shoot and root at different levels of soil Pb in control, PGPR and AMF treatments

کل سرب افزوده شده به خاک Total Pb added to soil (mg kg^{-1})	Control	PGPR	AMF
		درازی شاخساره Shoot length (cm)	
0	24.3 ± 0.18^{a,b}	28.8 ± 0.45^{a,a}	27.3 ± 0.61^{a,a}
250	21.7 ± 0.75^{b,c}	24.4 ± 0.13^{b,b}	26.3 ± 0.78^{ab,a}
500	18.2 ± 0.78^{c,c}	20.8 ± 0.11^{c,b}	24.7 ± 0.87^{b,a}
1000	9.7 ± 0.62^{d,b}	13.2 ± 0.62^{d,b}	16.6 ± 0.13^{c,a}
Mean	18.48 C	21.8 B	23.73 A
		وزن خشک شاخساره Shoot dry weight (g pot^{-1})	
0	4.19 ± 0.22^{a,b}	4.73 ± 0.21^{a,a}	4.67 ± 0.30^{a,a}
250	3.42 ± 0.18^{b,b}	4.40 ± 0.14^{b,a}	4.63 ± 0.16^{a,a}
500	2.48 ± 0.25^{c,b}	4.13 ± 0.06^{c,a}	4.49 ± 0.12^{a,a}
1000	1.83 ± 0.23^{d,c}	2.24 ± 0.06^{d,b}	3.24 ± 0.08^{b,a}
Mean	2.98 B	3.88 A	4.26 A
		وزن خشک ریشه Root dry weight (g pot^{-1})	
0	2.98 ± 0.27^{a,b}	4.74 ± 0.25^{a,a}	4.68 ± 0.11^{a,a}
250	2.70 ± 0.38^{ab,b}	3.80 ± 0.29^{b,a}	4.06 ± 0.17^{b,a}
500	2.21 ± 0.18^{b,c}	3.02 ± 0.17^{c,b}	3.55 ± 0.12^{c,a}
1000	2.06 ± 0.06^{b,c}	2.44 ± 0.22^{d,b}	3.24 ± 0.08^{c,a}
Mean	2.49 B	3.50 A	3.88 A

حروف بالانویس اول و دوم بر روی هر عدد به ترتیب نشان دهنده اختلاف آماری (P≤۰/۰۵) در هر ستون و هر ردیف می‌باشند

میانگین‌های دارای حروف مشترک بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن اختلاف معنی‌داری (P≤۰/۰۵) ندارند

The first and second superscript letters on each number indicate significant different at 5% level in each row and column, respectively

Means similar letter(s) are not significantly different at 5% probability level, according to the Duncan's -test at 5% probability level (n = 3)

رنگ‌دانه‌های فتوسنتزی

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد اثر تیمارهای میکروبی و سطوح سرب بر اندوخته کلروفیل‌ها (کلروفیل a، b و کل) و کاروتنوئیدها معنی‌دار (P≤۰/۰۱) بود، اما برهمکنش آن‌ها معنی‌دار نبود (جدول ۵). با افزایش غلظت سرب در خاک اندازه‌های اندوخته کلروفیل‌ها (کلروفیل a، b و a+b) و کاروتنوئیدها در گیاه در همه تیمارها کاهش یافت (جدول ۶). اگر چه در تیمار AMF کاهش اندازه‌های کلروفیل (a+b) و کاروتنوئیدها در Pb_{250} معنی‌دار نبود. در همه تیمارها بیش‌ترین و کم‌ترین مقدار کلروفیل‌ها و کاروتنوئیدها به ترتیب در Pb_0 و Pb_{1000} دیده شد. در همه اندازه‌های سرب در خاک اندازه‌های کلروفیل‌ها و کاروتنوئیدها در تیمارهای AMF و PGPR به‌گونه معنی‌داری بیش‌تر از تیمار شاهد بود. مایه‌زنی PGPR اندازه های کلروفیل‌های a، b، کلروفیل (a+b) و کاروتنوئیدها را به‌گونه میانگین (میانگین اندازه‌های در سطوح گوناگون سرب در خاک) به‌ترتیب ۱۸/۰، ۱۷/۴، ۱۷/۷ و ۲۲/۲ درصد افزایش داد. همچنین در پی مایه‌زنی AMF میانگین اندازه‌های کلروفیل‌های a، b، کلروفیل (a+b) و کاروتنوئیدها به‌ترتیب ۱۶/۰، ۱۸/۳، ۱۶/۲ و ۲۷/۷ درصد افزایش یافت. نتایج نشان داد در شرایط خاک غیرآلوده (Pb_0) و بدون تنش در گیاه اندازه‌های کلروفیل‌ها در تیمار AMF به‌گونه معنی‌داری کم‌تر از تیمار PGPR بود. اما در دیگر غلظت‌های سرب در خاک (Pb_{250}، Pb_{500} و Pb_{1000}) اختلاف اندازه‌های رنگ‌دانه‌های فتوسنتزی در این دو تیمار معنی‌دار نبود. یکی از دلایل کاهش کلروفیل‌ها در گیاه در پی افزایش غلظت سرب در خاک این است که سرب در گیاه مایه مهار فعالیت آنزیم‌های مؤثر در بیوسنتز کلروفیل از جمله δ-آمینولولینیک اسید دهیدراتاز (ALA دهیدراتاز) از طریق اتصال به گروه‌های سولفیدریل (SH-) این آنزیم می‌شود (۱۷). دلیل دیگر کاهش کلروفیل‌ها در شرایط تنش زهری بودن سرب در گیاه مهار کاتالیز آنزیمی چرخه کالوین و افزایش فعالیت کلروفیلاز می‌باشد (۲۴).

جدول ۵- تجزیه واریانس اثر تیمارها بر کلروفیل‌ها و کاروتنوئیدها

Table 5- Variance analysis of the treatments effects on chlorophylls and carotenoids

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	کلروفیل a Chlorophyll a	کلروفیل b Chlorophyll b	کلروفیل a+b Chlorophyll a+b	کاروتنوئید Cartenoid
میکروب Microbe	2	0.114^{**}	0.038^{**}	0.284^{**}	0.03^{*}
سرب Lead	3	1.578^{**}	0.518^{**}	3.905^{**}	0.11^{**}
میکروب × سرب Lead×Microbe	6	0.019^{ns}	0.006^{ns}	0.047^{ns}	0.0004^{ns}
خطا Error	22	0.011	0.004	0.027	0.001

سرب می‌تواند جایگزین منیزیم مرکزی در ساختار کلروفیل شده و با جلوگیری از دریافت نور، فتوسنتز در گیاه را بکاهد (۲۹). افزون بر این، تنش اکسیداتیو و رادیکال‌های آزاد اکسیژن ایجاد شده در پی زهری بودن سرب در گیاه یک عامل بازدارنده برای فتوسنتز و فتوسیستم II می‌باشد (۲۵). کاهش مقدار کاروتنوئیدها در گیاه در پی زهری بودن سرب در گیاه احتمالاً به‌دلیل فروپاشی ساختار آن‌ها می باشد (۴۲). پژوهش‌گرانی چند کاهش اندازه‌های رنگ‌دانه‌های فتوسنتزی را در غلظت‌های بالای فلزهای سنگین در خاک در گیاهان گوناگون گزارش کردند (۱۷ و ۲۸). نتایج این پژوهش نشان داد که مایه‌زنی AMF و PGPR مایه افزایش اندازه‌های رنگ‌دانه‌های فتوسنتزی شد. این نتیجه احتمالاً به‌دلیل تولید هورمون‌ها توسط جذب بیش‌تر عناصر در این تیمارها و آن‌ها از جمله فسفر به‌عنوان حامل انرژی در فتوسنتز می‌باشد (۱۱). همچنین یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد جذب آهن در تیمارهای AMF و PGPR بیش‌تر از تیمار شاهد بود (جدول ۱۰). بنابراین می‌توان بیش‌تر بودن اندازه‌های کلروفیل‌ها و کاروتنوئیدها در گیاهان مایه‌زنی شده با AMF و PGPR را به بیش‌تر بودن مقدار این عنصر در شاخساره گیاه به‌عنوان عناصر موثر در سنتز کلروفیل‌ها نسبت داد (۱۱). نتایج همانندی توسط پژوهش‌گران گوناگونی در خاک‌های آلوده به فلزهای سنگین گزارش شده است (۱۶ و ۳۶) برای نمونه، کامران و همکاران (۱۶) گزارش کردند مایه‌زنی باکتری‌های *Pseudomonas* مایه افزایش اندازه‌های کلروفیل در گیاه منداب (*Eruca sativa*) می‌شود. همچنین نتایج پژوهش یانگ و همکاران (۳۶) نشان داد مایه‌زنی AMF اندوخته رنگ‌دانه‌های فتوسنتزی اقاقیا (*Robinia pseudoacacia* L.) را در خاک‌های آلوده به سرب می‌افزاید.

جدول ٦- آزمون میانگین کلروفیل‌ها و کاروتنوئیدها در سطوح گوناگون سرب در خاک در تیمارهای AMF، PGPR و شاهد

Table 6- Mean comparison of chlorophylls and carotenoids, at different levels of soil Pb in control, PGPR and AMF treatments

کل سرب افزوده شده به خاک Total Pb added to soil (mg kg^{-1})	Control	PGPR	AMF
		کلروفیل a Chlorophyll a (mg g^{-1}FW)	
0	2.91 ± 0.10^{a,b}	3.63 ± 0.25^{a,a}	3.15 ± 0.14^{a,b}
250	2.31 ± 0.05^{b,a}	2.51 ± 0.29^{ab,a}	2.62 ± 0.02^{b,a}
500	1.73 ± 0.13^{c,a}	2.00 ± 0.17^{b,a}	2.09 ± 0.03^{c,a}
1000	1.04 ± 0.02^{d,b}	1.28 ± 0.22^{c,a}	1.42 ± 0.04^{d,a}
Mean	2.00 B	2.36 A	2.32 A
		کلروفیل b Chlorophyll b (mg g^{-1}FW)	
0	1.67 ± 0.06^{a,c}	2.08 ± 0.08^{a,a}	1.91 ± 0.08^{a,b}
250	1.32 ± 0.03^{b,a}	1.44 ± 0.11^{b,a}	1.50 ± 0.14^{b,a}
500	0.99 ± 0.08^{c,b}	1.14 ± 0.02^{,a}	1.21 ± 0.04^{c,a}
1000	0.60 ± 0.03^{d,b}	0.73 ± 0.02^{d,a}	0.82 ± 0.03^{d,a}
Mean	1.35 B	1.35 A	1.36 A
		کلروفیل a+b Chlorophyll a+b (mg g^{-1}FW)	
0	4.58 ± 0.15^{a,c}	5.71 ± 0.22^{a,a}	4.96 ± 0.24^{a,b}
250	3.64 ± 0.08^{b,b}	3.95 ± 0.13^{b,a}	4.12 ± 0.28^{ab,a}
500	2.73 ± 0.21^{c,b}	3.15 ± 0.04^{c,a}	3.29 ± 0.11^{c,a}
1000	1.64 ± 0.03^{d,b}	2.01 ± 0.06^{d,a}	2.25 ± 0.09^{d,a}
Mean	3.15 A	3.71 A	3.66 B
		کاروتنوئید Carotenoid (mg g^{-1}FW)	
0	0.26 ± 0.01^{a,b}	0.32 ± 0.02^{a,a}	0.29 ± 0.02^{a,ab}
250	0.19 ± 0.03^{b,b}	0.25 ± 0.05^{b,a}	0.26 ± 0.02^{ab,a}
500	0.15 ± 0.03^{c,a}	0.18 ± 0.04^{c,a}	0.21 ± 0.03^{b,a}
1000	0.11 ± 0.01^{d,a}	0.13 ± 0.02^{d,a}	0.15 ± 0.01^{d,a}
Mean	0.18 B	0.22 A	0.23 A

حروف بالانویس اول و دوم بر روی هر عدد به ترتیب نشان دهنده اختلاف آماری (P≤۰/۰۵) در هر ستون و هر ردیف می‌باشند

میانگین‌های دارای حروف مشترک بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن اختلاف معنی‌داری (P≤۰/۰۵) ندارند

The first and second superscript letters on each number indicate significant different (P≤ 0.05) in each row and column, respectively. Means similar letter(s) are not significantly (P≤ 0.05) different according to the Duncan's multiple range test

اندوخته نسبی آب برگ

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد اثر تیمارهای میکروبی و سطوح سرب بر اندوخته نسبی آب برگ معنی‌دار (P≤۰/۰۱) بود، اما برهمکنش آن‌ها معنی‌دار نبود (جدول ۷). با افزایش غلظت سرب در خاک اندازه‌های RWC در سطوح گوناگون سرب در همه تیمارها کاهش یافت (جدول ۸). اما این کاهش معنی‌دار نبود. همچنین، اندازه‌هایRWC در تیمارهای AMF و PGPR در همه اندازه‌های سرب در خاک بیش‌تر از تیمار شاهد بود، اگر چه این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نبود. نتایج برخی پژوهش‌ها نشان داده که سرب در گیاه می‌تواند با کاهش سطح برگ، کاهش انتقال آب به برگ، کاهش رشد و قابلیت تراوایی ریشه، کاهش تعداد و اندازه آوندهای چوبی و آسیب کلروپلاست و ایجاد تغییرات در اندامک‌های سلول‌های گیاهی، مایه ناهنجاری در تعادل آبی گیاه و کاهش اندوخته آب برگ در گیاهان شود (۹). بیش‌تر بودن مقدار RWC در گیاهان مایه‌زنی شده با AMF و PGPR احتمالاً به دلیل کارکرد بیش‌تر ریشه گیاه در این تیمارها (جدول ۴) و در نتیجه جذب و انتقال بیش‌تر آب و بهبود تعادل آبی گیاه می‌باشد (۲۷). همچنین احتمالاً جذب بیش‌تر پتاسیم در تیمارهای میکروبی به‌عنوان مهم‌ترین یون در تورژسانس و گسترش سلول‌های برگ، در افزایش مقدار RWC در این تیمارها مؤثر بوده است.

پرولین و قندهای محلول

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشـان داد اثـر تیمارهـای میکروبـی، سطوح سرب و برهمکنش آن‌ها بر پرولین و قندهای محلـول در گیـاه معنی‌دار (P≤۰/۰۱) بود (جدول ۷). رونـد تغییـرات پـرولین و قنـدهای محلول در گیاه با افزایش اندازه‌های سرب در خاک، همانند بود. بـدین ترتیب که در همه تیمارها با افزایش غلظت سرب در خاک اندازه‌هـای پرولین و قندهای محلول به‌گونه معنی‌داری افزایش یافتند (جدول ۸).

جدول ۷- تجزیه واریانس اثر تیمارها بر اندوخته نسبی آب برگ، پرولین و قندهای محلول

Table 7- Variance analysis of the treatments effects on leaf relative water content, proline and soluble sugars

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	اندوخته نسبی آب برگ Leaf relative water content	پرولین Proline	قندهای محلول Soluble sugars
میکروب Microbe	2	405.37**	4.69**	1.626**
سرب Lead	3	242.95**	22.62**	6.732**
میکروب × سرب Lead×Microbe	6	16.955^{ns}	0.511**	0.445**
خطا Error	22	33.181	0.057	0.004

جدول ۸- آزمون میانگین اندوخته نسبی آب برگ، پرولین و قندهای محلول در سطوح گوناگون سرب خاک در تیمارهای AMF، PGPR و شاهد

Table 8- Mean comparison of leaf relative water content, proline and soluble sugars, at different levels of soil Pb in control, PGPR and AMF treatments

کل سرب افزوده شده به خاک Total Pb added to soil (mg kg^{-1})	Control	PGPR	AMF
		اندوخته نسبی آب برگ Leaf relative water content (%)	
0	74.62 ± 4.76^{a,a}	78.74 ± 2.13^{a,a}	78.34 ± 1.29^{a,a}
250	70.31 ± 3.01^{a,a}	75.82 ± 2.32^{a,a}	77.41 ± 2.48^{a,a}
500	66.66 ± 4.15^{a,a}	73.41 ± 1.50^{a,a}	74.98 ± 3.39^{a,a}
1000	60.65 ± 6.05^{a,a}	69.81 ± 6.38^{a,a}	71.50 ± 3.94^{a,a}
Mean	68.06 A	74.45 A	75.56 A
		پرولین Proline (mg g^{-1}DW)	
0	0.36 ± 0.06^{d,a}	0.39 ± 0.02^{d,a}	0.43 ± 0.11^{d,a}
250	1.21 ± 0.13^{c,b}	2.11 ± 0.19^{c,a}	2.63 ± 0.20^{c,a}
500	1.93 ± 0.12^{b,b}	3.76 ± 0.12^{b,a}	3.82 ± 0.11^{b,a}
1000	3.32 ± 0.11^{a,b}	4.93 ± 0.41^{a,a}	4.94 ± 0.14^{a,a}
Mean	1.71 B	2.80 A	2.96 A
		قندهای محلول Soluble sugars (mg g^{-1}DW)	
0	1.37 ± 0.09^{d,a}	1.35 ± 0.25^{d,a}	1.46 ± 0.11^{d,a}
250	1.54 ± 0.13^{c,b}	1.94 ± 0.24^{c,a}	1.81 ± 0.17^{c,a}
500	1.98 ± 0.08^{b,b}	2.64 ± 0.11^{b,a}	2.56 ± 0.12^{b,a}
1000	2.33 ± 0.06^{a,b}	3.86 ± 0.19^{a,a}	3.92 ± 0.08^{a,a}
Mean	1.76 B	2.45 A	2.44 A

حروف بالانویس اول و دوم بر روی هر عدد به ترتیب نشان دهنده اختلاف آماری (P≤۰/۰۵) در هر ستون و هر ردیف می‌باشند

میانگین‌های دارای حروف مشترک بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن اختلاف معنی‌داری (P≤۰/۰۵) ندارند

The first and second superscript letters on each number indicate significant different (P≤ 0.05) in each row and column, respectively

Means similar letter(s) are not significantly (P≤ 0.05) different according to the Duncan's multiple range test

در Pb_0 اختلاف معنی‌داری میان اندازه‌های پرولین در تیمارهای گوناگون دیده نشد، اما در دیگر اندازه‌های سرب در خاک (Pb_{250}، Pb_{500} و Pb_{1000})، اندازه‌های پرولین و قندهای محلول در تیمارهای AMF و PGPR به‌گونه معنی‌داری بیش‌تر از تیمار شاهد بود. به‌گونه میانگین مایه‌زنی AMF و PGPR اندازه های پرولین و قندهای محلول در گیاه را به‌ترتیب بیش از ۶۳ و ۳۷ درصد در مقایسه با تیمار شاهد افزایش داد. اختلاف اندازه‌های پرولین و قندهای محلول گیاه در تیمارهای AMF و PGPR معنی‌دار نبود. افزایش اندوزش پرولین در پی افزایش غلظت سرب در گیاه یک راهکار محافظتی جهت بردباری در برابر تنش سرب و تنش اکسیداتیو ناشی از زهری بودن آن در گیاه می‌باشد (۴). دیگر پژوهش‌گران نیز افزایش اندوزش پرولین در گیاهان را در شرایط تنش فلزهای سنگین گزارش کرده‌اند (۱۶ و ۲۱). دلیل افزایش قندهای محلول در گیاه در پی افزایش غلظت سرب این است که گیاه با افزایش قندهای محلول در شرایط تنش می‌تواند ذخیره کربوهیدراتی خود را برای متابولیسم پایه سلولی در حد بهینه نگه دارد (۲). افزایش قندهای محلول گیاه در شرایط تنش یک راهکار بردباری در برابر تنش است و مایه تنظیم پتانسیل آب سلول دربخش سیتوزول و مقابله با غلظت بالای یون‌های جذب شده و اندوزش یافته در واکوئل می‌شود. همچنین کربوهیدرات‌های احیا کننده مایه کاهش آسیب‌های تنش اکسیداتیو ناشی از فلزهای سنگین و حفظ ساختار پروتئین‌ها و آنزیم‌ها در شرایط تنش آلودگی خاک می‌شوند (۲). همانند با این پژوهش الدوبی و بلتاجی (۲) گزارش کردند تنش سرب مایه افزایش مقدار قندهای محلول در گیاه لوبیا می‌شود. بیش‌تر بودن پرولین و قندهای محلول در تیمارهای مایه‌زنی شده احتمالاً به‌دلیل هورمون‌های تولید شده توسط این میکروب‌ها است، زیرا این هورمون‌ها در شرایط تنش می‌توانند با افزایش تولید اسیدهای آمینه به‌ویژه پرولین، مایه افزایش بردباری گیاه نسبت به تنش‌های محیطی می‌شود (۱۶). همچنین هورمون‌های تولید شده توسط AMF و PGPR مایه افزایش فتوسنتز و باز شدن روزنه‌ها و در پایان افزایش قندهای محلول در گیاه می‌شوند (۱۱).

غلظت آهن، روی و سرب در شاخساره

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد اثر تیمارهای میکروبی، سطوح سرب و برهمکنش آن‌ها بر غلظت سرب و آهن در شاخساره گیاه معنی‌دار ($P\leq ۰/۰۱$) بود اما اثر برهمکنش سرب و تیمار میکروبی بر غلظت روی در شاخساره گیاه معنی‌دار نبود (جدول ۹). غلظت آهن وروی در شاخساره بنگ‌دانه با افزایش اندازه‌های سرب در خاک، درهمه تیمارها به‌گونه معنی‌داری کاهش یافت (جدول ۱۰). همچنین غلظت آهن و روی در تیمارهای مایه‌زنی شده به‌گونه معنی‌داری بیش‌تر از تیمار شاهد بود. به‌گونه کلی در تمامی غلظت‌های سرب در خاک، غلظت آهن وروی درشاخساره گیاه در تیمارهای گوناگون به این ترتیب بود: AMF<PGPR< شاهد. کاهش غلظت آهن و روی با افزایش غلظت سرب به‌دلیل شرایط رقابتی در جذب عناصر توسط گیاه و اثرات آنتاگونیستی سرب برجذب و انتقال آهن و روی توسط گیاه می‌باشد (۳ و ۳۳). همچنین نتایج مطالعات نشان داده که سطوح بالای سرب در خاک می‌تواند مانع جذب دیگر عناصر غذایی از جمله آهن و روی و منگنز توسط سیستم ریشه‌ای گیاهان شود (۳). نتایج این پژوهش همچنین نشان داد که میکروب‌های مایه‌زنی شده به‌ویژه PGPR تأثیر بسیار زیادی در افزایش جذب آهن و روی توسط بنگ دانه دارند (جدول ۱۰). تولید متابولیت‌های گوناگون مانند اسیدهای آلی با وزن مولکولی کم و سیدروفور مایه افزایش حلالیت و زیست-فراهمی عناصر کم‌مصرف از جمله آهن و روی برای گیاهان و در نتیجه افزایش جذب آن‌ها توسط گیاهان می‌شود (۲۷).

جدول ۹- تجزیه واریانس اثر تیمارها بر غلظت آهن، روی و سرب در شاخساره

Table 9- Variance analysis of the treatments effects on shoot Fe, Zn and Pb concentration

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	غلظت آهن شاخساره Shoot Fe concentration	غلظت روی شاخساره Shoot Zn concentration	غلظت سرب شاخساره Shoot Pb concentration
میکروب Microbe	2	5010.47**	492.91**	199.13**
سرب Lead	3	7421.36**	1390.29**	941.51**
میکروب × سرب Lead×Microbe	6	83.79**	4.19ns	21.16**
خطا Error	22	19.59	4.72	2.69

قارچ‌ریشه‌های آربوسکولار نیز به‌دلیل سیستم هیفی گسترده و همچنین افزایش چشم‌گیر توسعه ریشه گیاه مایه افزایش فراهمی و جذب عناصر غذایی گوناگون از جمله آهن و روی می‌شود (۲۷). نتایج پژوهش‌های بهرامی‌نیا و همکاران (۳) و خداوردی‌لو و همکاران (۲۱) با این نتایج همانند بود.

با افزایش غلظت سرب در خاک در همه تیمارها غلظت سرب در شاخساره گیاه به‌گونه معنی‌داری افزایش یافت (جدول ۱۰). بهره گیری از زادمایه میکروبی AMF و PGPR غلظت سرب در شاخساره گیاه را به‌گونه معنی‌داری افزایش داد. در شرایط خاک غیرآلوده (Pb_0) و در بیش‌ترین غلظت سرب در خاک (Pb_{1000})، غلظت سرب در تیمار PGPR به‌گونه معنی‌داری بیش‌تر از تیمار AMF بود. اما در غلظت های متوسط آلودگی سربی خاک (Pb_{250}، Pb_{500}) اختلاف معنی‌داری ($P\leq ۰/۰۵$) در غلظت سرب در شاخساره گیاه در این تیمارهای میکروبی دیده نشد. این نتایج و نتایج مربوط به غلظت آهن و روی نشان می‌دهد که PGPR نسبت به AMF در افزایش فراهمی و جذب فلزات توسط بنگ‌دانه تأثیر نسبتاً بیش‌تری داشتند. نتایج این پژوهش نشان دهنده تأثیر بسیار زیاد AMF و PGPR در افزایش جذب سرب توسط گیاه بود. با وجود بیش‌تر بودن وزن خشک شاخساره گیاه در تیمارهای میکروبی نسبت به تیمار شاهد (جدول ۱۰)، غلظت سرب در شاخساره گیاهان نیز در تیمارهای میکروبی بیش‌تر از تیمار شاهد بود. این نتایج نشان دهنده کاهش زهری بودن سرب در گیاه در پی مایه‌زنی AMF و PGPR می‌باشد. یکی از دلایل این نتایج احتمالاً مربوط به بهبود جذب بیش‌تر عناصر غذایی و بهبود شرایط تغذیه‌ای گیاه در تیمارهای میکروبی باشد.

جدول ۱۰- آزمون میانگین غلظت آهن، روی و سرب در شاخساره در سطوح گوناگون سرب در خاک در تیمارهایAMF، PGPR و شاهد

Table 10- Mean comparison of shoot Fe, Zn and Pb concentration at different levels of soil Pb in control, PGPR and AMF treatments

کل سرب افزوده شده به خاک Total Pb added to soil (mg kg^{-1})	Control	PGPR	AMF
	غلظت آهن شاخساره Shoot Fe concentration (mg kg^{-1})		
0	$113.19 \pm 3.82^{a,c}$	$164.01 \pm 7.51^{a,a}$	$135.81 \pm 3.54^{a,b}$
250	$93.17 \pm 2.16^{b,c}$	$132.15 \pm 1.69^{b,a}$	$102.07 \pm 1.71^{b,b}$
500	$70.15 \pm 2.97^{c,c}$	$109.58 \pm 5.09^{c,a}$	$91.97 \pm 6.59^{c,b}$
1000	$52.63 \pm 3.05^{d,c}$	$82.76 \pm 4.88^{d,a}$	$67.44 \pm 3.81^{d,b}$
Mean	82.29 C	122.19 A	99.32 B
	غلظت روی شاخساره Shoot Zn concentration (mg kg^{-1})		
0	$39.17 \pm 2.18^{a,c}$	$50.92 \pm 1.74^{a,a}$	$46.15 \pm 1.27^{a,b}$
250	$28.75 \pm 3.32^{b,c}$	$43.12 \pm 1.82^{b,a}$	$35.94 \pm 1.92^{b,b}$
500	$19.87 \pm 0.29^{c,c}$	$30.13 \pm 0.49^{c,a}$	$25.85 \pm 2.07^{c,b}$
1000	$8.84 \pm 2.29^{d,c}$	$23.48 \pm 1.38^{d,a}$	$18.40 \pm 1.71^{d,b}$
Mean	24.16 C	36.91 A	31.59 B
	غلظت سرب شاخساره Shoot Pb concentration (mg kg^{-1})		
0	$0.34 \pm 0.07^{d,c}$	$2.35 \pm 0.28^{d,a}$	$1.79 \pm 0.11^{c,b}$
250	$6.93 \pm 0.83^{c,b}$	$16.21 \pm 1.59^{c,a}$	$15.81 \pm 2.01^{b,a}$
500	$12.07 \pm 0.69^{b,b}$	$20.35 \pm 0.63^{b,a}$	$21.86 \pm 2.89^{a,a}$
1000	$21.64 \pm 1.19^{a,c}$	$30.64 \pm 2.87^{a,a}$	$24.29 \pm 0.82^{a,b}$
Mean	10.25 B	17.39 A	15.94 A

حروف بالانویس اول و دوم بر روی هر عدد به ترتیب نشان دهنده اختلاف آماری ($P\leq ۰/۰۵$) در هر ستون و هر ردیف می‌باشند

میانگین‌های دارای حروف مشترک بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن اختلاف معنی‌داری ($P\leq ۰/۰۵$) ندارند

The first and second superscript letters on each number indicate significant different ($P\leq 0.05$) in each row and column, respectively

Means similar letter(s) are not significantly ($P\leq 0.05$) different according to the Duncan's multiple range test

دلیل دیگر سمیت‌زدایی سرب در تیمار مایه‌زنی شده با AMF و PGPR را می‌توان به اندوزش بیش‌تر پرولین در گیاه در تیمارهای میکروبی نسبت داد (جدول ۸). پرولین در گیاهان افزون بر تنظیم فشار اسمزی و pH سلول و محافظت از ساختارهای سلولی، منبع کربن و نیتروژن احیاء شده نیز می‌باشد (۱۴). همچنین پرولین در شرایط تنش‌های محیطی از جمله تنش فلزهای سنگین باکاهش

پراکسیداسیون لیپیدها و افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه آسیب‌های ناشی از گونه‌های کارای اکسیژن را کاهش می‌دهد (۱۴). همچنین احتمال کلاته شدن یون سرب در سلول و پیدایش ترکیب غیر سمی پرولین- سرب در گیاه وجود دارد. بیش‌تر بودن مقدار کاروتنوئیدها در تیمارهای AMF و PGPR نیز می‌تواند از دلایل کاهش زهری بودن سرب در این تیمارها باشد (جدول ۱۰). کاروتنوئیدها در شرایط تنش های اکسیداتیو به عنوان یک سیستم حفاظتی عمل کرده و می‌توانند با دریافت انرژی زیاد از طول موج‌های کوتاه و گرفتن رادیکال‌های آزاد اکسیژن در گیاه اثرات سمی آن‌ها در گیاه را کاهش دهند (۶). افزون بر این با توجه به نقش عناصر آهن و روی در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت مانند پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز در گیاهان و همچنین بیش‌تر بودن غلظت این عناصر در گیاهان مایه‌زنی شده، به‌نظر می‌رسد در غلظت‌های بالای سرب در خاک فعالیت این آنزیم‌ها در گیاهان مایه‌زنی شده با AMF و PGPR افزایش یافته و بدین ترتیب زهری بودن سرب در این تیمارها کاهش یافته است. در شرایط تنش فلزهای سنگین اتیلن تولید شده توسط گیاهان مایه کاهش رشد و گستردگی ریشه آن‌ها می‌شود (۱۶). در این شرایط PGPR با تولید آنزیم ACC دآمیناز با تبدیل پیش‌ماده اتیلن (ACC) به آمونیوم و α-کتوبوتیرات مانع تولید اتیلن شده و همچنین منبع نیتروژنی را در اختیار گیاه قرار می‌دهند. بدین ترتیب این باکتری‌ها افزون بر کاهش اثر زهری بودن سرب در گیاه، رشد گیاه را می‌افزایند (۱۶ و ۲۷).

نتیجه‌گیری کلی

نتایج به‌دست آمده از این پژوهش نشان داد که هر چند آلودگی سربی خاک، رشد، کارکرد، جذب آهن و روی و اندازه‌های رنگ‌دانه های فتوسنتزی در گیاه را کاهش داد، مایه‌زنی میکروبی AMF و PGPR جذب آهن و روی توسط گیاه را افزایش داد. همچنین در پی بهره‌گیری از زادمایه میکروبی اندوخته پرولین، قندهای محلول و کاروتنوئیدها و در نتیجه فعالیت آنتی‌اکسیدانی بنگ‌دانه در شرایط آلودگی سربی خاک افزایش یافت و بدین‌ترتیب با کاهش زهری بودن سرب در گیاه، رشد و کارکرد گیاه در شرایط آلودگی سربی خاک بهبود یافت. با توجه به نتایج این پژوهش AMF و PGPR با بهبود جذب آهن و روی و ویژگی‌های بیوشیمیایی بنگ‌دانه درکاهش آسیب‌های ناشی از تنش سرب در گیاه و بهبود رشد و کارکرد آن در شرایط آلودگی سربی خاک، بسیار سودمند هستند.

منابع

1- Abdullah M., Fasola M., Muhammad A., Malik S.A., Bostan N., Bokhari H., Kamran M.A., Shafqat, M.N., Alamdar A., Khan M., and Ali N. 2015. A vianfeathers as a non-destructive bio-monitoring tool of trace metals signatures: a case study from severely contaminated areas. Chemosphere, 119: 553–561.

2- Aldoobie N.F., and Beltagi M.S. 2013. Physiological, biochemical and molecular responses of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants to heavy metals stress. African Journal of Biotechnology, 12(29): 4614-4622.

3- Bahraminia M., Zarei M., Ronaghi A., and Ghasemi-Fasaei R. 2015. Effectiveness of arbuscular mycorrhizal fungi in phytoremediation of lead-contaminated soil by *Vetiver grass*. International Journal of Phytoremediation, 18: 730-737.

4- Barbosa B., Boléo S., Sidella S., Costa J., Duarte M.P., Mendes B., Cosentino S.L., and Fernando A.L. 2015. Phytoremediation of Heavy Metal-Contaminated Soils Using the Perennial Energy Crops *Miscanthus* spp. and *Arundo donax* L. BioEnergy Research, 8: 1500-1511.

5- Bates L.S., Waldern R.P., and Teare I.D. 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant and Soil, 39: 205-207.

6- Behera R.K., and Mishra P.C. 2002. High Irradiance and water stress induce alterations in pigment composition and chloroplast activities of primary wheat leaves. Journal of Plant Physiology, 159: 967-97.

7- Cariny T. 1995. The reuse of contaminated land. John Wiley and Sons Ltd Publisher, 219 p.

8- Carter M.R., and Gregorich E.G. 2008. Soil sampling and methods of analysis (2nd ed). CRC Press. Boca Raton. FL. 1204 p.

9- Cenkci S., Cioerci I.H., Yildiz M., Oezay C., Bozdao A., and Terzi H. 2010. Lead contamination reduces chlorophyll biosynthesis and genomic template stability in *Brassica rapa* L. Environmental and Experimental Botany, 67: 467-473.

10- Curaqueo G., Schoebitz M., Borie F., Caravaca F., and Roldán A. 2014. Inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi and addition of composted olive-mill waste enhance plant establishment and soil properties in the regeneration of a heavy metal-polluted environment. Environmental Science and Pollution Research, 21(12): 7403–7412.

11- Demir S. 2004. Influence of arbuscular mycorrhiza on some physiological growth parameters of pepper. Turkish Journal of Biology, 28: 85-90.

12- Gattai G.S., Pereira S.V., Costa C.M.C., Lima C.E.P., and Maia L. C. 2011. Microbial activity, arbuscular mycorrhizal fungi and inoculation of Woody plants in lead contaminated soil. Brazilian Journal of Microbiology, 42: 859-867.
13- Giovannetti M., and Mosse B. 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. New Phytologist, 84: 489-500.
14- Ivanov Y., Savochkin Y., and Kuznetsov V.l.V. 2013. Development of scots pine seedlings and functioning of antioxidant systems under the chronic action of lead ions. Biological Bulletin, 40(1): 26–35.
15- Janmohammadi M., Bihamta M., and Ghasemzadeh F. 2013. Influence of rhizobacteria inoculation and lead stress on the physiological and biochemical attributes of wheat genotypes. Cercetari agronomice in Moldova, 46: 49–67.
16- Kamran M.A., Eqani S.A., Bibi S., Xu R.K., Amna Monis M.F., Katsoyiannis A., Bokhari H., and Chaudhary H.J. 2016. Bioaccumulation of nickel by *E. sativa* and role of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) under nickel stress. Ecotoxicology and Environmental Safety, 126: 256–263.
17- Karamooz H., Safipour Afshar A., and Saeid Nematpour F. 2016. Tolerance and accumulation of heavy metals by *Descurainia sophia* L. Journal of Chemical Health Risks, 6(1): 69–78.
18- Karimi A., Khodaverdiloo H., Sepehri M., and Rasouli Sadaghiani M.H. 2011. Arbuscular mycorrhizal fungi and heavy metal contaminated soils. African Journal of Microbiology Research, 5: 1571- 1576.
19- Karimi A. Khodaverdiloo H., and Rasouli Sadaghiani M.H. 2013. Enhanced soil Pb extraction by Acroptilon (*Acroptilon repens*) through inoculation with some arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth promoting rhizobacteria.Journal of Water and Soil Conservation, 20(3): 193-210. (In Persian with English abstract).
20- Khodaverdiloo H., Rahmanian M., Rezapour S., Ghorbani Dashtaki Sh., Hadi H., and Han F.X. 2012. Effect of wetting-drying cycles on redistribution of lead in some semi-arid zone soils spiked with a lead salt. Pedosphere, 22: 304–313.
21- Khodaverdiloo H., Rasouli Sadaghiani M.H., and Karimi A. 2013. Influence of microbial inoculation of a Pb-contaminated soil on growth, some physiological properties, and uptake and translocation of Pb, Fe, and Zn by Centaurea (*Centaurea cyanus*). Journal of Soil Management and Sustainable Production, 3(2): 75-93. (In Persian with English abstract).
22- Khodaverdiloo H., and Hamzenejad Taghlidabad R. 2014. Phytoavailability and potential transfer of Pb from a salt-affected soil to *Atriplex verucifera*, *Salicornia europaea* and *Chenopodium album*. Chemistry and Ecology, 30: 216-226.
23- Kochert. 1978. Carbohydrate determination by phenol−sulfuric acid method. In:J.A. Hellebust and J.S. Craige, Editors, Handbook of physiological andbiochemical methods, Cambridge University Press, London, Pp: 95-97.
24- Kumar A., Prasad M.N.V., and Sytar O. 2012. Lead toxicity, defense strategies and associated indicative biomarkers in Talinum triangulare grown hydroponically. Chemosphere, 89: 1056– 1065.
25- Kumar A., and Prasad M.N.V. 2015. Lead-induced toxicity and interference in chlorophyll fluorescence in *Talinum triangulare* grown hydroponically. Photosynthetica, 53 (1): 66-71.
26- Lichtenthaler H.K., and Wellburn A.R. 1985. Determination of total carotenoids and chlorophyll a and b of leaf in different solvents. Biochemical Society Transactions, 11: 591-592.
27- Ma Y., Prasad M.N.V., Rajkumar M., and Freitas H. 2011. Plant growth promoting rhizobacteria and endophytes accelerate phytoremediation of metalliferous soils. Biotechnology Advances, 29: 248-258.
28- Mohammadzadeh A., Tavakoli M., Chaichi M.R., and Motesharezadeh B. 2014. Effects of nickel and PGPBs on growth indices and phytoremediation capability of sunflower (*Helianthus annuus* L.). Archives of Agronomy and Soil Science, 1765-1778.
29- Patra M., Bhowmik N., Bandopadhyay B., and Sharma A. 2004. Comparison of mercury, lead and arsenic with respect to genotoxic effects on plant systems and the development of genetic tolerance. Environmental and Experimental Botany, 52(3): 199-223.
30- Qian K., Wang L., and Yin N. 2012. Effects of AMF on soil enzyme activity and carbon sequestration capacity in reclaimed mine soil. International Journal of Mining Science and Technology, 22(4): 553–557.
31- Rasouli Sadaghiani M.H., Kavazi K., Rahimian H., Malakouti M.J., and Asadi H. 2006. An evaluation of the potentials of indigenous fluorescent pseudomonads of wheat rhizosphere for producing siderophore. Journal of Soil Water Sciences, 20: 133-143. (In Persian with English abstract).
32- Rasouli Sadaghiani M.H., Khodaverdiloo H., Barin, M., and Kazemalilou S. 2016. Influence of PGPR bacteria and arbuscular Mycorrhizal fungi on growth and some physiological parameters of *Onopordon acanthium* in a Cd-contaminated soil. Journal of Water and Soil, 30(2): 542-554. (In Persian with English abstract).
33- Sharma P., and Dubey R.S. 2005. Lead toxicity in plants. Plant Physiology, 17: 35-52.

34- Smith S.E., and Read D.J. 2010. Mycorrhizal symbiosis. Academic press, 800p.
35- Turner N.C. 1981. Techniques and experimental approaches for the measurement of plant water status. Plant and Soil, 58: 339–366.
36- Yang Y., Han X., Liang Y., Ghosh A., Chen J., and Tang M. 2015. The combined effects of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and lead (Pb) stress on Pb accumulation, plant growth parameters, photosynthesis, and antioxidant enzymes in *Robinia pseudoacacia* L. Plos One, 10(12): 1-24.

Journal of Water and Soil
Vol. 31, No. 5, Nove.-Dec. 2017, p. 1340-1354

نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۱، شماره ۵، آذر – دی ۱۳۹۶، ص. ۱۳۵۴-۱۳۴۰

Influence of Microbial Inoculation on Growth, Fe and Zn Uptake and Biochemical Response of *Hyoscyamus niger* L. in Lead (Pb) Stress

A. Karimi[1]– H. Khodaverdiloo[2]*– M.H. Rasouli-Sadaghiani[3]

Received: 05-11-2016
Accepted: 03-10-2017

Introduction: Recently, due to enhancement of industrialization, urbanization and disposal of wastes, fertilizers and pesticides the concentration of heavy metals (HMs)in agricultural soil has increased. Heavy metals are serious threat for environment due to their hazardous effects. Lead (Pb) is one of the toxic heavy metal that threats the health of plants, living organisms and human. Excessive Pb concentrations in agricultural soils result in decreasing the soil fertility and health which affects the plant growth and leads to decrease in plant growth. Plants simultaneously exposed to Pb suffer morphological, biochemical and physiological injury. Pb adversely affect plant absorption of essential elements, chlorophyll biosynthesis and shoot and root growth. Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) are known to enhance nutrient uptake and improvement of plant growth and tolerance in heavy metal contaminated soils through different mechanisms including producing low molecular weight organic acids, siderophore, antibiotics and hormones. The objective of this study was to evaluate the effect of AMF and PGPR on yield, leaf relative water content (RWC), some biochemical properties and uptake of Pb, Fe and Zn by Hyoscyamus (*Hyoscyamus niger* L.) under soil Pb contamination.

Materials and Methods: This study was carried out in greenhouse condition as a factorial experiment based on a randomized complete block design with two factors including Pb concentration (in four levels) and microbial treatment (in three levels including arbuscular mycorrhizal fungi, plant growth-promoting rhizobacteria and control) and in three replications. Consequently, a soil was selected and spiked uniformly with concentrations of Pb (0, 250, 500 and 1000 mg Pb kg^{-1} soil). The contaminated soil was then sterilized and inoculated with the selected species of arbuscular mycorrhizal fungi (a mixture of Glomus species including *G. intraradices*, *G. mosseae* and *G. fasciculatum*) or plant growth-promoting rhizobacteria (a mixture of Pseudomonas species includeing *P. putida*, *P. fluorescens*, and *P. aeruginosa*). Seeds of *Hyoscyamus niger* L. plant were grown in pots containing the Pb spiked soil. At the end of growth period shoot length, dry weights of root and shoot, Fe, Zn and Pb concentration in shoot, and some biochemical and physiological properties of plant including relative water content (RWC) chlorophyll a, b and total chlorophyll, carotenoids, proline and soluble sugars, were measured.

Results and Discussion: Results indicated that with increasing soil Pb concentration, dry weights of root and shoot, shoot length, photosynthetic pigments contents (chlorophyll a, chlorophyll b, total chlorophyll and carotenoids), shoot Fe and Zn concentration decreased, while proline and soluble sugars contents and the shoot Pb concentration increased. With increasing of soil Pb concentration, relative water content decreased, however, this reduction in concentration of 1000 mg Pb kg^{-1} soil was not significant ($P > 0.05$) in compared with concentration of 1000 mg Pb kg^{-1} soil. Amounts of all measured properties in AMF and PGPR treatments were higher than that control treatment. The highest values of shoot weight and root weight, were observed in plants that inoculated with AMF. The lowest shoot weight was recorded in non-inoculated plants that were grown under 1000 mg Pb kg^{-1} soil concentration. In this study Arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth-promoting rhizobacteria inoculation led to a significant increase ($P \leq 0.05$) in shoot length (12.9 -71.1%), shoot dry weight (11.5 – 81%), root dry weight (18.4 – 60.6%), chlorophyll (8.5 – 36.5%) and carotenoid (11.5 – 40.0%) pigments, proline (55 – 115.7%), soluble sugars (17.6 – 72.2%) and shoot Fe (9.5 – 57.2%) and Zn (25.0 – 165.5%) concentration in shoot at different levels of soil Pb. The highest and lowest amounts of shoot Fe, Zn and Pb concentration observed in AMF and control treatments respectively. Plant growth promoting rhizobacteria were more effective than arbuscular mycorrhizal fungi in shoot Fe, Zn and Pb concentration, while

1- Graduated M.Sc. Student of Soil Science, Urmia University and Ph.D. Student of Soil Science, Shahid Chamran University of Ahvaz
2 and 3- Associate Professor and Professor, Department of Soil Science, Urmia University
(*- Corresponding Author Email: H.Khodaverdiloo@urmia.ac.ir)

the mean of shoot length and shoot and root dry weight was higher in plants that inoculated with AMF compared to ones inoculated with PGPR. In general, there were not significant ($P \leq 0.05$) differences in amounts of chlorophyll (chlorophyll a, b and chlorophyll a+b) and carotenoids pigments, proline and soluble sugars between AMF and PGPR treatments.

Conclusion: It could be concluded that microbial inoculation (mixture of AMF and PGPR species) with improvement of plant biochemical properties results in improved *Hyoscyamus niger* L. yield and increased tolerance to Pb toxicity. Thus, the use of microbial inoculation (mixture of AMF and PGPR species) inoculation might be suggested for enhancement of plant tolerance in Pb contaminated soils.

Keywords: Arbuscular mycorrhizal fungi, Biochemical properties, Pb toxicity, Plant growth promoting rhizobacteria