نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۰، شماره ۲، خرداد– تیر ۱۳۹۵، ص. ۵۵۴-۵۴۲

Journal of Water and Soil
Vol. 30, No. 2, May.-Jun. 2016, p. 542-554

تأثیر باکتری‌های PGPR و قارچ‌های میکوریزا- آربوسکولار بر رشد و برخی ویژگی‌های فیزیولوژیک خارزن‌بابا در خاک آلوده به کادمیم

میرحسن رسولی صدقیانی[1*]- حبیب خداوردیلو[2]- محسن برین[3]- سولماز کاظم علیلو[4]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۸/۰۴
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۴/۱۳

چکیده

باکتری‌های افزاینده رشد گیاه (PGPR) و قارچ‌ریشه‌های آربوسکولار (AMF) سبب بهبود رشد گیاهان در تنش‌های محیطی می‌شوند. در این پژوهش نقش برخی گونه‌های PGPR (ترکیبی از گونه‌های *Pseudomonas* شامل سویه‌های *P. fluorescens*، *P.putida* و *P. aeruginosa*) و AMF (ترکیبی از گونه‌های *Glomus* شامل *G. mosseae*، *G. intraradices* و *G. fasciculatum*) بر برخی عناصر و همچنین برخی شاخص‌های فیزیولوژیک، توسط گیاه خارزن‌بابا (*Onopordon acanthium* L) بررسی شد. این مطالعه در شرایط گلخانه‌ای به صورت فاکتوریل با دو فاکتور غلظت کادمیم (صفر، ۱۰، ۳۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم کادمیم بر کیلوگرم) و تیمار تلقیح میکروبی، در قالب طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی انجام شد. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت کادمیم در خاک رشد گیاه، غلظت آهن، روی و مس در شاخساره، مقادیر کلروفیل‌ها و کاروتنوئیدها، ارتفاع، تنفس میکروبی و محتوای نسبی آب برگ (RWC) کاهش و مقادیر غلظت کادمیم در گیاه به طور معنی‌داری ($P\leq0/05$) افزایش یافت. مایه‌زنی میکروبی سبب کاهش تاثیر نامطلوب کادمیم بر رشد گیاه شد. عملکرد شاخساره گیاه به‌طور میانگین در تیمارهای PGPR و AMF به‌ترتیب بیش از ۲/۱ و ۲/۷ و تنفس میکروبی به‌ترتیب بیش از ۲/۱۷ و ۲/۰۱ برابر تیمارهای مشابه شاهد بود. چنین نتیجه‌گیری می‌گردد که مایه‌زنی میکروبی سبب افزایش بردباری گیاه و کاهش تاثیر نامطلوب کادمیم بر رشد گیاه می‌شود.

واژه‌های کلیدی: تلقیح میکروبی، خارزن‌بابا، شاخص‌های فیزیولوژیکی، سمیت کادمیم، فلزات سنگین

مقدمه

فلزات سنگین به طور بیولوژیکی تجزیه ناپذیر بوده و مدت زمانی طولانی در خاک باقی می‌مانند از این‌رو تهدیدی جدی برای محیط زیست به شمار می‌روند (۳۶). این فلزات در خاک از عوامل محدود کننده رشد گیاهان بوده و می‌تواند منجر به کاهش کمی و کیفی محصولات کشاورزی و در حالت‌های شدید نابودی تنوع گیاهی در مناطق آلوده گردد (۴۰).

کادمیوم به عنوان یک فلز سنگین، غیرضروری و به شدت سمّی برای اکثر موجودات شناخته می‌شود (۶۰). این عنصر با داشتن سمّیت ۲ تا ۲۰ برابر بیشتر از دیگر فلزات سنگین، در جایگاه هفتم به عنوان ده اولویت برتر لیست مواد خطرناک، در نظر گرفته شده است (۳۵). ریشه گیاهان به‌راحتی آن‌را جذب کرده و منجر به ورود این آلاینده به گیاه و متعاقباً زنجیره‌های غذایی خواهد شد (۱۹ و ۵۶). نتایج برخی تحقیقات نشان داده که کادمیم در گیاهان موجب کاهش رشد، کاهش فتوسنتز، کاهش تولید کلروفیل و ممانعت از فعالیت آنزیم احیا کننده آهن فریک می‌گردد (۱۹). همچنین افزایش غلظت کادمیم سبب کاهش غلظت بسیاری از عناصر کم‌مصرف می‌گردد (۳۸).

در سال‌های اخیر استفاده از توانایی ریزسازواره‌های ریزوسفری به‌ویژه قارچ‌های میکوریزا- آربوسکولار (AMF) و باکتری‌های محرک رشد گیاه (PGPR) در افزایش بردباری گیاهان به فلزات سنگین مورد توجه قرار گرفته است. میکوریزها مهمترین ریزسازواره‌های خاک بوده که در همزیستی با گیاهان، رشد و سلامتی آنها را بوسیله‌ی بهبود تغذیه‌ی معدنی (۴۸) و یا افزایش بردباری به تنش‌های محیطی بهبود می‌بخشند (۱۵ و ۳۷). به‌عنوان مثال این قارچ‌ها در جذب آب و عناصر غذایی به ویژه عناصر کم تحرک مانند فسفر نقش موثر داشته (۵۰) و نیز با تولید هورمون هایی مانند اکسین، سیتوکینین و اسید آبسیزیک در تحریک رشد گیاه نقش مهمی ایفا می‌کنند (۶). نوع قارچ ریشه می‌تواند تاثیرات متفاوتی در جذب و پالایش فلزات

۱، ۲، ۳ و ۴– به ترتیب دانشیاران، استادیار و فارغ‌التحصیل کارشناسی ارشد گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه
(*– نویسنده مسئول: Email: m.rsadaghiani@urmia.ac.ir)

سنگین داشته باشد برای مثال آووتوی و همکاران (۶) گزارش کردند که قارچ‌ریشه *G. intraradices* در جذب سرب و کادمیم توسط گیاه آفتابگردان کارایی بیش‌تری از قارچ‌ریشه *G. mosseae* دارا می‌باشد.

باکتری‌های محرک رشد گیاه گروه دیگری از ریزسازواره‌های مفید خاک می‌باشند که در شرایط مختلف از جمله آلودگی خاک‌ها به فلزات سنگین می‌توانند از طریق راهکارهای گوناگون از جمله تولید انواع ویتامین‌ها، اسیدهای آمینه، تولید آنزیم ACC دآمیناز، انحلال فسفات‌های نامحلول و تشکیل کمپلکس سیدروفور- آهن رشد و عملکرد گیاهان را می‌افزایند (۵ و ۴۷). هم‌چنین این باکتری‌ها موادی بنام تنظیم‌کننده‌های رشد تولید می‌کنند که به عنوان متابولیت‌های ثانویه، تاثیر مستقیم و غیرمستقیم بر مراحل فیزیولوژیک گیاهان دارند (۲). داری و همکاران (۱۸) گزارش کردند که مایه‌زنی گیاه لوبیا با *Pseudomonas sp.* سبب افزایش زیس توده این گیاه در خاک‌های آلوده به سرب شد.

تاکنون مطالعات مختلفی در دنیا تأثیر مایه زنی میکروبی در افزایش جذب فلزات سنگین در گیاهان مختلف بررسی شده است اما در زمینه تأثیر مایه‌زنی میکروبی در ویژگی‌های فیزیولوژیکی گیاهان بویژه انواع مرتعی خودرو و غیر خوش‌خوراک برای احشام نظیر گیاه خارزن‌بابا، در خاک‌های آلوده به فلز کادمیم مطالعات چندانی انجام نشده است. بنابراین هدف از این پژوهش بررسی تأثیر مایه‌زنی میکروبی شامل PGPR و AMF در جذب کادمیم، جذب آهن و روی، ارتفاع، عملکرد و برخی ویژگی‌های فیزیولوژیکی گیاه خارزن‌بابا در یک خاک آلوده به کادمیم بود.

مواد و روش‌ها

برای انجام این تحقیق از یک نمونه خاک در منطقه نازلو واقع در استان آذربایجان غربی نمونه‌برداری شد .این خاک پس از هواخشک شدن به دو بخش تقسیم گردید. در بخش کوچک‌تر از ۲ میلی‌متر، برخی ویژگی‌ای فیزیکی و شیمیایی خاک به روش‌های استاندارد اندازه‌گیری شد (۱۳). بخش دوم نمونه‌های پس از عبور از الک پنج میلی‌متری با غلظت‌های مختلف کادمیم (با توجه به حدود غلظت مجاز کادمیم در خاک) شامل صفر، ۱۰، ۳۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلو- گرم خاک آلوده گردید. برای آلوده کردن، ابتدا مقدار لازم نیترات کادمیم $Cd(NO_3)_2$ جهت آلوده کردن جرم مشخصی از خاک محاسبه شد. نیتروژن افزوده شده به خاک توسط نمک نیترات کادمیم، با افزودن مقادیر محاسبه شده اوره به تیمارهای مختلف تصحیح شد. سپس، جرم محاسبه شده‌ی نمک به یک کیلوگرم از خاک افزوده شد و کاملا" با آن مخلوط گردید تا پیش ماده‌ای همگن بدست آید. این پیش ماده‌ی آلوده سپس به طور کامل با توده خاک مخلوط گردید. سپس خاک‌های آلوده در جعبه‌های پلاستیکی بدون زهکش در معرض دوره‌های متناوب‌تر و خشک شدن قرار گرفتند. خاک آلوده به مدت ۵ ماه در معرض تناوب‌های تر و خشک شدن قرار گرفت که تا حد امکان بر همکنش‌های آلاینده و خاک تکوین یافته و شرایط آلودگی طبیعی‌تر باشد (۴۱). نمونه‌های خاک آلوده شده در اتوکلاو در دو نوبت در دمای ۱۲۱ درجه سانتی- گراد و فشار ۱/۵ بار در داخل کیسه‌های کنفی استریل شدند. گلدان‌ها نیز با الکل استریل سطحی شدند. خاک‌های استریل در گلدان‌هایی با ظرفیت تقریبی ۲/۵ کیلوگرم ریخته شدند. برای اعمال تیمارهای میکروبی، در تیمارهای مربوط به قارچ‌ریشه آربوسکولار قبل از کشت، در زیر بذرها مقدار ۷۰ گرم از زادمایه بصورت لایه‌ای به ضخامت تقریبی ۲ سانتی‌متر اضافه شد. تیمار قارچ‌ریشه‌ای شامل ترکیبی از زادمایه قارچ‌ریشه‌های جنس گلوموس (*Glomus*) و از گونه‌های *G. mosseae*، *G. intraradices* و *G. fasciculatum* بودند. تعداد کل اسپورهای قارچی زادمایه، به‌روش الک مرطوب و سپس استفاده از گرادیان ساکارز (۲۴)، ۲۵۰ اسپور در هر ۵۰ گرم زادمایه بود. برای تیمار باکتریایی مقدار ۱۵ میلی‌لیتر از محیط کشت مایع Nutrient Broth حاوی باکتری‌ها به گلدان‌ها تلقیح گردید. تیمار باکتریایی شامل ترکیبی از باکتری‌های جنس سودوموناس فلورسنت از سه گونه پوتیدا (*P. putida*)، فلورسنس (*P. fluorescens*) و آئروژینوزا (*P. aeruginosa*) بود که به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی- گراد در انکوباتور در محیط کشت مایع Nutrient Broth رشد کرده بودند. جمعیت این باکتری‌ها حدود ($CFU\ ml^{-1}$) $۲/۶ \times ۱۰^{۸}$ بود. پس از اعمال تیمارها کشت گیاهان انجام شد. آزمایش به‌صورت فاکتوریل با دو فاکتور غلظت کادمیم (در چهار سطح) و تیمار میکروبی (در سه سطح) در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی و در سه تکرار در شرایط گلخانه انجام شد. پس از رساندن رطوبت گلدان‌ها به ظرفیت زراعی و اعمال تیمارها در هر گلدان ۶ تا ۸ بذر (ضد عفونی سطحی شده) گیاه خارزن‌بابا با فواصل منظم در گلدان‌های مورد نظر کشت گردید. پس از جوانه زدن بذرها، ۲-۳ تا از بوته‌های سالم‌تر و قوی‌تر نگه‌داری شدند . پس از آبیاری گلدان‌ها تا حد ظرفیت زراعی، وزن هر گلدان بر روی آن یادداشت شد تا در مراحل بعدی از هر گونه تنش رطوبتی جلوگیری گردد. گلدان‌ها در شرایط گلخانه با دمای حداقل ۱۵ و حداکثر ۳۰ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند.

در پایان ماه پنجم رشد، بخش هوایی گیاهان از رویه خاک بریده شدند. شاخساره‌های گیاهان پس از شستشو با آب مقطر، به مدت ۷۲ ساعت در آون و در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد خشک شدند. سپس، نمونه‌ها برای تعیین عملکرد ماده خشک توزین و با آسیاب پودر شدند. ریشه‌های گیاهان نیز به آرامی از خاک گلدان‌ها جدا شده و پس از شستشو با آب مقطر و خشک کردن، به درون پاکت‌های کاغذی منتقل شدند. برای ارزیابی اثرات آلودگی کادمیمی خاک و مایه‌زنی میکروبی، ماده خشک گیاه، عملکرد نسبی ماده خشک شاخساره آن

نیز به صورت زیر محاسبه شد:

$$RY = \frac{Y_i}{Y_0} \quad (۱)$$

که در آن RY عملکرد نسبی گیاه ، Yi عملکرد ماده خشک گیاه در هر تیمار و Y_0 عملکرد ماده خشک گیاه در شرایط بدون کادمیم و در تیمار شاهد (بدون مایه‌زنی با میکروب‌ها) (۴۲).

برای رنگ‌آمیزی ریشه‌های میکوریزایی موجود در خاک‌های آلوده از روش فیلیپس و هایمن استفاده شد (۵۳). در این روش، ابتدا درون یک پتری ریشه‌ها به خوبی توسط آب شستشو داده شده و سپس جهت شفاف‌سازی، قطعات ریشه به مدت ۴۵ دقیقه در محلول هیدروکسید پتاسیم ۱۰ درصد در بن ماری در حال جوشیدن قرار داده شدند. در مرحله بعد ریشه‌ها ۴ تا ۵ بار با آب مقطر شسته شده تا اثر محلول پتاسیمی به خوبی از ریشه‌ها خارج شود. قطعات ریشه به مدت ۵-۳ دقیقه در محلول اسید کلریدریک ۱ درصد قرار گرفتند. برای رنگ‌آمیزی، قطعات ریشه در محلول ۰/۰۵ درصد تریپان بلو در لاکتوگلیسرول به مدت ۴۵ دقیقه در بن ماری قرار گرفتند. رنگ‌بری ریشه‌ها در محلول لاکتوگلیسرول انجام گرفت. درصد همزیستی طول ریشه با روش تقاطع خطوط شبکه تعیین گردید (۲۴).

در این پژوهش از روش اکسیداسیون تر برای عصاره گیری کادمیم، آهن و روی کل از گیاه استفاده شد (۲۶) و سپس غلظت سرب، آهن و روی با دستگاه جذب اتمی اسپکترومتری (Shimadzu 6300 AA) اندازه‌گیری شد. به منظور بررسی تأثیر تنش کادمیم در گیاه و هم چنین تأثیر PGPR و AMF در این زمینه مقادیر ویژگی-های فیزیولوژیکی اندازه گیری شد. برای اندازه‌گیری مقادیر کلروفیل-ها و کاروتنوئیدها (کاروتن و گزانتوفیل) از روش لیچن تالر و ولبرن (۴۶) استفاده شد. هم‌چنین برای اندازه‌گیری میزان نسبی آب برگ (RWC)، از روش یانوملو و همکاران (۶۴) استفاده شد و با استفاده از رابطه ۲ برای محاسبه درصد RWC استفاده شد:

$$RWC = \frac{FW - DW}{TW - DW} * 100 \quad (۲)$$

که در آن FW، DW و TW به ترتیب وزن برگ تازه، وزن برگ خشک و وزن برگ پس از تورژسانس می‌باشند (۶۴). تجزیه و تحلیل آماری داده‌های با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS انجام شد. مقایسه میانگین داده‌ها نیز با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن و در سطح احتمال پنج درصد انجام شد.

نتایج و بحث

ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک

جدول ۱ برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک مورد مطالعه را نشان می‌دهد. این خاک دارای بافتی متوسط pH آن در محدوده خاهای آهکی، کمی شور و غیرسدیمی بود. خاک مورد مطالعه با توجه به حدود مجاز گزارش شده در منابع (۱۲) غیرآلوده به فلزات سنگین بود.

عملکرد و ارتفاع گیاه

با افزایش غلظت کادمیم در خاک، عملکرد و عملکرد نسبی شاخساره‌ی گیاه در تمامی تیمارها به طور معنی‌داری ($P\leq ۰/۰۵$) کاهش یافت (جدول ۲). در هر سطح از غلظت کادمیم در خاک، مقادیر ماده خشک شاخساره گیاه در تیمارهای AMF و PGPR به طور معنی‌داری ($P\leq ۰/۰۵$) بیش‌تر از تیمار شاهد بود. همچنین در هر سطح از غلظت کادمیم در خاک، مقادیر ماده خشک شاخساره در تیمار AMF بیش‌تر از تیمار PGPR بود.

کادمیم در گیاهان سبب توقف رشد و کلروزه شدن برگ‌های گیاهان، کاهش و توقف رشد ریشه، چوب پنبه-ای شدن و صدمه به ساختمان خارجی و داخلی ریشه، کاهش هدایت هیدرولیکی آب در ریشه می‌شود (۴۸). تنش‌های محیطی مثل فلزات سنگین سبب افزایش تولید اتیلن در گیاه و به ویژه اندوزش آن در ریشه می‌شوند که به اتیلن تنشی مشهور است. افزایش بیش از حد اتیلن، اثری بازدارنده‌ای بر رشد و نمو گیاه دارد. در نتیجه با پایین آوردن سطح اتیلن در گیاه می‌توان رشد گیاه را بهبود بخشید. احتمالاً تلقیح باکتری‌های محرک رشد گیاه تولید اتیلن ناشی از تنش فلزات سنگین در گیاه را کاهش داده و موجب افزایش زیست توده گیاهی و ارتفاع گیاه می‌شود (۱). باکتری‌های حاوی آنزیم تجزیه کننده پیش ساز اتیلن (ACC)، با مصرف این ماده تولید اتیلن را کاهش داده و از این طریق رشد گیاه را می‌افزایند. قارچ ریشه‌های آربوسکولار به دلیل داشتن شبکه‌ای از هیف‌ها می‌توانند جذب عناصر غذایی به ویژه فسفر را توسط گیاه افزایش دهند که در نتیجه آن با بهبود شرایط تغذیه‌ای گیاه، وزن خشک اندام‌های هوایی و برخی از پارامترهای رشد افزایش می‌یابد (۴۵).

با افزایش غلظت کادمیم در خاک، ارتفاع گیاه در همه تیمارها به-طور معنی‌داری ($P\leq ۰/۰۵$) کاهش یافت. ارتفاع گیاه خارزن‌بابا در غلظت‌های مختلف بدین ترتیب بود: AMF> PGPR > شاهد. ارتفاع گیاه در تیمارهای AMF و PGPR بطور معنی‌داری ($P\leq ۰/۰۵$) بیش‌تر از تیمار شاهد بود. بنابراین می‌توان رشد بهتر گیاهان میکوریزایی را مربوط به بهبود وضعیت تغذیه‌ای گیاه و دسترسی عناصر غذایی دانست، چون فسفر موجب رشد بیشتر گیاه میزبان می-گردد (۳۹ و ۵۸).

جدول ۱- برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی اولیه خاک مورد مطالعه
Table 1- Selected physico-chemical properties of studied soil

Property	ویژگی	واحد Unit	مقدار Value
Sand	شن	$g\ kg^{-1}$	323
Silt	سیلت	$g\ kg^{-1}$	403
Clay	رس	$g\ kg^{-1}$	274
Soil texure	کلاس بافتی خاک		لوم
Organic mater	مواد آلی	$g\ kg^{-1}$	26.9
Cation exchange capacity (CEC)	ظرفیت تبادل کاتیونی	$cmolc\ kg^{-1}$	22.1
Electrical conductivity (EC)	هدایت الکتریکی عصاره اشباع خاک	$dS\ m^{-1}$	2.5
Exchangeable Sodium Percentage (ESP)	درصد سدیم تبادلی	%	3
Calcium Carbonate Equivalent. (CCE)	کربنات کلسیم معادل	%	30.5
pH	pH		8.1
Soluble Ca^{2+}	کلسیم محلول	$mg\ kg^{-1}$	0.53
Soluble Mg^{2+}	منیزیم محلول	$mg\ kg^{-1}$	0.18
Soluble Na^{+}	سدیم محلول	$mg\ kg^{-1}$	10.47
Soluble K+	پتاسیم محلول	$mg\ kg^{-1}$	0.0
Soluble HCO_3^-	بی‌کربنات محلول	$mg\ kg^{-1}$	2.46
Soluble Cl^-	کلر محلول	$mg\ kg^{-1}$	6.68
Soluble SO_4^{2-}	سولفات محلول	$mg\ kg^{-1}$	1.67
Total Pb	کل سرب	$mg\ kg^{-1}$	21.42
Total Cd	کل کادمیم	$mg\ kg^{-1}$	1.47
Total Fe	کل آهن	$mg\ kg^{-1}$	295.5
Total Zn	کل روی	$mg\ kg^{-1}$	62
Total Cu	کل مس	$mg\ kg^{-1}$	14.11

CEC: ظرفیت تبادل کاتیونی؛ ECe: هدایت الکتریکی عصاره اشباع خاک؛ ESP: درصد سدیم تبادلی؛ CCE: کربنات کلسیم معادل

افزایش فسفر احتمالا" زیست توده گیاه را افزایش داده و ممکن است اثرات سمی فلز را با رقیق کردن، ته نشین کردن یا جذب سطحی فلز روی گرانول‌های پلی فسفات کاهش دهد (۶۲). همچنین گزارش شده است PGPR می‌توانند رشد گیاهان را در خاک‌های آلوده از طریق افزایش جذب عناصر غذایی به‌ویژه فسفر، تولید هورمون‌های افزاینده رشد گیاه، تاثیر بر ترشحات ریشه می‌افزایند (۶۱).

تنفس پایه میکروبی

با افزایش غلظت کادمیم در خاک تنفس میکروبی پایه در ریزوسفر گیاه خارزن‌بابا به‌طور معنی‌داری ($P\leq ۰/۰۵$) کاهش یافت (جدول ۲). میزان تنفس میکروبی در تمام سطوح در تیمارهای میکروبی به‌طور معنی‌داری ($P\leq ۰/۰۵$) بیشتر از تیمار شاهد بود. به عبارت دیگر تلقیح میکروبی به طور موثر و معنی‌داری میانگین تنفس پایه را افزایش داد که علت آن را می‌توان به فعالیت بیشتر ریز جانداران خاک نسبت داد. شاید بتوان علت کاهش بیشتر تنفس میکروبی در غلظت‌های بالای کادمیم را به کاهش بیشتر زیست‌توده ریشه نسبت داد. لی و بانکز (۴۴) گزارش کردند فراوانی جمعیت میکروبی در حضور ریشه‌های گیاه، بیشتر از شرایط بدون حضور ریشه می‌باشد که نشان می‌دهد در خاک‌های آلوده ریشه گیاه با ترشحات خود (کربوهیدرات‌ها، آمینو اسیدها، ویتامین‌های ضروری و غیره) جمعیت میکروبی را افزایش می‌دهد. کاهش فعالیت میکروبی خاک بر اثر آلودگی، با نتایج مطالعات دیگر پژوهشگران نیز مطابقت دارد (۲۳ و ۵۱).

مقادیر کلروفیل‌ها و کاروتنوئید

محتوای کلروفیل a، b، کل و کاروتنوئید در گیاهان تلقیحی و غیرتلقیحی با افزایش غلظت کادمیم در خاک، کاهش معنی‌داری ($P\leq ۰/۰۵$) داشت. نتایج نشان داد که تیمارهای باکتریایی و میکوریزایی کلروفیل و کاروتنوئید بیشتری نسبت به تیمارهای شاهد داشتند (جدول ۳).

جدول ۲- مقایسه میانگین عملکرد، عملکرد نسبی، ارتفاع شاخساره و تنفس پایه در سطوح مختلف کادمیم در خاک در تیمارهای شاهد، PGPR و AMF

Table 2- Mean comparison of yield, relative yield, shoot height and base respiration at different levels of soil Cd in control, PGPR and AMF treatments

کل کادمیم افزوده شده به خاک Added Cd to soil (mg kg^{-1})	شاهد (Control)	PGPR	AMF
	عملکرد شاخساره Shoot yield (g pot^{-1})		
0	0.47± 0.05 ^{b,a}	0.82± 0.07 ^{a,a}	0.93± 0.11 ^{a,a}
10	0.29± 0.07 ^{c,b}	0.53± 0.02 ^{b,b}	0.79± 0.09 ^{a,a}
30	0.16± 0.03 ^{b,c}	0.41± 0.08 ^{a,c}	0.58± 0.11 ^{a,b}
100	0.05± 0.02 ^{c,d}	0.22± 0.02 ^{b,d}	0.30± 0.02 ^{a,c}
	عملکرد نسبی شاخساره گیاه Shoot relative yield (g pot^{-1})		
0	1.00± 0.00 ^{b,a}	1.74± 0.21 ^{a,a}	1.97±0.15 ^{a,a}
10	0.61± 0.10 ^{c,b}	1.12±0.09 ^{b,b}	1.67±0.04 ^{a,a}
30	0.35±0.08 ^{b,c}	0.88± 0.08 ^{a,b}	1.24 ± 0.28 ^{a,b}
100	0.13± 0.03 ^{b,d}	0.46± 0.02 ^{a,c}	0.63± 0.12 ^{a,c}
	ارتفاع Plant height (cm)		
0	7.5± 0.8 ^{c,a}	11.2± 1.2 ^{b,a}	16±1.0 ^{a,a}
10	6.4± 0.2 ^{b,a}	6.5±1.0 ^{b,b}	15.5±1.3 ^{a,a}
30	6.0±0.3 ^{b,a}	6.0± 0.6 ^{b,b}	11.2 ± 2.6 ^{a,b}
100	4.1± 1.3 ^{b,b}	4.3± 0.6 ^{b,c}	7.6± 0.8 ^{a,c}
	تنفس پایه Base respiration (mgCO_2 day^{-1}kg^{-1} soil)		
0	113.7± 7 ^{b,a}	219.6± 43 ^{a,a}	198.4±6 ^{a,a}
10	81.5± 6 ^{b,b}	128.3±1 ^{a,b}	119.2±14 ^{a,b}
30	43.3±7 ^{b,c}	117.6± 14 ^{a,b}	104.6 ± 3 ^{a,b}
100	17.1± 1 ^{b,d}	91.8± 11 ^{a,b}	94± 6 ^{a,bc}

حروف بالانویس اول و دوم بر روی هر عدد به ترتیب نشان دهنده اختلاف آماری در سطح احتمال ۵درصد در هر ردیف و هر ستون می باشند

میانگین های دارای حروف مشترک براساس آزمون چنددامنه ای دانکن اختلاف معنی داری آماری در سطح احتمال ۵درصد 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, using Duncan's multiple range test

با افزایش غلظت کادمیم در خاک، در همه تیمارها مقدار رنگدانه‌های فتوسنتزی شامل کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کاروتنوئید در گیاه خارزن‌بابا به‌طور معنی‌داری ($P\leq ۰/۰۵$) کاهش یافت. مقدار رنگدانه‌های فتوسنتزی گیاه خارزن‌بابا در غلظت‌های مختلف بصورت: PGPR<AMF> شاهد بود. مقدار رنگدانه‌های فتوسنتزی در تیمارهای AMF و PGPR در مقایسه با تیمار شاهد به‌طور معنی‌داری ($P\leq ۰/۰۵$) بیش‌تر بود. بالا بودن سطح کلروفیل در گیاهان تلقیحی را می‌توان به بالا بودن جذب فسفر بعنوان عامل انرژی در طی فرآیند فتوسنتز نسبت داد. چون فسفر باعث رشد بهتر گیاه میزبان می‌شود. از طرفی در گیاهان میکوریزایی، هیف‌های قارچی قادرند با نگهداری فلز در خود و عدم انتقال آن به سیستم گیاه باعث کاهش سمیت فلز سنگین شوند (۲۹). نتایج سایر محققان نیز افزایش در کلروفیل‌های a، b و کلروفیل کل را در برگ‌های *Prosopis juliflora* همزیست با *G. fasciculatum* نشان داد (۱۴).

بدیهی است با بالا بودن میزان کلروفیل a و b در گیاهان تلقیحی مقدار کلروفیل کل نیز بیشتر از تیمارهای شاهد خواهد بود (جدول ۳). کاهش مقدار کلروفیل در گیاهان تحت تنش فلزات سنگین، بعلت مهار مراحل مختلف بیوسنتز کلروفیل است (۳۹). مهار بیوسنتز کلروفیل احتمالا" بواسطه مهار سنتز دلتاآمینولوولینیک و مهار تشکیل پروتوکلروفیلید ردوکتاز است (۶۰). همچنین جایگزین شدن یون منیزیم مرکزی کلروفیل بوسیله فلزات سنگین صدمه دیگری است که باعث جلوگیری از به دام انداختن نور فتوسنتزی و در نتیجه از بین رفتن کلروفیل و کاهش فعالیت فتوسنتزی می‌شود (۵۲). کاهش مقدار کلروفیل در گیاهان تیمار شده با کادمیم نیز بعلت فعالیت آنزیم‌های تخریب کننده کلروفیل است (۵۴). وجود کادمیم در سلول‌های برگ باعث کاهش میزان کاروتنوئیدها می‌شود که در این تحقیق هم کاملاً این اثر مشاهده شد (جدول ۳). برهم‌کنش بین یون کادمیم و یون

منگنز درسلول می‌تواند دلیل احتمالی مهار انتقال الکترون در سطح کمپلکس شکست آب باشد که در نهایت باعث کاهش محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی کلروفیل و کاروتنوئید می‌شود (۵۲). کاهش کاروتنوئیدها بدلیل فرونشانی غیر فتوشیمیایی کلروفیل‌های برانگیخته است که توسط کاروتنوئیدها انجام و در نتیجه بر هم ریختن ساختارشان می‌گردد.

شاخص محتوای نسبی آب برگ

با افزایش غلظت کادمیم مقدار RWC در گیاه در همه تیمارها کاهش یافت (جدول ۳). هرچند این کاهش در تیمارهای AMF و PGPR گیاه معنی‌دار ($P\leq ۰/۰۵$) نبود ولی در تیمارهای شاهد این کاهش معنی‌دار بود که دلیل آن‌را می‌توان به غلظت بیش‌تر کادمیم و در نتیجه سمیت ناشی از آن نسبت داد. در کل مقدار RWC در گیاه در تیمارهای AMF و PGPR نسبت به تیمار شاهد به‌طور معنی‌داری ($P\leq ۰/۰۵$) بیش‌تر بود.

گزارشاتی مبنی بر ایجاد اختلال در جذب آب توسط کادمیم وجود دارد که نتیجه آن کاهش فشار تورگر است. این کاهش همراه با کاهش قابلیت ارتجاعی دیواره سلول باعث کوچک شدن سلول‌ها و کاهش فضای بین سلولی در گیاهان تحت تنش با کادمیم می‌باشد (۶۰). بیش‌تر بودن مقدار RWC در گیاهان تلقیح شده با AMF و PGPR نسبت به تیمار شاهد را می‌توان به افزایش جذب پتاسیم در این گیاهان نسبت داد.

جدول ۳- مقایسه میانگین ویژگی‌های فیزیولوژیکی گیاه در سطوح مختلف کادمیم در خاک در تیمارهای شاهد، PGPR و AMF

Table 3- Mean comparison of plant physiological properties at different levels of soil Cd in control, PGPR and AMF treatments

کل کادمیم افزوده شده به خاک Added Cd to soil (mg kg^{-1})	شاهد (Control)	PGPR	AMF
	کلروفیل a Chlorophyll a (mg g^{-1}FW)		
0	2.90± 0.27 ^{b,a}	3.49± 0.36 ^{ab,a}	3.68± 0.17 ^{a,a}
10	2.13± .048 ^{b,b}	2.49±0.35 ^{ab,ab}	3.06± 0.24 ^{a,b}
30	1.46± 0.20 ^{b,bc}	2.11± 0.25 ^{a,b}	2.10± 0.16 ^{a,c}
100	1.04± 0.07^{b,c}	1.53± 0.21 ^{a,c}	1.60± 0.07^{a,d}
	کلروفیلb Chlorophyll b (mg g^{-1}FW)		
0	1.13± 0.33 ^{b,a}	2.02± 0.19 ^{a,a}	0.94± 0.14 ^{b,a}
10	0.43± 0.22 ^{b,b}	1.69± 0.22 ^{a,b}	0.49± 0.14 ^{b,b}
30	0.18± 0.05 ^{b,b}	1.24± 0.11 ^{a,c}	0.34± 0.14 ^{b,b}
100	0.26± 0.15 ^{b,b}	0.68± 0.03 ^{a,d}	0.28± 0.03 ^{b,b}
	کلروفیل کل Total Chlorophyll (mg g^{-1}FW)		
0	4.02± 0.23 ^{b,a}	5.51± 0.42 ^{a,a}	4.61± 0.3 ^{b,a}
10	2.92± 0.15 ^{b,b}	3.82±0.32 ^{a,b}	3.55± 0.21 ^{a,b}
30	2.29± 0.23 ^{b,c}	2.70± 0.3 ^{a,c}	2.45± 0.07 ^{ab,c}
100	1.79± 0.09 ^{a,d}	1.72± 0.08 ^{a,d}	1.88± 0.08^{a,d}
	کاروتنوئید Cartenoids (mg g^{-1}FW)		
0	1.06± 0.25 ^{a,a}	1.25± 0.20 ^{a,a}	1.07± 0.70 ^{a,a}
10	1.13± 0.07 ^{a,a}	1.23±0.08 ^{a,a}	1.01± 0.10 ^{a,ab}
30	0.68± 0.09 ^{b,b}	1.02± 0.03 ^{a,b}	1.00± 0.05 ^{a,ab}
100	0.60± 0.10 ^{b,b}	1.00± 0.01 ^{a,b}	0.91± 0.03^{a,b}
	RWC (%)		
0	71.6± 11.7 ^{a,a}	81.2± 9.1 ^{a,a}	78.7± 2.2 ^{a,a}
10	72.6± 5.2 ^{a,a}	82.5±7.8 ^{a,a}	78.9± 9.2 ^{a,a}
30	75.2± 5.2 ^{a,a}	81.2± 5.8 ^{a,a}	74.1± 8.1 ^{a,a}
100	69.6± 2.5^{b,a}	88.3± 1.1 ^{a,a}	78.9± 7.5^{ab,a}

حروف بالانویس اول و دوم بر روی هر عدد به ترتیب نشان دهنده اختلاف آماری در سطح احتمال ۵درصد در هر ردیف و هر ستون می باشند

میانگین های دارای حروف مشترک براساس آزمون چنددامنه ای دانکن اختلاف معنی داری آماری در سطح احتمال ۵درصد 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, using Duncan's multiple range test

چرا که پتاسیم در تنظیم فشار تورژسانس و گسترش سلول‌های برگ و نیز افزایش فعالیت آنزیم‌های از بین برنده‌ی گونه‌های فعال اکسیژن در شرایط تنش‌های محیطی می‌باشد. نتایج مشابهی توسط محققان دیگر در مورد افزایش محتوای نسبی آب برگ بدنبال تلقیح قارچ آربوسکولار میکوریزا و باکتری‌های محرک رشد در شرایط تنش‌های محیطی (شوری) گزارش شده است (۵۹).

غلظت روی، آهن و مس

با افزایش غلظت کادمیم در خاک، غلظت آهن، روی و مس در شاخساره‌ی گیاه در همه تیمارها به‌طور معنی‌داری ($P\leq ۰/۰۵$) کاهش یافت (جدول ۴). غلظت آهن در شاخساره‌ی گیاه بدین ترتیب بود AMF>PGPR> شاهد. غلظت آهن در تیمارهای PGPR و AMF در هر دو گیاه به‌طور معنی‌داری ($P\leq ۰/۰۵$) بیش‌تر از تیمار شاهد بود. غلظت‌های بالای کادمیم اثرات سوء بر رشد گیاهان دارد. کاستا و اسپیتز (۱۷) بیان کردند که کادمیم موجب کاهش رشد گیاه می‌شود. اختلال در رشد گیاه می‌تواند به دلایل متعددی از جمله کاهش آب یاخته و کشسانی دیواره یاخته (۱۷)، اختلال در تعادل آبی گیاه به دلیل کاهش اندازه و تعداد آوندهای چوبی (۸)، کاهش جذب عناصر غذایی ضروری مانند پتاسیم، کلسیم، منیزیم و آهن (۲۵) و کاهش تولید زیست توده به دلیل اختلال در فرآیندهای فتوسنتز، تنفس و متابولیسم نیتروژن (۷) در اثر غلظت‌های سمی کادمیم رخ داده باشد. همچنین معلوم شده است که گیاهان رشد یافته در مناطق آلوده به فلزات سنگین دارای کمبود آهن می‌باشند. تولید ترکیبات سیدروفور توسط باکتری‌های محرک رشد گیاه در ریزوسفر گیاهان می‌تواند در بدست آوردن آهن کارامد گیاه مفید باشد (۱۰ و ۶۳). سیدروفورهای میکروبی بعنوان عوامل کلات کننده آهن، زیست فراهمی آهن در ریزوسفر گیاهان را افزایش می‌دهند (۹).

جدول ٤- مقایسه میانگین غلظت کادمیم، آهن، روی و مس شاخساره در سطوح مختلف کادمیم در خاک در تیمارهای شاهد، PGPR و AMF

Table 4- Mean comparison of shoot Cd, Fe, Zn and Cu concentration at different levels of soil Cd in control, PGPR and AMF treatments

کل کادمیم افزوده شده به خاک Added Cd to soil (mg kg^{-1})	شاهد (Control)	PGPR	AMF
	غلظت کادمیم شاخساره Shoot Cd concentration (mg kg^{-1})		
0	1.4± 0.2 ^{c,b}	2.9± 0.3 ^{a,b}	1.9± 0.2 ^{b,c}
10	36.0± 5.7 ^{b,a}	53.6±20.8 ^{a,a}	29.2± 3.9 ^{c,b}
30	43.9± 13.3 ^{a,a}	51.9± 6.8 ^{a,a}	30.0± 1.5 ^{a,b}
100	40.2± 7.7 ^{a,a}	61.6± 6.9 ^{a,a}	38.6± 2.2 ^{a,a}
	غلظت آهن شاخساره (mg kg^{-1}) Fe concentration (mg kg^{-1})		
0	87.6± 0.01 ^{a,a}	93.2± 7.8 ^{a,a}	116.9± 16.8 ^{a,a}
10	60.5± 5.4 ^{c,b}	74.4±7.7 ^{b,ab}	83.6± 5.7 ^{a,b}
30	42.0± 4.5 ^{a,c}	62.3± 7.9 ^{a,b}	72.2± 9.2 ^{a,b}
100	19.5± 2.1^{a,d}	27.6± 1.9 ^{a,c}	29.7± 5.3^{a,c}
	غلظت روی شاخساره (mg kg^{-1}) Zn concentration (mg kg^{-1})		
0	30.4± 5.9 ^{a,a}	28.0± 9.3 ^{a,a}	36.7± 3.1 ^{a,a}
10	17.6± 7.4 ^{a,ab}	29.0±0.5 ^{a,a}	31.3± 4.6 ^{a,ab}
30	9.4± 0.8 ^{c,b}	22.8± 0.9 ^{b,a}	29.1± 0.5 ^{a,b}
100	5.4± 0.3^{b,b}	23.5± 0.01 ^{a,a}	20.7± 5.1^{a,c}
	غلظت مس شاخساره (mg kg^{-1}) Cu concentration (mg kg^{-1})		
0	11.0± 0.5 ^{b,a}	12.3± 1.7 ^{ab,a}	14.8± 1.1 ^{a,a}
10	11.0± 0.6 ^{a,a}	11.7±1.7 ^{a,a}	11.9± 0.8 ^{a,ab}
30	5.6± 1.3 ^{a,b}	8.0± 0.5 ^{a,ab}	8.8± 1.4 ^{a,b}
100	2.3± 0.8 ^{b,c}	5.2± 0.4 ^{a,b}	4.7± 1.0 ^{a,c}

حروف بالانویس اول و دوم بر روی هر عدد به ترتیب نشان دهنده اختلاف آماری در سطح احتمال ۵درصد در هر ردیف و هر ستون می باشند

میانگین های دارای حروف مشترک براساس آزمون چنددامنه ای دانکن اختلاف معنی داری آماری در سطح احتمال ۵درصد 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, using Duncan's multiple range test

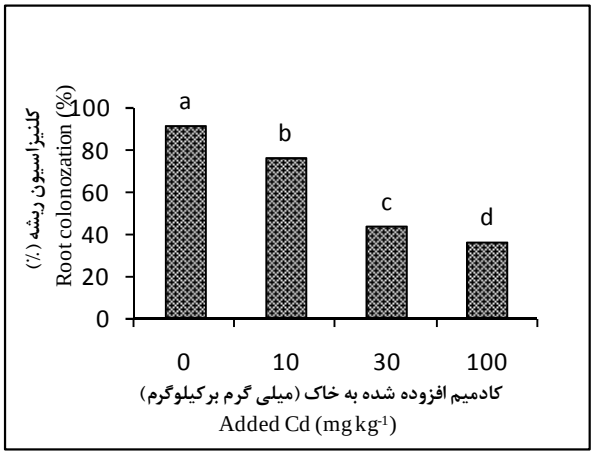
جلیل و همکاران (۳۲) بیان کردند که جذب بالای کادمیم منجر به بروز مشکلات ناشی از انتقال آهن، روی، مس و سایر عناصر کم مصرف در گیاه می‌شود. همچنین نشان دادند که در گیاهانی که تحت تنش ناشی از جذب بالای کادمیم قرار گرفته‌اند غلظت عناصر غذایی و بویژه آهن، روی و مس کاهش می‌یابد. حقیری (۲۷) اظهار داشت که جذب بالای کادمیم در محیط رشد، غلظت آهن، روی، مس و سایر عناصر کم مصرف را به دلیل کاهش سطح توسعه ریشه و کاهش متابولیسم گیاه مختل می‌نماید. قارچ‌های میکوریزی از طریق ترشح انواع از سیدروفورها و کلاته کردن آهن توانسته‌اند جذب و انتقال آهن به گیاهان بادام زمینی و سورگوم را افزایش دهند (۱۲). همچنین گونه‌های مختلف قارچ‌های میکوریزی نیز توانایی متفاوتی در جذب آهن از خود نشان می‌دهند (۱۵).

غلظت کادمیم

با افزایش غلظت کادمیم در خاک، غلظت کادمیم در شاخساره در همه‌ی تیمارها به‌طور معنی‌داری ($P\leq ۰/۰۵$) افزایش یافت (جدول ۴). غلظت کادمیم در شاخساره در تیمار PGPR در همه سطوح کادمیم در خاک، بیش‌تر از تیمار AMF بود. نوع جمعیت میکروبی (قارچ ریشه‌ها و PGPRها)، غلظت فلزات و نوع گیاه می‌توانند تاثیراتی متفاوت بر جذب و انتقال فلزات سنگین داشته باشد (۲۱، ۳۴ و ۴۹). هوانگ و همکاران (۳۱) با بررسی تاثیر قارچ میکوریز آربوسکولار بر جذب فلزات سنگین توسط ذرت بیان کردند که قارچ ریشه‌ها می‌توانند از گیاهان عالی در مقابل سمیت و غلظت بیش از حد مس، روی و سرب به کمک تغییر شکل دادن آن‌ها از فرم قابل دسترس به فرم غیر قابل دسترس محافظت کنند. در واقع تجمع مس و روی در ریشه ها و اندام هوایی گیاهان کلنی شده با قارچ‌ریشه به طرز معنی‌داری نسبت به گیاهان شاهد کمتر است، که این نتیجه بیان کننده آن است که قارچ ریشه‌ها در کاهش آلایندگی مس و روی جذب آنها در گیاهان عالی تاثیر بسزایی دارند (۳۱). معلوم شده است گیاهان قارچ ریشه‌ای در سطوح پایین در بدست آوردن عناصر کم مصرف مانند آهن، روی، مس و منگنز تواناتر از گیاهان بدون قارچ ریشه هستند ولی در سطوح بالای آلودگی گزارش‌ها ضد و نقیض می‌باشد (۱۶، ۲۰ و ۵۴). ویواس و همکاران (۶۱) نشان دادند که غلظت‌های کادمیم، مس، روی، منگنز بطور معنی‌داری در گیاهان قارچ ریشه‌ای نسبت به گیاهان بدون قارچ ریشه کمتر بود که این نتایج پیشنهاد می‌کند قارچ-هایی که تحمل بالایی نسبت به غلظت فلزات دارند می‌توانند برای اصلاح خاک‌ها مورد استفاده قرار گیرند. کاباتا–پندیاس (۳۳) بیان کردند که کادمیم جذب شده توسط گیاه بیشتر در ریشه تجمع می‌یابد. آنان اظهار داشتند که تجمع کادمیوم در ریشه ممکن است به علت تشکیل پیوند بین کادمیم و سولفیدریل و پروتئین‌هایی به نام فیتولکتین باشد.

درصد کلونیزاسیون ریشه

درصد کلونیزاسیون ریشه گیاه با افزایش غلظت کادمیم در خاک به طور معنی‌دار ($P\leq ۰/۰۵$) کاهش یافت (شکل ۱). کاهش کلونیزاسیون ریشه در شرایط تنش فلزات سنگین احتمالاً به‌عنوان یک راهکار سازگاری در شرایط سمیت فلزات سنگین معرفی شده است (۵۲). برخی پژوهش‌گران کاهش کلونیزاسیون ریشه را راهکاری برای محدود کردن جذب اضافی برخی از فلزات سنگین از طریق ریشه‌های قارچی گزارش کردند (۳۰).



شکل ۱- میانگین درصد کلونیزاسیون میکوریزی ریشه در سطوح مختلف کادمیم در خاک

Figure 1- Mean mycorrhizal root colonization at different levels of soil Cd

در حالی‌که برخی دیگر کاهش کلونیزاسیون ریشه‌ها را در نتیجه اثرات سمی فلزات سنگین روی اندام‌های قارچ‌ریشه‌های آربوسکولار بیان نموده‌اند (۴).

مطالعات نشان داده که عناصر سنگین بر کلونیزاسیون میکوریزی ریشه تأثیر منفی می‌گذارند (۳). در گزارشی کیم و همکاران (۴۳) نشان دادند که در حضور کادمیوم میزان آلودگی میکوریزی درختان کاج کاهش می‌یابد. اندوزش فلزات در ریشه‌ها و ساقه‌های گیاهان میکوریزی به میزان قابل توجهی نسبت به گیاهان غیرمیکوریزی بالاتر است. شرایط شیمیایی ریزوسفر در نتیجه روابط متقابل بین ریشه گیاهان و ریزجانداران ریزوسفری تغییر می‌یابد. فعل و انفعالات بین گیاه و قارچ می‌تواند منجر به افزایش تولید ترکیباتی گردد که خصوصیات شیمیایی خاک ریزوسفری و در نتیجه اندوزش فلزات سنگین را در گیاهان افزایش دهد (۲۸). در مطالعه دیگری با بررسی تاثیر همزیستی میکوریزی بر رشد گیاه ذرت در شرایط آلودگی کادمیوم و فسفر بالا نشان داده شد که کادمیوم رشد و گسترش هیف‌های قارچی و طول ریشه‌های آلوده را محدود نمود (۵۷).

نتیجه‌گیری

به طورکلی نتایج این تحقیق نشان داد هر چند با افزایش غلظت کادمیم در خاک مقادیر عملکرد شاخساره، غلظت عناصر آهن، مس، روی و کادمیم در شاخساره و همچنین ویژگی‌های فیزیولوژیک شامل رنگ‌دانه های فتوسنتزی و کاروتنوئیدها و RWC کاهش یافت اما مایه‌زنی با گونه‌های قارچ‌ریشه و باکتری‌های محرک رشد سبب شد که اثرات سمیت کادمیم بر این ویژگی‌ها به طور چشم‌گیری کاهش یابد. همچنین این مطالعه نشان داد که مایه‌زنی گونه‌های AMF تاثیر بیش‌تری در کاهش آسیب‌های فیزیولوژیکی ناشی از سمیت کادمیمی در گیاه گل خارزن‌بابا داشت.

منابع

1- Abou-Shanab R.A., Angle J.S., and Ghaney R.L. 2006. Bacterial inoculants affecting nickel uptake by *Alyssum murale* from low, moderate and high Ni soils. Soil Biology and Biochemistry, 38: 2886-2889.
2- Alipour Z., and Malakouti M.J. 2003. The role of plant growth promoting rhizobacteria on plant growth and health. Technical Buletin No. 309, Soil and Water Research Institute, 12 pp. (in Persian)
3- Andrade S.A., Silveira A.P., Jorge R.A., and Abreu M.F. 2008. Cadmium accumulation in sunflower plants influenced by arbuscular mycorrhiza. International Journal of Phytoremediation, 10: 1-13.
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 and Soil Pollution, 166: 31-47.
5- Arshad M, Saleem M., and Hussain S. 2007. Perspectives of bacterial ACC deaminase inphytoremediation. Trends Biotechnology, 25: 356–362.
6- Awotoye O.O., Adewole M.B., Salami A.O., and Ohiembor M.O. 2009. Arbuscular mycorrhiza contribution to the growth performance and heavy metal uptake of *Helianthus annuus* LINN in pot culture. African Journal Environment Science and Technology, 3: 157-163.
7- Balestrasse K.B., Gardey L., Gallego S.M., and Tomaro M.L. 2001. Response of antioxidant defence system in soybean nodules and roots subjected to cadmium stress. Australian Journal of Plant Physiology, 28: 497-504.
8- Barcelo J., and Poschenrieder C. 1990. Plant water relations as affected by heavy metal stress: A reaview. Journal of Plant Nutrition, 13: 1-37.
9- Bar-Ness E., Hadar Y., Chen Y., Shanzer A., and Libman J. 1992. Iron uptake by plant from microbial siderophores. Plant Physiology, 99: 1329-1335.
10- Burd G.I., Dixon D.G., and Glick B.R. 2000. Plant growth-promoting bacteria that decrease heavy metal toxicity in plants. Canadian Journal of Microbiology. 46: 237-245.
11- Cariny T. 1995. The Reuse of Contaminated Land. John Wiley and Sons Ltd. Publisher. P. 219.
12- Carneiro M.A.C., Siqueira J.O., and Moreira F.M.D. 2001. Establishment of herbaceous plants in heavy metal contaminated soils inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi. *Pesquisa* Agropecuaria Brasileira, 36: 1443-1452.
13- Carter M.R., and Gregorich E.G. 2008. Soil Sampling and Methods of Analysis (2nd ed). CRC Press. Boca Raton, FL. P.1204.
14- Chellappan P., and Selvaraj T. 2006. Arbuscular mycorrhizae: Adiverse personality. Review Paper. Central European Agriculture Journal. 7: 349-358.
15- Clark R.B., and Zeto S.K. 2000. Mineral acquisition by arbuscular mycorrhizal plants. Journal Plant Nutrition, 23: 867-902.
16- Colpaert J.V., and van Assche J.A. 1987. Heavy metal resistance in some ectomycorrhizal fungi. Functional Ecology, 1: 415-421.
17- Costa G., and Spitz E. 1997. Influence of cadmium on soluble carbohydrates, free amino acids, protein content of

in vitro cultured Lupinus albus. Plant Science, 128: 131-140.
18- 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. Hazard Mater, 177: 323-330.
19- Das P., Samantaray S., and Routm, G. R. 1997. Studies on cadmium toxicity in plants: a review. Environmental Pollution, 98: 29–36.
20- Dehn B., and Schüepp H. 1989. Influence of VA mycorrhizae on the uptake and distribution of heavy metals in plants.Agriculture Ecosystems and Environment. 29: 79–83.
21- Diaz G., Azcon-Aguilar C., and Honrubia M. 1996. Influence of arbuscular mycorrihza on heavy metal (Zn and Pb) uptake and growth of *Lygedum spartum* and *Anthyllis cytisoides*. Plant and Soil, 180: 241-249.
22- Gerdemann J.W., and Nicolson T.W. 1963. Spores of mycorrhizal endogone species extracted from soil by wet-sieving and decanting method. Transaction of British Mycological Society 46: 235-245.
23- Ghorbani N.R., Salehrastin N., and A. Moeini. 2002. Heavy metals affect the microbial populations and their activities. 17 th WCSS. Thailand, Symposium no. 54, paper no. 223: 1-11.
24- Giovannetti M., and Mosse B. 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. New Phytologist, 84: 489-500.
25- Gogorcena Y., Lucena J.J., and Abadia J. 2002. Effects of Cd and Pb in sugar beets plants grown in nutrient solution: Induced Fe deficiency and growth inhibition. Functional Plant Biology, 29: 1453-1464.
26- Gupta R.K. 2000.Soil, plant, water and fertilizer analysis.Agrobios, New Delhi, India. P: 438.
27- Haghiri F. 1973. Cadmium uptake by plants. Journal of Environmental Quality, 2: 93-96.
28- He L.Y., Chen Z.J., Ren G.D., Zhang Y.F., Qian M., and Sheng X.F. 2009. Increased cadmium and lead uptake of a cadmium hyperaccumulator tomato by cadmium-resistant bacteria. Ecotoxicology and Environmental Safety, 72: 1343-1348.
29- Horst V. 2004. Further root colonization by arbuscular mycorrhizal fungi in already mycorrhizal plants in suppressed after a critical level of root colonization. Journal of Plant Physiology, 161: 339-341.
30- Hovsepyan A., and Greipsson S. 2004. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on phytoextraction bycorn (*Zea mays*) of lead-contaminated soil. International Journal of Phytoremediation, 6: 305-321.
31- Huang Y., tao S.A., and Chen Y.j. 2005. The role of arbuscular mycorrhiza on change of heavy metal speciation in rhizosphere of maize in wastewater irrigated agriculture soil. *Journal* of *Environmental* Sciences, 17: 276-280.
32- Jalil A., Selles F., and Clarke J.M. 1994. Effect of cadmium on growth and uptake of cadmium and other elements by durum wheat. Journal of Plant Nutrition, 17: 1839-1858.
33- Kabata-Pendias A., and Pendias H. 1993. Biogeochemistry of trace elements. Wyd, Warszawa: 363. (In polish)
34- Kaldorf M., Kuhn A.J., Schröder W.H., Hildebrandt U., .and Bothe H. 1999. Selective element deposits in maize colonized by a heavy metal tolerance conferring arbuscular mycorrhizal fungus. Journal Plant Physiology, 154: 718-728.
35- Kamnev A.A., and Lelie D.V. 2000. Chemical and biological parameters as tools to evaluate and improve heavy metal phytoremediation. Bioscience Reports, 20: 239-258.
36- Karami A., and Zulkifli H.S.H. 2010. Phytoremediation of heavy metals with several efficiency enhancer methods. African Journal of Biotechnology, 9: 3689-3698.
37- 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.
38- Kazemalilou S., and Rasouli-Sadaghiani M.H. 2012. Effect of soil cadmium pollution on some physiological parameters of *Hyoscyamus* plant in presence/absence of growth-promoting microorganisms. Water and Soil Science, 22: 17-30. (in Persian with English abstract)
39- Khalighi A., and Khara J. 2008. The effect of AMF on oxidative stress and some growth and physiological parameters of wheat plant (Azar-2) under cadmium toxicity. Iranian Journal of Biology, 21: 216-230. (in Persian with English abstract)
40- Khan A.G. 2005. Role of soil microbes in the rhizospheres of plants growing on trace element contaminated soils in phytoremediation. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 18: 355-364.
41- Khodaverdiloo H., Rahmanian M., Rezapour S., Ghorbani Dashtaki S.h., 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.
42- Khodaverdiloo H.S., Ghorbani h., Dashtaki S.h., and Rezapour S. 2011. Lead and cadmium accumulation potential and toxicity threshold determined for land cress (*Barbarea verna*) and spinach (*Spinacia oleracea* L.). International Journal of Plant Production, 5: 275-281.
43- Kim C.G., Power S.A., and Bell J.N. 2004. Effects of host plant exposure to cadmium on mycorrhizal infection and soluble carbohydrate levels of *Pinus sylvestris* seedlings. Environmental Pollution, 131(2): 287-94.
44- Lee E., and Banks M.K. 1993. Bioremediation of petroleum contaminated soil using vegetation: A microbial study, Journal of Environmental Science and Health, 28: 2187.

45- Liao J.P., Lin X.G., Cao Z.H., Shi Y.Q. and Wong M.H.2003. Interactions between arbuscular mycorrhizae and heavy metals under sand culture experiment. Chemosphere, 50: 847-853.
46- Lichtenthaler H.K., and Wellburn A.R.1985. Determination of total carotenoids and chlorophyll a and b of leaf in different solvents. Biology Society Trans, 11: 591-592.
47- 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.
48- Malakouti M.J., and Homaee M. 2004. Soil fertility of arid and semi-arid regions, 2nd Edition, Tarbiat Modares University Press, Tehran, Iran, 482pp. (in Persian)
49- Malcová R., Rydlová J., and Vosátka M. 2003. Metal-free cultivation of Glomus sp. BEG 140 isolated from Mn-contaminated soil reduces tolerance to Mn. Mycorrhiza. 13: 151-157.
50- Marschner H., and Romheld, V. 1995. Strategies of plants for acquisition of iron. Plant and Soil, 165: 262-274.
51- Olga M., Jaromir K., and Jitka N. 2002. Some microbiological characteristics and enzymatic activities in soil polluted with heavy metals. 17 th WCSS, Thailand, Symposium no. 792: 1-7.
52- Oudeh M., Khan M., and Scullion J. 2002. Plant accumulation of potentially toxic elements in sewage sludge as affected by soil organic matter level and mycorrhizal fungi. Environmental Pollution. 6: 293–300.
53- Phillips J.M., and Hayman D.S. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. Transactions of the British Mycological Society Journal, 55: 158–161.
54- Prasad M., and Strazalka K.1999. Impact of heavy metals on phytosyntesis. Journal of Experimental Botany, 41: 314-320.
55- Rudawska M., and Leski T. 1998. Aluminium tolerance of different Paxillus involutus Fr. strains originating from polluted and non-polluted sites. Acta Societatis Botanicorum Poloniae, 67: 115-122.
56- Sanita d.I., Toppi L., and Gabbrielli R. 1999. Response to cadmium in higher plants: A review. Environ. Experimental Botany, 4: 105–130.
57- Sara A.L., Andrade D., Adriana P.D., and Silveira D. 2008. Mycorrhiza influence on maize development under Cd stress and P supply. Brazilian Journal of Plant Physiology, 20: 39-50.
58- Selispour M. 2003. Study on the effectiveness of microbial phosphate fertilizers contains phosphate-solubilizing microorganisms on yield and quality of corn in field condition. The 3rd Iranian national symposium on application of bio-material and proper use of fertilizers and pesticides in agriculture, 21-23 Feb. 2003, Tehran, Iran, 790pp. (in Persian)
59- Shirmardi M., Savaghebi G., Khavazi K., Farahbakhsh M. Rejali F., and Sadat A. 2010. Study on the interaction of mycorrhizal fungi and Pseudomonas on leaf water potential and yield of two sunflower genotypes in a saline soil. Iranian Journal of Soil and Water Research, 41: 221-228. (in Persian with English abstract)
60- Vassilev A., and Yordanov I. 1997. Reductive analysis of factors limiting growth of cadmium treated plants A review. Plant Physiology, 23: 14-133.
61- Vivas A., Biro B., Campos E., Barea J. M., and Azcon R. 2003. Symbiotic efficiency of autochthonous arbuscular mycorrhizal fungus (*G. mosseae*) and *Bacillus* sp. isolated from cadmium polluted soil under increasing cadmium levels. Environmental Pollution, 126:179-189.
62- Vogel-Mikus K., Drobne D., and Regvar M. 2005. Zn, Cd and Pb accumulation and arbuscular mycorrhizal colonization of pennycress (*Thlaspi praecox*) from the vicinity of a lead mine and smelter Slovenia. Environmental Pollution, 133: 233-242.
63- Wallace A., Wallace G.A., and. Cha J.W. 1992. Some modifications in trace elements toxicities and deficiencies in plants resulting from interactions with other elements and chelating agents. The special case of iron. Journal Plant Nutrition, 15: 1589-1598.
64- Yano-Melo A.M., Saggin O.J., and Maia L.C. 2003. Tolerance of mycorrhized banana (*Musa* sp. cv. Pacovan) plant lets to saline stress. Agriculture, Ecosystems and Environment, 95: 343–348.

Journal of Water and Soil
Vol. 30, No. 2, May.-Jun. 2016, p. 542-554

نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۰، شماره ۲، خرداد – تیر ۱۳۹۵، ص. ۵۵۴-۵۴۲

Influence of PGPR Bacteria and Arbuscular Mycorrhizal Fungi on Growth and some Physiological Parameters of *Onopordon acanthium* in a Cd-Contaminated Soil

M. H. Rasouli Sadaghiani[1*]- H. Khodaverdiloo[2]- M. Barin[3]- S. Kazemalilou[4]

Received: 26-10-2014
Accepted: 04-07-2015

Introduction: Heavy metals (HMs) are serious threat for environment due to their dangerous effects. These metals as contaminants that can be accumulated in soil and after absorption by plants, finally will be found in food chains. Cadmium (Cd) is one of the dangerous HMs that threats the health of plants, living organisms and human. Physicochemical remediation methods may cause large changes in different characteristics of soils . Recently environmental-friendly strategies including phytoremediation have been emphasized by researchers. Phytoremediation that refers to the use of plants and their assistance with microorganisms for remediation of contaminated soils is an effective and low cost method for reclamation of heavy metals polluted soils. The most important limitation of phytoremediation is low availability of heavy metals and sensitivity of plants to contamination. There are evidences that soil microbes can help to overcome these limitations through several ways. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) are known to enhance plant growth and survival in heavy metal contaminated soils through different mechanisms including producing promoting metabolites, auxin, siderophore and antibiotics. In this study the role of some strains of PGPR (a mixture of *Pseudomonas* species including *P. putida*, *P. fluorescens*, and *P. aeruginosa*) and AMF (a mixture of *Glomus* species including *G. intraradices*, *G. mosseae* and G. fasciculatum), on uptake and accumulation of Cd, Fe, Zn and Cu as well as some physiological properties of Onopordon (*Onopordon acanthium* L) were evaluated.

Materials and Methods:This study was carried out under greenhouse condition as a factorial experiment based on a randomized complete block design with two factors including Cd concentration (four levels) and microbial treatment (three levels) in three replications. Consequently, a soil was selected and spiked uniformly with different concentrations of Cd (0, 10, 30 and 100 mg Cd kg^{-1} soil) at greenhouse of agricultural college in Urmia University. The contaminated soils were then sterilized and subsequently inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi (a mixture of Glomose *species* including *G. intraradices*, *G. mosseae* and *G. fasciculatum*) and plant growth promoting rhizobacteria (a mixture of Pseudomonas *species* includeing *P. putida*, *P. fluorescens*, and *P. aeruginosa*). The seeds of Onopordon plants were grown in 2.5 kilogram pots under greenhouse condition. At the end of growing season the shoot dry weight, Cd, Fe, Zn and Cu concentration and element contents and some of physiological parameters of plant as well as microbial properties were analyzed. Furthermore, the effect of soil Pb level on population, activity and efficiency of the inoculated microbes was studied.

Results and Discussion: Significant difference was observed for plants' dry weights. At different Cd levels, the yield of inoculated plants was higher than that of control plants. Furthermore, at elevated Cd concentration, plant height, biomass, relative yield, chlorophyll a, b, carotenoids, relative water content (RWC) decreased significantly ($P < 0.05$), however, plants inoculated with plant growth promoting rhizobacteria and arbuscular mycorrhizal fungi showed considerable amount of dry matter, chlorophyll a, b as well as RWC. Mycorrizal and bacterial inoculation and Cd treatment also had significant effect on leaf photosynthetic pigments concentration and plant relative water content. In general, concentrations of photosynthetic pigments and RWC were higher in inoculated plants at every level of soil Cd. The microbial inoculation effectively decreased the inhibitory effects of Cd on plant growth. Shoot yield of arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth promoting rhizobacteria plants increased by 2.7 and 2.1 times as well as microbial respiration increased by 2.17 and 2.01 times compared to control treatment. The results showed inoculated plant absorbed more Cd than non-inoculated plants. Plant growth promoting rhizobacteria were more effective than arbuscular mycorrhizal fungi inoculation in shoot Cd concentration. Cd contamination reduced soil microbial population and basal respiration. Results showed that with increasing soil Cd concentration shoot Fe, Zn and Cu concentrations significantly decreased. Root

1, 2, 3 and 4- Associate Professors, Assistant Professor and Former MS.c. Student of Soil Science, Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Urmia University, Respectively
(*- Corresponding Author Email: m.rsadaghiani@urmia.ac.ir)

colonization rates decreased significantly with 10 mg kg^{-1} Cd addition for AMF treatments, and drastically with 100 mg kg^{-1} Cd added. Plant roots in the control and PGPR treatment were not colonized.

Conclusion: It is concluded that plant growth promoting rhizobacteria and arbuscular mycorrhizal fungi inoculation could be sustained and promoted plant growth in phytoremediation processes. Therefore, under Cd contamination it can be use PGPR and AMF as growth promoters and finally enhance phytoremediation efficiency.

Keywords*:* Cd Toxicity, Heavy Metals, Microbial Inoculation, *Onopordon acanthium*, Physiological Properties