تاثیر جدایه‌های محرک رشد گیاهی مقاوم به آرسنیک بر برخی ویژگی‌های فیزیولوژیک، رشد و تغذیه گیاه پونه در یک خاک آلوده به آرسنیک

لیلا حیدرپور[۱]، علی اشرف سلطانی طولارود[۲*]، اسماعیل گلی کلانپا[۳]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۲/۰۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۷/۰۳)

چکیده

تنش ناشی از فلزات سنگین یکی از مهم‌ترین انواع تنش‌ها در اکوسیستم خاک است که باعث کاهش تولید محصول در واحد سطح می‌گردد. یکی از مهم‌ترین روش‌های کاهش اثرات ناشی از تنش این فلزات استفاده از ریزجانداران محرک رشد گیاهی می‌باشد. به‌منظور انجام این تحقیق، یک آزمایش گلخانه‌ای به صورت طرح کاملاً تصادفی در یک خاک آلوده به فلز سمی آرسنیک با سه تکرار انجام شد. تیمارهای آزمایش شامل مایه‌زنی گیاه پونه با پنج جدایه برتر از نظر برخی ویژگی‌های محرک رشد گیاهی و مقاوم به آرسنیک و بدون مصرف مایه تلقیح بود. نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر مایه‌زنی گیاه پونه با جدایه‌های برتر بر مقدار پرولین در این گیاه معنی‌دار ($P\leq0.01$) شد. بیشترین میزان تجمع پرولین (۲/۳ $\mu g\ g^{-1}FW$) در گیاهان مایه‌زنی شده با جدایه‌ی AHG-6 و کمترین مقدار آن (۰/۴۳ $\mu g\ g^{-1}FW$) در گیاهان شاهد مشاهده گردید. کاربرد تمامی جدایه‌های محرک رشد مورد مطالعه بر میزان مقادیر کلروفیل a، b، کلروفیل کل، شاخص کلروفیل و کارتنوئیدها تأثیر معنی‌داری داشت و باعث افزایش چشمگیر این شاخص‌ها در گیاهان مایه‌زنی شده نسبت به شاهد گردید. مایه‌زنی گیاه پونه با جدایه‌های محرک رشد تأثیر چندانی در غلظت فسفر گیاه در مقایسه با شاهد نداشت و اختلاف معنی‌داری بین آنها مشاهده نشد. کاربرد تمام ریزجانداران محرک رشد باعث افزایش غلظت منیزیم در اندام هوایی گیاه پونه در مقایسه با شاهد شد، ولی فقط جدایه‌های AHG-5 و AHG-6 باعث افزایش معنی‌دار منیزیم ریشه گیاه پونه نسبت به شاهد شدند. در مورد کلسیم و پتاسیم استفاده از جدایه‌های محرک رشد توانست باعث افزایش غلظت این عناصر در ریشه و اندام هوایی گیاه پونه گردد، اما اختلاف معنی‌داری بین شاهد و برخی از تیمارها وجود نداشت. در این تحقیق تمامی جدایه‌های استفاده شده باعث افزایش معنی‌دار ($P\leq0.01$) وزن خشک اندام هوایی در گیاهان تیمار شده در مقایسه با گیاهان شاهد گردید. بیشترین مقدار این شاخص رشدی در گیاهان مایه‌زنی شده با جدایه AHG-6 مشاهده شد.

واژه‌های کلیدی: کلروفیل، کارتنوئیدها، پرولین، عناصر غذایی، فلز سمی

۱-دانش‌آموخته کارشناسی ارشد دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه محقق اردبیلی
۲-استادیار گروه علوم و مهندسی خاک دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه محقق اردبیلی (مکاتبه کننده)
۳-استادیار گروه علوم و مهندسی خاک دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه محقق اردبیلی
* پست الکترونیک: ali_soltani_t@yahoo.com

مقدمه

خاک به‌عنوان یکی از مهم‌ترین منابع طبیعی سهم بسیار قابل توجهی در زندگی بشر دارد. اما متأسفانه امروزه به روش‌های گوناگون در معرض نابودی قرار گرفته است. در دهه‌های اخیر آلودگی خاک به فلزات سنگین رو به افزایش بوده و در حال حاضر تقریبا ده درصد از خاک‌های کره زمین آلوده به این فلزات می‌باشد (Eijsackers, 2010). آلودگی خاک به فلزات سنگین نتیجه‌ی بسیاری از فعالیت‌های بشری نظیر معدن‌کاری، استخراج، ذوب فلزات، مصرف کودها، سموم، قارچ کش‌ها و غیره می‌باشد که سلامتی بشر و زیست بوم را به خطر می‌اندازد (Gavrilescu, 2004). با توجه به نقش عناصر سنگین در سیستم‌های بیولوژیکی، این عناصر به دو دسته ضروری و غیر ضروری تقسیم می‌شوند. عناصر ضروری شامل Fe، Mn، Zn، Cu و Ni عناصری هستند که موجودات زنده برای فعالیت‌های حیاتی فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی به آنها نیاز دارند (Cempel and Nikel, 2006; Gohre and Paszkowski, 2006) و عناصری که موجودات زنده برای فعالیت‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی به آن‌ها نیاز ندارد، مانند Cr، Hg، As، Pb و Cd عناصر سنگین غیر ضروری می‌باشند (Dabonne *et al*., 2010). آرسنیک یک شبه فلز سمی و غیرضروری با حالات اکسیداسیون متفاوت (۳، ۳+، ۵+ و ۰) بوده که به‌وسیله‌ی منابع طبیعی (آتشفشان‌ها) و منابع مصنوعی (حشره‌کش‌ها و علف‌کش‌ها) وارد محیط زیست می شود (Baroni *et al*., 2000). استفاده از آب‌های سطحی و زیرزمینی آلوده به آرسنیک جهت آبیاری مزارع کشاورزی، باعث افزایش غلظت این آلاینده در خاک شده و انتقال آن به بخش‌های مختلف گیاه را افزایش می‌دهد که در نتیجه منجر به مختل شدن رشد طبیعی گیاه با علائم سمیتی نظیر کاهش زیست‌توده، نکروزه شدن جوانه‌های برگی و کاهش میزان فتوسنتز می‌شود (Baker *et al*., 1976). بدیهی است که هرگاه غلظت آلاینده‌ها در محیط بسیار بیشتر از حد آستانه شود نابودی کامل گیاه را در پی خواهد داشت (Verma *et al*., 2001). از آشکارترین علائم سمیت آرسنیک در گیاهان، اختلالات فرایندهای متابولیکی، جایگزینی جذب مواد مغذی با آرسنیک و تغییر ساختار سلولی است. آرسنیک باعث کاهش میزان فتوسنتز، تعرق، مهار جوانه‌زنی، کاهش رشد، تخریب غشای کلروپلاستی و افزایش پر اکسیداسیون لیپیدها می‌گردد (Stoeva and Bineva, 2003).

ریزجانداران مفید موجود در ریزوسفر مانند باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه (PGPR)[1] می‌توانند با استفاده از مکانیسم‌های مختلفی از قبیل تولید فیتوهورمون‌های گیاهی مانند اکسین و سیتوکنین، افزایش زیست فراهمی عناصر غذایی مانند نیتروژن، فسفر، پتاسیم، روی و آهن از طریق تثبیت نیتروژن، تولید اسیدهای آلی و معدنی و تولید سیدروفور می‌توانند باعث توسعه تارهای کشنده و افزایش حجم ریشه، تسهیل جذب آب و عناصر غذایی و در نتیجه بهبود و افزایش رشد گیاه در حضور فلزات سنگین شوند (Glick, 1995). در خاک‌های آلوده به فلزات سنگین، سمیت ایجاد شده توسط این فلزات باعث کاهش شدید فعالیت جامعه زیستی خاک و نابودی ریزجانداران حساس می‌گردد. در نتیجه در این خاک‌ها تجزیه بقایای آلی (که یکی از منابع عمده عناصر غذایی برای گیاه است) چرخش و آزادسازی عناصر غذایی مورد نیاز گیاه دچار اختلال شده و معمولاً زیست فراهمی عناصر تغذیه‌ای به شدت کاهش می‌یابد. با این وجود در چنین خاک‌هایی، مصرف ریزجانداران متحمل به فلزات سنگین با ویژگی‌های صفات محرک رشد گیاهی، می‌تواند باعث بهبود زیست فراهمی عناصر غذایی و تأمین عناصر ضروری برای رشدگیاه در حضور فلزات سنگین گردد (Grichko *et al*., 2000; Rajkumar and Freitas, 2008). همچنین غلظت بالای فلزات سنگین در خاک‌های آلوده باعث می‌شود در بسیاری از گیاهان اتیلن تنشی تولید و باعث کاهش جذب آهن و در نتیجه اختلال در رشد گیاهان شوند. باکتری‌های محرک رشد با ترشح ACC- دآمیناز سطح اتیلن تنشی را در گیاهانی که در خاک‌های آلوده رشد کرده‌اند کاهش و باعث بهبود و افزایش رشد و توسعه گیاه می‌شوند (Glick, 2003). در یک تحقیق داری و همکاران (Dary *et al*., 2010) نشان دادند که تلقیح گیاه لوبیا با

1-Plant Growth Promoting Rhizobacteria

Pseudomonas sp سبب افزایش زیست‌توده این گیاه در خاک‌های آلوده به سرب گردید. بلیموو و همکاران (Belimov *et al*., 2005) گزارش کردند که باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد *Variovorax paradoxus* و *Flavobacterium* SP. سبب افزایش طول ریشه‌ی گیاهچه‌های خردل هندی در یک خاک آلوده به کادمیم شدند. در پژوهشی با موضوع پالایش خاک‌های آلوده به آرسنیک توسط پیازچه و کلم زینتی در حضور دو مایه تلقیح A (حاوی *Pseudomonas putida strain 4,11*) و مایه تلقیح B (حاوی *P. putida* strain 158 و *P. fluorescens* strain 169)، نتایج نشان داد که در هر دو گیاه تیمارهای تلقیح شده با مایه تلقیح B جذب آرسنیک را در مقایسه با مایه تلقیح A و شاهد به صورت معنی‌داری افزایش داد ($P<0.05$) و حداکثر جذب در تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم آرسنیک خاک اتفاق افتاد (Ladan, 2009).

با توجه به نقش باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد در بهبود رشد گیاهان در خاک‌های آلوده به فلزات سنگین، این تحقیق با هدف بررسی تأثیر جدایه‌های محرک رشد گیاهی و مقاوم به آرسنیک بر مقدار پرولین، رنگیزه‌های فتوسنتزی، غلظت فسفر، پتاسیم، کلسیم و منیزیم اندام هوایی و ریشه گیاه پونه در یک خاک آلوده به آرسنیک انجام شد.

مواد و روش‌ها

به‌منظور انجام این پژوهش یک آزمایش گلدانی در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در اتاقک رشد گروه علوم و مهندسی خاک دانشگاه محقق اردبیلی انجام شد. تیمارهای آزمایش شامل مایه‌زنی گیاه پونه با پنج جدایه برتر از نظر برخی صفات محرک رشد گیاهی و مقاوم به آرسنیک و عدم مصرف مایه تلقیح بود. پنج جدایه میکروبی استفاده شده در این تحقیق بر اساس صفات محرک رشد گیاهی (جدول ۱) و میزان مقاومت به آرسنیک (III) و (V) (جدول۲) از کلکسیون میکروبی دانشگاه محقق اردبیلی تهیه گردید. خاک مورد استفاده در این پژوهش از اطراف معدن صنعتی زرشوران شهرستان تکاب که آلوده به آرسنیک می‌باشد، از عمق ۲۰-۰ سانتی‌متر تهیه شد. مقداری از خاک تهیه شده پس از هوا خشک شدن و عبور از الک دو میلی‌متری برای تعیین برخی ویژگی‌های خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک استفاده شد. بافت خاک به روش هیدورمتری (Gee & Orr, 2002)، درصد رطوبت وزنی، ظرفیت زراعی، pH و EC در عصاره گل اشباع، کربنات کلسیم معادل بر اساس روش تیتراسیون برگشتی با اسید و باز، ماده آلی به روش والکلی و بلک (Walkly *et al*., 1934)، نیتروژن کل خاک به روش کجلدال (Bremener *et al*., 1982)، آرسنیک معادل کل به روش ریچاردز و استینهوس (Richards & Steenhuis,1998) و آرسنیک قابل دسترس به روش ونزل و همکاران (Wenzel *et al*., 2001) اندازه گیری شد.

آماده سازی مایه تلقیح

برای این منظور، مقداری از کلنی جدایه‌های مورد مطالعه به پنج ارلن مایر ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت BSMY اضافه گردید. ارلن مایرهای تلقیح شده روی شیکر با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه و دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از گذشت ۴۸ ساعت مایه تلقیح جدایه‌ها با جمعیت حدود 10^8 عدد در میلی‌لیتر آماده مصرف بود.

کشت گیاه و اندازه گیری شاخص‌های فیزیولوژیک و میزان عناصر غذایی

به منظور آماده‌سازی بستر کاشت گیاه، خاک آلوده به آرسنیک با غلظت ۸۹۷ میلی‌گرم در کیلوگرم پس از عبور از الک چهار میلی‌متری به گلدان‌های چهار کیلوگرمی منتقل گردید. ریزوم‌های گیاه پونه پس از مایه‌زنی با مایه تلقیح تهیه شده از ریزجانداران مورد مطالعه به تعداد چهار عدد در داخل هر گلدان کشت شدند. گلدان‌ها پس از کشت، به گلخانه با طول دوره روشنایی ۱۴ ساعت و با دمای متوسط ۲۲-۲۰ درجه سانتی‌گراد منتقل گردیدند. در طول دوره رشد، عملیات داشت شامل آبیاری و مبارزه با علف‌های هرز به‌طور دستی انجام گرفت. پس از گذشت ۷۵ روز از زمان رشد رویشی گیاهان برداشت شدند. برخی ویژگی‌های فیزیولوژیکی مانند پرولین به روش بیتس و همکاران (Bates *et al*., 1973)، میزان کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کارتنوئیدها در برگ تازه گیاه با روش لیچن تالر (Litchenthaler, 1987) و شاخص کلروفیل

با استفاده از دستگاه کلروفیل متر مدل SPAD-502 اندازه‌گیری شد. پس از برداشت، نمونه‌های گیاهی به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۶۵ درجه سیلسیوس در آون خشک شده و پس از اندازه‌گیری وزن خشک اندام هوایی با استفاده از یک ترازوی حساس دیجیتال، به صورت پودر درآمدند. برای اندازه‌گیری غلظت عناصر غذایی در اندام هوایی و ریشه پونه، یک گرم از نمونه گیاهی پودر شده داخل بوته چینی ریخته و به مدت دو ساعت در دمای ۵۵۰ درجه سیلسیوس در داخل کوره خاکستر گردیدند. سپس ۱۰ میلی‌لیتر اسید کلریدریک دو نرمال به بوته چینی حاوی خاکستر نمونه گیاهی اضافه شده و بوته چینی روی هیتر حرارت داده شد. پس از خنک شدن، محتوای بوته از کاغذ صافی عبور داده شده و به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسید (Jonze & Benton, 2001). سپس غلظت فسفر با دستگاه اسپکتوفتومتر در طول موج ۶۶۰ نانومتر (Olsen *et al.*,1982)، غلظت پتاسیم و کلسیم با دستگاه فلیم فتومتر قرائت شد. غلظت منیزیم با روش تیتراسیون با EDTA اندازه‌گیری گردید. غلظت آرسنیک در اندام هوایی گیاه پونه به روش ونزل و همکاران (Wenzel *et al.*, 2001) اندازه‌گیری شد.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS نسخه ۹/۱ و مقایسه میانگین‌ها نیز با آزمون چند دامنه‌ای دانکن صورت گرفت.

نتایج و بحث

برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک مورد مطالعه، صفات محرک رشد گیاهی و مقاومت به آرسنیک (III) و (V) جدایه‌های مورد استفاده در پژوهش حاضر به‌ترتیب در جداول ۱، ۲ و ۳ ارائه شده است. خاک مورد استفاده در این تحقیق دارای بافتی متوسط، کمی شور، آهکی و آلوده به آرسنیک بود (جدول ۱). جدایه‌های مورد مطالعه دارای توانایی تولید اکسین، سیدروفور، حل‌کنندگی ترکیبات کم محلول فسفر و روی و در نتیجه محرک رشد گیاه بودند (جدول ۲). همچنین این جدایه‌ها توانایی مقاومت در برابر فلز سمی آرسنیک را داشتند (جدول ۳).

جدول۱- برخی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک مورد مطالعه

Table 1: Some physical and chemical properties of the studied soil

EC	*$As_{(av)}$	$As_{(t)}$	P	K	pH	N	CCE	OC	Soil texture
ds m^{-1}	mg kg^{-1}					%			
2.51	0.188	897	16.7	123.44	7.4	0.01	10.96	0.25	Silt loam

As (av) آرسنیک استخراج شده با سولفات آمونیوم، As (t) آرسنیک کل، CCE کربنات کلسیم معادل، OC ماده آلی

OC: Organic Matter, CCE: Calcium Carbonate Equivalent, As (t): Total arsenic, As (av): ammonium sulfate extractable arsenic

پرولین و رنگیزه‌های فتوسنتزی

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که مایه-زنی گیاه پونه با جدایه‌های مورد مطالعه به‌طور معنی-داری ($P\leq0.01$) میزان پرولین آزاد برگ را تحت تأثیر قرار داد (جدول ۴). بیش‌ترین میزان این متابولیت (۲/۳ میکروگرم بر گرم وزن تازه) در تیمار AHG-6 و کم‌ترین مقدار آن (۰/۴۳ میکروگرم بر گرم وزن تازه) در تیمار شاهد بود که با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری داشتند (شکل۱). یکی از مکانیسم‌های دفاعی که توسط اکثر گیاهان در شرایط تنش مورد استفاده قرار می‌گیرد، تولید و تجمع ترکیبات آلی می‌باشد. از جمله این ترکیبات پرولین است. پرولین در گیاهان سبب تنظیم فشار اسمزی، پایداری پروتئین‌ها و محافظت از ساختارهای سلولی شده و در شرایط تنش‌های محیطی به ویژه تنش فلزات سنگین با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی از جمله سوپراکسید دیسموتاز آسیب‌های ناشی از گونه‌های فعال اکسیژن را کاسته و در نتیجه باعث بهبود رشد گیاه می‌گردد (Chang *et al.*, 2010). در این تحقیق کاربرد جدایه‌های محرک رشد باعث افزایش تولید پرولین در گیاه گردید. این نتیجه نشان می‌دهد که ریزجانداران مقاوم به آرسنیک دارای ویژگی‌های محرک رشد گیاهی با افزایش زیست فراهمی عناصر غذایی، توسعه سیستم ریشه‌ای از طریق

تولید فیتوهورمون اکسین و در نتیجه افزایش میزان جذب آب و عناصر غذایی و همچنین کنترل عوامل بیمارگر گیاهی توانسته‌اند باعث بهبود رشد گیاه و افزایش توانایی آن در سنتز و تولید مواد آلی و متابولیت‌های مورد نیاز برای مقابله با تنش منجمله پرولین گردد. افزایش تولید پرولین در گیاهان رشد یافته در خاک‌های آلوده به فلزات سنگین در حضور باکتری‌های محرک رشد و افزایش این متابولیت در گیاهان تحت شرایط تنش توسط سایر پژوهشگران نیز گزارش شده است (Pandy & Sharma, 2002; Parida *et al*., 2008; Pirdashti *et al*., 2009).

جدول۲- برخی ویژگی‌های محرک رشدگیاهی جدایه‌های مورد استفاده در این پژوهش

Table 2: Some plant growth promoting characteristics of isolates used in this study

جدایه‌ها (Isolates)	حل‌کنندگی فسفر Phosphate solubilization	حل‌کنندگی اکسید روی Zinc oxide solubilization	حل‌کنندگی کربنات روی Zinc carbonate solubilization	تولید اکسین Auxin production	تولید سیدروفور Siderophore production
	میلی‌گرم در لیتر ($mg\ L^{-1}$)				قطر هاله به کلونی Halo colony ratio
AHG-5	381	3.57	8.23	1.47	1.08
AHG-6	392	4.70	12.7	3.41	1.48
AHG-7	485	5.31	15.9	0.360	0.00
AHG-10	251	0.00	0.00	3.06	2.16
AHG-19	281	0.00	0.00	2.62	1.71

جدول ۳- مقاومت جدایه‌ها به غلظت‌های مختلف آرسنیک (III) و (V)

Table 3: Isolates resistance to different concentrations of As (III) & (V)

جدایه (Isolates)	غلظت آرسنیک (V) As (V) concentration(mgl^{-1})											غلظت آرسنیک (III) As (III) concentration(mgl^{-1})						
	1000	2000	3000	4000	6000	8000	10000	12000	14000	16000		500	750	1000	1250	1500	1750	2000
AHG-5	*+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+
AHG-6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+
AHG-7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+
AHG-10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	–	–	–	–	–
AHG-19	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	–	–	–

*علامت + برای جدایه‌های رشد کرده در غلظت مورد نظر وعلامت – جدایه‌هایی که رشد نکرده‌اند

*+ and – indicate ability and disability to growth

در این پژوهش کاربرد جدایه‌های محرک رشد میزان کلروفیل a، b، شاخص کلروفیل، کلروفیل کل و کارتنوئیدها را به‌طور معنی‌داری ($P\leq0.01$) افزایش داد (جدول۴). با توجه به شکل۱، مقدار شاخص‌های مذکور در گیاهان شاهد به‌طور چشمگیری کمتر از گیاهان مایه‌زنی شده با جدایه‌های مورد مطالعه بود. بیشترین مقدار کلروفیل b ($1/83\ mg\ g^{-1}FW$) و شاخص کلروفیل (۵۰/۱۵) در گیاهان تلقیح شده با جدایه‌ی AHG-6 و کمترین مقدار این شاخص‌ها در گیاهان شاهد مشاهده گردید (شکل ۱). در خصوص کلروفیل a بیشترین مقدار ($3/27\ mg\ g^{-1}FW$) در گیاهان مایه زنی شده با جدایه‌ی AHG-7 مشاهده گردید که اختلاف معنی‌داری با کلروفیل a اندازه‌گیری شده در گیاهان تلقیح شده با جدایه‌ی AHG-10 نداشت. کمترین میزان این کلروفیل ($2/33\ mg\ g^{-1}FW$) در گیاهان شاهد مشاهده گردید (شکل ۱). کاهش رنگیزه‌های فتوسنتزی در حضور

آرسنیک نشان از سمیت این عنصر برای گیاه است. کاهش رشد و عملکرد گیاه در حضور آرسنیک توسط پژوهشگران مختلف نیز گزارش شده است (Pigna *et al*., 2009؛ Cozzolino *et al*., 2009؛ Srivastava *et al*., 2010). آرسنیک می‌تواند با کاهش جذب آب و عناصر غذایی و به‌دنبال آن کاهش رشد و تقسیم سلولی در گیاه، ایجاد اختلال در فرایندهای متابولیکی گیاه، تغییر ساختار سلولی، افزایش میزان اتیلن تنشی، آسیب تارهای کشنده، کاهش طول و توسعه ریشه، کاهش میزان آمینواسیدها و ذخایر پروتئینی سلول، کاهش میزان فتوسنتز به دلیل صدمه دیدن و تغییر شکل کلروپلاست و کلروفیل‌ها، مراحل مختلف بیوسنتز رنگیزه‌های فتوسنتزی را تحت تأثیر قرار دهد. یکی از دلایل کاهش کلروفیل در حضور فلزات سنگین، برهمکنش این فلزات با گروه *SH*– آنزیم‌های دخیل در ساخت کلروفیل و غیرفعال شدن این آنزیم‌ها ذکرشده است (Ali *et al*., 2003). یافته‌های این تحقیق در مورد کاهش رنگیزه‌های فتوسنتزی در گیاه در حضور فلز سنگین با نتایج پژوهشگران دیگر مطابقت دارد (Rai *et al*., 2005; Vitoria *et al*., 2006). افزایش میزان مقادیر کلروفیل a، b، کلروفیل کل، شاخص کلروفیل و کارتنوئیدها در گیاهان تلقیح شده با جدایه‌های محرک رشد می‌تواند به دلیل افزایش ریشه‌دوانی گیاه در نتیجه تولید اکسین و در نتیجه افزایش میزان جذب آب و عناصر غذایی به ویژه منیزیم (یکی از عناصر موجود در ساختار کلروفیل) و فسفر که به‌عنوان حامل انرژی در فتوسنتز نقش مهمی ایفا می‌کند، باشد. در یک تحقیق کاظم‌علیلو و رسولی‌صدقیانی (Kazemalilou & Rasouli-Sadaghiani, 2012) افزایش میزان کلروفیل a و b را در گیاه بنگدانه تلقیح شده با باکتری‌های محرک رشد و قارچ‌های میکوریزی در یک خاک آلوده به کادمیوم گزارش کردند. در پژوهشی دیگر حیدری و همکاران (Heidari *et al*., 2011) نشان دادند که محتوی کلروفیل گیاه ریحان در حضور باکتری‌های محرک رشد *سودوموناس* سویه SP، *آزوسپریلیوم برسیلنس* و *باسیلوس لنتوس* افزایش یافت.

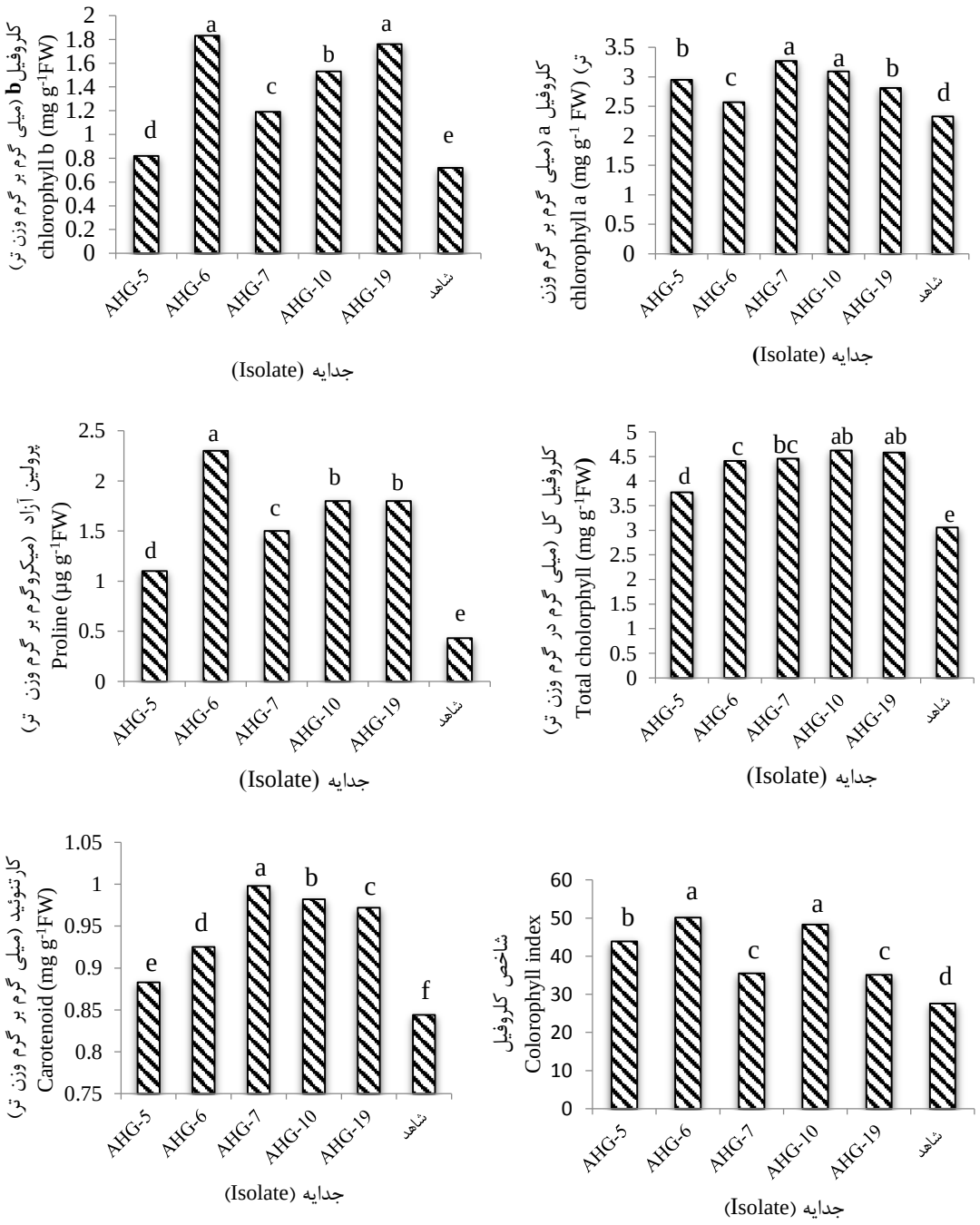
جدول ۴- تجزیه واریانس اثر جدایه‌ها بر روی برخی شاخص‌های فیزیولوژیکی و وزن خشک اندام هوایی گیاه پونه

Table 4: Analysis of variance for the effect of isolates on the some Physiological characteristics and shoot dry weight of *Mentha peparata* L.

منابع تغییرات (Source of variation)	درجه آزادی (Degree of freedom)	شاخص کلروفیل Chlorophyll index	پرولین آزاد برگ Proline	کارتنوئید carotenoid	کلروفیل a Chlorophyll a	کلروفیل b Chlorophyll b	کلروفیل کل Total chlorophyll	وزن خشک اندام هوایی shoot dry weight
جدایه (Isolate)	5	257.81**	0.009**	0.011**	2.91**	7.043**	10.9**	0.23**
خطا Error	14	4.09	0.004	0.003	0.82	0.503	0.13	0.004
CV(٪)	-	5.31	12.73	5	3.20	5.07	2.51	32.19

**معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد

**: significant at 1% probability level



شکل۱- اثر جدایه‌ها بر برخی شاخص‌های فیزیولوژیکی گیاه پونه

Figure 1. Effect of isolates on the some physiological characteristics of *Mentha peparata* L.

غلظت فسفر، پتاسیم، کلسیم و منیزیم

نتایج تجزیه واریانس (جدول۵) نشان دهنده معنی‌دار شدن ($P\leq0.01$) اثر مایه‌زنی با جدایه‌های مورد مطالعه بر غلظت فسفر اندام هوایی، پتاسیم، کلسیم و منیزیم اندام هوایی و ریشه گیاه پونه است. در تحقیق حاضر مقدار آرسنیک اندازه‌گیری شده در اندام هوایی گیاه پونه بین ۰/۰۸ درصد (در گیاهان تلقیح شده با جدایه‌ی AHG-6) و ۰/۰۱۳ درصد (در گیاهان شاهد) بود. در این پژوهش غلظت فسفر اندازه‌گیری شده در اندام هوایی و ریشه گیاه پونه کم بود و حضور جدایه‌های محرک رشد تأثیر چشمگیری در افزایش غلظت این عنصر نداشت (جدول ۶). به‌نظر می‌رسد علت این امر رقابت بین آرسنیک و فسفر به‌دلیل خصوصیات شیمیایی بسیار مشابه دو یون آرسنات و فسفات در

جذب می‌باشد، بنابراین حضور آرسنیک در ریزوسفر می‌تواند باعث کاهش جذب فسفر توسط گیاه شود (Duel *et al*., 1972; Geng *et al*., 2005; Nagajyoti *et al*., 2008). در این پژوهش کاربرد ریزجانداران محرک رشد باعث افزایش معنی‌دار غلظت منیزیم در اندام هوایی گیاه پونه شد (جدول۶). این موضوع می‌تواند یکی از دلایل افزایش میزان کلروفیل در گیاهان مایه‌زنی شده با جدایه‌های محرک رشد در این تحقیق باشد. در مورد کلسیم و پتاسیم استفاده از جدایه‌های محرک رشد در آزمایش حاضر توانست باعث افزایش غلظت این عناصر در ریشه و اندام هوایی گیاه پونه گردد اما اختلاف معنی‌داری بین شاهد و برخی از تیمارها وجود نداشت (جدول۶). در این پژوهش کاربرد جدایه‌های محرک رشد باعث بهبود تغذیه گیاه پونه گردید. دلیل افزایش غلظت عناصر غذایی در گیاهان مایه‌زنی شده با جدایه‌های محرک رشد را می‌توان به افزایش تارهای کشنده و ریشه‌های فرعی، افزایش حجم ریشه و در نتیجه افزایش سطح جذب گیاه در حضور این ریزجانداران نسبت داد. از طرف دیگر ریزجانداران محرک موجود در خاک با تولید یک‌سری متابولیت‌های ثانویه و آزادسازی آن در خاک (اسیدهای آلی و معدنی) و تغییرات pH محیط این اکوسیستم می‌توانند باعث افزایش انحلال ترکیبات معدنی کم محلول و نامحلول در ریزوسفر شده و در نتیجه زیست فراهمی و جذب عناصر غذایی را افزایش دهند. پژوهشگران افزایش جذب عناصر غذایی را در حضور میکروارگانیسم‌های محرک رشد گزارش نموده‌اند (Heidari *et al*., 2011; Ordookhani *et al*., 2010).

جدول ۵- تجزیه واریانس اثر جدایه‌ها بر غلظت عناصر غذایی پرمصرف گیاه پونه

Table 5: Analysis of variance for the effect of isolates on macronutrient concentration of *Mentha peparata* L.

		میانگین مربعات(Mean Square)								
		کلسیم (Calcium)		منیزیم (Magnesium)		پتاسیم (Potassium)		فسفر (Phosphorous)		
منابع تغییرات (Source of variation)	درجه آزادی (Degree of freedom)	اندام هوایی Shoot	ریشه Root	اندام‌هوایی Shoot	ریشه Root	اندام‌هوایی Shoot	ریشه Root	اندام هوایی Shoot	ریشه Root
جدایه (Isolate)	5	85.00**	0.054**	37.2**	0.20**	1.26**	0.05**	0.50**	0.00001ns
خطا (Error)	14	0.027	0.002	0.0025	0.001	0.026	0.00	0.001	0.0000
(CV) (٪)	-	9.28	13.3	13.8	26.9	9.89	15.1	9.49	26.2

**معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ و ns غیر معنی‌دار

(**and ns: , significant at 1% probability level and non-significant)

جدول ۶- اثر مایه‌زنی با جدایه‌ها بر غلظت عناصر غذایی پرمصرف و آرسنیک گیاه پونه

Table 6: Effect of isolates on macronutrient and arsenic concentration of *Mentha peparata* L.

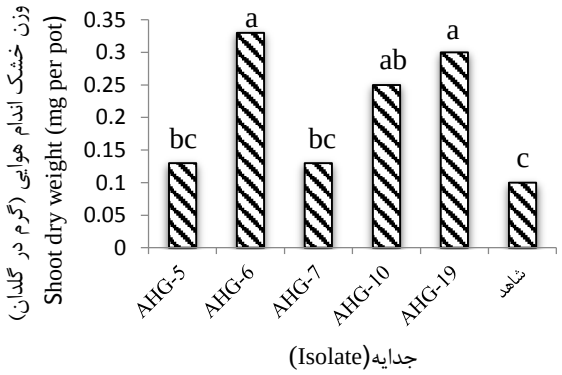
	کلسیم (٪) Calcium		منیزیم (٪) Magnesium		پتاسیم (٪) Potassium		فسفر (٪) Phosphorous		آرسنیک (٪) Arsenic
جدایه Isolates	اندام هوایی Shoot	ریشه Root	اندام‌هوایی Shoot	ریشه Root	اندام هوایی Shoot	ریشه Root	اندام هوایی Shoot	ریشه Root	اندام هوایی Shoot
AHG-5	a1.70	0.6a	0.3c	0.3a	1.40cd	0.6a	0.15a	0.1a	0.060c
AHG-6	c1.53	0.5b	0.3c	0.2b	1.53bc	0.3 d	0.13a	0.08ab	0.080a
AHG-7	b1.89	0.4c	0.43b	0.1c	1.73b	0.4c	0.17a	0.1a	0.020d
AHG-10	cd1.31	0.4c	0.4b	0.1c	3.03b	0.5b	0.14a	0.06b	0.025d
AHG-19	cd1.30	0.3d	0.7a	0.1c	1.55bc	0.4c	0.16a	0.063ab	0.067b
شاهد(Blank)	d1.20	0.3d	0.15d	0.1c	1.09d	0.2e	0.11a	0.05b	0.013e

میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد طبق آزمون دانکن می‌باشد

Averages with the same letters at each column are not significantly different at 5%

وزن خشک اندام هوایی

تجزیه واریانس تأثیر مایه‌زنی گیاه پونه با جدایه‌های مقاوم به آرسنیک دارای صفات محرک رشد گیاهی بر شاخص وزن خشک اندام هوایی نشان داد که استفاده از این جدایه‌ها به‌طور معنی‌داری ($P\leq0.01$) باعث افزایش این شاخص در گیاهان تلقیح شده در مقایسه با گیاهان شاهد گردید (جدول ۴). مقایسه میانگین اثر مایه‌زنی گیاهان با جدایه‌های مقاوم بر وزن خشک اندام هوایی نشان داد که گیاهان مایه‌زنی شده با جدایه AHG-6 بیش‌ترین وزن خشک اندام هوایی (۰/۳۳ گرم در گلدان) را دارا بوده که با گیاهان شاهد اختلاف معنی‌داری و قابل ملاحظه‌ای داشت. تیمار شاهد کم-ترین وزن خشک اندام هوایی (۰/۱ گرم در گلدان) را دارا بود (شکل۲). افزایش وزن خشک اندام هوایی گیاه در حضور ریزجانداران محرک رشد در خاک‌های آلوده به فلزات سنگین توسط محققین مختلف گزارش شده است (Kazemalilu & Rasouli-Sadaghiani, 2012; Pazoki, 2012).



شکل۲- اثر جدایه‌ها بر وزن خشک اندام هوایی گیاه پونه

Figure 2. Effect of isolates on the shoot dry weight of *Mentha peparata* L.

نتیجه‌گیری کلی

براساس یافته‌های این پژوهش می‌توان اظهار نمود که تحت تنش آرسنیک، ریزجانداران مقاوم به این فلز و دارای صفات محرک رشد گیاهی می‌توانند از طریق افزایش سطح جذب و در نتیجه افزایش میزان جذب آب و عناصر غذایی، افزایش میزان فتوسنتز در گیاه و افزایش میزان تولید متابولیت‌های مورد نیاز برای مقابله با تنش باعث بهبود رشد و افزایش زیست‌توده در گیاه پونه تلقیح شده با این ریزجانداران گردند. پیشنهاد می-گردد که اثر این جدایه‌ها بر رشد و نمو گیاه پونه و دیگر گیاهان در یک خاک آلوده به آرسنیک در شرایط مزرعه بررسی گردد.

References

Ali B.M., Vajpayee P., Tripathi R.D., Rai U.N., Singht S.N., and Singhgh S.P. 2003. Phytoremediation of lead, nickel, and copper by *Salix acmophylla* boiss: Role of antioxidant enzymes and antixidant substances. *Contamination and Toxicology*, 70: 462-469.

Baker S., Barrentine W.L., Bowman D.H., Hoawthrone W.L., and Pettiet J.V. 1976. Crop response and arsenic uptake following soil incorporation of MSMA. *Weed Science*, 24: 322-326.

Baroni F., Boscagli A., Protano G., and Riccobono F. 2000. Antimony accumulation in *Achillea ageratum*, *Plantago lanceolata* and *Silene vulgaris* growing in an old Sb-mining area. *Environmental Pollution*, 109: 347- 352.

Bates I., Waldern R., and Tear I. 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil*, 39: 205-207.

Belimov A.A., Hontzeas N., Safronova V. I., Demchinskaya S. V., Piluzza G., Bullitta S., and Glick B. R. 2005. Cadmium- tolerant plant growth- promoting bacteria associated with the roots of India mustard (*Brassica juncea* L.). *Soil Biology and Biochemistry*, 37(2): 241-250.

Bremner J. M., and Mulvaney. C. S. 1982. Total nitrogen. *In*: Page A.L., Miller R.H., and Keeney D.R (Eds.), Methods of Soil Analysis. Part 2, American Society of Agronomy and Soil Science Society of America, Madison, WI, pp. 595-624.

Cempel M., and Nikel G. 2006. Nickel: a review of its sources and environmental toxicology. *Polish Journal of Environmental Studies*, 15: 375-382.

Chang J.S., and Kim I.S. 2010. Arsenic oxidation by *Bacillus* sp. strain Sea H-As22w isolated from coastal seawater in yeosu Bay. *Environmental Engineering Research*, 15: 15-21.

Cozzolino V., Pigna M., Di Meo V., Caporale A. G., Violante A., and Meharg, A. A. 2010. Influence of phosphate addition on the arsenic uptake by wheat (*Triticum durum*) grown in arsenic polluted soils. *Fresenius Environmental Bulletin*, 19 (5): 838-845.

Dabonne S., Koffi B., Kouadio E., Koffi A., Due E., and Kouame L. 2010. Traditional utensils: Potential sources of poisoning by heavy metals. *British Journal of Pharmacology Toxicology*, 1: 90-92.

Dary M. Chamber-Pérez M. A. Palomares A. J., and Pajuelo, E. 2010. *in situ* phytostabilisation of heavy metal polluted soils using *Lupinus luteus* inoculated with metal resistant plant-growth promoting rhizobacteria. *Journal of Hazardous Materials*, 177: 323-330.

Duel L. E., and Swoboda A. R. 1972. Arsenic Toxicity to cotton and soybeans. *Journal of Environment Quality*, 1: 317-320.

Eijsackers H. 2010. Earthworms as colonisers: Primary colonisation of contaminated land, and sediment andsoil waste deposits. *Science of the Total Environment*. 408: 1759-1769.

Gavrilescu M. 2004. Removal of heavy metals from the environment by biosorption. *Engineering in Life Sciences*, 3: 219-232.

Gee G. W., and Orr D. 2002. Particle- size analysis. Soil Science Society of America. Madison, 16: 255-293.

Geng C.N., Zhu Y.G., Liu W.J., and Smith S. E. 2005. Arsenate uptake and translocation in seedlings of two genotypes of rice is affected by external phosphate concentrations. *Aquatic Botany*, 83: 321-331.

Glick B. R. 1995. The enhancement of plant growth by- free- living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 41: 109-117.

Glick B. R. 2003. Phytoremediation: synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment. *Biotechnology Advances*, 21: 383-393.

Gohre V., and Paszkowski U. 2006. Contribution of the arbuscular mycorrhizal symbiosis to heavy metal phytoremediation. *Planta*, 223: 1115-1122.

Grichko V. P., Fillby B., and Glick B. R. 2000. Increased ability of transgenic plants expressing the bacterial enzyme ACC deaminase to accumulate Cd, Co, Cu, Ni, Pb and Zn. *Journal of Biotechnology*, 81: 45-53.

Heidari M., Mousavinik S. M., and Golpayegani A. 2011. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) effect on physiological parameters and mineral uptake in basil (*Ociumum basilicm L.*) under water stress. *Journal of gricultural and Biological Science*, 12: 6-11. (In Persian)

Jones J., and Benton. K. 2001. Laboratory guide for conducting soil tests and plant analysis. CRS Press, 308p.

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. *Journal of Water and Soil Research*, 22: 17-30. (In Persian)

Ladan S. 2009. Bioremediation of arsenic-polluted soils by Scallion & Ornamental cabbage. Tarbiat Modares University. PhD thesis. (In Persian)

Lichtenthaler H. 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods of Enzymology*, 148: 350-382.

Nagajyoti P.C., Dinakar N., Prasad T. N., Suresh C., and Damodharam. T. 2008. Heavy metal toxicity: Industrial effluent effect on groundnut (*Arachis hypogaea* L.) seedlings. *Journal of Applied Sciences Research*, 4: 110-121.

Olsen S.R., and Sommers L.E. 1982. Phosphorus.P403-427. *In*: Page A.L., Miller R.H., and Keeney D.R (Eds.), Methods of Soil Analysis. Part 2, American Society of Agronomy and Soil Science Society of America, Madison, WI.

Ordookhani K., Khavazi K., Moezzi A., and Rejali F. 2010. Influence of PGPR and AMF on antioxidant activity, lycopene and potassium contents in tomato. *African Journal of Agricultural Research*, 5(10): 1108-1116.

Pandey N., and Sharma C.P. 2002. Effect of heavy metals CO_2, Ni_2, and Cd_2 on growth and metabolism of cabbage. *Plant Science*, 163:753-758.

Parida A. K., Dagaonkar V. S., Phalak M. S., and Aurangabadkar L. P. 2008. Differential response of the enzymes involved in proline biosynthesis and degradation in drought tolerant and sensitive cotton genotypes during drought stress and recovery. *Acta Physiologiae Plantarum*, 30: 619-627.

Pazoki A. R. 2012. Effect of lead, *Azospirillum* and humic acid on chlorophyll content, root and shootdry weight in rapeseed. *Journal of* C*rop Production Research*, 4 (2): 173-174.

Pigna M., Cozzolino V., Violanto A., and Meharg A. 2009. Influence of phosphate on the arsenic uptake by wheat (*Triticum durum* L.) irrigated with arsenic solutions at three different concentrations. *Water, Air and Soil Pollution*, 197: 371-380.

Pirdashti H., Tahmasebi – Sarvestani Z., and Bahmanyar M. A. 2009. Comparison of physiological response among four contrast rice cultivars under drought stress conditions. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 49: 52-53.

Rai V., Khatoon S., Bisht S. S., and Mehrotra S. 2005. Effect of cadmium ongrowth, ultramorphology of leaf and secondary metabolites of *Phyllanthus amarus* Schum and Thonn. *Chemosphere*, 61: 1644-1650.

Rajkumar M., and Freitas H. 2011. Plant growth promoting rhizobacteria and endophytes accelerate phytoremediation of metalliferous soils. *Biotechnology Advances*, 29: 248-258.

Rajkumar M., Ma Y., and Freitas H. 2008. Characterization of metal resistant plant growth *Bacillus weihenstephanensis* isolated from serpentine soil in Portugal. *Journal of Basic Microbiology*, 48: 1-9.

Richards B. k., and Steenhuis T. S. 1998. Metal mobility at an old heavy metal loaded sludge application site. *Environmental Pollution*, 99: 365-377.

Srivastava S., Srivastava A.K., Suprasanna P., and D'Souza S.F. 2009. Comparative biochemical and transcriptional profiling of two contrasting varieties of *Brassica juncea* L. in response to arsenic exposure reveals mechanisms of stress perception and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 181: 1-13.

Stoeva N., and Bineva T. 2003. Oxidative Changes and photosynthesis in oat plants grown in As-contaminated Soil. *Bulgarian Journal of Plant Physiology*, 29(1-2):87-95.

Verma S., and Dubeym R.S. 2001. Effect of cadmium on soluble sugars and enzymes of their metabolism in rice. *Biologia Plantarum*, 1: 117-123.

Vitoria A.P., Cunhab M.D., and Azevedo R.A. 2006. Ultrastructural changes of radish leaf exposed to cadmium. *Environmental and Experimental Botany*, 58: 47-52.

Walkly A., and Black I.A. 1934. An examination of Degtijaref method for determining soil organic matter and a proposed modification of the chromic acid in soil analysis. I. Experimental. *Soil Science Society of America Journal*, 79: 459-465.

Wenzel W.W, Kirchbaumer N., and Prohaska T. 2001. Arsenic fractionation in soils using an improved sequential extraction procedure. *Analytical Chimica Acta*, 436: 309-323.

Effect of Arsenic-Resistant Plant Growth Promoting (PGP) Isolates on some Physiological Characteristics, Growth and Nutrition of *Mentha peparata* L. in an Arsenic-Polluted Soil

Layla Haydarpoor[1], Ali-Ashraf Soltani Toolarood[2*], Esmaeel Goli Kalanpa[3]

(Received: April 2016 Accepted: September 2016)

Abstract

Heavy metals stress is one of the most important types of stresses in soil ecosystem which reduces crop production. Inoculation of plant growth promoting microorganisms is one the efficient methods which decreases the effects of heavy metals. In order to perform this research, a greenhouse experiment was conducted in a completely randomized design with three replications. Treatments were involved: inoculation of *Mentha peparata* L. with five plant growth promoting (PGP) and arsenic-resistant isolates as well as control (no inoculation). Results of data analysis revealed that inoculation of Oregano with superior isolates had significant effect ($P \leq 0.01$) on proline concentration. The greatest (2.3 µg g^{-1}FW) and lowest (0. 43 µg g^{-1}FW) accumulations of proline was observed in plants inoculated with AHG-6 isolate and control plants, respectively. The inoculation of all the PGP isolates significantly increased chlorophylla, b, total chlorophyll content, chlorophyll index and carotenoids proportions compared with control. The inoculation of *Mentha peparata* L with PGP isolates has no significant effect on the plant phosphorus concentration. The application of all PGP microorganisms notably propagated the shoot magnesium concentration compared to control. Whereas AHG-5 and AHG-6 significantly increased the root magnesium concentration. Regarding calcium and potassium, using PGP isolates raised their concentration in the root and shoot, although there was no significant between some treatments and control. In this research all the isolates increased significantly ($P \leq 0.01$) shoot dry weight compared to control condition. The highest growth index was observed in plants inoculated with AHG-6.

Keywords: Chlorophyll, Carotenoids, Proline, Nutrients, Toxic metal

1- Graduate MSc, Department of Soil Science, Faculty of Agricultural and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili
2-Associate professor, Department of soil science, Faculty of Agricultural and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili
3-Associate professor, Department of soil science, Faculty of Agricultural and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili
*Corresponding author: Email: ali_soltani_t@yahoo.com