Arch

نشریه پژوهش‌های حفاظت آب و خاک
جلد بیست و پنجم، شماره سوم، ۱۳۹۷
http://jwsc.gau.ac.ir
DOI: 10.22069/jwsc.2018.14253.2898

کارایی کرم خاکی و ریزوباکترها بر همزیستی میکوریزایی و رشد سه گونه گیاهی در یک خاک آلوده به فلز سرب

*علی محوحی[۱] و فایز رئیسی[۲]
[۱]دانشجوی دکتری گروه مهندسی علوم خاک، دانشگاه شهرکرد، [۲]استاد گروه مهندسی علوم خاک، دانشگاه شهرکرد
تاریخ دریافت: ۹۶/۸/۲۶ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۷/۲/۱۹

چکیده

سابقه و هدف: سرب از نظر سمیت و کاهش فعالیت بیولوژیکی در خاک مورد توجه است. رشد گیاهان نیز در یک خاک آلوده به فلزات سنگین به اثر متقابل بین جانداران در محیط ریزوسفر و ریشه گیاه بستگی دارد. کرم‌های خاکی، قارچ‌های میکوریزا و ریزوباکترهای محرک رشد گیاه از مهم‌ترین این ریزجانداران هستند. از آن‌جایی‌که مطالعات اندکی درباره مکانیسم اثر ریز/ درشت جاندارن بر همزیستی میکوریزایی صورت گرفته است، در این مطالعه اثر جداگانه و همزمان کرم خاکی و ریزوباکترها بر کلونیزاسیون ریشه و رشد گیاه در یک خاک آلوده مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: بذر سه گونه گیاهی شامل ذرت، مرغ و گاوپونه پس از استریل سطحی و جوانه‌زنی به گلدان‌های حاوی ٤ کیلوگرم خاک آلوده (جمع‌آوری‌شده از معدن سرب باما) و استریل‌شده در دمای ^{o}C ۱۲۱ به‌مدت ۲ ساعت منتقل شدند. سه گونه گیاه تلقیح‌شده با قارچ میکوریزا به‌صورت جداگانه و همزمان با کرم خاکی (*Eisenia foetida*) یا ریزوباکتری تلقیح گردید. پس از گذشت ۳ (ذرت و مرغ) و ٤ (گاوپونه) ماه از دوره رشد تحت شرایط گلخانه، اندام هوایی گیاهان از سطح خاک جدا شدند. غلظت سرب و فسفر در خاک و گیاهان، درصد کلونیزاسیون، فراوانی اسپور و طول ریشه کلونیزه اندازه‌گیری شدند.

یافته‌ها: به‌طورکلی، تلقیح هر سه گیاه میکوریزایی مورد مطالعه با کرم خاکی و ریزوباکتر، درصد کلونیزاسیون ریشه، فراوانی اسپورها، قابلیت دسترسی فسفر خاک و رشد گیاه را تحت‌تأثیر قرار داد و بسته به نوع گیاه و موجود زنده کاملاً متفاوت بود. همبستگی بین فسفر قابل‌دسترس خاک و درصد کلونیزاسیون ریشه در هر سه گیاه (ذرت: $r=-0/48$، $P<0/05$؛ مَرغ: $r=-0/74$، $P<0/001$ و گاوپونه: $r=-0/65$، $P<0/01$) منفی و معنی‌دار بود. اما همبستگی منفی بین سرب قابل‌دسترس و کلونیزاسیون تنها در کشت مَرغ مشاهده شد. همچنین از بین فاکتورهای همزیستی میکوریزایی مورد مطالعه، فراوانی اسپورها کم‌ترین تغییرات را بین تیمارهای هم‌زمان نشان داد. از سوی دیگر، همبستگی بین فراوانی اسپورها و کلونیزاسیون ریشه هر سه گیاه (غیرمعنی‌دار در کشت ذرت؛ مَرغ: $r=0/76$، $P<0/001$ و گاوپونه: $r=0/67$، $P<0/01$) نیز متفاوت بود و نشان داد که فراوانی اسپورها به تنهایی شاخص مناسبی برای وابستگی میکوریزایی نیست و به نوع گیاه و موجود زنده خاک (کرم خاکی یا باکتری) بستگی دارد.

* مسئول مکاتبه: alimahohi@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

نتیجه‌گیری: نتایج این بررسی بیانگر افزایش سرب و فسفر قابل‌دسترس خاک می‌تواند یکی از عوامل کاهش درصد کلونیزاسیون ریشه باشد، اما اثر منفی سرب بر همزیستی میکوریزایی به حساسیت گیاه به سمیت سرب بستگی دارد. همچنین درصد کلونیزاسیون ریشه به تنهایی شاخص مناسبی از رشد گیاهان مورد مطالعه نیست و به عوامل دیگری هم‌چون نوع گیاه، غلظت فسفر و سرب خاک بستگی دارد. همچنین هر اندازه حساسیت گیاه به سمیت سرب بیش‌تر باشد، همبستگی بین رشد گیاه و همزیستی میکوریزایی مشهودتر است.

واژه‌های کلیدی: ریزوباکتر، قارچ میکوریزا، کرم خاکی، کلونیزاسیون ریشه

مقدمه

نقش موجودات زنده در خاک‌های آلوده اغلب در راستای افزایش رشد گیاه یا افزایش مقاومت گیاه در مقابل سمیت فلزات سمی به‌منظور بهبود راندمان گیاه‌پالایی است (۲۵ و ۲۷). در اغلب خاک‌ها موجودات زنده خاکزی مانند قارچ‌های همزیست میکوریزا، ریزوباکترهای ریزوسفری و کرم‌های خاکی به‌طور هم‌زمان یافت می‌شوند و قادر هستند با سازوکارهای گوناگون رشد و نمو گیاه و ظرفیت جذب فلزات سمی و در نتیجه راندمان گیاه پالایی را در محیط‌های آلوده تحت‌تأثیر قرار دهند (۳۵). این موجودات اغلب با تغییر شرایط محیطی مانند pH خاک، تولید کربن آلی محلول، تولید اسیدهای آلی، تحریک فعالیت میکروبی، افزایش یا کاهش زیست‌فراهمی فلزات و در پی آن رشد و درجه سازگاری گیاه را در خاک‌های آلوده به فلزات سنگین تحت‌تأثیر قرار می‌دهند (۲۷ و ٤۲). قارچ‌های میکوریز آربوسکولار قادر به تعدیل سمیت ناشی از فلز سنگین برای گیاه و افزایش مقاومت آن می‌باشند (۷ و ۱۲). باکتری‌های ریزوسفری افزاینده رشد گیاه (PGPR's) (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria)، نیز از طریق راه‌کارهای گوناگون باعث تحریک و بهبود رشد گیاهان می‌شوند (۳). انحلال فسفات‌های نامحلول، تشکیل کمپلکس سیدروفور آهن و همچنین تولید تنظیم‌کننده‌های رشد و هورمون‌های گیاهی مانند ایندول استیک اسید، جیبرلیک اسید، تولید آنزیم و ACC- دآمیناز توسط این باکتری‌ها، از جمله راه‌کارهای افزایش رشد و عملکرد گیاه در شرایط تنش فلزات سنگین می‌باشد (۸، ۲۲ و ۲۷). همچنین کرم‌های خاکی از طریق تغییر در تنوع و عملکرد جمعیت میکروبی ریزوسفر به‌وسیله فرآیندهای مکانیکی و شیمیایی بر رشد گیاه در خاک‌های آلوده به فلزات سنگین تأثیرگذار است (۳۵). به‌طور مثال، ما و همکاران (۲۰۰٦) تأثیر سودمند کرم خاکی و قارچ میکوریزا را بر استقرار درختان لگومینوز بر پسماندهای معدن سرب و روی بررسی و گزارش کردند که قارچ میکوریزا بیش‌ترین تأثیر را در بهبود جذب نیتروژن، فسفر و پتاسیم داشته است (۲۱). همچنین گزارش شده است که حضور PGPRها به استقرار میکوریزا کمک می‌کند. به‌عنوان مثال، تلقیح باکتری *پنی‌باسیلوس برازیلینس* موجب افزایش کلونیزاسیون ریشه توسط قارچ‌های میکوریز *گلوموس موسه‌آ* گیاه شبدر شده است (۲). با توجه به این‌که در بیش‌تر پژوهش‌ها نقش کرم خاکی و ریزوباکترها در همزیستی میکوریزایی به‌طور جداگانه بررسی شده است، در این پژوهش، پیامد تلقیح جداگانه و هم‌زمان کرم خاکی و ریزوباکتر بر همزیستی میکوریزایی و رشد سه گیاه مختلف (ذرت رقم سینگل کراس ۷۰٤ (*Zea mays* L.)، مَرغ یا برموداگراس (*Cynodon dactylon*) و گیاه بومی گاوپونه (*Stachys inflata*) در یک خاک آلوده بررسی شد.

www.SID.ir

Archive of SID

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری خاک از منطقه دارای پوشش گیاهی در معدن سرب باما (جنوب‌غربی شهر اصفهان) از عمق ۱۵-۰ سانتی‌متری سطح خاک انجام و پس از انتقال به آزمایشگاه، هوا خشک و از الک ۲ میلی‌متری عبور داده شد. خاک مورد مطالعه یک خاک آهکی با بافت لومی است که میزان سرب کل، قابل‌دسترس و همچنین فسفر قابل‌دسترس آن به‌ترتیب ۳۷۸، ۱۷ و ۸/۷۱ $mg\ kg^{-1}$ بود.

این آزمایش برای هر گیاه به‌طور جداگانه، در قالب طرح کاملاً تصادفی در شرایط گلخانه اجرا شد. تیمارها شامل ۱) قارچ میکوریزا (M)، ۲) قارچ میکوریزا همراه با کرم خاکی (ME)، ۳) قارچ میکوریزا همراه با ریزوباکتر (MB) و ٤) قارچ میکوریزا همراه با کرم خاکی و ریزوباکتر (MEB) هر کدام در چهار تکرار بودند. خاک آلوده به سرب از منطقه مورد مطالعه پس استریل در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به‌مدت دو ساعت در اتوکلاو، در شرایط استریل به گلدان‌هایی با ظرفیت تقریبی ٤ کیلوگرم منتقل شد. شش عدد بذر جوانه‌دار گیاهان ذرت، مَرغ و گاوپونه در هر گلدان به‌مدت ۵ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۵ درصد استریل سطحی شده و پس از آن توسط آب مقطر استریل شسته و در کاغذ صافی مرطوب درون پتری‌دیش جوانه‌زده و جوانه‌های همسان و یکنواخت در گلدان کشت و پس از رشد، دو گیاه‌چه سالم حفظ و بقیه حذف شدند.

برای اعمال تیمارهای میکروبی، قبل از انتقال گلدان‌ها، ریشه‌چه‌ها با اسپورهای جداسازی‌شده از ۱۰۰ گرم مایه تلقیح قارچ میکوریزا شامل ترکیبی از مایه تلقیح قارچ‌های جنس گلوموس گونه‌های *گلوموس موسه‌آ* (*Glomus mossea*) و *گلوموس کانستریکتوم* (*Glomus canestericum*) که توسط الک ٤۰۰ مش و محلول قندی جداسازی‌شده و به‌مدت ۱۰ دقیقه توسط کلرآمین T ۲٪، استرپتوماسین ۰/۰۲٪ و جنتامایسین ۰/۰۱٪ استریل سطحی‌شده، مایه‌زنی شدند. تعداد ٤ عدد کرم خاکی بالغ گونه *ایسنیا فتیدا* (*Eisenia fetida*) با طول و وزن یکسان که به‌مدت ۲٤ ساعت در محلول مشابه بالا جهت استریل سطحی و به حداقل رساندن اسپور و ریزوباکترهای دستگاه گوارش کرم نیمه‌شناورشده، به گلدان‌های تیمار ME و همچنین MEB، دو هفته پس از استقرار گیاهان اضافه شدند. در تمامی واحدهای آزمایشی برای تغذیه کرم‌های خاکی ۲ درصد وزنی (w/w) ماده آلی استریل به شکل بقایای آسیاب‌شده یونجه با اندازه یک میلی‌متر در تیمارهای ME و MEB، به سطح خاک اضافه و در تیمار M به‌طور کامل مخلوط شد. برای تیمار ریزوباکترایی ۱۵ میلی‌لیتر از محیط کشت مایع (Nutrient Broth, NB) حاوی باکتری‌های *باسیلوس* و *باسیلوس لیکنی فورمیس* به گلدان‌ها پس از انتقال جوانه‌ها مایه‌زنی شد. آبیاری گلدان‌ها به‌وسیله آب‌مقطر استریل، بر اساس نیاز گیاه و نگهداری گلدان‌ها در شرایط گلخانه انجام شد.

پس از گذشت سه (ذرت و مَرغ) و چهار (گاوپونه) ماه از دوره رشد، شاخساره‌های گیاهان از سطح خاک قطع شدند. ریشه گیاهان نیز به آرامی از خاک گلدان‌ها جدا و بخش‌های زیرزمینی و هوایی به‌طور جداگانه هواخشک و به‌منظور تعیین وزن خشک، غلظت فسفر و سرب گیاه استفاده شدند. روش خاکستر خشک به‌منظور استخراج سرب (۵) و هضم تر به‌منظور استخراج فسفر گیاه (۳۰) در اندام هوایی و ریشه استفاده شد. درصد کلونیزاسیون ریشه گیاه توسط قارچ‌های میکوریزا انجام گرفت (٤۰). ریشه‌های گیاه پس از اندازه‌گیری طول آن‌ها به قطعات ۱ سانتی‌متری بریده و یک گرم پاک شده و با تری پن بلو رنگ‌آمیزی شد (۳٤). فراوانی اسپورها بر اساس روش سری الک و محلول شکری جداسازی و شمارش شدند (۱٦). غلظت فسفر قابل‌دسترس خاک (۲۹) و غلظت سرب قابل‌جذب به روش DTPA-TEA اندازه‌گیری شد (۲۰).

www.SID.ir

Archive of SID

پیش از انجام تجزیه‌های آماری، ابتدا پیش‌فرض‌های تجزیه واریانس مانند یکنواختی خطای آزمایش و توزیع نرمال داده‌ها یا باقی‌مانده‌ها بررسی شدند. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از مدل خطی جامع (General Linear Model) توسط نرم‌افزار SAS از طریق آنالیز واریانس انجام شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام گرفت.

نتایج و بحث

اثر متقابل موجودات زنده بر فاکتورهای همزیستی میکوریزایی: نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که مایه‌زنی جداگانه با میکوریزا و هم‌زمان (ME، MB و MEB) خاک به‌طور قابل‌توجهی درصد کلونیزاسیون ریشه را از نظر آماری (P<۰/۰۰۱) تحت‌تأثیر قرار داد (جدول ۱). به‌طورکلی درصد کلونیزاسیون ریشه در گیاه گاوپونه بیش‌ترین (۶۱٪) و در گیاه مَرغ کم‌ترین (۲۳٪) بود. تلقیح هم‌زمان کرم خاکی و میکوریزا (ME) نتایج متفاوتی به‌همراه داشت، به‌طوری‌که در گیاه ذرت افزایش و در گیاهان گاوپونه و مَرغ کاهش درصد کلونیزاسیون نسبت به تیمار میکوریزا به تنهایی (M) مشاهده شد (شکل A۱). از سوی دیگر، در هر سه گیاه مورد مطالعه، درصد کلونیزاسیون ریشه در حضور ریزوباکتر کم‌تر از دیگر تیمارها (M و ME) بود. اما حضور هر سه موجود زنده (MEB)، اثر منفی کرم خاکی و یا ریزوباکتر بر کلونیزاسیون ریشه را تا اندازه‌ای کاهش داد. افزایش و بهبود همزیستی میکوریزایی در حضور کرم خاکی در کشت ذرت با نتایج دیگر پژوهشگران (۱۹ و ٤٥) که مشاهده کردند حضور کرم خاکی کلونیزاسیون ریشه توسط قارچ‌های میکوریزا را در خاک‌های غیرآلوده و آلوده افزایش داد، مطابقت داشت. در مقابل هوا و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند کلونیزاسیون ریشه ذرت با قارچ *گلوموس* تحت‌تأثیر تیمار کرم خاکی ایزنیا فتیدا قرار نگرفت (١٤). لبرون و همکاران (۱۹۹۸) نیز گزارش کردند که اثر کرم خاکی بر همزیستی میکوریزایی به نوع گیاه بستگی دارد (۱۷). دیگر مطالعات (۱۰، ۱۹ و ٢٦) نیز نتایج متفاوتی از اثر کرم خاکی بر همزیستی میکوریزایی گزارش کرده‌اند و این اختلاف‌ها را به تفاوت بین نوع قارچ یا کرم خاکی مرتبط دانسته‌اند.

فراوانی اسپور قارچ میکوریزا روند نسبتاً مشابهی با درصد کلونیزاسیون داشت، با این تفاوت که فراوانی اسپورها در تیمارهای MB و MEB در کشت ذرت نسبت به مَرغ و گاوپونه بیش‌تر بود (شکل B۱). از سوی دیگر با وجود شباهت‌های بین فراوانی اسپورها و کلونیزاسیون ریشه تفاوت‌هایی مشاهده شد. به‌طور مثال فراوانی اسپورها در کشت مَرغ به‌طور قابل‌توجهی کم‌تر از ذرت و گاوپونه بود. همچنین در کشت ذرت با وجود درصد کلونیزاسیون کم‌تر ریشه در تیمارهای هم‌زمان (ME، MB و MEB) در مقایسه با کشت گاوپونه، اما فراوانی اسپورها در این تیمارها در کشت ذرت بیش‌تر از گاوپونه بود. بر اساس نتایج این مطالعه از بین فاکتورهای همزیستی میکوریزایی مورد مطالعه فراوانی اسپورها کم‌ترین تغییرات را در بین تیمارهای همزمان نسبت به تیمار میکوریزا به تنهایی نشان داد. از سوی دیگر همبستگی متفاوت بین کلونیزاسیون ریشه و فراوانی اسپورها در گیاهان مورد مطالعه نشان داد فراوانی اسپورها به تنهایی شاخص مناسبی برای بیان همزیستی میکوریزایی نیست و به نوع گیاه و جانداران خاک بستگی دارد که با نتایج سلواکومار و همکاران (۲۰۱۲) هم‌خوانی دارد (٣٦).

روند تغییرات طول ریشه و طول ریشه کلونیزه نیز به‌طور قابل‌توجهی تحت‌تأثیر تیمارها قرار گرفت و در بین گیاهان نتایج متفاوتی را به همراه داشت (شکل ۱)، به‌طوری‌که برخلاف ذرت و گاوپونه حضور کرم خاکی به‌طور قابل‌توجهی طول ریشه و ریشه کلونیزه مَرغ را کاهش داد (شکل C۱). از سوی دیگر با وجود عدم تغییر در طول ریشه در حضور ریزوباکتر (MB) طول ریشه کلونیزه به شکل قابل‌توجهی کاهش یافت (شکل C۱). اما در حضور هم‌زمان هر سه موجود

www.SID.ir

Archive of SID

زنده (MEB) طول ریشه کلونیزه کاهش کم‌تری نسبت به تیمار کرم خاکی (ME) یا ریزوباکتر (MB) نسبت به تیمار میکوریزا (M) به تنهایی داشت. اگرچه طول ریشه گاوپونه در تمامی تیمارهای هم‌زمان در مقایسه با میکوریزا به تنهایی (M) افزایش یافت، اما طول ریشه کلونیزه در تمامی این تیمارها کاهش قابل‌توجهی را نشان داد. در مقایسه بین فاکتورهای همزیستی، روند کاهش همزیستی نیز متفاوت بود. به‌طور مثال در تیمار هم‌زمان MB در مقایسه با تیمار M به تنهایی در کشت ذرت ۲٤/۵، ۰/۷ و ۲۸٪ کاهش به‌ترتیب در کلونیزاسیون ریشه، فراوانی اسپور و طول ریشه کلونیزه مشاهده شد. این کاهش در کشت مَرغ به‌ترتیب ۵۳، ۷ و ۵۷٪ و در کشت گاوپونه به‌ترتیب ۳۱، ۱۳ و ۳۵٪ بود (شکل ۱).

اثر منفی مشاهده شده در کشت‌های مَرغ و گاوپونه احتمالاً به‌دلیل خسارت ناشی از تخریب و قطع شبکه هیف قارچی و یا تغذیه اسپور قارچ‌ها توسط کرم خاکی باشد (۳۲ و ٤۱). به‌عبارت دیگر کرم‌های خاکی از طریق ایجاد دالان‌هایی در خاک و تغذیه از اندام‌های قارچ میکوریزا موجب کاهش شبکه هیف قارچی می‌شوند. این موضوع می‌تواند به‌طور غیرمستقیم در میزان همزیستی میکوریزایی گیاه مؤثر باشند (٤۱). از سوی دیگر حضور هم‌زمان کرم و باکتری در گیاه میکوریزایی (MEB)، اثر منفی کرم خاکی و یا ریزوباکتر را بر درصد کلونیزاسیون تا اندازه‌ای کاهش داد. احتمالاً در حضور هم‌زمان سه موجود زنده، ریزوباکترها به‌عنوان منبع غذایی ساده‌تر نسبت به هیف قارچی توسط کرم خاکی مصرف شده باشند و به‌دنبال آن از اثر منفی کرم بر درصد کلونیزاسیون کاسته شده است. بر اساس مشاهدات این مطالعه و همچنین نتایج گزارش شده از طول ریشه و وزن خشک ریشه مشخص شده است که ریشه ذرت به‌طور قابل‌توجهی قطورتر از ریشه مَرغ می‌باشد. از آن‌جایی‌که طول ریشه کلونیزه تابعی از طول ریشه است (جدول ۳). بنابراین این‌گونه می‌توان نتیجه گرفت که در کشت مَرغ، کرم خاکی با تغذیه از ریشه گیاه به‌طور مستقیم موجب کاهش طول ریشه و در نتیجه طول ریشه کلونیزه شده است.

کاهش همزیستی مشاهده شده در هر سه گیاه در حضور ریزوباکتر را می‌توان به غلظت فسفر خاک مرتبط دانست (جدول ۳). در این مطالعه و مشابه با مطالعات دیگر پژوهشگران کاهش همزیستی میکوریزایی با افزایش فسفر قابل‌دسترس در تیمارهای هم‌زمان مشاهده شد (٤، ۲۵ و ۲۸). از سوی دیگر همبستگی منفی بین همزیستی میکوریزایی و فسفر قابل‌دسترس (جدول ۳) نشان داد که اثر متقابل این موجودات زنده می‌تواند کارایی همزیستی بین گیاه و میکوریزا را کاهش دهد. از آن‌جایی‌که نقش اصلی همزیستی میکوریزایی را تامین فسفر گیاه دانسته‌اند، بنابراین غلظت بالای فسفر در گیاه نیاز به این همزیستی را کم‌رنگ کرده و فرضیه بالا را اثبات می‌کند که با نتایج دیگر پژوهشگران هم‌خوانی دارد (۳۹ و ٤۳). اما این همبستگی منفی در گیاه مَرغ معنی‌دار نبود. علاوه بر غلظت فسفر، غلظت سرب در گیاه نیز در میزان این همزیستی مؤثر است (۱). از آن‌جایی‌که تنها در گیاه مَرغ همبستگی منفی و معنی‌دار بین غلظت سرب در اندام هوایی و فاکتورهای همزیستی مشاهده شده به‌نظر می‌رسد که اثر سمیت سرب در اندام هوایی نسبت به فسفر در کاهش همزیستی میکوریزایی غالب‌تر بوده است.

اثر متقابل موجودات زنده بر غلظت فسفر و سرب خاک و گیاه: فسفر قابل‌دسترس خاک در کشت هر سه گیاه میکوریزایی به‌طور معنی‌دار ($P<۰/۰۰۱$) تحت‌تأثیر فعالیت میکوریزا، کرم خاکی و ریزوباکتر قرار گرفت (جدول ۲). به‌طورکلی نتایج این مطالعه نشان داد که فسفر قابل‌دسترس خاک در کشت مَرغ بیش‌تر از ذرت و گاوپونه بود. همچنین در کشت گاوپونه کم‌ترین مقدار فسفر قابل‌دسترس مشاهده شد. از سوی دیگر حضور هم‌زمان کرم و باکتری در گیاهان میکوریزایی، فسفر اندام هوایی را در هر سه گیاه تحت‌تأثیر قرار داد ($P<۰/۰۵$) اما بر فسفر ریشه در کشت مَرغ معنی‌دار

www.SID.ir

Archive of SID

نبود (جدول ۲). نتایج این مطالعه نشان داد که حضور کرم و ریزوباکتر به‌همراه میکوریزا غلظت فسفر قابل‌دسترس خاک را افزایش داد. این افزایش به‌ویژه در تیمار MEB در گیاه ذرت بیش‌تر بود، اما در گیاهان مَرغ و گاوپونه تفاوت معنی‌داری بین تیمار MB و MEB مشاهده نشد (شکل A۲).

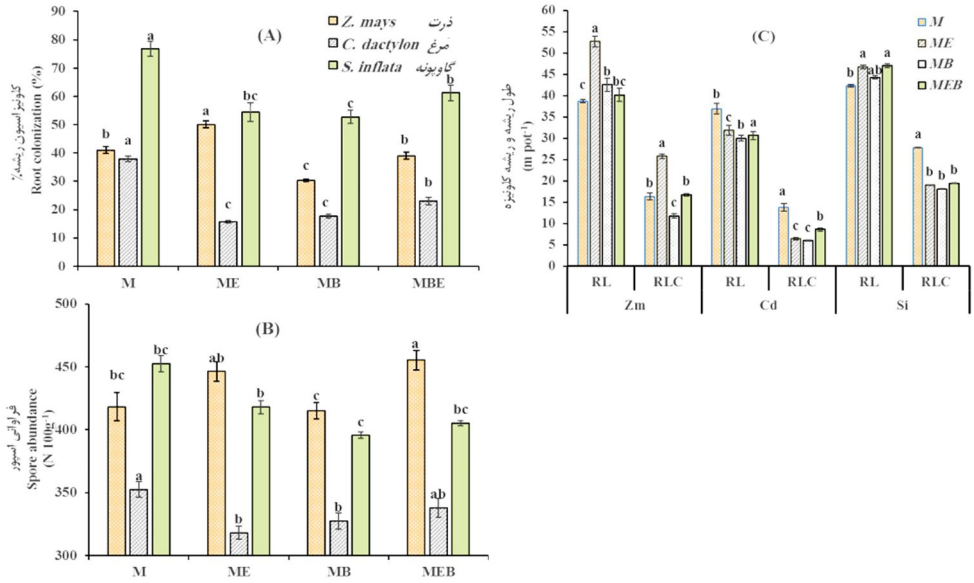
جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس (آماره F) اثر کرم خاکی (E)، قارچ میکوریزا (M) و ریزوباکتر (B) بر کلونیزاسیون ریشه، فراوانی اسپور، طول ریشه و طول ریشه کلونیزه شده در کشت ذرت (Zm)، مَرغ (Cd) و گاوپونه (Si).

Table 1. Factorial ANOVA results (F-values) for the influence of arbuscular mycorrhizal fungi (M), bacterial (B) and earthworm (E) inoculation on root colonization, spore abundance, root length (RL) and root length colonized (RLC) in cropped with *Z. mays* (Zm), *C. dactylon* (Cd) and *S. inflata* (Si).

ضریب تغییر C.V. (%)			میانگین مربعات خطا Mean square of error			آماره F F value			
Si	Cd	Zm	Si	Cd	Zm	Si	Cd	Zm	
-	-	-	15	15	15	3	3	3	درجه آزادی Degree of freedom
8.2	8.2	5.1	26	3.7	4.1	19***	108***	65***	درصد کلونیزاسیون Root colonization
2.1	4.1	4.3	79	185	345	31***	4.74*	4.68*	فراوانی اسپور Spore abundance
4.9	6.9	4.6	4.8	4.9	3.9	4.10*	7.93*	40***	طول ریشه Root length (RL)
4.0	13	6.8	0.71	1.3	1.5	115***	39***	94***	طول ریشه کلونیزه شده Root length colonized (RLC)

ns، *، ** و *** به‌ترتیب غیرمعنی‌دار، معنی‌دار در سطح احتمال ۵ (P<۰/۰۵)، ۱ (P<۰/۰۱) و یک‌دهم (P<۰/۰۰۱) درصد.

ns, *, **, *** not significant and significant at P < 0.05, P<0.01 and P < 0.001, respectively.



شکل ۱- برهم‌کنش بین تلقیح کرم خاکی (E)، قارچ میکوریزا (M) و ریزوباکتر (B) بر کلونیزاسیون ریشه (A)، فراوانی اسپور (B) و طول ریشه (RL) و ریشه کلونیزه شده (RLC) (C)، در کشت ذرت، مَرغ و گاوپونه. حروف متفاوت بالای هر ستون نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در بین تیمارهاست (تست دانکن P<۰/۰۵). خطوط عمودی نشان‌دهنده استاندارد خطاست (n=٤).

Figure 1. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi (M), bacterial (B) and earthworm (E) inoculation on root colonization (A), spore abundance (B) and root length (RL) and root length colonized (RLC) (C) in *Z. mays*, *C. dactylon and S. inflata*. Different letters above each column indicated significant difference among treatments (Duncan's test. P<0.05). The vertical bars indicate the standard error of the mean (n=4).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس (آماره F) اثر کرم خاکی (E)، قارچ میکوریزا (M) و ریزوباکتر (B) بر وزن خشک اندام هوایی و ریشه، قابلیت دسترسی فسفر و سرب، غلظت فسفر و سرب ریشه و اندام هوایی در کشت ذرت (Zm)، مَرغ (Cd) و گاوپونه (Si).

Table 2. Factorial ANOVA results (F-values) for the influence of arbuscular mycorrhizal fungi (M), bacterial (B) and earthworm (E) inoculation on maize shoot and root dry weights, soil available P and Pb, shoot and root P and Pb concentrations in cropped with *Z. mays* (Zm), *C. dactylon* (Cd) and *S. inflata* (Si).

ضریب تغییر C.V. (%)			میانگین مربعات خطا Mean square of error			آماره F F value			
Zm	Cd	Si	Zm	Cd	Si	Zm	Cd	Si	
-	-	-	15	15	15	3	3	3	درجه آزادی Degree of freedom
8.15	8.61	4.71	2.56	10.3	1.88	14***	14***	200***	فسفر قابل‌دسترس Available P
5.39	4.77	3.35	1.49	2.64	0.582	5.05*	43***	57***	سرب قابل‌دسترس Available Pb
5.26	6.10	5.95	0.211	0.011	0.071	6.11*	5.94*	9.25*	فسفر اندام هوایی Shoot P
5.61	7.72	4.48	0.041	0.002	0.002	3.91*	ns	65***	فسفر ریشه Root P
4.43	13.6	2.61	41	2.25	1.04	147***	43***	4008***	سرب اندام هوایی Shoot Pb
3.96	9.78	6.66	9.65	39	32	23***	70***	42***	سرب ریشه Root Pb
3.59	12.2	3.86	0.103	0.551	1.08	137***	69***	69***	وزن خشک اندام هوایی Shoot dry weight
3.32	6.25	4.67	0.013	0.003	0.184	120***	299***	80***	وزن خشک ریشه Root dry weight

ns، *، ** و *** به‌ترتیب غیرمعنی‌دار، معنی‌دار در سطح احتمال پنج (P<۰/۰۵)، یک (P<۰/۰۱) و یک‌دهم (P<۰/۰۰۱) درصد.

ns, *, ** not significant and significant at P<0.05, P<0.01 and P<0.001, respectively.

www.SID.ir

Archive of SID

بیش‌ترین و کم‌ترین غلظت فسفر اندام هوایی و ریشه به‌ترتیب در گیاهان گاوپونه و مَرغ مشاهده شد. همچنین غلظت فسفر ریشه و اندام هوایی در تمامی تیمارهای هم‌زمان در مقایسه با تیمار M به تنهایی افزایش یافت که این افزایش در اندام هوایی مشهودتر بود (شکل B۲). سرب قابل‌دسترس نیز به‌طور قابل‌توجهی تحت‌تأثیر تیمارهای هم‌زمان در هر سه گیاه ذرت، مرغ ($P<۰/۰۰۱$) و گاوپونه ($P<۰/۰۵$) قرار گرفت (جدول ۲). سرب قابل‌دسترس در تیمارهای هم‌زمان به‌ویژه تیمار MEB نسبت به تیمار M به تنهایی افزایش یافت. البته در برخی موارد تفاوتی بین تیمارها به‌ویژه کشت گاوپونه مشاهده نشد (شکل C۲). نتایج این مطالعه نشان داد که غلظت سرب اندام هوایی و ریشه، هم در بین تیمارها و هم گیاهان متفاوت بود. اما بیش‌ترین و کم‌ترین مقدار سرب اندام هوایی و ریشه به‌ترتیب در گاوپونه و مَرغ مشاهده شد. از سوی دیگر، در اندام هوایی هر سه گیاه غلظت سرب در تیمارهای هم‌زمان (ME، MB و MEB) در مقایسه با تیمار M به تنهایی افزایش یافت اما در ریشه ذرت در تیمارهای ME و MB و در ریشه مَرغ در تیمار ME کم‌تر از تیمار M به تنهایی بود. همچنین نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که در مقایسه با غلظت کم‌تر سرب اندام هوایی نسبت به ریشه در گیاهان ذرت و مَرغ، این غلظت در گیاه گاوپونه معکوس بود.

اکثر مطالعات غلظت بالای فلزات سنگین را به‌عنوان عامل کاهش همزیستی میکوریزایی نیز عنوان کرده‌اند (٦ و ١١). در بررسی همبستگی بین سرب قابل‌دسترس و فاکتورهای میکورزایی تنها در کشت مَرغ همبستگی منفی و معنی‌دار مشاهده شد (جدول ۳). بنابراین کاهش فاکتورهای همزیستی میکوریزایی در حضور ریزوباکتر در کشت مَرغ را می‌توان به دو عامل افزایش فسفر و سرب قابل‌دسترس گیاه مرتبط دانست در حالی‌که اثر منفی سمیت سرب بر همزیستی میکوریزایی در کشت‌های ذرت و گاوپونه معنی‌دار نبود. ملک‌زاده و همکاران (۲۰۱۱) گزارش نمودند که درصد کلونیزه شدن ریشه ذرت در سطوح مختلف کادمیوم و در مایه‌زنی توأم با باکتری‌های محرک رشد گیاه متفاوت بود (۲۳). به‌طور مثال، در مایه‌زنی توأم *گلوموس موسه* با *باسیلوس میکودیس*، کلونیزاسیون ریشه کاهش یافت و در مایه‌زنی توأم این قارچ با *میکروکوکوس روزئوس* اختلاف معنی‌دار آماری در مقایسه با تلقیح جداگانه *گلوموس موسه* مشاهده نگردید. اما دیپوسیس و همکاران (۲۰۰٦) نشان دادند که *سودوموناس مونتولی* نه تنها کلونیزاسیون ریشه گیاه سورگوم را افزایش می‌دهد، بلکه به‌عنوان باکتری کمک‌کننده میکوریزی عمل می‌کند و به‌میزان قابل‌ملاحظه‌ای جذب کادمیوم توسط گیاه را افزایش می‌دهد (۹).

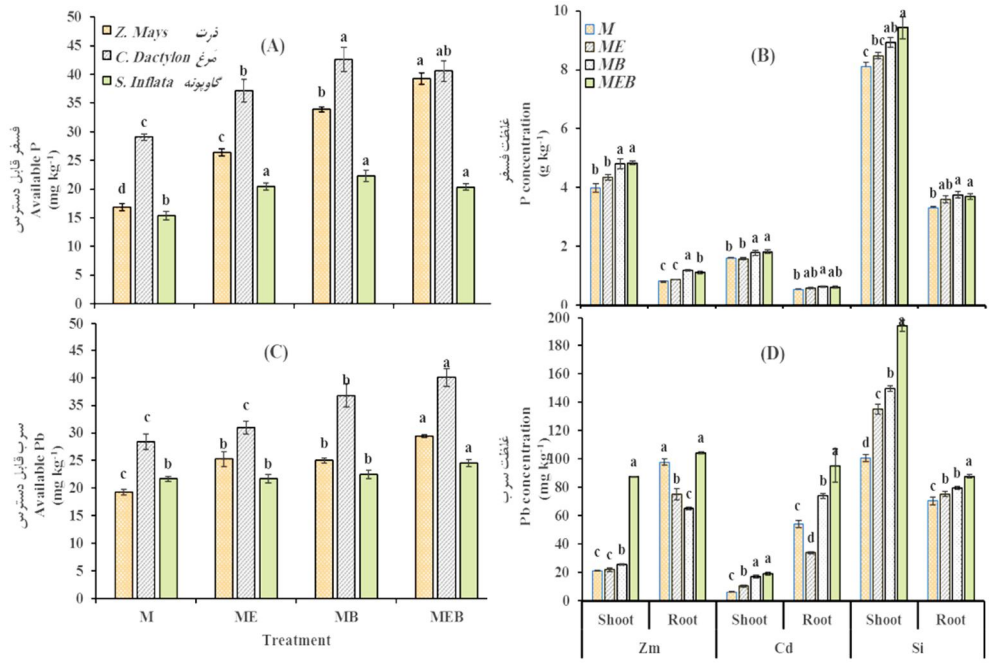
بر اساس نتایج این مطالعه، سرب قابل‌دسترس در حضور قارچ‌های میکوریزا به تنهایی، کاهش و در حضور کرم خاکی و ریزوباکترها در گیاهان میکوریزایی افزایش یافت. میزان جذب عناصر از خاک به شکل قابل‌دسترس این عناصر در خاک بستگی دارد. همچنین ارتباط این عناصر با ذرات خاک و یا تمایل گیاه به جذب آن‌ها نیز در میزان جذب یک عنصر توسط گیاه نقش دارد. قارچ‌های میکوریزا از طریق تجمع زیستی فلزات در سلول خود و یا پیوند با گلومالین (۱۲) موجب کاهش قابلیت دسترسی فلزات در خاک می‌شوند. اثر هم‌زمان فعالیت قارچی و ریزوباکترایی در افزایش تحرک یا کاهش تحرک فلزات و کاربرد آن‌ها در اصلاح زیستی توسط پژوهشگران بسیاری بررسی شده است (۲۲ و ۳۵). به‌طورکلی اسیدی شدن، کلاته شدن و پروتونه شدن منجر به افزایش تحرک فلزات در خاک و رسوی، قلیایی شدن و تشکیل کمپلکس منجر به بی‌جنبش

www.SID.ir

Archive of SID

شدن فلزات می‌شود. کرم‌های خاکی و ریزوباکترها با افزایش فسفر قابل‌جذب در خاک در حضور میکوریزا به جذب بیش‌تر آن توسط گیاه کمک می‌کنند. که با نتایج این مطالعه همخوانی دارد. گزارش شده است که غلظت عناصر در کَست‌های (فضولات) خروجی از دستگاه گوارش کرم خاکی بیش‌تر از خاک اطراف است که بیان‌کننده افزایش تحرک و قابلیت دسترسی توسط کرم خاکی است (۳۸). از سوی دیگر کَست‌های کرم خاکی غنی از اسیدهای آمینه، پروتئین و کربن آلی محلول است. این ترکیبات آلی نقش به‌سزایی در افزایش تحرک عناصر در خاک دارند (۳۸).

طبق نظر شن و همکاران (۲۰۰۶) رقیق‌سازی غلظت فلزات سنگین در گیاه (اثر رقت) در نتیجه افزایش رشد گیاه و وزن خشک اندام هوایی در تیمار قارچ میکوریزا مکانیسمی است که این ریزجانداران را قادر به بهبود تحمل گیاه به سمیت مقادیر بالای فلزات سنگین در خاک کرده است (۳۷). نقش میکوریزا در جلوگیری از انتقال فلزات سنگین به اندام‌های هوایی گیاهان توسط پژوهشگران بسیاری گزارش شده است (۱۳، ۱۵، ۱۸، ٤٤ و ٤٦) اما این ممانعت از انتقال در حضور کرم خاکی و ریزوباکترها، به‌ویژه حضور هم‌زمان هر سه موجود زنده کاهش یافته است. نتایج این مطالعه در مورد اثر حضور هم‌زمان کرم خاکی و قارچ میکوریزا با دیگر مطالعات همخوانی داشت. با این وجود در برخی مطالعات (۲۱ و ٤٥) تفاوتی در غلظت فلزات سنگین در اندام هوایی در حضور هم‌زمان کرم خاکی و قارچ میکوریزا مشاهده نشد.



شکل ۲- برهم‌کنش بین تلقیح کرم خاکی (E)، قارچ میکوریزا (M) و ریزوباکتر (B) بر فسفر قابل‌دسترس (A)، سرب قابل‌دسترس (B) خاک، غلظت فسفر ریشه و اندام هوایی (C) و غلظت سرب ریشه و اندام هوایی (D) در کشت ذرت (Zm)، مَرغ (Cd) و گاوپونه (Si) (n=٤). حروف متفاوت بالای هر ستون نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در بین تیمارهاست (تست دانکن P<۰/۰۵). خطوط عمودی نشان‌دهنده استاندارد خطاست.

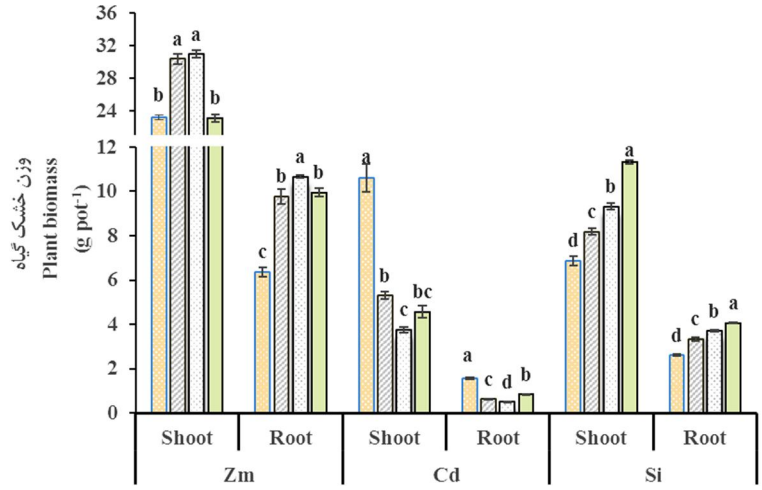
Figure 2. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi (M), bacterial (B) and earthworm (E) inoculation on soil available P (A), available Pb (B), shoot and root phosphorus (P) concentration (C) and shoot and root Pb concentration (D) in *Z. mays* (Zm), *C. dactylon* (Cd) and *S. inflata* (Si) (n=4). Different letters above each column indicated significant difference among treatments (Duncan's test. P<0.05). The vertical bars indicate the standard error of the mean.

www.SID.ir

Archive of SID

از طرفی بخشی از فلزات سنگین در بدن کرم خاکی بی‌جنبش شده و از دسترس گیاه خارج می‌شود (۲٤ و ۳۳). بنابراین بخشی از کاهش غلظت سرب در اندام هوایی گیاه در تیمار کرم- میکوریزا را می‌توان به بی‌جنبش شدن فلز در بدن کرم نسبت داد.

اثر متقابل موجودات زنده بر رشد گیاه: وزن خشک اندام هوایی و ریشه نیز در هر سه گیاه به‌طور معنی‌دار ($P<۰/۰۰۱$) تحت‌تأثیر تیمار هم‌زمان موجودات زنده به‌کار رفته در این مطالعه قرار گرفتند (جدول ۲). وزن خشک اندام هوایی ذرت در تیمارهای ME و MB، در مقایسه با تیمار میکوریزا به تنهایی افزایش یافت اما تفاوت معنی‌دار با تیمار MEB نداشت (شکل ۳). در کشت گاوپونه نیز حضور کرم خاکی (ME) و ریزوباکتر (MB) منجر به افزایش ۱۹ تا ٦٥ درصدی وزن خشک اندام هوایی شد. اما بر خلاف ذرت و گاوپونه، تیمار همزمان میکوریزا با کرم خاکی و ریزوباکتر منجر به کاهش ۵۰ تا ٦٤ درصدی وزن خشک اندام هوایی و ریشه مَرغ نسبت به تیمار میکوریزا به تنهایی گردید.



شکل ۳- برهم‌کنش بین تلقیح کرم خاکی (E)، قارچ میکوریزا (M) و ریزوباکتر (B) بر وزن خشک ریشه و اندام هوایی در کشت ذرت (Zm)، مَرغ (Cd) و گاوپونه (Si). حروف متفاوت بالای هر ستون نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در بین تیمارهاست (تست دانکن $P<۰/۰۵$). خطوط عمودی نشان‌دهنده استاندارد خطاست.

Figure 3. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi (M), bacterial (B) and earthworm (E) inoculation on shoot and root dry weight in *Z. mays* (Zm), *C. dactylon* (Cd) and *S. inflata* (Si) (n=4). Different letters above each column indicated significant difference among treatments (Duncan's test. P<0.05). The vertical bars indicate the standard error of the mean.

نتایج این مطالعه نشان داد که اثر تیمارهای هم‌زمان کرم و ریزوباکتر با قارچ میکوریزا بر رشد گیاه به نوع گیاه و به‌ویژه حساسیت آن به سمیت فلزات سنگین وابسته است. در بین سه گیاه مورد مطالعه، رشد مَرغ همبستگی منفی و معنی‌دار با سرب قابل‌دسترس ($P<۰/۰۰۱$، $r= -۰/٦۰$) داشت (جدول ۳) که نشان‌دهنده حساسیت بیش‌تر این گیاه به سمیت سرب دارد. از آن‌جایی‌که نقش اصلی میکوریزا در افزایش رشد گیاه و جلوگیری از انتقال فلزات سنگین به اندام هوایی در مطالعات مختلف گزارش شده است (۳۱ و ٤٤).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳- ضریب همبستگی پیرسون بین وزن خشک اندام هوایی و ریشه، کلونیزاسیون ریشه، فراوانی اسپور، طول ریشه و طول ریشه کلونیزه فسفر قابل‌دسترس و سرب قابل‌دسترس در کشت ذرت (Zm)، مَرغ (Cd) و گاوپونه (Si) (n=۱۶).

Table 3. Pearson correlation coefficient (r) between shoot and root biomass, root colonization, spore abundance, root length (RL), root length colonized (RLC), available P (AvP) and Pb (AvPb) in *Z. mays* (Zm), *C. dactylon* (Cd) and *S. inflata* (Si) (n=16).

	ذرت (*Z. mays*)				مَرغ (*C. dactylon*)				گاوپونه (*S. inflata*)			
	کلونیزاسیون ریشه Root colonization	فراوانی اسپور Spore abundance	طول ریشه Root Length	طول ریشه کلونیزه Root Length Colonized	کلونیزاسیون ریشه Root colonization	فراوانی اسپور Spore abundance	طول ریشه Root Length	طول ریشه کلونیزه Root Length Colonized	کلونیزاسیون ریشه Root colonization	فراوانی اسپور Spore abundance	طول ریشه Root Length	طول ریشه کلونیزه Root Length Colonized
کلونیزاسیون ریشه Root colonization	1				1				1			
فراوانی اسپور Spore abundance	ns	1			0.76***	1			0.67**	1		
طول ریشه Root Length	0.56*	ns	1		ns	ns	1		ns	ns	1	
طول ریشه کلونیزه Root Length Colonized	0.91***	ns	0.76***	1	0.92***	0.64**	0.82***	1	0.84***	0.91***	-0.53*	1
وزن خشک اندام هوایی Shoot dry weight	ns	ns	0.66**	ns	0.86***	0.60*	0.74***	0.83***	ns	-0.75***	ns	0.58*
وزن خشک ریشه Root dry weight	ns	ns	ns	ns	0.95***	0.64**	0.75***	0.95***	ns	-0.86***	0.58*	-0.84***
فسفر قابل‌دسترس Available P	-0.48*	ns	ns	ns	-0.74***	-0.63**	-0.69**	-0.71**	-0.65**	-0.87***	ns	-0.90***
سرب قابل‌دسترس Available Pb	ns	0.70***	ns	ns	-0.47*	ns	-0.72**	48* -0.	ns	ns	ns	ns
فسفر اندام هوایی Shoot P	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	-0.57*	ns	-0.57*
فسفر ریشه Root P	-0.75***	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	-0.64**	ns	-0.63**
سرب اندام هوایی Shoot Pb	ns	0.53*	ns	ns	-0.53*	ns	-0.68**	-0.57*	ns	-0.74***	0.56*	-0.69**
سرب ریشه Root Pb	ns	ns	-0.51*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	-0.61*	0.62*	-0.57*

ns، *، ** و *** به‌ترتیب غیرمعنی‌دار، معنی‌دار در سطح احتمال پنج (P>۰/۰۵)، یک (P>۰/۰۱) و یک‌دهم (P>۰/۰۰۱) درصد.

ns, *, **, *** not significant and significant at P<0.05, P<0.01 and P<0.001, respectively.

www.SID.ir

Archive of SID

بنابراین به‌نظر می‌رسد که هرچه حساسیت گیاه به سمیت فلزات سنگین بیش‌تر باشد این همبستگی بین رشد گیاه و همزیستی میکوریزایی مشهودتر خواهد بود. نتایج این مطالعه نشان داد که همبستگی بین وزن خشک اندام هوایی ذرت با فاکتورهای همزیستی معنی‌دار نبود اما در کشت مَرغ مثبت و معنی‌دار بود (جدول ۳). در مورد گیاه گاوپونه این همبستگی نه تنها مثبت نبود بلکه به‌خصوص بین وزن خشک ریشه و فاکتورهای همزیستی (فراوانی اسپور و طول ریشه کلونیزه (P<۰/۰۰۱)) منفی بود. بنابراین طبق فرضیه مطرح شده همبستگی بین میزان همزیستی و رشد گیاه تابع عوامل دیگری همچون حساسیت گیاه به سمیت فلزات سنگین در خاک‌های آلوده است. به‌طورکلی همبستگی بین وزن خشک اندام هوایی با درصد کلونیزاسیون متفاوت بود که نشان می‌دهد که درصد کلونیزاسیون ریشه نیز شاخص مناسبی از رشد گیاه نیست و به عوامل دیگری هم‌چون نوع و حساسیت گیاه به سمیت فلزات بستگی دارد.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد تلقیح جداگانه یا هم‌زمان ریزوباکترها و کرم خاکی گیاه میکوریزایی در خاک به‌طور قابل‌توجهی درصد کلونیزاسیون ریشه، فراوانی اسپورها، قابلیت دسترسی فسفر خاک و همچنین رشد گیاه را تحت‌تأثیر قرار می‌دهد که با توجه به نوع گیاه و همچنین نوع موجود زنده همراه با میکوریزا نتایج متفاوت بود. کاهش همزیستی مشاهده شده در هر سه گیاه در حضور ریزوباکتر را می‌توان به غلظت فسفر خاک مرتبط دانست. علاوه بر این، کاهش فاکتورهای همزیستی میکوریزایی در حضور ریزوباکتر در کشت مَرغ به سرب قابل‌دسترس نیز وابسته است. با این وجود، در حضور هم‌زمان ریزوباکترها و کرم خاکی گیاه میکوریزایی (MEB)، اثر منفی کرم خاکی و یا ریزوباکتر بر درصد کلونیزاسیون تا اندازه‌ای کاهش یافت. فراوانی اسپورها نیز کم‌ترین تغییرات را در بین تیمارهای هم‌زمان نسبت به تیمار میکوریزا به تنهایی نشان داد که چنین استنباط می‌شود که فراوانی اسپورها همیشه شاخص مناسبی برای بیان همزیستی میکوریزایی نیست و به نوع گیاه و جانداران خاک بستگی دارد. از آن‌جایی‌که تنها در گیاه مَرغ همبستگی منفی و معنی‌دار بین غلظت سرب در اندام هوایی و فاکتورهای همزیستی مشاهده شده است، به‌نظر می‌رسد که اثر سمیت سرب در اندام هوایی مَرغ نسبت به فسفر در کاهش همزیستی میکوریزایی غالب‌تر بوده است.

منابع

1.Andrade, S.A.L., Abreu, C.A., Abreu, M.F., and Silveria, A.P.D. 2004. Influence of lead addition on arbuscular mycorrhiza and rhizobium symbiosis under soybean plants. Applied Soil Ecology. 26: 123-131.

2.Artursson, V., Finlay, R.D., and Jansson, J.K. 2006. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth. Environmental Microbiology. 8: 1-10.

3.Belimov, A.A., Kunakova, A.M., Safronova, V.I., Stepanok, V.V., Yudkin, L.Y., Akleseev, Y.V., and Kozhemyakov, A.P. 2004. Employment of rhizobacteria for the inoculation of barley plants cultivated in soil contaminated with lead and cadmium. Microbiology. 73: 99-106.

4.Bruce, A., Smith, S.E., and Tester, M. 1994. The development of mycorrhizal infection in cucumber: effects of P supply on root growth, formation of entry points and growth of infection units. New Phytologist. 1: 507-514.

www.SID.ir

Archive of SID

5.Campbell, C.R., and Plank, C.O. 1998. Preparation of plant tissue for laboratory analysis. In: Kalra Y.P. (ed) Handbook of Reference Methods for Plant Analysis. CRC Press, Taylor & Francis Group. Pp: 37-50.
6.Chen, B.D., Liu, Y., Shen, H., Li, X.L., and Christie, P. 2004. Uptake of cadmium from an experimentally contaminated calcareous soil by arbuscular mycorrhizal maize (*Zea mays* L.). Mycorrhiza. 14: 347-354.
7.Chen, X., Wu, C., Tang, J., and Hu, S. 2005. Arbuscular mycorrhizae enhance metal lead uptake and growth of host plants under sand culture experiment. Chemosphere. 60: 665-671.
8.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. J. Hazard. Mater. 177: 323-330.
9.Duponnois, R., Kisa, M., Assigbetse, K., Prin, Y., Thioulouse, J., Issartel, M., Moulin, P., and Lepage, M. 2006. *Fluorescent pseudomonads* occurring in *Macrotermes subhyalinus* mound structures decrease Cd toxicity and improve its accumulation in sorghum plants. Science of the Total Environment. 370: 391-400.
10.Eisenhauer, N., König, S., Sabais, A.C., Renker, C., Buscot, F., and Scheu, S. 2009. Impacts of earthworms and arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomus intraradices*) on plant performance are not interrelated. Soil Biology and Biochemistry. 41: 561-567.
11.Gildon, A., and Tinker, P.B. 1983. Interactions of vesicular-arbuscular mycorrhizal infection and heavy metals in plants. The effects of heavy metals on the development of vesicular-arbuscular mycorrhizas. New Phytologist. 95: 247-261.
12.Gonzalez-Chavez, M., Carrillo-Gonzalez, R., Wright, S., and Nichols, K. 2004. The role of glomalin, a protein produced by arbuscular mycorrhizal fungi, in sequestering potentially toxic elements. Environmental Pollution. 130: 317-323.
13.Hassan, S.E., Hijri, M., and St-Arnaud, M. 2013. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on trace metal uptake by sunflower plants grown on cadmium contaminated soil. New Biotechnology. 30: 780-787.
14.Hua, J.F., Lin, X.G., Bai, J.F., Shao, Y.F., Yin, R., and Jiang, Q. 2010. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi and earthworm on nematode communities and arsenic uptake by maize in arsenic contaminated soils. Pedosphere. 20: 163-173.
15.Hu, J., Wang, H., Wu, F., Wu, S., Cao, Z., Lin, X., and Wong, M.H. 2014. Arbuscular mycorrhizal fungi influence the accumulation and partitioning of Cd and P in bashful grass (*Mimosa pudica* L.) grown on a moderately Cd-contaminated soil. Applied Soil Ecology. 73: 51-57.
16.Jenkins, W.R. 1964. A rapid centrifugal technique for separating nematodes from soil. Plant Disease Reporter. 48: 692-701.
17.Lebron, L., Zou, X.M., and Lodge, D.J. 1998. Disturbance VA mycorrhizae by earthworm in a pasture and a forest in Puerto Rico. Second International Conference on Mycorrhiza, Uppsala, Sweden. Pp: 5-10.
18.Li, Y., Peng, J., Shi, P., and Zhao, B. 2009. The effect of Cd on mycorrhizal development and enzyme activity of *Glomus mosseae* and *Glomus intraradices* in *Astragalus sinicus* L. Chemosphere. 75: 894-899.
19.Li, Xiang D., Wang, Ch., Li, X., and Lou, Y. 2012. Effects of epigeic earthworm *(Eisenia fetida)* and arbuscular mycorrhizal fungus (*Glomus intraradices*) on enzyme activities of a sterilized soil–sand mixture and nutrient uptake by maize. Biology and Fertility of Soils. 48: 879-887.
20.Lindsay, W.L., and Norvell, W.A. 1978. Development of DTPA soil test for zinc, iron, manganese, and copper. Soil Sci. Soc. Amer. J. 42: 421-428.
21.Ma, Y., Dickinson, N.M., and Wong, M.H. 2006. Beneficial effects of earthworms and arbuscular mycorrhizal fungi on establishment of leguminous trees on Pb/Zn mine tailings. Soil Biology and Biochemistry. 38: 1403-1412.

www.SID.ir

Archive of SID

22.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.
23.Malekzadeh, A., Alikhani, H., Savaghebi Firoozabadi, Gh., and zarei, M. 2011. Interaction between Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Cd-Resistant PGPR in Phytoremediation of Cadmium. J. Water Soil. 25: 266-274. (Translated in Persian)
24.Marino, F., and Morgan, A.J. 1999. The time-course of metal (Ca, Cd, Cu, Pb, Zn) accumulation from a contaminated soil by three populations of the earthworm, *Lumbricus rubellus*. Applied Soil Ecology. 12: 169-177.
25.Marschner, H., and Dell, B. 1994. Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. Plant and Soil. 159: 89-102.
26.Milleret, R., Le Bayon, R.C., and Gobat, J.M. 2009. Root, mycorrhiza and earthworm interactions: their effects on soil structuring processes, plant and soil nutrient concentration and plant biomass. Plant and Soil. 316: 1-12.
27.Nadeem, S.M., Ahmad, M., Zahir, Z.A., Javaid, A., and Ashraf, M. 2014. The role of mycorrhizae and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in improving crop productivity under stressful environments. Biotechnology Advances. 32: 429-448.
28.Nogueira, M.A., and Cardoso, E.J.B.N. 2007. Phosphorus availability changes the internal and external endomycorrhizal colonization and affects symbiotic effectiveness. Scientia Agricola, (Piracicaba, Braz.). 64: 295-300.
29.Olsen, S.R., Cole, C.V., Watanabe, F.S., and Dean, L.A. 1954. Estimation of available phosphorus in soil by extraction with sodium bicarbonate. USDA. Circ. 939. U. S. GOV. Print Office, Washington, DC.
30.Olsen, S.R., and Sommers, L.E. 1982. Phosphorus, P 403-430, In: Page A.L. (Ed), Methods of soil analysis, Part 2, Chemical and Microbiological properties, Soil Sci. Soc. Amer. J. Madison, 1982.
31.Orlowska, E., Godzik, B., and Turnau, K. 2012. Effect of different arbuscular mycorrhizal fungal isolates on growth and arsenic accumulation in *Plantago lanceolata* L. Environmental Pollution. 168: 121-130.
32.Ortiz-Ceballos, A.I., Pena-Cabriales, J.J., Fragoso, C. and Brown, G.G. 2007. Mycorrhizal colonization and nitrogen uptake by maize: combined effect of tropical earthworms and velvet bean mulch. Biology and Fertility of Soils. 44: 181-186.
33.Ownby, D.R., Galvan, K.A., and Lydy, M.J. 2005. Lead and zinc bioavailability to *Eisenia fetida* after phosphorus amendment to repository soils. Environmental Pollution. 136: 315-321.
34.Philips, J.M., and Hayman, D.S. 1970. Improved procedure from clearing root and vesicular arbuscular mycorrhiza fungi for rapid assessment of infection. Transactions of the British Mycological Society. 55: 158-160.
35.Rajkumar, M., Sandhya, S., Prasad, M.N.V., and Freitas, H. 2012. Perspectives of plant-associated microbes in heavy metal phytoremediation. Biotechnology Advances. 30: 1562-1573.
36.Selvakumar, G., Murugesan, Ch., Charlotte, Sh., Kiyoon, K., and Tongmin, S. 2012. Spore associated bacteria (SAB) of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) increase nutrient uptake and plant growth under stress conditions. Korea. J. Soil Sci. Fertil. 45: 582-592.
37.Shen, H., Christie, P., and Li, X. 2006. Uptake of zinc, cadmium and phosphorus by arbuscular mycorrhizal maize (*Zea mays* L.) from a low available phosphorus calcareous soil spiked with zinc and cadmium. Environmental Geochemistry and Health. 28: 111-119.
38.Sizmur, T., Palumbo-Roe, B., Watts, M.J., and Hodson, M.E. 2011. Impact of the earthworm *Lumbricus terrestris* L. on As, Cu, Pb and Zn mobility and speciation in contaminated soils. Environmental Pollution. 159: 742-748.
39.Smith, S.E., and Read, D.J. 2008. Mycorrhizal symbiosis. 3rd edn. Academic Press.
40.Tennant, D. 1975. A test of a modified line intersect method of estimating root length. J. Ecol. 63: 995-1001.

www.SID.ir

Archive of SID

41. Tuffen, F., Eason, W.R., and Scullion, J. 2002. The effect of earthworm and arbuscular mycorrhizal fungi on growth of and ^{32}P transfer between *Allium porrum* plants. Soil Biology and Biochemistry. 34: 1027-1036.
42. Vivas, A., Voros, I., Biro, B., Barea, J.M., Ruiz-Lozano, J.M. and Azcon, R. 2003. Beneficial effects of indigenous Cd-tolerant and Cd sensitive *Glomus mosseae* associated with a Cd-adapted strain of *Brevibacillus brevis* in improving plant tolerance to Cd contamination. Applied Soil Ecology. 24: 177-186.
43. Watts-Williams, S., and Cavagnaro, T. 2012. Arbuscular mycorrhizas modify tomato responses to soil zinc and phosphorus addition. Biol. Fertil. Soils. 48: 285-294.
44. Wu, F.Y., Bi, Y.L., Leung, H.M., Ye, Z.H., Lin, X.G., and Wong, M.H. 2010. Accumulation of As, Pb, Zn, Cd and Cu and arbuscular mycorrhizal status in populations of *Cynodon dactylon* grown on metal-contaminated soils. Applied Soil Ecology. 44: 213-218.
45. Yu, X., Cheng, J., and Wong, M.H. 2005. Earthworm-mycorrhiza interaction on Cd uptake and growth of ryegrass. Soil Biology and Biochemistry. 37: 195-201.
46. Zhang, X.C., Lin, L., Chen, M.Y., Zhu, Z.Q., Yang, W.D., Chen, B., Yang, X.E., and An, Q.L. 2012. A nonpathogenic Fusarium oxysporum strain enhances phytoextraction of heavy metals by the hyperaccumulator *Sedum alfredii* Hance. J. Hazard. Mater. 229: 361-370.

www.SID.ir

Archive of SID

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

J. of Water and Soil Conservation, Vol. 25(3), 2018
http://jwsc.gau.ac.ir
DOI: 10.22069/jwsc.2018.14253.2898

The efficiency of earthworms and rhizobacteria on mycorrhizal symbiosis and growth of three plant species in a soil contaminated with Lead (Pb) metal

***A. Mahohi[1] and F. Raiesi[2]**
[1]Ph.D. Student, Dept. of Soil Science Engineering, University of Shahrekord,
[2]Professor, Dept. of Soil Science Engineering, University of Shahrekord
Received: 11.17.2017; Accepted: 05.09.2018

Abstract

Background and Objectives: Lead (Pb) is considered to be particularly toxic and responsible for significant decreases in biological activities in soils. Phytoremediation is an emerging and low-cost technology that utilizes plants to remove, transform, or stabilize contaminants located in water, sediments, or soils. The success of phytoremediation depends on the interactions between rhizosphere macro and microorganisms and plant roots. Among these organisms, the role of earthworms, mycorrhizal fungi, and plant growth promoters' rhizobacteria have been considered. In this study, we have evaluated and compared the combined effects of earthworms and bacteria on root colonization and plant growth in a contaminated soil.

Materials and Methods: Three plant species seeds (*Zea mays* (*maize*); *Cynodon dactylon* (*bermudagrass*) and *Stachys inflata*), after surface-sterilization and germination were transplanted into each plastic pot contained 4 kg of contaminated soil (collected from bama mining area located in the southwest of Isfahan) that already autoclaved at 121 ^{o}C for 2 h. A completely randomized design with 2×2×2 factorial treatment combination was used with the following factors: with or without earthworm treatments (*Eisenia foetida*), with or without arbuscular mycorrhizal (AM) fungal treatments and with or without rhizobacteria. After about three (*bermudagrass* and *maize)* and four (*Stachys inflata*) month growth in greenhouse condition, plant shoots were harvested. Pb and phosphorus (P) concentration, root colonization, spore abundance and root colonized length were determined.

Results: In general, inoculation of these organisms differently affected root colonization, spore abundance, soil phosphorus (P) availability and plant growth, and showed variable results depending upon plant species and soil organisms involved. The significant and negative correlations between soil P availability and root colonization for all the plants (*maize*: r= -0.48, P<0.05; *bermudagrass*: r= -0.74, P<0.001 and *Stachys inflata*: r= -0.65, P<0.01) suggests that the increased P availability would mainly be responsible for the decreases of root colonization in the presence of earthworms or rhizobacteria. But the negative correlation between available Pb and colonization only showed in *C. dactylon* and demonstrated that the negative effects of Pb on mycorrhizal symbiosis depends on plant sensitivity on the toxicity of Pb. Furthermore, among all mycorrhizal symbiosis determined in this study, the spore abundance had a lower change between co-inoculation. The correlations between spore abundance and root colonization were also different for the three plant species (*maize*: ns; *bermudagrass*: r= -0.76, P<0.001 and *S. inflata*: r= -0.67, P<0.01), showing that spore abundance could not be a suitable index for mycorrhizal dependency, and that it depends on plant species and soil organisms considered.

Conclusion: This study showed that increasing the availability of soil P and Pb could be one of the decrease factors in root colonization, but the negative Pb effects depend on plant sensitivity. Furthermore, root colonization may not alone be a suitable index for plant growth and could be different with plant species and soil P or Pb concentrations. Furthermore, the relationship between plant growth and mycorrhizal symbiosis was higher in plant sensitive to Pb toxicity.

Keywords: AM fungi, Earthworms, Rhizobacteria, Root colonization

* Corresponding Author; Email: alimahohi@yahoo.com

www.SID.ir