اثرات تلقیح ریزوبیومی بر شاخص‌های تشریحی برگ یونجه (*Medicago sativa*) تحت آلودگی گاز دی‌اکسیدگوگرد

شیما حسین‌خانی هزاوه و مهری عسکری*

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اراک، کد پستی ۳۸۱۵۶-۸-۸۳۴۹

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۰۹/۱۱ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۲/۱۴)

چکیده:

گاز دی‌اکسیدگوگرد (SO_2) یکی از مهم‌ترین آلاینده‌های هوا است که در غلظت‌های بالا می‌تواند سبب اختلال در رشد و عملکرد فیزیولوژیکی گیاهان شود. همزیستی ریزوبیوم-گیاه، علاوه بر افزایش رشد گیاه می‌تواند باعث افزایش مقاومت گیاه نسبت به تنش‌های زیستی و غیر زیستی شود. در این مطالعه اثرات ریزوبیوم (سویه بومی و استاندارد) بر شاخص‌های تشریحی برگ یونجه تحت غلظت‌های مختلف گاز دی‌اکسیدگوگرد (۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ ppm) ارزیابی شد. نتایج نشان داد که تلقیح ریزوبیوم روی شاخص‌های تشریحی برگ یونجه اثری ندارد. غلظت‌های بالای SO_2 (۱، ۱/۵ و ۲ ppm) سبب تغییرات معنی‌دار تمامی شاخص‌های تشریحی در مقایسه با گیاهان شاهد می‌شود ولی غلظت پایین گاز SO_2 (۰/۵ ppm) تأثیری بر این شاخص‌ها نداشت. تلقیح یونجه با دو سویه ریزوبیوم اثرات منفی غلظت‌های بالای گاز SO_2 را بر شاخص‌های تشریحی کاهش داد. بنابراین ریزوبیوم می‌تواند مقاومت و تحمل گیاه را در برابر تنش‌های غیر زیستی مثل آلودگی SO_2 هوا افزایش دهد.

کلمات کلیدی: آلودگی SO_2، ریزوبیوم، شاخص‌های تشریحی، یونجه *(Medicago sativa)*.

مقدمه:

آلودگی هوا یکی از بزرگ‌ترین مشکلات زیست محیطی شهرهای توسعه یافته و در حال توسعه می‌باشد و گیاهان نیز ضمن این که می‌توانند تا اندازه‌ای در کاهش آلودگی هوا موثر باشند تحت تأثیر آلاینده‌ها قرار گرفته و آسیب می‌بینند. گیاهان م ختلف نسبت به آلودگی هوا حساسیت‌های متفاوتی نشان می‌دهند (Breusgem *et al*., 2001). کاهش رشد و اختلال در رفتارهای بیولوژیکی تحت تأثیر آلاینده‌ها مشاهده می‌شود. گیاهان در برابر تنش‌های محیطی با مکانیسم‌های دفاعی شانس خود را برای بقا افزایش می‌دهند. در بین آلاینده‌های اتمسفری، دی‌اکسیدگوگرد یکی از سمی‌ترین آلاینده‌ها برای گیاهان است که از طریق روزنه‌ها و کوتیکول جذب می‌شود (Tatsumoto and Yoshinari, 1991). SO_2 گازی بی‌رنگ و خورنده است که از سوختن سوخت‌های فسیلی غنی از گوگرد، آتش‌سوزی جنگل، فوران‌های آتشفشانی، ذوب سنگ معدن و تولید آهن، فولاد، آلومینیم، مس، سرب، روی و طلا ایجاد می‌شود. رخداد جنگ جهانی دوم و به دنبال آن گسترش اقتصاد پس از جنگ، منجر به افزایش بی‌سابقه انتشار گاز SO_2 به محیط شد. در سال‌های ۲۰۰۲-

*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی:m-askary@araku.ac.ir

Archive of SID

www.SID.ir

۲۰۰۵ نشر SO_2 به محیط افزایش ناگهانی یافت، در حال حاضر ۴۰٪ انتشار جهانی این گاز از منطقه آسیا، به خصوص چین نشأت می‌گیرد و انتشار جهانی آن به محیط همچنان رو به افزایش است (Smith *et al.*, 2011).

گاز SO_2 پس از جذب توسط کوتیکول یا منافذ روزنه، در دیواره سلول‌های برگی با آب ترکیب و به سولفیت SO_3^{2-} سمی، یک عامل هسته‌دوست قوی، تبدیل می‌گردد. برخی گیاهان می‌توانند با افزایش نرخ تبدیل سولفیت توسط جریان تثبیتی سولفور و تولید سیستئین و یا اکسایش مجدد سولفیت به سولفات توسط سولفیت‌اکسیداز، مقدار سولفیت درون سلول را کنترل کنند (Lang *et al.*, 2007). بارش اسیدی ناشی از آلودگی گازهای گوگرددار نیز به ریشه گیاهان آسیب می‌رساند. در pH اسیدی حاصل، باکتری‌های مفید خاک که از مواد آلی در حال فساد استفاده و مواد معدنی آن‌ها را آزاد می‌کنند، کشته می‌شوند که این سبب کمبود مواد غذایی در دسترس گیاهان می‌شود. بارش باران اسیدی به لایه مومی روی برگ‌ها نیز آسیب می‌زند و گیاهان را نسبت به بیماری‌ها آسیب‌پذیر می‌سازد. جوانه‌زنی و تولیدمثل گیاهان نیز توسط باران اسیدی بازداشته می‌شود (Irshad *et al.*, 2011). عملکرد گیاه برای جلوگیری یا کاهش ورود گاز SO_2، اعمال تغییراتی از جمله تغییر در گشودگی دهانه، تعداد روزنه و تراکم کرک در سطوح زیرین و زبرین برگ می‌باشد (Sharma, 1977).

ریزوباکترهای محرک رشد گیاه مثل ریزوبیوم ضمن افزایش رشد گیاهان همزیست با آنها می‌توانند از اثرات زیان‌آور عوامل تنش‌زای محیطی جلوگیری کنند (Yang *et al.*, 2009; Bojnanska *et al.*, 2012). در تنش‌های غیرزیستی، ریزوبیوم با القای یک سری تغییرات فیزیکی و شیمیایی در گیاهان، سبب افزایش مقاومت به تنش می‌شود، فرآیندی که به عنوان مقاومت سیستمیک القایی (Induced Systemic Resistance) مطرح می‌شود (Dimkpa *et al.*, 2009). تولید هورمون‌هایی مثل آبسیزیک‌اسید که موجب بسته شدن روزنه‌ها می‌شود و آنتی‌اکسیدان‌هایی مثل سوپر اکسید دیسموتاز که باعث مهار رادیکال‌های آزاد می‌شوند و تولید ترکیبات اسمولیت که در هنگام تنش منجر به ایجاد تعادل اسمزی در گیاه می‌شوند از جمله سازوکارهای به‌کاررفته توسط این باکتری‌ها است (Yang *et al.*, 2009). به دلیل نقش موثر میکروارگانیسم‌ها در حلالیت، زیست فراهمی و تحرک عناصر، توان تطبیقی بالای بقولات به شرایط مختلف و نامساعد و استفاده از رابطه مفید همزیستی به عنوان یک سیستم ارزشمند در حاصلخیزی خاک، همزیستی لگوم-ریزوبیوم کاندیدای خوبی در زیست‌پالایی آلاینده‌ها است (Dimkpa *et al.*, 2009). گیاه یونجه (*Medicago sativa*) به عنوان ملکه نباتات علوفه‌ای با سطح زیر کشت ۳۲ میلیون هکتار در جهان (Benabderrahim *et al.*, 2009)، علوفه غالب در مناطقی با آب و هوای معتدل است (Graham and Vance, 2003). مطالعه حاضر به منظور بررسی اثرات آلاینده SO_2 هوا بر شاخص‌های تشریحی برگ گیاه یونجه و ارزیابی اثرات دو سویه باکتری ریزوبیوم بر کاهش اثرات منفی آلودگی گاز SO_2 هوا بر این صفات صورت گرفت تا در صورت بقاء و تغییرات اندک شاخص‌های تشریحی گیاه (تلقیحی یا غیرتلقیحی) در حضور آلاینده SO_2، کاشت گیاه علوفه‌ای یونجه در اطراف شهرهای آلوده به منظور کاهش آلودگی SO_2 هوا پیشنهاد گردد.

مواد و روش‌ها:

تهیه باکتری و آماده‌سازی مایه تلقیح: ریزوبیوم بومی از ریشه یونجه جمع‌آوری شده از زمین‌های مزروعی اطراف اراک استخراج شد. پس از سترون‌سازی ریشه با اتانول و شستشو با آب مقطر استریل (Swift and Bignell, 2001) گرهک‌های صورتی حاوی باکتری فعال از ریشه جدا و در آب مقطر له شده و در محیط جامد YMA (Molla *et al.*, 2001) کشت داده شدند و به انکوباتور ۲۵°C منتقل شدند. سپس نوع واکنش گرم و مورفولوژی باکتری در زیر میکروسکوپ بررسی شد. تشکیل کلنی‌های محدب و

Archive of SID

www.SID.ir

برجسته، نیمه شفاف، لزج، موسیلاژی و واکنش گرم منفی نشانه موفقیت‌آمیز بودن جداسازی در نظر گرفته شد (Swift and Bignell, 2001).

ریزوبیوم استاندارد *Rhizobium meliloti* PTCC 1684 به صورت لیوفیلیزه از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد. جهت فعال‌سازی، آمپول حاوی باکتری در شرایط استریل شکسته و ۱ml محیط کشت مایع YMA به پودر باکتری اضافه شد. یک لوپ میکروبیولوژی از باکتری فوق در ۱۰۰ml محیط مایع YMA حل و ۲۴ ساعت روی شیکر (۲۰۰rpm) گذاشته تا باکتری تکثیر پیدا کند. غلظت بهینه ریزوبیوم جهت تحریک رشد یونجه 10^5cfu mL^{-1} گزارش شده است (Caetano-Anolles *et al.*, 1988)، دو سویه ریزوبیوم بومی و ریزوبیوم استاندارد در محیط YMA مایع (Molla *et al.*, 2001) در ۲۵°C به مدت ۲۴ ساعت در روتاری شیکر (۲۰۰ rpm) کشت داده شدند (Sadovinkova *et al.*, 2003). سپس کشت‌ها سانتریفوژ (۱۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه) و در بافر فسفات تا رسیدن به غلظت 10^8cfu mL^{-1} دوباره محلول شدند. در صورتی جذب نوری در محلول YMA مایع در طول موج ۶۲۰ نانومتر معادل ۰/۱ باشد غلظت ریزوبیوم 10^8 در نظر گرفته شد (Bai *et al.*, 2003). سپس غلظت 10^5 از هر دو باکتری با رقیق نمودن محلول‌های مادر فوق توسط بافر فسفات تهیه شد.

تهیه و تلقیح بذر: بذر یونجه رقم همدانی (*Medicago sativa* cv. Hamedani) از مرکز تحقیقات جهاد کشاورزی اراک تهیه شد. بذرها با اتانول ۷۰٪ (۲ دقیقه) و هیپوکلریت‌سدیم ۱٪ (۵ دقیقه) ضدعفونی سطحی و سپس ۵ بار با آب مقطر شستشو داده شدند (Wang and Oyaizu, 2009). بذرهای سترون‌شده به مدت چند ساعت در محیط غذایی قرار داده و به سه گروه تقسیم شدند. یک گروه از بذرها در مایه تلقیح باکتری بومی با غلظت 10^5 cfu mL^{-1} تحت خلأ و در درجه‌حرارت محیط به مدت ۲ ساعت قرار داده شد. یک گروه مایه تلقیح باکتری استاندارد را با همان غلظت و شرایط دریافت کردند و گروه سوم شاهد در همان شرایط و در بافرفسفات استریل (بدون باکتری) قرار گرفتند (Bashan *et al.*, 1989).

کشت هیدروپونیک بذرهای یونجه تلقیح شده: بذرهای یونجه شاهد و تلقیحی به پتری‌دیش منتقل و ۲۴ ساعت در تاریکی جهت جوانه‌زنی قرار گرفتند. بعد از جوانه‌زنی، بذرها به میکروتیوب‌های استریل درون ظروف پلاستیکی حاوی دو لیتر محلول منتقل شدند. اکسیژن‌دهی به وسیله پمپ هوا انجام شد. هر ظرف محتوی بذرهای یونجه شاهد یا تلقیح‌شده، یک تیمار در نظر گرفته شد. این ظروف در شرایط محیط در درجه حرارت ۲۰°C در شب و ۲۵°C در روز و فتوپریود ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند (Bashan *et al.*, 1989).

تزریق گاز SO_2: گاز دی‌اکسیدگوگرد ۰/۱٪ از پتروشیمی شازند اراک تهیه شد. ۳۵ روز پس از رشد گیاهان، تزریق گاز SO_2 در غلظت‌های مختلف ۰ (شاهد)، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ppm ۲ به ظروف (با حجم ۶ لیتر هوای آزاد) محتوی گیاهان تلقیح‌نشده، گیاهان تلقیح‌شده با ریزوبیوم بومی و استاندارد انجام شد. تزریق گاز به وسیله سرنگ به مدت ۶ روز و هر روز ۲ ساعت با بستن کامل درب ظروف پلاستیکی انجام شد (Agrawal *et al.*, 1985). پس از دو ساعت انکوباسیون با باز کردن درب ظروف، گیاهان به هوای معمولی انتقال یافتند. در طی این مدت درب ظروف شاهد (۰ppm) هم بسته بودند و جریان هوای معمولی را نداشتند. برداشت نهایی به منظور بررسی برگ و ریشه در روز ۴۵ روزگی گیاهان صورت گرفت. برگ‌های فوقانی هر گیاه برای انجام آزمایش انتخاب شد.

رنگ‌آمیزی با تترازولیوم: ریشه برخی گیاهان تلقیح‌شده ۲ ساعت در محلول ۲، ۳، ۵-تری‌فنیل‌تترازولیوم‌کلراید ۱gL-1 قرار گرفتند و پس از شستشو حضور گرهک قرمز فعال از نظر آنزیم نیتروژناز بررسی گردید. در این رابطه از خاصیت احیاءشوندگی تترازولیوم در حضور آنزیم نیتروژناز فعال باکتری و تشکیل رنگ قرمز استفاده شد. آنزیمی که توانایی احیای تترازولیوم را دارد آنزیم نیتروژناز

Archive of SID

www.SID.ir

شکل ۱- تغییر رنگ ندادن ریشه گیاهان تلقیح‌نشده در تترازولیوم (الف)، قرمز شدن ریشه گیاهان تلقیح‌شده با ریزوبیوم در تترازولیوم (ب) و برش عرضی ریشه یونجه تلقیح‌شده با ریزوبیوم ملیلوتی (شکل د).

است. تترازولیوم احیا شده تولید رنگ صورتی می‌کند. تولید رنگ صورتی در گرهک‌های موجود در ریشه، حضور و ورود باکتری که دارای آنزیم نیتروژناز فعال است را به اثبات می‌رساند. در این آزمایش آنزیم نیتروژناز به طور جداگانه مورد بررسی واقع نشده بلکه علائم نشان دهنده فعالیت آن که در واقع اثبات کننده‌ی حضور باکتری در ریشه و موفق بودن فرآیند تلقیح است بررسی شده است (Cocking *et al.*, 1992).

بررسی صفات تشریحی برگ: اپیدرم سطح رویی (adaxial) و زیرین (abaxial) برگ یونجه شاهد و تلقیحی که تحت تأثیر غلظت‌های مختلف گاز دی‌اکسیدگوگرد بودند، به صورت دستی تهیه شد. شمارش تعداد کرک و روزنه در دو سطح زبرین و زیرین در مساحت ۱۳mm^2/ و اندازه‌گیری اندازه کرک و دهانه روزنه (میکرومتر) به وسیله گراتی‌کیول انجام شد (Noori, 2002). پس از تهیه مقاطع عرضی برگ با میکروتوم، رنگ‌آمیزی به روش هماتوکسیلین، ائوزین انجام شد. از نمونه‌ها عکس‌برداری و ابعاد سلول‌های پارانشیم نردبانی و قطر سلول‌های پارانشیم اسفنجی توسط نرم‌افزار موتیک (MOTIC IMAGES ADVANCED 3.2 SOFTWARE) اندازه‌گیری شد (Kiernan, 1999). آزمایش‌ها در طرح کاملاً تصادفی در قالب آزمایشات فاکتوریل در ۳ تکرار انجام شد. آنالیز داده‌ها از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن و برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel استفاده گردید.

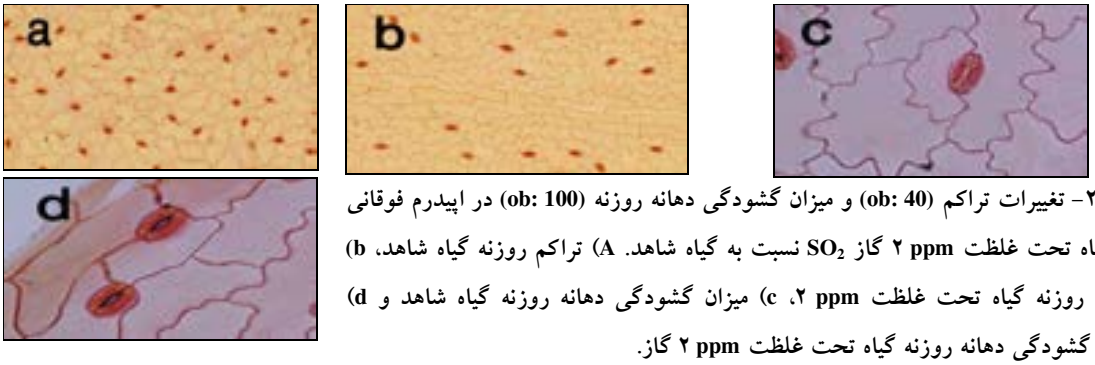
نتایج:

آزمایش تترازولیوم قرمز شدن ریشه یونجه تلقیح‌شده با ریزوبیوم بومی و استاندارد را نشان داد و بررسی برش عرضی ریشه گیاهان وجود نقاط قرمز رنگ در سلول‌های ریشه را تایید کرد (شکل ۱).

تلقیح ریزوبیومی اثر معنی‌داری بر تراکم و میزان گشودگی دهانه روزنه، تراکم و طول کرک نشان نداد ولی تزریق گاز SO_2 بر تراکم روزنه اپیدرم تحتانی (سطح ۰/۰۵) و فوقانی، گشودگی دهانه روزنه، تراکم و طول کرک در هر دو سطح فوقانی و تحتانی اپیدرم اثر معنی‌داری (سطح ۰/۰۱) داشت. در شرایط بدون تنش (۰ppm) تراکم و میزان گشودگی روزنه در اپیدرم فوقانی کمتر و در اپیدرم تحتانی بیشتر است. مقایسه میانگین‌های حاصل از اثر گاز SO_2 نشان می‌دهد که تراکم و میزان گشودگی روزنه در هر دو سطح تحت غلظت ۰/۵ ppm مشابه شاهد است. با افزایش غلظت گاز در سطح فوقانی تراکم روزنه کاهش و میزان گشودگی روزنه افزایش می‌یابد (شکل ۲). در غلظت ۲ ppm کاهش ۳۵/۴۹ درصدی در تراکم روزنه و افزایش ۴۹/۴۳ درصدی در میزان گشودگی دهانه روزنه مشاهده می‌شود. در سطح تحتانی حالت عکس مشاهده می‌شود یعنی با افزایش غلظت گاز، تراکم روزنه افزایش و گشودگی دهانه روزنه کاهش می‌یابد. در اپیدرم تحتانی، بیشترین و کمترین تراکم روزنه به ترتیب در ۲ ppm (۳۸٪ افزایش نسبت به شاهد) و شاهد و بیشترین و کمترین میزان گشودگی دهانه روزنه در شاهد و گیاهان تحت غلظت ۲ ppm (۳۶٪ کاهش

Archive of SID

www.SID.ir



شکل۲- تغییرات تراکم (ob: 40) و میزان گشودگی دهانه روزنه (ob: 100) در اپیدرم فوقانی در گیاه تحت غلظت ppm ۲ گاز SO_2 نسبت به گیاه شاهد. A) تراکم روزنه گیاه شاهد، b) تراکم روزنه گیاه تحت غلظت ppm ۲، c) میزان گشودگی دهانه روزنه گیاه شاهد و d) میزان گشودگی دهانه روزنه گیاه تحت غلظت ppm ۲ گاز.

جدول ۱- مقایسه میانگین‌های اثر غلظت‌های مختلف گاز SO_2 بر تراکم روزنه و کرک (تعداد در mm^2)، طول کرک و دهانه روزنه (µ) در دو سطح فوقانی (ad) و تحتانی (ab) برگ یونجه. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار بین میانگین مطابق آزمون دانکن است. هر عدد میانگین ۳ تکرار ± SE است. مقایسه هر شاخص جداگانه (ردیفی) انجام شده است.

شاخص	غلظت‌های مختلف گاز SO_2 (ppm)				
	۰	۰/۵	۱	۱/۵	۲
تراکم روزنه (ad)	۱۵/۳۳^{a}±۰/۱۷	۱۵/۵۶^{a}±۰/۱۰	۱۳/۶۷^{b}±۰/۱۰	۱۱/۶۷^{c}±۰/۰۹	۹/۸۹^{d}±۰/۳۵
تراکم روزنه (ab)	۱۸/۴۴^{d}±۰/۱۸	۱۸/۶۷^{d}±۰/۱۶	۲۱/۱۱^{c}±۰/۳۵	۲۴/۰۰^{b}±۰/۲۸	۲۵/۴۴^{a}±۰/۲۲
دهانه روزنه (ad)	۱۰/۴۴^{d}±۰/۰۹	۱۰/۳۹^{d}±۰/۱۰	۱۱/۲۱^{c}±۰/۱۴	۱۳/۷۷^{b}±۰/۱۲	۱۵/۶۰^{a}±۰/۱۸
دهانه روزنه (ab)	۱۴/۳۷^{a}±۰/۰۹	۱۴/۳۱^{a}±۰/۰۸	۱۳/۱۷^{b}±۰/۱۵	۱۰/۸۰^{c}±۰/۱۳	۹/۱۷^{d}±۰/۰۹
تراکم کرک(ad)	۴/۰۰^{b}±۰/۳۲	۳/۳۳^{b}±۰/۵۷	۴/۲۲^{b}±۰/۴۱	۷/۰۰^{a}±۰/۲۰	۷/۰۰^{a}±۰/۲۸
تراکم کرک (ab)	۶/۲۲^{b}±۰/۱۱	۵/۰۰^{b}±۰/۱۹	۶/۷۸^{b}±۰/۲۸	۹/۲۲^{a}±۰/۲۵	۹/۰۰^{a}±۰/۱۲
طول کرک (ad)	۱۱۴/۳۰^{b}±۱/۲۶	۱۱۴/۳۱^{b}±۰/۸۷	۱۱۶/۶۱^{b}±۰/۸۶	۱۱۳/۷۴^{b}±۰/۷۹	۲۰۰/۶۳^{a}±۲/۰۷
طول کرک (ab)	۳۰۴/۳^{b}±۲/۰۷	۳۰۴/۰۰^{b}±۱/۳۳	۳۰۹/۵۵^{b}±۱/۱۰	۳۰۳/۱۳^{b}±۱/۲۸	۴۳۷/۴۱^{a}±۱/۳۹

نسبت به شاهد) مشاهده می‌شود (جدول ۱). تراکم و طول کرک گیاهان شاهد در اپیدرم فوقانی کمتر از اپیدرم تحتانی است مقایسه میانگین‌های حاصل از اثر گاز SO_2 نشان می دهد که غلظت‌های پایین‌تر از ۱/۵ppm تأثیری بر تراکم کرک در هیچ یک از دو سطح برگی ندارد. در گیاهان تحت غلظت ۲ppm گاز تراکم کرک در دو سطح فوقانی و تحتانی به ترتیب افزایش ۷۵٪ و ۴۴/۶۹٪ را نسبت به شاهد نشان می‌دهد. طول کرک در هر دو سطح فقط در گیاهان تحت غلظت ۲ppm افزایش یافت به طوری که در اپیدرم تحتانی و فوقانی به ترتیب افزایش ۴۳/۷۴ و ۷۵/۲۳ درصدی در طول کرک مشاهده شد (جدول ۲ و شکل ۳).

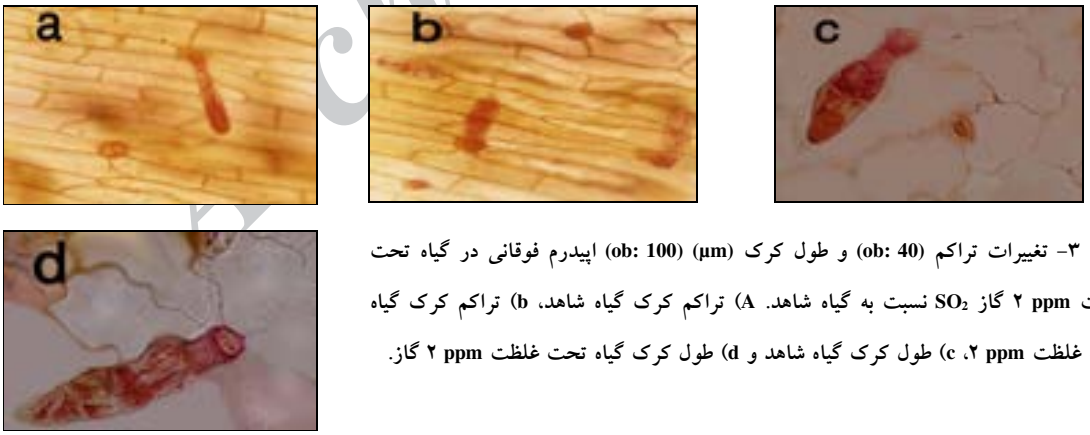
اثر متقابل تلقیح باکتریایی و گاز SO_2 بر تراکم و میزان گشودگی روزنه، تراکم و طول کرک معنی‌دار (سطح ۰/۰۱) بود. کمترین میزان تراکم روزنه اپیدرم فوقانی در گیاهان بدون تلقیح و ۲ppm گاز مشاهده شد به طوری که کاهش ۴۴/۶۷٪ را نسبت به شاهد (بدون تلقیح و بدون گاز) نشان داد. این کاهش در گیاهان تلقیح‌شده به میزان کمتری مشاهده شد. گیاهان تلقیح‌شده با باکتری بومی و استاندارد به ترتیب کاهش ۳۴/۰۸ و ۳۱/۹۱٪ را نسبت به شاهد نشان دادند. بیشترین میزان تراکم روزنه اپیدرم فوقانی در گیاهان شاهد مشاهده شد. تراکم روزنه در اپیدرم تحتانی در گیاهان تلقیح نیافته و تحت غلظت ppm ۲ گاز بیشترین

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲- مقایسه میانگین‌های اثر متقابل گاز SO_2 و تلقیح باکتریایی بر تراکم و دهانه روزنه در دو سطح رویی (ad) و زیری (ab) برگ یونجه. هر عدد جدول میانگین ۳ تکرار ± SE است و مقایسه برای هر شاخص ستونی انجام شده است.

تلقیح	گاز SO_2 ppm	تراکم روزنه (mm^2) (ad)	تراکم روزنه (mm^2) (ab)	دهانه روزنه (µ) (ad)	دهانه روزنه (µ) (ab)
بدون تلقیح -R	۰	۱۵/۶۷^{a}±۰/۳۳	۱۹/۰۰^{f}±۰/۰۰	۱۰/۴۰^{g}±۰/۳۵	۱۴/۳۶^{a}±۰/۰۹
	۰/۵	۱۵/۳۳^{a}±۰/۳۳	۱۸/۶۷^{fg}±۰/۳۳	۱۰/۷۶^{g}±۰/۲۸	۱۴/۳۷^{a}±۰/۰۹
	۱	۱۳/۰۰^{c}±۰/۰۰	۲۲/۳۳^{d}±۰/۳۳	۱۲/۳۵^{e}±۰/۳۳	۱۲/۵۷^{c}±۰/۰۶
	۱/۵	۱۱/۰۰^{e}±۰/۰۰	۲۵/۰۰^{b}±۰/۰۰	۱۴/۵۹^{c}±۰/۲۴	۱۰/۷۱^{e}±۰/۰۵
	۲	۸/۶۷^{f}±۰/۳۳	۲۶/۳۳^{a}±۰/۳۳	۱۶/۲۵^{a}±۰/۱۶	۸/۷۷^{h}±۰/۰۶
تلقیح با ریزوبیوم بومی R_n	۰	۱۵/۳۳^{a}±۰/۳۳	۱۸/۳۳^{fg}±۰/۳۳	۱۰/۶۴^{g}±۰/۳۵	۱۴/۳۹^{a}±۰/۱۱
	۰/۵	۱۵/۶۶^{a}±۰/۳۳	۱۸/۶۷^{fg}±۰/۳۳	۱۰/۶۷^{g}±۰/۲۷	۱۴/۳۷^{a}±۰/۰۸
	۱	۱۴/۰۰^{b}±۰/۰۰	۲۰/۶۷^{e}±۰/۰۴	۱۱/۴۹^{f}±۰/۲۰	۱۳/۵۱^{b}±۰/۰۶
	۱/۵	۱۲/۰۰^{d}±۰/۰۰	۲۳/۶۷^{c}±۰/۳۳	۱۳/۵۸^{d}±۰/۱۳	۱۱/۳۳^{d}±۰/۰۵
	۲	۱۰/۳۳^{e}±۰/۳۳	۲۵/۰۰^{b}±۰/۰۰	۱۵/۱۷^{b}±۰/۱۸	۹/۴۰^{g}±۰/۰۷
تلقیح با ریزوبیوم استاندارد R_s	۰	۱۵/۰۰^{a}±۰/۰۰	۱۸/۰۰^{fg}±۰/۰۰	۱۰/۵۱^{g}±۰/۱۰	۱۴/۳۶^{a}±۰/۰۵
	۰/۵	۱۵/۶۷^{a}±۰/۰۴	۱۸/۶۷^{fg}±۰/۳۳	۱۰/۶۹^{g}±۰/۲۲	۱۴/۳۱^{a}±۰/۰۶
	۱	۱۴/۰۰^{b}±۰/۰۰	۲۰/۳۳^{e}±۰/۳۳	۱۱/۴۲^{f}±۰/۱۵	۱۳/۴۳^{b}±۰/۰۴
	۱/۵	۱۲/۰۰^{d}±۰/۰۰	۲۳/۶۷^{c}±۰/۳۳	۱۳/۶۱^{d}±۰/۳۱	۱۰/۳۵^{f}±۰/۰۷
	۲	۱۰/۶۷^{e}±۰/۳۳	۲۵/۰۰^{b}±۰/۰۰	۱۵/۲۸^{b}±۰/۲۸	۹/۳۱^{g}±۰/۰۴



شکل ۳- تغییرات تراکم (ob: 40) و طول کرک (µm) (ob: 100) اپیدرم فوقانی در گیاه تحت غلظت ppm ۲ گاز SO_2 نسبت به گیاه شاهد. A) تراکم کرک گیاه شاهد، b) تراکم کرک گیاه تحت غلظت ppm ۲، c) طول کرک گیاه شاهد و d) طول کرک گیاه تحت غلظت ppm ۲ گاز.

میزان را داشت به طوری که افزایش ۳۸/۵۸٪ را نسبت به شاهد نشان داد. در گیاهان تلقیحی، افزایش ناشی از تنش گاز به میزان کمتری مشاهده شد به طوری که در گیاهان تلقیحی با باکتری بومی و استاندارد و ۲ppm گاز هر دو ۳۱/۵۷ ٪ افزایش تراکم روزنه داشتند. بین تراکم روزنه در گیاهان تلقیحی با باکتری بومی و استاندارد تحت

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۳- مقایسه میانگین‌های اثر متقابل گاز SO_2 و تلقیح ریزوبیومی بر تراکم کرک (mm^2) و طول کرک (µ) در سطح رویی (ad) و زیری (ab) برگ یونجه. هر عدد جدول میانگین ۳ تکرار ±SE است. مقایسه برای هر شاخص جداگانه انجام شده است.

تلقیح	SO_2	تراکم کرک (ad)	تراکم کرک (ab)	طول کرک (ad)	طول کرک(ab) (µ)
بدون تلقیح -R	۰	۴/۰۰^{c}±۰/۵۷	۶/۳۳^{c}±۰/۳۳	۱۱۴/۱^{c}±۲/۳	۳۰۴/۹^{c}±۱/۱۴
	۰/۵	۴/۰۰^{c}±۰/۵۷	۶/۰۰^{c}±۰/۵۷	۱۱۴/۶^{c}±۱/۸	۳۰۳/۶^{c}±۱/۸۴
	۱	۴/۳۳^{c}±۰/۳۳	۶/۰۰^{c}±۰/۵۷	۱۱۸/۴^{c}±۰/۵	۳۰۸/۵^{c}±۱/۱۱
	۱/۵	۸/۳۳^{a}±۰/۳۳	۱۰/۶۷^{a}±۰/۶۷	۱۱۴/۳^{c}±۱/۵	۳۰۴/۴^{c}±۱/۳۷
	۲	۸/۶۷^{a}±۰/۳۳	۱۰/۶۷^{a}±۰/۳۳	۳۱۴/۶^{a}±۲/۰۴	۵۰۴/۶^{a}±۱/۰۴
تلقیح با ریزوبیوم بومی R_n	۰	۴/۶۷^{c}±۰/۳۳	۶/۳۳^{c}±۰/۳۳	۱۱۳/۱^{c}±۲/۷	۳۰۳/۷^{c}±۱/۷۰
	۰/۵	۳/۶۷^{c}±۰/۶۷	۵/۳۳^{c}±۰/۳۳	۱۱۳/۷^{c}±۱/۴	۳۰۳/۷^{c}±۱/۱۳
	۱	۴/۰۰^{c}±۰/۰۰	۶/۰۰^{c}±۰/۵۷	۱۱۵/۹^{c}±۰/۶	۳۰۵/۴^{c}±۱/۶۴
	۱/۵	۶/۳۳^{ab}±۰/۳۳	۸/۰۰^{b}±۰/۵۷	۱۱۲/۰۳^{c}±۱/۱	۳۰۱/۸^{c}±۰/۹۹
	۲	۶/۶۷^{b}±۰/۳۳	۸/۳۳^{b}±۰/۶۷	۲۱۸/۹^{b}±۲/۳	۴۰۴/۲^{b}±۱/۲۹
تلقیح با ریزوبیوم استاندارد R_s	۰	۳/۶۷^{c}±۰/۶۷	۵/۰۰^{c}±۰/۰۰	۱۱۵/۷^{c}±۲/۱۶	۳۰۵/۱^{c}±۱/۴۴
	۰/۵	۳/۶۷^{c}±۰/۳۳	۵/۳۳^{c}±۰/۳۳	۱۱۴/۶^{c}±۱/۹	۳۰۲/۹^{c}±۱/۱۶
	۱	۳/۶۷^{c}±۰/۶۷	۵/۶۷^{c}±۰/۳۳	۱۱۵/۵^{c}±۲/۴	۳۰۴/۵^{c}±۰/۹۸
	۱/۵	۶/۳۳^{ab}±۰/۳۳	۸/۰۰^{b}±۰/۰۰	۱۱۴/۹^{c}±۱/۳	۳۰۱/۳^{c}±۱/۲۰
	۲	۶/۳۳^{ab}±۰/۳۳	۸/۳۳^{b}±۰/۶۷	۲۱۷/۲^{b}±۲/۴	۴۰۷/۶^{b}±۱/۲۵

غلظت‌های ۰ و ۰/۵ ppm گاز تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. گشودگی دهانه روزنه تحت تأثیر تنش در اپیدرم فوقانی افزایش و در اپیدرم تحتانی کاهش معنی‌داری را نشان داد. تلقیح باکتریایی باعث کاهش این تغییرات تحت تنش گاز SO_2 شد. بیشترین میزان گشودگی دهانه روزنه اپیدرم فوقانی در گیاهان تلقیح‌نیافته و غلظت ۲ppm و کمترین در شاهد (بدون تلقیح و بدون گاز) مشاهده شد. گیاهان تلقیح‌شده با باکتری بومی و استاندارد در غلظت‌های ۰ و ۰/۵ppm گاز تغییر معنی‌داری نسبت به شاهد نداشتند. در اپیدرم تحتانی به ترتیب بیشترین و کمترین میزان گشودگی دهانه روزنه در گیاهان شاهد و گیاهان تلقیح‌نشده و غلظت ۲ppm گاز مشاهده شد (جدول ۲). اثرات ناشی از تلقیح با سویه بومی ریزوبیوم مشابه اثرات سویه استاندارد بود. در گیاهان تلقیح‌نشده تراکم کرک در هر دو سطح اپیدرم در اثر تنش در غلظت‌های ۱/۵ و ۲ppm افزایش یافت. افزایش تراکم کرک در اپیدرم فوقانی و تحتانی در گیاهان تلقیح‌نشده و ۲ppm به ترتیب ۱۱۶/۷۵٪ و۶۸/۵۶٪ را نشان داد. این افزایش ناشی از تنش در گیاهان تلقیح‌یافته به میزان کمتری صورت گرفت، به طوری که در اپیدرم فوقانی در گیاهان تلقیحی با باکتری استاندارد و بومی در ۲ppm به ترتیب افزایش ۵۸/۲۵ و ۶۶/۷۵٪ و در اپیدرم تحتانی افزایش ۳۱/۶٪ تراکم کرک (هر دو باکتری) مشاهده شد. طول کرک در گیاهان تلقیح‌نیافته در هر دو سطح برگ فقط در گیاهان تحت غلظت ۲ppm گاز افزایش یافت. این افزایش به میزان ۲/۷۶ برابر در اپیدرم فوقانی و ۱/۶۵ برابر در اپیدرم تحتانی بود. در گیاهان تلقیح‌یافته با ریزوبیوم افزایش طول کرک کمتر بود. در غلظت ۲ppm در گیاهان تلقیحی با سویه بومی و

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۴- مقایسه میانگین‌های اثر غلظت‌های مختلف گاز SO_2 بر طول سلول نردبانی و قطر سلول اسفنجی برگ یونجه حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها مطابق آزمون دانکن است. هر عدد جدول میانگین ۳ تکرار SE± است.

ابعاد سلول	تیمار گاز SO_2 (ppm)				
(میکرومتر)	۰	۰/۵	۱	۱/۵	۲
طول نردبانی	۴۸/۸۱^{a}±۰/۲۵	۴۸/۷۹^{a}±۰/۳۰	۴۷/۰۱^{b}±۰/۲۹	۴۵/۱۸^{c}±۰/۲۵	۴۳/۷۹^{d}±۰/۳۴
قطر اسفنجی	۱۳/۳۴^{a}±۰/۲۱	۱۳/۴۱^{a}±۰/۳۰	۱۱/۸۰^{b}±۰/۱۹	۱۰/۰۰^{c}±۰/۲۵	۸/۰۴^{d}±۰/۲۲

استاندارد، افزایش طول کرک در اپیدرم فوقانی و تحتانی به ترتیب ۱/۹۱ و ۱/۳۴ برابر مشاهده شد (جدول ۳). بیشترین تغییرات تشریحی برگ در گیاهان تلقیح‌نیافته تحت غلظت ppm ۲ گاز مشاهده شد.

نتایج آنالیز واریانس نشان داد که تلقیح ریزوبیومی یونجه اثر معنی‌داری بر طول سلول نردبانی و قطر سلول اسفنجی نداشت ولی طول سلول نردبانی و قطر سلول اسفنجی در گیاهان یونجه تحت تأثیر غلظت‌های مختلف گاز SO_2 تفاوت معنی‌داری (سطح ۰/۰۱) را نشان دادند. در گیاهان تحت غلظت ۰/۵ppm گاز تغییر معنی‌داری در طول سلول نردبانی و قطر سلول اسفنجی مشاهده نشد اما با افزایش غلظت گاز طول سلول نردبانی و قطر سلول اسفنجی کاهش معنی‌داری پیدا کرد به طوری که در گیاهان تحت تیمار ppm ۲ گاز به ترتیب کاهش ۱۰/۲۸ و ۳۹/۷۳ درصدی در طول سلول نردبانی و قطر سلول اسفنجی نسبت به شاهد مشاهده شد (جدول ۴).

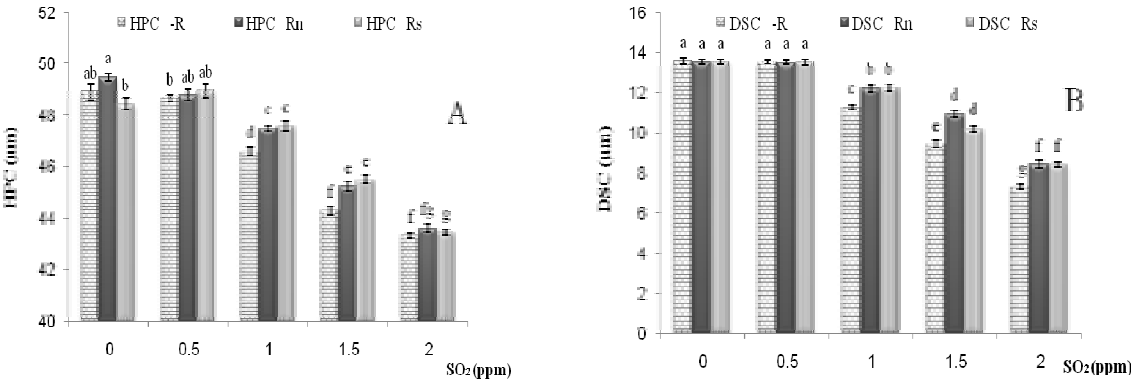
اثر متقابل تلقیح باکتریایی و گاز SO_2 بر طول سلول نردبانی (سطح ۰/۰۵) و قطر سلول اسفنجی (سطح ۰/۰۱) برگ گیاه یونجه اثر معنی‌داری را نشان داد. بزرگ‌ترین طول سلول نردبانی و قطر سلول اسفنجی در گیاهان شاهد (بدون تلقیح و بدون SO_2) مشاهده شد. اختلاف معنی‌داری در طول سلول نردبانی و قطر سلول اسفنجی در گیاهان تلقیح‌نشده و تلقیح‌شده که تحت غلظت ۰/۵ppm گاز بودند، نسبت به گیاهان شاهد مشاهده نشد. کمترین طول سلول نردبانی در گیاهان تلقیح‌نشده تحت غلظت ppm ۲ گاز مشاهده شد که کاهش ۱۱/۴۱ درصدی را نسبت به گیاهان شاهد نشان داد. در گیاهان تلقیح‌شده این کاهش کمتر بود به طوری که در گیاهان تلقیح‌شده با سویه بومی و استاندارد ریزوبیوم کاهش ۱۰/۸۲ و ۱۱/۱۴ درصدی به ترتیب نسبت به گیاهان شاهد مشاهده شد. کمترین قطر سلول اسفنجی در گیاهان تلقیح‌نشده تحت غلظت ۲ppm گاز مشاهده شد که کاهش ۴۶/۲۴ درصدی را نسبت به گیاهان شاهد نشان داد. در گیاهان تلقیح‌شده این کاهش به میزان کمتری رخ داد به طوری که در گیاهان تلقیح‌شده با ریزوبیوم ملیلوتی سویه بومی و استاندارد به ترتیب کاهش ۳۷/۹۸ و ۳۸/۱۳ درصدی نسبت به گیاهان شاهد مشاهده شد (شکل ۴).

بحث:

در این مطالعه تلقیح باکتریایی به تنهایی اثر معنی‌داری بر هیچ یک از صفات تشریحی برگ نداشت. تغییرات تشریحی گیاهان، تکنیک آگاه کننده و تنظیم کننده آلودگی‌های زیست محیطی است (Omosun *et al.*, 2008). بنابراین عدم تغییر خصوصیات تشریحی گیاه یونجه به دنبال تلقیح ریزوبیومی مبین این مطلب است که تلقیح ریزوبیومی برای یونجه تنش محسوب نمی‌شود. یونجه به طور طبیعی با ریزوبیوم همزیستی برقرار می‌کند و از این ارتباط سود می‌برد و نیازی به تغییر خصوصیات تشریحی خود ندارد. از نظر محققین سیستم روزنه‌ای در مقابله با باکتری‌های بیماری‌زا تغییر می‌کند. این تغییر در برابر باکتری‌های بیماری‌زا، در سازش و بقا گیاه در برابر تنش زیستی می‌تواند موثر باشد (Melotto *et al.*, 2006). گیاهان با تغییر

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۴- اثر متقابل گاز SO_2 (۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ppm ۲) و تلقیح باکتریایی (بدون تلقیح R-، تلقیح با ریزوبیوم بومی R_n و استاندارد R_s) بر (A): طول سلول نردبانی HPC (بر حسب میکرومتر) و (B): قطر سلول اسفنجی DSC (بر حسب میکرومتر) برگ گیاهان یونجه ۴۵ روزه. خطوط نشان دهنده خطای استاندارد (SE) و حروف غیرمشابه نشان دهنده معنی‌دار بودن (سلول نردبانی سطح ۰/۰۵ و برای سلول اسفنجی سطح ۰/۰۱) براساس آزمون دانکن می‌باشد.

تعداد و ابعاد سلول‌های اپیدرمی، کرک و روزنه در برابر آلاینده‌های هوا مقابله می‌کنند (Kulshreshtha *et al.*, 1994). در گیاهان یونجه تحت غلظت ۰/۵ ppm SO_2، تراکم و میزان گشودگی روزنه در هر دو سطح فوقانی و تحتانی مشابه گیاهان شاهد (۰ ppm) بود، یعنی غلظت ۰/۵ppmگاز، تنش برای گیاه نبوده است و بر خصوصیات تشریحی گیاه تأثیر نداشته است. میزان طبیعی SO_2 در مناطق شهری ۰/۵ ppm- ۰/۰۵ و در مکان‌های با هوای آلوده به میزان ۲ ppm یا بیشتر است (Khan *et al.*, 2006). با افزایش غلظت گاز از ۰/۵ به ۲ ppm در سطح فوقانی تراکم روزنه کاهش و میزان گشودگی روزنه افزایش یافت و در سطح تحتانی نیز حالت عکس مشاهده شد. در مطالعه‌ی انجام شده توسط Wali و همکارانش (۲۰۰۷) تحت تیمار SO_2 گشودگی روزنه در هر دو سطح رویی و زیرین برگ همیشه بهار تغییر را نشان داد، اغلب در دوزهای پایین (۰/۵ppm) گاز SO_2 بدون تغییر بودند. غلظت‌های بالای گاز به ویژه ۲ ppm باعث افزایش اندازه‌ی گشودگی روزنه در سطح رویی و کاهش آن در سطح زیرین برگ‌ها شد. افزایش دهانه روزنه در اپیدرم فوقانی به کاهش تورژسانس سلول‌های همراه روزنه مربوط می‌باشد. جذب سریع SO_2 توسط سلول‌های همراه باعث تغییراتی در نفوذپذیری غشا و کاهش تورژسانس سلولی آن‌ها می‌شود که ممکن است افزایش در گشودگی روزنه را توضیح دهد (Singh *et al.*, 1985). بسته شدن شکاف‌های روزنه‌ای که در غلظت‌های خیلی بالا رخ می‌دهد یا در گیاهانی که زمان‌های خیلی طولانی در معرض SO2 قرار گرفتند، باعث تجمع CO_2 در حفره‌های زیر روزنه و در نتیجه توقف فتوسنتز می‌شود. این کاهش دهانه روزنه برای جلوگیری از ورود بیشتر SO_2 به داخل برگ مفید است (Wali *et al.*, 2007). کاهش تعداد روزنه در سطح زبرین می‌تواند مقدار گاز SO_2ای که وارد بافت‌های برگ می‌شود را کاهش دهد و بنابراین از گیاه در برابر سمیت این گاز محافظت کند(Sharma, 1977). کاهش دهانه روزنه اپیدرم زیرین برای جلوگیری از ورود بیشتر SO_2 به داخل برگ مفید است (Sharma, 1977). مطالعه‌ای گیاه *Brassica rapa* در معرض گاز CO_2، افزایش تراکم کرک در گیاهان تحت تنش گاز تا ۵۷ درصد گزارش شد. افزایش تراکم کرک می‌تواند مکانیسمی برای تحمل تنش توسط گیاه باشد. (Karowe and Grubb, 2011). کرک‌های بلند ممکن است به عنوان یک فیلتر و محافظ عمل کنند و ذرات و مولکول‌های آلودگی را از دهانه روزنه دور نگه دارند (Sharma, 1977).

Archive of SID

www.SID.ir

در گیاهان تحت غلظت ppm ۰/۵ گاز تغییر معنی‌داری در طول سلول نردبانی و قطر سلول اسفنجی مشاهده نشد اما با افزایش غلظت گاز طول سلول نردبانی و قطر سلول اسفنجی کاهش معنی‌داری پیدا کردند. در بررسی اثر آلودگی هوا روی ساختار بافتی *Trifolium montanum* و *T. pretenes* مشخص شد که آلودگی هوا سبب کاهش قطر پارانشیم اسفنجی و طول پارانشیم نردبانی می‌شود. با توجه به فضاهای بزرگ بین سلول‌های مزوفیل اسفنجی نسبت به پارانشیم نردبانی، بنابراین آلاینده‌های گازی به راحتی بعد از ورود به برگ در بخش تحتانی برگ انباشت شده و به پارانشیم حفره‌ای صدمات بیشتری می‌زنند. یکی از راه‌های مقاومت گیاهان به سمیت آلاینده‌های گازی افزایش ضریب نردبانی شدن است که این ضریب نسبت ضخامت سلول‌های پارانشیم نردبانی به ضخامت سلول‌های پارانشیم اسفنجی است (Gostin, 2009). در گیاه *Cajanus cajan* تحت تنش آلاینده‌های هوا، فراوانی کرک و کاهش اندازه برگ و برگچه، اندازه سلول‌های اپیدرمی، طول پارانشیم نردبانی، قطر پارانشیم اسفنجی، اندازه روزنه در اپیدرم فوقانی و تراکم روزنه در اپیدرم تحتانی گزارش شد (Meerabai *et al.*, 2012). کاهش در طول سلول‌های نردبانی می‌تواند به این علت باشد که SO_2 به کلروپلاست سلول‌های نردبانی آسیب وارد می‌کند (Krishnayya and Bedi, 1989). محققان گزارش کردند که تخریب کلروفیل و فتوسنتز توسط SO_2 ابتدا در سلول‌های نردبانی برگ اتفاق می‌افتد (Hui-zhen *et al.*, 1980).

اثرات منفی گاز SO_2 بر صفات تشریحی برگ به دنبال تلقیح با ریزوبیوم کاهش یافت. بیشترین تغییرات تشریحی برگ در اثر تنش SO_2 در گیاهان بدون تلقیح و غلظت ppm ۲ گاز مشاهده شد. این تغییرات تشریحی برگ در گیاهان تلقیح‌یافته (چه بومی و چه استاندارد) به میزان کمتری مشاهده شد. افزایش تعداد و طول کرک در غلظت‌های بالای گاز SO_2 در هر دو سطح اپیدرم در اثر تنش، در گیاهان تلقیح یافته با سویه بومی و استاندارد ریزوبیوم به میزان کمتری صورت گرفت. کاهش معنی‌دار طول سلول نردبانی و قطر سلول اسفنجی در غلظت‌های ۱ تا ppm ۲ گاز، در گیاهان تلقیح‌یافته به میزان کمتری مشاهده شد. از آن‌جا که اکسین نقش مهمی در تنظیم رشد و نمو گیاهان دارد و رشد طولی سلول و تقسیم سلولی را وابسته به غلظت کنترل می‌کند (Saharan and Nehra, 2012) این اثر ناشی از تلقیح احتمالاً به دلیل تولید اکسین توسط باکتری است. همچنین اثر ریزوبیوم بر فعالیت‌های فیزیولوژیک به علت لومیکروم رها شده توسط باکتری می‌تواند باشد (Matiru and Dacora, 2005). لومیکروم یک مولکول سیگنال است که از ریشه به بخش‌های هوایی از طریق شیره خام انتقال یافته و در برگ تجمع یافته و سبب تغییرات نموی در اندام‌های هوایی می‌شود. لومیکروم محرک تقسیم و توسعه سلولی نیز می‌باشد. این متابولیت ریزوبیومی عمل روزنه‌ها را تنظیم می‌کند و سبب سازش لگوم‌ها نسبت به تنش‌های مختلف می‌شود (Matiru and Dacora, 2005). باکتری ریزوبیوم همزیست با لگوم‌ها در کاهش شرایط تنشی نقش مهم و موثری را ایفا می‌کند. ریزوبیوم با تولید ترکیباتی همچون انواع هورمون‌ها، ویتامین‌ها، ترکیبات اسمولیت‌ها مثل پرولین، تولید ACC-دآمیناز و تولید آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی تحت شرایط تنش، در کاهش شرایط تنش برای گیاهان موثر است (Dimkpa *et al.*, 2009).

نتیجه‌گیری:

عدم تأثیر تلقیح ریزوبیومی به تنهایی بر شاخص‌های تشریحی برگ، بیان‌کننده این مطلب است که تلقیح ریزوبیومی برای یونجه تنش محسوب نمی‌شود. غلظت ppm ۰/۵ گاز SO_2 نیز برای یونجه تنش محسوب نمی‌شود اما غلظت‌های بالاتر اثرات منفی روی گیاه اعمال می‌کنند. با برقراری یک رابطه مناسب بین یونجه-ریزوبیوم می‌توان علاوه بر رشد گیاه، اثر آلودگی SO_2 را کاهش داد.

Archive of SID

www.SID.ir

تشکر و قدردانی:

از حوزه معاونت محترم پژوهشی و فناوری دانشگاه اراک که حمایت مالی و اجرایی این تحقیق را به عهده داشتند صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع:

Agrawal, M., Nandi, P. K. and Rao, D. N. (1985) Effects of sulphur dioxide fumigation on soil system and growth behaviour of *Vicia faba* plants. Plant and Soil 86: 69-78.

Bai, Y., Zhou, X. and smith, D. L. (2003) Crop ecology, management and quality: enhanced soybean plant growth resulting from coinoculation of Bacillus strains with *Bradyrhizobium japonicum*. Crop Science 43: 1774-1781.

Bashan, Y., Levanony, H. and Mitiku, G. (1989) Changes in proton efflux of intact wheat roots induced by *Azospirillum brasilense* Cd. Canadian Journal of Microbiology 35: 691-697.

Benabderrahim, M. A., Mansour, H. and Ferchichi, A. (2009) Diversity of Lucerne (*Medicago sativa* L.) Populations in South Tunisia. Pakistan Journal of Botany 41: 2851-2861.

Bojnanska, T., Francakova, H., Liskova, M. and Tokar, M. (2012) Legumes – The alternative raw materials for bread production. Microbiology, Biotechnology and Food Sciences 1: 876-886.

Breusgem, F. V., Vranova, E., Dat, J. F. and Inze, D. (2001) The role of active oxygen species in plant signal transduction. Plant Science 161: 405-414.

Caetano-Anolles, G., Wall. L. G., De Micheli, A. T., Macchi, E. M. Bauer, W. D. and Favelukes, G. (1988) Role of motility and chemotaxis in efficiency of nodulation by *Rhizobium meliloti*. Plant Physiology 86: 1228-1235.

Cocking, E. C., Davey, M. R., Kothari, S. L., Srivastava, J. S., Jing, Y., Ridge, R. W. and Rolfe, B. G. (1992) Altering the specificity control of the interaction between rhizobia and plant. Symbiosis 14: 123-130.

Dimkpa, C., Weinand, T. and Asch, F. (2009) Plant–rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. Plant, Cell and Environment 32: 1682–1694.

Gostin, I. N. (2009) Air pollution effects on the leaf structure of some Fabaceae species. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca. 37: 57-63.

Graham, P. H. and Vance, C. P. (2003) Legumes: importance and constraints to greater use. Plant Physiology. 131: 872–877.

Hui-zhen, Q., Zhu-jun, W., Jia-xi, W., Da-fu, Q. and Zheng-fang, L. (1980) The effects of the harmful gases SO_2 and HF on plant leaf structure. Acta Botanical Science 22: 232-236.

Irshad, A. H., Fayaz Ahmad, S. and Sultan, P. (2011) Effect of sulphur dioxide on the biochemical parameters of spinach (*Spinacea oleracia*). Trakia Journal of Sciences 9: 24-27.

Karowe, D. N. and Grubb, Ch. (2011) Elevated CO_2 increases constitutive phenolicsand Ttrichomes, but decreases inducibility of phenolics in *Brassica rapa* (Brassicaceae). Journal of Chemical Ecology 37:1332–1340.

Khan, I., Ahmad, A. and Iqbal, M. (2006) Sulphur in the environment. In: Biodiversity and its significance (eds. Tandon, P., Khatri, S., Abrol, Y. P.) pp. 90-99. IK International, New Delhi.

Kiernan, J. A. (1999) Histopathology and histochemical method; theory and practice 3rd Ed. Oxford, Butternworth-Heinemann.

Krishnayya, N. S. R. and Bedi, S. J. (1989) Effect of sulphur dioxide and ascorbic acid on the plastid ultrastructure of Azadirachta indica leaves. Annals of Butany 64: 311-313.

Kulshreshtha, K., Srivastava, K. and Ahmad, K. J. (1994) Effect of automobile exhaust pollution on leaf surface structures of *Calotropis procera* L. and *Nerium indicum* L. Feddes Repertorium 105:185-189.

Lang, C., Popko, J., Wirtz, M., Hell, R., Herschbach, C., Kreuzwieser, J., Rennenberg, H., Mendel, R. R. and Hansch, R. (2007) Sulphite oxidase as key enzyme for protecting plants against sulphur dioxide. Plant, Cell and Environment 30: 447–455.

Matiru, V. N. and Dakora, F. D. (2005) Xylem transport and shoot accumulation of lumichrome, a newly recognized rhizobial signal, alerts root respiration, stomatal conductance, leaf transpiration and photosynthetic rates in legumes and cereals. New Phytologist 165: 847-855.

Meerabai, G., Venkata Ramana, C. and Rasheed, M. (2012) Effect of air pollutants on leaves of pigeon pea, a pulse crop of Fabaceae growing in the vicinity of a silicon industry. World Rural Observations 4: 19-21.

Melotto, M., Underwood, W., Koczan, J., Nomura, K. and He, S. Y. (2006) Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. Cell 126: 969–980.

Molla, A. H., Shamsuddin, Z. H., Halimi, M. S., Morziah, M. and Puteh, A. B. (2001) Potential for enhancement of root growth and nodulation of soybean co-inoculated with *Azospirillum* and *Bradyrhizobium* in laboratory systems. Soil Biology and Biochemestry 33: 457-463.

Noori, M. (2002) Characterization of the Iranian species of Shophorea and Ammodendron (Leguminosea: Sophorea). Phd thesis, University of London and Royal Botanic Gurden, Kew, UK.

Omosun,G., Markson, A. A. and Mbanasor, O. (2008) Growth and anatomy of *Amaranthus Hybridus* as affected by diferrent crude oil concen-

Archive of SID

www.SID.ir

Swift, M. and Bignell, D. (2001) Standard methods for assessment of soil biodioversity and land use practice. International centre for research in Agroforestry (ICRAF) Southeast Asia. Available at: http://www.icraf.cgiar.org/sea. Accessed 15 September 2009.

Tatsumoto, H. and Yoshinari, H. (1991) Correlation between sulfur oxide concentration and sulfur content in the leaves of woody plants. Taiki Osen Gakkaishi 26: 165–170.

Wali, B., Iqbal, M., Mahmooduzzafar (2007) Anatomical and functional responses of *Calendula officinalis* L. to SO_2 stress as observed at different stages of plant development. Flora 202: 268–280.

Wang, Y. X. and Oyaizu, H. (2009) Evaluation of the phytoremediation potential of four plant species for dibenzofu-ran-contaminated soil. Journal of Hazardous Materials 168: 760-764.

Yang, J., Kloepper, J. W. and Ryu, C. (2009) Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. Plant Science 14: 1-4

.

trations. American-Eurasian Journal of Scientific Research 3: 70-74.

Sadovinkova, Y. N., Bespalova, L. A. and Antonyuk, L. P. (2003) Wheat gram agglutinin is a grown factor for bactrerium *Azospirillum brasilense*. Doklady Biochemistry and Biophysics 398:103-105.

Saharan, B. S. and Nehra, V. (2012) Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A Critical Review. Life Sciences and Medicine Research 2011: 21: 1-30.

Sharma, G. K. (1977) Cuticular features as indicators of environmental pollution. Water, Air and Soil pollution 8: 15-19.

Singh, S. N., Yunus, M., Srivastava, K., Kulshreshtha, K. and Ahmad, J. (1985) Response of *Calendula officinalis* L. to long- term fumigation with SO_2. Environmental Pollution 39: 17-25.

Smith, S. J., Aardenne, J. V., Klimont, Z., Andres, R. J., Volke, A. and Delgado Arias, S. (2011) Anthropogenic sulfur dioxide emissions: 1850–2005. Atmospheric Chemistry and Physics 11: 1101–1116.

Archive of SID

www.SID.ir

Effects of rhizobia inoculation on anatomical indexes of alfalfa leaf (*Medicago sativa*) under SO_2 pollution

Shima Hosseinkhani Hezave and Mehri Askari*
Biology Department, Faculty of Science, Arak University, Arak 38156-8-8349
(Received: 4 April 2012; Accepted: 1 Desamber 2012)

Abstract:

Sulphur dioxide (SO_2) is one of the main air pollutants that can cause imbalance in growth and physiological function of plant in high concentrations. Rhizobium-plant symbiosis can cause increasing in plant resistance to abiotic and biotic stresses in addition to increase growth of plant. In this study, effects of Rhizobium (native and standard strains) on leaf anatomical parameters of alfalfa under different concentrations of SO_2 (0, 0.5, 1, 1.5 and 2 ppm) were evaluated. The Results showed that inoculation had no effect on the leaf anatomical parameters on the alfalfa. High concentrations of SO_2 (1, 1.5 or 2 ppm) caused significantly changes in all of the anatomical indexes in compared to the control plants; however low concentration of SO_2 (0.5 ppm) had no effects on this parameters. Inoculation of alfalfa with two strains of *Rhizobium* decreased negative effects of high concentrations of SO_2 on anatomical indexes. Rhizobium can increase plant resistance and tolerance against abiotic stresses such as air pollution.

Keywords: alfalfa (*Medicago sativa*), anatomical indexes, *Rhizobium*, SO_2 pollution.

Archive of SID

*Corresponding Author: m-askary@araku.ac.ir

www.SID.ir