اثر تیمارهای بیولوژیکی بذر بر مقاومت گیاه دارویی رازیانه (*Foeniculum vulgare* L.) به تنش عنصر سنگین مس در مرحله جوانه‌زنی و گیاهچه‌ای

معصومه علی‌زاده فروتن[۱]، همت‌اله پیردشتی*[۲]، یاسر یعقوبیان[۳]

[۱] دانشجوی کارشناسی‌ارشد، گروه زراعت، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

[۲] دانشیار گروه زراعت، پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

[۳] دانشجوی دکتری زراعت، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۶/۲۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۸/۱۹

چکیده

به‌منظور بررسی اثر قارچ تریکودرما (*Trichoderma virens*) به همراه باکتری‌های آزوسپریلیوم (*Azospirillum brasilense*) و ازتوباکتر (*Azotobacter chroococcum*) بر جوانه‌زنی و رشد گیاهچه گیاه دارویی رازیانه (*Foeniculum vulgare* L.) در تنش عنصر مس آزمایشی در سال ۱۳۹۱ به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار اجرا گردید. تیمارهای آزمایشی شامل چهار سطح نیترات مس (صفر، ٤٠، ۸۰ و ۱۲۰ میلی‌گرم در لیتر) و چهار سطح تیمار بیولوژیکی بذر (شاهد، قارچ تریکودرما، آزوسپریلیوم+ ازتوباکتر و تلفیق تریکودرما+ آزوسپریلیوم+ ازتوباکتر) بود. براساس نتایج به‌دست آمده افزایش غلظت عنصر مس موجب کاهش صفات وزن تر ریشه‌چه و گیاهچه، طول ریشه‌چه، ساقه‌چه و گیاهچه و ۵۰ درصد جوانه‌زنی شد در صورتی‌که ضریب آلومتری را به‌صورت معنی‌داری افزایش داد. پاسخ وزن تر گیاهچه (R^2=۰/۳۵)، طول گیاهچه (R^2=۰/٦۸) و طول ساقه‌چه (R^2=۰/۷۱) به غلظت نیترات مس به‌صورت خطی بوده و با افزایش آن به‌ترتیب با شیب ۰/۰۲۹-، ۰/۰۱۹- و ۰/۰۰۷- کاهش نشان دادند. ولی روند تغییرات وزن تر (R^2=۰/۵۰) و طول ریشه‌چه (R^2=۰/۸٦) و ضریب آلومتری (R^2=۰/۷۷) در برابر افزایش غلظت عنصر مس به‌صورت معادله درجه دوم بود. همچنین تلقیح قارچ تریکودرما وزن‌تر ریشه‌چه (به میزان ۲۳ درصد) و تلقیح باکتری‌های آزوسپریلیوم+ازتوباکتر، موجب بهبود صفات آغاز، ۵۰ درصد و پایان جوانه‌زنی و همچنین میانگین زمان جوانه‌زنی نسبت به شاهد شدند. همچنین کاربرد توأم تریکودرما و آزوسپریلیوم+ازتوباکتر آغاز جوانه‌زنی را حدود ۱۹ درصد کاهش، ولی پایان و یکنواختی جوانه‌زنی را به‌ترتیب حدود ۱۳و ۳۳ درصد افزایش داد. در مجموع به نظر می‌رسد تیمار بیولوژیکی بذر با قارچ و باکتری موجب بهبود شاخص‌های جوانه‌زنی و گیاهچه‌ای در گیاه دارویی رازیانه تحت تنش عنصر مس خواهد شد.

واژگان کلیدی: آزوسپریلیوم، ازتوباکتر، تریکودرما، جوانه‌زنی، رازیانه، مس

*نویسنده مسئول: h.pirdashti@sanru.ac.ir

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

سرعت شهرنشینی، صنعتی‌شدن و گسترش فناوری‌های نوین در مراحل مختلف زندگی محیط‌زیست را بیش از پیش به خطر انداخته است (Aycicek et al., 2008). مسمومیت با فلزات سنگین یکی از مشکلات عمده‌ی کنونی در سلامت محیط زیست است که با توجه به تأثیر منفی بر بسیاری از اشکال زندگی تهدیدی جدی برای سیستم‌های زیست‌محیطی به شمار می‌رود (Anand et al., 2006; Aycicek et al., 2008). بعضی از عناصر سنگین مانند مس (Cu^{2+}) از عناصر کم‌مصرف ضروری برای گیاهان به شمار می‌روند (Li et al., 2005). با این حال در غلظت‌های بالا در شکل یونی آزاد، برای سلول‌ها سمی بوده (Aycicek et al., 2008) و باعث تنش اکسیداتیو در گیاهان و در نتیجه، آسیب غشایی و دیواره‌ی سلولی، پراکسیداسیون لیپیدها و یا اختلال در فرآیندهای متابولیک می‌شوند. از آنجایی که جوانه‌زنی مرحله بسیار حساسی در رشد و نمو گیاه است، اثرات تنش فلزات سنگین روشن‌تر است و در مراحل بعدی رشد گیاه نیز نمایان خواهد شد (Szôllôsi et al., 2011). (Jelizkova et al., 2003) با بررسی اثر فلزات سنگین کادمیوم، مس، سرب و روی را بر جوانه‌زنی و رشد گیاهچه در گیاهان دارویی انیسون[1]، زیره سیاه[2] و رازیانه، کاهش جوانه‌زنی و رشد گیاهچه را در هر سه گونه مورد آزمایش گزارش نمودند. همچنین در آزمایشی روی جوانه‌زنی بذر گیاه دارویی آتریپلکس[3] غلظت‌های اعمال شده‌ی سولفات مس بر درصد جوانه‌زنی بذرها اثری نداشت اما طول ریشه‌چه، طول ساقه‌چه، طول گیاهچه و شاخص بنیه بذر را کاهش داد (Saberi et al., 2010).

از سوی دیگر امروزه فرآیندهای پاک‌سازی فلزات سنگین گران‌قیمت بوده و باعث آسیب به محیط‌زیست می‌شوند، به این ترتیب پژوهش‌گران و مهندسان به تولید فناوری‌های مقرون به‌صرفه‌ای چون زیست‌پالایی روی آورده‌اند که در سال‌های اخیر برای جذب عناصر سنگین مورد توجه قرار گرفته است. زیست‌پالایی شامل استفاده از میکروارگانیسم‌ها، زیست‌توده و گیاهان زنده در فرآیند پاکسازی مناطق آلوده می‌باشد (Aydinalp and Marinova, 2009). توجه به اهمیت جذب زیستی از دهه ۱۹۸۰ آغاز و از آن پس به‌عنوان یک پتانسیل جایگزین برای حذف و بازیافت فلزات سنگین به کار برده شد (Kavamura and Esposito, 2010). در این فرآیند میکروارگانیسم‌های ویژه‌ای وجود دارند که می‌توانند در غلظت‌های بالای فلزات زنده مانده و از پتانسیل تجمع فلزات مختلف برخوردارند (Anand et al., 2006). گونه‌های قارچ تریکودرما[4] یکی از این میکروارگانیسم‌ها هستند که به‌طور رایج در انواع خاک‌ها یافت می‌شوند. بعضی از گونه‌های این قارچ توانایی پاکسازی محیط آلوده را داشته و می‌توانند به‌عنوان یکی از منابع میکروارگانیسمی برای تجزیه زیستی آلاینده‌های موجود در محیط به کار روند (Wang and Zhou, 2005). این قارچ‌ها هم‌زیست فرصت‌طلب و غیر بیماری‌زای گیاهی هستند که بعضی از گونه‌های آن با سطوح ریشه کلونی‌های قوی و پایداری برقرار کرده و به درون اپیدرم و سلول‌های زیر سطح آن نفوذ می‌کنند (Harman et al., 2004). تحریک رشد ریشه، تولید و جذب مواد غذایی و در نتیجه افزایش مقاومت گیاه به تنش‌های محیطی از ویژگی‌های بارز این قارچ عنوان شده است (Hoyos-carvajal et al., 2009). گزارش‌های متعدد اخیر نیز نشان داده است که این قارچ‌ها مقاومت به تنش‌های غیرزنده را در طول دوره رشد گیاه با بهبود رشد ریشه، ظرفیت نگهداری آب گیاه و جذب مواد مغذی افزایش می‌دهند (Mastouri et al., 2010; Yazdani et al., 2009). علاوه بر آن، گروهی از

1- *Pimpinella anisum* L.
2- *Carum carvi* L.
3- *Atriplex lentiformis*
4- Trichoderma

Archive of SID

www.SID.ir

باکتری‌های تثبیت‌کننده‌ی نیتروژن از جمله آزوسپریلیوم و ازتوباکتر نیز که ریزوباکترهای افزاینده‌ی رشد گیاه[1] نامیده می‌شوند (Akbari et al., 2009) با ریشه گیاهان کلونی تشکیل داده و باعث افزایش رشد گیاه می‌شوند (Yadegari et al., 2012). مکانیسم‌های تأثیرگذار این باکتری‌ها مانند تثبیت بیولوژیک نیتروژن، تولید هورمون‌ها و تنظیم کننده‌های رشد گیاه، افزایش تحرک و قابلیت جذب عناصر غذایی برای گیاه و کنترل عوامل بیماری‌زا به اثبات رسیده است (Mohammadi et al., 2010). نتایج برخی مطالعات نشان می‌دهد که حضور باکتری‌های افزاینده رشد در ریزوسفر گیاهان رشد کرده در خاک‌های آلوده به فلزات سنگین، موجب شده است تا غلظت برخی از این فلزات همچون مس، در اندام‌های گیاهی افزایش یابد (Sedghiani et al., 2011; Janouskova and Vosatka, 2005).

گیاه چندساله‌ی رازیانه (*Foeniculum vulgare* L.) از مهمترین و پرمصرف‌ترین گیاهان دارویی خانواده‌ی چتریان[2] می‌باشد که اسانس حاصل از بذر آن در صنایع مختلف دارویی، غذایی، آرایشی و بهداشتی مورد استفاده قرار می‌گیرد. با وجود این و علیرغم گرایش به سمت کشت و مصرف فراورده‌های طبیعی در دنیا و با توجه به اهمیت دارویی گیاه رازیانه، در مقایسه با سایر گیاهان، مطالعات اندکی روی این گیاه انجام شده است (Nezami et al., 2010; Hornak, 1992). بر همین اساس هدف از انجام این آزمایش بررسی تأثیر پیش‌تیمار قارچ تریکودرما و باکتری‌های آزوسپریلیوم و ازتوباکتر بر جوانه‌زنی و رشد اولیه گیاه دارویی رازیانه در شرایط آلودگی مس بود تا توانایی این پیش تیمارهای بیولوژیکی بذر برای کاهش اثرات زیان بار عنصر سنگین مس مورد ارزیابی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر در بهار سال ۱۳۹۱ در آزمایشگاه تنش‌های محیطی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری انجام شد. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی به صورت فاکتوریل و در سه تکرار اجرا گردید. تیمارهای آزمایشی شامل چهار سطح تیمار بیولوژیکی بذر [شاهد، قارچ تریکودرما (Trich)، باکتری آزوسپیریلیوم + ازتوباکتر (Azp+Azt) و تلفیق تریکودرما و آزوسپریلیوم + ازتوباکتر (Trich+Azp+Azt)] و چهار سطح عنصر سنگین مس (صفر، ٤٠، ٨٠ و ١٢٠ میلی‌گرم در لیتر از منبع نیترات مس) بود.

ایزوله قارچ تریکودرما گونه *Trichoderma virens* از مجموعه قارچ‌های زنده آزمایشگاه قارچ‌شناسی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری تهیه و پس از تکثیر در محیط کشت PDA (عصاره‌ی سیب‌زمینی، دکستروز و آگار) به مدت یک هفته در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری و پس از پنج روز اسپورزایی، اسپورهای قارچی از محیط کشت جداسازی شده (Cavalcant et al., 2008) و با تهیه سوسپانسیون تعداد اسپورها با استفاده از لام هموسیتومتر شمارش گردید و به غلظت 10^7 عدد اسپور در هر میلی‌لیتر رسانده شد. باکتری‌های مورد استفاده در این پژوهش نیز باکتری‌های محرک رشد شامل آزوسپریلیوم براسیلنس[3] و ازتوباکتر کروکوم[4]، به تعداد 10^8 عدد باکتری زنده در هر میلی‌لیتر از منبع کود زیستی نیتروکسین بود. برای تهیه‌ی محلول حاوی تریکودرما و باکتری‌های افزاینده رشد از نسبت ۱:۱ سوسپانسیون تریکودرما و باکتری‌های آزوسپریلیوم و ازتوباکتر استفاده شد (Abdollahi et al., 2013).

1- PGPR
2- Umbelliferae (Apiaceae)
3- *Azospirillum brasilense*
4- *Azetobacter crocome*

Archive of SID

www.SID.ir

بذرهای رازیانه با استفاده از محلول ۰/۵ درصد هیپوکلرید سدیم به مدت ۱۰ دقیقه ضدعفونی شده و به منظور تلقیح بذرها با تیمارهای قارچی و باکتریایی، بذرها به مدت ۱۰ دقیقه در محلول‌های تهیه شده نگهداری گردید (Abdollahi et al., 2013). پس از تلقیح بذور، ۲۵ عدد بذر در هر پتری‌دیش که حاوی یک عدد کاغذ صافی بود گذاشته و یک میلی‌لیتر محلول نیترات مس با غلظت‌های مشخص برای هر تیمار اضافه شد. پتری‌دیش‌ها به مدت ۱٤ روز در ژرمیناتور با دمای ۲±۲۱ درجه سانتی‌گراد نگهداری و در پایان هر ۲٤ ساعت تعداد بذور جوانه‌زده شمارش گردید (Akramian et al., 2007). خروج ریشه‌چه به میزان ۲ میلی‌متر از پوسته بذر به عنوان زمان شروع جوانه‌زنی در نظر گرفته شد (Shakirova, 2003). در پایان روز چهاردهم پس از شمارش تعداد بذرهای جوانه‌زده و تعداد گیاهچه‌های نرمال، از هر پتری‌دیش ۱۰ عدد گیاهچه به صورت تصادفی انتخاب و طول ساقه‌چه و ریشه‌چه با استفاده از خط‌کش مدرج و وزن تر و خشک ریشه‌چه و ساقه‌چه با استفاده از ترازوی حساس ۰/۰۰۰۱ (AND HR-100, Japan) اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری وزن خشک، ریشه‌چه‌ها و ساقه‌چه‌ها از هم جدا گردیده و درون فویل‌های آلومینیومی به‌مدت ٤۸ ساعت در آون با دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. بر اساس داده‌های به‌دست آمده شاخص‌های ۵۰ درصد جوانه‌زنی، یکنواختی جوانه‌زنی، آغاز و پایان جوانه‌زنی با استفاده از نرم‌افزار Germin (Soltani et al., 2002) و همچنین سرعت جوانه‌زنی، شاخص جوانه‌زنی، سرعت جوانه‌زنی روزانه، میانگین زمان جوانه‌زنی و ضریب آلومتری به ترتیب با استفاده از روابط ۱ تا ۵ محاسبه گردید:

$$R_{50} = \frac{1}{D50}$$ [رابطه ۱]

R_{50} = سرعت جوانه‌زنی، D_{50} = زمان تا ۵۰ درصد جوانه‌زنی

$$GI = \Sigma \frac{TiNi}{S}$$ [رابطه ۲]

GI = شاخص جوانه‌زنی، T_i = تعداد روزهای پس از کشت، N_i = تعداد بذرهای جوانه‌زده در روز i، S = تعداد کل بذرهای کاشته شده

$$DGS = \frac{1}{\frac{FGP}{d}}$$ [رابطه ۳]

DGS = سرعت جوانه‌زنی روزانه، FGP= درصد جوانه‌زنی، d = تعداد روزها تا رسیدن به حداکثر جوانه‌زنی نهایی (طول دوره اجرای آزمایش)

$$MGT = \frac{\Sigma Dn}{\Sigma n}$$ [رابطه ٤]

MGT = میانگین زمان جوانه‌زنی، D_n = تعداد بذور جوانه‌زده در طی d روز، n = تعداد روزها از ابتدای جوانه‌زنی، Σn = تعداد کل بذور جوانه‌زده

$$CA = \frac{LS}{LR}$$ [رابطه ۵]

CA = ضریب آلومتری، LS = طول ساقه‌چه، LR = طول ریشه‌چه

در نهایت داده‌های به‌دست آمده به روش کولموگراو اسمیرنوف تست نرمال گردیده با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS (Soltani, 2008) نسخه ۹/۲ تجزیه شده و میانگین‌ها با روش آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) و در سطح احتمال P<۰/۰۵ مقایسه گردید. در سطوح نیترات مس نیز از تجزیه رگرسیونی و برازش منحنی درجه یک یا دو استفاده گردید.

Archive of SID

www.SID.ir

نتایج و بحث

شاخص‌های رویشی: نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های به‌دست آمده از آزمایش نشان داد که اثر ساده عنصر سنگین مس در صفات وزن تر ریشه‌چه، طول ریشه‌چه، طول ساقه‌چه، طول گیاهچه و ضریب آلومتری در سطح احتمال یک درصد و وزن تر گیاهچه در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود. همچنین اثر ساده تیمارهای بیولوژیک بر صفت وزن تر ریشه‌چه در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود. با این وجود بین عنصر سنگین و تیمارهای بیولوژیکی از نظر صفات رویشی گیاهچه‌ی رازیانه بر همکنش معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۱). این نتیجه بیانگر آن است که اثر غلظت‌های مختلف عنصر سنگین در هر یک از تیمارهای بیولوژیک یکسان بوده است.

جدول ۱- تجزیه واریانس صفات رویشی گیاهچه رازیانه در تیمارهای بیولوژیکی و سطوح نیترات مس

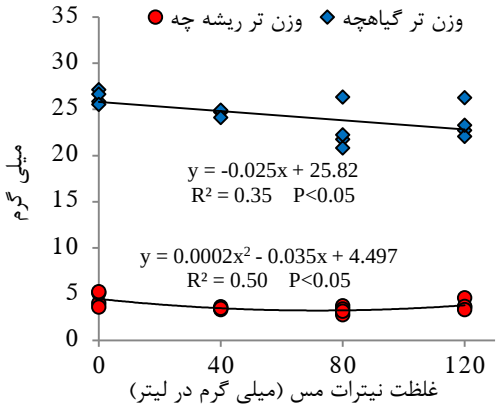
منابع تغییر	نیترات مس	تیمار بیولوژیک	نیترات مس × تیمار بیولوژیک	خطای آزمایشی	ضریب تغییرات (درصد)
درجه آزادی	۳	۳	۹	۳۲	
وزن تر ریشه‌چه	۳/۴۹**	۲/۱۱*	۰/۴۶^{ns}	۰/۵۸	۲۰/۳۱
وزن تر ساقه‌چه	۱۴/۲۱^{ns}	۹/۹۰^{ns}	۳/۴۱^{ns}	۶/۶۵	۱۲/۵۴
وزن تر گیاهچه	۲۷/۳۸*	۱۸/۱۹^{ns}	۳/۹۷^{ns}	۸/۲۷	۱۱/۸۲
وزن خشک ریشه‌چه	۰/۰۱^{ns}	۰/۰۰۶^{ns}	۰/۰۰۳^{ns}	۰/۰۰۴	۳۲/۹۷
وزن خشک ساقه‌چه	۰/۰۰۴^{ns}	۰/۰۲۵^{ns}	۰/۰۰۷^{ns}	۰/۰۲۱	۱۲/۲۰
وزن خشک گیاهچه	۰/۰۱۸^{ns}	۰/۰۰۹^{ns}	۰/۰۰۳^{ns}	۰/۰۲۲	۱۰/۹۹
طول ریشه‌چه	۸/۱۱**	۰/۴۵^{ns}	۰/۲۸^{ns}	۰/۴۱	۲۶/۶۸
طول ساقه‌چه	۱/۵۰**	۰/۱۴^{ns}	۰/۱۱^{ns}	۰/۳۱	۹/۳۲
طول گیاهچه	۱۵/۸۰**	۰/۷۸^{ns}	۰/۳۹^{ns}	۱/۲۱	۱۳/۰۰
ضریب آلومتری	۵/۲۵**	۰/۳۴^{ns}	۰/۳۸^{ns}	۰/۴۳	۲۳/۶۵

* و ** به‌ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد، ns بدون اختلاف معنی‌دار

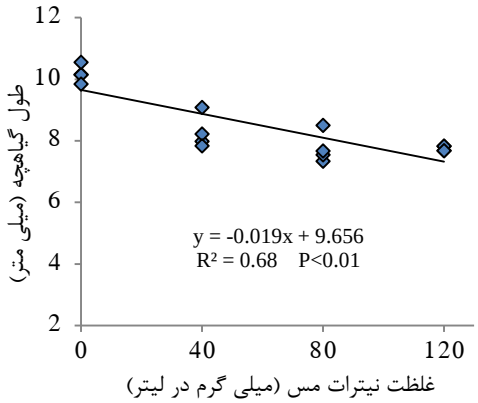
معادله رگرسیونی حاصل از برازش بر روند پاسخ صفات در سطوح مختلف نیترات مس (شکل ۱)، حاکی از تبعیت روند پاسخ وزن تر ریشه‌چه از معادله درجه دوم (R^2=۰/۵۰) در پاسخ به تغییرات غلظت عنصر سنگین مس بود. به‌طوری که با افزایش غلظت عنصر سنگین در سطوح ۴۰ و ۸۰ میلی‌گرم در لیتر، وزن تر ریشه‌چه روند کاهشی داشته و سپس به‌میزان ناچیزی افزایش نشان داد (شکل ۱)، ولی رابطه وزن تر گیاهچه با تغییرات نیترات مس به صورت خطی (R^2=۰/۳۵) بوده به طوری که با افزایش غلظت عنصر سنگین با شیب حدود ۰/۰۳- واحد کاهش نشان داد (شکل ۱). در مورد طول گیاهچه نیز رابطه به‌صورت خطی (R^2=۰/۶۸) بوده و با افزایش تنش عنصر سنگین با شیب ۰/۰۱۹- واحد کاهش نشان داد که با توجه به ضریب تبیین آن، حدود ۶۸ درصد تغییرات آن به تغییرات غلظت نیترات مس مربوط بود (شکل ۲). این نتایج با نتایج Saberi and Shahriari (2010) در گیاه آتریپلکس هم‌خوانی دارد.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱– اثر سطوح نیترات مس بر وزن تر ریشه‌چه و گیاهچه



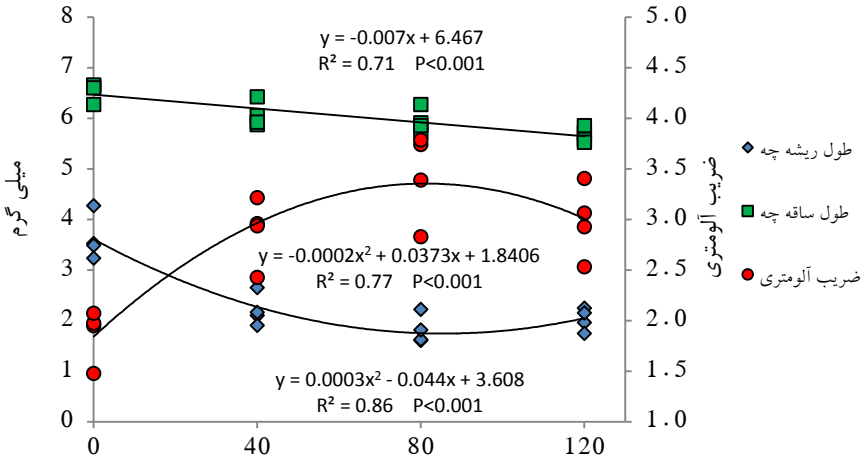
شکل ۲– اثر سطوح نیترات مس بر طول گیاهچه

افزایش غلظت نیترات مس بر طول ریشه‌چه و ساقه‌چه اثر منفی داشته و هردو این صفات را به‌صورت معنی‌داری کاهش داد با این تفاوت که روند تغییرات طول ریشه‌چه در پاسخ به تغییرات غلظت عنصر سنگین به‌صورت رابطه درجه دوم (R^2=۰/۸٦) ولی در در مورد طول ساقه‌چه از نوع خطی (R^2=۰/۷۱) بود (شکل ۳). طول ساقه‌چه با افزایش عنصر سنگین مس با شیب حدود ۰/۰۰۷- واحد کاهش نشان داده و در سطح ۱۲۰ میلی‌گرم در لیتر به کمترین میزان خود (۵/٦۸ سانتی‌متر) رسید. Ghorbanli et al. (2007) نیز کاهش طول ساقه و ریشه را در اثر کاربرد کلرید مس گزارش کرده‌اند. انباشته شدن فلزات سنگین در محیط ریشه سبب کاهش جذب آب و مواد غذایی، کاهش انتقال آب و بر هم خوردن تعادل آب، مهار فعالیت آنزیم‌ها، کاهش متابولیسم سلولی و در نتیجه مهار رشد و حتی مرگ گیاه می‌گردد (Cheng and Huang, 2006). در این آزمایش بازدارندگی طول اندام هوایی به وسیله‌ی نیترات مس کمتر از طول ریشه بود، این نتیجه را می‌توان با تجمع فلز سنگین در ریشه مرتبط دانست چراکه ریشه‌های بعضی از گیاهان می‌توانند غلظت‌های بالای مس را در خود تجمع دهند و از انتقال فلزات به قسمتهای در حال رشد گیاهان جلوگیری کنند (Liu et al., 2009). روند تغییرات ضریب آلومتری نیز در پاسخ به افزایش غلظت نیترات مس به صورت تابع درجه دوم (R^2=۰/۷۷) بود به‌طوری که تا سطوح متوسط تنش روند افزایشی ولی در سطح بالای آن (۱۲۰ میلی‌گرم در لیتر نیترات مس) سیر نزولی نشان داد (شکل ۳). افزایش ضریب آلومتری در جوانه‌زنی بذر رازیانه می‌تواند به دلیل حساسیت بیشتر طول ریشه‌چه نسبت به طول ساقه‌چه در پاسخ به افزایش غلظت نیترات مس باشد (شکل ۳). به نظر می رسد اولین اثر ظاهری عنصر سنگین مس روی گیاه محدود نمودن رشد ریشه است که این کاهش، از طریق کاهش تقسیم سلولی و در نتیجه کاهش رشد طولی ریشه اتفاق می‌افتد (Verma et al., 2011). این نتایج با نتایج آزمایش Shariat and Asareh (2006) در جوانه‌زنی بذور اکالیپتوس و Mahmood et al. (2005) روی جوانه‌زنی ذرت در شرایط تنش عنصر سنگین مس مطابقت دارد. Abdollahi et al. (2013) نیز در بررسی اثر سطوح مس بر جوانه‌زنی شوید[1] افزایش ضریب آلومتری گیاهچه را در سطوح متوسط عنصر مس گزارش کرده‌اند. همچنین در آزمایش Jelizkova et al. (2003) نیز رشد ریشه گیاهان دارویی انیسون، زیره سیاه و رازیانه در شرایط آلودگی به فلزات سنگین کادمیوم، مس، سرب و روی حساسیت بیشتری نسبت به ساقه نشان داد. Smirnoval et al. (2006) در

1- *Aniethum graveolens* L.

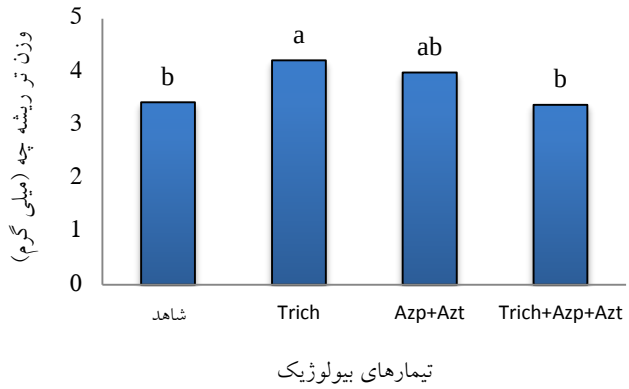
Archive of SID
www.SID.ir

آزمایشی روی جوانه‌زنی و رشد گیاهچه گندم نیز گزارش کردند که طول ریشه حساس‌ترین صفت نسبت به سمیت عنصر مس بوده و بیشتر از سایر صفات تحت تأثیر قرار گرفت.



شکل ۳– اثر سطوح نیترات مس بر طول ریشه‌چه، ساقه‌چه و ضریب آلومتری

در بین صفات رویشی اثر ساده تیمارهای بیولوژیک تنها در صفت وزن تر ریشه‌چه معنی‌دار (P<۰/۰۵) بود (جدول ۱). بیشترین وزن تر ریشه‌چه در تیمار بیولوژیک تریکودرما و آزوسپریلیوم + ازتوباکتر مشاهده شد که ۲۳ درصد نسبت به شاهد افزایش نشان داد (شکل ٤). طبق نتایج Yazdani et al. (2009) نیز استفاده از قارچ تریکودرما موجب بهبود رشد و نمو گیاهچه سویا شد. Mastouri et al. (2010) نیز افزایش جوانه‌زنی و رشد گیاهچه‌های گوجه-فرنگی را در اثر تلقیح قارچ تریکودرما، تحت تنش‌های شوری، خشکی، سرما و پیری گزارش نمودند. گونه‌های تریکودرما با استفاده از راهکارهایی سبب افزایش رشد گیاهان می‌شود که از آن جمله می‌توان به تولید آنتی‌بیوتیک (Aneja et al., 2005)، دفع سموم و افزایش جذب عناصر غذایی به‌دلیل افزایش حلالیت عناصر، ترشح هورمون‌های رشد و تولید اتیلن (Sharma et al., 1999; Gravel et al., 2007) اشاره نمود.



شکل ٤– اثر تیمارهای بیولوژیک بر وزن تر ریشه‌چه رازیانه

www.SID.ir

شاخص‌های جوانه‌زنی

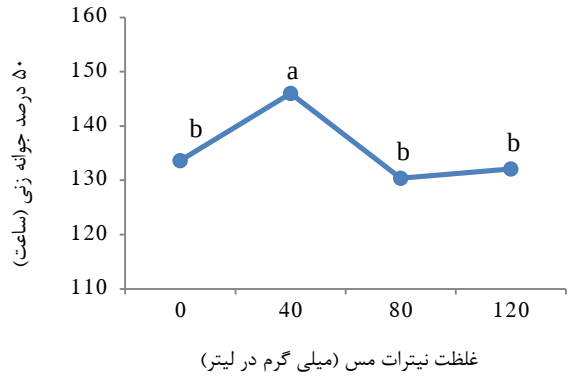
بر اساس داده‌های به‌دست آمده از آزمایش، اثر ساده عنصر سنگین مس بر صفت ۵۰ درصد جوانه‌زنی در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود (جدول ۲). همچنین اثر ساده تیمارهای بیولوژیک بر صفات آغاز جوانه‌زنی، ۵۰ درصد جوانه‌زنی، پایان جوانه‌زنی، سرعت جوانه‌زنی، میانگین زمان جوانه‌زنی و یکنواختی جوانه‌زنی در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. برهمکنش عنصر سنگین مس و تیمارهای بیولوژیک تنها از نظر سرعت جوانه‌زنی روزانه معنی‌دار ($P<۰/۰۵$) بود.

جدول ۲- تجزیه واریانس شاخص‌های جوانه‌زنی گیاهچه رازیانه در تیمارهای بیولوژیکی و سطوح نیترات مس

منابع تغییر	نیترات مس	تیمار بیولوژیک	نیترات مس× تیمار بیولوژیک	خطای آزمایشی	ضریب تغییرات (درصد)
درجه آزادی	۳	۳	۹	۳۲	
آغاز جوانه‌زنی	٤۲۷/۲٤ ns	۱٦٥۷/۱۲ **	۲۷۳/٤۸ ns	۱۹۸/۳۰	۱٦/۳۷
۵۰ درصد جوانه‌زنی	٦۰٦/٥٦ *	۳۲۷۸/٦٤ **	۱٥۹/۹۷ ns	۱٦۸/۷۹	۹/٥۸
پایان جوانه‌زنی	۱۱٦٦/۳٤ ns	٦۳٦۰/۹٦ **	۸۹۳/٥٤ ns	۱۲٦۱/۰٦	۱٤/٦۲
درصد جوانه‌زنی	٤۳/۰۰ ns	۱٦٥/٦٦ ns	۱٦۹/۸۱ ns	۸۹/۳۳	۱۳/۷٤
سرعت جوانه‌زنی	۰/۱۱ ns	۰/۹۳ **	۰/۲۳ ns	۰/۱۲	۱۲/۲٤
سرعت جوانه‌زنی روزانه	۰/۰۰۱۱ ns	۰/۰۰۱٥ ns	۰/۰۰۱۹ *	۰/۰۰۰۷	۱۲/٥٤
میانگین زمان جوانه‌زنی	۰/٥۷ ns	٤/٦٦ **	۰/۳٤ ns	۰/۲٥	٦/٦۱
شاخص جوانه‌زنی	۰/٦٤ ns	۱/۲۱ ns	۱/۲۸ ns	۰/۷۱	۱٥/۹٦
یکنواختی جوانه‌زنی	٦٤۹/۱٤ ns	۸۳٤۲/۸۹ **	۱٤۰۱/۲۷ ns	۱۳۳٦/۳۸	۲۳/۲٥

* و **: به‌ترتیب معنی دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد. ns بدون اختلاف معنی‌دار

مدت زمان مورد نیاز برای رسیدن به ۵۰ درصد جوانه‌زنی بذر با افزایش غلظت نیترات مس از صفر به ٤۰ میلی‌گرم در لیتر به‌صورت معنی‌داری افزایش یافت ولی در ادامه با افزایش بیشتر غلظت عنصر سنگین (از ٤۰ به ۸۰ میلی‌گرم در لیتر) از میزان این صفت کاسته شد (شکل ۵). اثر ساده نیترات مس در سایر شاخص‌های جوانه‌زنی معنی‌دار نبود. بر اساس پژوهش انجام شده روی سه گیاه دارویی انیسون، زیره سیاه و رازیانه نیز رشد اولیه ریشه‌ها بیشتر از سایر شاخص‌های جوانه‌زنی تحت تاثیر عناصر سنگین قرار گرفت (Jeliazkova et al., 2003).



شکل ۵ - اثر غلظت نیترات مس بر ۵۰ درصد جوانه‌زنی بذر رازیانه

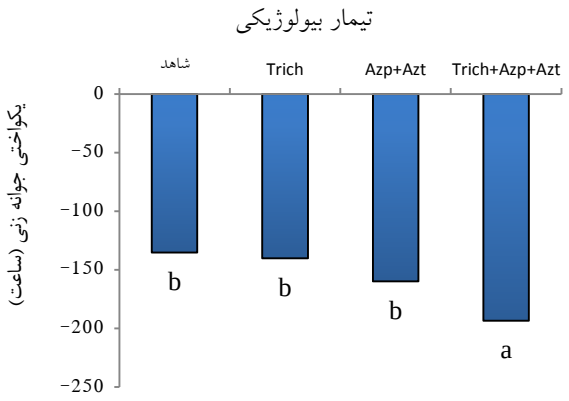
Archive of SID
www.SID.ir

مقایسه میانگین اثر تیمار بیولوژیک بر شاخص‌های جوانه‌زنی نشان داد که تلقیح باکتری‌های آزوسپریلیوم + ازتوباکتر مدت زمان لازم برای جوانه‌زنی را افزایش داده و آغاز جوانه‌زنی را به تأخیر انداخت ولی تلقیح همزمان تریکودرما و آزوسپریلیوم + ازتوباکتر باعث آغاز سریع‌تر جوانه‌زنی نسبت به تیمار شاهد (حدود ۱۵ درصد) و آزوسپریلیوم + ازتوباکتر (حدود ۳۱ درصد) گردید (جدول ۳). تلقیح باکتری آزوسپریلیوم + ازتوباکتر مدت زمان لازم برای رسیدن به ۵۰ درصد و پایان جوانه‌زنی و همچنین تلقیح همزمان تریکودرما و آزوسپریلیوم + ازتوباکتر نیز مدت زمان لازم برای پایان جوانه‌زنی را افزایش دادند. سرعت جوانه‌زنی در تیمار آزوسپریلیوم + ازتوباکتر نسبت به شاهد (۱۶/۷۹ درصد) و سایر تیمارها به‌صورت معنی‌داری کاهش ولی میانگین زمان جوانه‌زنی (۱۷/۴۲ درصد) افزایش نشان داد (جدول ۳).

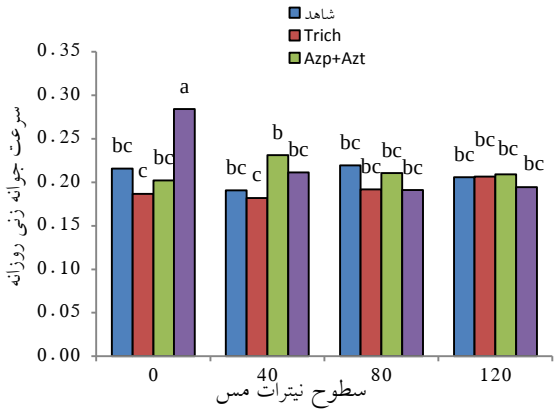
جدول ۳- مقایسه میانگین اثر تیمار بیولوژیکی بر شاخص‌های جوانه‌زنی بذر رازیانه

تیمار	آغاز جوانه‌زنی	۵۰ درصد جوانه‌زنی	پایان جوانه‌زنی	سرعت جوانه‌زنی	میانگین زمان جوانه‌زنی
	(ساعت)			(بذر در روز)	(روز)
شاهد	۸۶/۳۱^{b}	۱۲۷/۷۷^{b}	۲۲۶/۴۳^{b}	۲/۵۶^{ab}	۷/۲۹^{bc}
Trich	۸۲/۰۲^{bc}	۱۲۳/۵۷^{b}	۲۱۹/۸۵^{b}	۲/۸۰^{a}	۷/۱۹^{c}
Azp+Azt	۱۰۶/۴۷^{a}	۱۵۹/۹۲^{a}	۲۵۸/۸۰^{a}	۲/۱۳^{c}	۸/۵۶^{a}
Trich+Azp+Azt	۷۳/۴۴^{c}	۱۳۰/۸۸^{b}	۲۶۶/۰۳^{a}	۲/۴۳^{b}	۷/۶۹^{b}

میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.



شکل ٦- اثر تیمار بیولوژیکی بر یکنواختی جوانه‌زنی بذر



شکل ۷- برهم‌کنش نیترات مس و تیمار بیولوژیک بر سرعت جوانه‌زنی روزانه

یکنواختی جوانه‌زنی در کاربرد تلفیقی قارچ تریکودرما با باکتری‌های آزوسپریلیوم و ازتوباکتر به‌صورت معنی‌داری نسبت به شاهد و تیمار جداگانه‌ی قارچ و باکتری افزایش یافت (شکل ٦). یکنواختی جوانه‌زنی از کسر زمان تا ۱۰ درصد جوانه‌زنی و ۹۰ درصد جوانه‌زنی به‌دست می‌آید. هرچه این عدد کمتر باشد، فاصله زمانی بین ۱۰ درصد و ۹۰ درصد جوانه‌زنی کمتر و یکنواختی جوانه‌زنی بیشتر خواهد بود (Latifi et al., 2003). نمودار حاصل از مقایسه میانگین اثر متقابل عنصر سنگین با تیمار بیولوژیک بر سرعت جوانه‌زنی روزانه (شکل ۷) نشان داد که در غلظت صفر

www.SID.ir

نیترات مس استفاده از تلفیق قارچ تریکودرما و باکتری‌های آزوسپریلیوم و ازتوباکتر افزایش معنی‌دار سرعت جوانه‌زنی روزانه را در پی‌داشت که این افزایش نسبت به شاهد ۲۷ و نسبت به تریکودرما ٤٧ درصد بود، ولی در سایر سطوح عنصر سنگین تیمار بیولوژیکی اثر معنی‌داری روی سرعت جوانه‌زنی روزانه نداشت.

نتیجه‌گیری نهایی

با توجه به نتایج آزمایش می‌توان بیان داشت که هرچند کاربرد تیمارهای قارچی و باکتریایی برای بهبود جوانه‌زنی گیاه دارویی رازیانه تنها در برخی صفات از جمله وزن تر ریشه‌چه، یکنواختی جوانه‌زنی، سرعت جوانه‌زنی روزانه و مدت زمان لازم برای آغاز جوانه‌زنی اثر مثبت داشت اما به نظر می‌رسد می‌تواند تا حدودی اثرات مضر ناشی از عنصر سنگین مس را نیز تعدیل کند و باعث افزایش سرعت استقرار و به دنبال آن تعداد بوته در مزرعه و در نتیجه افزایش محصول در گیاه رازیانه گردد. ولی با این حال برای درک بهتر اثر این میکروارگانیسم‌ها در شرایط تنش عنصر سنگین نیاز به آزمایش‌های بیشتر به ویژه در سایر مراحل رشدی گیاه می‌باشد.

سپاسگزاری

بدینوسیله از آقایان دکتر محمدعلی تاجیک و مهندس سید محمد علوی به‌دلیل همکاری در تهیه ایزوله‌های قارچ تریکودرما و کشت باکتری‌های افزاینده رشد تشکر می‌گردد.

Reference

Abdollahi, L., Pirdashti, H., and Yaghoubian, Y. 2013. Effect of biological treatments on dill (*Aniethum graveolens* L.) seed germination and seedling growth under copper nitrate contamination. Seed Science and Technology. In Press.

Akbari, P., Ghalavand, A., and Modarres Sanavy, S.A.M. 2009. Effects of different nutrition systems and biofertilizer (PGPR) on phenology period yield and yield components of sunflower (*Helianthus annuus* L.). Electronic Journal of Crop Production. 2: 119-134.

Akramian, M., Hosseini, H., Kazerooni Monfared, A., and Rezvani Moghadam, P. 2007. Effect of seed osmopriming on germination and seedling development of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). 5(1):37-46.

Anand, P., Isar, J., Saran, S., and Saxena, RK. 2006. Bioaccumulation of copper by *Trichoderma viride*. Bioresource Technology. 97: 1018-25.

Aneja, M., Gianfagna, T.J., and Hebbar, P.K. 2005. *Trichoderma harzianum* produces nonanoic acid, an inhibitor of spore germination and mycelial growth of two cacao pathogens. Physiological and Molecular Plant Pathology. 67: 304-307.

Aycicek, M., Ince, M., and Yaman, M. 2008. Effects of Cadmium on the Germination, Early Seedling Growth and Metal Content of Cotton (*Gossypium hirsutum* L.). International Journal of Science and Technology. 3: 1-11.

Aydinalp, C., and Marinova, S. 2009. The effects of heavy metals on seed germination and plant growth on alfalfa plant (*medicago sativa*). Bulgarian Journal of Agricultural Science. 15: 347-350.

Cavalcante, R.S., Lima, H.L.S., Pinto, G.A.S., Gava, C.A.T., and Rodriguez, S. 2008. Effect of moisture on *Trichoderma conidia* production on corn and wheat bran by solid state fermentation. Microbiol. Biotechnology. 24: 319-325.

Cheng, S., and C. Huang, 2006. Influence of cadmium on growth of root vegetable and accumulation of cadmium in the edible root. International J. Applied Science and Engineering. 3: 243-252.

Archive of SID

www.SID.ir

Ghorbanli, M., Meighani, F., and Asadollahy, B. 2007. Effect of copper chloride stress on chlorophyll, carbohydrate accumulation, and some growth parameters in two canola (*Brassica napus* L.) cultivars. Pajouhesh and Sazandegi. 76: 134-141.

Gravel, V., Antoun, H., and Tweddell, R.J. 2007. Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: Possible role of indole acetic acid (IAA). Soil Biology and Biochemistry. 39: 1968-1977.

Harman, G., Howell, Ch.R., Viterbo, A., Chet, I., and Lorito, M. 2004. Trichoderma species-opportunistic, avirulent plant symbionts. Nature Reviews Microbiology. 2: 43-56.

Hornak, L. 1992. Cultivation and processing of medicinal plants. Akademia Kiado. Budapest. P. 338.

Hoyos-Carvajal, L., Orduz, S. and Bissett, J. 2009. Growth stimulation in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by Trichoderma. Biological Control. 51: 409-416.

Janouskova, M., and Vosatka, M. 2005. Response to cadmium of *Daucus carota* hairy roots dual cultures with *Glomus intraradices* or *Gigaspora margarita*. Mycorrhiza. 15: 217–224.

Jeliazkova, E.A., Craker, L.E., and Xing, B. 2003. Seed germination of anise, caraway, and fennel in heavy metal contaminated solutions. Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants, 10: 83-93.

Kavamura, V.N., and Esposito, E. 2010. Biotechnological strategies applied to the decontamination of soils polluted with heavy metals. Biotechnology Advances. 28: 61-69.

Latifi, N., Soltani, A., and Spanner, D. 2003. Effect of temperature on germination components in canola cultivars. Iranian Journal Agriculture Science. 35: 313-321.

Li, W., Khan, M.A., Yamaguchi, S.H., and Kamiya, Y. 2005. Effects of heavy metals on seed germination and early seedling growth of *Arabidopsis thaliana*. Plant Growth Regulation .46:45–50.

Liu, T.F., Wang, T., Sun, C., and Wang, Y.M. 2009. Single and joint toxicity of cypermethrin and copper on Chinese cabbage (*Pakchoi*) seeds. Journal of Hazardous Materials. 163:344–348.

Mahmood, S., Hussain, A., Saeed, Z., and Athar, M. 2005. Germination and seedling growth of corn (*Zea mays* l.) under varying levels of copper and zinc. International Journal of Environmental Science and Technology, 2: 269-274.

Mastouri, F., Björkman, T., and Harman, G.E. 2010. Seed treatment with *Trichoderma harzianum* alleviates biotic, abiotic, and physiological stresses in germinating seeds and seedlings. Biological Control. 100: 1213-21.

Mohammadi, R., Olamaee, M., Ghorbani Nasrabadi, R., and Chakeralhossaini, M.R. 2010. Effects of urea fertilizer, organic matter and Plant Growth Promoting Rhizobacteria on N uptake and yield of wheat (*Triticum aestivum* C.V Alvand). Journal of Plant Production. 17: 77-92.

Nezami, A., Azizi, K., Siyahmargoyi, A., and Mohammad Abadi, A. 2010. Effect of freezing stress on electrolyte leakage of fennel (*Foeniculum vulgare*) plants. Iranian Journal of Field Crops Research. 8: 587-593.

Saberi, M., Tavili, A., Jafari, M., Heydari, M. 2010. Effect of different levels of heavy metals on seed germination and seedling growth of *Atriplex lentiformis*. Journal of Range. 1: 112-120.

Sedghiani, MR., Gharemaleki, T., Besharati, H., and Tavasolee, A. 2011. Effects of PGPR and AM Fungi on Growth and Zn Uptake by Corn Plant in a Zn-Contaminated Soil. Water and Soil Sciences. 21: 135-147.

Shakirova, F.M. 2003. Changes in the hormonal status of wheat seedlings induced by SA and salinity. Plant Science, 164: 317-322.

Shariat, A., and Asareh, M.H. 2006. Effects of different levels of heavy metals on seed germination and seedling growth of three *Eucalyptus* species. Research Quarterly Genetics and Plant Breeding of Pasture and Forest. 14: 38-46.

Sharma, H.S.S., Kilpatrick, M., Ward, F., Lyons, G., and Burns, L. 1999. Colonization of phase II compost by biotypes of *Trichoderma harzianum* and their effect on mushroom yield and quality. Applied Microbiology Biotechnology. 51: 572-578.

Soltani, A. 2008. Using the SAS statistical Analysis. Jahaddaneshgahi Mashhad. p. 182.

Soltani, A., Galeshi, S., Zeinali, E., and Latifi, N. 2002. Germination, seed reserve utilization and seedling growth of chickpea as affected by salinity and seed size. Seed Science and Technology. 30: 51–60.

Archive of SID

www.SID.ir

Szôllôsi, R., Kálmán, E., Medvegy, A., Petô, A., and Varga, S.A. 2011. Studies on oxidative stress caused by Cu and Zn excess in germinating seeds of Indian mustard (*Brassica juncea* L.). Acta Biologica Szegediensis. 55: 175-178.

Verma, J.P., Singh, V., and Yadav, J. 2011. Effect of copper sulphate on seed germination, plant growth and peroxidase activity of Mung Bean (Vigna radiate). In. J. Bot. 7(2):200-204.

Wang. M. and Zhou, Q. 2005. Single and joint toxicity of chlorimuron-ethyl, cadmium, and copper acting on wheat *Triticum aestivum*. Ecotoxicology and Environmental Safety. 60: 169–175.

Yadegari, M., Farahani, G.H.N. and Mosadeghzad, Z. 2012. Biofertilizers effects on quantitative and qualitative yield of Thyme (*Thymus vulgaris*). African Journal of Agricultural Research. 7:4716-4723.

Yazdani, M., Pirdashti, H., Tajik, M.A., and Bahmanyar, M.A. 2009. Effect of *Trichoderma* spp. and different organic manures on growth and development in soybean [*Glycine max* (L.) Merril.]. Electronic Journal of Crop Production. 1: 65-82.

Archive of SID

www.SID.ir