

مقاومت به سرب نهال‌های *Populus nigra* همزیست شده با قارچ‌های میکوریز آربوسکولار بر اساس پارامترهای فیزیولوژیکی

آزاده صالحی^۱، مسعود طبری کوچکسرایبی^{۲*}، ابراهیم محمدی گل تپه^۳، انوشیروان شیروانی^۴

۱- دکتری جنگل‌داری، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس؛ استادیار پژوهشی، موسسه تحقیقات

جنگل‌ها و مراتع، سازمان تحقیقات، ترویج و آموزش کشاورزی.

۲- استاد دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس

۳- استاد دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس

۴- استادیار دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱/۲۷ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۳/۶/۱۵)

چکیده:

جهت بررسی مقاومت به فلز سنگین سرب کلون ۶۲/۱۵۴ تبریزی (*P. nigra*) همزیست شده با قارچ‌های میکوریز آربوسکولار آزمایشی گلخانه‌ای به صورت آزمون فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل^۱ تصادفی با دو فاکتور (۱) تلقیح قارچی در ۴ سطح (شاهد، تلقیح با *G. mosseae* تلقیح با *G. intraradices* و تلقیح با *G. intraradices + G. mosseae*) و (۲) سرب در ۴ سطح (۰، ۱۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک) انجام شد. در پایان دوره رویش، درصد کلنیزاسیون میکوریزی و پارامترهای فیزیولوژیکی نهال‌ها اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که در تمام سطوح سرب، درصد کلنیزاسیون میکوریزی ریشه نهال‌ها در تیمارهای تلقیحی به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد (بدون تلقیح میکوریزی) بیشتر بود، ولی سه تیمار تلقیح قارچی از این لحاظ با یکدیگر اختلاف معنی‌داری نداشتند. همچنین، در تیمارهای مورد بررسی افزایش غلظت سرب درصد کلنیزاسیون میکوریزی ریشه را کاهش نداد. فتوسنتز، هدایت روزنه‌ای، تعرق، غلظت CO₂ بین سلولی و کارایی مصرف آب نهال‌های *P. nigra* در برابر تیمارهای سرب و تلقیح قارچ و تاثیر متقابل این دو تیمار بدون تغییر باقی ماند. به‌طور کلی، نتایج تحقیق حاضر نشان داد که تلقیح قارچی تأثیری بر پارامترهای فیزیولوژیکی نهال‌های *P. nigra* و به تبع آن مقاومت گیاه در برابر تنش سرب نداشت. این در حالی است که با توجه به پارامترهای بررسی شده (درصد کلنیزاسیون میکوریزی و پارامترهای فیزیولوژیکی)، کلون مورد مطالعه مقاومت خوبی نسبت به تنش فلز سنگین سرب در غلظت‌های بررسی شده نشان داد. لذا این کلون به عنوان یک گونه پیشنهادی می‌تواند برای تحقیقات آبی گیاه پالایی خاک‌های آلوده به سرب مورد توجه پژوهشگران قرار گیرد.

واژگان کلیدی: پارامترهای فیزیولوژیکی، تبریزی، سرب، قارچ میکوریز آربوسکولار، گیاه پالایی

۱ - مقدمه

خاک‌های آلوده مطرح شده است (Susarlaet *al.*, 2002; GaurandAdholeya, 2004; Rafatiet *al.*, 2011; Heet *al.*, 2013). در واقع، گیاه پالایی فناوری استفاده از گیاهان در پالایش بسترهای آلوده می‌باشد (Arriagadaet *al.*, 2005). از آنجا که ورود فلزات سنگین به زنجیره غذایی خطرناک است، لذا خاک‌های آلوده باید از زیر کشت محصولات کشاورزی خارج شوند و از طریق درخت کاری در معرض فرآیند گیاه پالایی قرار گیرند (BojarczukandKieliszewska-Rokicka, 2010). تحقیقات نشان داده‌اند که در بین گونه‌های درختی، گونه‌های متعلق به خانواده Salicaceae نه تنها به دلیل تولید زی‌توده بالا، سیستم ریشه‌ای عمیق و گسترده و جذب بالای آب (Bitts'anszkyet *al.*, 2009)، بلکه به دلیل مقاومت و ظرفیت انباشت بالای فلزی، گزینه‌های ایده‌آلی برای گیاه پالایی خاک‌های آلوده به فلزات سنگین می‌باشند (Utmazianet *al.*, 2007).

در میان فاکتورهای زیستی موثر بر فرآیند گیاه پالایی، نقش میکروارگانیسم‌های خاک به‌ویژه قارچ‌های میکوریزی حائز اهمیت است (Zimmeret *al.*, 2009; Mrnkaet *al.*, 2012). قارچ‌های میکوریزی (اندو میکوریز^۲ و اکتو میکوریز^۳) می‌توانند با افزایش جذب عناصر غذایی، تغییر دسترسی زیستی فلزات، بهبود فعالیت‌های فیزیولوژیکی و تولید مواد محرک رشد، مقاومت گیاه را در برابر تنش‌های محیطی

فلز سنگین سرب عنصری بدون نقش فیزیولوژیکی ولی بالقوه سمی برای گیاهان است (Kabata-PendiasandPendias, 1992). به طوری که خاک آلوده به سرب می‌تواند آسیب‌هایی را به رشد و نمو گیاه وارد سازد (McLaughlin, 2001). حساسیت گیاهان نسبت به فلز سنگین سرب متفاوت است (Arriagadaet *al.*, 2005). با این وجود، غلظت ۵۰۰-۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم (ppm) سرب در خاک برای اغلب گیاهان، سمی گزارش شده است (Kabata-Pendias, 2004).

با توجه به اینکه فلزات سنگین تجمع یافته در خاک به دلیل پایداری و پتانسیل اثرات مضر اکولوژیکی می‌توانند اکوسیستم‌های زمینی را برای مدت طولانی تحت تاثیر قرار دهند، لذا خاک‌های آلوده به فلزات سنگین باید مورد هدف فرآیندهای پالایش قرار گیرند (BojarczukandKieliszewska-Rokicka, 2010). روش‌های فیزیکی و شیمیایی متعددی برای پالایش خاک‌های آلوده به فلزات سنگین وجود دارد که اغلب آنها علاوه بر هزینه زیاد، منجر به تخریب ساختار فیزیکی و شیمیایی و فعالیت‌های حیاتی خاک می‌شوند (Kramer, 2005). بنابراین، بهتر است تا حد ممکن از روش‌های زیستی مناسب، طبیعی، مقرون به صرفه و در محل استفاده شود.

در سال‌های اخیر، گیاه پالایی^۱ به‌عنوان یک تکنولوژی موثر، قابل اجرا و سازگار با محیط زیست برای حذف، جابجایی و یا غیرفعال کردن آلاینده‌ها در

²Endomycorrhiza

³Ectomycorrhiza

¹Phytoremediation

(Mrnkaet al., 2012). براساس گزارش‌های پیشین، گونه‌های مختلف صنوبر و همچنین پایه‌های میکوریزی شده آنها واکنش‌های فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی متفاوتی در بسترهای آلوده به فلزات سنگین نشان می‌دهند (Borghiet al., 2008; Linguaet al., 2008; Mrnkaet al., 2012; He et al., 2013). برای موفقیت فرآیند گیاه پالایی باید کلون‌هایی از صنوبر با بهترین پاسخ فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی به تنش ناشی از فلز سنگین انتخاب شود (Cheng, 2003).

با وجود تاکید تحقیقات متعدد بر اهمیت جنس صنوبر در فرآیند گیاه پالایی، اطلاعات کمی در مورد واکنش کلون‌های برتر صنوبرهای مورد استفاده در کشور و همچنین پایه‌های تلقیح شده آنها با قارچ-های میکوریزی در بسترهای آلوده به فلزات سنگین موجود است. نظر به اینکه بررسی پاسخ‌های فیزیولوژیکی گیاه در خاک آلوده، روشی برای ارزیابی مقاومت گیاه نسبت به فلز سنگین محسوب می‌شود (Borghiet al., 2008)، در مطالعه حاضر در خاک آلوده به غلظت‌های مختلف فلز سنگین سرب، پاسخ-های فیزیولوژیکی (فتوسنتز، هدایت روزنه‌ای، تعرق، غلظت CO₂ بین سلولی و کارایی مصرف آب گیاه) کلون ۶۲/۱۵۴ تبریزی (*P. nigra*) همزیست شده با قارچ‌های میکوریز آربوسکولار بررسی شد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱ روش تحقیق

برای انجام این تحقیق، از دو گونه قارچ

(خشکی، فلزات سنگین، بیماری‌ها، شوری و پاتوژن-ها) افزایش دهند (Rodriguez and Redman, 2008; Cicatelliet al., 2010; Karlinskiet al., 2010). قارچ‌های میکوریز آربوسکولار^۴ (AMF) از شناخته‌ترین نوع قارچ‌های اندومیکوریزی هستند که پراکنش وسیعی داشته و با ریشه اکثر گونه‌های گیاهی (Fanet al., 2008) به‌خصوص در مناطق خشک و نیمه خشک (Diagneet al., 2001) همزیستی دارند. مطالعات پیشین نشان داده-اند که در صنوبرهای جوان کلنیزاسیون ریشه با قارچ-های میکوریز آربوسکولار غالب است، درحالی‌که در پایه‌های مسن‌تر، کلنیزاسیون اکتومیکوریزی چیره می‌شود (Khasaet al., 2002).

در فرآیند گیاه پالایی، مقاومت گیاه به فلز سنگین، فاکتوری اولیه و مهم برای پالایش زیستی آلاینده توسط گیاه است (Zalesnyet al., 2005). از آنجایی که مقاومت به آلاینده و پتانسیل رشد گونه گیاهی در ارتباط مستقیم با ویژگی‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه است (Huanget al., 2004)، بررسی و آنالیز تبادلات گازی گیاه می‌تواند تاثیرات تنش ناشی از فلز سنگین روی گیاه را نشان دهد (Pietriniet al., 2003). حتی، گاهی اوقات فرآیندهای فیزیولوژیکی می‌توانند تنش ایجاد شده توسط آلاینده را بدون علائم ظاهری در گیاه نشان دهند (Pilipovicet al., 2012). در واقع بیدها (*Salix*) و صنوبرها (*Populus*) مقاومت خوبی نسبت به فلزات سنگین دارند، اما این مقاومت در بین گونه-های یک جنس ممکن است متفاوت باشد

⁴Arbuscular Mycorrhizal Fungi

سانتی‌گراد) نگهداری شد. سپس خاکی غیر استریل (برای اینکه محیط کشت نهال‌ها به محیط کشت طبیعی نزدیک باشد) با مشخصات آمده در جدول ۱ تهیه و با غلظت‌های مختلفی از نیترات سرب (Pb) $(NO_3)_2$ معادل صفر (شاهد)، ۱۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم (ppm) آلوده گردید. آنگاه گلدان‌هایی ۷ لیتری با خاک آماده شده فوق‌الذکر پر شدند. سپس گلدان‌ها تقریباً "تا رطوبت اشباع آبیاری و دو هفته رها شدند تا امکان برهم‌کنش آلاینده و خاک فراهم و شرایط آلودگی طبیعی‌تر باشد (Khodaverdiloo and Homae, 2007).

در اوایل فروردین، قلمه‌ها از سردخانه خارج و ۲۴ ساعت در ظرف پر از آب نگهداری شدند. در گلدان‌های آماده شده با خاک فوق و آلوده به سرب، یک قلمه (با دو جوانه بالاتر از سطح خاک) کاشته شد و مایه تلقیح قارچی (*G. mosseae* و *G. intraradices*) به میزان ۶۰ گرم تقریباً معادل با ۵۰۰ اسپور در اطراف هر قلمه اضافه شد (برای تیمار قارچ ترکیبی، *G. mosseae* + *G. intraradices*، نسبت‌های مساوی از دو مایه تلقیح قارچی با هم مخلوط شدند). برای گلدان‌های شاهد (فاقد تلقیح قارچی) نیز از ۶۰ گرم مایه تلقیح غیر میکوریزی تهیه شده در اطراف هر قلمه استفاده گردید. سپس گلدان‌ها به مدت یک دوره رویشی (تا اواخر مهر ماه) در گلخانه‌ای با دمای ۱۵-۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. آبیاری گلدان‌ها با آب شیر ۲-۳ بار در هفته با توجه به نیاز آبی گیاهان و به طور کاملاً یکسان برای تمام گلدان‌ها انجام شد. در حقیقت، تحقیق حاضر به صورت آزمون

میکوریز آربوسکولار (AMF) بومی (جداسازی شده از یک خاک کشاورزی: اهدایی از دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس) (*Glomus mosseae*) (Gerd. & Nicol.) Gerdemann & Trappe و (*G. intraradices* (Schenck & Smith) ترکیب این دو قارچ استفاده شد. جهت تهیه مایه تلقیح قارچی، قارچ‌های مذکور به روش سنتی در مجاورت ریشه گیاه ذرت در یک محیط استریل (شامل ماسه، پیت و رس به نسبت ۲:۱:۱) طی دوره رویشی ۴ ماهه در شرایط گلخانه تکثیر شدند (Chellappan et al., 2002). پس از اتمام دوره رشد، از محتویات گلدان‌ها که شامل خاک، قطعات ریشه میکوریزی گیاه ذرت، هیف و اسپور قارچی بود به عنوان مایه تلقیحی استفاده گردید. به طور متوسط در هر گرم مایه تلقیحی به ترتیب ۱۰ و ۸ اسپور از قارچ‌های *G. intraradices* و *G. mosseae* وجود داشت. هم‌زمان، برای گلدان‌های شاهد (فاقد تلقیح قارچی)، مایه تلقیح غیر میکوریزی از رشد گیاه ذرت در محیط استریل ذکر شده فراهم گردید. به طوری که این مایه تلقیح شامل قطعات ریشه غیر میکوریزی ذرت و خاک بدون هیف و اسپور قارچی بود (Wanget al., 2007).

در اواخر بهمن، از خزانه موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، از کلون ۶۲/۱۵۴ تیریزی (*P. nigra*) که متداول‌ترین کلون مورد استفاده در جنگل‌کاری مناطق خشک و نیمه خشک می‌باشد (Bagheriet al., 2012)، قلمه‌های ۴ جوانه‌ای به طول ۱۸-۲۲ سانتی‌متر و قطر ۱/۵-۱ سانتی‌متر تهیه و تا شروع آزمایش در سردخانه (دمای ۴ درجه

سطح (۰، ۱۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم (ppm) خاک) و در کل با ۱۶ تیمار در ۳ تکرار (۴ قلمه در هر تکرار) برای کلون ۶۲/۱۵۴ تبریزی (P. *nigra*) انجام شد.

فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کاملاً تصادفی با دو فاکتور (۱) تلقیح قارچی در ۴ سطح (شاهد، تلقیح با *G. mosseae*، تلقیح با *G. intraradices* و تلقیح با *G. intraradices*+*G. mosseae*) و (۲) سرب در ۴

جدول ۱: برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک مورد استفاده در آزمایش

پارامتر	رس (%)	سیلت (%)	شن (%)	بافت	pH	هدایت الکتریکی (dS m ⁻¹)	ظرفیت تبادل کاتیونی (mEq 100gr ⁻¹)	ماده آلی (%)	نیتروژن کل (%)	فسفر قابل جذب (mg kg ⁻¹)	پتاسیم تبدالی (mg kg ⁻¹)
مقدار	۱۹/۳	۳۴/۲	۴۶/۵	لومی-شنی	۷/۴	۰/۹۵	۱۴/۳	۱/۳	۰/۱۶	۱۰/۸	۱۰۵

شستشو و رنگ‌آمیزی شد. پس از رنگ‌آمیزی، درصد کلنیزاسیون قارچی ریشه‌ها طبق روش تقاطع شبکه^۶ در زیر میکروسکوپ تعیین گردید (Giovannetti and Mosse, 1980). در این روش هر نمونه‌ها ریشه رنگ‌آمیزی شده، در داخل یک پتری‌دیش که در زیر آن یک صفحه شبکه‌بندی شده قرار دارد، پخش شد. سپس در هر خط افقی و عمودی تعداد برخوردهای ریشه و تعداد برخوردهای ریشه‌های میکوریزی شده (واجد ساختارهای میکوریزی: هیف، آربوسکول، ویزیکول و یا اسپورهای داخلی) با اضلاع شبکه ثبت گردید. سپس از تقسیم تعداد ریشه‌های میکوریزی به تعداد کل ریشه‌های تقاطع یافته با اضلاع شبکه ضرب در ۱۰۰، درصد کلنیزاسیون ریشه تعیین شد. برای شمارش فراوانی اسپور مایه تلقیح قارچی نیز از روش الک مرطوب و سانتریفوژ با ساکاروز استفاده گردید (Rajni and Mukerji, 2002).

تجزیه و تحلیل داده‌ها با نرم‌افزار آماری SPSS انجام شد. بدین ترتیب ابتدا توسط آزمون‌های Shapiro-Wilk و Levene نرمال بودن و همگنی

۲-۲ اندازه‌گیری‌ها

در پایان دوره رویش، پارامترهای فیزیولوژی شامل فتوسنتز، هدایت روزنه‌ای، تعرق و غلظت CO₂ بین سلولی در واحد سطح برگ نهال‌ها اندازه‌گیری شد. بدین منظور در هر تیمار ۳ نهال به‌طور تصادفی انتخاب و اندازه‌گیری‌ها بر روی چهارمین و پنجمین برگ بالغ و سالم کاملاً رشد یافته از نوک گیاه با استفاده از یک دستگاه فتوسنتزی قابل حمل (ADC bioScientific Ltd., UK) در یک روز آفتابی بین ساعت ۹:۳۰ تا ۱۱ در حالی که دمای ثابت برگ بین ۲۵ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد بود، انجام شد (Borghiet al., 2008). سپس کارایی مصرف آب (WUE)^۵ گیاه از تقسیم میزان فتوسنتز به میزان تعرق محاسبه گردید (Zhanget al., 2005).

برای تعیین درصد کلنیزاسیون ریشه با AMF، به‌ازای هر تیمار، ۳ نهال به‌طور تصادفی انتخاب و سپس بخشی از ریشه‌های فرعی نازک آنها با استفاده از روش استاندارد Phillips و Hayman (۱۹۷۰)

^۶Grid-line intersect method

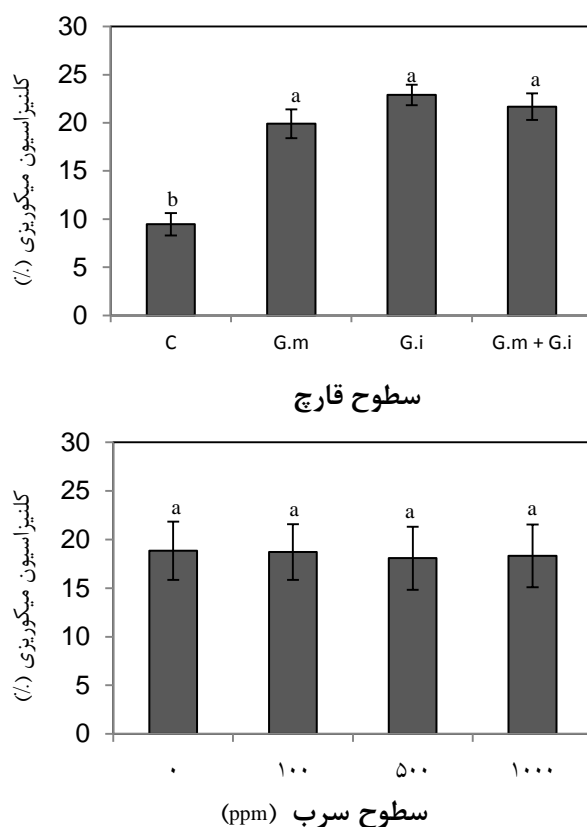
^۵water use efficiency

میکوریزی ریشه در نهال‌های تلقیح شده با قارچ‌های میکوریزیبه‌طور معنی‌داری بیشتر از نهال‌های بدون تلقیح قارچی (شاهد) بود، اما بین سه تیمار قارچی از این لحاظ اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. همچنین در تیمارهای مورد بررسی، درصد کلنیزاسیون میکوریزی ریشه نهال‌های *P. nigra* تحت تاثیر تیمارهای سرب کاهش معنی‌داری پیدا نکرد (شکل ۱، جدول ۲).

واریانس داده‌ها بررسی شد. سپس برای مقایسه آماری تیمارهای مختلف از آزمون آنالیز واریانس (ANOVA)، و برای گروه‌بندی و مقایسه میانگین‌ها از آزمون Tukey-HSD در سطح احتمال ۵ درصد ($P < 0.05$) استفاده گردید.

۳- نتایج

نتایج بدست آمده نشان داد که در کلون مورد مطالعه، در تمام سطوح سرب، درصد کلنیزاسیون



شکل ۱: درصد کلنیزاسیون میکوریزی ریشه نهال‌های *P. nigra* در خاک آلوده به غلظت‌های مختلف سرب (میانگین \pm SE): C: شاهد، G.m: *G. mosseae*، G.i: *G. intraradices*، G.m+G.i: *G. mosseae* + *G. intraradices*؛ حروف انگلیسی متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار آماری در سطح احتمال پنج درصد است.

جدول ۲: نتایج تجزیه واریانس (ANOVA) تاثیر بلوک، تیمارهای سربی (Pb) و قارچ (AMF) و اثر متقابل آنها (Pb × AMF) بر

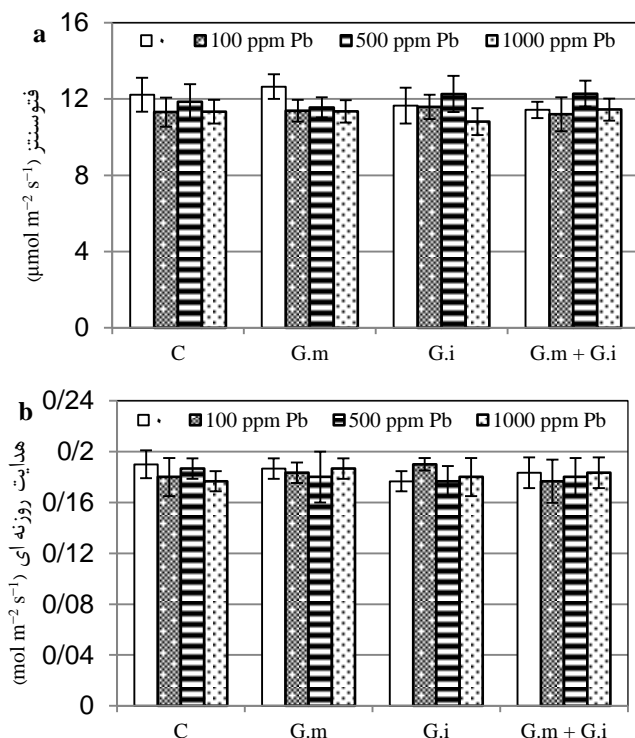
درصد کلنیزاسیون میکوریزی ریشه و پارامترهای فیزیولوژیکی نهال‌های *P. nigra*

Pb × AMF	AMF		Pb		بلوک		پارامتر	
	P-value	F	P-value	F	P-value	F		
۰/۹۸۰ ns	۰/۲۶۴	۰/۰۰۰*	۲۴/۸۸	۰/۹۰۶ ns	۰/۱۸۵	۰/۷۴۶ ns	۰/۲۹۵	کلنیزاسیون میکوریزی (/)
۰/۹۷۳ ns	۰/۲۸۹	۰/۷۹۰ ns	۰/۱۸۰	۰/۳۶۸ ns	۱/۰۸	۰/۵۸۷ ns	۰/۶۱۲	فتوسنتز ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
۰/۹۹۴ ns	۰/۱۸۹	۰/۹۷۳ ns	۰/۱۷۵	۰/۸۴۰ ns	۰/۱۵۲	۰/۱۶۴ ns	۱/۷۰	هدایت روزنه‌ای ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
۰/۹۹۹ ns	۰/۲۲۲	۰/۹۸۹ ns	۰/۱۶۰	۰/۵۹۶ ns	۰/۶۳۷	۰/۱۷۲ ns	۱/۳۰	تعرق ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
۰/۹۱۷ ns	۰/۴۱۷	۰/۹۵۳ ns	۰/۱۱۱	۰/۷۴۳ ns	۰/۴۱۵	۰/۳۸۲ ns	۰/۸۴۵	غلظت CO ₂ بین سلولی ($\mu\text{mol mol}^{-1}$)
۰/۹۱۴ ns	۰/۲۸۸	۰/۹۷۴ ns	۰/۲۰۱	۰/۳۲۸ ns	۱/۱۹	۰/۲۰۲ ns	۱/۱۴	کارایی مصرف آب گیاه ($\mu\text{mol mmol}^{-1}$)

ns عدم وجود اختلاف معنی‌دار

هیچ یک از سطوح دو تیمار مورد بررسی و اثر متقابل دو تیمار، تاثیر معنی‌داری بر پارامترهای فیزیولوژی نهال‌ها نداشته است (جدول ۲، شکل ۲).

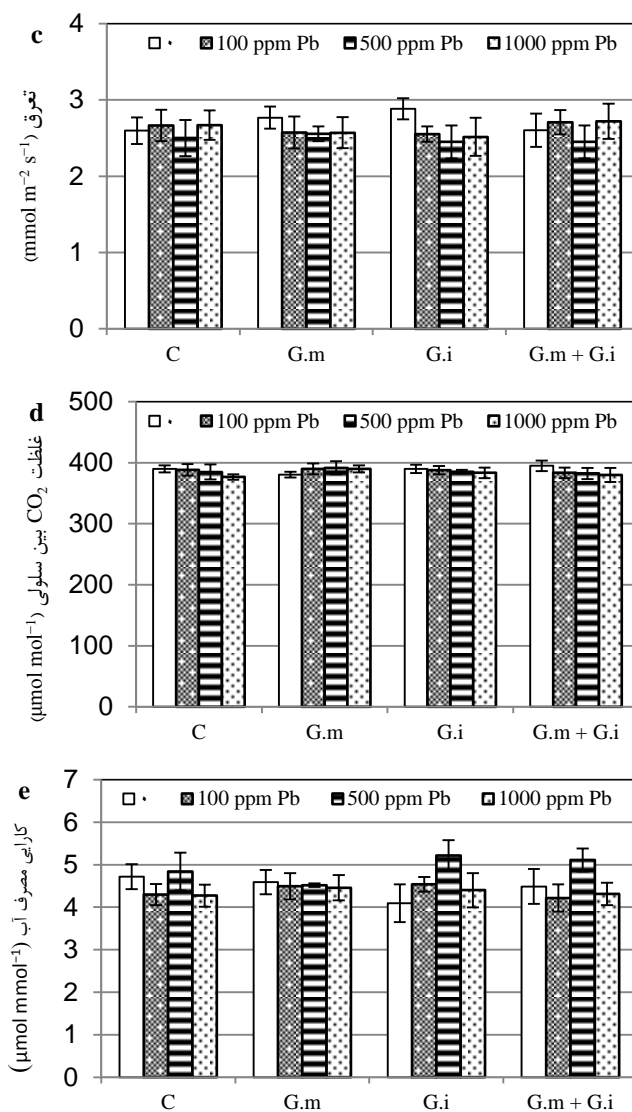
نتایج بررسی تاثیر تیمارهای سرب و قارچ میکوریزی و تاثیر متقابل دو تیمار بر میزان فتوسنتز، هدایت روزنه‌ای، تعرق، غلظت CO₂ بین سلولی و کارایی مصرف آب نهال‌های *P. nigra* نشان داد که



شکل ۲: فتوسنتز (a)، هدایت روزنه‌ای (b)، تعرق (c)، غلظت CO₂ بین سلولی (d) و کارایی مصرف آب (e) نهال‌های *P. nigra* همزیست

شده با قارچ‌های میکوریز آربوسکولار در خاک آلوده به غلظت‌های مختلف سرب (میانگین \pm SE): C: شاهد، G.m: *G. mosseae*، G.i: *G.*

G.m+G.i: *G. mosseae* + *G. intraradices intraradices*



ادامه شکل ۲: فتوسنتز (a)، هدایت روزنه‌ای (b)، تعرق (c)، غلظت CO₂ بین سلولی (d) و کارایی مصرف آب (e) نهال‌های *P. nigra* همزیست شده با قارچ‌های میکوریز آربوسکولار در خاک آلوده به غلظت‌های مختلف سرب (میانگین \pm SE): C: شاهد، G.m: *G. mosseae*، G.m+G.i: *G. mosseae* + *G. intraradices*، G.i: *G. intraradices*

۴- بحث و نتیجه گیری

میکوریزی ریشه نهال‌های *P. nigra* مشاهده نشد (شکل b-۱).

بررسی پارامترهای فیزیولوژیکی نهال‌های *P. nigra* نشان داد که میزان فتوسنتز، هدایت روزنه-ای، تعرق و غلظت CO_2 بین سلولی متاثر از تیمارهای سرب و تلقیح قارچ میکوریزی و تاثیر متقابل این دو تیمار نبود (شکل ۲، جدول ۲). پاسخ-های فیزیولوژیکی متعددی از صنوبرها نسبت به تنش فلزات سنگین مختلف گزارش شده است. Borghi و همکاران (۲۰۰۸) نشان دادند که در محیط کشت هیدروپونیک آلوده به غلظت‌های بالای فلز مس (Cu)، میزان فتوسنتز *P. canadensis* × بدون تغییر باقی ماند، در حالی که در *P. alba* به مقدار ۲۸ درصد کاهش یافت. Di Baccio و همکاران (۲۰۰۳) نیز کاهش میزان فتوسنتز نهال‌های *P. deltoides* × *P. nigra* را در غلظت‌های ۱۰۰ و ۱۰۰۰ (μM) فلز روی (Zn) گزارش کردند. همچنین، در تحقیقی با غلظت ۲۰۰ (μM) کادمیم، میزان فتوسنتز برگ‌های بالغ در صنوبرهایی نظیر *P. cathayana*، *P. alba* × *P. euramericana*، *P. glandulosa* نسبت به شرایط کنترل ۱۹ تا ۴۸ درصد کاهش یافت، در حالی که در صنوبرهای *P. nigra* و *P. popularis* بدون تغییر باقی ماند (He *et al.*, 2013). تاثیر فلز سنگین بر فعالیت فتوسنتزی گیاه می‌تواند یا به صورت مستقیم با انباشته شدن فلز سنگین در اندام‌های فتوسنتزی گیاه (برگ) باشد، یا به صورت غیرمستقیم از طریق رقابت برای جذب فلزات ضروری فرآیند فتوسنتز از قبیل منیزیم، آهن، روی و منگنز صورت گیرد (Pietrini

تلقیح با قارچ‌های *G. mosseae*، *G. intraradices* + *G. mosseae* درصد کلنیزاسیون میکوریزی ریشه نهال‌های *P. nigra* را نسبت به نهال‌های شاهد (فاقد تلقیح قارچی) در تمام غلظت‌های سرب اعمال شده افزایش داد (شکل a-۱). این امر نشان دهنده این واقعیت است که تلقیح قارچی می‌تواند باعث تقویت و جبران کمبود کلنیزاسیون میکوریزی طبیعی شود (Turnau, 1998). درصد کلنیزاسیون میکوریزی به دست آمده برای ریشه کلون ۶۲/۱۵۴ *P. nigra* مطابق با میزان کلنیزاسیون میکوریزی ریشه کلون‌های دیگری از *P. nigra* و *P. alba* رشد یافته در خاک‌های آلوده به فلزات سنگین می‌باشد (Lingua *et al.*, 2008; Ciatelliet *al.*, 2010).

تاثیرات مثبت، منفی و خنثی فلزات سنگین خاک بر کلنیزاسیون میکوریزی ریشه گیاه میزبان در مطالعات پیشین گزارش شده است. برای مثال، Ciatelli و همکاران (۲۰۱۰) نشان دادند که کلنیزاسیون میکوریزی ریشه کلون *AL35P. alba* تحت تاثیر غلظت‌های بالای فلزات روی و مس خاک نبود. در حالی که Taka`cs و همکاران (۲۰۰۵) افزایش کلنیزاسیون میکوریزی ریشه برخی کلون-های *P. euramericana* × *P. nigra* و Lingua و همکاران (۲۰۰۸) کاهش میزان کلنیزاسیون ریشه نهال‌های *P. alba* را در خاک‌های آلوده به فلزات سنگین گزارش کردند. در تحقیق حاضر با افزایش آلودگی سرب در خاک تغییر معنی‌داری در درصد کلنیزاسیون

(et al., 2003).

میکوریزی، گونه گیاهی و شرایط زیست محیطی ممکن است متفاوت می باشد (Tang, 1998). چنانچه Reid و همکاران (۱۹۸۳) نشان دادند که قارچ های میکوریزی با بهبود جذب عناصر غذایی باعث افزایش میزان فتوسنتز گیاه شدند. همچنین Han و همکاران (۲۰۱۱) نیز افزایش میزان فتوسنتز *P. alba* × *glandulosa* همزیست شده با قارچ اکتومیکوریز *Pisolithus tinctorius* را گزارش کردند. در حالی که Mrnka و همکاران (۲۰۱۲) با مطالعه تاثیر تیمارهای قارچی اندو و اکتومیکوریزی متعدد (*H. G. claroideum*, *G. intraradices*, *P. involutus mesophaeum*) به صورت منفرد و ترکیبی بر نهال های *P. nigra* رشد یافته در خاک آلوده به فلزات سنگین (عمدتاً کادمیم، سرب و روی)، تاثیر معنی داری را بر فعالیت فتوسنتزی نهال ها مشاهده نکردند. همان طور که ذکر گردید در تحقیق حاضر نیز در مورد کلون ۶۲/۱۵۴ *P. nigra* تیمارهای قارچی تاثیری بر فعالیت فتوسنتزی نهال ها نداشتند (شکل ۲، جدول ۲).

به طور کلی، از آنجایی که (۱) پاسخ های فیزیولوژیکی گیاه در خاک آلوده، میزان مقاومت گیاه نسبت به فلز سنگین را نشان می دهد (Borghiet al., 2008)، (۲) ویژگی های خوب فیزیولوژیکی، زنده ماندن و پتانسیل پالایش گونه گیاهی را تحت شرایط نامساعد اکولوژیکی بهبود می بخشد و (۳) در واقع ژنوتیپ های گیاهی مناسب برای فرآیند گیاه پالایی باید دارای پتانسیل خوب فتوسنتزی، WUE نسبتاً بالا و ثابت و تولید زی توده بالا باشند (Pajevic et

pasx hay fizyolozhiki متفاوت صنوبرها نسبت به تنش فلزات سنگین می تواند ناشی از محیط های رشد متفاوت، مدت زمان تیمار با فلز سنگین و تفاوت های ژنوتیپی گونه های صنوبر بر حسب ظرفیت فتوسنتزی باشد (Borghiet al., 2008). به طوری که در مطالعه Kieffer و همکاران (۲۰۰۹)، تیمار کوتاه مدت فلز سنگین کادمیم (۱۴ روزه)، آسیب شدیدی بر واکنش های فتوسنتزی صنوبر وارد کرد، در حالی که تحت تاثیر تیمار طولانی مدت کادمیم (حدوداً ۵۶ روزه) شدت این آسیب کمتر بود. در واقع، می توان گفت که در تیمارهای طولانی مدت، برخی صنوبرها جهت کاهش صدمات ناشی از فلزات سنگین بر روی فتوسنتز و رشد می توانند با فلزات سنگین سازگاری پیدا کنند (He et al., 2013).

در تحقیق حاضر، نهال های *P. nigra* رشد یافته در خاک آلوده به سرب، کارایی مصرف آب (WUE) تقریباً ثابتی را در غلظت های مختلف سرب نشان دادند (شکل e-۲). WUE یک شاخص خوب اقتصادی است که میزان تولید زیستی را به ازای واحد آب مصرفی توسط گیاه نشان می دهد. ثبات مقادیر WUE در شرایط زیست محیطی نامساعد نشان دهنده تولید زیستی بالا و پتانسیل پالایشی خوب گونه گیاهی است (Pajevic et al., 2009).

قارچ های میکوریزی همزیست شده با گیاهان از طریق تغییر و تعدیل فرآیندهای فیزیولوژیکی گیاه از قبیل افزایش فعالیت فتوسنتزی می توانند موجب کاهش سمیت فلز سنگین در گیاه شوند (Hanet al., 2011). البته، این امر با توجه به نوع قارچ

در برابر تنش سرب نداشت. در مجموع، این نظریه که "گونه‌های متعلق به خانواده Salicaceae شامل بیدها و صنوبرها مقاومت خوبی نسبت به فلزات سنگین دارند" مورد تایید اغلب محققین است؛ با این وجود، نباید تفاوت‌های بین و درون‌گونه‌ای را از نظر دور داشت (Mrnka et al., 2012). در واقع، انتخاب دقیق و مناسب ژنوتیپ‌ها و هیبریدهای گیاهی مقاوم به فلزات سنگین می‌تواند در کاهش صدمات ناشی از فلزات سنگین بر گیاه و موفقیت فرآیند گیاه‌پالایی نقش تعیین‌کننده‌ای ایفا نماید (GUet al., 2007; Lingua et al., 2008; Cheng, 2003).

REFERENCES

Arriagada, C.A., Herrera, M.A., Ocampo, J.A., 2005. Contribution of arbuscular mycorrhizal and saprobe fungi to the tolerance of *Eucalyptus globulus* to Pb. Water, Air, and Soil Pollution 166, 31-47.

Bagheri, R., Ghasemi, R., Calagari, M., Merrikh, F., 2012. Effect of different irrigation intervals on superior poplar clones yield. Iranian Journal of Forest and Poplar Research 20, 357-369. (in Persian).

Bitts'anszky, A., Gyulai, G., Gullner, G., Kiss, J., Szab'ó, Z., K'atay, G., Heszky, L., K'om'ives, T., 2009. In vitro breeding of grey poplar (*Populus × canescens*) for phytoremediation purposes. Journal of Chemical Technology and Biotechnology 84, 890-894.

Bojarczuk, K., Kieliszewska-Rokicka, B., 2010. Effect of ectomycorrhiza on Cu and Pb accumulation in leaves and roots of silver birch (*Betula pendula* Roth.) seedlings grown in metal-contaminated soil. Water, Air, and Soil Pollution

(al., 2009)، بنابراین نظر به اینکه در تحقیق حاضر در غلظت‌های بالای سرب کاهشی در درصد کلنیزاسیون میکوریزی ریشه و پارامترهای فیزیولوژیکی نهال‌های کلون ۶۲/۱۵۴ *P. nigra* مشاهده نشد، می‌توان گفت که تحت شرایط گلخانه این کلون مقاومت خوبی نسبت به تنش فلز سنگین سرب در غلظت‌های بررسی شده دارد. از این‌رو، این کلون به عنوان یک گونه پیشنهادی می‌تواند برای تحقیقات آتی گیاه‌پالایی خاک‌های آلوده به سرب، مورد توجه پژوهشگران قرار گیرد. شایان ذکر است که تلقیح با قارچ‌های میکوریزی تأثیری بر پارامترهای فیزیولوژی نهال‌ها و به تبع آن افزایش و یا کاهش مقاومت گیاه

207, 227-240.

Borghi, M., Tognetti, R., Monteforti, G., Sebastiani, L., 2008. Responses of two poplar species (*Populus alba* and *Populus x canadensis*) to high copper concentrations. Environmental and Experimental Botany 62, 290-299.

Chellappan, P., Anitha Christy, S.A., Mahadevan, A., 2002. Multiplication of arbuscular mycorrhizal fungi on roots, In: Mukerji, K.G., Manoharachary, C., Chaloma, B.P., (eds.), Techniques in mycorrhizal studies, Kluwer, Dordrecht, 285-297.

Cheng, sh., 2003. Effects of heavy metals on plants and resistance mechanisms. Environmental Science and Pollution Research 10, 256-264.

Cicatelli, A., Lingua, G., Todeschini, V., Biondi, S., Torrigiani, P., Castiglione, S., 2010. Arbuscular mycorrhizal fungi restore normal growth in a white poplar clone grown on heavy metal-contaminated soil, and this is associated with upregulation of foliar metallothionein and polyamine biosynthetic gene expression. Annals of Botany 106, 791-802.

Di Baccio, D., Tognetti, R., Sebastiani, L.,

- Vitagliano, C., 2003. Responses of *Populus deltoides* × *Populus nigra* (*Populus* × *euramericana*) clone I-214 to high zinc concentrations. *New Phytologist* 159, 443-452.
- Diagne, O., Ingleby, K., Deans, J.D., Lindley, D.K., Diaite, I., Neyra, M., 2001. Mycorrhizal inoculum potential of soils from alley cropping plots in Senegal. *Forest Ecology and Management* 146, 35-43.
- Fan, Y., Luan, Y., An, L., Yu, K., 2008. Arbuscular mycorrhizae formed by *Penicillium pinophilum* improve the growth, nutrient uptake and photosynthesis of strawberry with two inoculum-types. *Biotechnology Letters* 30, 1489-94.
- Gaur, A., Adholeya, A., 2004. Prospects of arbuscular mycorrhizal fungi in phytoremediation of heavy metal-contaminated soils. *Current Science* 86, 528-534.
- Giovannetti, M., Mosse, B., 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist* 84, 498-500.
- Gu, J., Qi, L., Jiang, W., Liu, D., 2007. Cadmium accumulation and its effects on growth and gas exchange in four *Populus* cultivars. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 49, 7-14.
- Han, S.H., Kim, D.H., Lee, J.Ch., 2011. Effects of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* and Cd on physiological properties and Cd uptake by hybrid poplar *Populus alba* × *glandulosa*. *Journal of Ecology and Field Biology* 34, 393-400.
- He, J., Ma, C., Ma, Y., Li, H., Kang, J., Liu, T., Polle, A., Peng, C., Luo, Z., 2013. Cadmium tolerance in six poplar species. *Environmental Science and Pollution Research* 20, 163-174.
- Huang, X.D., El-Alawi, Y., Penrose, D.M., Glick, B.R., Greenberg, B.M., 2004. Responses of three grass species to creosote during phytoremediation. *Environmental Pollution* 130, 453-463.
- Kabata-Pendias, A., 2004. Soil-plant transfer of trace elements-an environmental issue. *Geoderma* 122, 143-149.
- Kabata-Pendias, A., Pendias, H., 1992. Trace elements in soils and plants. Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Karlinski, L., Rudawska, M., Kieliszewska-Rokicka, B., Leski, T., 2010. Relationship between genotype and soil environment during colonization of poplar roots by mycorrhizal and endophytic fungi. *Mycorrhiza* 20, 315-324.
- Khasa, P.D., Chakravarty, P., Robertson, A., Thomas, B.R., Dancik, B.P., 2002. The mycorrhizal status of selected poplar clones introduced in Alberta. *Biomass and Bioenergy* 22, 99-104.
- Khodaverdiloo, H., Homaei, M., 2007. Modeling phytoremediation of Cd and Pb from contaminated soils using plant transpiration reduction functions. *Iranian Journal of Irrigation & Drainage* 1, 7-16. (in Persian).
- Kieffer, P., Planchon, S., Oufir, M., Ziebel, J., Dommes, J., Hoffmann, L., Hausman, J.F., Renaut, J., 2009. Combining proteomics and metabolite analyses to unravel cadmium stress-response in poplar leaves. *Journal of Proteome Research* 8, 400-417.
- Kramer, U., 2005. Phytoremediation: novel approaches to cleaning up polluted soils. *Current Opinion in Biotechnology* 16, 133-141.
- Lingua, G., Franchin, C., Todeschini, V., Castiglione, S., Biondi, S., Burlando, B., Parravicini, V., Torrigiani, P., Berta, G., 2008. Arbuscular mycorrhizal fungi differentially affect the response to high zinc concentrations of two registered poplar clones. *Environmental Pollution* 153, 137-147.
- McLaughlin, M.J., 2001. 'Bioavailability of metals to terrestrial plants', in H. E. Allen (ed.),

Bioavailability of Metals in Terrestrial Ecosystems. Importance of Partitioning for Bioavailability to Invertebrates, Microbes and Plants, SETAC Press, Pensacola, FL, pp. 39-68

Mrnka, L., Kuchár, M., Cieslarová, Z., Matějka, P., Száková, J., Tlustoš, P., Vosátka, M., 2012. Effects of endo- and ectomycorrhizal fungi on physiological parameters and heavy metals accumulation of two species from the family salicaceae. *Water, Air, and Soil Pollution* 223, 399-410.

Pajevic, S., Borisev, M., Nikolic, N., Krstic, B., Pilipovic, A., Orlovic, S., 2009. Phytoremediation capacity of poplar (*Populus* spp.) and willow (*Salix* spp.) clones in relation to photosynthesis. *Archives of Biological Sciences Belgrade* 61, 239-247.

Phillips, J.M., Hayman, D.S., 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society* 55, 158-161.

Pietrini, F., Iannelli, M.A., Pasqualini, S., Massacci, A., 2003. Interaction of cadmium with glutathione and photosynthesis in developing leaves and chloroplasts of *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud. *Plant Physiology* 133, 829-837.

Pilipovic, A., Orlovic, S., Nikolic, N., Borisev, M., Krstic, B., Roncevic, S., 2012. Growth and plant physiological parameters as markers for selection of poplar clones for crude oil phytoremediation. *Šumarski list* CXXXVI, 273-281.

Rafati, M., Khorasani, N., Moattar, F., Shirvany, A., Moraghebi, F., Hosseinzadeh, S., 2011. Phytoremediation potential of *Populus alba* and *Morus alba* for cadmium, chromium and nickel absorption from polluted soil. *International Journal of Environmental Research* 5, 961-970.

Rajni, G., Mukerji, K.G., 2002. Techniques for the

isolation of VAM/AM fungi in soil. In: Mukerji, K.G., Manoharachary, C. and Chaloma, B.P., (Eds.), *Techniques in mycorrhizal studies*, Kluwer Academic Publishers, London: 1-6.

Reid, C.P.P., Kidd, F.A., Ekwebelam, S.A., 1983. Nitrogen nutrition, photosynthesis and carbon allocation in ectomycorrhizal pine. *Plant and Soil* 71, 415-432.

Rodriguez, R., Redman, R., 2008. More than 400 million years of evolution and some plants still can't make it on their own: plant stress tolerance via fungal symbiosis. *Journal of Experimental Botany* 59, 1109-1114.

Susarla, S., Medina, V.F., McCutcheon, S.C., 2002. Phytoremediation: An ecological solution to organic chemical contamination. *Ecological Engineering* 18, 647-658.

Takačs, T., Radimsky, L., Ne'meth, T., 2005. The arbuscular mycorrhizal status of poplar clones selected for phytoremediation of soils contaminated with heavy metals. *Zeitschrift fuer Naturforschung Section C Journal of Biosciences* 60, 357-361.

Tang, M., 1998. The advance of VA fungi enhancing the resistance of plants to alkalinity and heavy metals. *Soil* 5, 251-254.

Turnau, K., 1998. Heavy metal content and localization in mycorrhizal *Euphorbia cyparissias* from zinc wastes in southern Poland. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 67, 105-113.

Utmazian, M.N.D., Wieshammer, G., Vega, R., Wenzel, W.W., 2007. Hydroponic screening for metal resistance and accumulation of cadmium and zinc in twenty clones of willows and poplars. *Environmental Pollution* 148, 155-165.

Wang, F.Y., Lin, X.G., Yin, R., 2007. Inoculation with arbuscular mycorrhizal fungus *Acaulospora mellea* decrease Cu phytoextraction by maize from Cu-contaminated soil. *Pedobiologia* 51, 99-109.

Zalesny, J.r. R.S., Bauer, E.O., Hall, R.B., Zalesny,

J.A., Kunzman, J., Rog, C.J., Riemenschneider, D.E., 2005. Clonal variation in survival and growth of hybrid poplar and willow in an in situ trial on soils heavily contaminated with petroleum hydrocarbons. International Journal of Phytoremediation 7, 177-197.

Zhang, X., Wu, N., Li, C., 2005. Physiological and growth responses of *Populus davidiana* ecotypes to

different soil water contents. Journal of Arid Environments 60, 567-579.

Zimmer, D., Baum, Ch., Leinweber, P., Hrynkiewicz, K., Meissner, R., 2009. Associated bacteria increase the phytoextraction of cadmium and zinc from metal contaminated soil by mycorrhizal willows. International Journal of Phytoremediation 11, 200-213.

Lead tolerance of *Populus nigra* in symbiosis with arbuscular mycorrhizal fungi in relation to physiological parameters

Azadeh Salehi¹, Masoud Tabari^{2*}, Ebrahim Mohammadi Goltapeh³,
Anoushirvan Shirvani⁴

¹Ph.D. Student of forestry, Faculty of Natural Resources and Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Iran

²Professor, Faculty of Natural Resources and Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Iran

³Professor, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Iran

⁴Assistant Professor, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Iran

Received: 16-Apr.-2014 Accepted: 06-Sep.-2014

Abstract

With the aim to examine lead tolerance of *Populus nigra* (clone 62/154) in symbiosis with arbuscular mycorrhizal fungi, a greenhouse experiment was carried out in a factorial randomized complete scheme with two factors 1) fungal inoculation in 4 levels (control, inoculation with *Glomus mosseae*, inoculation with *G. intraradices* and inoculation with *G. mosseae*+*G. intraradices*) and 2) lead in 4 levels (0, 100, 500 and 1000 mg kg⁻¹ soil). Mycorrhizal colonization and physiological parameters of plants were measured at the end of growth season. Results showed that at all Pb levels, the percentage of root mycorrhizal colonization in fungal treatments was significantly higher than that in control treatment (without fungal inoculation), however without significant differences between 3 fungal treatments. Pb treatments had no significant effect on root mycorrhizal colonization of *P. nigra* plants. Also, photosynthesis, stomatal conductance, transpiration, intercellular CO₂ concentration and water use efficiency of *P. nigra* plants had no significant inhibitory effects versus the control found under Pb and fungal treatments or their interaction. The results of present study demonstrated that fungal treatments had no significant effects on physiological parameters and Pb tolerance of *P. nigra* plants. While, in relation to mycorrhizal colonization and physiological parameters, *P. nigra* clone 62/154 showed a good tolerance to Pb stress. So, in further investigations of phytoremediation of lead-contaminated soils, this clone can be considered as a proposed species.

Keywords: Arbuscular mycorrhizal fungus, Lead, *P. nigra*, Physiological parameters, Phytoremediation