نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۳، شماره ۳، پاییز ۱۳۸۸، ص. ۴۴-۳۶

Journal of Water and Soil
Vol. 23, No. 3, Fall 2009, p. 36-44

تأثیر باکتری ریزوبیوم لگومینوراروم بیوار فازئولی بر جذب و افزایش تحمل به آرسنیک در گیاه لوبیا

امیر لکزیان*[۱]- اکرم حلاج نیا[۲]- مهدی نصیری محلاتی[۳]- فهیمه نیک بین[۴]

تاریخ دریافت: ۸۷/۸/۶
تاریخ پذیرش: ۸۷/۱۲/۱۹

چکیده

آلودگی خاک‌ها به آرسنیک، به یک مسئله جهانی تبدیل شده است. بقولات بدلیل توانایی تثبیت بیولوژیکی نیتروژن برای اصلاح مناطق آلوده استفاده می‌شوند. در این مطالعه تأثیر تلقیح لوبیا با باکتری ریزوبیوم لگومینوراروم بیوار فازئولی در جذب و افزایش تحمل گیاه به آرسنیک مورد مطالعه قرار گرفت. آزمایشی با آرایش فاکتوریل با دو سطح تلقیح و بدون تلقیح و پنج سطح آرسنیک (صفر، ۲/۵، ۵، ۷/۵ و ۱۰ میکرومولار) در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار بصورت کشت در شن در شرایط گلخانه‌ای انجام شد. نتایج نشان داد تلقیح لوبیا با باکتری همزیست آن تأثیر معنی داری بر وزن خشک اندام‌های هوایی داشت ولی تأثیر تلقیح بر وزن خشک ریشه و ارتفاع گیاه معنی دار نبود. وزن خشک اندام‌های هوایی لوبیا با افزایش غلظت آرسنیک کاهش معنی داری را نشان داد و کمترین وزن خشک اندام‌های هوایی در تیمارهای ۵، ۷/۵ و ۱۰ میکرومولار آرسنیک مشاهده شد. پاسخ ریشه و ارتفاع گیاه به غلظت‌های مختلف آرسنیک مشابه وزن خشک اندام‌های هوایی بود. کمترین تعدا گره در تیمار ۵ میکرومولار آرسنیک مشاهده شد و تیمارهای دیگر تأثیری بر تعداد گره‌های تشکیل شده برروی ریشه‌های لوبیا نداشتند. همچنین تلقیح لوبیا با باکتری ریزوبیوم لگومینوراروم بیوار فازئولی موجب افزایش معنی دار میزان آرسنیک جذب شده در اندام های هوایی گیاه شد. با افزایش غلظت آرسنیک در محیط کشت غلظت آن در اندام‌های هوایی افزایش پیدا کرد. کمترین تعداد گره و بیشترین غلظت آرسنیک در ریشه در تیمار ۵ میکرومولار آرسنیک مشاهده شد.

واژه‌های کلیدی : آرسنیک، کشت در شن، گره زایی، تلقیح

مقدمه

آرسنیک عنصری شبه فلزی است که بعنوان جزء فعال در بسیاری از آفت کش‌ها بکار می‌رود. این عنصر برای گیاه ضروری نیست و زمانی که در محلول خاک قرار گیرد بسهولت جذب ریشه گیاه می‌شود (۱). بنابراین با تجمع آرسنیک در بافت‌های گیاهی علائم سمیت در گیاهان ظاهر می‌شود. این عنصر سمی در بسیاری از ضایعات حاصل از فعالیت‌های انسان و همچنین در برخی مناطق ژئوشیمیایی خاص وجود دارد. استفاده مکرر از کودهای شیمیایی و آفت کش‌ها یکی از منابع اصلی ورود این عنصر به خاک است. آرسنات فرم معدنی غالب عنصر آرسنیک است که در خاک هایی با تهویه مناسب می‌تواند جذب ذرات خاک شود (۳). فرآیند معدنی شدن و فعالیت‌های میکروارگانیزم‌ها تحرک آرسنیک را در محیط افزایش می‌دهد. امروزه فعالیت‌های انسان نگرانی‌های زیادی را برای آلودگی آب، خاک و محصولات کشاورزی به آرسنیک در بسیاری از نقاط دنیا ایجاد کرده است (۶). درک صحیح و دقیق این موضوع که آرسنیک چگونه می‌تواند بر فرایندهای بیوشیمیایی خاک تأثیر بگذارد از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

یکی از مهمترین چرخه‌های بیوشیمیایی خاک همزیستی باکتری‌های ریزوبیوم با بقولات است که در اکوسیستم‌های کشاورزی و اکوسیستم‌های طبیعی دارای اهمیت زیادی است. امروزه توجه محققان به استفاده از بقولات و میکروارگانیزم‌های همزیست آنها برای اصلاح زیستی اراضی آلوده به فلزات سنگین و همچنین دیگر آلاینده‌های آلی معطوف شده است (۴). از آنجائی که همزیستی بقولات با باکتری‌های ریزوبیوم امکان رشد گیاهان را بدون عرضه کودهای نیتروژن فراهم می‌کند لذا رابطه همزیستی از نظر اصلاح اراضی آلوده دارای چند مزیت است. اولاً میکروارگانیزم‌ها می‌توانند بر

۱- دانشیار گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(* - نویسنده مسئول: Email: alakzian@yahoo.com)
۲و۴- به ترتیب کارشناس ارشد و کارشناس گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۳- استاد گروه زراعت، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

روی حلالیت و زیست فراهمی فلزات و حرکت آنها در خاک بسیار تأثیر گذار باشند. ثانیاً بقولات به راحتی در اراضی غیر حاصلخیز مستقر می‌شوند و بهمین خاطر در مطالعات و تحقیقات گیاه پالایی مورد توجه قرار گرفته اند. ثالثاً محققان به این نتیجه رسیده اند که در تجزیه آلاینده‌ها ترکیب دو روش گیاه پالایی[1] و افزودن مواد زیستی[2] در مقایسه با بکارگیری هر کدام از روشها مفیدتر بوده است (۹). به همین دلایل توجه بسیاری از محققان به همزیستی بقولات و باکتری‌های ریزوبیوم برای رفع آلودگیهای زیست محیطی جلب شده است. بنابراین اولین سوالی که در این باره مطرح می‌شود این است که همزیستی بقولات که برای گیاه پالایی استفاده می‌شوند چگونه تحت تأثیر آلاینده قرار می‌گیرد؟ آیا تلقیح بقولات یا همزیستی با گونه هایی که قادر به تشکیل گره و تثبیت نیتروژن هستند در افزایش تحمل گیاه به آلاینده تأثیر دارد؟ در ایران هیچگونه اطلاعاتی در این رابطه گزارش نشده است. شاید بتوان گفت که گزارش ریچمن (۱۰) تنها گزارش مربوط به تأثیر آرسنیک بر روی گیاه سویا بوده است. در این تحقیق تأثیر تلقیح گیاه لوبیا با باکتری همزیست آن *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* و نقش آن در جذب آرسنیک در غلظت‌های مختلف به صورت کشت در شن[3] مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

به منظور بررسی اثرات تلقیح لوبیا با باکتری ریزوبیوم لگومینوراروم بیوار فازئولی درجذب آرسنیک، یک آزمایش با آرایش فاکتوریل شامل دو سطح تلقیح (گیاهان بدون تلقیح و گیاهان تلقیح شده با باکتری همزیست) و پنج سطح آرسنیک (غلظت صفر، ۲/۵، ۵، ۷/۵، و ۱۰ میکرو مولار) در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار در شرایط گلخانه تحقیقاتی به صورت کشت در شن انجام گردید. بذور لوبیا قرمز رقم ناز با استفاده از محلول ۳ درصد هیپو کلریت سدیم به مدت ۱۰ دقیقه ضد عفونی و سپس بذور شش مرتبه با آب مقطر استریل شستشو شدند تا هیپو کلریت سدیم باقیمانده کاملا از سطوح بذور خارج شود. سپس بذور به مدت ۲۴ ساعت در آب مقطر سترون خیسانده شدند و پس از آن بذرها به گلدان هایی با قطر ۱۱ و ارتفاع ۸/۵ سانتیمتر حاوی ۶۰۰ گرم شن استریل منتقل گردیدند. در ابتدا سه بذر در هر گلدان قرار داده شد ولی بعد از جوانه زدن و خروج گیاهچه فقط یک گیاه باقی گذاشته شد. باکتری ریزوبیوم لگومینوراروم بیوار فازئولی از مرکز تحقیقات خاک و آب تهران تهیه و قبل از شروع آزمایش امکان تشکیل گره و ایجاد همزیستی با لوبیا رقم مورد نظر در یک آزمایش جداگانه تایید شد. گیاهان در شرایط طول روز ۱۴ ساعت و دمای ۲۵ درجه و طول شب ۱۰ ساعت و دمای ۱۷ درجه سانتی گراد در گلخانه نگهداری شدند و در طی دوره آزمایش طی چند مرحله با محلول غذایی فاقد نیتروژن آبیاری شدند. بمنظور تهیه غلظت‌های مختلف آرسنیک از نمک Na_2HAsO_4 استفاده شد. غلظت‌های آرسنیک در طی دو مرحله در روزهای ۱۰ و ۱۴ روز پس از زمان ظهور گیاهچه‌ها به گلدان‌ها به همراه آب آبیاری اضافه شدند. تلقیح گیاهان در تیمارهای تلقیح دو بار در روزهای ۱۱ و ۱۵ روز پس از انتقال گیاهچه‌ها به گلدان‌های حاوی شن و با ۲ میلی لیتر از سوسپانسیون باکتری با جمعیت 10^{10} در هر میلی لیتر انجام شد. گیاهان ۴۰ روز بعد از تلقیح نهایی برداشت گردیدند. بعد از برداشت ابتدا ریشه‌ها کاملا با آب مقطر شستشو داده شدند و سپس طول اندام‌های هوایی اندازه گیری شد. ریشه و اندام‌های هوایی هر یک از گیاهان در پاکتهای کاغذی جداگانه قرار داده شدند و به آزمایشگاه منتقل گردیدند. در آزمایشگاه گره‌های ریشه ابتدا جدا و تعداد آنها شمارش و سپس توزین شدند. ریشه‌ها به همراه گره‌ها و اندام‌های هوایی در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت در آون خشک و توزین شدند. جهت تعیین غلظت آرسنیک در بافت‌های گیاهی، اندام‌های هوایی و ریشه‌ها بطور جداگانه آسیاب و از الک ۰/۵ میلی متری عبور داده شدند. وزن مشخصی از نمونه‌های آسیاب شده با استفاده از اسید نیتریک و اسید پرکلریک هضم و سپس مقدار آرسنیک در نمونه‌های هضم شده با استفاده از کوره گرافیتی مدل Shimadzu-GFA-4A اندازه گیری شد.

نتایج حاصل از آزمایش با استفاده از نرم افزار آماری MSTATC آنالیز و میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن مقایسه گردیدند و سطح معنی داری در کلیه مقایسه‌ها با توجه به جداول آنالیز واریانس (جدول ۱) ۰/۰۱ در نظر گرفته شد .

نتایج و بحث

نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که تلقیح بر وزن خشک ریشه تأثیر معنی دار نداشت. ارتفاع گیاه نیز در غلظت‌های مختلف آرسنیک از نظر آماری تحت تأثیر تلقیح باکتری ریزوبیوم لگومینوراروم بیوار فازئولی قرار نگرفتند و با تیمارهای تلقیح نشده تفاوت معنی داری نداشتند (جدول ۱). میانگین وزن خشک ریشه در تیمارهای تلقیح شده لوبیا با باکتری ریزوبیوم لگومینوراروم بیوار فازئولی؛ ۰/۳۸ گرم و در تیمار تلقیح نشده ۰/۳۷ گرم بود. ارتفاع گیاه در تیمار تلقیح نشده ۱۸/۸ و در تیمارهای تلقیح شده ۲۰/۲ سانتیمتر بود. تلقیح تأثیر معنی داری بر وزن خشک اندام‌های هوایی داشت (شکل ۱).

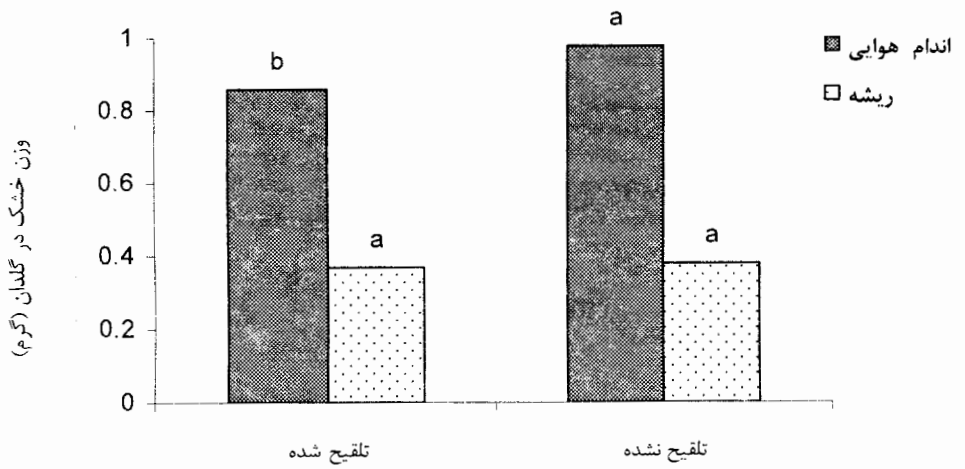
ریچمن (۱۰) گزارش کرد که وزن خشک اندام‌های هوایی گیاهان سویای تلقیح شده با باکتری بردی ریزوبیوم (باکتری همزیست سویا) ۳۸ ٪ بیشتر از گیاهان تلقیح شده بود. نتایج حاصل از این آزمایش با یافته‌های ریچمن مطابقت دارد هرچند که میزان افزایش وزن خشک در لوبیا به اندازه گیاه سویا نبود. احتمالا این تفاوت به زمان جمع آوری نمونه‌ها و بیوماس متفاوت سویا و لوبیا مربوط می‌شود.

1- Phytoremediation
2- Bioagumentation
3- Sand culture

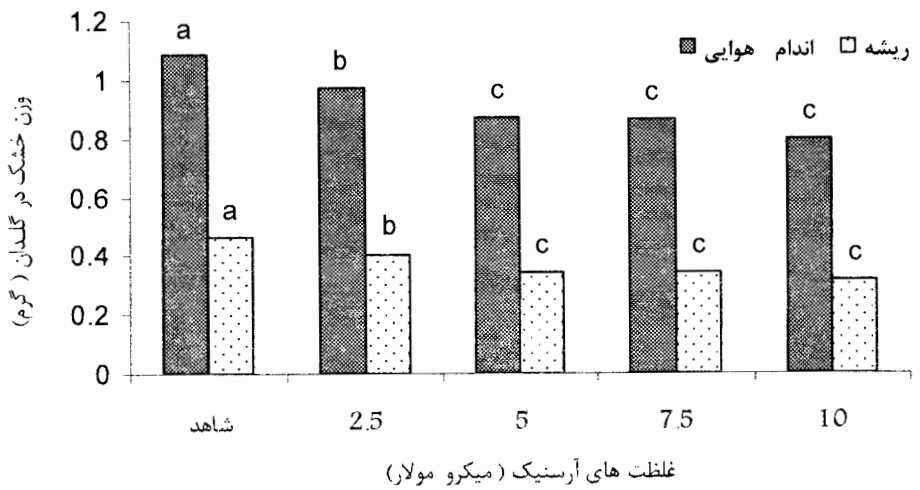
(جدول۱)- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) صفات اندازه گیری شده در لوبیا

منابع تغییر	درجه آزادی	وزن خشک اندام هوایی (گرم)	وزن خشک ریشه (گرم)	طول اندام هوایی (cm)	غلظت آرسنیک $mg.kg^{-1}$ اندام هوایی	غلظت آرسنیک $mg.kg^{-1}$ ریشه	غلظت آرسنیک $mg.pot^{-1}$ اندام هوایی	غلظت آرسنیک $mg.pot^{-1}$ ریشه
تلقیح	۱	۰/۱۰۲**	۰/۰۰۰ns	۱۴/۷**	۰۰/۳۲۲**	۰/۰۳ns	۰/۴۴**	۰/۰۰۳ns
آرسنیک	۴	۰/۰۷۷**	۰/۰۲۰**	۱۵۵/۴**	۰/۷۹۵**	۱۰/۹**	۰/۵۱**	۱/۳۰۹**
اثرمتقابل	۴	۰/۰۲۲**	۰/۰۱۰**	۳/۳ns	۰/۰۲۵**	۰/۳۴**	۰/۰۵**	۰/۱۸۲**
خطا	۲۰	۰/۰۰۲	۰/۰۰۲	۱/۷	۰/۰۰۱	۰/۰۰۷	۰/۰۰۱	۰/۰۰۳
		وزن مرطوب گره	تعداد گره					
غلظت‌های آرسنیک	۴	۰/۰۲۷**	۵۱۸/۵**					
خطا	۱۰	۰/۰۰۱	۸/۵۵۰					

** معنی داری در سطح ۰/۰۱



(شکل ۱)- میانگین وزن خشک اندام‌های هوایی و ریشه لوبیا در تیمارهای تلقیح شده و بدون تلقیح



(شکل ۲)- میانگین وزن خشک اندام‌های هوایی و ریشه لوبیا در غلظت‌های مختلف آرسنیک

نتایج حاصل از تأثیر غلظت‌های مختلف آرسنیک بر روی وزن خشک اندام‌های هوایی، ریشه و ارتفاع گیاه لوبیا نشان داد که اختلاف معنی داری در بین تیمارهای آزمایش وجود دارد. بیشترین وزن خشک اندام هوایی در تیمار شاهد بدون آرسنیک مشاهده شد (شکل ۲) سپس با افزایش غلظت آرسنیک وزن خشک اندام هوایی تا غلظت ۵ میکرو مولار آرسنیک کاهش یافت. اگر چه تغییرات وزن خشک اندام‌های هوایی لوبیا در غلظت‌های ۵، ۷/۵ و ۱۰ میکرومولار آرسنیک تفاوت معنی داری با هم نداشتند اما وزن خشک اندام‌های هوایی در این تیمارها در مقایسه با تیمار شاهد و تیمار ۲/۵ میکرو مولار آرسنیک کاهش معنی داری را نشان دادند.

کاهش وزن خشک ریشه و اندام‌های هوایی گیاهان سویای تلقیح شده با بردی ریزوبیوم ژاپنیکوم در غلظت‌های مختلف آرسنیک توسط ریچمن (۱۰) نیز گزارش شده است. مطالعات مختلف نشان می‌دهد که عکس العمل رشدی گیاهان به غلظت‌های مختلف آرسنیک متفاوت است. اگر چه در مطالعه حاضر کاهش وزن اندام‌های هوایی از غلظت ۲/۵ میکرو مولار آرسنیک شروع شد (شکل ۲)، در تحقیقی که توسط استوا و همکاران (۱۱) انجام شد کاهش رشد در گیاه لوبیا در غلظت ۶۷ میکرو مولار آرسنیک گزارش شده است. در مطالعه بارلو وهمکاران (۲) حتی در غلظت ۶۷ میکرومولار آرسنیک هم کاهش رشد در گیاه گوجه فرنگی دیده نشد. بجز تفاوت رفتاری ناشی از گونه گیاهی یکی از دلایلی که ریچمن (۱۰) در پاسخ‌های متفاوت گیاهان حتی در بین گونه‌ها در مطالعات مختلف ذکر کرده است غلظت‌های مختلف محلول غذایی مورد استفاده بوده است. بویژه غلظت‌های بالای فسفر در محلول غذایی می‌تواند جذب آرسنیک توسط گیاه را تحت تأثیر قرار دهد. از این جهت شرایط کشت نیز کاملا می‌تواند بر مقدار جذب آرسنیک توسط گیاه موثر باشد. جذب غلظت‌های بالای آرسنیک توسط گیاه عمدتاً در شرایط کشت آبی دیده می‌شود که آرسنیک به سهولت در اختیار گیاه قرار می‌گیرد در حالی که کشت در شن می‌تواند روی جذب آرسنیک توسط گیاه تأثیرگذار باشد. تغییرات وزن خشک ریشه لوبیا و ارتفاع آن در غلظت‌های مختلف آرسنیک مشابه تغییرات وزن خشک اندام‌های هوایی بود. بیشترین وزن خشک ریشه و ارتفاع گیاه در تیمار شاهد و کمترین آنها در تیمارهای ۵ میکرو مولار آرسنیک و غلظت‌های بالاتر مشاهده شد.

نتایج حاصل از تأثیر تلقیح بر گیاه لوبیا نشان داد که گیاهان تلقیح شده همگی دارای گره بودند. نتایج مطالعه‌ای که بر روی خصوصیات همزیستی باکتری‌های ریزوبیوم جدا شده از مناطق معدن پیریت در اسپانیا انجام شد، نشان داد که تنوع ژنتیکی بسیار زیادی در بین جدایه‌های ریزوبیوم از نقطه نظر خصوصیات همزیستی وجود دارد و حتی در شرایط آلودگی بالا بسیاری از جدایه‌ها از نقطه نظر تثبیت بیولوژیکی نتروژن کاملا موثر بودند (۴). گیاهان بدون تلقیح هیچکدام دارای گره نبودند که این نتایج گویای حفظ شرایط سترون در کل آزمایش و عدم آلودگی‌های شرایط محیطی در هنگام آزمایش در شرایط گلخانه بوده است.

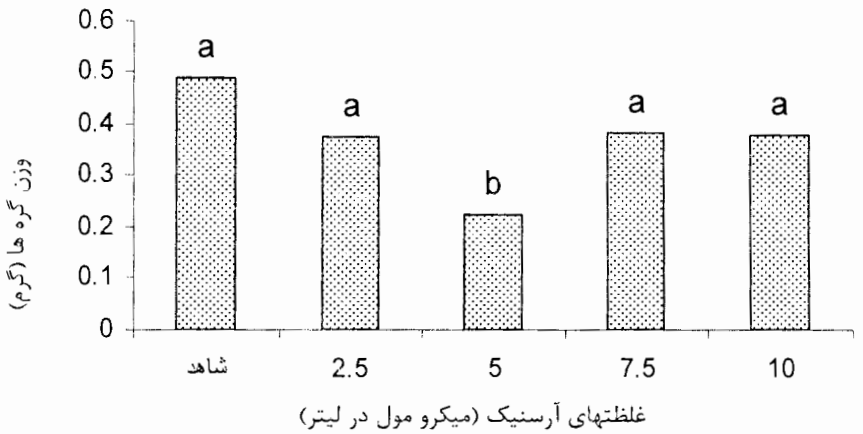
تأثیر غلظت‌های مختلف آرسنیک بر روی تعداد و وزن گره‌های ایجاد شده بر روی ریشه لوبیا نشان داد که با افزایش غلظت آرسنیک هم تعداد گره و هم وزن گره تا غلظت ۵ میکرومولار در لیتر کاهش یافت. اگر چه این کاهش فقط در تیمار ۵ میکرو مولار بر لیتر از نظر آماری معنی دار بود (شکل ۳). تعداد گره و وزن گره در تیمارهای ۷/۵ و ۱۰ میکرو مولار آرسنیک با شاهد اختلاف معنی داری نداشتند. کاراسکو (۴) در مطالعه تأثیر همزیستی باکتری سینوریزوبیوم با گیاه یونجه در جذب آرسنیک گزارش کرد که حضور آرسنیک موجب کاهش تعداد گره‌ها شد ولی آرسنیک بر روی فعالیت نیتروژناز (آنزیم درگیر در فرآیند تثبیت بیولوژیکی نیتروژن) تأثیری نداشت. در مطالعه‌ای که توسط پاجیلو و همکاران (۹) بر روی تأثیر آرسنیک بر روی فرایند همزیستی انجام شده بود ۲۵ درصد کاهش در تعداد گره‌ها در غلظت ۳۵ میکرومولار آرسنات سدیم گزارش شد. آنها همچنین گزارش کردند که میزان آلودگی ریزوبیومی[1] ۹۰ درصدکاهش داشته است که این کاهش را ناشی از صدمه ریشه‌ها و نکروزه و کاهش سطح مناسب برای نفوذ باکتری‌ها دانسته اند.

تلقیح لوبیا با باکتری ریزوبیوم لگومینوراروم بیوار فازئولی بر میزان جذب آرسنیک در اندام‌های هوایی تأثیر معنی دار داشت. میانگین میزان آرسنیک در تیمارهای تلقیح نشده و تلقیح شده به ترتیب از ۰/۳۱ و ۰/۵۲ میکروگرم بر گرم بود (شکل ۴). بنابراین به نظر می‌رسد که تلقیح می‌تواند بر جذب بیشتر آرسنیک تأثیر داشته باشد. علاوه بر این افزایش وزن خشک اندام‌های هوایی در تیمارهای تلقیح شده (شکل ۱) به همراه افزایش غلظت آرسنیک در این اندام‌ها می‌تواند از نظر گیاه پالایی مورد توجه قرار گیرد (۸).

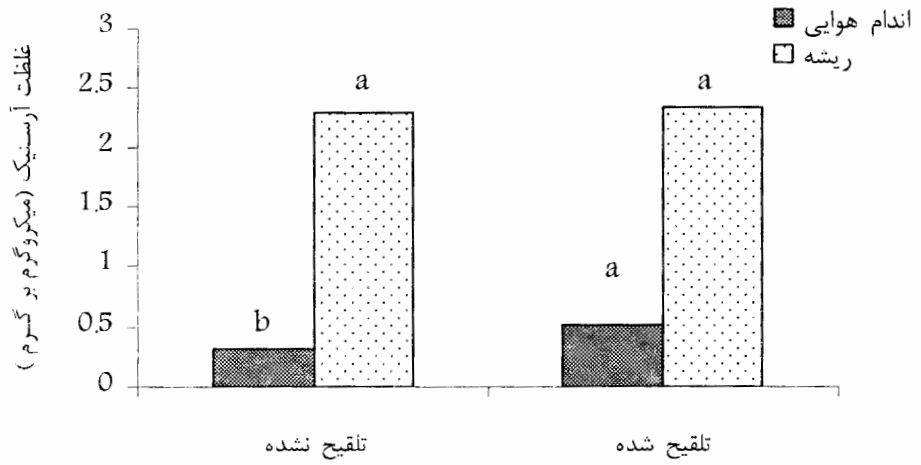
اخیراً همزیستی لگوم - ریزوبیوم به عنوان یک ابزار جالب توجه در زیست پالایی پیشنهاد شده است. دلایل این پیشنهاد به نقش موثر میکروارگانیزم‌ها در حلالیت، زیست فراهمی و تحرک عناصر و همچنین به توان تطبیقی بالای بقولات به شرایط مختلف و نامساعد و استفاده از رابطه مفید همزیستی بعنوان یک سیستم ارزشمند در حاصلخیزی خاک مربوط می‌شود.

نتایج حاصل از تجزیه شیمیایی ریشه‌ها نشان داد که تلقیح لوبیا با باکتری ریزوبیوم لگومینوراروم بیوار فازئولی تأثیر معنی دار بر غلظت آرسنیک در ریشه نداشت و میانگین غلظت آرسنیک در تیمارهای تلقیح شده و بدون تلقیح به ترتیب ۲/۳۵ و ۲/۲۹ بود. میزان تجمع آرسنیک در ریشه به طور متوسط ۵/۶ برابر تجمع آن در اندام‌های هوایی بود. در مطالعه ریچمن (۱۰) مقدار تجمع آرسنیک در ریشه‌های سویا ۱۰۰ برابر آن در اندام‌های هوایی بود.

1- Rhizobia infection



(شکل ۳)- میانگین وزن مرطوب گره در ریشه لوبیا در غلظت‌های مختلف آرسنیک



(شکل ٤)- میانگین غلظت آرسنیک در اندام‌های هوایی و ریشه لوبیا در تیمارهای تلقیح شده و بدون تلقیح

درمطالعه ریچمن کشت در محیط آبی (هیدروپونیک) انجام شده بود که معمولا جذب از محلول می‌تواند با به‌سهولت بیشتری انجام شود. در آن مطالعه اختلاف معنی دار بین غلظت آرسنیک در ریشه و اندام‌های هوایی در گیاهان تلقیح شده و بدون تلقیح وجود نداشت. نتایج مطالعه پاجیلو و همکاران (۹) که با هدف تأثیر همزیستی باکتری سینوریزوبیوم با گیاه یونجه بر جذب آرسنیک انجام شده بود نشان داد که مقدار آرسنیک در اندام‌های هوایی فقط ۱۰ درصد مقدار آن در ریشه بود. این محققان بقولات را به طور مشخص جمع کننده عناصر در ریشه معرفی کردند و امکان استفاده از بقولات را در تثبیت فلزات بکمک گیاهان (Phytostabilization) در برابر آبشویی و فرسایش مطرح کردند.

نتایج مشابه در مطالعه چن و همکاران (۵) در بررسی تأثیر همزیستی لگوم- ریزوبیوم در جذب دیگر عناصر سنگین شامل کادمیوم ، سرب و مس بدست آمد. در این مطالعه به نقش موثر گره‌ها در حفاظت گیاه در غلظت‌های بالای یون‌های فلزی و دیگر آلوده‌کننده‌های محلول اشاره شده است. مقاومت بیشتر گیاهان همزیست به فرآیند چند مرحله‌ای جذب در حضور گره‌ها ارتباط داده شده است به طوری که فلزات سنگین به ناچار در ابتدا توسط ریشه‌ها و گره‌ها جذب شده به اندام‌های هوایی منتقل می‌شوند. تشکیل گره به طور مشخص جذب عناصر سنگین را در این مطالعه افزایش داد که علت آن می‌تواند به دنبال تغییرات فیزیولوژیکی خاصی باشد که در طی تشکیل باکتروئید در سلول‌های گره‌ها رخ می‌دهد. از طرف دیگر آزادسازی برخی ترشحات برون سلولی مانند پلی ساکاریدها در طی تشکیل گره می‌تواند برجذب این فلزات موثر باشد. تجمع زیاد عناصر سنگین در ریشه و گره‌ها سهم ظرفیت تجمع را در اندام‌های هوایی کاهش داده و موجب مقاومت بیشتر گیاه می‌گردد.

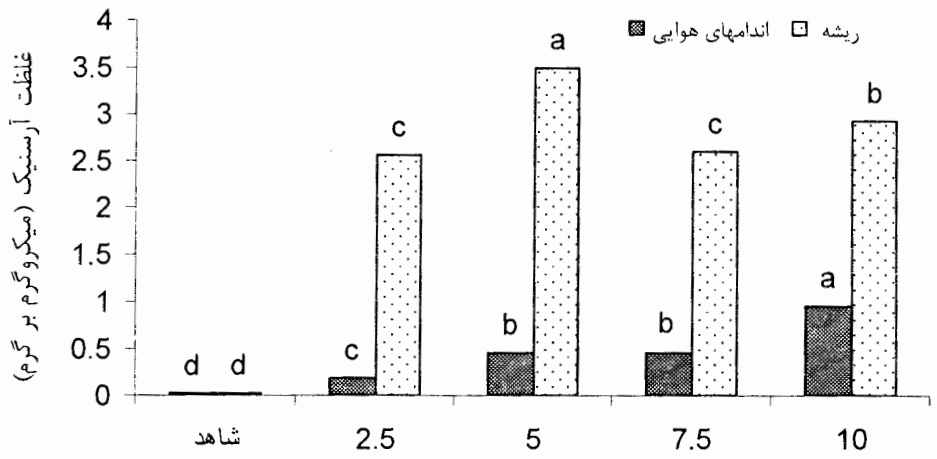
نتایج حاصل از تأثیر غلظت‌های مختلف آرسنیک بر روی میزان جذب آرسنیک در اندام‌های هوایی نشان داد که با افزایش غلظت آرسنیک در تیمارهای آزمایش مقدار جذب آن در اندام‌های هوایی افزایش یافته است (شکل ۵). بیشترین میزان جذب در تیمار ۱۰میکرومولار آرسنیک و کمترین مقدار جذب در تیمار شاهده وجود داشت. میزان جذب آرسنیک در تیمارهای ۵ و ۷/۵ میکرو مولار اختلاف معنی داری نداشتند. در آزمایشی که توسط منچ و همکاران (۷) در اصلاح خاک‌های آلوده به آرسنیک انجام شد دامنه تغییرات آرسنیک در اندام‌های هوایی گیاه لوبیا بین ۰/۳۸ تا ۱/۰۴ میکروگرم بر گرم گزارش شد که با مقادیر بدست آمده در این آزمایش مطابقت دارد.

روند تغییرات غلظت آرسنیک در ریشه لوبیا در تیمارهای مختلف آرسنیک در مقایسه با اندام‌های هوایی کاملا متفاوت بود. در ریشه بیشترین مقدار آرسنیک در تیمار ۵ میکرومولار آرسنیک و کمترین مقدار در تیمار شاهد وجود داشت. میزان آرسنیک در ریشه لوبیا در تیمارهای ۲/۵ و۷/۵ از نظر آماری اختلاف معنی داری نداشتند (شکل ۵).

جدول ۲ اثرات متقابل تلقیح لوبیا با باکتری ریزوبیوم لگومینوزاروم بیوار فازئولی و غلظت‌های مختلف آرسنیک را بر ارتفاع، وزن خشک اندام هوایی، غلظت آرسنیک در اندامهای هوایی و میزان جذب کل آرسنیک توسط اندامهای هوایی گیاه لوبیا را نشان می‌دهد. نکته قابل توجه و حائز اهمیت در این جدول معنی دار بودن اثر تلقیح بر روی غلظت آرسنیک در اندامهای هوایی و جذب کل آرسنیک در غلظت‌های مختلف آرسنیک است. تلقیح لوبیا با باکتری ریزوبیوم لگومینوزاروم بیوار فازئولی میزان آرسنیک را در اندامهای هوایی لوبیا و میزان کل جذب آرسنیک را تا دو برابر تیمار تلقیح نشده در همان غلظت افزایش داده است. این نتایج می‌تواند از نقطه نظر گیاه پالایی آرسنیک توسط بقولات قابل توجه باشد. جدول ۳ نیز اثرات متقابل تلقیح لوبیا با باکتری ریزوبیوم لگومینوزاروم بیوار فازئولی و غلظت‌های مختلف آرسنیک را بر وزن خشک ریشه، غلظت آرسنیک در ریشه و جذب کل آرسنیک توسط ریشه گیاه لوبیا را نشان می‌دهد. با مقایسه اطلاعات حاصله از تغییرات میزان آرسنیک در ریشه و تغییرات تعداد گره در تیمارهای مختلف آرسنیک (جدول ۲) به نظر می‌رسد که غلظت آرسنیک در ریشه متاثر از تعداد گره نبوده است بجز این که در تیمار ۵ میکرومولار که دارای کمترین تعداد گره بود بیشترین غلظت آرسنیک مشاهده شد. جالب توجه آنکه تا غلظت ۵ میکرومولار، غلظت آرسنیک در ریشه در گیاهان تلقیح شده بیشتر از گیاهان تلقیح نشده بود و از غلظت ۵ میکرو مولار به بعد عکس این حالت مشاهده شد به طوری که در گیاهان بدون تلقیح غلظت آرسنیک بیشتر از گیاهان تلقیح شده بود. به نظر می‌رسد که غلظتهای ۷/۵ و ۱۰ میکرو مولار آرسنیک سبب بروز سمیت در گیاه و کاهش رشد ریشه شده است به طوری که کمترین وزن خشک ریشه در این تیمارها گواه صحت این ادعا است.

نتیجه گیری

نتایج حاصل از این آزمایش نشان داده شد که تلقیح لوبیا با باکتری ریزوبیوم لگومینوراروم بیوار فازئولی و ایجاد همزیستی تأثیر معنی داری بر وزن خشک ریشه و ارتفاع گیاه در غلظت‌های مختلف آرسنیک نداشت در حالی که موجب افزایش وزن خشک اندام‌های هوایی گردید. علاوه بر این غلظت آرسنیک در اندام‌های هوایی در تیمارهای تلقیح شده بیشتر از تیمارهای تلقیح نشده بود. افزایش وزن خشک اندام‌های هوایی در تیمارهای تلقیح شده به همراه افزایش غلظت آرسنیک در اندام‌های هوایی این تیمارها می‌تواند نمایانگر این موضوع باشد که احتمالا با ایجاد همزیستی تا حدودی اثرات منفی حاصل از سمیت آرسنیک کاهش و یا به عبارت دیگر مقاومت گیاه افزایش پیدا کرده است. با افزایش غلظت آرسنیک وزن خشک ریشه و اندام‌های هوایی و همچنین ارتفاع گیاه در همه تیمارها تا غلظت ۵ میکرومولار آرسنیک کاهش پیدا کرد و از آن به بعد با افزایش غلظت تأثیر معنی داری در کاهش این پارامترها در مقایسه با تیمار ۵ میکرومولار مشاهده نگردید. جالب توجه این که تنها در همین غلظت یعنی غلظت ۵ میکرومولار تعداد و وزن گره‌ها اختلاف معنی داری با سایر غلظت‌ها داشت و کمترین تعداد و وزن گره در این تیمار مشاهده شد. از طرف دیگر غلظت آرسنیک در ریشه در این تیمار بیشترین مقدار بود.



(شکل ۵)- میانگین غلظت آرسنیک در اندام‌های هوایی و ریشه لوبیا در تیمارهای مختلف آرسنیک

(جدول ۲)- اثرات متقابل تلقیح لوبیا با باکتری ریزوبیوم لگومینوزاروم بیوار فازئولی و غلظت‌های مختلف آرسنیک بر ارتفاع، وزن خشک اندام‌های هوایی و غلظت آرسنیک در اندام‌های هوایی

ارتفاع گیاه (سانتی متر)		وزن خشک اندام های هوایی (گرم)		غلظت آرسنیک در اندام های هوایی (میکرو گرم بر گرم)		آرسنیک جذب شده در اندام‌های هوایی (میکرو گرم بر گلدان)	
غلظت آرسنیک میکرومولار	تلقیح	بدون تلقیح	تلقیح	بدون تلقیح	تلقیح	بدون تلقیح	تلقیح	بدون تلقیح
صفر	۲۸/۰ a	۲۶/۰ab	۱/۰۹۷a	۱/۰۸a	Nd	Nd	Nd	Nd
۲/۵	۲۴/۰ bc	۲۱/۰c	۱/۱۰۹a	۰/۸۴۴b	۰/۳۰۱d	۰/۰۶۹e	۰/۳۳۴c	۰/۰۵۸d
۵	۱۷/۰d	۱۵/۰d	۰/۹۱۱b	۰/۸۲۹b	۰/۵۸۲c	۰/۳۴۶d	۰/۵۳۱b	۰/۲۸۷c
۷/۵	۱۷/۵d	۱۶/۰d	۰/۸۶۳b	۰/۸۶۶b	۰/۵۶۶c	۰/۳۵۱d	۰/۴۸۸b	۰/۳۰۴c
۱۰	۱۴/۵d	۱۵/۵d	۰/۹۱۲b	۰/۶۸۵c	۱/۱۴۰a	۰/۷۸۵b	۱/۰۴۰a	۰/۵۳۸b

Nd: تشخیص داده نشد

(جدول ۳)- اثرات متقابل تلقیح لوبیا با باکتری ریزوبیوم لگومینوزاروم بیوار فازئولی و غلظت‌های مختلف آرسنیک بر تعداد و وزن گره، وزن خشک ریشه و غلظت آرسنیک در ریشه

گیاهان تلقیح شده		وزن خشک ریشه (گرم)		غلظت آرسنیک در ریشه (میکرو گرم بر گرم)		آرسنیک جذب شده در ریشه (میکرو گرم بر گلدان)	
غلظت آرسنیک میکرومولار	تعداد گره	تلقیح	بدون تلقیح	تلقیح	بدون تلقیح	تلقیح	بدون تلقیح
صفر	۵۶a	۰/۴۸۳a	۰/۴۳۶ab	Nd	Nd	Nd	Nd
۲/۵	۵۴a	۰/۴۳۵ab	۰/۳۷۰bcd	۲/۸۳۴c	۲/۳۰۳d	۱/۲۳۱ab	۰/۸۵۲d
۵	۲۸b	۰/۳۳۹cde	۰/۳۴۴cde	۳/۷۷۳a	۳/۲۱۱b	۱/۲۷۴a	۱/۱۰۵bc
۷/۵	۵۸a	۰/۲۸۰e	۰/۳۲۳abc	۲/۳۴۴d	۲/۸۴۵c	۰/۶۲۵e	۱/۱۷۹ab
۱۰	۵۹a	۰/۳۱۵de	۰/۳۱۶de	۲/۷۸۹c	۳/۰۸۸b	۰/۸۷۹d	۰/۹۷۷cd

Nd: تشخیص داده نشد

منابع

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

2- Burlo F., Guijarro I., Carbonell-Barrachina A.A., Valero D., and Martinez-Sanchez F. 1999. Arsenic species: Effects on and accumulation by tomato plants. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47:1247–1253.

3- Campos V., and Faustino Pires M.A. 2004. Phytoremoval of arsenic from soil. Communication in Soil Science and Plant Analysis, 35:2137–2146.

4- Carrasco J.A., Armario P., Pajuelo E., Burgos A., Caviedes M.A., Lo´pez R., Chamber M.A., and Palomares A.J. 2005. Isolation and characterization of symbiotically effective *Rhizobium* resistant to arsenic and heavy metals after the toxic spill at the Aznalco´llar pyrite mine. Soil Biology and Biochemistry, 37:1131-1140.

5- Chen W.M., Wu C.H., James E.K. and Chang J.S. 2008. Metal biosorption capability of *Cupriavidus taiwanensis* and its effects on heavy metal removal by nodulated *Mimosa pudica*. Journal of Hazardous Materials, 151:364-371.

6- Duker A.A., Carranza E.J. and Hale M. 2005. Arsenic geochemistry and health. Environmental International, 31:631-641.

7- Mench M., Vangronsveld J., Beckx C., and Ruttens A. 2006. Progress in assisted natural remediation of an arsenic contaminated agricultural soil. Environmental Pollution, 44:51- 61.

8- Pajuelo E., Carrasco J.A., Romero L.C., Chamber M.A., and Gotor C. 2007. Evaluation of the metal phytoextraction potential of crop legumes. Regulation of the expression of O-acetylserine (thiol) lyase under metal stress. Plant Biology, 9:672-681.

9- Pajuelo E., Rodrı´guez-Llorente I.D., Dary M., and Palomares A.J. 2008. Toxic effects of arsenic on *Sinorhizobium Medicago sativa* symbiotic interaction. Environmental Pollution, 154:203-211.

10-Reichman S.M. 2007. The potential use of the legume-*rhizobium* symbiosis for the remediation of arsenic contaminated sites. Soil Biology and Biochemistry, 39:2587–2593.

11-Stoeva N., Berova M., and Zlatev Z., 2005. Effect of arsenic on some physiological parameters in bean plants. Biologia Plantarum, 49:293–296.