نشریه دانش آب و خاک/ جلد 22 شماره 1/ سال 1391

اثر قارچ‌های میکوریز آربوسکولار بر گیاه‌پالایی سرب توسط سورگوم (*Sorghum bicolor* L.)

ستاره امانی‌فر[1*]، ناصر علی‌اصغرزاد[2]، نصرت‌اله نجفی[3]، شاهین اوستان[4] و صاحبعلی بلندنظر[5]

تاریخ دریافت: 88/11/11 تاریخ پذیرش: 89/9/10

1- دانشجوی دکتری، بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

3،2و4- به ترتیب استاد، استادیار و دانشیار، گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز

5- استادیار، گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

* مسئول مکاتبه: E.mail: Amanifar.s@gmail.com

چکیده

همزیستی گیاه با قارچ‌های میکوریز آربوسکولار در خاک‌های آلوده به فلزات سنگین می‌تواند رشد، تغذیه و مقاومت گیاه به فلزات سنگین را تحت تأثیر قرار داده و نقش مهمی در گیاه‌پالایی داشته باشد. در این تحقیق تأثیر همزیستی با دو گونهٔ قارچ *گلوموس اینترارادیسز* و *گلوموس موسه* بر جذب و انتقال سرب در گیاه سورگوم در شرایط گلخانه‌ای بررسی گردید. آزمایش به صورت فاکتوریل و در قالب طرح طرح پایهٔ کاملاً تصادفی با چهار سطح سرب (صفر، 200، 400 و 600 میلی‌گرم سرب بر کیلوگرم خاک) و سه تیمار قارچ (دو گونهٔ میکوریز و شاهد غیرمیکوریز) با چهار تکرار انجام شد. برای ایجاد تیمارهای سرب از نمک نیترات سرب استفاده شد. تلقیح گیاهان با هر دو گونهٔ قارچی انتقال سرب به بخش هوایی را به‌طور معنی‌داری کاهش داد. همزیستی با قارچ *گلوموس اینترارادیسز* سبب افزایش وزن خشک بخش هوایی در سطح 200 میلی‌گرم سرب بر کیلوگرم خاک و افزایش وزن خشک ریشه در سطوح 400 و 600 میلی‌گرم سرب بر کیلوگرم خاک در مقایسه با گیاهان غیرمیکوریزی گردید ولی اثر معنی‌داری بر سایر پارامترهای رشد نداشت. در سطوح بالای سرب، همزیستی با قارچ *گلوموس موسه* سبب کاهش معنی‌دار ($p<0.05$) وزن تر و خشک گیاه، سطح برگ و شاخص کلروفیل برگ‌ها در مقایسه با گیاهان غیرمیکوریزی گردید. در سطوح 400 و 600 میلی‌گرم سرب بر کیلوگرم خاک، نسبت غلظت سرب ریشه به بخش هوایی گیاهان در همزیستی با قارچ *گلوموس موسه* به طور معنی‌داری بیشتر از گیاهان بدون میکوریزی و گیاهان تلقیح شده با گلوموس اپنترارادیسز بود.

واژه‌های کلیدی: سرب، سورگوم، فلز سنگین، گیاه‌پالایی، میکوریز آربوسکولار

Effect of Arbuscular Mycorrhizal Fungi on Lead Phytoremediation by Sorghum (*Sorghum bicolor* L.)

S Amanifar[1*], N Aliasgharzad[2], N Najafi[3], Sh Oustan[4] and S Bolandnazar[5]

Received: 31, January 2010 Accepted: 1, December 2010
[1] PhD Student, Soil Science Dept., Univ. of Tabriz, Iran
[2,3,4] Prof., Assist. Prof., and Assoc. Prof., Soil Science Dept., Univ. of Tabriz, Iran
[3]Assist Prof., Horticulture Dept., Univ. of Tabriz, Iran
*Corresponding author: E.mail: Amanifar.s@gmail.com

Abstract

Arbuscular mycorrhizal fungi in association with plant roots may affect plant growth, nutrition and tolerance to heavy metals in polluted soils. Therefore, this association can play an important role in phytoremediation. In this study, the effects of two arbuscular mycorrhizal fungi species including *Glomus intraradices* and *Glomus mosseae*, on the uptake and translocation of Pb in sorghum, were investigated under greenhouse conditions. The experiment was conducted as factorial, completely randomized design including four levels of Pb^{2+} (0, 200, 400 and 600 mg Pb^{2+} kg^{-1}) and three treatments of fungi (two mycorrhizal fungi species and a non-mycorrhizal plant) with four replications. Lead were added to the pots as $Pb(NO_3)_2$. The Results indicated that symbiosis with *G. intraradices* increased shoot dry weight at 200 and root dry weight at 400 and 600 mg Pb kg^{-1} compared to the non-mycorrhizal treatment. There were, however, no significant effects on other growth parameters. Both mycorrhizal fungi caused a significant decrease in Pb^{2+} translocation from the root to the shoot. However, the shoot and root dry weights, leaf area and chlorophyll content in plants inoculated with *G. mosseae* at higher levels of Pb^{2+} were considerably ($p<0.05$) decreased compared to the non-mycorrhizal plants. At pb levels of 400 and 600 $mgkg^{-1}$, the ratio of Pb concentration in root to that of shoot in plants inoculated with *G. mosseae* was significantly ($p<0.05$) greater than that of plants inoculated with *G. intraradices* and none inoculated ones.

Key words: Arbuscular mycorrhizae, Heavy metal, Lead**,** Phytoremediation**,** Sorghum

مقدمه

در خاک‌های آلوده به فلزات سنگین، حضور ریزجاندارانی مانند قارچ‌های میکوریز آربوسکولار[1] در رایزوسفر، می‌تواند فراهمی و سمیت فلزات سنگین را برای گیاه تغییر دهد و از این طریق نقش مهمی در گیاه‌پالایی[2] داشته باشد (بیرو و تاکاس 2007). قارچ میکوریزآربوسکولار نقش اکولوژیک قابل توجهی در تثبیت فلزات سنگین توسط گیاه[3] در خاک‌های آلوده به این فلزات با ایجاد کمپلکس، ایفا می‌کند و به نوبهٔ خود به بقای گیاهان میکوریزی کمک می‌کند. از طرف دیگر، برخی گزارش‌ها حاکی از افزایش جذب فلزات سنگین توسط گیاهان میکوریزی است که در این صورت از جهت استخراج فلزات از خاک توسط گیاه[4] حایز اهمیت بوده و برای اصلاح خاک‌های آلوده مفید خواهد بود (خان 2006). اگرچه نتایج آزمایش‌های انجام یافته در زمینهٔ قارچ‌های میکوریز و فلزات سنگین، متنوع و وابسته به شرایط آزمایش از جمله ویژگی‌های بستر رشد، نوع گیاه و گونهٔ قارچ همزیست می‌باشد ولی به‌طور کلی، به‌نظر می‌رسد قارچ‌های میکوریز آربوسکولار قادر به تعدیل سمیت ایجاد شده توسط فلز سنگین برای گیاه می‌باشند (بیرو و تاکاس 2007).

ترکیبات دیوارهٔ سلولی قارچ‌های میکوریز-آربوسکولار حاوی ترکیباتی نظیر آمینواسیدهای آزاد و گروه‌های هیدروکسیل و کربوکسیل است که قادرند به فلزات سنگین سمی متصل و آنها را کمپلکس کنند (کاپور و ویراراگاوان 1995). پروتئین‌های دیوارهٔ سلولی قارچ‌های میکوریز نیز توانایی کمپلکس کردن فلزات سنگین را از خود نشان داده‌اند که گلومالین (یک نوع گلیکوپروتئین نامحلول) تولید شده توسط هیف‌های قارچ میکوریز آربوسکولار از جمله آنها می‌باشد (گونزالز و همکاران 2004). آندرد و همکاران (2004) مشاهده کردند تلقیح میکوریزی سویا، موجب تحریک رشد و افزایش سرعت جذب مواد غذایی بویژه فسفر شد. آنان گزارش کردند جذب بهتر سرب توسط قارچ میکوریز، سبب تولید اندام‌های هوایی با غلظت‌های کمتر سرب (در حدود 30% کمتر از گیاهان غیرمیکوریزی) در غلظت‌های بالای سرب اضافه شده به خاک، شد. تحقیق دیگر که توسط ژونر و لیوال (2001) انجام گرفت، نشان داد که گیاهان شبدر و ذرت میکوریزی نسبت به گیاهان غیر میکوریزی دارای سرب بیشتری در ریشه و اندام هوایی بودند. آنان اظهار داشتند غلظت زیاد فسفر و فلزات در ریشه نسبت به ساقه نشان دهندهٔ کمپلکس شدن فسفات با فلزات در ریشه‌های میکوریزی است. چن و همکاران (2005) مشاهده کردند که همزیستی میکوریزی تجمع سرب در بخش هوایی و ریشه گیاهان را به‌طور معنی‌داری تشدید کرد. نتایج آنان نشان داد که در غلظت‌های بالای سرب، همزیستی میکوریزی می-تواند رشد گیاهان را بر اثر افزایش جذب فسفر و کاهش سمیت سرب از طریق کمپلکس کردن سرب در ریشه گیاهان مورد مطالعه، افزایش دهد. ویسنهورن و لیوال (1995) مشاهده کردند غلظت سرب، به ویژه در ریشه ذرت، با افزایش کلنیزاسیون میکوریزی تمایل به افزایش داشت و انتقال مس و روی (نه سرب و کادمیوم) از ریشه به بخش هوایی با کلنیزاسیون میکوریزی افزایش یافت.

همزیستی میکوریزی همواره سبب بهبود رشد گیاه نمی‌گردد و در برخی موارد می‌تواند اثرات منفی بر شاخص‌های رشد داشته باشد. کیلهام و فیرستون (1982) مشاهده کردند که غلظت فلزات سنگین در ریشه و بخش هوایی گیاه میکوریزی بیشتر از غیرمیکوریزی بود. اثر تشدید کنندگی همزیستی میکوریزی بر جذب فلزات سنگین، در تیمارهای با غلظت بالاتر فلزات سنگین و اسیدیته بیشتر، افزایش یافت و سبب کاهش رشد گیاهانی شد که در معرض شرایط اسیدی و فلزات سنگین بودند. ویسنهورن و همکاران (1995) مشاهده کردند که کلنیزاسیون ریشه ذرت با قارچ میکوریز آربوسکولار، به طور قابل ملاحظه‌ای، از تجمع فلز در گیاه پیشگیری نکرد و غلظت فلزات سنگین در ذرت رشد کرده در خاک‌های آلوده به شدت از مقادیر طبیعی

[1] Arbuscular mycorrhizae
[2] Phytoremediation
[3] Phytostabilization
[4] Phytoextraction

افزایش یافت و برای کادمیوم و سرب به حد سمیت جهت تغذیه حیوانات رسید.

هدف از تحقیق حاضر بررسی رفتار همزیستی دو گونهٔ قارچ میکوریز آربوسکولار با گیاه سورگوم در غلظتهای بالای فلز سنگین در خاک بود که با اندازه-گیری غلظت این فلز در ریشه و بخش هوایی و محاسبهٔ میزان جذب آنها انجام شد.

مواد و روش‌ها

انتخاب و آماده‌سازی خاک

خاک مورد استفاده در این آزمایش از عمق 20 -0 cm نمونه‌برداری شد. بعد از هوا خشک کردن خاک و عبور از الک دو میلیمتری، خصوصیات مهم خاک شامل بافت (گی و بادر1986)، pH در گل اشباع (مکلین 1982)، EC در عصارهٔ گل اشباع (رودز 1986) ، درصد کربن آلی به روش والکلی و بلک (نلسون و سومرز 1982) ، مقدار پتاسیم قابل جذب به روش استات آمونیوم (نودسن و همکاران 1982)، مقدار فسفر قابل جذب (اولسن و سومر 1982) و رطوبت ظرفیت مزرعه (کسل و نیلسن 1986) تعیین گردید (جدول 2).

پس از گذرانیدن خاک از غربال چهار میلی-متری، به مدت چهار ساعت در داخل اتوکلاو (دمای 121 درجه سلسیوس و فشار 1/5 بار) سترون گردید و به گلدانهای پلاستیکی (1/5 کیلوگرم در هر گلدان) منتقل شد. سطوح سرب شامل صفر،200،400 و 600 میلی‌گرم سرب بر کیلوگرم خاک (به ترتیب Pb_0، Pb_1، Pb_2 و Pb_3) در خاک استریل بود (آن 2006، لاگرورف و همکاران 1973). نمک نیترات سرب را در آب مقطر لازم برای رسیدن به رطوبت FC حل کرده و پس از گذراندن از صافی 0/45 میکرومتر به خاک اسپری شد و برای رسیدن به حالت تعادل، دو هفته در کیسه‌های پلاستیکی با حفظ رطوبت FC (و دمای $20\pm 5\ ^{\circ}C$) نگهداری شد. همچنین برای یکسان‌سازی اثر نیترات، با در نظر گرفتن بیشترین تیمار سرب، غلظت‌های برابر از نیترات با استفاده از نمک نیترات سدیم در سایر تیمارها ایجاد شد. عناصر غذایی نیتروژن (از منبع اوره) و پتاسیم (از منبع سولفات پتاسیم) بر اساس توصیه کودی بطور یکنواخت به خاک همه گلدان‌ها قبل از کشت افزوده و به خوبی مخلوط شد (ملکوتی 1379). هنگام استفاده از کود نیتروژن، مقدار افزوده شده از این عنصر به شکل نیترات سرب درنظر گرفته شد. همچنین پس از سپری شدن زمان انکوباسیون برخی ویژگی‌های خاک نظیر pH (1:1)، EC (1:1) و سرب قابل جذب به روش DTPA (لیندزی و نورول 1978) اندازه‌گیری شدند (جدول 3).

آماده‌سازی تیمارها و کشت گلدانی

بذور سالم و یکنواخت سورگوم (*Sorghum bicolor* L.) از دانشگاه تبریز (ایستگاه تحقیقات کشاورزی خلعت‌پوشان) تهیه گردید. بذور به مدت 30 ثانیه در الکل اتیلیک 96 درصد و سپس پنج دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم دو درصد قرار داده شدند و جهت حذف هیپوکلریت سدیم از سطح بذور ضدعفونی شده، بذور حداقل هشت بار با آب مقطر استریل شستشو و سپس برای جوانه‌زنی در ظروف حاوی آب-آگار یک درصد در انکوباتور در دمای 20 درجه سلسیوس قرار داده شدند. برای تهیه مایه تلقیح قارچی، مقدار300 گرم از مایه تلقیح* *گلوموس اینترارادیسز*[1] و *گلوموس موسه*[2] (به ترتیب Gi و Gm) به‌طور جداگانه داخل گلدانهای پنج کیلویی حاوی خاک شنی استریل افزوده شد و با گیاه سورگوم، به مدت چهار ماه تکثیر شد. سپس مخلوط داخل گلدان شامل هیف‌ها، اسپورها و ریشه‌های میکوریزی همراه خاک گلدان به‌عنوان مایه تلقیح مورد استفاده قرار گرفت (علی‌اصغرزاد و همکاران 2001). 50 گرم مایه تلقیح قارچی با پنج سانتی‌متر از خاک سطحی گلدان‌ها مخلوط گردید. تعداد شش بذر جوانه‌دار شده سورگوم در هر گلدان و در عمق 2/5 سانتی‌متری کاشته شد. در مورد گیاهان شاهد غیرمیکوریزی، همان مقدار مایه تلقیح

[1] *Glomus intraradices*
[2] *Glomus mosseae*
* گونه‌های قارچی از آزمایشگاه بیولوژی خاک دانشگاه تبریز دریافت شدند.

قارچی استریل شده در اتوکلاو اضافه گردید. 20 روز پس از رشد، چهار بوته را نگه‌داشته و بوته‌های ضعیف حذف گردیدند. گیاه سورگوم، در شرایط اتاقک رشد در معرض 14 ساعت روشنایی و 10 ساعت تاریکی (دمای 2±30 درجه سلسیوس در روز و 2±20 درجه سلسیوس در شب و رطوبت نسبی 60 درصد و شدت نوری 10000 لوکس) به مدت سه ماه رشد یافت و در این مدت گیاهان با آب مقطر استریل و تا رطوبت 80 درصد ظرفیت مزرعه از طریق توزین گلدان‌ها، آبیاری شدند. برای ایجاد شرایط یکسان برای تمام گلدانها، هر دو روز یک‌بار تمام گلدانها به صورت تصادفی جابجا شدند.

طرح آزمایشی و تجزیه آماری

این آزمایش به صورت فاکتوریل و در قالب طرح پایهٔ کاملاً تصادفی در چهار تکرار انجام شد. فاکتورهای مورد استفاده عبارت بودند از چهار سطح سرب و سه تیمار قارچ (دو گونهٔ قارچ میکوریز آربوسکولار و شاهد بدون قارچ). آزمون نرمال بودن توزیع داده‌ها و سپس تجزیه واریانس و مقایسه میانگین‌ها (با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد) با نرم‌افزار MSTATC و رسم نمودارها با نرم‌افزار Excel انجام شد.

اندازه‌گیری‌های گیاه

اندازه‌گیری شاخص کلروفیل برگها توسط دستگاه کلروفیل‌سنج Spad-502، قبل از برداشت گیاهان، پس از 97 روز رشد، انجام گرفت. بخش هوایی گیاهان از محل طوقه قطع شد و وزن تر آنها اندازه-گیری شد. اندازه‌گیری سطح برگ‌ها توسط دستگاه سطح برگ سنج مدل Li - 3100 انجام گرفت. پس از جدا کردن ریشه‌ها از خاک، ریشه‌ها به‌دقت و با مقادیر فراوان آب مقطر شستشو شدند و وزن تر آنها توزین گردید. کلیه نمونه‌های گیاهی در دمای 65 درجه سلسیوس، به مدت سه روز خشک شدند. با استفاده از ترازوی ±0/001g وزن خشک آنها تعیین شد. برای ایجاد یکنواختی در ترکیب نمونه‌ها، بافت خشک گیاهان آسیاب شده و از الک یک میلی‌متری عبور داده شد. بعد از شستن ریشه‌ها حدود 0/2 گرم از ریشه‌های ظریف و ریز در محلول 50% اتانول جهت تعیین درصد کلنیزاسیون ریشه تثبیت شد. جهت تعیین درصد کلونیزاسیون حدود 30 قطعه از ریشه‌های رنگ‌آمیزی شده به طول یک سانتی‌متر روی لام قرار داده شد و با استفاده از میکروسکوپ درصد حضور اندام‌های قارچی در طول ریشه تخمین زده شد. برای هر نمونه، حداقل دولام تهیه و در نهایت از آنها میانگین گرفته شد (لیونگ و همکاران 2007، نوریف و همکاران 1992). نمونه‌های گیاهی به روش خشک‌سوزانی (نسبت 1:3 اسید نیتریک و اسید کلریدریک) هضم شدند و اندازه گیری فسفر به روش رنگ سنجی وانادات – مولیبدات (کاتنیه 1980) و سرب با استفاده از دستگاه جذب اتمی (والینگ و همکاران 1989) انجام گرفت.

محاسبهٔ مقدار فلز و کارایی گیاه در انتقال سرب از ریشه به بخش هوایی

برای محاسبهٔ مقدار عنصر در گیاه از رابطه زیر استفاده شد (کاتنیه 1980):

$$UPT = DM \times C$$

UPT: میزان جذب عنصر توسط گیاه ($mg\ pot^{-1}$)، DM: مادهٔ خشک گیاه ($g\ pot^{-1}$)، C: غلظت عنصر ($mg\ g^{-1}$)

برای تعیین کارایی گیاه در انتقال سرب از ریشه به بخش هوایی از رابطه زیر استفاده شد (گابوس و همکاران 2009) :

$$\text{شاخص انتقال} = \frac{\text{مقدار فلز در کل گیاه } (mg\ pot^{-1})}{\text{مقدار فلز در بخش هوایی } (mg\ pot^{-1})}$$

نتایج

نتایج تجزیهٔ واریانس صفات مورد مطالعه در جدول 1 ارائه شده است.

جدول 1- تجزیه واریانس اثر میکوریز و سطوح سرب بر ویژگی‌های اندازه‌گیری شده در گیاه سورگوم

منبع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات						
		غلظت فسفر بخش هوایی	غلظت فسفر ریشه	مقدار فسفر بخش هوایی	مقدار فسفر ریشه	وزن خشک بخش هوایی	وزن خشک ریشه	شاخص کلروفیل
سرب	3	0/085**	0/031*	1/912**	1/769**	27/824**	12/679**	10/793*
قارچ	2	0/049**	0/122**	0/480**	0/932**	4/562**	4/823**	11/960*
سرب×قارچ	6	0/036**	0/008ns	0/383**	0/368**	4/687**	2/020**	12/907**
خطا	36	0/008	0/011	0/031	0/055	0/317	0/396	2/570
CV(%)	-	15/85	10/77	11/97	14/94	14/64	21/54	5/94

ادامه جدول 1

منبع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات						
		سطح برگ	غلظت سرب ریشه	غلظت سرب بخش هوایی	مقدار سرب ریشه	مقدار سرب بخش هوایی	شاخص انتقال	نسبت غلظت سرب ریشه به بخش هوایی
سرب	3	140/8**	2/37**	0/055**	4/706**	0/328**	0/053**	8/986**
قارچ	2	28/5**	0/11**	0/0001ns	0/455**	0/070**	0/018**	1/921**
سرب×قارچ	6	36/96**	0/035**	0/001 ns	0/126**	0/011**	0/003 ns	0/756**
خطا	36	1/755	0/008	0/001	0/031	0/002	0/002	0/169
CV(%)	-	7/25	9/89	5/44	14/40	8/56	13/37	12/95

ns، * و ** به ترتیب غیرمعنی‌دار، معنی‌دار در سطح احتمال 5% و 1%

کلنیزاسیون میکوریزی ریشه‌ها

شکل 1 نشان می‌دهد که با افزایش غلظت سرب خاک، درصد کلنیزاسیون ریشه‌ها کاهش یافت. در سطح Pb_0، کلنیزاسیون قارچ Gm بیش از Gi بود ولی در سطوح Pb_1 و Pb_2 تفاوت معنی‌داری بین کلنیزاسیون دو قارچ مشاهده نشد و در سطح Pb_3، کلنیزاسیون قارچ Gi بیش از قارچ Gm بود ($p<0.05$). به‌طور کلی شدت کاهش میزان کلنیزاسیون قارچ Gm بیش از Gi بود بطوریکه از 41 درصد به 12 درصد کاهش یافت ولی کلنیزاسیون قارچ Gi از 31/4 به 17/8 درصد کاهش یافت.

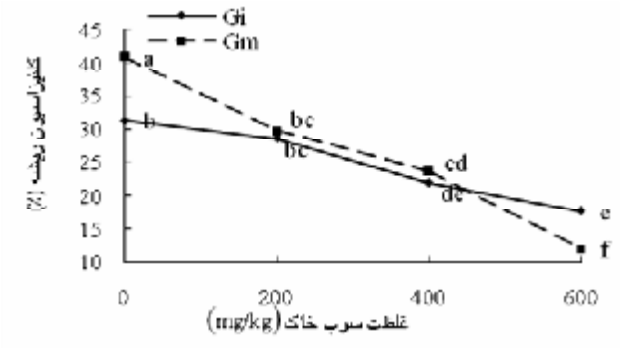
وزن خشک بخش هوایی و ریشه‌ها

شکل 2 نتایج برهمکنش سطوح سرب و تیمارهای قارچی را بر وزن خشک بخش هوایی و ریشه‌ها نشان می‌دهد. بطور کلی با افزایش غلظت سرب خاک وزن خشک بخش هوایی سورگوم کاهش یافت ولی شدت این کاهش در گیاهان همزیست با قارچGm بیش از دو تیمار دیگر بود به طوری که این گیاهان در تیمارهای حاوی سرب کمترین وزن خشک بخش هوایی را دارند. همزیستی با قارچ Gi فقط در سطح 200 میلی‌گرم سرب سبب افزایش وزن خشک در مقایسه با شاهد غیرمیکوریزی شد. همزیستی با قارچ Gi در سطح 400 و 600 میلی‌گرم سرب بر کیلوگرم خاک سبب افزایش وزن خشک ریشه‌ها گردید.

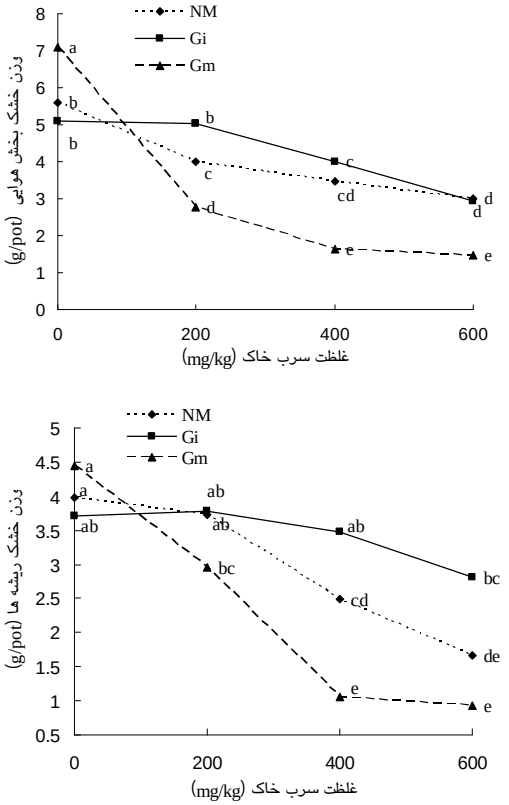
شاخص کلروفیل و سطح برگ‌ها

همانطور که در شکل 3 مشاهده می‌شود، شاخص کلروفیل گیاهان غیرمیکوریزی و گیاهان تلقیح شده با قارچ Gi در ، بطور شدید تحت تأثیر سطوح سرب قرار نگرفت ولی این شاخص در گیاهان همزیست قارچ Gm با افزایش غلظت سرب خاک کاهش یافت. بطور کلی با افزایش غلظت سرب خاک، سطح برگ‌های

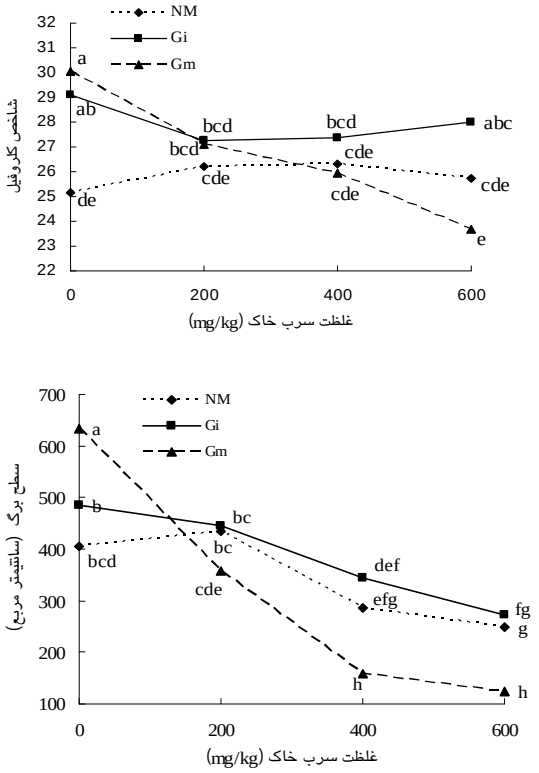
سورگوم کاهش یافت. این کاهش در گیاهان تلقیح شده با قارچ Gm بیش از دو تیمار دیگر بود. از طرف دیگر همزیستی با قارچ Gi اثر مثبتی در مقایسه با گیاهان غیرمیکوریزی نداشت (شکل 3).



شکل1- اثر برهمکنش سطوح سرب و تیمارهای قارچی بر درصد کلونیزاسیون ریشه‌ها (Gi و Gm به ترتیب *گلوموس اینترارادیسز* و *گلوموس موسه*).



شکل 2- اثر برهمکنش سطوح سرب و تیمارهای قارچی بر وزن خشک بخش هوایی و ریشه‌ها (NM، Gi و Gm به ترتیب شاهد غیر میکوریزی، *گلوموس اینترارادیسز* و *گلوموس موسه*)



شکل 3- اثر برهمکنش سطوح سرب و تیمارهای قارچی بر شاخص کلروفیل و سطح برگ‌ها (NM، Gi و Gm به ترتیب شاهد غیر میکوریزی، *گلوموس اینترارادیسز* و *گلوموس موسه*)

غلظت فسفر

با افزایش غلظت سرب خاک، غلظت فسفر ریشهٔ گیاه سورگوم کاهش یافت. همانطور که در شکل 4 مشاهده می‌شود، غلظت فسفر در ریشه‌های گیاهان میکوریزی بیش از غیرمیکوریزی بود و اثر برهمکنش همزیستی میکوریزی و سطوح سرب خاک، بطور معنی-داری غلظت فسفر ریشه‌ها را تحت تأثیر قرار نداد ($p<0.05$). غلظت فسفر بخش هوایی در گیاهان تلقیح شده با قارچ Gi و گیاهان غیرمیکوریزی، با افزایش غلظت سرب خاک، تا سطح 400 میلی‌گرم سرب بر کیلوگرم، کاهش محسوسی نداشت ولی در گیاهان تلقیح شده با قارچ Gm، افت شدیدی در سطح 200 میلی‌گرم سرب بر کیلوگرم مشاهده شد ولی پس از آن، در سطح 400 میلی‌گرم سرب بر کیلوگرم، مقداری افزایش یافت و مجدداً در سطح 600 میلی‌گرم سرب بر کیلوگرم کاهش یافت (شکل 5).

مقدار فسفر

مقدار فسفر بخش هوایی گیاهان تلقیح شده با قارچ Gi در مقایسه با گیاهان تیمار Gm و گیاهان غیر میکوریزی، با شدت کمتری کاهش یافت بطوریکه این کاهش تنها در سطح 600 میلی‌گرم سرب بر کیلوگرم خاک معنی‌دار بود و بطور کلی شدت کاهش مقدار فسفر در گیاهان تیمار Gm بیش از دو تیمار قارچی دیگر بود (شکل 6). در ریشه‌های گیاهان این تیمار نیز چنین روند کاهشی، تا سطح 200 میلی‌گرم سرب بر کیلوگرم خاک مشاهده شد و پس از آن تغییرات معنی‌دار نبود (شکل 6).

جدول 2- برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی اندازه‌گیری شده در خاک مورد استفاده

بافت	pH	EC_e (dS m^{-1})	FC (w/w)	OC (%)	K (mg kg^{-1})	P (mg kg^{-1})
شنی	7/79	0/66	0/125	0/101	182/6	4/4

جدول 3- pH (1:1)، EC (1:1) و سرب قابل جذب به روش DTPA پس از سپری شدن زمان انکوباسیون.

سطوح سرب (mg kg^{-1})	صفر	200	400	600
EC (µS cm^{-1})	727	733	716	826
pH	8/08	7/76	7/43	7/20
DTPA-Pb (mg kg^{-1})	صفر	156/65	311/721	492/730

غلظت سرب

با افزایش غلظت سرب خاک، غلظت سرب بخش هوایی و ریشه‌ها افزایش یافت. همانطور که در شکل7 مشاهده می‌شود، کلونیزاسیون میکوریزی و سطوح سرب خاک (در تیمارهای حاوی سرب)، بطور معنی‌داری غلظت سرب بخش هوایی را تحت تأثیر قرار نداد ($p<0.05$). غلظت سرب ریشه‌های گیاهان همزیست قارچ Gm در سطوح 400 و 600 میلی‌گرم سرب بر کیلوگرم خاک بیش از گیاهان غیرمیکوریزی و گیاهان تلقیح شده با قارچ Gi بود (شکل 8).

مقدار سرب

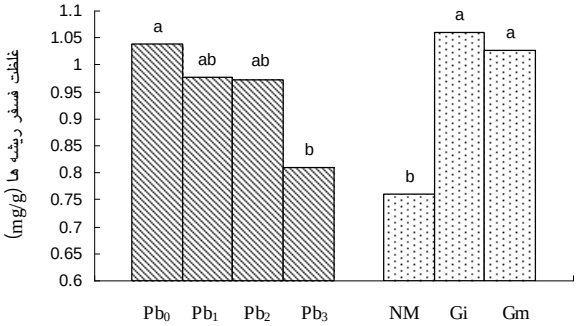
مقدار سرب بخش هوایی گیاهان تلقیح شده با قارچ Gi تا سطح 400 میلی‌گرم سرب بر کیلوگرم خاک روند افزایشی داشت ولی در دو تیمار قارچی دیگر این روند صعودی تا سطح 200 میلی‌گرم سرب بر کیلوگرم خاک مشاهده شد و پس از آن کاهش یافت. در کلیه تیمارهای حاوی سرب گیاهان همزیست با قارچ Gm کمترین مقدار سرب را داشتند (شکل 9). مقدار سرب ریشه نیز با افزایش غلظت سرب خاک افزایش یافت ولی شدت این افزایش در گیاهان همزیست قارچ Gm بیش از دو تیمار قارچی دیگر بود (شکل 9).

انتقال سرب از ریشه به بخش هوایی

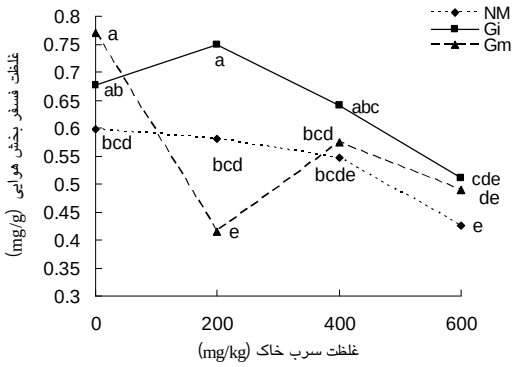
همانطور که در شکل 10 مشاهده می‌شود، با افزایش غلظت سرب در خاک شاخص انتقال کاهش یافت. همچنین شاخص انتقال در گیاهان میکوریزی کمتر از غیر میکوریزی بود ($p<0.05$).

نسبت غلظت سرب ریشه به بخش هوایی

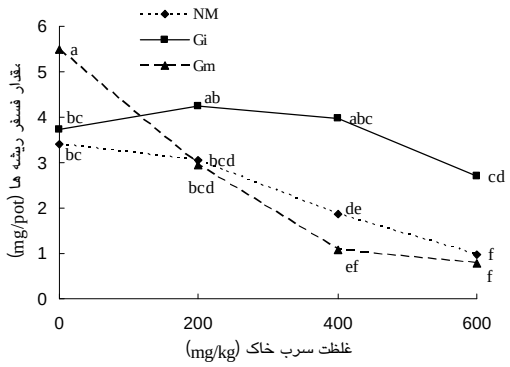
شکل 11 نشان می‌دهد که با افزایش غلظت سرب خاک نسبت غلظت سرب ریشه به بخش هوایی گیاه سورگوم افزایش یافته است. در سطح 600 میلی-گرم سرب، گیاهان همزیست با قارچ Gm بطور معنی-داری نسبت غلظت سرب ریشه به بخش هوایی بیشتری در مقایسه با دو تیمار دیگر داشتند و این تفاوت بارز در سطح 400 میلی‌گرم سرب نیز بین گیاهان این تیمار و گیاهان همزیست با قارچ Gi قابل توجه است.

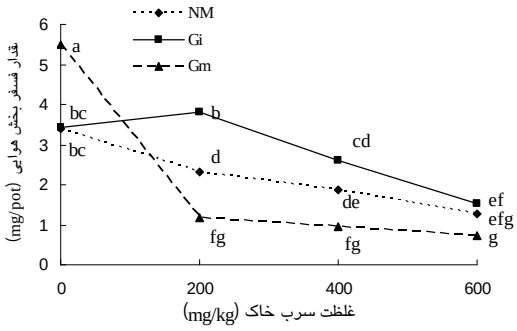


شکل4 - اثر سطوح سرب و تیمارهای قارچی بر غلظت فسفر ریشه‌ها (Pb0، Pb1، Pb2 و Pb3 به‌ترتیب صفر، 200، 400 و 600 میلی‌گرم سرب بر کیلوگرم)، (NM، Gi و Gm به ترتیب شاهد غیر میکوریزی، *گلوموس اینترارادیسز* و *گلوموس موسه*)

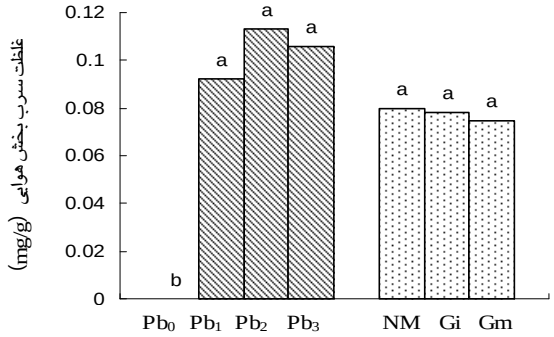


شکل 5- اثر برهمکنش سطوح سرب و تیمارهای قارچی بر غلظت فسفر بخش هوایی (NM، Gi و Gm به ترتیب شاهد غیر میکوریزی، *گلوموس اینترارادیسز* و *گلوموس موسه*)

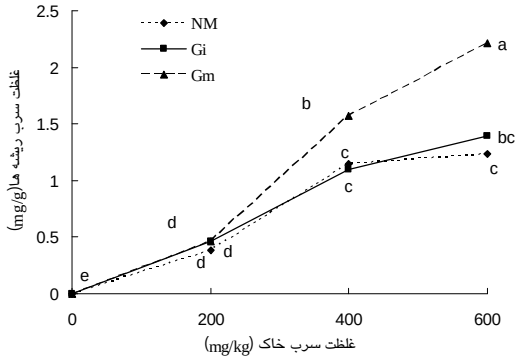




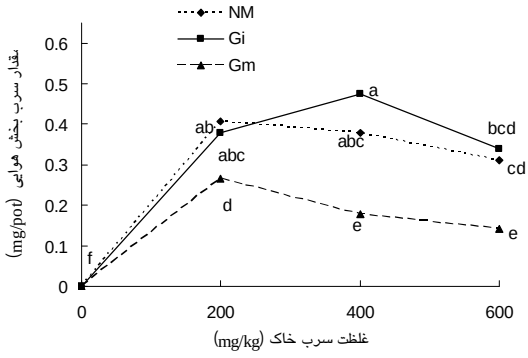
شکل 6- اثر برهمکنش سطوح سرب و تیمارهای قارچی بر مقدار فسفر بخش هوایی و ریشه (NM، Gi و Gm به ترتیب شاهد غیر میکوریزی، *گلوموس اینترارادیسز* و *گلوموس موسه*).

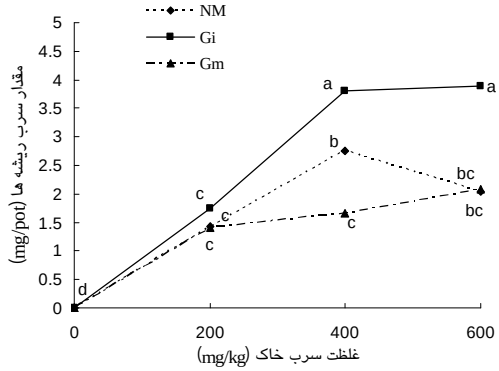


شکل7- اثر سطوح سرب و تیمارهای قارچی بر غلظت سرب بخش هوایی (Pb0، Pb1، Pb2 و Pb3 به‌ترتیب صفر، 200، 400 و 600 میلی‌گرم سرب بر کیلوگرم)، (NM، Gi و Gm به ترتیب شاهد غیر میکوریزی، *گلوموس اینترارادیسز* و *گلوموس موسه*).

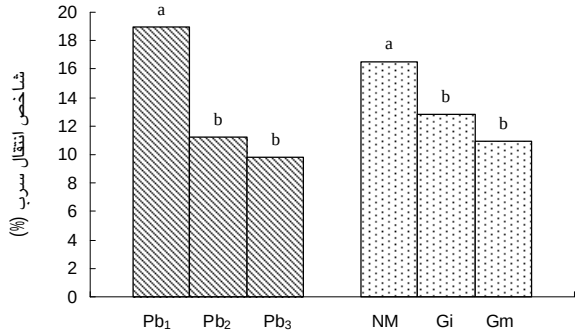


شکل 8- اثر برهمکنش سطوح سرب و تیمارهای قارچی بر غلظت سرب ریشه (NM، Gi و Gm به ترتیب شاهد غیر میکوریزی، *گلوموس اینترارادیسز* و *گلوموس موسه*).

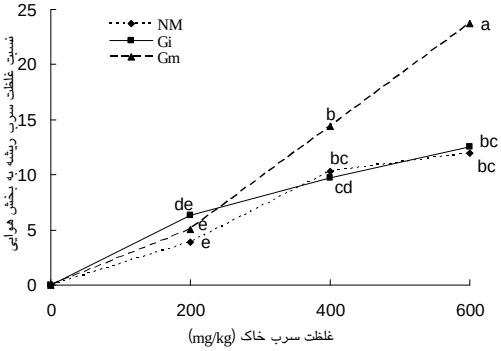




شکل 9- اثر برهمکنش سطوح سرب و تیمارهای قارچی بر مقدار سرب بخش هوایی و ریشه (NM، Gi و Gm به ترتیب شاهد غیر میکوریزی، *گلوموس اینترارادیسز* و *گلوموس موسه*).



شکل 10- اثر سطوح سرب و تیمارهای قارچی بر شاخص انتقال سرب (Pb_1، Pb_2 و Pb_3 به‌ترتیب 200، 400 و 600 میلی‌گرم سرب بر کیلوگرم)، (NM، Gi و Gm به ترتیب شاهد غیر میکوریزی، *گلوموس اینترارادیسز* و *گلوموس موسه*)



شکل 11- اثر برهمکنش سطوح سرب و تیمارهای قارچی بر نسبت غلظت سرب ریشه به بخش هوایی (NM، Gi و Gm به ترتیب شاهد غیر میکوریزی، *گلوموس اینترارادیسز* و *گلوموس موسه*)

بحث

همزیستی گیاه سورگوم با قارچ Gm نه‌تنها تأثیر مثبتی بر رشد گیاهان نداشته است بلکه سبب کاهش رشد نیز گردیده است. این کاهش رشد در گیاهان همزیست قارچ Gm به‌ویژه در سطوح Pb_2 و Pb_3 می‌تواند در نتیجهٔ انباشتگی سرب در ریشهٔ این گیاهان باشد. به عبارت دیگر، در این دو سطح سرب، قارچ Gm در کاهش جذب آن مؤثر نبوده است. افزایش معنی‌دار نسبت غلظت سرب ریشه به بخش هوایی گیاهان تیمار Gm نسبت به گیاهان تیمار Gi در سطح Pb_2 و نسبت به هر دو تیمار Gi و NM در سطح Pb_3 نیز می‌تواند

گواهی بر تجمع سرب در ریشه این گیاهان باشد. علت احتمالی دیگر که می‌توان برای کاهش رشد سورگوم در حضور قارچ عنوان نمود، محدودیت تأمین کربن می‌باشد. از آنجایی که در همزیستی میکوریزی، گیاه مسئول تأمین کربن قارچ است پس گیاهان میکوریزی نسبت به شاهد انرژی بیشتری مصرف می‌کنند و اگر شرایط به گونه‌ای باشد که گیاه نتواند در حد مناسب کربن آلی تولید کند، در این حالت جنبهٔ منفی همزیستی میکوریزی (مصرف انرژی گیاه توسط قارچ) ظاهر خواهد شد. این عمل در نهایت باعث کاهش بیوماس گیاه خواهد شد (سیتریو و همکاران 2005). نظر به اینکه سورگوم یک گیاه C_4 می‌باشد و اشباع نوری آن بسیار زیاد است، لذا در شرایط نور مصنوعی اتاق رشد میزان فتوسنتز گیاه کاهش می‌یابد که این کاهش فتوسنتز در کنار اثر منفی فلز سنگین بر آن، تشدید شده و حضور قارچ همزیست سبب کاهش بیوماس گیاهی گردیده است. به‌نظر می‌رسد سمیت سرب علاوه بر ایجاد اختلال در جذب عناصر غذایی کم‌مصرف، موجب اختلال در فعالیت‌های متابولیکی گیاه گردیده است. افزایش معنی‌دار وزن خشک ریشهٔ سورگوم در سطوح Pb_2 و Pb_3 در گیاهان همزیست قارچ Gi احتمالاً در نتیجهٔ مقدار فسفر بیشتر ریشهٔ این گیاهان نسبت به سایر تیمارهای قارچی است. احتمالاً تولید هورمون‌های گیاهی نظیر سیتوکینین‌ها توسط قارچ همزیست در راستای حمایت از رشد گیاه در شرایط سمیت، توانسته بیوماس ریشه‌ها را در این سطوح سرب افزایش دهد. همچنین کاهش معنی‌دار وزن خشک ریشهٔ گیاهان تلقیح شده با قارچ Gm احتمالاً به دلایلی اعم از تجمع سرب در ریشه‌ها و اختلال در جذب عناصر غذایی کم‌مصرف و بروز جنبهٔ منفی همزیستی به دلیل مناسب نبودن شرایط رشد گیاه، به‌طور مشابه با کاهش وزن بخش هوایی آنها باشد. نتیجهٔ مشابه توسط سیتریو و همکاران (2005) در گیاه شاهدانه همزیست با قارچ *گلوموس موسه* در خاک آلوده به نیکل، کروم و کادمیوم گزارش شده است.

سمیت فلزات سنگین گسترش هیف‌های داخل ریشه‌ای را محدود می‌کند و در غلظت‌های بالای فلزات گسترش هیف‌های خارج ریشه‌ای نیز متأثر می‌گردد. از طرف دیگر گسترش همزیستی تابع شرایط گیاه میزبان نیز می‌باشد و در شرایط نامساعد میزبان، کلنیزاسیون نیز تحت تأثیر قرار می‌گیرد (گیلدون و تینکر 1983، پاولوسکا و چاروات 2004). کاهش کلنیزاسیون قارچ میکوریزآربوسکولار در نتیجهٔ سمیت سرب توسط محققان متعددی از جمله وگل –میکوس و همکاران (2006) در بررسی کلنیزاسیون قارچ *گلوموس موسه* و *گلوموس اتونیکاتوم* همزیست با *Thlaspi praecox* در خاک آلوده به سرب، کادمیوم و روی، گیلدون و تینکر (1983) در بررسی کلنیزاسیون پیاز با قارچ *گلوموس موسه* در خاک آلوده به کادمیوم، روی و مس و چاو و وانگ (1990) در بررسی کلنیزاسیون ریشه‌های ذرت با قارچ‌های میکوریز گزارش شده است.

کلنیزاسیون میکوریزی در سطح Pb_3 و Pb_2 تأثیری بر غلظت فسفر بخش هوایی نداشت که این مسئله احتمالاً ناشی از عدم کارایی همزیستی در جذب و انتقال فسفر، به دلیل کاهش میزان کلنیزاسیون و عدم توسعهٔ هیف‌های خارج ریشه‌ای می‌باشد. کاهش معنی‌دار غلظت فسفر بخش هوایی گیاهان تیمار Gm، با توجه به غلظت بالای سرب در ریشهٔ این گیاهان، احتمالاً به‌دلیل کمپلکس شدن فسفات با سرب در ریشه و عدم انتقال آن به بخش هوایی گیاهان همزیست می‌باشد (ژونر و لیوال 2001). تشکیل کمپلکس‌های فسفات سرب در هیف‌های قارچ و درون ریشه‌ها، به‌ویژه دیواره‌های سلولی، سبب کاهش انتقال فسفر به بخش هوایی می‌گردد (ونگ و همکاران 2007، چن و همکاران 2005). به‌نظر می‌رسد قارچ Gm در مقایسه با قارچ Gi حساسیت بیشتری به سمیت سرب داشته باشد، زیرا مادهٔ خشک بخش هوایی گیاهان سورگوم تلقیح شده با قارچ Gm با شیب بیشتری نسبت به گیاهان تلقیح شده با قارچ Gi بر اثر سمیت سرب کاهش می‌یابد. در نتیجه فعالیت متابولیک آنها کاهش یافته و جذب فعال فسفر توسط آنها نیز کم می‌شود و غلظت فسفر بخش هوایی کاهش می‌یابد.

افت شدید شاخص کلروفیل و سطح برگهای سورگوم در گیاهان تیمار Gm می‌تواند در نتیجهٔ افزایش غلظت سرب ریشه و اختلال در جذب عناصری نظیر آهن، منیزیم، منگنز و بطور کلی اختلال در تغذیهٔ معدنی گیاه، از طریق ممانعت در جذب به ریشه‌ها (به دلیل رقابت سرب با این عناصر در جذب یا اختلال در

نفوذپذیری غشاها و ناقلین یون‌ها) یا انتقال آنها به بخش هوایی (از طریق تأثیر بر پتانسیل آبی آوندهای چوبی به دلیل اختلال در تعرق) گیاهان باشد (پاترا و همکاران 2004). غلظت بالای سرب در گیاهان فعالیت‌های متابولیکی از جمله فتوسنتز، عملکرد آنزیم‌ها و هورمون‌ها (به‌ویژه هورمون‌های رشد) را مختل می‌سازد (کوپر و کرونک 2005). اثر بازدارندهٔ سرب بر بیوسنتز کلروفیل طی تحقیقات متعدد نشان داده شده است (پاترا و همکاران 2004).

برخی گزارش‌ها بیانگر این است که فلز سنگین در اندام‌های قارچی توسط گرانول‌های پلی‌فسفات تثبیت می‌گردد (ونگ و همکاران 2007، چن و همکاران 2005) و یا توسط ترکیبات دیوارهٔ قارچ مانند کیتین و ملانین کمپلکس می‌شود (وگل و همکاران 2006). افزایش معنی‌دار غلظت سرب ریشهٔ گیاهان همزیست قارچ Gm، می‌تواند بیانگر تأثیر همزیستی این قارچ بر تجمع سرب در ریشه و ساختارهای قارچی باشد. کم بودن مقدار سرب ریشه و بخش هوایی در گیاهان همزیست با Gm احتمالاً ناشی از پایین بودن مادهٔ خشک گیاهی می‌باشد. نتایج حاکی است که همزیستی میکوریزی تأثیری بر غلظت سرب بخش هوایی نداشته است در حالی که همزیستی با قارچ Gm سبب افزایش معنی‌دار نسبت غلظت سرب ریشه به بخش هوایی گردیده است. بطور کلی می‌توان چنین نتیجه گرفت که همزیستی با این گونهٔ قارچی منجر به نگهداری فلز سنگین سرب در اندام‌های قارچی اعم از وزیکول، آربوسکول و هیف گردیده و یا توسط گرانول‌های پلی‌فسفات و ترکیبات دیوارهٔ قارچ تثبیت شده است. افزایش مقدار سرب ریشه‌ها، تابعی از افزایش غلظت سرب آنها است و بطور عمده تحت تأثیر غلظت سرب ریشه قرار گرفته است. مقدار سرب بخش هوایی گیاهان تیمار Gm، بطور معنی‌داری کمتر از دو تیمار NM و Gi است. با این حال، مقدار سرب ریشهٔ گیاهان تیمار Gm و NM تفاوت معنی‌داری باهم ندارند و میزان انتقال به بخش هوایی در گیاهان همزیست قارچ Gm کمتر از گیاهان غیرمیکوریزی است. مقدار سرب ریشهٔ گیاهان تیمار Gi بیشتر از گیاهان غیرمیکوریزی بود ولی مقدار سرب بخش هوایی تفاوت معنی‌داری با گیاهان غیرمیکوریزی نداشت که این مسئله نشان دهندهٔ انتقال کمتر سرب در گیاهان میکوریزی Gi در مقایسه با گیاهان غیرمیکوریزی است. نتایج فوق بیانگر نقش همزیستی با هر دو گونهٔ قارچی در تثبیت فلزات توسط گیاه سورگوم می‌باشد. شاخص انتقال محاسبه شده نیز بیانگر همین نتایج می‌باشد. میزان انتقال با افزایش غلظت سرب خاک کاهش یافته است. یکی از دلایلی که می‌توان برای کاهش انتقال سرب به بخش هوایی گیاهان با افزایش غلظت سرب خاک متصور بود این است که انتقال فلز به بخش هوایی از طریق آوندهای چوبی صورت می‌گیرد و عامل انتقال در این آوندها، شیب هیدروستاتیک و شیب پتانسیل آب است. بنابراین با کاهش رشد گیاهان، میزان تبخیر و تعرق کاهش و میزان انتقال در این آوندها نیز کاهش می‌یابد (خلدبرین و اسلام‌زاده 1380). از طرف دیگر چون محاسبهٔ این شاخص بر پایهٔ مقدار سرب انجام گرفته است، کاهش مادهٔ خشک و به تبع آن مقدار سرب در گیاه، می‌تواند عاملی در توجیه کاهش این شاخص به‌شمار آید. از عوامل تعیین کننده در رها شدن یون‌ها به درون آوند چوبی میزان تعرق گیاه، وضعیت کربوهیدرات‌های ریشه و تنفس ریشه می‌باشد. کاهش هر سه مورد ذکر شده سبب کاهش رها شدن یون‌ها به درون آوندهای چوبی می‌گردد (خلدبرین و اسلام‌زاده 1380). با توجه به اثر بازدارندهٔ فلز سنگین بر شدت فتوسنتز، تولید کربوهیدرات‌ها کاهش می‌یابد و به تبع آن میزان انتقال این مواد به ریشه‌ها نیز کم می‌شود. از طرف دیگر کربوهیدرات‌ها سوبسترای اصلی نیرو برای تنفس هستند، بنابراین با کاهش میزان فتوسنتز تأمین کربوهیدرات‌ها برای ریشه‌ها و حتی قارچ همزیست محدود شده و تنفس آنها کاهش می‌یابد. صرف نظر از تأثیر ساختارهای قارچی در کمپلکس کردن فلز و کاهش انتقال به بخش هوایی (ونگ و همکاران 2007، چن و همکاران 2005)، عوامل فوق‌الذکر نیز می‌توانند دلیلی برای کاهش انتقال فلز به‌شمار آیند. بعد دیگری که در این مورد قابل بررسی است نحوهٔ جذب سرب به ریشه‌ها می‌باشد. تا زمانی که یک اختلاف شیب غلظت فلز میان درون و بیرون ریشه‌ها حاکم باشد، سرب با پدیده جذب غیرفعال و در جهت شیب غلظت وارد ریشه‌ها می‌شود ولی با افزایش غلظت سرب داخل ریشه، جذب عمدتاً به‌شکل فعال ادامه پیدا خواهد کرد. با توجه به اینکه جذب فعال با مصرف انرژی انجام

گرفته و وابسته به فعالیت‌های متابولیکی گیاه است، با افزایش غلظت سرب خاک و به تبع آن مسمومیت سلول-های گیاهی و کاهش فعالیت‌های متابولیکی، بطور کلی، جذب سرب از محلول خاک به ریشه‌ها کاهش می‌یابد.

نتیجه‌گیری

غلظت سمی سرب در بخش هوایی اکثر گیاهان بین 30 تا 300 میلی‌گرم بر کیلوگرم ماده خشک گزارش شده است (کاباتا پندیاس و پندیاس 2000). در این آزمایش غلظت سرب بخش هوایی حداقل 75 و حداکثر 120 و در ریشه‌ها بین 287 تا 2215 میلی‌گرم بر کیلوگرم ماده خشک متغیر بود. با توجه به محدوده فوق، غلظت سرب بخش هوایی سورگوم در حد سمیت قرار می‌گیرد. از جمله علایم سمیت سرب برگهای ضعیف، پژمردگی برگهای قدیمی و وزن خشک پایین در بخش هوایی و ریشه‌های به رنگ قهوه‌ای تیره، شکننده و با انشعابات کم می‌باشد (کاباتا پندیاس و پندیاس 2000). در این آزمایش چنین علایمی، با شدت بیشتر در گیاهان غیرمیکوریزی و تلقیح شده با قارچ Gm، در تیمارهای حاوی سرب مشاهده شد ولی به‌طور کلی شاخص انتقال در گیاهان میکوریزی کمتر از غیرمیکوریزی بود. همزیستی با قارچ *گلوموس اینترارادیسز* سبب افزایش وزن خشک بخش هوایی در سطح 200 میلی‌گرم سرب بر کیلوگرم خاک و افزایش وزن خشک ریشه‌ها در سطوح 400 و 600 میلی‌گرم سرب بر کیلوگرم خاک در مقایسه با گیاهان غیرمیکوریزی گردید ولی تأثیر معنی‌داری بر سایر پارامترهای رشد نداشت درحالیکه همزیستی با قارچ *گلوموس موسه* سبب کاهش معنی‌دار وزن تر و خشک گیاهان، سطح برگ و شاخص کلروفیل در سطوح بالای سرب، در مقایسه با گیاهان غیرمیکوریزی گردید.

منابع مورد استفاده

خلدبرین ب و اسلام‌زاده ط، 1380. تغذیهٔ معدنی گیاهان عالی (ترجمه). در دو جلد. انتشارات دانشگاه شیراز.

ملکوتی م ج، 1379. توصیهٔ بهینهٔ کودی برای محصولات زراعی و باغی. نشریهٔ فنی شمارهٔ 200. مؤسسهٔ تحقیقات خاک و آب. نشر آموزش کشاورزی.

Aliasgharzadeh N, Saleh Rastin N, Towfighi H and Alizadeh A, 2001. Occurrence of arbuscular mycorrhizal fungi in salin soils of the Tabriz plain of Iran in relation to some physical and chemical properties of soil. Mycorrhiza 11: 119-122.

An YJ, 2006. Assessment of comparative toxicities of lead and copper using plant assay. Chemosphere 62:1359-1365.

Andrade SAL, Abreu CA, Abreu MF and Silveria APD, 2004. Influence of lead addition on arbuscular mycorrhiza and rhizobium symbiosis under soybean plants. Applied Soil Ecology 26: 123-131.

Biro I and Takacs T, 2007. Effects of *Glomus mossea* strains of different origin on plant macro and micronutrient uptake in Cd polluted and unpolluted soils. Acta Agronomica Hungarica 55(2):1-10.

Cassel DK and Nielsen DR, 1986. Field capacity and available water capacity. Pp. 901-926. *In*: Klute A (ed). Methods of Soil Analysis. Part 1: Physical and Mineralogical Methods, 2nd ed. American Society of Agronomy and Soil Science Society of America, Madison,WI.

Chao CC and Wang YP, 1990. Effects of heavy metals on the infection of vesicular arbuscular mycorrhizae and the growth of maize. Journal of Agriculture Association 152: 34-45.

Chen X, Wu C, Tang J and Hu S, 2005. Arbuscular mycorrhizae enhance metal lead uptake and growth of host plants under sand culture experiment. Chemosphere 60: 665-671.

Citterio S, Prato N, Fumagalli P, Aina R, Massa N, Santagostina A, Sgorbati S and Berta G, 2005. The arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* induces growth and metal accumulation changes in *Cannabis sativa* L. Chemosphere 59: 21-29.

Cottenie A, 1980. Soil and Plant Testing. FAO Soils Bulletin, No. 38/2.

Gabos MA, Abreu CA and Coscione AR, 2009. EDTA assisted phytoremediation of a Pb contaminated soil: Metal leaching and uptake by jack beans. Scientia Agricola 66: 506-514.

Gee GW and Bauder JW, 1986. Particle size analysis. Pp. 383-411. *In*: Klute A (ed). Methods of Soil Analysis. Part 1: Physical and Mineralogical Methods, 2nd ed. American Society of Agronomy and Soil Science Society of America, Madison,WI.

Gildon A and Tikner PB, 1983. Interaction of vesicular arbuscular mycorrhizal infection and heavy metals in plants. The effect of heavy metals on the development of vesicular arbuscular mycorrhizas. New Phytologist 95: 247-261.

Gonzalez-Chavez MC, Carrillo-Gonzalez R, Wright SF and Nichols K, 2004. The role of glomalin, a protein produced by arbuscular mycorrhizal fungi in sequestering potentially toxic elements. Environmental Pollution 130: 317- 323.

Joner EJ and Leyval C, 2001. Time-course of heavy metal uptake in maize and clover as affected by root density and different mycorrhizal inoculation regimes. Biology and Fertility of Soils 33: 351-357.

Kabata-Pendias A, Pendias H, 2000. Trace Elements in Soil and Plants. 2nd edition. Boca Raton: CRC Press.

Kapoor, A and Viraraghavan T, 1995. Fungal biosorption- an alternative treatment option for heavy metal bearing wastewater. Bioresource Technology 53: 195-206.

Khan AG, 2006. Mycorrhizae remediation - an enhanced form of phytoremediation. Journal of Zhejiang University 7: 503-514.

Killham K and Firestone MK, 1982. Vesicular arbuscular mycorrhizal mediation of grass response to acidic and heavy metal depositions. Plant and Soil 72: 39-48.

Knudsen D, Peterson GA and Pratt PF, 1982. Lithium, sodium and potassium. Pp: 225-246. *In:* Page AL, (ed). Methods of Soil Analysis. Part 2: Chemical and Microbiological Properties, 2nd ed. American Society of Agronomy and Soil Science Society of America. Madison,WI.

Kuper H and Kroneck PMH, 2005. Heavy metal uptake by plants and cyanobacteria. Pp. 97-142. In: Sigel A, Sigel H, Sigel RKO, (eds). Metal Ions in Biological Systems. Marcel Dekker Inc. NY. USA.

Lagerwerff JV, Armiger WH and Specht AW, 1973. Uptake of lead by alfalfa and corn from soil and air. Soil Science 115:455-460.

Leung HM, Ye ZH and Wong MH, 2007. Survival strategies of plants associated with arbuscular mycorrhizal fungi on toxic mine tailings. Chemosphere 66: 905-915.

Lindsay WL and Norvell WA, 1978. Development of DTPA soil test for zinc, iron, manganese, and copper. Soil Sci Soc Am J 42:421-428.

Mclean EO, 1982. Soil pH and lime requirement. Pp. 199–223. *In:* Page AL, (ed). Methods of Soil Analysis. Part 2: Chemical and Microbiological Properties, 2nd ed. American Society of Agronomy and Soil Science Society of America, Madison,WI.

Nelsons BW and Sommers LE, 1982. Total carbon, organic carbon, and organic matter. Pp. 539-579. *In*: Page AL, (ed) Methods of Soil Analysis, Part 2: Chemical and Microbiological Properties, 2nd ed. American Society of Agronomy and Soil Science Society of America, Madison,WI.

Norrif IR, Read DJ and Varma AK, 1992. Methods in Microbiology. Vol 24. Techniques for Study of Mycorrhiza. Academic Press, London.

Olsen SR and Sommers LE, 1982. Phosphorus. Pp. 403-430. *In*: Page AL, (ed) Methods of Soil Analysis. Part 2: Chemical and Microbiological Properties, 2nd ed. American Society of Agronomy and Soil Science Society of America, Madison,WI.

Patra M, Bhowmic N, Bandopadhyay B and Sharma A, 2004. Comparison of mercury, lead and arsenic with respect to genotoxic effects on plant systems and the development of genetic tolerance. Environmental and Experimental Botany 52: 199-223.

Pawlowska TE and Charvat I, 2004. Heavy metal stress and development patterns of arbuscular mycorrhizal fungi. Applied and Environmental Microbiology 70: 6643-6649.

Rhoades JD, 1986. Soluble salts. Pp.167-179. *In*: Page AL (ed) Methods of Soil Analysis. Part 2: Chemical and Microbiological Properties, 2nd ed. American Society of Agronomy and Soil Science Society of America, Madison,WI.

Vogel-Mikus K, Pongrac P, Kump P, Necemer M and Regvar M, 2006. Colonization of Zn, Cd and Pb hyper accumulator *Thlaspi praecox Wulfen* with indigenous arbuscular mycorrhizal fungal mixture induces changes in heavy metal and nutrient uptake. Environmental Pollution 139:362-371.

Waling I, Vark WV, Houba VJG and Van der lee JJ, 1989. Soil and Plant Analysis a Series of Syllabi. Part 7. Plant Analysis Procedures. Wageningen Agricultural University.

Weissenhorn I and Leyval C, 1995. Root colonization of maize by a Cd- tolerant *Glomus mosseae* and cadmium uptake in sand culture. Plant and Soil 175: 233- 238.

Weissnhorn I, Leyval C, Belgg G and Berthelin J, 1995. Arbuscular mycorrhiza contribution to heavy metal uptake by maize(*Zea mays* L.) in pot culture with contaminated soil. Mycorrhizae 5:245-251.

Wong CC, Wu SC, Kuek C, Khan AG, and Wong MH, 2007. The role of mycorrhizae associated with Vetiver grown in Pb-Zn contaminated soils: Green house study. Restoration Ecology 15:60-67.