اثر آلودگی کادمیومی خاک بر برخی شاخص‌های فیزیولوژیک گیاه بنگدانه (*Hyoscyamus niger L*) در حضور و عدم حضور ریزجانداران محرک رشد گیاه

سولماز کاظم‌علیلو[1]، میرحسن رسولی‌صدقیانی[2*]

تاریخ دریافت: 90/06/20 تاریخ پذیرش: 91/03/06

[1]- دانشجوی کارشناسی ارشد علوم خاک، دانشگاه ارومیه

[2]- استادیار گروه علوم خاک، دانشگاه ارومیه

* مسئول مکاتبه: m.rsadaghiani@urmia.ac.ir

چکیده

ریزجانداران محرک رشد گیاه به روشهای مستقیم و غیر مستقیم باعث بهبود رشد و عملکرد گیاه می‌شوند. برای بررسی اثر باکتری‌های محرک رشد گیاه و قارچ ریشه‌های آربوسکولار بر برخی شاخص‌های فیزیولوژیک گیاه بنگدانه، آزمایش گلخانه‌ای به صورت فاکتوریل با طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار انجام گرفت. فاکتورهای آزمایش شامل غلظت‌های مختلف کادمیوم (0، 10، 30 و 100 میلی گرم کادمیوم بر کیلوگرم خاک) و تلقیح میکروبی در سه سطح شاهد، PGPR (ترکیب سودوموناس‌های *P. putida*، *P. fluorescens* و *P. aeruginosa*) و AMF (ترکیب میکوریزهای *G. mosseae*، *G. intraradices* و *G. fasciculatum*) اجرا گردید. نتایج نشان داد تیمارهای آزمایش، طول ساقه و وزن خشک گیاه را در مقایسه با تیمار شاهد به طور معنی‌داری ($P\leq0/05$) افزایش دادند. همچنین نتایج بدست آمده نشان داد که با افزایش غلظت کادمیوم در خاک از غلظت کلروفیل a، b و میزان نسبی آب برگ (RWC) به طور معنی‌داری ($P\leq0/05$) کاسته شد. با اینحال در گیاهان تلقیح شده با ریزجانداران محرک رشد افزایش قابل توجهی در کلروفیل a، b و RWC مشاهده شد. مقدار کربوهیدرات‌های محلول و پرولین تحت تنش آلودگی، در گیاهان باکتریایی و قارچی نسبت به گیاهان شاهد به طور معنی‌داری افزایش یافت. همچنین درصد همزیستی میکوریزی با افزایش کادمیوم در خاک به‌طور معنی‌داری (73% نسبت به Cd_0) کاهش یافت. چنین استنباط می‌گردد که در شرایط تنش فلزات سنگین می‌توان از ریزجانداران محرک رشد بعنوان افزاینده‌های رشد گیاه بهره برد.

واژه های کلیدی: باکتری‌های محرک رشد گیاه، پرولین، قارچ ریشه‌های آربوسکولار، کادمیوم، کلروفیل

Effect of soil cadmium pollution on some physiological parameters of *Hyoscyamus* plant in presence/absence of growth-promoting microorganisms

S Kazemalilou[1], MH Rasouli-Sadaghiani[2*]

Received: 11 September 2011 Accepted: 26 May 2012
1. MSc Student, Dept. of Soil Sci., Univ. of Urmia, Iran.
2. Assist. Prof., Dept. of Soil Sci., Faculty of Agric., Univ. of Urmia, Iran.
*. Corresponding author, m.rsadaghiani@urmia.ac.ir

Abstract

Plant growth promoting microorganisms enhance plant growth and yield by virtue of direct and indirect mechanisms. In this study the effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) on plant height, yield, chlorophyll *a*, *b*, relative water content (RWC), carbohydrate and proline content of *Hyoscyamus* plant were evaluated. The soil was polluted with different concentrations of cadmium (0, 10, 30 and 100 mg kg^{-1} soil), and experiment was done in a factorial with randomized complete block design with three levels of microbial inoculation including fluorescent Pseudomonads as PGPR (*P. putida, P. fluorescence and P. aeruginosa*), fungal inoculation with *Glomus* species as AMF (*G. mosseae, G. intraradices* and *G. fasciculatum*) and control condition (no inoculation). The results indicated that the experiment treatments increased significantly ($P\leq 0.05$) plant height, shoot dry weight compared to control condition. Furthermore, as cadmium concentration raised in soil the contents of chlorophyll *a*, chlorophyll *b*, and relative water significantly decreased. However, plants inoculated with PGPR and AMF showed considerable amount of chlorophyll *a*, *b* as well as RWC. Under Cd contamination, the contents of soluble sugar and proline increased in inoculated plants in comparison to control plants. Cd addition also significantly decreased (73% compared to Cd_0) mycorrhizal root colonization. It is concluded that at the presence of Cd, inoculation with PGPR and AMF could sustain and promote plant growth.

Keywords: AMF, Cadmium, Carbohydrate, Chlorophyll, PGPR, Proline

مقدمه

آلودگی خاک به وسیله مواد سمی حاصل از فعالیت-های گوناگون بشری از جمله کشاورزی، صنعتی و در برخی موارد هسته‌ای سبب ایجاد مشکلات زیست محیطی، اقتصادی و بهداشتی فراوانی شده است (خان 2005). خطر فلزات سنگین برای سلامتی انسان و دام به دلیل دوام طولانی آنها در محیط زیست تشدید می‌شود (گیسبرت و همکاران 2003). در میان فلزات سنگین کادمیوم دارای اهمیت ویژه‌ای است، ریشه گیاهان براحتی آنرا جذب می‌نماید و سمیت کادمیوم برای گیاهان تا 20 برابر سایر فلزات سنگین می‌باشد.

کادمیوم در گیاهان موجب کاهش رشد، لوله شدن برگ-ها، کاهش جذب برخی عناصر مانند آهن و در نتیجه کلروزه شدن برگ‌ها، کاهش میزان فتوسنتز، کاهش تولید کلروفیل و ممانعت از فعالیت آنزیم احیاکننده آهن III می‌گردد (داس و همکاران 1997). همچنین کادمیوم، کمبود عناصر غذایی ضروری را در گیاه افزایش داده و غلظت بسیاری از عناصر کم مصرف را کاهش می‌دهد (واسیلو و همکاران 2002). در ده سال گذشته مقدار کادمیم در اکوسیستم‌های کشاورزی افزایش یافته که خطر آلودگی زنجیره‌ی غذایی را افزایش و حاصلخیزی خاک را کاهش داده است (بابیچ و استوتزکی 1978).

اخیراً استفاده از توانایی ریزجانداران ریزوسفر به‌ویژه قارچهای میکوریز آربوسکولار[1] (AMF) و باکتریهای محرک رشد گیاه[2] (PGPR) در افزایش بردباری گیاهان به فلزات‌سنگین مورد توجه قرار گرفته است. AMF وPGPR می‌توانند جذب آب، موادغذایی و رشد گیاهان را در خاک‌های آلوده به این فلزات افزایش دهند (ژانگ و همکاران 2010). از جمله مکانیزم‌های مهم باکتری‌های محرک رشد، تولید هورمون‌های گیاهی است که با ساخته شدن و رهاسازی تنظیم کننده‌های رشد گیاهی، راهکارهای مؤثر در مبارزه بیولوژیکی فراهم می‌نماید. این باکتری‌ها موادی به نام تنظیم کننده-های رشد تولید می‌کنند که به عنوان متابولیت‌های ثانویه، تأثیر مستقیم و غیرمستقیم بر مراحل فیزیولوژیک گیاهان دارند. همچنین حلالیت فسفر توسط این باکتری‌ها و تثبیت زیستی نیتروژن از دیگر خصوصیات مهم محرک رشد آنها است (علیپور و ملکوتی 1382).

قارچ ریشه‌ها از ریزجانداران مهم همزیست به شمار می‌آیند که با ریشه‌ی بیش از 90 درصد گیاهان همزیستی دارند (برادرت 2002). قارچ‌های میکوریزی با داشتن شبکه هیفی گسترده و افزایش سطح و سرعت جذب ریشه، کارایی گیاهان را در جذب آب و عناصر غذایی به ویژه عناصر کم تحرک فسفر، روی و مس افزایش و موجب بهبود رشد آنها می‌شوند (مارشنر و دل 1994). بنابراین قارچ‌های میکوریزا ارتباط مستقیمی بین خاک و ریشه‌ی گیاه ایجاد می‌کنند پس در میزان دسترسی فلزات سنگین و سمیت آنها در گیاهان حائز اهمیت هستند (لی وال و همکاران 1997). گزارش‌ها نشان داده که همزیستی قارچ ریشه‌ها می‌تواند از گیاهان در مقابل سمیت فلزات به طور نقطه‌ای حفاظت کند (جنسکی و گدبولد 2000، لی وال و همکاران 1997). برد و همکاران (1998) گزارش کردند که در خاک‌هایی با آلودگی شدید که مقدار فلزات آنها از حد تحمل گیاه فراتر است، تلقیح گیاهان با ریزجانداران ریزوسفری، ممکن است سبب افزایش بیوماس گیاه شود و بدین وسیله منجر به تثبیت و بازسازی پوشش گیاهی و همچنین اصلاح خاک آلوده به فلزات می‌شود. سیکوایرا و همکاران (1999) گزارش کردند که میکوریزها برای اصلاح خاک‌های آلوده به عناصر سنگین بسیار با اهمیت هستند. جونر و همکاران (1997) با مطالعه رشد شبدر در یک خاک آلوده به کادمیوم، رشد مطلوب شبدر در چنین نقاطی را به همزیستی موثر میکوریزها با ریشه گیاه نسبت دادند. ملک‌زاده و همکاران (1390) با تلقیح قارچ‌های میکوریز و باکتری‌های PGPR در گیاه ذرت در یک خاک آلوده به کادمیوم نشان دادند در شرایط آلودگی خاک رشد گیاه در تیمار مایه‌زنی‌شده با قارچ *گلوموس موسه* بیشتر از بقیه تیمارها بود و مایه‌زنی توام قارچ *گلوموس موسه* با باکتری میکروکوکوس *روزئوس* بیشترین تجمع کادمیوم در گیاه را بدنبال داشت. رحمانیان و همکاران (2011) با بررسی رشد برخی گیاهان مرتعی در خاک‌های آلوده به کادمیوم و با حضور میکروارگانیسم‌های مقاوم به آلودگی نشان دادند که میکروب‌ها با افزایش شکل‌های

[1] Arbuscular mycorrhizal fungi
[2] Plant growth promoting rhizobacteria

قابل دسترس کادمیوم برای گیاه سبب افزایش جذب آن توسط گیاه شدند و در بین گیاهان مورد مطالعه بیدگیاه و ارزن وحشی را به‌ترتیب به عنوان مقاوم‌ترین و حساس‌ترین گیاهان معرفی نمودند.

هدف از انجام این پژوهش بررسی تاثیر ریزجانداران AMF و PGPR در پاسخ گیاه مرتعی بنگدانه به تنش کادمیوم و برخی شاخص‌های رشد و فیزیولوژی این گیاه در شرایط تنش آلودگی کادمیوم بود.

مواد و روش‌ها

این آزمایش به صورت فاکتوریل با طرح پایه بلوک-های کامل تصادفی، تاثیر سه سطح تلقیح میکروبی شامل کنترل (بدون تلقیح)، تلقیح باکتری‌های PGPR و تلقیح قارچ‌هایAMF در 3 تکرار در سال 90-1389 در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه اجرا شد. پس از هوا خشک شدن خاک مورد نظر، خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آن از لحاظ بافت، میزان pH، EC ، درصد کربن آلی، میزان عناصر آهن، روی، کادمیوم و سرب کل آنالیز شدند (جدول 1).

این تحقیق بر روی یک خاک با گروه بزرگ Typic halaquepts اجرا گردید. غلظت آلاینده با توجه به حدود غلظت مجاز کادمیوم در خاک انتخاب شد به گونه‌ای که دامنه‌ای از غلظت صفر آن فلز تا چندین برابر غلظت مجاز را بپوشاند. با توجه به غلظت مجاز کادمیوم در خاک (1 تا 5 میلی‌گرم در کیلوگرم) غلظت-هایی از کادمیوم در محدوده صفر، 10، 30 و 100 میلی‌گرم در کیلوگرم خاک انتخاب شدند. برای آلوده کردن خاک، از نمک نیترات کادمیوم $Cd(NO_3)_2$ استفاده شد. خاک‌ها در گلدان‌های پلاستیکی به مدت حدود 5 ماه در دوره‌های خشک - مرطوب متوالی در دمای اتاق خوابانده شدند. در هر دوره خشک – مرطوب شدن، خاک گلدان‌ها اشباع و بعد اجازه داده شد تا هوا خشک گردد بطوری که رطوبت خاک به حد نسبتاً ثابتی برسد. به منظور جلوگیری از آبشویی کادمیوم از گلدان‌های بدون زهکش استفاده گردید. هر دوره خشک - مرطوب 40 روز طول کشید و بعد از هر دوره خاک گلدان‌ها به منظور ایجاد یکنواختی در غلظت کادمیوم کاملاً مخلوط می‌گردید. در انتهای هر دوره مقدار کادمیوم کل و محلول اندازه‌گیری شد. پس از انجام واکنش‌ها، خاک-های آلوده به کادمیوم دو بار (با یک هفته فاصله) با دستگاه اتوکلاو در دمای 121 درجه سلسیوس و فشار 1/5 اتمسفر به مدّت 2 ساعت در داخل کیسه‌های کنفی ضدعفونی شدند.

گلدان‌ها نیز با الکل استریل سطحی شدند. برای اعمال تیمارهای میکروبی، در تیمارهای مربوط به قارچ-ریشه آربوسکولار قبل از کشت، در زیر بذرها مقدار 50 گرم از مایه تلقیح با پتانسیل در حدود 250 پروپاگول در سانتی‌متر مکعب بصورت لایه‌ای به ضخامت تقریبی 2 سانتی‌متر اضافه شد. تیمار قارچ ریشه‌ای شامل ترکیبی از مایه تلقیح قارچ ریشه‌های جنس *Glomus* از گونه‌های *G.mosseae*، *G. intraradices* و *G. fasciculatum* بود. برای تیمار باکتریایی مقدار 20 میلی‌لیتر از محیط کشت مایع باکتری‌ها (با جمعیت حدود 10^8 باکتری در میلی‌لیتر) به گلدان‌ها تلقیح گردید. تیمار باکتریایی شامل ترکیبی از باکتری‌های سودوموناس فلورسنت از سه گونه *P. putida*، *P. fluorescens* و *P. aeruginosa* بود که به مدت 48 ساعت در دمای 28 درجه سلسیوس در انکوباتور در محیط کشت مایع مغذی (Nutrient Broth) رشد کرده بودند. تیمارهای شاهد مقدار مشابه از مایه تلقیح استریل‌شده دریافت نمودند. سویه‌های مورد استفاده از بانک میکروبی موسسه تحقیقات خاک و آب کرج تهیه شدند. پس از اعمال تیمارها کشت گیاهان در داخل گلدان‌های 2/5 کیلوگرمی انجام شد. سایر عناصر غذایی و مراقبتهای زراعی لازم برای تمامی تیمارها به طور یکنواخت اعمال گردید و آبیاری در طول دوره رشد گیاه انجام گرفت. پس از اِعمال تیمارها کشت گیاه به تعداد 8 بذر بنگدانه انجام شد. اما در ادامه در هر گلدان فقط 4 بوته نگهداری شد. طی دوره رشد، آبیاری

گلدان‌ها تا حد ظرفیت مزرعه‌ای با روش وزنی صورت گرفت. پس از گذشت سه ماه از زمان کشت، پس از تعیین وزن خشک گیاه، غلظت کادمیوم در اندام هوایی با روش هضم تَر (استفاده از سولفوسالسیلیک اسید) و با دستگاه جذب اتمی اندازه‌گیری شد (گوپتا 2000).

اندازه‌گیری وزن خشک و ارتفاع گیاه

پس از گذشت 5 ماه از زمان کشت، بوته‌ها از محل طوقه برداشت، شستشو و در دمای 70 درجه سلسیوس به مدت 48 ساعت خشک و سپس توزین شدند. همچنین ارتفاع گیاه نیز اندازه‌گیری گردید.

اندازه‌گیری میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی

استخراج کلروفیل با استفاده از استن 80% و به روش لیختنت هالر و ولبورن (1985) تعیین شد. نیم گرم از بافت تر برگ (برگ‌های میانی گیاه) با مقدار 10 میلی‌لیتر استن ساییده شد تا یک بافت بی‌رنگ و کاملاً سفید باقی ماند. محلول حاصل با استفاده از کاغذ صافی و قیف صاف، سپس کاغذ صافی با 10 میلی‌لیتر دیگر شستشو داده شد تا رنگیزه‌های روی کاغذ صافی نیز وارد محلول شود. سپس حجم محلول با استن به 25 میلی لیتر رسید. در مرحله بعد با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج‌های 663 و 645 نانومتر جذب محلول اندازه‌گیری و در نهایت با استفاده از فرمول‌های زیر میزان کلروفیل های a، b، کل و کارتنوئید بر حسب میلی‌گرم بر گرم برگ تر محاسبه شد:

$$Chl_a = 11/75\ A_{663} - 2/35A_{645}$$

$$Chl\ b = 18/61\ A_{645} - 3/96\ A_{663}$$

کلروفیل کل = کلروفیل a + کلروفیل b [1]

کارتنوئید = $(1000\times A_{470} - 1.82\times Chl_a - 85.02Chl_b)/198$ [2]

تعیین میزان نسبی آب برگ

به منظور تعیین RWC[1] (میزان نسبی آب برگ)، نمونه‌گیری از جوان‌ترین برگ کامل شده انجام گرفت و میزان نسبی آب برگ با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد:

$$RWC = (FW-DW)/(TW-DW) \quad [3]$$

که در آن FW، DW و TW به ترتیب وزن برگ تازه، وزن برگ خشک و وزن برگ اشباع شده (گرم) می‌باشند. برای تعیین وزن تورژسانس برگ‌های جدا شده از بوته پس از تعیین وزن تر، برگ‌ها به مدت 4 ساعت در داخل آب مقطر غوطه‌ور شده و پس از خارج شدن و گرفتن آب سطحی با استفاده از دستمال کاغذی، توزین شدند.

اندازه‌گیری میزان پرولین و کربوهیدرات‌های محلول

به منظور اندازه‌گیری میزان پرولین از روش بیتز و همکاران (1973) استفاده گردید.

به این منظور 0/04 گرم بافت خشک اندام‌های هوایی با 10 میلی لیتر اسید سولفوسالیسیلیک 3 درصد ساییده شد و به مدت 72 ساعت در یخچال در دمای 4 درجه سلسیوس قرار گرفت تا اسید آمینه پرولین آزاد شود. هموژنات در 3000 g به مدت 20 دقیقه سانتریفوژ شد. 2 میلی لیتر از محلول رویی با دو میلی لیتر از اسید استیک گلاسیال و 2 میلی لیتر معرف نین‌هیدرین (حاوی 20 ml اسید فسفریک 6 M، 30 ml اسید استیک گلاسیال و 1/25 گرم نین هیدرین) مخلوط شد و به مدت یک ساعت در بن ماری در حال جوش قرار گرفت تا رنگ آجری تثبیت شود. سپس به منظور جلوگیری از ادامه واکنش لوله‌ها را داخل آب یخ قرار داده و 4 میلی لیتر تولوئن به آن اضافه شد. بعد از هم زدن، دو فاز تشکیل گردید. از فاز رویی برداشته و میزان جذب در 520 نانومتر با اسپکتروفتومتر مدل LKB اندازه گیری شد.

[1] Relative water content

با استفاده از منحنی استاندارد، محتوای پرولین بر حسب میکرمول بر گرم وزن تر بدست می‌آید.

اندازه‌گیری قندهای محلول با استفاده از روش فنل سولفوریک و بر اساس هیدرولیز اسیدی قندهای محلول با ایجاد ترکیب فورفورال و تشکیل کمپلکس رنگی با فنل انجام گرفت (فالس 1951).

تعیین درصد همزیستی میکوریزی

به‌منظور تعیین درصد همزیستی میکوریزی، ریشه‌ها به روش رنگ‌آمیزی با تریپان بلو رنگ‌آمیزی شدند (نوریس و همکاران 1992) و درصد همزیستی طول ریشه با روش مک‌گونیگل و همکاران (1990) تعیین گردید.

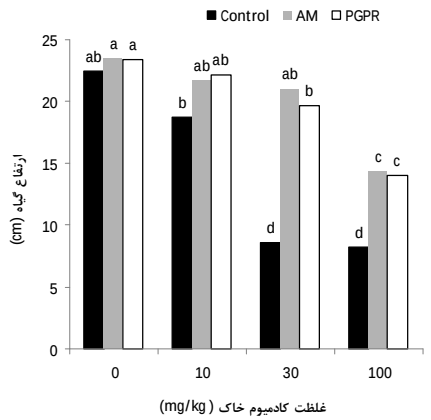
تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها از طریق نرم افزار SAS، مقایسه تیمارها با استفاده از آزمون دانکن و رسم نمودارها با نرم‌افزار Excel انجام گرفت.

نتایج و بحث

ارتفاع گیاه

نتایج حاصل از تحلیل آماری داده‌ها نشان می‌دهد که در گیاهان شاهد و همچنین در گیاهان تلقیح شده با باکتری‌های محرک رشد گیاه و قارچ ریشه‌های آربوسکولار میکوریزا، در اثر سمیت کادمیوم و با افزایش غلظت فلز ارتفاع اندام هوایی کاهش یافت (شکل 1). بررسی‌ها نشان داد که کادمیوم بر تقسیم و رشد سلول‌های گیاهان اثر می‌گذارد (داس و همکاران 1997).

نتایج نشان می‌دهد که عموماً کاهش ارتفاع گیاه در گیاهان میکوریزایی و باکتریایی کمتر از گیاهان شاهد بود. بنابراین می‌توان رشد بهتر گیاهان تلقیحی را مربوط به بهبود وضعیت تغذیه‌ای گیاه و دسترسی به عناصر غذایی دانست، چون فسفر موجب رشد بیشتر گیاه میزبان می‌گردد (خلیقی و خارا 1387، سلیسپور 1382).



شکل 1- تأثیر غلظت‌های مختلف کادمیوم بر طول ساقه گیاه بنگدانه در تیمارهای مختلف (Control: شاهد، AMF: تلقیح میکوریز و PGPR: تلقیح باکتریهای محرک رشد)

همچنین برد و همکاران (2000) گزارش کردند که برخی باکتری‌های محرک رشد با تولید ترکیبات خاص می‌توانند رشد گیاه را به طور معنی‌داری در حضور فلزات سنگین افزایش دهند.

جدول 1- برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک مورد مطالعه

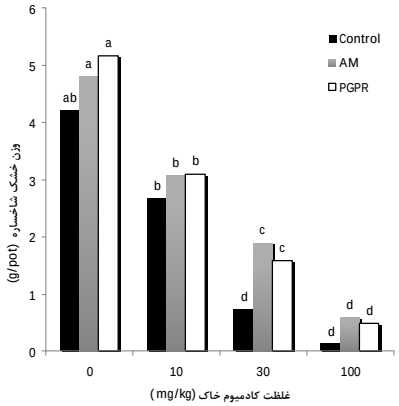
بافت خاک	pH	EC ($dS\ m^{-1}$)	O.C (%)	Fe ($mg\ kg^{-1}$)	Zn ($mg\ kg^{-1}$)	Cd ($mg\ kg^{-1}$)	Pb ($mg\ kg^{-1}$)
لوم	8/1	2/5	2/69	29505	62	1/47	21/42

وزن خشک اندام هوایی

با مقایسه داده‌های حاصل از آنالیز آماری در مورد وزن خشک اندام هوایی مشاهده می‌گردد که وزن خشک اندام‌های هوایی با سمیت کادمیوم و همگام با افزایش غلظت کادمیوم در خاک کاهش یافته‌است و بین گیاهان تیمار شده با ریزجانداران محرک رشد و گیاهان شاهد اختلاف آماری معنی‌داری($P\leq0/05$) مشاهده شد (شکل 2). کادمیوم با ایجاد اختلال در فتوسنتز، تنفس و متابولیسم نیتروژن در گیاهان منجر به کاهش رشد می‌شود در نتیجه بیوماس یا توده زنده گیاه نیز کاهش می‌یابد (گویا و همکاران 2001). برد و همکاران (2000) گزارش کردند که *Achromobacter piechaudii* ARV8 با توان تولید آنزیم ACC دآمیناز، به طور معنی‌داری وزن تر و خشک نهال‌های گوجه فرنگی رشد کرده در شرایط تنش فلزات سنگین را افزایش داد.

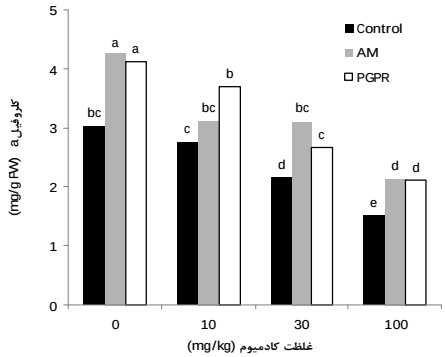
مطالعات زیادی افزایش جذب فسفر توسط قارچ ریشه‌های آربوسکولار و باکتری‌های محرک رشد و انتقال آن به گیاه را گزارش داده‌اند (چن و همکاران 2003، دیویز و همکاران 2001، لیو و همکاران 2000). افزایش جذب فسفر احتمالاً وزن خشک گیاه را افزایش داده، بنابراین ممکن است اثرات سمی فلز را بواسطه اثر رقت، ته نشین‌کردن یا جذب سطحی فلز روی گرانول‌های پلی‌فسفات کاهش دهد (ووگل میکوس و همکاران 2005، دوفی و دفاگو 1999، برد و همکاران 2000، میر 2000).

لیائو وهمکاران (2003) نشان دادند که علی رغم افزایش سطوح کادمیوم در خاک، تلقیح میکوریزی سبب افزایش ماده خشک اندام هوایی و زمینی گیاه در مقایسه با گیاهان شاهد شد.

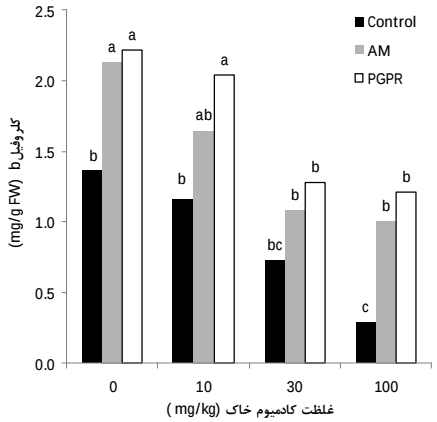


شکل 2- تأثیر غلظت‌های مختلف کادمیوم بر وزن خشک شاخساره گیاه بنگدانه در تیمارهای مختلف (Control: شاهد، AMF: تلقیح میکوریز و PGPR: تلقیح باکتریهای محرک رشد)

آنالیز داده‌های مربوط به محتوای کلروفیل a و کلروفیل b نشان داد که میزان هر دو نوع کلروفیل a و b در گیاهان شاهد و همچنین در گیاهان تلقیح شده با قارچ‌ها و باکتری‌ها، در اثر سمیت کادمیوم کاهش یافت، ولی در کل میزان کلروفیل در گیاهان تلقیحی بالاتر از میزان آن در گیاهان غیر تلقیحی بود. در مقایسه بین گیاهان تلقیح یافته و شاهد مشاهده گردید که گیاهان تلقیح‌شده و شاهد تفاوت معنی‌داری ($P\leq0/05$) از نظر مقدار کلروفیل a و b داشتند (شکل 3).



شکل 3-الف) تأثیر غلظت‌های مختلف کادمیوم بر میزان کلروفیل a گیاه بنگدانه در تیمارهای مختلف (Control: شاهد، AMF: تلقیح میکوریز و PGPR: تلقیح باکتریهای محرک رشد)



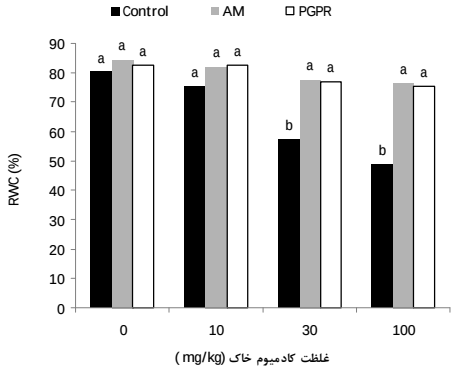
شکل 3-ب) تاثیر غلظت‌های مختلف کادمیوم بر میزان کلروفیل b گیاه بنگدانه در تیمارهای مختلف (Control: شاهد، AMF: تلقیح میکوریز و PGPR: تلقیح باکتریهای محرک رشد)

کاهش میزان کلروفیل در گیاهان تحت تنش فلزات سنگین، بعلت مهار مراحل مختلف بیوسنتز کلروفیل است (خلیقی و خارا 1387). مهار بیوسنتز کلروفیل احتمالاً بواسطه مهار سنتز دلتاآمینولوولینیک و مهار تشکیل پروتوکلروفیلید ردوکتاز است (واسیلو و یوردانوو 1997). همچنین جایگزین شدن یون منیزیم مرکزی کلروفیل بوسیله فلزات سنگین صدمه دیگری است که باعث جلوگیری از به دام انداختن نور فتوسنتزی و در نتیجه از بین رفتن کلروفیل و کاهش فعالیت فتوسنتزی می‌شود (پراساد و استرازالکا 1999).

حقیری (1973) گزارش کرد که غلظت زیاد کادمیوم در محیط رشد، جذب آهن توسط گیاه را مختل و سمیت کادمیوم بر فرآیندهای اصلی گیاه نظیر فتوسنتز، تکثیر سلولی و جذب آب توسط ریشه‌های گیاهان اثر می‌گذارد. علت بالا بودن میزان کلروفیل a و b در گیاهان تلقیح شده با باکتری‌های محرک رشد و قارچ ریشه‌های آربوسکولار میکوریزا را می‌توان اینگونه توجیه کرد که احتمالاً بعلت وجود رابطه مثبت بین غلظت فسفر و مقدار کلروفیل کل در گیاهان میکوریزایی و باکتریایی، نقش قارچ و باکتری در فراهم نمودن فسفر مورد نیاز گیاه بعنوان حامل انرژی در فتوسنتز تایید می‌شود (دمیر 2004).

این نتایج با نتایج بدست آمده توسط سلواراج و چلاپن (2006) همخوانی دارد. این محققان افزایش در مقادیر کلروفیل‌های a، b و کلروفیل کل را در برگ‌های *Prosopisjuliflora* همزیست با *G. fasciculatum* نشان دادند (چلاپن و سلواراج 2006). همچنین دمیر در سال 2004 نشان داد که محتوای کلروفیل گیاهان فلفل همزیست با قارچ *G. intraradices* در مقایسه با گیاهان غیر میکوریزایی بالاتر بود (دمیر 2004).

نتایج حاصل از آنالیز آماری داده‌ها نشان می‌دهد که در گیاهان شاهد و همچنین در گیاهان تلقیح شده با باکتری‌های محرک رشد گیاه و قارچ ریشه‌های آربوسکولار میکوریزا، در اثر سمیت کادمیوم و با افزایش غلظت فلز میزان نسبی آب برگ (RWC) کاهش نمود (شکل 4).



شکل 4- تاثیر غلظت‌های مختلف کادمیوم بر میزان نسبی آب برگ گیاه بنگدانه در تیمارهای مختلف (Control: شاهد، AM: تلقیح میکوریز و PGPR: تلقیح باکتریهای محرک رشد)

نتایج مشابهی توسط محققان دیگر در مورد افزایش میزان نسبی آب برگ بدنبال تلقیح قارچ آربوسکولار میکوریزا و باکتری‌های محرک رشد تحت تنش شوری خاک گزارش شده است (شیر مردی و همکاران 1389).

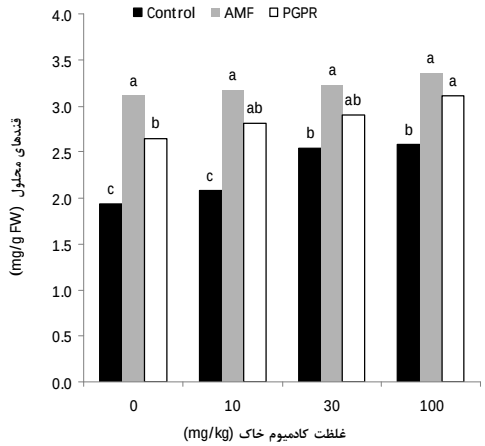
مقدار قندهای محلول و پرولین اندام هوایی همراه با سمیت کادمیوم افزایش یافت. نتایج تجزیه آماری داده‌ها

نشان داد که غلظت قندهای محلول و پرولین در گیاهان تیمار شده با ریزجانداران محرک رشد بطور معنی‌داری ($P\leq 0/05$) در مقایسه با گیاهان شاهد افزایش یافت (شکل 5).

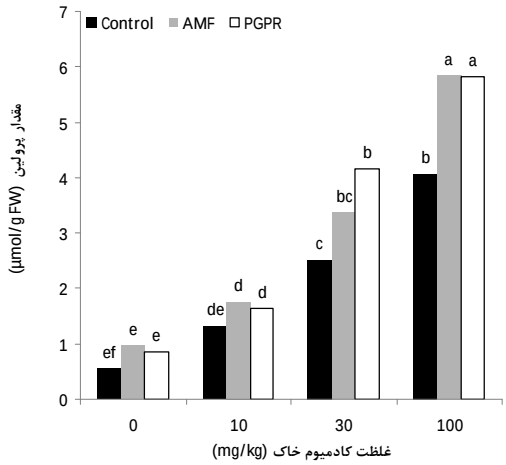
در شرایط تنش‌زای محیطی گیاهان متابولیسم قندها را افزایش می‌دهند. گزارشاتی مبنی بر افزایش قندهای احیا کننده در گیاه برنج ارائه گردیده است. کادمیوم با کاهش انتقال آب به برگ‌ها و اختلال در سرعت تعرق برگ باعث تغییرات فراساختاری در اندامک‌های سلول و تغییر در رفتار آنزیم‌های کلیدی از جمله مسیر متابولیسم قند می‌شود. با تجمع قندهای محلول، گیاه ذخیره کربوهیدراتی خود را برای حفظ متابولیسم پایه سلول در شرایط محیطی تحت تنش، در حد مطلوب نگه می‌دارد (ورما و دوبی 2001).

برهمکنش همزیستی در اجتماعات میکوریزی، بر اساس تبادل کربوهیدرات‌ها و مواد غذایی بین گیاهان و قارچ‌ها می‌باشد. فسفر نقش مهمی را در شکستن کربوهیدرات‌ها و سنتز پلی ساکاریدها ایفا می‌کند به ویژه در سنتز نشاسته از گلوکز بسیار مؤثر می‌باشد. قارچ‌های میکوریز و باکتری‌های محرک رشد گیاه در جذب فسفر موثر می‌باشند (دمیر 2004). محتوای فسفر نیز بر روی پارامترهای فیزیولوژیک در گیاهان تاثیر دارد. یکی از پارامترها افزایش در میزان فتوسنتز است. مشخص شده است که فسفر نقش مهمی را در انتقال انرژی در طول فتوسنتز ایفا می‌کند. بنابراین قارچ‌های میکوریز و باکتری‌های محرک رشد گیاه، محرکی جهت افزایش فعالیت فتوسنتزی می‌باشد (دمیر 2004، سلیسپور 1382). دلیل دیگر برای تاثیر این قارچ‌ها و باکتری‌ها در افزایش محتوای قند، افزایش سطح هورمون‌های گیاهی مانند سیتوکینین و جیبرلین در گیاهان تلقیحی می‌باشد. افزایش در میزان این هورمون-ها بویژه سیتوکینین می‌تواند با انتقال یون‌های موثر در باز شدن روزنه‌ها و تنظیم سطح کلروفیل، موجب افزایش و بالا رفتن سرعت فتوسنتز و در نهایت افزایش محتوای کربوهیدرات‌ها در گیاهان شود (سلواراج و چلاپن 2006).

دمیر (2004) نشان داد که میزان قندهای فروکتوز، α گلوکز، β گلوکز، ساکارز و همچنین محتوای قند کل در گیاهان فلفل همزیست با قارچ *G. intraradices* به صورت معنی‌داری بالاتر از گیاهان شاهد غیر میکوریزایی بوده است.



الف



ب

شکل 5- تاثیر غلظت‌های مختلف کادمیوم بر میزان قندهای محلول (الف) و پرولین (ب) اندام هوایی گیاه بنگدانه در تیمارهای مختلف (Control: شاهد، AM: تلقیح میکوریز و PGPR: تلقیح باکتریهای محرک رشد)

گزارش شده است پرولین در گیاهان تحت شرایط نامناسب رشد، از جمله تنش فلزات سنگین تجمع می‌یابد. بین تجمع پرولین و کمبود آب ایجاد شده توسط فلز سنگین و در نتیجه ممانعت از رشد ریشه، ارتباط نزدیکی گزارش شده است (متوالی و همکاران 2003).

پرولین در تعدیل تنش‌های محیطی، از جمله تنش فلزات سنگین نقش مهمی را ایفا می‌کند. پرولین احتمالاً در سلول‌های تحت تنش نقش آنتی اکسیدانی دارد (ژنگ و همکاران 2010). افزایش تولید پرولین یکی از راهکارهای گیاهان در واکنش به تنش فلزات سنگین افزایش می‌باشد که با کاهش پراکسیداسیون لیپیدها خطر گونه‌های فعال اکسیژن[1] را کاهش داده و موجب کاهش آسیب دیدگی غشاها می‌گردد (سیریپورنادلسیل و همکاران 2002، شالر 2003). تحریک تولید پرولین از گلوتامیک اسید و افزایش مقدار آن در گیاه در خاک‌های آلوده به عناصر سنگین توسط پژوهش‌گران مختلفی گزارش شده است (شالر 2003، آندراده و همکاران 2009، ژنگ و همکاران 2010). افزایش این ماده در شرایط استرس، علاوه بر گیاهان در دامنه وسیعی از موجودات دیگر مثل باکتری‌ها، مخمرها، بی‌مهرگان دریایی و جلبک‌ها مشاهده شده است (مک کیو و هانسون 1990، دلونی و ورما 1993). همچنین معلوم شده است پرولین تاثیر کند کنندگی یون‌ها روی آنزیم‌ها را کاهش می‌دهد و باعث افزایش و پایداری آنزیم‌ها در دماهای بالا می‌شود (والاس 1987). در واقع پرولین بعنوان یک محافظ شیمیایی[2] باعث پایداری فرم طبیعی پروتئین‌ها شده از به هم خوردن شکل طبیعی ترکیبات آنزیمی ممانعت می‌نماید (سالومون و بیر 1994). به نظر می‌رسد گیاهان مورد مطالعه در این تحقیق محتوای پرولین را به منظورهای یاد شده افزایش دادند (شکل 6). نشان داده شده که افزایش غلظت کادمیوم، نیکل و سرب باعث افزایش میزان آنزیم‌ها و پروتئین‌ها در چند گونه علف هرز گردید (اوایس و همکاران 1997). در تحقیق دیگری که روی کلم انجام گرفت مشاهده گردید که کادمیوم موجب افزایش معنی‌دار میزان پرولین می‌شود (لاماس و همکاران 2000).

نتایج بررسی درصد همزیستی طول ریشه نشان داد که با افزایش غلظت کادمیوم، این شاخص بطور معنی‌داری کاهش یافت (جدول 2). در غلظت‌های بالای کادمیوم، درصد همزیستی میکوریزی از 37/5% در شرایط Cd_0 به حدود 10/1% در تیمار Cd_{100} کاهش پیدا نمود. به‌عبارت دیگر درصد همزیستی در بالاترین غلظت کادمیوم به میزان 73% نسبت به شرایط بدون کادمیوم کاهش یافت و می‌توان گفت که به تبع آن بهره‌مندی گیاه از منافع همزیستی با قارچ میکوریز محدود شده‌است. مطالعات نشان داده که عناصر سنگین بر کلونیزاسیون میکوریزی ریشه تأثیر منفی می‌گذارد (لیائو و همکاران 2003، آندراده و همکاران 2008). در گزارشی کیم و همکاران (2004) نشان دادند که در حضور کادمیوم میزان آلودگی میکوریزی درختان کاج کاهش می‌یابد. در مطالعه دیگری با بررسی تاثیر همزیستی میکوریزی بر رشد گیاه ذرت در شرایط آلودگی کادمیوم و فسفر بالا نشان داده شد که با افزایش غلظت کادمیوم کاهش یافت و کادمیوم رشد و گسترش هیف‌های قارچی و طول ریشه‌های آالوده را محدود نمود (سارا و همکاران 2008). به‌هر حال در کشت‌های گلدانی حجم خاکی که در اختیار گیاه است، محدود بوده و ریشه گیاه تقریباً به تمامی حجم خاک دسترسی دارد و با این وجود شبکه هیف قارچ‌ها نمی‌تواند کارائی را که در حجم زیاد خاک مزرعه‌ای دارد، در شرایط گلخانه و کشت گلدانی نشان دهد.

به‌علاوه برخی گزارش‌ها نشان می‌دهند که میکوریزها گیاه میزبان خود را از مسمومیت‌های گیاهی که بر اثر زیادی عناصر سنگین حاصل می‌شود، با استفاده از تغییر ویژگی‌های فلز از شکل زیست فراهم به

[1] Reactive Oxygen Species
[2] Chemical chaperone

شکل غیرزیست فراهم، حفظ می‌کنند (گیسبرت و همکاران 2003، خان 2001).

جدول2- نتایج تاثیر غلظت‌های مختلف کادمیوم بر میزان همزیستی میکوریزی در ریشه بنگدانه

غلظت کادمیوم ($mg\ kg^{-1}$)	همزیستی میکوریزی (%)
0	37/5a
10	30b
30	25b
100	10/1c

امر مسلم این است که اندوزش فلزات در ریشه‌ها و ساقه‌های گیاهان میکوریزی به میزان قابل توجهی نسبت به گیاهان غیرمیکوریزی بالاتر است. شرایط شیمیایی ریزوسفر در نتیجه روابط متقابل بین ریشه گیاهان و ریزجانداران ریزوسفری تغییر می‌یابد. فعل و انفعالات بین گیاه و باکتری می‌تواند منجر به افزایش تولید ترکیباتی گردد که خصوصیات شیمیایی خاک ریزوسفری و در نتیجه اندوزش فلزات سنگین را در گیاهان افزایش دهد (هی و همکاران 2009).

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به نتایج این تحقیق، به نظر می‌رسد که تلقیح گیاهان با قارچ ریشه‌های آربوسکولار میکوریزا و باکتری‌های محرک رشد، با تأثیر مثبت باعث افزایش زیست توده گیاهی شوند. به طور کلی، نتایج این بررسی نشان داد که کاربرد قارچ ریشه‌های آربوسکولار و باکتری‌های محرک رشد گیاه در شرایط تنش فلزات سنگین می‌توانند به رشد گیاه و تولید محصول کمک نمایند. رشد مطلوب گیاهان در شرایط حضور آلاینده‌ها از مهمترین مشکلات مطالعات گیاه‌پالایی بوده و با توجه به نتایج بدست آمده و نقش مؤثر ریزجانداران مفید در تحریک رشد گیاه، استفاده از پتانسیل میکروبی خاک در این‌گونه بررسی‌ها توصیه می‌شود.

منابع مورد استفاده

خلیقی جمال‌آباد ا و خارا ج، 1387. تاثیر قارچ میکوریزای آربوسکولار بر روی تنش اکسیداتیو و برخی پارامترهای رشدی و فیزیولوژی در گیاه گندم رقم آذر 2 تحت سمیت کادمیوم. مجله زیست شناسی ایران. جلد 21، شماره 2 صفحه های 216 تا 230.

سلیسپور م، 1382. مطالعه مزرعه‌ای اثر بخشی کودهای میکروبی فسفاته حاوی میکروارگانیزم‌های حل کننده فسفات بر عملکرد کمی و کیفی ذرت. سومین همایش ملی توسعه کاربرد مواد بیولوژیک و استفاده از کود و سم در کشاورزی، تهران.

شیر مردی م، ثواقبی غ، خاوازی ک، فرحبخش م، رجالی ف و سادات ع، 1389. بررسی بر همکنش قارچ میکوریز و باکتری سودوموناس بر پتانسیل آب برگ و عملکرد دو رقم آفتابگردان در یک خاک شور. مجله تحقیقات آب و خاک ایران. جلد 41، شماره 2. صفحه های 221 تا 228.

علیپور ز و ملکوتی م، 1382. نقش باکتری‌های محرک رشد در رشد و سلامت گیاه. نشریه فنی شماره 309، موسسه تحقیقات آب و خاک، 12 صفحه.

ملک‌زاده ا، علیخانی ح، ثواقبی غ و زارعی م، 1390. برهم‌کنش قارچهای میکوریز آربوسکولار و باکتریهای PGPR مقاوم به کادمیوم در گیاه‌پالایی کادمیوم. نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی)، جلد 25، شماره 2. صفحه های 266 تا 274.

Andrade SA, Silveira AP, Jorge RA and Abreu MF, 2008. Cadmium accumulation in sunflower plants influenced by arbuscular mycorrhiza. Inter J Phytorem 10: 1-13.

Andrade SA, Gratao PL, Schiavinato MA, Silveira AP, Azevedo RA, and Mazzafera P, 2009. Zn uptake, physiological response and stress attenuation in mycorrhizal jack bean growing in soil with increasing Zn concentrations. Chemosphere 75: 1363-1370.

Babich H, and Stotzky G, 1978. Effects of cadmium on the biota: influence of environmental factors. Adv Appl Microbiol 23: 55-117.

Bates LS, Waldren SP and Teare ID, 1973. Rapid determination of free proline for water–stress studies. Plant Soil 39: 205-207.

Brud GI, Dixon DG and Glick BR, 1998. Plant growth promoting bacterium that decreases nickel toxicity in seedlings. Appl Environ Microbiol 64(10): 3663-8.

Brudrett, MC, 2002. Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. New Phytol 154: 275-304.

Burd GI, Dixon DG and Glick BR, 2000. Plant growth-promoting bacteria that decrease heavy metal toxicity in plants. Can J Microbiol 46: 237–245.

Chen BD, Li XL, Tao HQ, Christie P and Wong MH, 2003. The role of arbuscular mycorrhiza in zinc uptake by red clover growing in calcareous soil spiked with various quantities of zinc. Chemosphere 50: 839-846.

Das P, Samantaray S and Rout GR, 1997. Studies on cadmium toxicity in plants: a review. Environ Pollut 98: 29-36.

Davies FT, Puryear JD and Newton RJ, 2001. Mycorrhizal fungi enhance accumulation and tolerance of chromium in sunflower (*Helianthus annuus*). J Plant Physiol 158(6):777-786.

Delauney AJ and Verma DP, 1993. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. The Plant J 4: 215-223.

Demir S, 2004. Influence of arbuscular mycorrhiza on some physiological growth parameters of pepper. Turk J Biol 28: 85-90.

Duffy BK and Defago G, 1999. Environmental factors modulating antibiotic and siderophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. Appl Environ Microbiol 65(6):2429-2438.

Ewaise EA, 1997. Effects of cadmium nickel and lead on growth, chlorophyll content and proteins of weed. Biol Plantarum 39(3):403-410.

Fales F. 1951. The assimilation and degradation of carbohydrates by yeast cells. J Biol Chem 193: 113-124.

Gisbert C, Ros R, De Haro A, Walker DJ, Bernal MP, Serrano R and Navarro-Avino JA, 2003. Plant genetically modified that accumulates Pb is specially promising for phytoremediation. Biochem Biophys Res Commun 5: 303-440

Gupta PK, 2000. Soil, plant, water and fertilizer analysis. Agrobios, New Delhi, India. pp. 438.

Gouia H, Ghorbal MH and Meyer C, 2001. Effect of cadmium on activity of nitrate reductase and on other enzymes of the nitrate assimilation pathway in bean. Plant Physiol 38: 629-638.

Haghiri F, 1973. Cadmium uptake by plants. J Environ Qual 2: 93-96.

He LY, Chen ZJ, Ren GD, Zhang YF, Qian M and Sheng XF, 2009. Increased cadmium and lead uptake of a cadmium hyperaccumulator tomato by cadmium-resistant bacteria. Ecotox Environ Safety 72: 1343-1348.

Jentschke G, and Godbold DL. 2000. Metal toxicity and ectomycorrhizas. Physiol Plantarum 109: 107-116.

Joner EJ and Leyval C, 1997. Uptake of 109 Cd by roots and hyphae of a *Glomus mossea/Trifolium subterraneum* mycorrhiza from soil amended with high and low concentrations of cadmium. New Phytol 135(2):353-360.

Khan AG, 2005. Mycorrhizas and phytoremediation. In: Willey N, editor. Method in biotechnology phytoremediation: methods and reviews. Totowa, USA: Humana Press.

Kim CG, Power SA and Bell JN, 2004. Effects of host plant exposure to cadmium on mycorrhizal infection and soluble carbohydrate levels of *Pinus sylvestris* seedlings. Environ Pollut 131(2):287-94.

Leyval C, Turnau K and Haselwandter R, 1997. Effect of heavy metal pollution on mycorrhizal colonization and function: physiological, ecological and applied aspects. Mycorrhiza 7: 139-153.

Liao JP, Lin XG, Cao ZH, Shi YQ and Wong MH, 2003. Interactions between arbuscular mycorrhizae and heavy metals under sand culture experiment. Chemosphere 509 (6): 847-853.

Lichtenthaler HK and Wellburn AR, 1985. Determination of total carotenoids and chlorophyll a and b of leaf in different solvents. Biol Soc Trans 11, 591-592.

Liu A, Hamel C, Hamilton RI, Ma BL, and Smith DL, 2000. Acquisition of Cu, Zn, Mn and Fe by mycorrhizal maize (*Zea mays* L.) grown in soil at different P and micronutrient levels. Mycorrhiza 9(6):331-336.

Llamas A, Ullrich CI and Sanz A, 2000. Cadmium effects on transmembrance electrical potential difference, respiration and membrane permeability of rice (*Oryza sativa*) roots. Plant Soil 219: 21-28.

Marschner H and Dell B, 1994. Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. Plant Soil 159: 89-102.

McCue KF and Hanson AD, 1990. Drought and salt tolerance: towards understanding and application. Trends Biotech 8: 358-362.

McGonigle TP, Miller MH, Evans DG, Fairchild GL and Swan JA, 1990. A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. New Phytol 115:495-501.

Metwally A, Finkemeier I, George M and Dietz KJ, 2003. Salicylic acid alleviates the cadmium toxicity in barley seedlings. Plant Physiol 132:272-281.

Meyer JM, 2000. Pyoverdines: pigments siderophores and potential taxonomic markers of fluorescent *Pseudomonas* species. Arch Microbiol 174(3):135-142.

Norris JR, Read DJ and Varma AK, 1992. Methods in Microbiology. Volume 24, Techniques for the Study of Mycorrhiza, Academic Press, London.

Pardha A and Saradhi P, 1991. Proline accumulation under heavy metal stress. Plant Physiol 138:554-558.

Prasad M, and Strazalka K. 1999. Impact of heavy metals on photosynthesis. J Exp Bot 41: 314-320.

Rahmanian M, Khodaverdiloo H, Rezaee-Danesh Y and Rasouli-Sadaghiani MH, 2011. Effects of heavy metal resistant soil microbes inoculation and soil Cd concentration on growth and metal uptake of millet, couch grass and alfalfa. Afr J Microbiol Res 5: 403-410.

Sara AL, Andrade D, Adriana PD and Silveira D, 2008. Mycorrhiza influence on maize development under Cd stress and P supply. Braz. J Plant Physiol 20(1):39-50.

Schaller H, 2003. The role of sterols in plant growth and development. Prog Lipid Res 42: 63-175.

Selvaraj T, Chellappan P, 2006. Arbuscular mycorrhizae: A diverse personality. Review Paper. J Cent Eur Agr 7: 349-358.

Siqueria JO, Pereira MA, Simao, JB and Moreira FM, 1999. Effect of formononetin on mycorrhiza colonization and growth corn in soil with excess of heavy metals. Rev Bras Fisiol Veg 23:561-567.

Siripornadulsil S, Traina S, Verma DS, and Sayre RT. 2002. Molecular mechanisms of proline mediated tolerance to toxic heavy metals in transgenic microalgae. Plant Cell 14:2837-2847.

Solomon A and Beer S, 1994. Effect of NaCl on the carboxylating activity of rubisco and absence of proline related compatible solutes. Plant Physiol 108: 1387-1394.

Vassilev A and Yordanov I, 1997. Reductive analysis of factors limiting growth of cadmium–treated plants –A review. Plant Physiol 23: 14-133.

Verma S and Dubey RS, 2001. Effect of cadmium on soluble sugars and enzymes of their metabolism in rice. Biol Plantarum 44: 117-123.

Vogel-Mikus K, Drobne D and Regvar M, 2005. Zn, Cd and Pb accumulation and arbuscular mycorrhizal colonization of pennycress (*Thlaspi praecox* Wulf. Brassicaceae) from the vicinity of a lead mine and smelter Slovenia. Environ Pollut 133: 233-242.

Wallace DM, 1987. Large and Small Phenol Extraction Methods in Enzymology, Academic Press, New York.

Zhang HH, Tang M, Zheng C, 2010. Effect of inoculation with AM fungi on lead uptake, translocation and stress alleviation of *Zea mays* L. seedlings planting in soil with increasing lead concentrations. Eur J Soil Biol 46: 306-311.