

## اثرات تلقیح با ریزوبیوم بر افزایش مقاومت شبدر ایرانی (*Trifolium resupinatum*) به آلودگی گاز دی‌اکسید گوگرد

لادن بیات و مه‌ری عسکری\*

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اراک، کد پستی ۳۸۱۵۶-۸-۸۳۴۹

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۰۹/۱۱؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۲/۱۴)

### چکیده:

ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاهان باکتری‌های مفیدی هستند که سبب افزایش رشد گیاهان و القاء مقاومت نسبت به تنش‌های مختلف می‌شوند. یکی از این تنش‌ها آلودگی دی‌اکسید گوگرد ( $SO_2$ ) است که به عنوان یک آلاینده آسیب‌رسان قوی هوا شناخته شده است. شبدر ایرانی یکی از گیاهان خانواده بقولات است که به عنوان یک گیاه علوفه‌ای مطرح می‌باشد و با باکتری ریزوبیوم همزیست می‌شود. در این مطالعه اثرات ریزوبیوم (سویه بومی و استاندارد) بر میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی و عناصر پتاسیم و فسفر شبدر ایرانی تحت غلظت‌های مختلف گاز دی‌اکسید گوگرد (۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ ppm) ارزیابی شد. نتایج نشان داد که تلقیح ریزوبیوم اثرات مفیدی بر میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی، پتاسیم و فسفر در مقایسه با گیاهان تلقیح نیافته دارد. غلظت‌های بالای  $SO_2$  (۱، ۱/۵ و ۲ ppm) سبب کاهش معنی‌دار میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی و عناصر پتاسیم و فسفر در مقایسه با گیاهان کنترل می‌شود ولی غلظت پایین  $SO_2$  (۰/۵ ppm) بر شاخص‌های فوق تأثیر مثبتی می‌گذارد. تلقیح شبدر ایرانی با دو سویه ریزوبیوم اثرات منفی غلظت‌های بالای گاز  $SO_2$  را بر میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی و عناصر پتاسیم و فسفر کاهش داد. بیشترین مقدار تمامی این شاخص‌ها در ترکیب سویه بومی و غلظت ۰/۵ ppm گاز  $SO_2$  اندازه‌گیری شد. بنابراین ریزوبیوم می‌تواند مقاومت و تحمل گیاه را در برابر تنش‌های غیر زیستی مثل آلودگی  $SO_2$  هوا افزایش دهد.

کلمات کلیدی: آلودگی  $SO_2$ ، پتاسیم، رنگیزه‌های فتوسنتزی، ریزوبیوم، شبدر، فسفر

### مقدمه:

ضعیف ریشه و کاهش توانایی ریشه در اکتساب آب و مواد غذایی می‌شود را کاهش می‌دهد. القاء تولید هورمون‌هایی مثل آبسزیک‌اسید در گیاهان که موجب بسته شدن روزنه‌ها می‌شود و آنتی‌اکسیدان‌هایی مثل سوپراکسیددیسموتاز که باعث مهار رادیکال‌های آزاد می‌شوند از جمله سازوکارهای دیگر به کار رفته توسط این باکتری‌ها است. تولید ترکیبات اسمولیت که در هنگام تنش منجر به ایجاد تعادل اسمزی در گیاه

ریزوبیوم مشهورترین باکتری محرک رشد گیاه و آندوفیت طبیعی گیاهان خانواده بقولات است. این باکتری در تنش‌های غیر زیستی می‌تواند سبب القای مقاومت سیستمیک در گیاهان شود (Dimkpa *et al.*, 2009). از جمله این مکانیسم‌ها می‌توان به تولید آنزیم ACC-دآمیناز اشاره کرد. این آنزیم با تجزیه ACC از تولید هورمون اتیلن جلوگیری می‌کند در نتیجه اثرات اتیلن که موجب رشد

\* نویسنده مسئول، نشانی پست الکترونیکی: m-askary@araku.ac.ir

می‌شوند نیز از دیگر سازوکارها می‌باشد (Yang et al., 2009).

در بین آلاینده‌های اتمسفری، دی‌اکسید گوگرد ( $\text{SO}_2$ ) یکی از سمی‌ترین آلاینده‌ها برای گیاهان است که از طریق روزنه‌ها و کوتیکول جذب می‌شود (Tatsumoto and Yoshinari, 1991).  $\text{SO}_2$  گازی بی‌رنگ و خورنده است که از سوختن سوخت‌های فسیلی غنی از گوگرد مثل زغال‌سنگ و نفت، آتش‌سوزی جنگل، فوران‌های آتشفشانی، ذوب سنگ معدن و تولید آهن، فولاد، آلومینیم، مس، سرب، روی و طلا ایجاد می‌شود و سلامت انسان، حیوانات و گیاهان را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Rakwal et al., 2003). میزان طبیعی  $\text{SO}_2$  در مناطق شهری ۰/۵ - ۰/۰۵ ppm و در مکان‌های با هوای آلوده به میزان ۲ ppm یا بیشتر است (Khan et al., 2006). گسترش اقتصاد پس از جنگ جهانی دوم، منجر به افزایش بی‌سابقه انتشار گاز  $\text{SO}_2$  به محیط شد. در حال حاضر ۴۰٪ انتشار جهانی این گاز از منطقه آسیا، به خصوص چین نشأت می‌گیرد و انتشار جهانی آن به محیط همچنان رو به افزایش است (Smith et al., 2011). آسیب‌هایی که توسط  $\text{SO}_2$  به گیاهان وارد می‌شود یا به صورت آسیب برگی (بافت‌های نکروزه یا مرده و کلروز) بروز می‌کنند یا منجر به اختلال در فرآیندهای متابولیکی و فیزیولوژیکی می‌شود که این خود باعث کاهش رشد و محصول می‌شود و یا باعث تجمع گوگرد اضافی در بافت‌های گیاهی می‌شود (Hijano et al., 2005). غلظت‌های بالا گاز  $\text{SO}_2$  اثرات منفی بر متابولیسم و فرآیندهای رشد و نمو گیاه دارد. گاز دی‌اکسید گوگرد می‌تواند از طریق روزنه‌ها وارد برگ شود و روی ساختار کلروپلاست اثر گذارد و در نهایت رشد و نمو گیاه را تحت تأثیر قرار دهد (Sha et al., 2010). حتی وقتی که روزنه‌ها بسته باشند این گاز می‌تواند با آب واکنش داده و به بی‌سولفیت تبدیل شده و از طریق کوتیکول وارد برگ شود. در کلروپلاست،  $\text{SO}_2$  به سولفیت تبدیل می‌شود و باعث کاهش تثبیت  $\text{CO}_2$ ، جلوگیری از فعالیت

آنزیم‌های فتوسنتزی و کاهش نرخ انتقال الکترون فتوسنتزی می‌شود (Sha et al., 2010, Swanepoel, et al., 2007). کاهش ماده خشک می‌تواند ناشی از بازدارندگی فعالیت فتوسنتزی و کاهش ماده‌سازی در گیاهان (Wali et al., 2007) و یا ناشی از کاهش سطح سبز برگ گیاهان در معرض تنش  $\text{SO}_2$  باشد (Kropff, 1990). تنش دی‌اکسید گوگرد سبب تولید رادیکال‌های آزاد نیز می‌شود که سبب تخریب پراکسیداتیو اجزای سلولی می‌شود. از جمله اثرات سمیت  $\text{SO}_2$  و  $\text{SO}_3^{2-}$  روی گیاهان شامل تخریب پیگمان‌ها، کاهش لیپیدهای سلولی و پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع نیز گزارش شده است (Sha et al., 2010).

شبدر ایرانی (*Trifolium resupinatum* L.) از خانواده بقولات و یک ساله است (Erdemli et al., 2007) که می‌تواند با باکتری ریزوبیوم ارتباط همزیستی برقرار کند (Abbas and Kamel, 2004). این گیاه از مهم‌ترین گیاهان علوفه‌ای است که از ارزش غذایی بالایی برخوردار است و در کشور می‌تواند در تولید و جبران کمبود علوفه نقش مهمی داشته باشد (عباسی، ۱۳۸۷). با توجه به صنایع پتروشیمی و پالایشگاه‌ها سازند که منبع تولید آلاینده  $\text{SO}_2$  در هوای شهرهای صنعتی اراک و شازند می‌باشد، مطالعه حاضر به منظور ارزیابی اثرات گاز  $\text{SO}_2$  هوا به عنوان یک آلاینده بر جذب عناصر فسفر و پتاسیم و مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی گیاه شبدر ایرانی و ارزیابی اثرات دو سویه باکتری ریزوبیوم بر کاهش اثرات منفی آلودگی گاز  $\text{SO}_2$  هوا، به منظور پیشنهاد کشت شبدر در مناطق آلوده و صنعتی نظیر اراک صورت گرفت.

#### مواد و روش‌ها:

**تهیه باکتری و آماده‌سازی مایه تلقیح:** ریزوبیوم بومی از ریشه گیاه شبدر جمع‌آوری شده از زمین‌های مزرعی اطراف اراک استخراج شد (Molla et al., 2001). ریزوبیوم استاندارد ۱۶۸۴ (*Rhizobium meliloti* PTCC) به صورت لیوفیلیزه از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه

هوای بالای هر ظرف انجام شد (Agrawal et al., 1985). در طی این مدت، هوا دهی با پمپ هوا انجام شد. پس از دو ساعت انکوباسیون با باز کردن درب ظروف، گیاهان به هوای معمولی انتقال یافتند. در طی این مدت درب ظروف شاهد (ppm۰) هم بسته بودند و جریان هوای معمولی را نداشتند.

#### سنجش کلروفیل *a*، *b* کلروفیل کل و کارنتوئیدها:

برای اندازه‌گیری کلروفیل از روش آرنون (۱۹۴۹) و کاروتنوئید از روش Lichtenthaler and Welbum (1983) استفاده شد. مقدار کلروفیل *a*، *b* کلروفیل کل و کاروتنوئیدها (شامل کاروتن و گزانتوفیل  $C_{x+c}$ ) برحسب میلی‌گرم کلروفیل یا کاروتنوئید در گرم بافت تر برگ محاسبه گردید.

$$\begin{aligned} \text{Chlorophyll}_a \text{ (Chl}_a\text{)} &= 12.9A_{663} - 2.9A_{645} \\ \text{Chlorophyll}_b \text{ (Chl}_b\text{)} &= 22.9A_{645} - 4.68A_{663} \\ \text{Total Chlorophyll (Tchl)} &= 20.2A_{645} + 8.02A_{663} \\ C_{x+c} &= (1000 A_{470} - 3.27 \text{ chl}_a - 104 \text{ chl}_b) / 229 \end{aligned}$$

#### اندازه‌گیری یون‌های پتاسیم و فسفر بخش هوایی:

اندازه‌گیری پتاسیم به روش فلیم‌فوتومتری (Wang and Zhao, 1995) و فسفر به روش اسپکتروفوتومتری (Creus et al., 2004, Kohler et al., 2007) انجام شد.

آزمایش‌ها در طرح کاملاً تصادفی در قالب آزمایشات فاکتوریل در ۳ تکرار انجام شد. برای آنالیز داده‌ها از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن و برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel استفاده گردید.

#### نتایج:

بررسی مورفولوژی ریشه گیاهان شبدر تلقیح‌شده با ریزوبیوم بومی و استاندارد وجود گرک‌های صورتی رنگ و فعال را در ریشه این گیاهان نشان داد که چنین گرک‌هایی روی ریشه گیاهان تلقیح‌نشده مشاهده نشدند (شکل ۱).

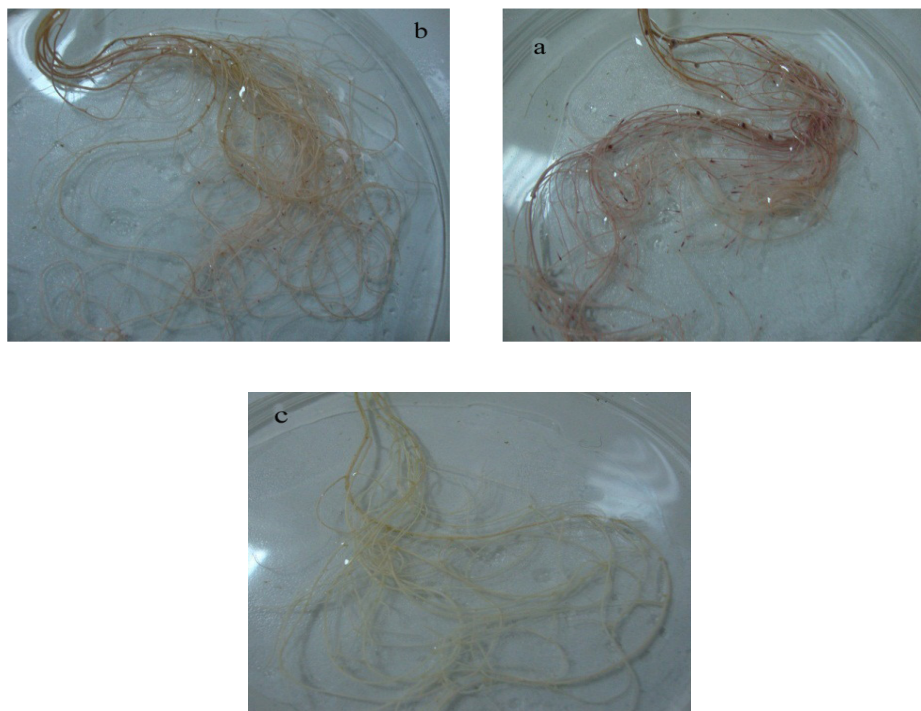
شد و فعال‌سازی باکتری در محیط کشت مایع YMA انجام گردید. از آنجا که غلظت بهینه ریزوبیوم جهت تحریک رشد شبدر  $10^5 \text{ cfu mL}^{-1}$  گزارش شده است (Caetano-Anolles et al., 1988)، غلظت فوق از هر دو سویه ریزوبیوم بومی و ریزوبیوم میلیوتی استاندارد (Bai et al., 2003) تهیه گردید.

#### تهیه و تلقیح بذرها: بذرهاى شبدر ایرانی

*Trifolium resupinatum* L. cv. Alashtar Lorestan) از مرکز تحقیقات جهاد کشاورزی اراک تهیه شد. پس از سترون‌سازی (Wang and Oyaizu, 2009)، بذرهاى سترون شده به سه گروه تقسیم شدند. یک گروه از بذرها در مایه تلقیح باکتری بومی با غلظت  $10^5 \text{ cfu mL}^{-1}$  تحت خلأ و در درجه‌حرارت محیط به مدت ۲ ساعت قرار داده شد. یک گروه مایه تلقیح باکتری استاندارد *R. meliloti* با غلظت  $10^5 \text{ cfu mL}^{-1}$  را با همان شرایط بالا دریافت کردند و گروه سوم شاهد در همان شرایط و در بافر فسفات استریل (بدون باکتری) قرار گرفتند (Bashan et al., 1989). بعد از جوانه‌زنی، بذرها به میکروتیوب‌های استریل درون گلدان (۲۲ در ۳۱ سانتی‌متر) و حاوی دو لیتر محلول غذایی منتقل شدند. اکسیژن‌دهی به وسیله پمپ هوا انجام شد. هر گلدان محتوی بذرهاى شبدر شاهد یا تلقیح شده، یک تیمار در نظر گرفته شد. این ظروف در شرایط محیط در درجه حرارت  $20^\circ\text{C}$  در شب و  $25^\circ\text{C}$  در روز و فتوپریود ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند (Bashan et al., 1989).

#### تزریق گاز $\text{SO}_2$ : گاز دی‌اکسید گوگرد ۰/۱٪ از

پتروشیمی سازند اراک تهیه شد. ۳۱ روز پس از رشد گیاهان، تزریق گاز  $\text{SO}_2$  در غلظت‌های مختلف ۰ (شاهد)، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ ppm به ظروف محتوی گیاهان تلقیح‌نشده، گیاهان تلقیح‌شده با ریزوبیوم بومی و استاندارد انجام شد. تزریق گاز به وسیله سرنگ به مدت ۵ روز و هر روز ۲ ساعت با بستن کامل درب ظروف پلاستیکی به فضای بالای گلدان‌ها، با توجه به فضای



شکل ۱- مقایسه ریشه و گرهک‌ها در گیاهان تلقیح‌شده با باکتری بومی (a)، باکتری استاندارد (b) و تلقیح‌نشده (شکل c).

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر متقابل گاز SO<sub>2</sub> (۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ ppm) و تلقیح باکتریایی بر مقدار کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل، کاروتنوئید، میزان پتاسیم و فسفر گیاهان ۴۱ روزه.

منابع تغییر	کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل کل	کاروتنوئید	پتاسیم	فسفر
تیمار تلقیح باکتریایی	۱۴۰/۶۹**	۲۵۱/۹۲**	۲۵۷/۴۸**	۵۴/۰۲**	۲۸۶/۵۴**	۵۳۳/۳۶**
تیمار گاز SO <sub>2</sub>	۱۱۳/۶**	۴۸۷/۳۲**	۱۶۸/۸**	۶۱۱/۸۲**	۴۹۵/۰۱**	۱۳۱/۹۰**
اثر متقابل تلقیح باکتری و SO <sub>2</sub>	۷/۵۴**	۱۷/۳۵**	۲۹**	۳/۳۱**	۲۹/۹۸**	۱۳/۶۲**
***: معنی دار نیست	*: معنی دار در سطح ۵٪		**: معنی دار در سطح ۱٪			

**اثر تلقیح باکتریایی و گاز SO<sub>2</sub> بر مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی شبدر ایرانی: غلظت‌های مختلف گاز SO<sub>2</sub> و اثر متقابل تلقیح و کلروفیل a، b، کلروفیل کل و کاروتنوئید گیاهان ۴۱ روزه**  
 اثر معنی‌داری در سطح ۱ درصد نشان دادند (جدول ۱).  
 بیشترین میزان کلروفیل a، b، کلروفیل کل و کاروتنوئید در گیاهان ۴۱ روزه تلقیحی با ریزوبیوم بومی مشاهده شد. میزان کلروفیل a، b، کلروفیل کل و کاروتنوئید به ترتیب ۱/۲۶، ۱/۱۷، ۱/۲۴ و ۱/۱۹ برابر میزان این رنگیزه‌ها در گیاهان شاهد است. میزان کلروفیل a، b،

کلروفیل کل و کاروتنوئید گیاهان ۴۱ روزه تلقیح‌شده با ریزوبیوم استاندارد به ترتیب ۱/۱۲، ۱/۴۳، ۱/۰۸ و ۱/۱۷ برابر میزان این رنگیزه‌ها در گیاهان شاهد است (جدول ۲).  
 میزان تمامی رنگیزه‌ها در گیاهان ۴۱ روزه در غلظت پایین گاز SO<sub>2</sub> (۰/۵ ppm) افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهد. به طوری که میزان کلروفیل a، b، کلروفیل کل و کاروتنوئیدها در این غلظت گاز به ترتیب ۱/۱۹، ۱/۲۷، ۱/۲۲ و ۱/۲۸ برابر میزان این رنگیزه‌ها در گیاهان شاهد است. افزایش غلظت گاز SO<sub>2</sub> باعث کاهش معنی‌دار کلروفیل a، b، کلروفیل کل و کاروتنوئیدها تا ۰/۶۴، ۰/۴۳،

جدول ۲- مقایسه میانگین‌های تأثیر تلقیح بر مقدار کلروفیل *a*، کلروفیل *b* و کلروفیل کل، کاروتنوئید (mg/g وزن تر برگ) و مقدار عناصر پتاسیم و فسفر (mg/g وزن خشک برگ) گیاهان ۴۱ روزه

شاخص	تلقیح باکتریایی		
	بدون تلقیح -R	تلقیح با ریزوبیوم بومی	تلقیح با <i>R. meliloti</i>
کلروفیل <i>a</i> (mg/g FW)	۱/۴۱ <sup>c</sup> ± ۰/۱۵	۱/۷۹ <sup>a</sup> ± ۰/۱۹	۱/۵۹ <sup>b</sup> ± ۰/۱۶
کلروفیل <i>b</i> (mg/g FW)	۰/۶۹ <sup>c</sup> ± ۰/۰۵	۰/۹۹ <sup>a</sup> ± ۰/۰۸	۰/۸۱ <sup>b</sup> ± ۰/۰۶
کلروفیل کل (mg/g FW)	۲/۲۶ <sup>c</sup> ± ۰/۱۸	۲/۸۱ <sup>a</sup> ± ۰/۳	۲/۴۵ <sup>b</sup> ± ۰/۲
کاروتنوئید (mg/g FW)	۰/۹۸ <sup>b</sup> ± ۰/۰۹	۱/۱۷ <sup>a</sup> ± ۰/۱۱	۱/۱۵ <sup>a</sup> ± ۰/۱
پتاسیم (mg/g DW)	۱۵/۲ <sup>c</sup> ± ۱/۴	۲۶/۷۳ <sup>a</sup> ± ۳/۳	۲۰/۶۳ <sup>b</sup> ± ۲/۱
فسفر (mg/g DW)	۲/۲۵ <sup>c</sup> ± ۰/۲	۳/۶۹ <sup>a</sup> ± ۰/۳۹	۲/۹۷ <sup>b</sup> ± ۰/۳

حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها مطابق آزمون دانکن است. داده‌ها میانگین ۳ تکرار ± SE و مقایسه برای هر ردیف جداگانه انجام شده است.

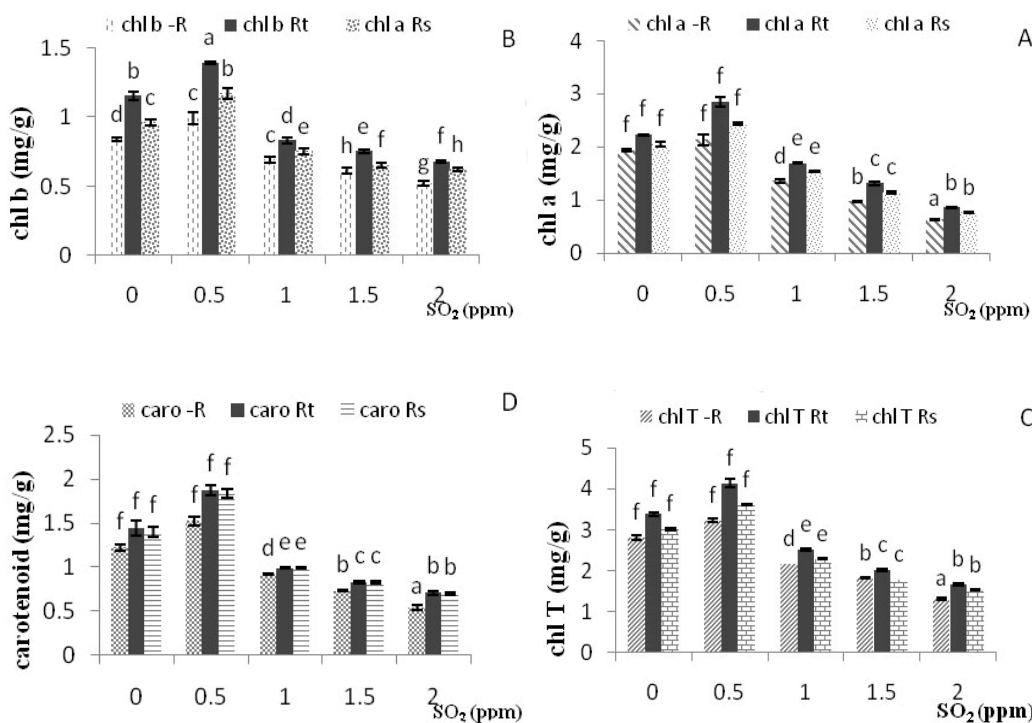
جدول ۳- مقایسه میانگین‌های اثر غلظت‌های مختلف گاز SO<sub>2</sub> بر مقدار کلروفیل *a*، *b*، کلروفیل کل، کاروتنوئید (mg/g وزن تر برگ) و مقدار عناصر پتاسیم و فسفر (mg/g وزن خشک برگ) شبدر ایرانی.

شاخص	غلظت‌های مختلف گاز SO <sub>2</sub> (ppm)				
	۰	۰/۵	۱	۱/۵	۲
کلروفیل <i>a</i> (mg/g FW)	۲/۰۷ <sup>b</sup> ± ۰/۰۴	۲/۴۸ <sup>a</sup> ± ۰/۱	۱/۵۳ <sup>c</sup> ± ۰/۰۵	۱/۱۴ <sup>d</sup> ± ۰/۰۵	۰/۷۵ <sup>e</sup> ± ۰/۰۳
کلروفیل <i>b</i> (mg/g FW)	۰/۹۸ <sup>b</sup> ± ۰/۰۵	۱/۲۵ <sup>a</sup> ± ۰/۰۹	۰/۷۴ <sup>c</sup> ± ۰/۰۳	۰/۶۴ <sup>d</sup> ± ۰/۰۹	۰/۵۶ <sup>e</sup> ± ۰/۰۳
کلروفیل کل (mg/g FW)	۳/۰۶ <sup>b</sup> ± ۰/۰۸	۳/۷۶ <sup>a</sup> ± ۰/۱۸	۲/۳۲ <sup>c</sup> ± ۰/۱۶	۱/۸۸ <sup>d</sup> ± ۰/۱۱	۱/۵۱ <sup>e</sup> ± ۰/۱۶
کاروتنوئید (mg/g FW)	۱/۳۵ <sup>b</sup> ± ۰/۰۳	۱/۷۴ <sup>a</sup> ± ۰/۰۶	۰/۹۷ <sup>c</sup> ± ۰/۰۱	۰/۷۹ <sup>d</sup> ± ۰/۰۲	۰/۶۵ <sup>e</sup> ± ۰/۰۳
پتاسیم (mg/g DW)	۲۵/۴۳ <sup>b</sup> ± ۲/۶	۳۵ <sup>a</sup> ± ۲/۹	۱۹/۶۱ <sup>c</sup> ± ۱/۶	۱۴/۱ <sup>d</sup> ± ۰/۷	۱۰/۱۴ <sup>e</sup> ± ۰/۴
فسفر (mg/g DW)	۳/۷۱ <sup>b</sup> ± ۰/۲	۵/۰۶ <sup>a</sup> ± ۰/۳	۲/۸۵ <sup>c</sup> ± ۰/۲	۱/۹۴ <sup>d</sup> ± ۰/۱	۱/۳۱ <sup>e</sup> ± ۰/۱

حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها مطابق آزمون دانکن است. داده‌ها میانگین ۳ تکرار ± SE و مقایسه برای هر ردیف جداگانه انجام شده است.

میزان آن‌ها در گیاهان شاهد است. کم‌ترین میزان رنگیزه‌ها در گیاهان تلقیح‌نشده و غلظت ۲ ppm SO<sub>2</sub> مشاهده شد. کاهش ۶۸، ۴۵، ۵۳ و ۵۶ درصدی کلروفیل *a*، *b*، کلروفیل کل و کاروتنوئیدها که در گیاهان بدون تلقیح و ۲ ppm گاز به ترتیب مشاهده شد در همان تیمار گازی در گیاهان تلقیح با ریزوبیوم بومی ۵۶، ۱۸، ۴۰ و ۴۳٪ در گیاهان تلقیح با ریزوبیوم استاندارد ۶۱، ۳۴، ۴۵ و ۴۳٪ اندازه‌گیری شد (شکل ۲).

۵۱٪ و ۵۷٪ به ترتیب شد (جدول ۳). بیشترین میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی در گیاهان تلقیحی با باکتری بومی و غلظت ۰/۵ ppm SO<sub>2</sub> مشاهده شد. میزان کلروفیل *a*، *b*، کلروفیل کل و کاروتنوئیدها به ترتیب ۱/۴۶، ۱/۹۱، ۱/۵۸ و ۱/۵۳ برابر میزان این رنگیزه‌ها در گیاهان شاهد است. میزان کلروفیل *a*، *b* و کلروفیل کل در تلقیح با باکتری استاندارد به ترتیب ۱/۲۵، ۱/۴۰، ۱/۲۸ و ۱/۵ برابر

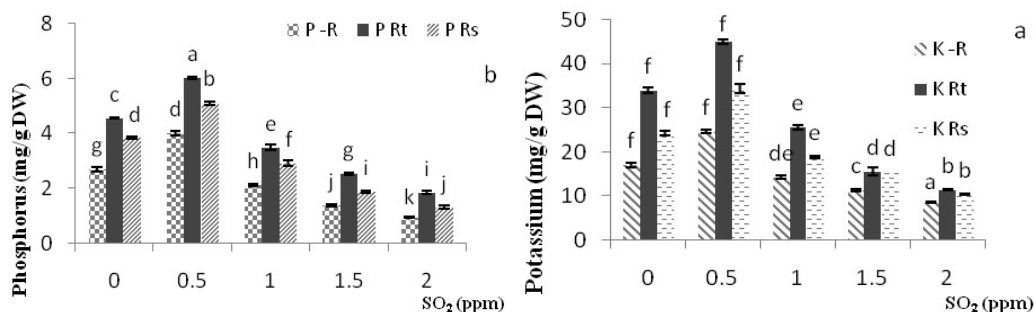


شکل ۲- اثرات متقابل غلظت‌های مختلف گاز SO<sub>2</sub> و تلقیح باکتریایی (بدون تلقیح -R، تلقیح با ریزوبیوم بومی Rt و استاندارد (Rs) بر میزان (A) کلروفیل a، (B) کلروفیل b، (C) کلروفیل کل و (D) کاروتنوئید برگ شیدر ایرانی. خطوط نشان‌دهنده خطای استاندارد (SE) است. حروف غیرمشابه نشان‌دهنده معنی‌دار بودن اختلاف بین میانگین‌ها برای هر شاخص می‌باشد.

۲ ppm به ترتیب ۲۲/۹۱٪، ۴۴/۶۹٪ و ۶۰/۱۴٪ نسبت به گیاهان شاهد محاسبه شد. کاهش میزان فسفر در همین غلظت‌ها به ترتیب ۲۳/۱۸٪، ۴۷/۷۰٪ و ۶۴/۶۹٪ اندازه‌گیری شد (جدول ۳).

بیشترین مقدار پتاسیم و فسفر در گیاهان تلقیحی با باکتری بومی و غلظت ۵/۵ ppm SO<sub>2</sub> مشاهده شد. کم‌ترین مقدار پتاسیم و فسفر در گیاهان بدون تلقیح و غلظت ۲ ppm SO<sub>2</sub> به ترتیب با ۴۹٪ و ۶۴/۴۴٪ کاهش نسبت به گیاهان شاهد (گیاهان بدون تلقیح و غلظت ۰ ppm) مشاهده شد. گیاهان تلقیح یافته تحت ۲ ppm گاز SO<sub>2</sub> کاهش کمتری را در میزان پتاسیم و فسفر نشان دادند، در این غلظت گاز گیاهان تلقیح‌یافته با ریزوبیوم بومی ۳۲/۹۴٪ و گیاهان تلقیح‌یافته با *R. meliloti* میزان ۳۸/۶۴٪ کاهش پتاسیم را نسبت به شاهد نشان دادند. در همین غلظت گاز گیاهان تلقیح‌شده با ریزوبیوم بومی ۳۱/۱۱٪ و گیاهان

اثر تلقیح باکتریایی و SO<sub>2</sub> بر مقدار پتاسیم و فسفر شیدر ایرانی: تلقیح باکتریایی، گاز SO<sub>2</sub> و اثر متقابل تلقیح باکتریایی و گاز SO<sub>2</sub> بر مقدار پتاسیم و فسفر گیاهان ۴۱ روزه اثر معنی‌داری (سطح ۰/۰۱) نشان داد (جدول ۱). بیشترین مقدار پتاسیم و فسفر در گیاهان ۴۱ روزه تلقیح با ریزوبیوم بومی به ترتیب با ۷۵/۸۵٪ و ۶۴٪ افزایش نسبت به شاهد تلقیح‌نشده مشاهده شد. مقدار پتاسیم و فسفر گیاهان تلقیح با ریزوبیوم استاندارد نیز به ترتیب ۳۵/۷۲٪ و ۳۲٪ افزایش را نسبت به شاهد نشان دادند (جدول ۲). در غلظت ۰/۵ ppm گاز SO<sub>2</sub> به ترتیب افزایش معنی‌دار ۳۷/۵۷٪ و ۳۶/۳۸٪ در میزان پتاسیم و فسفر نسبت به گیاهان شاهد (۰ ppm) مشاهده شد ولی در غلظت‌های ۱/۵ و ۲ ppm گاز SO<sub>2</sub> با افزایش شدت تنش میزان پتاسیم و فسفر نسبت به گیاهان شاهد کاهش معنی‌داری را نشان داد. کاهش میزان پتاسیم در غلظت‌های ۱/۵ و



شکل ۳- اثرات متقابل غلظت‌های مختلف گاز SO<sub>2</sub> و تلقیح باکتریایی (بدون تلقیح R-، تلقیح با ریزوبیوم بومی Rt و استاندارد Rs) بر میزان پتاسیم (a) و فسفر (b) برگ شیدر ایرانی. خطوط نشان‌دهنده خطای استاندارد (SE) است. حروف غیرمشابه نشان‌دهنده معنی‌دار بودن اختلاف بین میانگین‌ها برای هر شاخص می‌باشد.

تولیدی توسط باکتری، جذب برخی عناصر مثل منیزیم (Creus *et al.*, 2004) که در ساختمان کلروفیل وجود دارد افزایش می‌یابد (Bai *et al.*, 2003). با توجه به نقش نیتروژن و منیزیم در بیوسنتز کلروفیل، بنابراین مقدار کلروفیل برگ گیاهان تلقیح شده افزایش می‌یابد و این هم سازوکاری جهت افزایش محصولات فتوسنتزی و در نتیجه رشد بهتر گیاه تلقیح‌شده، می‌باشد (Bashan and de-Bashan, 2005).

تلقیح باکتریایی بر مقدار پتاسیم و فسفر نیز اثر معنی‌داری داشت. مقدار پتاسیم و فسفر در تلقیح با باکتری بومی نسبت به باکتری استاندارد افزایش بیشتری را نشان داد. نتایج مشابه در تلقیح *Arachis hypogaea* (Basu, 2011) و برنج (Hussain *et al.*, 2009) با ریزوبیوم مشاهده گردید. باکتری‌های ریزوبیوم با ترشح ترکیباتی مثل اسیدهای آلی (نگه‌داشتن شکل معدنی فسفر در خاک)، آنزیم‌هایی مثل فیتاز و اسیدفسفاتاز (معدنی‌کردن فسفر آلی)، ترشح پروتون (کاهش pH و ایجاد pH اسیدی مناسب برای محلول‌ترین شکل فسفر  $H_2PO_4^-$ ) و ترکیبات اگزوپلی‌ساکاریدی (جدا نگه‌داشتن شکل محلول فسفر از شکل غیرمحلول آن) سبب افزایش فسفر معدنی محلول و در دسترس برای گیاهان می‌شوند (Bashan and de-Bashan, 2005). باکتری‌های افزایش‌دهنده رشد مثل ریزوبیوم جذب یون‌های معدنی مثل فسفر و پتاسیم توسط گیاه را از طریق تحریک پمپ پروتون-ATPase نیز افزایش می‌دهند

تلقیح‌شده با *R. meliloti* ۵۱/۵٪ کاهش فسفر را نسبت به شاهد نشان دادند (شکل ۳a, b).

#### بحث:

در بررسی حاضر مقدار تمامی رنگیزه‌ها در اثر تلقیح با ریزوبیوم نسبت به گیاهان تلقیح‌نیافته افزایش معنی‌داری یافتند. مقدار این رنگیزه‌ها در تلقیح با باکتری بومی نسبت به باکتری استاندارد افزایش بیشتری را نشان داد. نتایج مشابه در تلقیح *Phaseolus vulgaris* با ریزوبیوم (Bambara and Ndadikemi, 2009) و تلقیح *Cicer arietinum* با ریزوبیوم لگومینوزاروم (Bejandi *et al.*, 2012) مشاهده شد. پاسخ گیاه میزبان در تلقیح با برخی از باکتری‌های محرک رشد از جمله ریزوبیوم به صورت افزایش مقدار کلروفیل و سایر رنگیزه‌ها ظاهر می‌شود که سبب افزایش فتوسنتز شده و به دنبال آن افزایش رشد و محصول گیاه رخ می‌دهد (Alam *et al.*, 2001). افزایش این رنگیزه‌ها به افزایش تثبیت نیتروژن توسط این باکتری‌ها بر می‌گردد. ترکیبات نیتروژنه حاصل از تثبیت نیتروژن در گرهک‌های ریشه به شکل آلانتوئین و اسیدهای آلانتوئیک به ریشه ترشح و به برگ‌ها منتقل می‌شوند و در بیوسنتز کلروفیل و پروتئین‌های ضروری برای فتوسنتز استفاده می‌شوند (Bejandi *et al.*, 2012). همچنین به دنبال تلقیح باکتریایی، به دلیل افزایش سطح ریشه ناشی از هورمون اکسین

از طرفی تأثیر گاز  $\text{SO}_2$  بر گیاهان وابسته به گونه گیاهی، مدت زمان در معرض  $\text{SO}_2$  قرار گرفتن و غلظت  $\text{SO}_2$  متفاوت است (Hijano *et al.*, 2005). دی‌اکسید گوگرد هوا در غلظت‌های پایین دارای اثرات مثبت بر رشد و نمو گیاه می‌باشد و به عنوان یک منبع تأمین‌کننده گوگرد مورد نیاز گیاه محسوب می‌شود. گوگرد یکی از عناصر ضروری برای رشد گیاهان است. ریشه گیاهان می‌توانند آنیون‌های سولفات  $\text{SO}_4^{2-}$  را از خاک جذب کنند؛ برگ‌ها نیز می‌توانند  $\text{SO}_2$  را از جو جذب کنند. دی‌اکسید گوگرد پس از ورود به گیاه، در فاز آبی دیواره سلولی حل می‌شود و بی‌سولفیت  $\text{HSO}_3^-$  و سولفیت را تشکیل می‌دهد، که این مواد تحت واکنش آنزیمی به  $\text{SO}_4^-$  تبدیل می‌شوند.  $\text{SO}_4^-$  به داخل سلول‌های برگ منتقل می‌شود و در آنجا برای ساخت مولکول‌های آلی شامل آمینواسیدهایی مثل سیستئین و متیونین که سپس پروتئین را تشکیل می‌دهند، استفاده می‌شود (Swanepoel *et al.*, 2007). در بسیاری از کشورهای صنعتی و آلوده مثل چین که از آلوده‌ترین کشورهای جهان است، گوگرد مورد نیاز گیاهان زراعی (مثل کلم چینی) از سولفور اتمسفری تأمین می‌شود (De Kok *et al.*, 2000) ولی جذب اضافه و زیاد گوگرد از خاک یا اتمسفر می‌تواند باعث آسیب به گیاهان شود (Swanepoel *et al.*, 2007). در غلظت‌های بالای  $\text{SO}_2$ ، سولفیت‌های حاصل از  $\text{SO}_2$  با کلروفیل واکنش داده و تولید رادیکال‌های سوپراکسید می‌کند (Shimazaki *et al.*, 1980). همچنین  $\text{SO}_2$  با آزاد کردن یون منیزیم از کلروفیل *a* باعث تبدیل شدن کلروفیل *a* به می‌شود و  $\text{SO}_2$  با افزایش فعالیت آنزیم کلروفیل‌لاز با دفع گروه فیتول از کلروفیل *b* باعث تبدیل کلروفیل *b* به کلروفیلاید *b* می‌شود (Malhotra, 1977). کاهش در محتوای کاروتنوئیدی می‌تواند به علت تشکیل سولفوریک‌اسید پس از ترکیب  $\text{SO}_2$  با آب در بافت‌های گیاهی و تجزیه بعدی این اسید به یون‌های  $\text{H}^+$  و  $\text{HSO}_3^-$  که باعث تجزیه رنگیزه‌ها می‌شود، باشد (Irshad *et al.*, 2011). اثر  $\text{SO}_2$  روی محتوای کاروتنوئیدی به گونه

(Mantelin and Touraine, 2004). همچنین مطالعات نشان داده‌اند که یکی دیگر از مکانیسم‌های این باکتری‌ها برای افزایش جذب یون‌ها، تحریک نمو ریشه می‌باشد که این کار را با تولید هورمون‌هایی مثل ایندول‌استیک‌اسید انجام می‌دهد (Kloepper, *et al.*, 2007). توانایی تثبیت  $\text{N}_2$  توسط ریزوبیوم و افزایش حجم و سطح ریشه به دنبال تلقیح گیاهان با باکتری‌های PGPR مثل ریزوبیوم، سبب افزایش جذب عناصری مثل نیتروژن، فسفر، پتاسیم، منیزیم می‌شود، سازوکاری که توسط بسیاری از محققان گزارش شده است (Askary *et al.*, 2009; Bai *et al.*, 2003). مهم‌ترین مکانیسم تحریک رشد توسط سویه‌های ریزوبیومی، تولید فیتوهورمون‌های ایندولی می‌باشد که نتیجه آن رشد بهتر ریشه، به دنبال آن افزایش جذب آب و عناصر غذایی (فسفر، نیتروژن و پتاسیم) توسط گیاه و افزایش رشد می‌باشد. باکتری‌های ریزوبیومی توانایی تولید این فیتوهورمون‌ها را دارند اما این توانایی در بین گونه‌های مختلف ریزوبیومی و نیز در بین سویه‌های متعلق به هر گونه، یکسان نیست. بنابراین اثر گونه‌ها و سویه‌های مختلف ریزوبیومی روی گیاهان متفاوت است (اعتصامی و علی خانی، ۱۳۹۰) همان‌طور که در این تحقیق نیز اثر سویه بومی و استاندارد ریزوبیوم ملیوتی روی گیاه متفاوت بود. مشابه اثرات مثبت تلقیح گندم و ذرت با سویه‌های همولوگ (ایزوله شده از ریشه‌های استریل همان گیاه) که بیشتر از اثرات سویه‌های هترولوگ (ایزوله شده از ریشه سایر گیاهان) بر گیاهان تلقیح یافته است و به همین علت محققین مطرح می‌کنند که ژنوتیپ گیاهی و سویه همولوگ باکتری نقش مهمی در برقراری جریان تثبیت بیولوژیک نیتروژن بازی می‌کنند (Askary *et al.*, 2009; Bashan and de - Bashan 2005). از نظر محققین وقتی غلظت گاز  $\text{SO}_2$  از حد طبیعی که بین  $0.5-0.5\text{ppm}$  می‌باشد، بیشتر شود آلودگی گاز  $\text{SO}_2$  رخ می‌دهد (Wali *et al.*, 2007; Khan *et al.*, 2006). بنابراین غلظت  $0.5\text{ppm}$  غلظت سمی برای گیاه نمی‌باشد.



کاهش نشان دادند در تلقیح با باکتری کاهش کمتری را نسبت به گیاهان تلقیح نیافته نشان دادند. اثر باکتری بومی نسبت به استاندارد در کاهش اثرات SO<sub>2</sub> بر مقدار رنگیزه‌ها مؤثرتر بود. کاهش شرایط تنش ناشی از تلقیح ریزوبیومی در مورد رنگیزه‌ها در گزارشات مختلفی ذکر شده است. نتایج مشابه برای نخود (Ogutcu et al., 2010) و *Lactuca sativa* تلقیح شده با ریزوبیوم (Han and Lee, 2005) تحت تنش شوری گزارش شده است.

در بررسی حاضر بیشترین مقدار پتاسیم و فسفر در گیاهان تلقیح یافته با ریزوبیوم و کمترین مقدار در گیاهان بدون تلقیح و ۲ ppm SO<sub>2</sub> مشاهده شد. تلقیح با ریزوبیوم بومی و استاندارد کاهش مقدار پتاسیم و فسفر که در غلظت‌های بالای SO<sub>2</sub> ایجاد شد، را بهبود بخشید و میزان کاهش جذب دو عنصر را کاهش داد. نتایج مشابه در تلقیح *Lactuca sativa* (Han and Lee, 2005) و گیاه *Acacia saligna* با ریزوبیوم تحت تنش شوری (Soliman et al., 2012) مشاهده شده است. افزایش سطح ریشه که به دنبال تلقیح گیاهان با باکتری‌های محرک رشد انجام می‌شود، سبب افزایش جذب عناصری مثل پتاسیم و فسفر از محیط ریشه، هم در گیاهان تحت تنش و هم در گیاهان بدون تنش، می‌شود و این می‌تواند دلیلی بر رشد بهتر و بقا بیشتر گیاهان تلقیح شده باشد (Bashan and de-Bashan, 2005). توانایی باکتری برای تولید محرک‌های رشد مثل اکسین که با افزایش سطح ریشه، جذب عناصری مثل نیتروژن و منیزیم را که برای بیوستز کلروفیل ضروری هستند افزایش می‌دهد (Bagheri, 2011) و همچنین لومیکروم سنتزی توسط باکتری ریزوبیوم که در افزایش مقدار کلروفیل نقش دارند سبب می‌شود که تلقیح باکتریایی در جبران اثرات منفی تنش‌ها بر مقدار کلروفیل نقش مهمی ایفا کند (Matiru and Dakora, 2005). از آن جایی که افزایش مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی از جمله کلروفیل پارامتری است که با افزایش فتوسنتز همراه است بنابراین افزایش تولیدات فتوسنتزی ناشی از افزایش رنگیزه‌ها، سبب افزایش رشد گیاه و محصول می‌شود (Alam et al., 2001).

گیاهی و غلظت گاز SO<sub>2</sub> بستگی دارد (Bhardwaj et al., 2012). غلظت پایین SO<sub>2</sub> (۰/۵ ppm) در محتوای کاروتنوئیدی همیشه بهار اثرات تحریک‌کنندگی داشت، اما غلظت‌های بالاتر SO<sub>2</sub> (۱، ۱/۵ و ۲ ppm) در مقایسه با نمونه‌های شاهد موجب کاهش محتوای کاروتنوئیدی شد (Wali et al., 2007).

در مطالعه حاضر در غلظت ۰/۵ ppm SO<sub>2</sub> میزان پتاسیم و فسفر افزایش معنی‌داری نسبت به گیاهان شاهد نشان داد و همراه با افزایش غلظت گاز میزان پتاسیم و فسفر کاهش معنی‌داری یافت. نتایج مشابه در *Vicia faba* مشاهده شد (Agrawal et al., 1985). گیاهان عالی قادر به تنظیم مقدار سولفور کلی خود از طریق ایجاد یک تعادل بین غلظت سولفیت و سولفات هستند. این تعادل از طریق تشکیل سولفیت در نور و سولفات در تاریکی ایجاد می‌شود، قسمتی از SO<sub>2</sub> که به سولفات تبدیل می‌شود در ساختار ذرات آلی مثل آمینواسیدها و پروتئین‌های گوگرد دار استفاده می‌شود و قسمتی به فرم SO<sub>2</sub> یا SH<sub>2</sub> در عمل تبادل گازی طبیعی حذف می‌شود. زمانی که غلظت SO<sub>2</sub> اتمسفری به مقادیر سمی بالای ۰/۵ ppm می‌رسد آسیب‌های نکرده و فیزیولوژیک ایجاد می‌شوند (Hijano et al., 2005). بنابراین افزایش عناصر در غلظت پایین گاز ناشی از افزایش پروتئین‌سازی و در نتیجه رشد بیشتر ریشه (سطح جذب عناصر) (Swanepoel et al., 2007) است و کاهش میزان عناصر که در غلظت‌های بالای رخ می‌دهد می‌تواند به علت کاهش کلروفیل و فتوسنتز گیاه (Irshad et al., 2011) و در نتیجه کاهش رشد و نمو گیاه (Sha et al., 2010) باشد.

نتایج تحقیق حاضر نشان‌دهنده افزایش مقاومت شبدر تلقیح یافته به غلظت‌های بالای SO<sub>2</sub> است. بیشترین میزان رنگیزه‌ها در گیاهان تلقیح شده با ریزوبیوم بومی و غلظت ۰/۵ ppm SO<sub>2</sub> و کمترین میزان در گیاهان تلقیح نشده و غلظت ۲ ppm SO<sub>2</sub> مشاهده شد. میزان کلروفیل *b*، *a* کلروفیل کل و کاروتنوئید که در غلظت‌های بالای SO<sub>2</sub>

**نتیجه گیری:**

رنگیزه‌های فتوسنتزی و افزایش جذب عناصر ضروری مثل فسفر و پتاسیم به دنبال تلقیح ریزوبیومی از ساز و کارهای گیاهان تلقیح شده برای رشد و مقاومت بیشتر در تنش‌ها است.

**تشکر و قدردانی:**

از حوزه معاونت محترم پژوهشی و فناوری دانشگاه اراک که حمایت مالی و اجرایی این تحقیق را به عهده داشتند صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود.

غلظت ۰/۵ ppm گاز SO<sub>2</sub> بر میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی و عناصر پتاسیم و فسفر برگ شبدر ایرانی اثر مثبت داشته و سبب افزایش این شاخص‌ها شده است ولی غلظت‌های بالاتر روی میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی و عناصر پتاسیم و فسفر اثر منفی گذاشته و شرایط تنش‌زا برای گیاه ایجاد می‌نماید. با برقراری یک همزیستی مفید و کارآمد بین گیاهان و ریزوباکترهای محرک رشد می‌توان اثر آلودگی SO<sub>2</sub> را کاهش داد و در این راستا باکتری بومی تأثیر بیش‌تری بر کاهش اثرات تنش SO<sub>2</sub> دارد. افزایش مقدار

**منابع:**

- and Mahdavi). American-Eurasian Journal Agricultural & Environmental Science 5: 296-307.
- Bagheri, A. R. (2011) Effect of salinity and inoculation with *Azospirillum* on carbohydrate production, nitrogen status and yield of barley. African Journal of Biotechnology 10: 9089-9096.
- Bai, Y., Zhou, X. and Smith, D. L. (2003) Crop ecology, management and quality: enhanced soybean plant growth resulting from coinoculation of *Bacillus* strains with *Bradyrhizobium japonicum*. Crop Science 43: 1774-1781.
- Bambara, S. and Ndakidemi, P. A. (2009) Effects of *Rhizobium* inoculation, lime and molybdenum on photosynthesis and chlorophyll content of *Phaseolus vulgaris* L. African Journal of Microbiology Research 3: 791-798.
- Bashan, Y., and de-Bashan, L.E. (2005) Bacteria/Plant growth-promotion. In: Encyclopedia of soils in the environment (ed. Hillel, D.) PP.103-115. Elsevier, Oxford, U.K.
- Bashan, Y., Levanony, H. and Mitiku, G. (1989) Changes in proton efflux of intact wheat roots induced by *Azospirillum brasilense* Cd. Canadian Journal of Microbiology 35: 691-697.
- Basu, T. K. (2011) Effect of cobalt, *Rhizobium* and phosphobacterium inoculations on growth, yield, quality and nutrient uptake of summer groundnut (*Arachis hypogaea*). American Journal of Experimental Agriculture 1: 21-26.
- Bejandi, T. K., Sharifii, R. S., Sedghi, M. and Namvar, A. (2012) Effects of plant density, *Rhizobium* inoculation and microelements on nodulation, chlorophyll content and yield of chickpea (*Cicer arietinum* L.). Annals of Biological Research 3: 951-958.
- Bhardwaj, M. K., Chaudhary, R. and Bhardwaj, A. (2012) Studies on growth and biochemical responses in *Solanum melongena* cv. Pusa Purple Round under sulphur dioxide stress. Indian
- اعتصامی، ح. و علی‌خانی، ح. (۱۳۹۰) ارزیابی توان تولید هورمون‌های اکسینی (IAA) توسط سویه‌های ریزوبیومی بومی خاک‌های ایران و اثرات کاربرد سویه‌های برتر بر شاخص‌های رشد گیاه گندم و هدرروی کودهای شیمیایی. زراعت (پژوهش و سازندگی) ۲۴:۵۳-۶۲.
- عباسی، م. (۱۳۸۷) بررسی تنوع در خزانه‌های ژنتیکی شبدر ایرانی (*Trifolium resupinatum* L.) موجود در بانک ژن گیاهی ملی ایران. دو فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران ۱۶: ۳۷-۴۹.
- Abbas, S. M. and Kamel, E. A. (2004) *Rhizobium* as a biological agent for preventing heavy metal stress. Asian Journal of Plant Science 3: 416-424.
- Agrawal, M., Nandi, P. K. and Rao, D. N. (1985) Effects of sulphur dioxide fumigation on soil system and growth behaviour of *Vicia faba* plants. Plant and Soil 86: 69-78.
- Alam, M. S., Cui, Z. J., Yamagishi, T., and Ishii, R. (2001) Grain yield and related physiological characteristics of rice plants (*Oryza sativa* L.) inoculated with free-living rhizobacteria. Plant Production Science 4: 126-130.
- Askary, M., Mostajeran, A., Amooaghaei, R. and Mostajeran, M. (2009) Influence of the coinoculation *Azospirillum brasilense* and *Rhizobium meliloti* plus 2,4-D on grain yield and N, P, K content of *Triticum Arestivum* (cv. Baccross

- Lichtenthaler, H. K. and Wellburn, A. R. (1983) Determinations of total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions* 11: 591 – 592.
- Malhotra, S. S. (1977) Effects of aqueous sulphur dioxide on chlorophyll destruction in *Pinus contorta*. *New Phytologist* 78: 101-109.
- Mantelin, S. and Touraine, B. (2004) Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability impacts on root development and nitrate uptake. *Experimental Botany* 55: 27–34.
- Matiru, V. N. and Dakora, F. D. (2005) Xylem transport and shoot accumulation of lumichrome, a newly recognized rhizobial signal, alerts root respiration, stomatal conductance, leaf transpiration and photosynthetic rates in legumes and cereals. *New Phytologist* 165: 847-855.
- Molla, A. H., Shamsuddin, Z. H., Halimi, M. S., Morziah, M. and Puteh, A. B. (2001) Potential for enhancement of root growth and nodulation of soybean co-inoculated with *Azospirillum* and *Bradyrhizobium* in laboratory systems. *Soil Biology and Biochemistry* 33: 457-463.
- Ögutcu, H., Kasimoglu, C. and Elkoca, E. (2010) Effects of rhizobium strains isolated from wild chickpea on the growth and symbiotic performance of chickpeas (*Cicer arietinum* L.) under salt stress. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 34: 361-371.
- Rakwal, R., Agrawal, G. K., Kubo, A., Yonekura, M., Tamogami, S., Saji, H. and Iwahashi, H. (2003) Defense/stress responses elicited in rice seedlings exposed to the gaseous air pollutant sulfur dioxide. *Environmental and Experimental Botany* 49: 223-235.
- Sha, C., Wang, T. and Lu, J. (2010) Relative sensitivity of Wetland plants to SO<sub>2</sub> pollution. *Wetlands* 30: 1023- 1030.
- Shimazaki, K. I., Sakaki, T., Kondo, D. and Sugahara, K. (1980) Active O<sub>2</sub> participation in chlorophyll destruction and lipid peroxidation in SO<sub>2</sub> fumigated leaves of spinach. *Plant Cell Physiology* 21:1193-1204.
- Smith, S. J., Aardenne, J. V., Klimont, Z., Andres, R. J., Volke, A. and Delgado Arias, S. (2011) Anthropogenic sulfur dioxide emissions: 1850–2005. *Atmospheric Chemistry and Physics* 11: 1101–1116.
- Soliman, A. Sh., Shanan, N. T., Massoud, O. N. and Swelim, D. M. (2012) Improving salinity tolerance of *Acacia saligna* (Labill.) plant by arbuscular mycorrhizal fungi and *Rhizobium* inoculation. *African Journal of Biotechnology* 11: 1259-1266.
- Swanepoel, J. W., Kruger, G. H. J. and Heerden, P. D. R. (2007) Effects of sulphur dioxide on photosynthesis in the succulent *Augea capensis* Thunb. *Journal of Arid Environments* 70: 208-221.
- Journal of Applied and Pure Biology. 27: 17-23.
- Caetano-Anolles, G., Wall, L. G., De Micheli, A. T., Macchi, E. M. Bauer, W. D. and Favelukes, G. (1988) Role of motility and chemotaxis in efficiency of nodulation by *Rhizobium meliloti*. *Plant Physiology* 86: 1228-1235.
- Creus, C. M., Sueldo, R. J. and Barassi, C. A. (2004) Water relations in *Azospirillum*-inoculated wheat seedlings under osmotic stress. *Canadian Journal of Botany*. 76: 238-244.
- De Kok, L. J., Westerman, S., Stuiver, C. E. E. and Stulen, I. (2000) Atmospheric H<sub>2</sub>S as plants sulfur source: interaction with pedospheric sulfur nutrition – a case study with *Brassica oleracea* L. In: Sulfur nutrition and sulfur assimilation in higher plants; molecular, biochemical and physiological aspects (eds. Brunold, C., Rennenberg, H., De Kok, L. J., Stulen, I. and Davidian, J.-C.) 41-56. Paul Haupt, Bern.
- Dimkpa, C., Weinand, T. and Asch, F. (2009) Plant–rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. *Plant, Cell and Environment* 32: 1682–1694.
- Erdemli, S., Colak, E. and Kendir, H. (2007) Determination of some plant and agricultural characteristics in Persian clover (*Trifolium resupinatum* L.). *Tarım Bilimleri Dergisi* 13: 240-245.
- Han, H. S. and Lee K. D. (2005) Plant growth promoting rhizobacteria effect on antioxidant status, photosynthesis, mineral uptake and growth of lettuce under Soil Salinity. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences* 1: 210-215.
- Hijano, C. F., Dominguez, M. D. P., Gimenez, R. G., Sanchez, P. H. and Garcia, I. S. (2005) Higher plants as bioindicators of sulphur dioxide emissions in urban environments. *Environmental Monitoring and Assessment* 111: 75–88.
- Hussain, M. B., Mehboob, I., Zahir, Z. A., Naveed, M. and Asghar, H. N. (2009) Potential of *Rhizobium* spp. for improving growth and yield of rice (*Oryza sativa* L.). *Soil and Environment* 28: 49-55.
- Irshad, A. H., Fayaz Ahmad, S. and Sultan, P. (2011) Effect of sulphur dioxide on the biochemical parameters of spinach (*Spinacea oleracia*). *Trakia Journal of Sciences* 9: 24-27.
- Khan, I., Ahmad, A. and Iqbal, M. (2006) Sulphur in the environment. In: Biodiversity and its significance (eds. Tandon, P., Khatri, S., Abrol, Y. P. IK) Pp.90-99. International, New Delhi.
- Kloepper, J.W., Gutierrez-Estrada, A. and McInroy, J. A. (2007) Photoperiod regulates elicitation of growth promotion but not induced resistance by plant growth-promoting rhizobacteria. *Canadian Journal of Microbiology* 53, 159–167.
- Kropff, M. J. (1990) The effects of long-term open-air fumigation with SO<sub>2</sub> on a field crop of broad bean (*Vicia faba* L.). Quantitative analysis of damage components. *New Phytologist* 115: 357-365.

- Wang, B. S. and Zhao, K. F. (1995) Comparison of extractive methods of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  in wheat leaves. *Plant Physiol Communications* 31: 50–52.
- Wang, Y. X. and Oyaizu, H. (2009) Evaluation of the phytoremediation potential of four plant species for dibenzofuran-contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials* 168: 760-764.
- Yang, J., Klopper, J. W. and Ryu, C. (2009) Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Plant Science* 14: 1-4.
- Tatsumoto, H. and Yoshinari, H. (1991) Correlation between sulfur oxide concentration and sulfur content in the leaves of woody plants. *Taiki Osen Gakkaishi* 26: 165–170.
- Wali, B., Iqbal, M. and Mahmooduzzafar (2007) Anatomical and functional responses of *Calendula officinalis* L. to  $\text{SO}_2$  stress as observed at different stages of plant development. *Flora* 202: 268–280.