

## اثرات تلقیح ریزوپیومی بر شاخص‌های تشریحی برگ یونجه (*Medicago sativa*) تحت آلودگی گاز دی‌اکسید‌گوگرد

\*شیما حسین‌خانی هزاوه و مهری عسکری

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اراک، کد پستی ۸۳۴۹-۸۷۱۵۶

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

### چکیده:

گاز دی‌اکسید‌گوگرد ( $\text{SO}_2$ ) یکی از مهم‌ترین آلاینده‌های هوا است که در غلظت‌های بالا می‌تواند سبب اختلال در رشد و عملکرد فیزیولوژیکی گیاهان شود. همزیستی ریزوپیوم-گیاه، علاوه بر افزایش رشد گیاه می‌تواند باعث افزایش مقاومت گیاه نسبت به تنفس‌های زیستی و غیر زیستی شود. در این مطالعه اثرات ریزوپیوم (سویه بومی و استاندارد) بر شاخص‌های تشریحی برگ یونجه تحت غلظت‌های مختلف گاز دی‌اکسید‌گوگرد (۰، ۰/۵، ۱/۵ و ۲ ppm) ارزیابی شد. نتایج نشان داد که تلقیح ریزوپیوم روی شاخص‌های تشریحی برگ یونجه اثری ندارد. غلظت‌های بالای  $\text{SO}_2$  (۰، ۰/۵ و ۲ ppm) سبب تغییرات معنی‌دار تمامی شاخص‌های تشریحی در مقایسه با گیاهان شاهد می‌شود ولی غلظت پایین گاز  $\text{SO}_2$  (۰/۵ ppm) تأثیری بر این شاخص‌ها نداشت. تلقیح یونجه با دو سویه ریزوپیوم اثرات منفی غلظت‌های بالای گاز  $\text{SO}_2$  را بر شاخص‌های تشریحی کاهش داد. بنابراین ریزوپیوم می‌تواند مقاومت و تحمل گیاه را در برابر تنفس‌های غیر زیستی مثل آلودگی  $\text{SO}_2$  هوا افزایش دهد.

کلمات کلیدی: آلودگی  $\text{SO}_2$ ، ریزوپیوم، شاخص‌های تشریحی، یونجه (*Medicago sativa*).

### مقدمه:

آلودگی هوا یکی از بزرگ‌ترین مشکلات زیست محیطی شهرهای توسعه یافته و در حال توسعه می‌باشد و گیاهان نیز ضمن این که می‌توانند تا اندازه‌ای در کاهش آلودگی هوا موثر باشند تحت تأثیر آلاینده‌ها قرار گرفته و آسیب می‌بینند. گیاهان م مختلف نسبت به آلودگی هوا حساسیت‌های متفاوتی نشان می‌دهند (Breusgem *et al.*, 2001). کاهش رشد و اختلال در رفتارهای بیولوژیکی تحت تأثیر آلاینده‌ها مشاهده می‌شود. گیاهان در برابر تنفس‌های محیطی با مکانیسم‌های دفاعی شناس خود را برای بقا

آنتی اکسیدان‌هایی مثل سوپر اکسید دیسموتاز که باعث مهار رادیکال‌های آزاد می‌شوند و تولید ترکیبات اسمولت که در هنگام تنش منجر به ایجاد تعادل اسمزی در گیاه می‌شوند از جمله سازوکارهای به کار رفته توسط این باکتری‌ها است (Yang *et al.*, 2009). به دلیل نقش موثر میکرووارگانیسم‌ها در حلالیت، زیست فراهمی و تحرک عناصر، توان تطبیقی بالای بقولات به شرایط مختلف و نامساعد و استفاده از رابطه مفید همزیستی به عنوان یک سیستم ارزشمند در حاصلخیزی خاک، همزیستی لگوم-ریزوبیوم کاندیدای خوبی در زیست‌پالایی آلاینده‌ها است (Dimkpa *et al.*, 2009). گیاه (Medicago sativa) به عنوان ملکه نباتات علوفه‌ای یونجه با سطح زیر کشت ۳۲ میلیون هکتار در جهان (Benabderrahim *et al.*, 2009)، علوفه غالب در مناطقی با آب و هوای معتدل است

بررسی اثرات آلاینده  $\text{SO}_2$  هوا بر شاخص‌های تشریحی برگ گیاه یونجه و ارزیابی اثرات دو سویه باکتری ریزوبیوم بر کاهش اثرات منفی آلودگی گاز  $\text{SO}_2$  هوا بر این صفات صورت گرفت تا در صورت بقاء و تغییرات اندک شاخص‌های تشریحی گیاه (تلقیحی یا غیرتلقیحی) در حضور آلاینده  $\text{SO}_2$ ، کاشت گیاه علوفه‌ای یونجه در اطراف شهرهای آلوده به منظور کاهش آلودگی  $\text{SO}_2$  هوا پیشنهاد گردد.

### مواد و روش‌ها:

تهیه باکتری و آماده‌سازی مایه تلقیح: ریزوبیوم بومی از ریشه یونجه جمع‌آوری شده از زمین‌های مزروعی اطراف اراک استخراج شد. پس از سترون‌سازی ریشه با اتانول و (Swift and Bignell, 2001) شستشو با آب مقطر استریل (Molla *et al.*, 2001) آب مقطر له شده و در محیط جامد YMA کشت داده شدند و به انکوباتور  $25^{\circ}\text{C}$  منتقل شدند. سپس نوع واکنش گرم و مورفولوژی باکتری در زیر میکروسکوپ بررسی شد. تشکیل کلنی‌های محدب و

۲۰۰۵ نشر  $\text{SO}_2$  به محیط افزایش ناگهانی یافت، 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) گاز  $\text{SO}_2$  پس از جذب توسط کوتیکول یا منافذ روزن، در دیواره سلول‌های برگی با آب ترکیب و به سولفیت  $\text{SO}_3^{2-}$  سمی، یک عامل هسته‌دوست قوی، تبدیل می‌گردد. برخی گیاهان می‌توانند با افزایش نرخ تبدیل سولفیت توسط جریان تثبیتی سولفور و تولید سیستئین و یا اکسایش مجدد سولفیت به سولفات توسط سولفیت‌اکسیداز، مقدار سولفیت درون سلول را کنترل کنند (Lang *et al.*, 2007) بارش اسیدی ناشی از آلودگی گازهای گوگردار نیز به ریشه گیاهان آسیب می‌رساند. در pH اسیدی حاصل، باکتری‌های مفید خاک که از مواد آلی در حال فساد استفاده و مواد معدنی آن‌ها را آزاد می‌کنند، کشته می‌شوند که این سبب کمبود مواد غذایی در دسترس گیاهان می‌شود. بارش باران اسیدی به لایه موئی روی برگ‌ها نیز آسیب می‌زند و گیاهان را نسبت به بیماری‌ها آسیب‌پذیر می‌سازد. جوانهزنی و تولید ممثل گیاهان نیز توسط باران اسیدی بازداشت می‌شود (Irshad *et al.*, 2011). عملکرد گیاه برای جلوگیری یا کاهش ورود گاز  $\text{SO}_2$ ، اعمال تغییراتی از جمله تغییر در گشودگی دهانه، تعداد روزن و تراکم کرک در سطوح زیرین و زبرین برگ می‌باشد (Sharma, 1977).

ریزو باکترهای محرك رشد گیاه مثل ریزوبیوم ضمن افزایش رشد گیاهان همزیست با آنها می‌توانند از اثرات زیان‌آور عوامل تنش‌زای محیطی جلوگیری کنند (Yang *et al.*, 2009; Bojnanska *et al.*, 2012). در تنش‌های غیرزیستی، ریزوبیوم با القای یک سری تغییرات فیزیکی و شیمیایی در گیاهان، سبب افزایش مقاومت به تنش می‌شود، فرآیندی که به عنوان مقاومت سیستمیک القایی (Induced Systemic Resistance) مطرح می‌شود (Dimkpa *et al.*, 2009). تولید هورمون‌هایی مثل آبسیزیک‌اسید که موجب بسته شدن روزن‌ها می‌شود و

همان شرایط و در بافرفسفات استریل (بدون باکتری) قرار گرفتند (Bashan *et al.*, 1989).

#### کشت هیدروپوئنیک بذرهای یونجه تلقیح شده:

بذرهای یونجه شاهد و تلقیحی به پتربالانس متنقل و ۲۴ ساعت در تاریکی جهت جوانه‌زنی قرار گرفتند. بعد از جوانه‌زنی، بذرها به میکروتیوب‌های استریل درون ظروف پلاستیکی حاوی دو لیتر محلول متنقل شدند. اکسیژن دهی به وسیله پمپ هوا انجام شد. هر ظرف محتوی بذرهای یونجه شاهد یا تلقیح شده، یک تیمار در نظر گرفته شد. این ظروف در شرایط محیط در درجه حرارت ۲۰°C در شب و ۲۵°C در روز و فتوپریود ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند (Bashan *et al.*, 1989).

**تزریق گاز  $\text{SO}_2$**  گاز دی‌اکسید‌گوگرد ۰/۱٪ از پتروشیمی شازند اراک تهیه شد. ۳۵ روز پس از رشد گیاهان، تزریق گاز  $\text{SO}_2$  در غلاظت‌های مختلف ۰ (شاهد)، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ ppm به ظروف (با حجم ۶ لیتر هوای آزاد) محتوی گیاهان تلقیح نشده، گیاهان تلقیح شده با ریزوبیوم بومی و استاندارد انجام شد. تزریق گاز به وسیله ریزوبیوم بومی و استاندارد انجام شد. در طی این مدت سرنگ به مدت ۶ روز و هر روز ۲ ساعت با بستن کامل درب ظروف پلاستیکی انجام شد (Agrawal *et al.*, 1985).

پس از دو ساعت انکوباسیون با باز کردن درب ظروف، گیاهان به هوای معمولی انتقال یافتند. در طی این مدت درب ظروف شاهد (۰ ppm) هم بسته بودند و جریان هوای معمولی را نداشتند. برداشت نهایی به منظور بررسی برگ و ریشه در روز ۴۵ روزگی گیاهان صورت گرفت. برگ‌های فوقانی هر گیاه برای انجام آزمایش انتخاب شد.

رنگ آمیزی با تترازولیوم: ریشه برخی گیاهان تلقیح شده ۲ ساعت در محلول ۱-۳-۵-تری‌فنیل‌تترازولیوم کلراید ۱gL<sup>-1</sup> قرار گرفتند و پس از شستشو حضور گرهک قرمز فعال از نظر آنزیم نیتروژناز بررسی گردید. در این رابطه از خاصیت احیاء‌شوندگی تترازولیوم در حضور آنزیم نیتروژناز فعال باکتری و تشکیل رنگ قرمز استفاده شد. آنزیمی که توانایی احیای تترازولیوم را دارد آنزیم نیتروژناز

برجسته، نیمه شفاف، لرج، موسیلاژی و واکنش گرم منفی نشانه موفقیت‌آمیز بودن جداسازی در نظر گرفته شد (Swift and Bignell, 2001).

**Rhizobium meliloti** PTCC 1684 استاندارد ریزوبیوم به صورت لیوفلیزه از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد. جهت فعال‌سازی، آمپول حاوی باکتری در شرایط استریل شکسته و ۱ ml محیط کشت مایع YMA به پودر باکتری اضافه شد. یک لوپ میکروبیولوژی از باکتری فوق در ۱۰۰ml ۱۰۰rpm حل و ۲۴ ساعت روی شیکر (۲۰۰rpm) گذاشته تا باکتری تکثیر پیدا کند. غلاظت بهینه ریزوبیوم جهت تحریک رشد یونجه  $10^5\text{cfu mL}^{-1}$  گزارش شده است (Caetano-Anolles *et al.*, 1988)، دو سویه ریزوبیوم بومی و ریزوبیوم استاندارد در محیط YMA مایع (Molla *et al.*, 2001) در ۲۵°C به مدت ۲۴ ساعت در روتاری شیکر (۲۰۰ rpm) کشت داده شدند (Sadovinkova *et al.*, 2003). سپس کشت‌ها سانتریفیوژ (۱۰۰۰g) به مدت ۱۰ دقیقه و در بافر فسفات تا رسیدن به غلاظت  $10^8\text{cfu mL}^{-1}$  دوباره محلول شدند. در صورتی جذب نوری در محلول YMA مایع در طول موج ۶۲۰ نانومتر معادل ۱٪ باشد غلاظت ریزوبیوم  $10^8$  در نظر گرفته شد (Bai *et al.*, 2003). سپس غلاظت  $10^5$  از هر دو باکتری با ریقیق نمودن محلول‌های مادر فوق توسط بافر فسفات تهیه شد.

**تهیه و تلقیح بذر:** بذر یونجه رقم همدانی (Medicago sativa cv. Hamedani) از مرکز تحقیقات جهاد کشاورزی اراک تهیه شد. بذرها با اتانول ۷۰٪ (۲ دقیقه) و هیپوکلریتسدیم ۱٪ (۵ دقیقه) ضدغیرنی سطحی و سپس ۵ بار با آب مقطر شستشو داده شدند (Wang and Oyaizu, 2009). بذرهای سترون‌شده به مدت چند ساعت در محیط غذایی قرار داده و به سه گروه تقسیم شدند. یک گروه از بذرها در مایه تلقیح باکتری بومی با غلاظت  $10^5\text{cfu mL}^{-1}$  تحت خلاً و در درجه حرارت محیط به مدت ۲ ساعت قرار داده شد. یک گروه مایه تلقیح باکتری استاندارد را با همان غلاظت و شرایط دریافت کردند و گروه سوم شاهد در



شکل ۱- تغییر رنگ ندادن ریشه گیاهان تلقیح شده در ترازوپیوم (الف)، فرمز شدن ریشه گیاهان تلقیح شده با ریزوپیوم در ترازوپیوم (ب) و برش عرضی ریشه یونجه تلقیح شده با ریزوپیوم میلیوتی (شکل د).

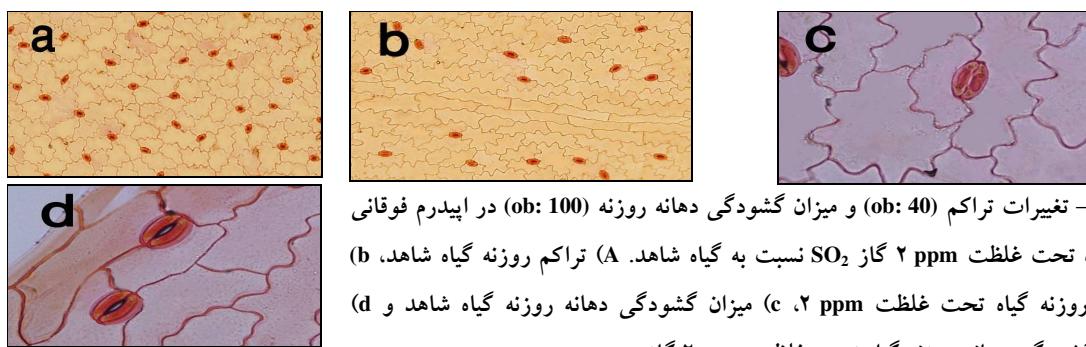
#### نتایج:

آزمایش ترازوپیوم قرمز شدن ریشه یونجه تلقیح شده با ریزوپیوم بومی و استاندارد را نشان داد و بررسی برش عرضی ریشه گیاهان وجود نقاط قرمز رنگ در سلول‌های ریشه را تایید کرد (شکل ۱).

تلقیح ریزوپیومی اثر معنی‌داری بر تراکم و میزان گشودگی دهانه روزنه، تراکم و طول کرک نشان نداد ولی تزریق گاز  $\text{SO}_2$  بر تراکم روزنه اپیدرم تحتانی (سطح  $0/05$ ) و فوقانی، گشودگی دهانه روزنه، تراکم و طول کرک در هر دو سطح فوقانی و تحتانی اپیدرم اثر معنی‌داری ( $0/01$ ) داشت. در شرایط بدون تنش ( $0\text{ ppm}$ ) تراکم و میزان گشودگی روزنه در اپیدرم فوقانی کمتر و در اپیدرم تحتانی بیشتر است. مقایسه میانگین‌های حاصل از اثر گاز  $\text{SO}_2$  نشان می‌دهد که تراکم و میزان گشودگی روزنه در هر دو سطح تحت غلظت  $0/5 \text{ ppm}$  مشابه شاهد است. با افزایش غلظت گاز در سطح فوقانی تراکم روزنه کاهش و میزان گشودگی روزنه افزایش می‌یابد (شکل ۲). در غلظت  $2 \text{ ppm}$  کاهش  $35/49$  درصدی در تراکم روزنه و افزایش  $49/43$  درصدی در میزان گشودگی دهانه روزنه مشاهده می‌شود. در سطح تحتانی حالت عکس مشاهده می‌شود یعنی با افزایش غلظت گاز، تراکم روزنه افزایش و گشودگی دهانه روزنه کاهش می‌یابد. در اپیدرم تحتانی، بیشترین و کمترین تراکم روزنه به ترتیب در  $2 \text{ ppm}$  (۳۸٪) و  $2 \text{ ppm}$  (۳۶٪) کاهش و شاهد و گیاهان تحت غلظت  $2 \text{ ppm}$  (۲ کاهش

است. ترازوپیوم احیا شده تولید رنگ صورتی می‌کند. تولید رنگ صورتی در گرهک‌های موجود در ریشه، حضور و ورود باکتری که دارای آنزیم نیتروژناز فعال است را به اثبات می‌رساند. در این آزمایش آنزیم نیتروژناز به طور جداگانه مورد بررسی واقع نشده بلکه عالم نشان دهنده فعالیت آن که در واقع اثبات کننده حضور باکتری در ریشه و موفق بودن فرآیند تلقیح است بررسی شده است (Cocking *et al.*, 1992).

**بررسی صفات تشریحی برگ:** اپیدرم سطح رویی (adaxial) و زیرین (abaxial) برگ یونجه شاهد و تلقیحی که تحت تأثیر غلظت‌های مختلف گاز دی‌اکسیدگوگرد بودند، به صورت دستی تهیه شد. شمارش تعداد کرک و روزنه در دو سطح زیرین و زیرین در مساحت  $13\text{mm}^2$  و اندازه‌گیری اندازه کرک و دهانه روزنه (میکرومتر) به وسیله گراتی کیول انجام شد (Noori, 2002). پس از تهیه مقاطع عرضی برگ با میکروتوم، رنگ‌آمیزی به روش هماتوکسیلین، ائوزین انجام شد. از نمونه‌ها عکس‌برداری و ابعاد سلول‌های پارانشیم نربیانی و قطر سلول‌های پارانشیم (MOTIC IMAGES ADVANCED 3.2 SOFTWARE) انجام شد (Kiernan, 1999). آزمایش‌ها در طرح کاملاً تصادفی در قالب آزمایشات فاکتوریل در ۳ تکرار انجام شد. آنالیز داده‌ها از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن و برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel استفاده گردید.



شکل ۲- تغییرات تراکم (ob: 40) و میزان گشودگی دهانه روزنے (ob: 100) در اپیدرم فوقانی در گیاه تحت غلظت ۲ ppm  $\text{SO}_2$  نسبت به گیاه شاهد. (a) تراکم روزنے گیاه شاهد، (b) تراکم روزنے گیاه تحت غلظت ۲ ppm، (c) میزان گشودگی دهانه روزنے گیاه شاهد و (d) میزان گشودگی دهانه روزنے گیاه تحت غلظت ۲ ppm گاز.

جدول ۱- مقایسه میانگین‌های اثر غلظت‌های مختلف گاز  $\text{SO}_2$  بر تراکم روزنے و کرک (تعداد در  $\text{mm}^2$ )، طول کرک و دهانه روزنے ( $\mu$ ) در دو سطح فوقانی (ad) و تحتانی (ab) برگ یونجه. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار بین میانگین مطابق آزمون دانکن است. هر عدد میانگین  $3 \pm \text{SE}$  تکرار است. مقایسه هر شاخص جداگانه (ردیفی) انجام شده است.

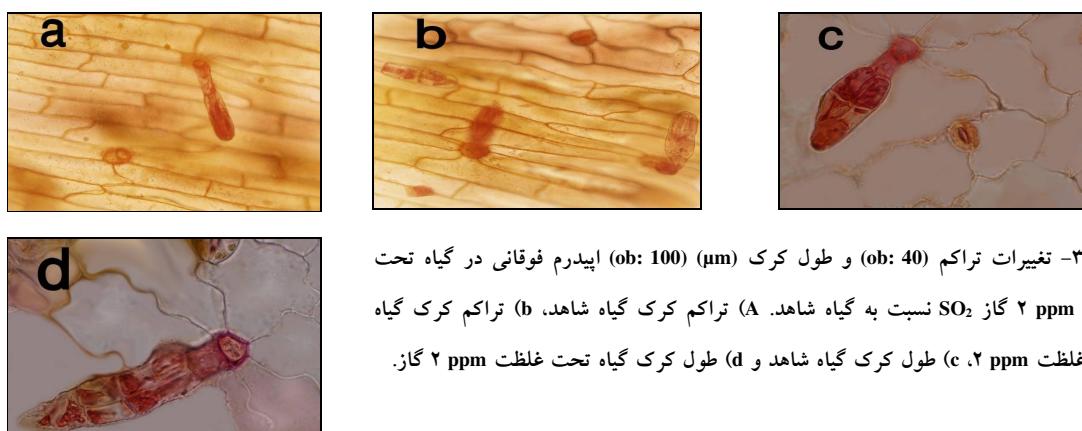
غلظت‌های مختلف گاز (ppm)					شاخص
۲	۱/۵	۱	۰/۵	۰	
۹/۸۹ <sup>d</sup> $\pm 0/۳۵$	۱۱/۶۷ <sup>c</sup> $\pm 0/۰۹$	۱۳/۶۷ <sup>b</sup> $\pm 0/۱۰$	۱۵/۵۶ <sup>a</sup> $\pm 0/۱۰$	۱۵/۳۳ <sup>a</sup> $\pm 0/۱۷$	تراکم روزنے (ad)
۲۵/۴۴ <sup>a</sup> $\pm 0/۲۲$	۲۴/۰۰ <sup>b</sup> $\pm 0/۲۸$	۲۱/۱۱ <sup>c</sup> $\pm 0/۳۵$	۱۸/۶۷ <sup>d</sup> $\pm 0/۱۶$	۱۸/۴۴ <sup>d</sup> $\pm 0/۱۸$	تراکم روزنے (ab)
۱۵/۶۰ <sup>a</sup> $\pm 0/۱۸$	۱۳/۷۷ <sup>b</sup> $\pm 0/۱۲$	۱۱/۲۱ <sup>c</sup> $\pm 0/۱۴$	۱۰/۳۹ <sup>d</sup> $\pm 0/۱۰$	۱۰/۴۴ <sup>d</sup> $\pm 0/۰۹$	دهانه روزنے (ad)
۹/۱۷ <sup>d</sup> $\pm 0/۰۹$	۱۰/۸۰ <sup>c</sup> $\pm 0/۱۳$	۱۳/۱۷ <sup>b</sup> $\pm 0/۱۵$	۱۴/۳۱ <sup>a</sup> $\pm 0/۰۸$	۱۴/۳۷ <sup>a</sup> $\pm 0/۰۹$	دهانه روزنے (ab)
۷/۰۰ <sup>a</sup> $\pm 0/۲۸$	۷/۰۰ <sup>a</sup> $\pm 0/۲۰$	۴/۲۲ <sup>b</sup> $\pm 0/۴۱$	۳/۳۳ <sup>b</sup> $\pm 0/۰۷$	۴/۰۰ <sup>b</sup> $\pm 0/۳۲$	تراکم کرک (ad)
۹/۰۰ <sup>a</sup> $\pm 0/۱۲$	۹/۲۲ <sup>a</sup> $\pm 0/۲۵$	۶/۷۸ <sup>b</sup> $\pm 0/۲۸$	۵/۰۰ <sup>b</sup> $\pm 0/۱۹$	۶/۲۲ <sup>b</sup> $\pm 0/۱۱$	تراکم کرک (ab)
۲۰۰/۶۳ <sup>a</sup> $\pm 2/۰۷$	۱۱۳/۷۴ <sup>b</sup> $\pm 0/۷۹$	۱۱۶/۶۱ <sup>b</sup> $\pm 0/۸۶$	۱۱۴/۳۱ <sup>b</sup> $\pm 0/۸۷$	۱۱۴/۳۰ <sup>b</sup> $\pm 1/۲۶$	طول کرک (ad)
۴۳۷/۴۱ <sup>a</sup> $\pm 1/۳۹$	۳۰۳/۱۳ <sup>b</sup> $\pm 1/۲۸$	۳۰۹/۵۵ <sup>b</sup> $\pm 1/۱۰$	۳۰۴/۰۰ <sup>b</sup> $\pm 1/۳۳$	۳۰۴/۳۰ <sup>b</sup> $\pm 2/۰۷$	طول کرک (ab)

اثر متقابل تلقیح باکتریایی و گاز  $\text{SO}_2$  بر تراکم و میزان گشودگی روزنے، تراکم و طول کرک معنی‌دار (سطح تحتانی) بود. کمترین میزان تراکم روزنے اپیدرم فوقانی در گیاهان بدون تلقیح و ۲ ppm گاز مشاهده شد به طوری که کاهش ۴۴/۶۷٪ را نسبت به شاهد (بدون تلقیح و بدون گاز) نشان داد. این کاهش در گیاهان تلقیح شده به میزان کمتری مشاهده شد. گیاهان تلقیح شده با باکتری بومی و استاندارد مشاهده شد. تراکم روزنے در اپیدرم تحتانی در شاهد مشاهده شد. تراکم روزنے در اپیدرم تحتانی در گیاهان تلقیح نیافته و تحت غلظت ۲ ppm گاز بیشترین

نسبت به شاهد مشاهده می‌شد (جدول ۱). تراکم و طول کرک گیاهان شاهد در اپیدرم فوقانی کمتر از اپیدرم تحتانی است مقایسه میانگین‌های حاصل از اثر گاز  $\text{SO}_2$  نشان می‌دهد که غلظت‌های پایین تر از ۱/۵ ppm تأثیری بر تراکم کرک در هیچ یک از دو سطح برگی ندارد. در گیاهان تحت غلظت ۲ ppm گاز تراکم کرک در دو سطح فوقانی و تحتانی به ترتیب افزایش ۷۵٪ و ۴۴/۶۹٪ را نسبت به شاهد نشان می‌دهد. طول کرک در هر دو سطح فقط در گیاهان تحت غلظت ۲ ppm افزایش یافت به طوری که در اپیدرم تحتانی و فوقانی به ترتیب افزایش ۴۳/۷۴ و ۷۵/۲۳ درصدی در طول کرک مشاهده شد (جدول ۲ و شکل ۲).

جدول ۲- مقایسه میانگین‌های اثر متقابل گاز  $\text{SO}_2$  و تلقیح باکتریایی بر تراکم و دهانه روزنه در دو سطح رویی (ad) و زیری (ab) برگ یونجه.  
هر عدد جدول میانگین ۳ تکرار  $\pm \text{SE}$  است و مقایسه برای هر شاخص ستونی انجام شده است.

تلقیح	گاز $\text{SO}_2$ ppm	تراکم روزنه ( $\text{mm}^2$ ) (ad)	دهانه روزنه ( $\mu$ ) (ad)	دهانه روزنه ( $\mu$ ) (ab)	دهانه روزنه ( $\mu$ ) (ab)
بدون تلقیح -R	.	۱۵/۶۷ <sup>a</sup> $\pm 0/۳۳$	۱۹/۰۰ <sup>f</sup> $\pm 0/۰۰$	۱۰/۴۰ <sup>g</sup> $\pm 0/۳۵$	۱۴/۳۶ <sup>a</sup> $\pm 0/۰۹$
	۰/۵	۱۵/۳۳ <sup>a</sup> $\pm 0/۳۳$	۱۸/۶۷ <sup>fg</sup> $\pm 0/۲۳$	۱۰/۷۶ <sup>g</sup> $\pm 0/۲۸$	۱۴/۳۷ <sup>a</sup> $\pm 0/۰۹$
	۱	۱۳/۰۰ <sup>c</sup> $\pm 0/۰۰$	۲۲/۳۳ <sup>d</sup> $\pm 0/۳۳$	۱۲/۳۵ <sup>e</sup> $\pm 0/۲۳$	۱۲/۰۷ <sup>c</sup> $\pm 0/۰۶$
	۱/۵	۱۱/۰۰ <sup>e</sup> $\pm 0/۰۰$	۲۵/۰۰ <sup>b</sup> $\pm 0/۰۰$	۱۴/۵۹ <sup>c</sup> $\pm 0/۲۴$	۱۰/۷۱ <sup>e</sup> $\pm 0/۰۵$
	۲	۸/۶۷ <sup>f</sup> $\pm 0/۳۳$	۲۶/۳۳ <sup>a</sup> $\pm 0/۳۳$	۱۶/۲۵ <sup>a</sup> $\pm 0/۱۶$	۸/۷۷ <sup>h</sup> $\pm 0/۰۶$
تلقیح با R <sub>n</sub>	.	۱۵/۳۳ <sup>a</sup> $\pm 0/۳۳$	۱۸/۳۳ <sup>fg</sup> $\pm 0/۳۳$	۱۰/۶۴ <sup>g</sup> $\pm 0/۳۵$	۱۴/۳۹ <sup>a</sup> $\pm 0/۱۱$
	۰/۵	۱۵/۶۶ <sup>a</sup> $\pm 0/۳۳$	۱۸/۶۷ <sup>fg</sup> $\pm 0/۳۳$	۱۰/۶۷ <sup>g</sup> $\pm 0/۲۷$	۱۴/۳۷ <sup>a</sup> $\pm 0/۰۸$
	۱	۱۴/۰۰ <sup>b</sup> $\pm 0/۰۰$	۲۰/۶۷ <sup>c</sup> $\pm 0/۰۴$	۱۱/۴۹ <sup>f</sup> $\pm 0/۲۰$	۱۳/۵۱ <sup>b</sup> $\pm 0/۰۶$
	۱/۵	۱۲/۰۰ <sup>d</sup> $\pm 0/۰۰$	۲۳/۶۷ <sup>c</sup> $\pm 0/۳۳$	۱۳/۵۸ <sup>d</sup> $\pm 0/۱۳$	۱۱/۳۳ <sup>d</sup> $\pm 0/۰۵$
	۲	۱۰/۳۳ <sup>e</sup> $\pm 0/۳۳$	۲۵/۰۰ <sup>b</sup> $\pm 0/۰۰$	۱۰/۱۷ <sup>b</sup> $\pm 0/۱۸$	۹/۴۰ <sup>g</sup> $\pm 0/۰۷$
تلقیح با R <sub>s</sub>	.	۱۵/۰۰ <sup>a</sup> $\pm 0/۰۰$	۱۸/۰۰ <sup>fg</sup> $\pm 0/۰۰$	۱۰/۵۱ <sup>g</sup> $\pm 0/۱۰$	۱۴/۳۶ <sup>a</sup> $\pm 0/۰۵$
	۰/۵	۱۵/۶۷ <sup>a</sup> $\pm 0/۰۴$	۱۸/۶۷ <sup>fg</sup> $\pm 0/۳۳$	۱۰/۶۹ <sup>g</sup> $\pm 0/۲۲$	۱۴/۳۱ <sup>a</sup> $\pm 0/۰۶$
	۱	۱۴/۰۰ <sup>b</sup> $\pm 0/۰۰$	۲۰/۳۳ <sup>c</sup> $\pm 0/۳۳$	۱۱/۴۲ <sup>f</sup> $\pm 0/۱۵$	۱۳/۴۳ <sup>b</sup> $\pm 0/۰۴$
	۱/۵	۱۲/۰۰ <sup>d</sup> $\pm 0/۰۰$	۲۳/۶۷ <sup>c</sup> $\pm 0/۳۳$	۱۳/۶۱ <sup>d</sup> $\pm 0/۳۱$	۱۰/۳۵ <sup>f</sup> $\pm 0/۰۷$
	۲	۱۰/۶۷ <sup>e</sup> $\pm 0/۳۳$	۲۵/۰۰ <sup>b</sup> $\pm 0/۰۰$	۱۵/۲۸ <sup>b</sup> $\pm 0/۲۸$	۹/۳۱ <sup>g</sup> $\pm 0/۰۴$



شکل ۳- تغییرات تراکم (ob: 40) و طول کرک (ob: 100) اپیدرم فوکانی در گیاه تحت غلظت ۲ ppm گاز  $\text{SO}_2$  نسبت به گیاه شاهد. (a) تراکم کرک گیاه شاهد، (b) تراکم کرک گیاه تحت غلظت ۲ ppm، (c) طول کرک گیاه شاهد و (d) طول کرک گیاه تحت غلظت ۲ ppm.

تلقیحی با باکتری بومی و استاندارد و ۲ ppm گاز هر دو ۳۱/۵۷٪ افزایش تراکم روزنه داشتند. بین تراکم روزنه در گیاهان تلقیحی با باکتری بومی و استاندارد تحت

میزان را داشت به طوری که افزایش ۳۸/۵۸٪ را نسبت به شاهد نشان داد. در گیاهان تلقیحی، افزایش ناشی از تنش گاز به میزان کمتری مشاهده شد به طوری که در گیاهان

جدول ۳- مقایسه میانگین‌های اثر متقابل گاز  $\text{SO}_2$  و تلقیح ریزوپیومی بر تراکم کرک ( $\text{mm}^2$ ) و طول کرک ( $\mu$ ) در سطح رویی (ad) و زیری (ab) برگ یونجه. هر عدد جدول میانگین  $3 \pm \text{SE}$  است. مقایسه برای هر شاخص جدآگانه انجام شده است.

تلقیح	$\text{SO}_2$	تراکم کرک (ad)	تراکم کرک (ab)	طول کرک (ad)	طول کرک (ab)	( $\mu$ ) (ab)
بدون تلقیح -R	۰	$4/00^c \pm 0/07$	$6/33^c \pm 0/33$	$114/1^c \pm 2/3$	$30.4/9^c \pm 1/14$	$30.4/9^c \pm 1/14$
	۰/۵	$4/00^c \pm 0/07$	$6/00^c \pm 0/07$	$114/6^c \pm 1/8$	$30.3/6^c \pm 1/84$	$30.3/6^c \pm 1/84$
	۱	$4/33^c \pm 0/33$	$6/00^c \pm 0/07$	$118/4^c \pm 0/5$	$30.8/5^c \pm 1/11$	$30.8/5^c \pm 1/11$
	۱/۵	$8/33^a \pm 0/33$	$10/67^a \pm 0/67$	$114/3^c \pm 1/0$	$30.4/4^c \pm 1/37$	$30.4/4^c \pm 1/37$
	۲	$8/67^a \pm 0/33$	$10/67^a \pm 0/67$	$314/6^a \pm 2/04$	$50.4/6^a \pm 1/04$	$50.4/6^a \pm 1/04$
تلقیح با R <sub>n</sub>	۰	$4/67^c \pm 0/33$	$6/33^c \pm 0/33$	$113/1^c \pm 2/7$	$30.3/7^c \pm 1/70$	$30.3/7^c \pm 1/70$
	۰/۵	$3/67^c \pm 0/67$	$5/33^c \pm 0/33$	$113/7^c \pm 1/4$	$30.3/7^c \pm 1/13$	$30.3/7^c \pm 1/13$
	۱	$4/00^c \pm 0/00$	$6/00^c \pm 0/07$	$115/9^c \pm 0/6$	$30.5/4^c \pm 1/64$	$30.5/4^c \pm 1/64$
	۱/۵	$6/33^b \pm 0/33$	$8/00^b \pm 0/57$	$112/0.3^c \pm 1/1$	$30.1/8^c \pm 0/99$	$30.1/8^c \pm 0/99$
	۲	$6/67^b \pm 0/33$	$8/33^b \pm 0/67$	$218/9^b \pm 2/3$	$40.4/2^b \pm 1/29$	$40.4/2^b \pm 1/29$
استاندارد R <sub>s</sub>	۰	$3/67^c \pm 0/67$	$5/00^c \pm 0/00$	$115/7^c \pm 2/16$	$30.5/1^c \pm 1/44$	$30.5/1^c \pm 1/44$
	۰/۵	$3/67^c \pm 0/33$	$5/33^c \pm 0/33$	$114/6^c \pm 1/9$	$30.2/9^c \pm 1/16$	$30.2/9^c \pm 1/16$
	۱	$3/67^c \pm 0/67$	$5/67^c \pm 0/33$	$115/5^c \pm 2/4$	$30.4/5^c \pm 0/98$	$30.4/5^c \pm 0/98$
	۱/۵	$6/33^b \pm 0/33$	$8/00^b \pm 0/00$	$114/9^c \pm 1/3$	$30.1/3^c \pm 1/20$	$30.1/3^c \pm 1/20$
	۲	$6/33^b \pm 0/33$	$8/33^b \pm 0/67$	$217/2^b \pm 2/4$	$40.7/6^b \pm 1/25$	$40.7/6^b \pm 1/25$

تراکم کرک در هر دو سطح اپیدرم در اثر تنش در غلظت‌های  $0/5$  و  $2\text{ppm}$  افزایش یافت. افزایش تراکم کرک در اپیدرم فوقانی و تحتانی در گیاهان تلقیح نشده و  $2\text{ppm}$  به ترتیب  $116/75\%$  و  $68/56\%$  را نشان داد. این افزایش ناشی از تنش در گیاهان تلقیح یافته به میزان کمتری صورت گرفت، به طوری که در اپیدرم فوقانی در گیاهان تلقیحی با باکتری استاندارد و بومی در  $2\text{ppm}$  به ترتیب افزایش  $58/25\%$  و  $66/75\%$  و در اپیدرم تحتانی افزایش  $31/6\%$  تراکم کرک (هر دو باکتری) مشاهده شد. طول کرک در گیاهان تلقیح یافته در هر دو سطح برگ فقط در گیاهان تحت غلظت  $2\text{ppm}$  گاز افزایش یافت. این افزایش به میزان  $2/76$  برابر در اپیدرم فوقانی و  $1/65$  برابر در اپیدرم تحتانی بود. در گیاهان تلقیح یافته با ریزوپیوم افزایش طول کرک کمتر بود. در غلظت  $2\text{ppm}$  در گیاهان تلقیحی با سویه بومی و

غلظت‌های  $0$  و  $0/5 \text{ ppm}$  گاز تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. گشودگی دهانه روزنه تحت تأثیر تنش در اپیدرم فوقانی افزایش و در اپیدرم تحتانی کاهش معنی‌داری را نشان داد. تلقیح باکتریایی باعث کاهش این تغییرات تحت تنش گاز  $\text{SO}_2$  شد. بیشترین میزان گشودگی دهانه روزنه اپیدرم فوقانی در گیاهان تلقیح‌نیافته و غلظت  $2\text{ppm}$  و کمترین در شاهد (بدون تلقیح و بدون گاز) مشاهده شد. گیاهان تلقیح شده با باکتری بومی و استاندارد در غلظت‌های  $0$  و  $0/5\text{ppm}$  گاز تغییر معنی‌داری نسبت به شاهد نداشتند. در اپیدرم تحتانی به ترتیب بیشترین و کمترین میزان گشودگی دهانه روزنه در گیاهان شاهد و گیاهان تلقیح نشده و غلظت  $2\text{ppm}$  گاز مشاهده شد (جدول ۲). اثرات ناشی از تلقیح با سویه بومی ریزوپیوم مشابه اثرات سویه استاندارد بود. در گیاهان تلقیح نشده

جدول ۴- مقایسه میانگین‌های اثر غلظت‌های مختلف گاز  $\text{SO}_2$  بر طول سلول نرdbانی و قطر سلول اسفنجی برگ یونجه حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها مطابق آزمون دانکن است. هر عدد جدول میانگین ۳ تکرار SE ± است.

ابعاد سلول	تمیار گاز (ppm)	$\text{SO}_2$ (ppm)	۰/۵	۱	۱/۵	۲	۴۳/۷۹ <sup>d</sup> ±۰/۳۴	۴۵/۱۸ <sup>c</sup> ±۰/۲۵	۴۷/۰۱ <sup>b</sup> ±۰/۲۹	۴۸/۷۹ <sup>a</sup> ±۰/۳۰	۴۸/۸۱ <sup>a</sup> ±۰/۲۵	۱۳/۴۱ <sup>a</sup> ±۰/۳۰	۱۳/۳۴ <sup>a</sup> ±۰/۲۱
(میکرومتر)	طول نرdbانی	قطر اسفنجی											

نسبت به گیاهان شاهد نشان داد. در گیاهان تلقیح شده این کاهش کمتر بود به طوری که در گیاهان تلقیح شده با سویه بومی و استاندارد ریزوپیوم کاهش ۱۰/۸۲ و ۱۱/۱۴ درصدی به ترتیب نسبت به گیاهان شاهد مشاهده شد. کمترین قطر سلول اسفنجی در گیاهان تلقیح شده تحت غلظت ۲ ppm گاز مشاهده شد که کاهش ۴۶/۲۴ درصدی غلظت ۲ گاز مشاهده شد که کاهش این کاهش را نسبت به گیاهان شاهد نشان داد. در گیاهان تلقیح شده این کاهش به میزان کمتری رخ داد به طوری که در گیاهان تلقیح شده با ریزوپیوم ملیوتی سویه بومی و استاندارد به ترتیب کاهش ۳۷/۹۸ و ۳۸/۱۳ درصدی نسبت به گیاهان شاهد مشاهده شد (شکل ۴).

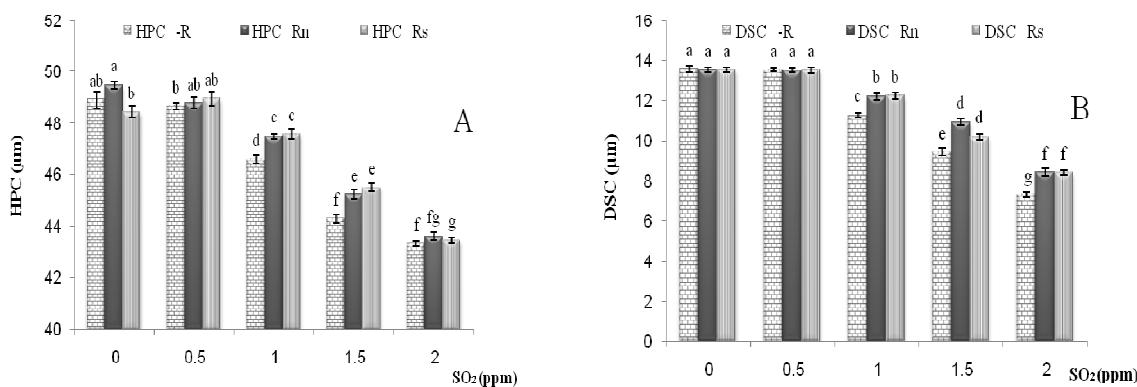
#### بحث:

در این مطالعه تلقیح باکتریایی به تنها یکی از اثربارهای بر هیچ یک از صفات تشریحی برگ نداشت. تغییرات تشریحی گیاهان، تکنیک آگاه کننده و تنظیم کننده آلودگی‌های زیست محیطی است (Omosun *et al.*, 2008). بنابراین عدم تغییر خصوصیات تشریحی گیاه یونجه به دنبال تلقیح ریزوپیومی می‌باشد که تلقیح ریزوپیومی برای یونجه تنش محسوب نمی‌شود. یونجه به طور طبیعی با ریزوپیوم همزیستی برقرار می‌کند و از این ارتباط سود می‌برد و نیازی به تغییر خصوصیات تشریحی خود ندارد. از نظر محققین سیستم روزنامه‌ای در مقابله با باکتری‌های بیماری‌زا تغییر می‌کند. این تغییر در برابر باکتری‌های بیماری‌زا، در سازش و بقا گیاه در برابر تنش زیستی می‌تواند موثر باشد (Melotto *et al.*, 2006). گیاهان با تغییر

استاندارد، افزایش طول کرک در اپیدرم فوکانی و تحتانی به ترتیب ۱/۹۱ و ۱/۳۴ برابر مشاهده شد (جدول ۳). بیشترین تغییرات تشریحی برگ در گیاهان تلقیح نیافته تحت غلظت ۲ ppm گاز مشاهده شد.

نتایج آنالیز واریانس نشان داد که تلقیح ریزوپیومی یونجه اثر معنی‌داری بر طول سلول نرdbانی و قطر سلول اسفنجی نداشت ولی طول سلول نرdbانی و قطر سلول اسفنجی در گیاهان یونجه تحت تأثیر غلظت‌های مختلف گاز  $\text{SO}_2$  تفاوت معنی‌داری (سطح ۰/۰۱) را نشان دادند. در گیاهان تحت غلظت ۰/۵ ppm گاز تغییر معنی‌داری در طول سلول نرdbانی و قطر سلول اسفنجی مشاهده نشد اما با افزایش غلظت گاز طول سلول نرdbانی و قطر سلول اسفنجی کاهش معنی‌داری پیدا کرد به طوری که در گیاهان تحت تیمار ۲ ppm گاز به ترتیب کاهش ۱۰/۲۸ و ۳۹/۷۳ درصدی در طول سلول نرdbانی و قطر سلول اسفنجی نسبت به شاهد مشاهده شد (جدول ۴).

اثر متقابل تلقیح باکتریایی و گاز  $\text{SO}_2$  بر طول سلول نرdbانی (سطح ۰/۰۵) و قطر سلول اسفنجی (سطح ۰/۰۱) برگ گیاه یونجه اثر معنی‌داری را نشان داد. بزرگ‌ترین طول سلول نرdbانی و قطر سلول اسفنجی در گیاهان شاهد (بدون تلقیح و بدون  $\text{SO}_2$ ) مشاهده شد. اختلاف معنی‌داری در طول سلول نرdbانی و قطر سلول اسفنجی در گیاهان تلقیح شده و تلقیح شده که تحت غلظت ۰/۵ ppm گاز بودند، نسبت به گیاهان شاهد مشاهده نشد. کمترین طول سلول نرdbانی در گیاهان تلقیح شده تحت غلظت ۲ ppm گاز مشاهده شد که کاهش ۱۱/۴۱ درصدی را



شکل ۴- اثر مقابل گاز  $\text{SO}_2$  (۰، ۰.۵، ۱، ۱/۵ و ۲ ppm) تلقیح باکتریایی (بدون تلقیح R، تلقیح با ریزوپیوم بومی  $R_n$  و استاندارد  $R_s$ ) (A): طول سلول نرdbانی HPC (بر حسب میکرومتر) و (B): قطر سلول اسفنجی DSC (بر حسب میکرومتر) برگ گیاهان یونجه ۴۵ روزه. خطوط نشان دهنده خطاًی استاندارد (SE) و حروف غیر مشابه نشان دهنده معنی دار بودن (سلول نرdbانی سطح ۰/۰۵ و برای سلول اسفنجی سطح ۰/۰۱) براساس آزمون دانکن می باشد.

تغییراتی در نفوذپذیری غشا و کاهش تورژسانس سلولی آنها می شود که ممکن است افزایش در گشودگی روزنے را توضیح دهد (Singh *et al.*, 1985). بسته شدن شکاف های روزنے ای که در غلاظت های خیلی بالا رخ می دهد یا در گیاهانی که زمان های خیلی طولانی در معرض  $\text{SO}_2$  قرار گرفته اند، باعث تجمع  $\text{CO}_2$  در حفره های زیر روزنے و در نتیجه توقف فتوستتر می شود. این کاهش دهانه روزنے برای جلوگیری از ورود بیشتر  $\text{SO}_2$  به داخل برگ مفید است (Wali *et al.*, 2007). کاهش تعداد روزنے در سطح زیرین می تواند مقدار گاز  $\text{SO}_2$  که وارد بافت های برگ می شود را کاهش دهد و بنابراین از گیاه در برابر سمیت این گاز محافظت کند (Sharma, 1977). کاهش دهانه روزنے اپیدرم زیرین برای جلوگیری از ورود بیشتر  $\text{SO}_2$  به داخل برگ مفید است (Sharma, 1977). مطالعه ای گیاه *Brassica rapa* در معرض گاز  $\text{CO}_2$  افزایش تراکم کرک در گیاهان تحت تنش گاز تا ۵۷ درصد گزارش شد. افزایش تراکم کرک می تواند مکانیسمی برای تحمل تنش توسط گیاه باشد. کرک های بلند ممکن است به عنوان یک فیلتر و محافظ عمل کنند و ذرات و مولکول های آلودگی را از دهانه روزنے دور نگه دارند (Sharma, 1977).

تعداد و ابعاد سلول های اپیدرمی، کرک و روزنے در برابر آلینده های هوا مقابله می کنند (Kulshreshtha *et al.*, 1994). در گیاهان یونجه تحت غلاظت  $\text{SO}_2$  ۰/۵ ppm تراکم و میزان گشودگی روزنے در هر دو سطح فوقانی و تحتانی مشابه گیاهان شاهد (۰ ppm) بود، یعنی غلاظت ۰/۵ ppm گاز، تنش برای گیاه نبوده است و بر خصوصیات تشریحی گیاه تأثیر نداشته است. میزان طبیعی  $\text{SO}_2$  در مناطق شهری ۰/۵ ppm و در مکان های با هوای آلوده به میزان ۲ ppm یا بیشتر است (Khan *et al.*, 2006). با افزایش غلاظت گاز از ۰/۵ به ۲ ppm در سطح فوقانی تراکم روزنے کاهش و میزان گشودگی روزنے افزایش یافت و در سطح تحتانی نیز حالت عکس مشاهده شد. در مطالعه ای انجام شده توسط Wali و همکارانش (۲۰۰۷) تحت تیمار  $\text{SO}_2$  ۰/۵ ppm گشودگی روزنے در هر دو سطح رویی و زیرین برگ همیشه بهار تغییر را نشان داد، اغلب در دوزه های پایین (۰/۵ ppm) گاز بدون تغییر بودند. غلاظت های بالای گاز به ویژه ۲ ppm باعث افزایش اندازه گشودگی روزنے در سطح رویی و کاهش آن در سطح زیرین برگ ها شد. افزایش دهانه روزنے در اپیدرم فوقانی به کاهش تورژسانس سلول های همراه روزنے مربوط می باشد. جذب سریع  $\text{SO}_2$  توسط سلول های همراه باعث

ریزوپیوم به میزان کمتری صورت گرفت. کاهش معنی دار طول سلول نرdbانی و قطر سلول اسفنجی در غلظت های ۱ تا ppm ۲ گاز، در گیاهان تلقیح یافته به میزان کمتر مشاهده شد. از آنجا که اکسین نقش مهمی در تنظیم رشد و نمو گیاهان دارد و رشد طولی سلول و تقسیم سلولی را (Saharan and Nehra, 2012) وابسته به غلظت کترول می کند (Matiru and Dacora, 2005). این اثر ناشی از تلقیح احتمالاً به دلیل تولید اکسین توسط باکتری است. همچنین اثر ریزوپیوم بر فعالیت های فیزیولوژیک به علت لومیکروم رها شده توسط باکتری می تواند باشد (Matiru and Dacora, 2005). لومیکروم یک مولکول سیگنال است که از ریشه به بخش های هوایی از طریق شیره خام انتقال یافته و در برگ تجمع یافته و سبب تغییرات نمود در اندام های هوایی می شود. لومیکروم محرك تقسیم و توسعه سلولی نیز می باشد. این متابولیت ریزوپیومی عمل روزنه ها را تنظیم می کند و سبب سازش لگوم ها نسبت به تنش های مختلف می شود (Matiru and Dacora, 2005). باکتری ریزوپیوم همزیست با لگوم ها در کاهش شرایط تنشی نقش مهم و موثری را ایفا می کند. ریزوپیوم با تولید ترکیباتی همچون اندام های، ویتامین ها، ترکیبات اسماولیت ها مثل پرولین، تولید ACC-دآمیناز و تولید آنتی اکسیدان های آنزیمی تحت شرایط تنش، در کاهش شرایط تنش برای گیاهان موثر است (Dimkpa et al., 2009).

### نتیجه گیری:

عدم تأثیر تلقیح ریزوپیومی به تنها یی بر شاخص های تشریحی برگ، بیان کننده این مطلب است که تلقیح ریزوپیومی برای یونجه تنش محسوب نمی شود. غلظت ریزوپیومی ppm ۰/۵ گاز SO<sub>2</sub> نیز برای یونجه تنش محسوب نمی شود اما غلظت های بالاتر اثرات منفی روی گیاه اعمال می کنند. با برقراری یک رابطه مناسب بین یونجه-ریزوپیوم می توان علاوه بر رشد گیاه، اثر آلدگی SO<sub>2</sub> را کاهش داد.

در گیاهان تحت غلظت ppm ۰/۵ گاز تغییر معنی داری در طول سلول نرdbانی و قطر سلول اسفنجی مشاهده نشد اما با افزایش غلظت گاز طول سلول نرdbانی و قطر سلول اسفنجی کاهش معنی داری پیدا کردند. در بررسی اثر آلدگی هوا روی ساختار بافتی *Trifolium montanum* و *T. pretenes* مشخص شد که آلدگی هوا سبب کاهش قطر پارانشیم اسفنجی و طول پارانشیم نرdbانی می شود. با توجه به فضاهای بزرگ بین سلول های مزوفیل اسفنجی نسبت به پارانشیم نرdbانی، بنابراین آلاینده های گازی به راحتی بعد از ورود به برگ در بخش تحتانی برگ انباست شده و به پارانشیم حفره ای صدمات بیشتری می زند. یکی از راه های مقاومت گیاهان به سمیت آلاینده های گازی افزایش ضربی نرdbانی شدن است که این ضربی نسبت ضخامت سلول های پارانشیم *Cajanus cajan* (Gostin, 2009). در گیاه *Meerabai et al.*, 2012) تحت تنش آلاینده های هوا، فراوانی کرک و کاهش اندازه برگ و برگچه، اندازه سلول های اپیدرمی، طول پارانشیم نرdbانی، قطر پارانشیم اسفنجی، اندازه روزنه در اپیدرم فوقانی و تراکم روزنه در اپیدرم تحتانی گزارش شد (Krishnayya and Bedi, 1989). کاهش در طول سلول های نرdbانی می تواند به این علت باشد که SO<sub>2</sub> به کلروپلاست سلول های نرdbانی آسیب وارد می کند (Hui-zhen et al., 1980).

اثرات منفی گاز SO<sub>2</sub> بر صفات تشریحی برگ به دنبال تلقیح با ریزوپیوم کاهش یافت. بیشترین تغییرات تشریحی برگ در اثر تنش SO<sub>2</sub> در گیاهان بدون تلقیح و غلظت ۲ ppm گاز مشاهده شد. این تغییرات تشریحی برگ در گیاهان تلقیح یافته (چه بومی و چه استاندارد) به میزان کمتر مشاهده شد. افزایش تعداد و طول کرک در غلظت های بالای گاز SO<sub>2</sub> در هر دو سطح اپیدرم در اثر تنش، در گیاهان تلقیح یافته با سویه بومی و استاندارد

- 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.
- Karowe, D. N. and Grubb, Ch. (2011) Elevated CO<sub>2</sub> increases constitutive phenolics and Trichomes, but decreases inducibility of phenolics in *Brassica rapa* (Brassicaceae). *Journal of Chemical Ecology* 37:1332–1340.
- 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.) pp. 90-99. IK International, New Delhi.
- Kiernan, J. A. (1999) *Histopathology and histochemical method; theory and practice* 3<sup>rd</sup> Ed. Oxford, Butterworth-Heinemann.
- Krishnayya, N. S. R. and Bedi, S. J. (1989) Effect of sulphur dioxide and ascorbic acid on the plastid ultrastructure of *Azadirachta indica* leaves. *Annals of Botany* 64: 311-313.
- Kulshreshtha, K., Srivastava, K. and Ahmad, K. J. (1994) Effect of automobile exhaust pollution on leaf surface structures of *Calotropis procera* L. and *Nerium indicum* L. *Feddes Repertorium* 105:185-189.
- Lang, C., Popko, J., Wirtz, M., Hell, R., Herschbach, C., Kreuzwieser, J., Rennenberg, H., Mendel, R. R. and Hansch, R. (2007) Sulphite oxidase as key enzyme for protecting plants against sulphur dioxide. *Plant, Cell and Environment* 30: 447–455.
- 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.
- Meerabai, G., Venkata Ramana, C. and Rasheed, M. (2012) Effect of air pollutants on leaves of pigeon pea, a pulse crop of Fabaceae growing in the vicinity of a silicon industry. *World Rural Observations* 4: 19-21.
- Melotto, M., Underwood, W., Koczan, J., Nomura, K. and He, S. Y. (2006) Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell* 126: 969–980.
- 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.
- Noori, M. (2002) Characterization of the Iranian species of *Shophorea* and *Ammodendron* (Leguminosae: *Sophoreae*). Phd thesis, University of London and Royal Botanic Garden, Kew, UK.
- Omosun, G., Markson, A. A. and Mbanasor, O. (2008) Growth and anatomy of *Amaranthus Hybridus* as affected by different crude oil concen-

**تشکر و قدردانی:**

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

**منابع:**

- 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.
- 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.
- 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.
- Benabderrahim, M. A., Mansour, H. and Ferchichi, A. (2009) Diversity of Lucerne (*Medicago sativa* L.) Populations in South Tunisia. *Pakistan Journal of Botany* 41: 2851-2861.
- Bojnanska, T., Francakova, H., Liskova, M. and Tokar, M. (2012) Legumes – The alternative raw materials for bread production. *Microbiology, Biotechnology and Food Sciences* 1: 876-886.
- Breusgem, F. V., Vranova, E., Dat, J. F. and Inze, D. (2001) The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Science* 161: 405-414.
- 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.
- Cocking, E. C., Davey, M. R., Kothari, S. L., Srivastava, J. S., Jing, Y., Ridge, R. W. and Rolfe, B. G. (1992) Altering the specificity control of the interaction between rhizobia and plant. *Symbiosis* 14: 123-130.
- Dimkpa, C., Weinand, T. and Asch, F. (2009) Plant-rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. *Plant, Cell and Environment* 32: 1682–1694.
- Gostin, I. N. (2009) Air pollution effects on the leaf structure of some Fabaceae species. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. 37: 57-63.
- Graham, P. H. and Vance, C. P. (2003) Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiology*. 131: 872-877.
- Hui-zhen, Q., Zhu-jun, W., Jia-xi, W., Da-fu, Q. and Zheng-fang, L. (1980) The effects of the harmful gases SO<sub>2</sub> and HF on plant leaf structure. *Acta Botanical Science* 22: 232-236.

- Swift, M. and Bignell, D. (2001) Standard methods for assessment of soil biodiversity and land use practice. International centre for research in Agroforestry (ICRAF) Southeast Asia. Available at: <http://www.icraf.cgiar.org/sea>. Accessed 15 September 2009.
- 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., Mahmooduzzafar (2007) Anatomical and functional responses of *Calendula officinalis* L. to SO<sub>2</sub> stress as observed at different stages of plant development. *Flora* 202: 268–280.
- Wang, Y. X. and Oyaizu, H. (2009) Evaluation of the phytoremediation potential of four plant species for dibenzofu-ran-contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials* 168: 760–764.
- Yang, J., Kloepper, J. W. and Ryu, C. (2009) Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Plant Science* 14: 1-4
- .
- trations. *American-Eurasian Journal of Scientific Research* 3: 70-74.
- Sadovinkova, Y. N., Bespalova, L. A. and Antonyuk, L. P. (2003) Wheat gram agglutinin is a grown factor for bacterium *Azospirillum brasilense*. *Doklady Biochemistry and Biophysics* 398:103-105.
- Saharan, B. S. and Nehra, V. (2012) Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A Critical Review. *Life Sciences and Medicine Research* 2011: 21: 1-30.
- Sharma, G. K. (1977) Cuticular features as indicators of environmental pollution. *Water, Air and Soil pollution* 8: 15-19.
- Singh, S. N., Yunus, M., Srivastava, K., Kulshreshtha, K. and Ahmad, J. (1985) Response of *Calendula officinalis* L. to long- term fumigation with SO<sub>2</sub>. *Environmental Pollution* 39: 17-25.
- 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.

## Effects of rhizobia inoculation on anatomical indexes of alfalfa leaf (*Medicago sativa*) under SO<sub>2</sub> pollution

Shima Hosseinkhani Hezave and Mehri Askari\*

Biology Department, Faculty of Science, Arak University, Arak 38156-8-8349

(Received: 4 April 2012; Accepted: 1 Desamber 2012)

### Abstract:

Sulphur dioxide (SO<sub>2</sub>) is one of the main air pollutants that can cause imbalance in growth and physiological function of plant in high concentrations. Rhizobium-plant symbiosis can cause increasing in plant resistance to abiotic and biotic stresses in addition to increase growth of plant. In this study, effects of Rhizobium (native and standard strains) on leaf anatomical parameters of alfalfa under different concentrations of SO<sub>2</sub> (0, 0.5, 1, 1.5 and 2 ppm) were evaluated. The Results showed that inoculation had no effect on the leaf anatomical parameters on the alfalfa. High concentrations of SO<sub>2</sub> (1, 1.5 or 2 ppm) caused significantly changes in all of the anatomical indexes in compared to the control plants; however low concentration of SO<sub>2</sub> (0.5 ppm) had no effects on this parameters. Inoculation of alfalfa with two strains of *Rhizobium* decreased negative effects of high concentrations of SO<sub>2</sub> on anatomical indexes. Rhizobium can increase plant resistance and tolerance against abiotic stress- es such as air pollution.

**Keywords:** alfalfa (*Medicago sativa*), anatomical indexes, *Rhizobium*, SO<sub>2</sub> pollution.

\*Corresponding Author: m-askary@araku.ac.ir