

## اثرات تلقیح ریزوبیومی بر شاخص‌های تشریحی برگ یونجه (*Medicago sativa*) تحت آلودگی گاز دی‌اکسید گوگرد

شیمیا حسین‌خانی هزاوه 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:

گاز دی‌اکسید گوگرد ( $\text{SO}_2$ ) یکی از مهم‌ترین آلاینده‌های هوا است که در غلظت‌های بالا می‌تواند سبب اختلال در رشد و عملکرد فیزیولوژیکی گیاهان شود. همزیستی ریزوبیوم-گیاه، علاوه بر افزایش رشد گیاه می‌تواند باعث افزایش مقاومت گیاه نسبت به تنش‌های زیستی و غیر زیستی شود. در این مطالعه اثرات ریزوبیوم (سویه بومی و استاندارد) بر شاخص‌های تشریحی برگ یونجه تحت غلظت‌های مختلف گاز دی‌اکسید گوگرد (۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ ppm) ارزیابی شد. نتایج نشان داد که تلقیح ریزوبیوم روی شاخص‌های تشریحی برگ یونجه اثری ندارد. غلظت‌های بالای  $\text{SO}_2$  (۱، ۱/۵ 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 ریزوبیوم اثرات منفی غلظت‌های بالای گاز  $\text{SO}_2$  را بر شاخص‌های تشریحی کاهش داد. بنابراین ریزوبیوم می‌تواند مقاومت و تحمل گیاه را در برابر تنش‌های غیر زیستی مثل آلودگی  $\text{SO}_2$  هوا افزایش دهد.

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

### مقدمه:

افزایش می‌دهند. در بین آلاینده‌های اتمسفری، دی‌اکسید گوگرد 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، آتش‌سوزی جنگل، فوران‌های آتشفشانی، ذوب سنگ معدن و تولید آهن، فولاد، آلومینیم، مس، سرب، روی و طلا ایجاد می‌شود. رخداد جنگ جهانی دوم و به دنبال آن گسترش اقتصاد پس از جنگ، منجر به افزایش بی‌سابقه انتشار گاز  $\text{SO}_2$  به محیط شد. در سال‌های ۲۰۰۲-

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 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 تنش‌های محیطی با مکانیسم‌های دفاعی شانس خود را برای بقا

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

آنتی‌اکسیدان‌هایی مثل سوپر اکسید دیسموتاز که باعث مهار رادیکال‌های آزاد می‌شوند و تولید ترکیبات اسمولیت که در هنگام تنش منجر به ایجاد تعادل اسمزی در گیاه می‌شوند از جمله سازوکارهای به‌کاررفته توسط این باکتری‌ها است (Yang *et al.*, 2009). به دلیل نقش موثر میکروارگانیزم‌ها در حلالیت، زیست‌فراهمی 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 یونجه (*Medicago sativa*) به عنوان ملکه نباتات علوفه‌ای با سطح زیر کشت ۳۲ میلیون هکتار در جهان (Benabderahim *et al.*, 2009)، علوفه غالب در مناطقی با آب و هوای معتدل است (Graham and Vance, 2003). مطالعه حاضر به منظور بررسی اثرات آلاینده SO<sub>2</sub> هوا بر شاخص‌های تشریحی برگ گیاه یونجه و ارزیابی اثرات دو سویه باکتری ریزوبیوم بر کاهش اثرات منفی آلودگی گاز SO<sub>2</sub> هوا بر این صفات صورت گرفت تا در صورت بقاء و تغییرات اندک شاخص‌های تشریحی گیاه (تلقیحی یا غیرتلقیحی) در حضور آلاینده SO<sub>2</sub>، کاشت گیاه علوفه‌ای یونجه در اطراف شهرهای آلوده به منظور کاهش آلودگی SO<sub>2</sub> هوا پیشنهاد گردد.

#### مواد و روش‌ها:

**تهیه باکتری و آماده‌سازی مایه تلقیح:** ریزوبیوم بومی از ریشه یونجه جمع‌آوری شده از زمین‌های مزرعی اطراف اراک استخراج شد. پس از سترون‌سازی ریشه با اتانول و شستشو با آب مقطر استریل (Swift and Bignell, 2001) گرهک‌های صورتی حاوی باکتری فعال از ریشه جدا و در آب مقطر له شده و در محیط جامد YMA (Molla *et al.*, 2001) کشت داده شدند و به انکوباتور ۲۵°C منتقل شدند. سپس نوع واکنش گرم و مورفولوژی باکتری در زیر میکروسکوپ بررسی شد. تشکیل کلنی‌های محدب و

۲۰۰۵ نسر SO<sub>2</sub> 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 SO<sub>2</sub> پس از جذب توسط کوتیکول یا منافذ روزنه، در دیواره سلول‌های برگی با آب ترکیب و به سولفیت SO<sub>3</sub><sup>2-</sup> 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 مومی روی برگ‌ها نیز آسیب می‌زند و گیاهان را نسبت به بیماری‌ها آسیب‌پذیر می‌سازد. جوانه‌زنی و تولیدمثل گیاهان نیز توسط باران اسیدی بازداشته می‌شود (Irshad *et al.*, 2011). عملکرد گیاه برای جلوگیری یا کاهش ورود گاز SO<sub>2</sub>، اعمال تغییراتی از جمله تغییر در گشودگی دهانه، تعداد روزنه و تراکم کرک در سطوح زیرین و زبرین برگ می‌باشد (Sharma, 1977).

ریزوباکترهای محرک 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). 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 آبسزیک‌اسید که موجب بسته شدن روزنه‌ها می‌شود و

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

#### کشت هیدروپونیک بذره‌های یونجه تلقیح شده:

بذره‌های یونجه شاهد و تلقیحی به پتری‌دیش منتقل و ۲۴ ساعت در تاریکی جهت جوانه‌زنی قرار گرفتند. بعد از جوانه‌زنی، بذرها به میکروتیوب‌های استریل درون ظروف پلاستیکی حاوی دو لیتر محلول منتقل شدند. اکسیژن‌دهی به وسیله پمپ هوا انجام شد. هر ظرف محتوی بذره‌های یونجه شاهد یا تلقیح‌شده، 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 SO<sub>2</sub>: گاز دی‌اکسید گوگرد ۰/۱٪ از

پتروشیمی شازند اراک تهیه شد. ۳۵ روز پس از رشد گیاهان، تزریق گاز SO<sub>2</sub> در غلظت‌های مختلف (۰ شاهد)، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ ppm به ظروف (با حجم ۶ لیتر هوای آزاد) محتوی گیاهان تلقیح‌نشده، گیاهان تلقیح‌شده با ریزوبیوم بومی و استاندارد انجام شد. تزریق گاز به وسیله 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.

رنگ‌آمیزی با تترازولیوم: ریشه برخی گیاهان تلقیح‌شده ۲ ساعت در محلول ۲، ۳، ۵-تری‌فنیل‌تترازولیوم کلراید ۱g/L-1 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، لزج، موسیلاژی و واکنش گرم منفی نشانه موفقیت‌آمیز بودن جداسازی در نظر گرفته شد (Swift and Bignell, 2001).

#### ریزوبیوم استاندارد Rhizobium meliloti PTCC 1684

به صورت لیوفیلیزه از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد. جهت فعال‌سازی، آمپول حاوی باکتری در شرایط استریل شکسته و ۱ml محیط کشت مایع YMA به پودر باکتری اضافه شد. یک لوپ میکروبیولوژی از باکتری فوق در ۱۰۰ml محیط مایع YMA حل و ۲۴ ساعت روی شیکر (۲۰۰rpm) گذاشته تا باکتری تکثیر پیدا کند. غلظت بهینه ریزوبیوم جهت تحریک رشد یونجه ۱۰<sup>۵</sup> cfu mL<sup>-1</sup> 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 سانتریفوژ (۱۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه) و در بافر فسفات تا رسیدن به غلظت ۱۰<sup>۸</sup> cfu mL<sup>-1</sup> دوباره محلول شدند. در صورتی جذب نوری در محلول YMA مایع در طول موج ۶۲۰ نانومتر معادل ۰/۱ باشد غلظت ریزوبیوم ۱۰<sup>۸</sup> در نظر گرفته شد (Bai *et al.*, 2003). سپس غلظت ۱۰<sup>۵</sup> از هر دو باکتری با رقیق نمودن محلول‌های مادر فوق توسط بافر فسفات تهیه شد.

#### تهیه و تلقیح بذرها: بذرها یونجه رقم همدانی

(Medicago sativa cv. Hamedani) از مرکز تحقیقات جهاد کشاورزی اراک تهیه شد. بذرها با اتانول ۷۰٪ (۲ دقیقه) و هیپوکلریت سدیم ۱٪ (۵ دقیقه) ضدعفونی سطحی و سپس ۵ بار با آب مقطر شستشو داده شدند (Wang and Oyaizu, 2009). بذره‌های 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 غلظت ۱۰<sup>۵</sup> cfu mL<sup>-1</sup> تحت خلأ و در درجه حرارت محیط به مدت ۲ ساعت قرار داده شد. یک گروه مایه تلقیح باکتری استاندارد را با همان غلظت و شرایط دریافت کردند و گروه سوم شاهد در



شکل ۱- تغییر رنگ ندادن ریشه گیاهان تلقیح نشده در تترازولیوم (الف)، قرمز شدن ریشه گیاهان تلقیح شده با ریزوبیوم در تترازولیوم (ب) و برش عرضی ریشه یونجه تلقیح شده با ریزوبیوم میلیوتی (شکل د).

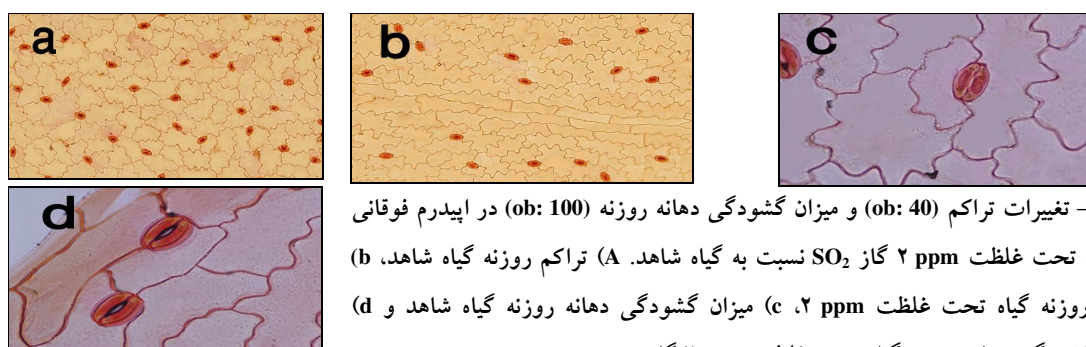
### نتایج:

آزمایش تترازولیوم قرمز شدن ریشه یونجه تلقیح شده با ریزوبیوم 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 ریزوبیومی اثر معنی داری بر تراکم و میزان گشودگی دهانه روزنه، تراکم و طول کرک نشان نداد ولی تزریق گاز  $SO_2$  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 معنی داری (سطح  $0/01$ ) داشت. در شرایط بدون تنش ( $0$  ppm) تراکم و میزان گشودگی روزنه در اپیدرم فوقانی کمتر و در اپیدرم تحتانی بیشتر است. مقایسه میانگین‌های حاصل از اثر گاز  $SO_2$  نشان می‌دهد که تراکم و میزان گشودگی روزنه در هر دو سطح تحت غلظت  $0/5$  ppm مشابه شاهد است. با افزایش غلظت گاز در سطح فوقانی تراکم روزنه کاهش و میزان گشودگی روزنه افزایش می‌یابد (شکل ۲). در غلظت  $2$  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  $2$  ppm ( $38/0$ ) افزایش نسبت به شاهد) و شاهد و بیشترین و کمترین میزان گشودگی دهانه روزنه در شاهد و گیاهان تحت غلظت  $2$  ppm ( $36/0$ ) کاهش

است. تترازولیوم 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 علائم نشان دهنده فعالیت آن که در واقع اثبات کننده‌ی 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 دی‌اکسید گوگرد بودند، به صورت دستی تهیه شد. شمارش تعداد کرک و روزنه در دو سطح زیرین و زیرین در مساحت  $13mm^2$  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، اتوزین انجام شد. از نمونه‌ها عکس برداری و ابعاد سلول‌های پارانشیم نردبانی و قطر سلول‌های پارانشیم اسفنجی توسط نرم‌افزار موتیک (MOTIC IMAGES (ADVANCED 3.2 SOFTWARE اندازه‌گیری 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 روزنه (ob: 100) در اپیدرم فوقانی در گیاه تحت غلظت ۲ ppm گاز SO<sub>2</sub> نسبت به گیاه شاهد. (A) تراکم روزنه گیاه شاهد، (b) تراکم روزنه گیاه تحت غلظت ۲ ppm، (c) میزان گشودگی دهانه روزنه گیاه شاهد و (d) میزان گشودگی دهانه روزنه گیاه تحت غلظت ۲ ppm گاز.

جدول ۱- مقایسه میانگین‌های اثر غلظت‌های مختلف گاز SO<sub>2</sub> بر تراکم روزنه و کرک (تعداد در mm<sup>2</sup>)، طول کرک و دهانه روزنه 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 ۳ تکرار ± SE است. مقایسه هر شاخص جداگانه (ردیفی) انجام شده است.

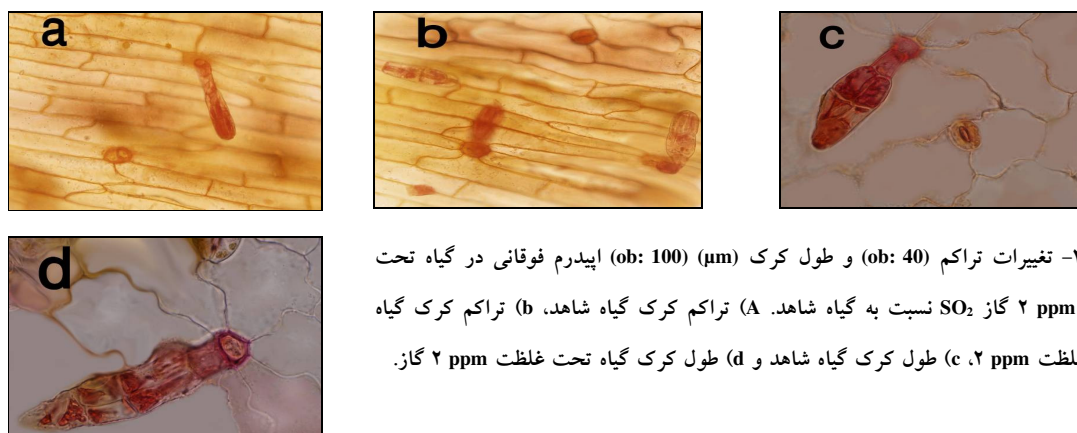
شاخص	غلظت‌های مختلف گاز SO <sub>2</sub> (ppm)				
	۰	۰/۵	۱	۱/۵	۲
تراکم روزنه (ad)	۱۵/۳۳ <sup>a</sup> ±۰/۱۷	۱۵/۵۶ <sup>a</sup> ±۰/۱۰	۱۳/۶۷ <sup>b</sup> ±۰/۱۰	۱۱/۶۷ <sup>c</sup> ±۰/۰۹	۹/۸۹ <sup>d</sup> ±۰/۳۵
تراکم روزنه (ab)	۱۸/۴۴ <sup>d</sup> ±۰/۱۸	۱۸/۶۷ <sup>d</sup> ±۰/۱۶	۲۱/۱۱ <sup>c</sup> ±۰/۳۵	۲۴/۱۰ <sup>b</sup> ±۰/۲۸	۲۵/۴۴ <sup>a</sup> ±۰/۲۲
دهانه روزنه (ad)	۱۰/۴۴ <sup>d</sup> ±۰/۰۹	۱۰/۳۹ <sup>d</sup> ±۰/۱۰	۱۱/۲۱ <sup>c</sup> ±۰/۱۴	۱۳/۷۷ <sup>b</sup> ±۰/۱۲	۱۵/۶۰ <sup>a</sup> ±۰/۱۸
دهانه روزنه (ab)	۱۴/۳۷ <sup>a</sup> ±۰/۰۹	۱۴/۳۱ <sup>a</sup> ±۰/۰۸	۱۳/۱۷ <sup>b</sup> ±۰/۱۵	۱۰/۸۰ <sup>c</sup> ±۰/۱۳	۹/۱۷ <sup>d</sup> ±۰/۰۹
تراکم کرک (ad)	۴/۰۰ <sup>b</sup> ±۰/۳۲	۳/۳۳ <sup>b</sup> ±۰/۵۷	۴/۲۲ <sup>b</sup> ±۰/۴۱	۷/۰۰ <sup>a</sup> ±۰/۲۰	۷/۰۰ <sup>a</sup> ±۰/۲۸
تراکم کرک (ab)	۶/۲۲ <sup>b</sup> ±۰/۱۱	۵/۰۰ <sup>b</sup> ±۰/۱۹	۶/۷۸ <sup>b</sup> ±۰/۲۸	۹/۲۲ <sup>a</sup> ±۰/۲۵	۹/۰۰ <sup>a</sup> ±۰/۱۲
طول کرک (ad)	۱۱۴/۳۰ <sup>b</sup> ±۱/۲۶	۱۱۴/۳۱ <sup>b</sup> ±۰/۸۷	۱۱۶/۶۱ <sup>b</sup> ±۰/۸۶	۱۱۳/۷۴ <sup>b</sup> ±۰/۷۹	۲۰۰/۶۳ <sup>a</sup> ±۲/۰۷
طول کرک (ab)	۳۰۴/۳ <sup>b</sup> ±۲/۰۷	۳۰۴/۰۰ <sup>b</sup> ±۱/۳۳	۳۰۹/۵۵ <sup>b</sup> ±۱/۱۰	۳۰۳/۱۳ <sup>b</sup> ±۱/۲۸	۴۳۷/۴۱ <sup>a</sup> ±۱/۳۹

اثر متقابل تلقیح باکتریایی و گاز SO<sub>2</sub> بر تراکم و میزان گشودگی روزنه، تراکم و طول کرک معنی‌دار (سطح ۰/۰۱) بود. کمترین میزان تراکم روزنه 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 تلقیح‌شده به میزان کمتری مشاهده شد. گیاهان تلقیح‌شده با باکتری بومی و استاندارد به ترتیب کاهش ۳۴/۰۸ و ۳۱/۹۱٪ را نسبت به شاهد نشان دادند. بیشترین میزان تراکم روزنه اپیدرم فوقانی در گیاهان شاهد مشاهده شد. تراکم روزنه در اپیدرم تحتانی در گیاهان تلقیح نیافته و تحت غلظت ۲ ppm گاز بیشترین

نسبت به شاهد) مشاهده می‌شود (جدول ۱). تراکم و طول کرک گیاهان شاهد در اپیدرم فوقانی کمتر از اپیدرم تحتانی است مقایسه میانگین‌های حاصل از اثر گاز SO<sub>2</sub> نشان می‌دهد که غلظت‌های پایین‌تر از ۱/۵ ppm تأثیری بر تراکم کرک در هیچ یک از دو سطح برگ 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 ۳).

جدول ۲- مقایسه میانگین‌های اثر متقابل گاز SO<sub>2</sub> و تلقیح باکتریایی بر تراکم و دهانه روزنه در دو سطح رویی (ad) و زیری (ab) برگ یونجه. هر عدد جدول میانگین ۳ تکرار ± SE است و مقایسه برای هر شاخص ستونی انجام شده است.

تلقیح	گاز SO <sub>2</sub> ppm	تراکم روزنه (mm <sup>2</sup> ) (ad)	تراکم روزنه (mm <sup>2</sup> ) (ab)	دهانه روزنه (μ) (ad)	دهانه روزنه (μ) (ab)
بدون تلقیح -R	۰	۱۵/۶۷ <sup>a</sup> ±۰/۳۳	۱۹/۰۰ <sup>f</sup> ±۰/۰۰	۱۰/۴۰ <sup>g</sup> ±۰/۳۵	۱۴/۳۶ <sup>a</sup> ±۰/۰۹
	۰/۵	۱۵/۳۳ <sup>a</sup> ±۰/۳۳	۱۸/۶۷ <sup>f</sup> ±۰/۳۳	۱۰/۷۶ <sup>g</sup> ±۰/۲۸	۱۴/۳۷ <sup>a</sup> ±۰/۰۹
	۱	۱۳/۰۰ <sup>c</sup> ±۰/۰۰	۲۲/۳۳ <sup>d</sup> ±۰/۳۳	۱۲/۳۵ <sup>e</sup> ±۰/۳۳	۱۲/۵۷ <sup>c</sup> ±۰/۰۶
	۱/۵	۱۱/۰۰ <sup>e</sup> ±۰/۰۰	۲۵/۰۰ <sup>b</sup> ±۰/۰۰	۱۴/۵۹ <sup>c</sup> ±۰/۲۴	۱۰/۷۱ <sup>e</sup> ±۰/۰۵
	۲	۸/۶۷ <sup>f</sup> ±۰/۳۳	۲۶/۳۳ <sup>a</sup> ±۰/۳۳	۱۶/۲۵ <sup>a</sup> ±۰/۱۶	۸/۷۷ <sup>h</sup> ±۰/۰۶
تلقیح با ریزوبیوم بومی R <sub>n</sub>	۰	۱۵/۳۳ <sup>a</sup> ±۰/۳۳	۱۸/۳۳ <sup>f</sup> ±۰/۳۳	۱۰/۶۴ <sup>g</sup> ±۰/۳۵	۱۴/۳۹ <sup>a</sup> ±۰/۱۱
	۰/۵	۱۵/۶۶ <sup>a</sup> ±۰/۳۳	۱۸/۶۷ <sup>f</sup> ±۰/۳۳	۱۰/۶۷ <sup>g</sup> ±۰/۲۷	۱۴/۳۷ <sup>a</sup> ±۰/۰۸
	۱	۱۴/۰۰ <sup>b</sup> ±۰/۰۰	۲۰/۶۷ <sup>e</sup> ±۰/۰۴	۱۱/۴۹ <sup>f</sup> ±۰/۲۰	۱۳/۵۱ <sup>b</sup> ±۰/۰۶
	۱/۵	۱۲/۰۰ <sup>d</sup> ±۰/۰۰	۲۳/۶۷ <sup>c</sup> ±۰/۳۳	۱۳/۵۸ <sup>d</sup> ±۰/۱۳	۱۱/۳۳ <sup>d</sup> ±۰/۰۵
	۲	۱۰/۳۳ <sup>e</sup> ±۰/۳۳	۲۵/۰۰ <sup>b</sup> ±۰/۰۰	۱۵/۱۷ <sup>b</sup> ±۰/۱۸	۹/۴۰ <sup>g</sup> ±۰/۰۷
تلقیح با ریزوبیوم استاندارد R <sub>s</sub>	۰	۱۵/۰۰ <sup>a</sup> ±۰/۰۰	۱۸/۰۰ <sup>f</sup> ±۰/۰۰	۱۰/۵۱ <sup>g</sup> ±۰/۱۰	۱۴/۳۶ <sup>a</sup> ±۰/۰۵
	۰/۵	۱۵/۶۷ <sup>a</sup> ±۰/۰۴	۱۸/۶۷ <sup>f</sup> ±۰/۳۳	۱۰/۶۹ <sup>g</sup> ±۰/۲۲	۱۴/۳۱ <sup>a</sup> ±۰/۰۶
	۱	۱۴/۰۰ <sup>b</sup> ±۰/۰۰	۲۰/۳۳ <sup>e</sup> ±۰/۳۳	۱۱/۴۲ <sup>f</sup> ±۰/۱۵	۱۳/۴۳ <sup>b</sup> ±۰/۰۴
	۱/۵	۱۲/۰۰ <sup>d</sup> ±۰/۰۰	۲۳/۶۷ <sup>c</sup> ±۰/۳۳	۱۳/۶۱ <sup>d</sup> ±۰/۳۱	۱۰/۳۵ <sup>f</sup> ±۰/۰۷
	۲	۱۰/۶۷ <sup>e</sup> ±۰/۳۳	۲۵/۰۰ <sup>b</sup> ±۰/۰۰	۱۵/۲۸ <sup>b</sup> ±۰/۲۸	۹/۳۱ <sup>g</sup> ±۰/۰۴



شکل ۳- تغییرات تراکم (ob: 40) و طول کرک (ob: 100) (μm) اپیدرم فوقانی در گیاه تحت غلظت ۲ ppm گاز SO<sub>2</sub> 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 گاز.

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 SO<sub>2</sub> و تلقیح ریزوبیومی بر تراکم کرک (mm<sup>2</sup>) و طول کرک (μ) در سطح رویی (ad) و زیری (ab) برگ یونجه. هر عدد جدول میانگین ۳ تکرار ±SE است. مقایسه برای هر شاخص جداگانه انجام شده است.

تلقیح	SO <sub>2</sub>	تراکم کرک (ad)	تراکم کرک (ab)	طول کرک (ad)	طول کرک (ab) (μ)
بدون تلقیح -R	۰	۴/۰۰ <sup>c</sup> ±۰/۵۷	۶/۳۳ <sup>c</sup> ±۰/۳۳	۱۱۴/۱ <sup>c</sup> ±۲/۳	۳۰۴/۹ <sup>c</sup> ±۱/۱۴
	۰/۵	۴/۰۰ <sup>c</sup> ±۰/۵۷	۶/۰۰ <sup>c</sup> ±۰/۵۷	۱۱۴/۶ <sup>c</sup> ±۱/۸	۳۰۳/۶ <sup>c</sup> ±۱/۸۴
	۱	۴/۳۳ <sup>c</sup> ±۰/۳۳	۶/۰۰ <sup>c</sup> ±۰/۵۷	۱۱۸/۴ <sup>c</sup> ±۰/۵	۳۰۸/۵ <sup>c</sup> ±۱/۱۱
	۱/۵	۸/۳۳ <sup>a</sup> ±۰/۳۳	۱۰/۶۷ <sup>a</sup> ±۰/۶۷	۱۱۴/۳ <sup>c</sup> ±۱/۵	۳۰۴/۴ <sup>c</sup> ±۱/۳۷
	۲	۸/۶۷ <sup>a</sup> ±۰/۳۳	۱۰/۶۷ <sup>a</sup> ±۰/۳۳	۳۱۴/۶ <sup>a</sup> ±۲/۰۴	۵۰۴/۶ <sup>a</sup> ±۱/۰۴
تلقیح با ریزوبیوم بومی R <sub>n</sub>	۰	۴/۶۷ <sup>c</sup> ±۰/۳۳	۶/۳۳ <sup>c</sup> ±۰/۳۳	۱۱۳/۱ <sup>c</sup> ±۲/۷	۳۰۳/۷ <sup>c</sup> ±۱/۷۰
	۰/۵	۳/۶۷ <sup>c</sup> ±۰/۶۷	۵/۳۳ <sup>c</sup> ±۰/۳۳	۱۱۳/۷ <sup>c</sup> ±۱/۴	۳۰۳/۷ <sup>c</sup> ±۱/۱۳
	۱	۴/۰۰ <sup>c</sup> ±۰/۰۰	۶/۰۰ <sup>c</sup> ±۰/۵۷	۱۱۵/۹ <sup>c</sup> ±۰/۶	۳۰۵/۴ <sup>c</sup> ±۱/۶۴
	۱/۵	۶/۳۳ <sup>b</sup> ±۰/۳۳	۸/۰۰ <sup>b</sup> ±۰/۵۷	۱۱۲/۰ <sup>c</sup> ±۱/۱	۳۰۱/۸ <sup>c</sup> ±۰/۹۹
	۲	۶/۶۷ <sup>b</sup> ±۰/۳۳	۸/۳۳ <sup>b</sup> ±۰/۶۷	۲۱۸/۹ <sup>b</sup> ±۲/۳	۴۰۴/۲ <sup>b</sup> ±۱/۲۹
تلقیح با ریزوبیوم استاندارد R <sub>s</sub>	۰	۳/۶۷ <sup>c</sup> ±۰/۶۷	۵/۰۰ <sup>c</sup> ±۰/۰۰	۱۱۵/۷ <sup>c</sup> ±۲/۱۶	۳۰۵/۱ <sup>c</sup> ±۱/۴۴
	۰/۵	۳/۶۷ <sup>c</sup> ±۰/۳۳	۵/۳۳ <sup>c</sup> ±۰/۳۳	۱۱۴/۶ <sup>c</sup> ±۱/۹	۳۰۲/۹ <sup>c</sup> ±۱/۱۶
	۱	۳/۶۷ <sup>c</sup> ±۰/۶۷	۵/۶۷ <sup>c</sup> ±۰/۳۳	۱۱۵/۵ <sup>c</sup> ±۲/۴	۳۰۴/۵ <sup>c</sup> ±۰/۹۸
	۱/۵	۶/۳۳ <sup>b</sup> ±۰/۳۳	۸/۰۰ <sup>b</sup> ±۰/۰۰	۱۱۴/۹ <sup>c</sup> ±۱/۳	۳۰۱/۳ <sup>c</sup> ±۱/۲۰
	۲	۶/۳۳ <sup>b</sup> ±۰/۳۳	۸/۳۳ <sup>b</sup> ±۰/۶۷	۲۱۷/۲ <sup>b</sup> ±۲/۴	۴۰۷/۶ <sup>b</sup> ±۱/۲۵

تراکم کرک در هر دو سطح اپیدرم در اثر تنش در غلظت‌های ۱/۵ و ۲ppm افزایش یافت. افزایش تراکم کرک در اپیدرم فوقانی و تحتانی در گیاهان تلقیح‌نشده و ۲ppm به ترتیب ۱۱۶/۷۵٪ و ۶۸/۵۶٪ را نشان داد. این افزایش ناشی از تنش در گیاهان تلقیح‌یافته به میزان کمتری صورت گرفت، به طوری که در اپیدرم فوقانی در گیاهان تلقیحی با باکتری استاندارد و بومی در ۲ppm به ترتیب افزایش ۵۸/۲۵ و ۶۶/۷۵٪ و در اپیدرم تحتانی افزایش ۳۱/۶٪ تراکم کرک (هر دو باکتری) مشاهده شد. طول کرک در گیاهان تلقیح‌نیافته در هر دو سطح برگ فقط در گیاهان تحت غلظت ۲ppm گاز افزایش یافت. این افزایش به میزان ۲/۷۶ برابر در اپیدرم فوقانی و ۱/۶۵ برابر در اپیدرم تحتانی بود. در گیاهان تلقیح‌یافته با ریزوبیوم افزایش طول کرک کمتر بود. در غلظت ۲ppm در گیاهان تلقیحی با سویه بومی و

غلظت‌های ۰ و ۰/۵ 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 SO<sub>2</sub> شد. بیشترین میزان گشودگی دهانه روزنه اپیدرم فوقانی در گیاهان تلقیح‌نیافته و غلظت ۲ppm و کمترین در شاهد (بدون تلقیح و بدون گاز) مشاهده شد. گیاهان تلقیح‌شده با باکتری بومی و استاندارد در غلظت‌های ۰ و ۰/۵ppm گاز تغییر معنی‌داری نسبت به شاهد نداشتند. در اپیدرم تحتانی به ترتیب بیشترین و کمترین میزان گشودگی دهانه روزنه در گیاهان شاهد و گیاهان تلقیح‌نشده و غلظت ۲ppm گاز مشاهده شد (جدول ۲). اثرات ناشی از تلقیح با سویه بومی ریزوبیوم مشابه اثرات سویه استاندارد بود. در گیاهان تلقیح‌نشده

جدول ۴- مقایسه میانگین‌های اثر غلظت‌های مختلف گاز  $SO_2$  بر طول سلول نردبانی و قطر سلول اسفنجی برگ یونجه حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها مطابق آزمون دانکن است. هر عدد جدول میانگین  $\pm SE$  است.

ابعاد سلول (میکرومتر)	تیمار گاز $SO_2$ (ppm)				
	۰	۰/۵	۱	۱/۵	۲
طول نردبانی	۴۸/۸۱ <sup>a</sup> ±۰/۲۵	۴۸/۷۹ <sup>a</sup> ±۰/۳۰	۴۷/۰۱ <sup>b</sup> ±۰/۲۹	۴۵/۱۸ <sup>c</sup> ±۰/۲۵	۴۳/۷۹ <sup>d</sup> ±۰/۳۴
قطر اسفنجی	۱۳/۳۴ <sup>a</sup> ±۰/۲۱	۱۳/۴۱ <sup>a</sup> ±۰/۳۰	۱۱/۸۰ <sup>b</sup> ±۰/۱۹	۱۰/۰۰ <sup>c</sup> ±۰/۲۵	۸/۰۴ <sup>d</sup> ±۰/۲۲

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

#### بحث:

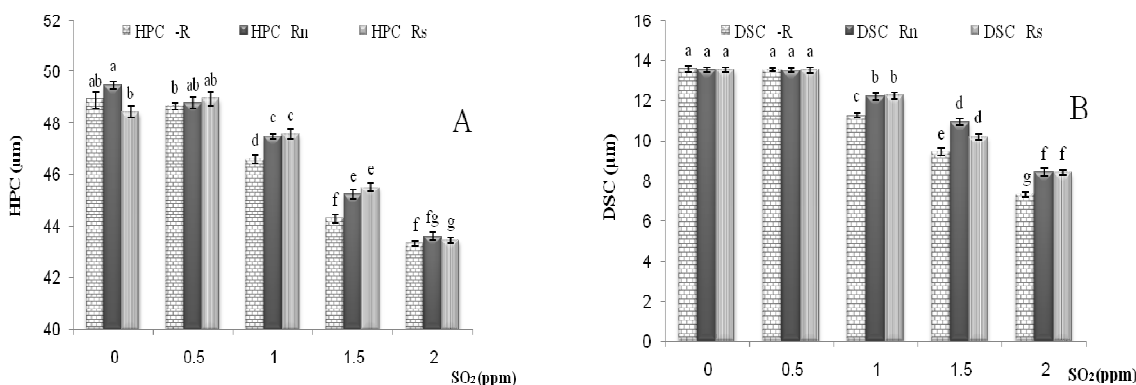
در این مطالعه تلقیح باکتریایی به تنهایی اثر معنی‌داری بر هیچ یک از صفات تشریحی برگ نداشت. تغییرات تشریحی گیاهان، تکنیک آگاه‌کننده و تنظیم‌کننده آلودگی‌های زیست محیطی است (Omosun *et al.*, 2008). بنابراین عدم تغییر خصوصیات تشریحی گیاه یونجه به دنبال تلقیح ریزوبیومی مبین این مطلب است که تلقیح ریزوبیومی برای یونجه تنش محسوب نمی‌شود. یونجه به طور طبیعی با ریزوبیوم همزیستی برقرار می‌کند و از این ارتباط سود می‌برد و نیازی به تغییر خصوصیات تشریحی خود ندارد. از نظر محققین سیستم روزنه‌ای 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 فوقانی و تحتانی به ترتیب ۱/۹۱ و ۱/۳۴ برابر مشاهده شد (جدول ۳). بیشترین تغییرات تشریحی برگ در گیاهان تلقیح‌نیافته تحت غلظت ۲ ppm گاز مشاهده شد.

نتایج آنالیز واریانس نشان داد که تلقیح ریزوبیومی یونجه اثر معنی‌داری بر طول سلول نردبانی و قطر سلول اسفنجی نداشت ولی طول سلول نردبانی و قطر سلول اسفنجی در گیاهان یونجه تحت تأثیر غلظت‌های مختلف گاز  $SO_2$  تفاوت معنی‌داری (سطح ۰/۰۱) را نشان دادند. در گیاهان تحت غلظت ۰/۵ppm گاز تغییر معنی‌داری در طول سلول نردبانی و قطر سلول اسفنجی مشاهده نشد اما با افزایش غلظت گاز طول سلول نردبانی 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 نردبانی و قطر سلول اسفنجی نسبت به شاهد مشاهده شد (جدول ۴).

اثر متقابل تلقیح باکتریایی و گاز  $SO_2$  بر طول سلول نردبانی (سطح ۰/۰۵) و قطر سلول اسفنجی (سطح ۰/۰۱) برگ گیاه یونجه اثر معنی‌داری را نشان داد. بزرگ‌ترین طول سلول نردبانی و قطر سلول اسفنجی در گیاهان شاهد (بدون تلقیح و بدون  $SO_2$ ) مشاهده شد. اختلاف معنی‌داری در طول سلول نردبانی و قطر سلول اسفنجی در گیاهان تلقیح‌نشده و تلقیح‌شده که تحت غلظت ۰/۵ppm گاز بودند، نسبت به گیاهان شاهد مشاهده نشد. کمترین طول سلول نردبانی در گیاهان تلقیح‌نشده تحت غلظت ۲ ppm گاز مشاهده شد که کاهش ۱۱/۴۱ درصدی را





شکل ۴- اثر متقابل گاز SO<sub>2</sub> (۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ ppm) و تلفیح باکتریایی (بدون تلفیح -R، تلفیح با ریزوبیوم بومی R<sub>n</sub> و استاندارد R<sub>s</sub>) بر (A): طول سلول نردبانی HPC (بر حسب میکرومتر) و (B): قطر سلول اسفنجی DSC (بر حسب میکرومتر) برگ گیاهان یونجه ۴۵ روزه. خطوط نشان دهنده خطای استاندارد (SE) و حروف غیرمشابه نشان دهنده معنی دار بودن (سلول نردبانی سطح ۰/۰۵ و برای سلول اسفنجی سطح ۰/۰۱) براساس آزمون دانکن می‌باشد.

تغییراتی در نفوذپذیری غشا و کاهش تورژسانس سلولی آن‌ها می‌شود که ممکن است افزایش در گشودگی روزنه را توضیح دهد (Singh *et al.*, 1985). بسته شدن شکاف‌های روزنه‌ای که در غلظت‌های خیلی بالا رخ می‌دهد یا در گیاهانی که زمان‌های خیلی طولانی در معرض SO<sub>2</sub> قرار گرفتند، باعث تجمع CO<sub>2</sub> در حفره‌های زیر روزنه و در نتیجه توقف فتوسنتز می‌شود. این کاهش دهانه روزنه برای جلوگیری از ورود بیشتر SO<sub>2</sub> به داخل برگ مفید است (Wali *et al.*, 2007). کاهش تعداد روزنه در سطح زیرین می‌تواند مقدار گاز SO<sub>2</sub> ای که وارد بافت‌های برگ می‌شود را کاهش دهد و بنابراین از گیاه در برابر سمیت این گاز محافظت کند (Sharma, 1977). کاهش دهانه روزنه اپیدرم زیرین برای جلوگیری از ورود بیشتر SO<sub>2</sub> به داخل برگ مفید است (Sharma, 1977). مطالعه‌ای گیاه *Brassica rapa* در معرض گاز CO<sub>2</sub>، افزایش تراکم کرک در گیاهان تحت تنش گاز تا ۵۷ درصد گزارش شد. افزایش تراکم کرک می‌تواند مکانیسمی برای تحمل تنش توسط گیاه باشد. (Karowe and Grubb, 2011). کرک‌های بلند ممکن است به عنوان یک فیلتر و محافظ عمل کنند و ذرات و مولکول‌های آلودگی را از دهانه روزنه دور نگه دارند (Sharma, 1977).

تعداد و ابعاد سلول‌های اپیدرمی، کرک و روزنه در برابر آلاینده‌های هوا مقابله می‌کنند (Kulshreshtha *et al.*, 1994). در گیاهان یونجه تحت غلظت SO<sub>2</sub> ۰/۵ ppm، تراکم و میزان گشودگی روزنه در هر دو سطح فوقانی و تحتانی مشابه گیاهان شاهد (۰ ppm) بود، یعنی غلظت ۰/۵ ppm گاز، تنش برای گیاه نبوده است و بر خصوصیات تشریحی گیاه تأثیر نداشته است. میزان طبیعی SO<sub>2</sub> 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). با افزایش غلظت گاز از ۰/۵ به ۲ ppm در سطح فوقانی تراکم روزنه کاهش و میزان گشودگی روزنه افزایش یافت و در سطح تحتانی نیز حالت عکس مشاهده شد. در مطالعه‌ی انجام شده توسط Wali و همکارانش (۲۰۰۷) تحت تیمار SO<sub>2</sub> گشودگی روزنه در هر دو سطح رویی و زیرین برگ همیشه بهار تغییر را نشان داد، اغلب در دوزهای پایین (۰/۵ ppm) گاز SO<sub>2</sub> بدون تغییر بودند. غلظت‌های بالای گاز به ویژه ۲ ppm باعث افزایش اندازه‌ی گشودگی روزنه در سطح رویی و کاهش آن در سطح زیرین برگ‌ها شد. افزایش دهانه روزنه در اپیدرم فوقانی به کاهش تورژسانس سلول‌های همراه روزنه مربوط می‌باشد. جذب سریع SO<sub>2</sub> توسط سلول‌های همراه باعث

ریزوبیوم به میزان کمتری صورت گرفت. کاهش معنی‌دار طول سلول نردبانی و قطر سلول اسفنجی در غلظت‌های ۱ تا ۲ ppm گاز، در گیاهان تلقیح‌یافته به میزان کمتری مشاهده شد. از آن‌جا که اکسین نقش مهمی در تنظیم رشد و نمو گیاهان دارد و رشد طولی سلول و تقسیم سلولی را وابسته به غلظت کنترل می‌کند (Saharan and Nehra, 2012) این اثر ناشی از تلقیح احتمالاً به دلیل تولید اکسین توسط باکتری است. همچنین اثر ریزوبیوم بر فعالیت‌های فیزیولوژیک به علت لومیکروم رها شده توسط باکتری می‌تواند باشد (Matiru and Dacora, 2005). لومیکروم یک مولکول سیگنال است که از ریشه به بخش‌های هوایی از طریق شیره خام انتقال یافته و در برگ تجمع یافته و سبب تغییرات نموی در اندام‌های هوایی می‌شود. لومیکروم محرک تقسیم و توسعه سلولی نیز می‌باشد. این متابولیت ریزوبیومی عمل روزه‌ها را تنظیم می‌کند و سبب سازش لگوم‌ها نسبت به تنش‌های مختلف می‌شود (Matiru and Dacora, 2005). باکتری ریزوبیوم همزیست با لگوم‌ها در کاهش شرایط تنشی نقش مهم و موثری را ایفا می‌کند. ریزوبیوم با تولید ترکیباتی همچون انواع هورمون‌ها، ویتامین‌ها، ترکیبات اسمولیت‌ها مثل پرولین، تولید ACC-دآمیناز و تولید آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی تحت شرایط تنش، در کاهش شرایط تنش برای گیاهان موثر است (Dimkpa et al., 2009).

### نتیجه‌گیری:

عدم تأثیر تلقیح ریزوبیومی به تنهایی بر شاخص‌های تشریحی برگ، بیان‌کننده این مطلب است که تلقیح ریزوبیومی برای یونجه تنش محسوب نمی‌شود. غلظت ۰/۵ ppm گاز SO<sub>2</sub> نیز برای یونجه تنش محسوب نمی‌شود اما غلظت‌های بالاتر اثرات منفی روی گیاه اعمال می‌کنند. با برقراری یک رابطه مناسب بین یونجه-ریزوبیوم می‌توان علاوه بر رشد گیاه، اثر آلودگی SO<sub>2</sub> را کاهش داد.

در گیاهان تحت غلظت ۰/۵ ppm گاز تغییر معنی‌داری در طول سلول نردبانی و قطر سلول اسفنجی مشاهده نشد اما با افزایش غلظت گاز طول سلول نردبانی و قطر سلول اسفنجی کاهش معنی‌داری پیدا کردند. در بررسی اثر آلودگی هوا روی ساختار بافتی *Trifolium montanum* و *T. pratense* مشخص شد که آلودگی هوا سبب کاهش قطر پارانشیم اسفنجی و طول پارانشیم نردبانی می‌شود. با توجه به فضا‌های بزرگ بین سلول‌های مزوفیل اسفنجی نسبت به پارانشیم نردبانی، بنابراین آلاینده‌های گازی به راحتی بعد از ورود به برگ در بخش تحتانی برگ انباشت شده و به پارانشیم حفره‌ای صدمات بیشتری می‌زنند. یکی از راه‌های مقاومت گیاهان به سمیت آلاینده‌های گازی افزایش ضریب نردبانی شدن است که این ضریب نسبت ضخامت سلول‌های پارانشیم نردبانی به ضخامت سلول‌های پارانشیم اسفنجی است (Gostin, 2009). در گیاه *Cajanus cajan* تحت تنش آلاینده‌های هوا، فراوانی کرک و کاهش اندازه برگ و برگچه، اندازه سلول‌های اپیدرمی، طول پارانشیم نردبانی، قطر پارانشیم اسفنجی، اندازه روزنه در اپیدرم فوقانی و تراکم روزنه در اپیدرم تحتانی گزارش شد (Meerabai et al., 2012). کاهش در طول سلول‌های نردبانی می‌تواند به این علت باشد که SO<sub>2</sub> به کلروپلاست سلول‌های نردبانی آسیب وارد می‌کند (Krishnayya and Bedi, 1989). محققان گزارش کردند که تخریب کلروفیل و فتوسنتز توسط SO<sub>2</sub> ابتدا در سلول‌های نردبانی برگ اتفاق می‌افتد (Hui-zhen et al., 1980).

اثرات منفی گاز SO<sub>2</sub> بر صفات تشریحی برگ به دنبال تلقیح با ریزوبیوم 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 تلقیح‌یافته (چه بومی و چه استاندارد) به میزان کمتری مشاهده شد. افزایش تعداد و طول کرک در غلظت‌های 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 Butany* 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 (Leguminosea: Sophorea). 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 صمیمانه 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 dibenzofuran-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 growth 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 Desember 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 stresses such as air pollution.

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

---

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