

اثرات تلقیح دو سویه ریزوبیوم بر شاخص‌های آناتومیکی شبدر ایرانی (*Trifolium resupinatum*) تحت آلودگی دی‌اکسید گوگرد

مهری عسکری Ph.D.*، لادن بیات M.Sc.^۲

۱- دانشگاه اراک، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی، کدپستی ۳۸۱۵۶-۸-۸۳۴۹
۲- کارشناس ارشد فیزیولوژی گیاهی، دانشگاه اراک، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی
* پست الکترونیک نویسنده مسئول: m-askary@araku.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۲/۱۰

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۹/۱۹

چکیده

هدف: هدف از این مطالعه ارزیابی اثرات تلقیح ریزوبیومی بر شاخص‌های آناتومیکی شبدر ایرانی تحت شرایط آلودگی SO_2 هوا می‌باشد.
مواد و روش‌ها: گیاهان ۳۱ روزه (تلقیح‌نشده، تلقیح‌شده با دو سویه ریزوبیوم) به مدت ۵ روز متوالی، هر روز ۲ ساعت تحت غلظت‌های مختلف گاز SO_2 (صفر به عنوان شاهد، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و $۲ppm$) قرار گرفتند. سپس شاخص‌های آناتومیکی برگ گیاهان ۴۰ روزه بررسی شد.

نتایج: تحت غلظت‌های بالای SO_2 (۱، ۱/۵ و $۲ppm$) طول سلول‌های نردبانی و قطر سلول‌های اسفنجی در هر دو سطح برگ کاهش، تراکم روزنه در اپی‌درم فوقانی کاهش و در اپی‌درم تحتانی افزایش یافتند. همچنین گشودگی دهانه روزنه در اپی‌درم فوقانی افزایش و در اپی‌درم تحتانی کاهش یافت. تراکم کرک در هر دو سطح برگ در غلظت‌های ۱/۵ و $۲ppm$ ، افزایش معنی‌داری را نسبت به گیاهان شاهد نشان داد. طول کرک در غلظت $۲ppm$ افزایش معنی‌داری را در هر دو سطح برگ نشان داد. تلقیح شبدر با دو سویه ریزوبیوم اثرات منفی غلظت‌های بالای SO_2 را به‌طور معنی‌داری کاهش داد.

نتیجه‌گیری: نتایج بیانگر اثرات منفی غلظت‌های بالای آلودگی SO_2 هوا بر برخی شاخص‌های آناتومیکی گیاهان و اثرات مثبت تلقیح باکتریایی در مقاومت نسبت به تنش آلودگی SO_2 هوا می‌باشد.

واژگان کلیدی: آلودگی SO_2 ، ریزوبیوم، شاخص‌های آناتومیکی، شبدر

مقدمه

آلودگی محیط توسط ترکیبات گوگردار مثل دی‌اکسید گوگرد (SO_2)، هیدروژن سولفید، سولفیت (SO_3^{2-}) و یون‌های سولفات (SO_4^{2-}) یک مشکل جدی جهان است (۱). دی‌اکسید گوگرد، یک گاز بی‌رنگ، خورنده، غیرقابل اشتعال و با بوی تند است (۲) 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 تاثیر قرار می‌دهد (۱). رخداد جنگ جهانی دوم و به‌دنبال آن گسترش اقتصاد پس از جنگ، منجر به افزایش بی‌سابقه انتشار گاز SO_2 به محیط شد. در بین سال‌های ۲۰۰۲ تا ۲۰۰۵ نثر SO_2 به هوای محیط افزایش ناگهانی یافت. در حال حاضر ۴۰ درصد انتشار جهانی این گاز از منطقه آسیا، به‌خصوص چین نشأت می‌گیرد و انتشار جهانی آن به محیط همچنان رو به افزایش است (۳). غلظت‌های پایین این گاز می‌تواند اثرات مثبت بر گیاهان داشته باشد ولی غلظت‌های بالای آن اثرات منفی را ایجاد می‌کند. اولین بار Hill و Thomas (۴) کاهش محصول یونجه را در حضور SO_2 هوا گزارش نمودند. صدمات ناشی از SO_2 بر سلول‌های مزوفیل و اپی‌درم برگ توسط Solberg و Adams (۵) گزارش شد. در سال ۱۹۷۰ گلسنگ‌ها به‌عنوان شاخص‌های بیولوژیک آلودگی هوای شهرهای تولیدکننده فولاد معرفی شدند (۶) تا اینکه Sharma (۷) تغییر برخی ویژگی‌های آناتومیکی برگ مثل تراکم و اندازه برگ، طول کرک را به‌عنوان شاخص و مقیاس آلودگی هوا مطرح نمود. گاز SO_2 پس از جذب توسط کوتیکول یا منافذ روزه، در دیواره سلول‌های برگ با آب ترکیب و به سولفیت SO_3^{2-} سمی، یک عامل هسته‌دوست قوی، تبدیل می‌گردد. 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 (۸).

ریزوبیوم مشهورترین باکتری محرک رشد گیاه و آندوفیت طبیعی گیاهان خانواده بقولات است (۹). ریزوبیوم می‌تواند با مکانیسم‌های مختلف مثل تثبیت نیتروژن ملکولی N_2 ، محلول‌سازی فسفر، افزایش آهن در دسترس، تولید هورمون‌های گیاهی، افزایش حجم و سطح ریشه و در نتیجه افزایش جذب عناصری مثل نیتروژن، فسفر، پتاسیم، منیزیم، تولید

ویتامین‌های گروه B و القای مقاومت به تنش‌ها سبب افزایش رشد گیاهان شود (۱۰). باکتری‌های محرک رشد علاوه بر افزایش رشد گیاه، به کمک یک‌سری مکانیسم‌ها سبب مقاومت به تنش‌های غیرزیستی می‌شوند. از جمله این مکانیسم‌ها می‌توان به تولید آنزیم ACC-دآمیناز اشاره کرد. این آنزیم با تجزیه ACC از تولید هورمون اتیلن جلوگیری می‌کند و در نتیجه اثرات اتیلن که موجب کاهش رشد ریشه و کاهش توانایی ریشه در اکتساب آب و مواد غذایی می‌شود را کاهش می‌دهد. تولید هورمون‌هایی مثل اسیدآبسیزیک که موجب بسته‌شدن روزنه‌ها می‌شود و آنتی‌اکسیدان‌هایی مثل سوپراکسیددیسموتاز که باعث مهار رادیکال‌های آزاد می‌شوند از جمله سازوکارهای دیگر به‌کار رفته توسط این باکتری‌ها است. تولید ترکیبات اسمولیت که در هنگام تنش منجر به ایجاد تعادل اسمزی در گیاه می‌شوند نیز از دیگر سازوکارها می‌باشد (۱۱). به‌طور مثال افزایش تحمل آرابیدوپسیس، فلفل و گوجه نسبت به تنش خشکی که به‌دنبال تلقیح با باکتری‌های محرک رشد مشاهده شده است (۱۱). بنابراین همزیستی لگوم-ریزوبیوم به‌عنوان کاندیدای خوب در زیست‌پالایی آلاینده‌ها پیشنهاد شده است.

شبدر ایرانی (*Trifolium resupinatum* L.) گیاهی از خانواده بقولات و یکساله است (۱۲) که بیشترین رویش را در آب و هوای نیمه گرمسیری دارد (۱۳). این گیاه می‌تواند با باکتری ریزوبیوم ارتباط همزیستی برقرار کند (۱۴). گیاهان علوفه‌ای در حاصلخیزی خاک نقش مهمی ایفا می‌کنند. شبدر ایرانی 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 (۱۵). مطالعه حاضر به‌منظور ارزیابی اثرات گاز SO_2 هوا بر پارامترهای آناتومیکی گیاه شبدر ایرانی و ارزیابی اثرات دو سویه باکتری ریزوبیوم (استاندارد و بومی) بر کاهش اثرات منفی آلودگی گاز SO_2 هوا صورت گرفت، تا در صورت موفقیت، کشت شبدر-ریزوبیوم در محیط‌های آلوده و نزدیک صنایع آلوده‌کننده هوا، به‌منظور پالایش آلودگی هوا پیشنهاد گردد.

مواد و روش‌ها

تهیه باکتری و آماده‌سازی مایه تلقیح: ریزوبیوم بومی از ریشه گیاه شبدر جمع‌آوری شده از زمین‌های مزروعی اطراف اراک استخراج شد. بدین منظور پس از سترون‌سازی ریشه شبدر

meliloti با غلظت 10^5 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 (۲۲).

کشت هیدروپونیک بذرهاى شبدر تلقیح شده: بذرهاى شبدر شاهد و تلقیح‌شده به پتری‌دیش منتقل و ۲۴ ساعت در تاریکی جهت جوانه‌زنی قرار گرفتند. بعد از جوانه‌زنی، بذرها به میکروتیوب‌های استریل درون ظروف کشت هیدروپونیک و حاوی دو لیتر محیط غذایی (هوگلند فاقد نیتروژن) منتقل شدند. اکسیژن‌دهی به‌وسیله پمپ هوا انجام شد. هر ظروف کشت هیدروپونیک محتوی بذرهاى شبدر شاهد یا تلقیح شده، یک تکرار از هر تیمار در نظر گرفته شد. این ظروف در شرایط محیط در درجه حرارت ۲۰ درجه سانتی‌گراد در شب و ۲۵ درجه سانتی‌گراد در روز و فتوپریود ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند. هر ۵ روز یکبار محیط غذایی تعویض شد (۲۲).

تزریق گاز SO₂: گاز دی‌اکسید گوگرد ۰/۱ درصد از پتروشیمی سازند اراک تهیه شد. ۳۱ روز پس از رشد گیاهان، در مرحله ۷ الی ۸ برگی گیاهان شاهد، تزریق گاز SO₂ در غلظت‌های مختلف (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 محتوی گیاهان، به فضای درونی گلدان‌ها انجام شد (۲۳). پس از دو ساعت آنکوباسیون 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. آزمایش به صورت کشت هیدروپونیک با طرح کاملاً تصادفی در قالب آزمایشات فاکتوریل در سه تکرار برای هر تیمار انجام شد.

رنگ‌آمیزی با نمک‌های تترازولیوم: به منظور اثبات تشکیل گرهک‌های فعال (از نظر آنزیم نیتروژناز) در ریشه گیاهان تلقیح‌شده با ریزوبیوم بومی و استاندارد، از هر تیمار سه گیاه به‌طور تصادفی انتخاب و درون ظروف حاوی محلول ۵،۳،۲-تری‌فنیل تترازولیوم کلراید در غلظت 1 g L^{-1} اضافه شد. بعد از ۲ ساعت آنکوباسیون در درجه حرارت محیط، ریشه‌ها در آب سترون شسته شدند. سپس مقاطع طولی و عرضی از ریشه تهیه شد و حضور گرهک‌های قرمز رنگ در ریشه بررسی گردید (۲۴).

توسط اتانول و شستشو بعدی توسط آب مقطر استریل (۱۶) گرهک‌های صورتی رنگ حاوی باکتری فعال از ریشه‌ها جدا و در آب مقطر له شده و در محیط جامد (۱۷) YMA کشت داده شدند و سپس به آنکوباتور ۲۵ درجه سانتی‌گراد منتقل گردید. پس از آنکوباسیون نوع واکنش گرم و مورفولوژی باکتری در زیر میکروسکوپ بررسی شد. تشکیل کلنی‌های محدب و برجسته، نیمه شفاف، لزج و موسیلاژی و واکنش گرم منفی نشانه موفقیت‌آمیز بودن جداسازی ریزوبیوم در نظر گرفته شد (۱۶).

ریزوبیوم استاندارد *Rhizobium meliloti* PTCC 1684 به‌صورت لیوفیلیزه از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد. برای فعال‌سازی این باکتری آمپول حاوی باکتری در شرایط استریل شکسته و ۱ میلی‌لیتر محیط کشت مایع YMA روی پودر باکتری ریخته شد. یک لوپ میکروبیولوژی از باکتری فوق در ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط مایع YMA حل و مدت ۲۴ ساعت روی شیکر با دور ۲۰۰ rpm گذاشته شد تا باکتری تکثیر پیدا کند. از آنجا که غلظت بهینه ریزوبیوم جهت تحریک رشد شبدر 10^5 گزارش شده است (۱۸)، دو سویه ریزوبیوم بومی و ریزوبیوم ملیوتی استاندارد در محیط YMA مایع (۱۷) در ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت در روتاری شیکر (با دور ۲۰۰ rpm) کشت داده شدند (۱۹). سپس کشت‌ها سانتریفوژ (دور ۱۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه) و در بافر فسفات تا رسیدن به غلظت 10^8 cfu mL⁻¹ دوباره محلول شدند. جهت تهیه غلظت فوق از معیار جذب نوری استفاده گردید. در صورتی که جذب نوری در محلول YMA مایع در طول موج ۶۲۰ نانومتر معادل ۰/۱ باشد غلظت ریزوبیوم 10^8 Cells mL⁻¹ در نظر گرفته شد (۲۰). سپس غلظت 10^5 از هر دو باکتری با رقیق نمودن محلول‌های مادر فوق توسط بافر فسفات تهیه شد.

تهیه و تلقیح بذرهاى شبدر ایرانی (*Trifolium resupinatum* L. cv. Alashtar Lorestan) از مرکز تحقیقات جهاد کشاورزی اراک تهیه شد. بذرها توسط اتانول ۷۰ درصد به مدت ۲ دقیقه و هیپوکلریت سدیم ۱ درصد به مدت ۵ دقیقه ضدعفونی سطحی و سپس ۵ بار با آب مقطر شستشو داده شدند (۲۱). بذرهاى شبدر سترون شده ابتدا به مدت چند ساعت در محیط غذایی قرار گرفته و سپس بذرها به سه گروه تقسیم شدند: گروه اول از بذرها در مایه تلقیح باکتری بومی با غلظت 10^5 cfu mL⁻¹ تحت خلا و در درجه حرارت محیط به مدت ۲ ساعت قرار داده شد. گروه دوم مایه تلقیح باکتری استاندارد *R.*

نردبانی و قطر سلول‌های اسفنجی در شبدر ایرانی ۴۰ روزه تلقیح شده با ریزوبیوم بومی و استاندارد و در معرض غلظت‌های مختلف SO_2 نشان داد که تلقیح باکتریایی بر هیچ یک از فاکتورهای ذکر شده اثر معنی‌داری ندارد ولی غلظت‌های مختلف SO_2 و اثر متقابل گاز و تلقیح روی این پارامترها در سطح ۰/۰۱ معنی‌دار است (جدول ۱).

اثر تلقیح باکتریایی و گاز SO_2 بر تراکم روزنه و کرک برگ شبدر ایرانی

الف- اثر گاز SO_2 به تنهایی: در غلظت SO_2 ۰/۵ ppm نسبت به گیاهان شاهد (۰ ppm)، تراکم روزنه در هر دو سطح فوقانی و تحتانی برگ تغییر معنی‌داری مشاهده نشد ولی تحت غلظت‌های بالاتر SO_2 (۱، ۱/۵ و ۲ ppm) تراکم روزنه در اپی‌درم تحتانی با افزایش شدت تنش افزایش یافت. این افزایش نسبت به شاهد برای غلظت‌های ۱، ۱/۵ و ۲ ppm SO_2 به ترتیب ۱۲/۸۸، ۲۱/۴۷ و ۳۵/۵۷ محاسبه شد. در حالی که در اپی‌درم فوقانی تراکم روزنه با افزایش شدت تنش کاهش معنی‌داری را نسبت به شاهد نشان داد (شکل ۲). این کاهش برای غلظت‌های ۱، ۱/۵ و ۲ ppm SO_2 به ترتیب ۲۰/۴۸ درصد، ۳۶/۰۸ و ۵۱/۶۸ درصد محاسبه شد. تراکم کرک در غلظت‌های ۰/۵ و ۱ ppm گاز SO_2 نسبت به گیاهان شاهد اختلاف معنی‌داری را در هر دو سطح برگ نشان نداد ولی تحت غلظت‌های ۱/۵ و ۲ ppm این گاز تراکم کرک هم در اپی‌درم فوقانی و هم تحتانی افزایش معنی‌داری را نسبت به شاهد نشان داد (شکل ۲). افزایش تراکم کرک در اپی‌درم فوقانی در غلظت‌های ۱/۵ و ۲ ppm به نسبت به شاهد به ترتیب ۵۰ و ۵۷ درصد و برای سطح تحتانی به ترتیب ۳۷/۵ درصد و ۴۰/۲۵ درصد محاسبه گردید (جدول ۲).

ب- اثر متقابل گاز SO_2 و تلقیح ریزوبیومی: بیشترین تراکم روزنه در اپی‌درم فوقانی در گیاهان بدون تلقیح و ۰ ppm گاز (شاهد) مشاهده شد. اختلاف معنی‌داری بین تراکم روزنه در گیاهان شاهد و تلقیح‌شده با باکتری بومی و استاندارد در غلظت‌های ۰ و ۰/۵ ppm گاز مشاهده نشد. کمترین تراکم روزنه در گیاهان بدون تلقیح و غلظت ۲ ppm گاز با ۵۷/۴۵ درصد کاهش نسبت به گیاهان شاهد مشاهده شد. در اپی‌درم تحتانی بیشترین تراکم روزنه در گیاهان تلقیح‌نشده و تحت غلظت ppm ۲ SO_2 با ۳/۲۶ درصد افزایش نسبت به گیاهان شاهد مشاهده شد و کمترین تراکم آن در گیاهان تحت غلظت‌های ۰ و ۰/۵ ppm گاز بود که در این رابطه بین گیاهان تلقیح‌نشده و

بررسی اپی‌درم: اپی‌درم سطح فوقانی (adaxial) و تحتانی (abaxial) برگ تعدادی از گیاهان شبدر ۴۰ روزه تلقیح‌نشده و تلقیح‌شده با ریزوبیوم بومی و استاندارد تحت تاثیر غلظت‌های مختلف گاز دی‌اکسید گوگرد، تهیه و با سافرانین ۱۰ درصد رنگ‌آمیزی شدند. سپس تراکم کرک (Trichome density) و روزنه (Stomatal density) در دو سطح فوقانی و تحتانی اپی‌درم برگ تمامی تیمارها و شاهد در مساحت ۰/۱۳ میلی‌متر مربع شمارش گردید. همچنین اندازه کرک (Trichome length) و دهانه روزنه (Stomatal opening) (برحسب میکرومتر) به وسیله گراتی کیول اندازه‌گیری شد (۲۵).

اندازه‌گیری ابعاد سلول‌های مزوفیل برگ: نمونه‌های تثبیت‌شده برگ (۲۶)، پس از فرآیند پاساژ بافتی (۲۷) (دستگاه پاساژ بافتی Leica، آلمان)، در پارافین بلوک‌گیری شدند. سپس با میکروتوم (مدل Leitz 1512 ساخت آلمان) برش‌های ۲۰ میکرونی از بافت برگ تهیه و رنگ‌آمیزی به روش هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) (۲۸) انجام شد. پس از عکسبرداری از نمونه‌های رنگ‌آمیزی شده طول سلول‌های نردبانی (Height of the palisade cells) و قطر سلول‌های اسفنجی (Diameter of the spongy cells) ناحیه مزوفیل برگ توسط نرم‌افزار موتیک (MOTIC IMAGES ADVANCED 3.2 SOFTWARE) اندازه‌گیری شد.

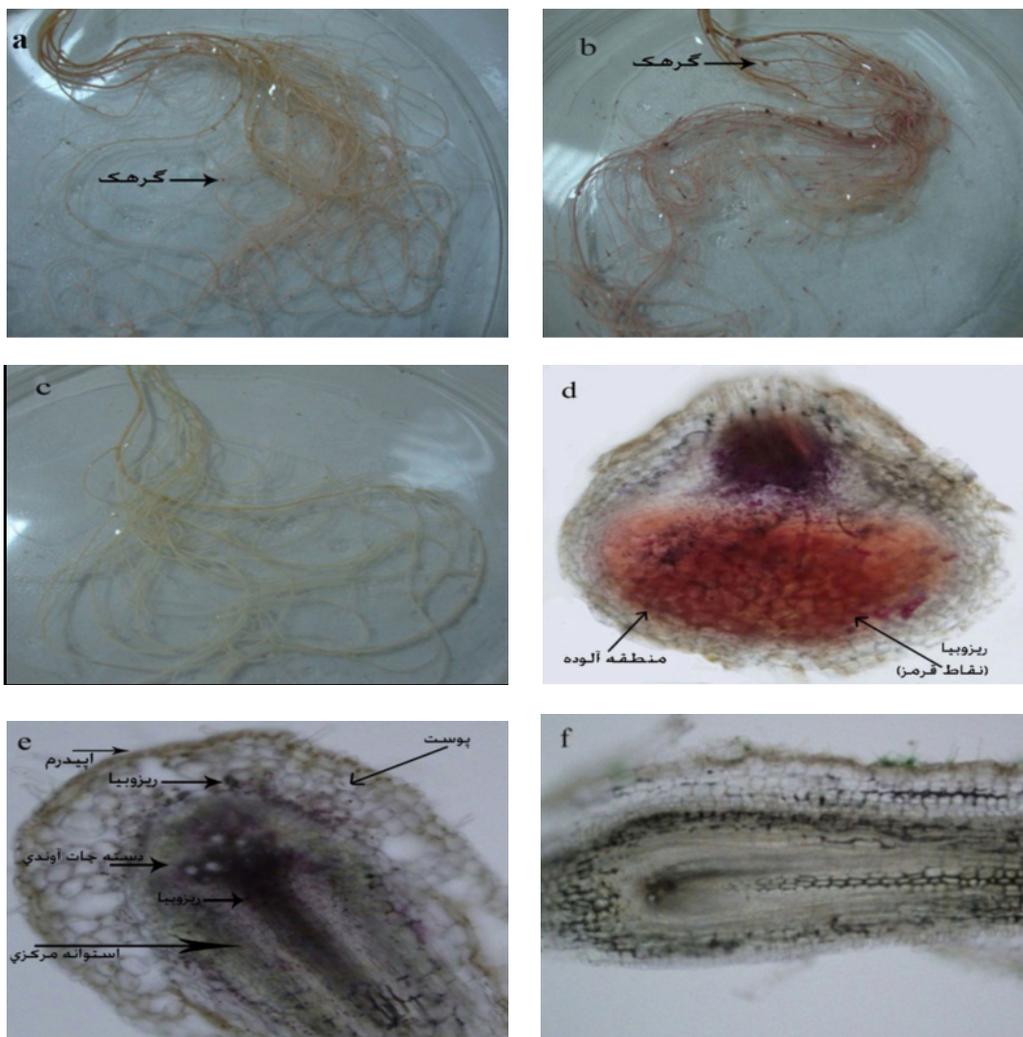
تجزیه و تحلیل داده‌ها با نرم‌افزار SPSS16، مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون دانکن و رسم نمودارها با کمک نرم‌افزار Excel انجام شد.

نتایج

بررسی مورفولوژی ریشه گیاهان شبدر تلقیح‌شده با ریزوبیوم بومی و استاندارد، وجود گرهک‌های صورتی رنگ و فعال را در ریشه این گیاهان نشان داد. این گرهک‌ها در ریشه گیاهان تلقیح‌نشده مشاهده نشدند. نتایج آزمایش تترازولیوم، قرمز شدن ریشه گیاهان شبدر تلقیح‌شده با ریزوبیوم بومی و استاندارد را نشان داد و بررسی برش عرضی ریشه این گیاهان وجود نقاط قرمز رنگ در سلول‌های ریشه را تایید کرد. در این رابطه از خاصیت احیا شونده تترازولیوم در حضور آنزیم نیتروژناز فعال باکتری و تشکیل رنگ قرمز استفاده شد (شکل ۱). نتایج بررسی آناتومی برگ شامل تراکم روزنه و کرک، گشودگی دهانه روزنه و اندازه کرک در اپی‌درم فوقانی و تحتانی برگ و طول سلول‌های

تحتانی نسبت به گیاهان شاهد مشاهده شد. کمترین میزان تراکم کرک در هر دو سطح برگ در گیاهان تلقیح‌شده و تلقیح‌نشده و تحت غلظت‌های ۰ و ۰/۵ ppm SO₂ شمارش گردید (جدول ۳).

گیاهان تلقیح‌شده با هر دو ریزوبیوم اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. بیشترین میزان تراکم کرک در هر دو سطح برگ در گیاهان تلقیح‌نیافته و غلظت ۲ ppm SO₂ با ۷۷/۸۳ درصد افزایش در اپی‌درم فوقانی و ۳۲/۵ درصد افزایش در اپی‌درم



شکل ۱: قرمز شدن ریشه پس از قرارگیری در تترازولیوم در گیاهان تلقیح‌شده با باکتری استاندارد (a)، باکتری بومی (b) و تغییر رنگ ندادن ریشه در گیاهان تلقیح‌نشده (c). برش عرضی از یک گره‌گ گیاه تلقیحی با ریزوبیوم بومی (d)، برش عرضی ریشه گیاهان تلقیح‌شده با ریزوبیوم استاندارد (e) و برش ریشه گیاهان تلقیح‌نشده (f).

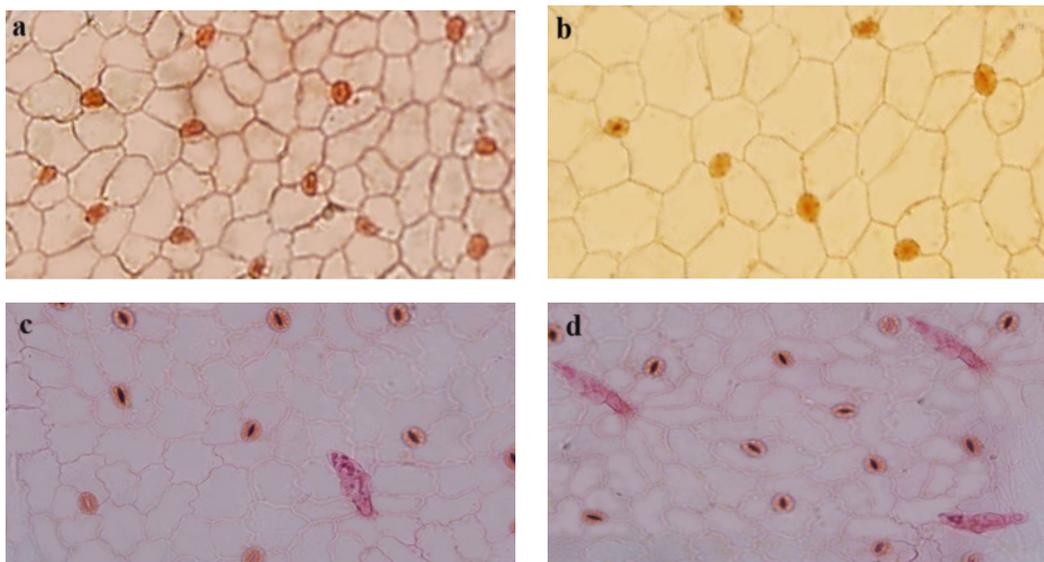
جدول ۱: آنالیز واریانس اثر متقابل گاز SO₂ (۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ ppm) و تلقیح باکتریایی (بدون تلقیح، تلقیح با ریزوبیوم بومی و استاندارد بر تراکم روزنه (SD)، تراکم کرک (TD)، دهانه روزنه (SO)، طول کرک (TL)، طول سلول نردبانی (HPC) و قطر سلول اسفنجی (DSC) در اپی‌درم فوقانی (ad) و تحتانی (ab) برگ گیاهان ۴۰ روزه. مقایسه هر ستون جداگانه انجام شده است.

DSC		HPC		TL		SO		TD		SD		منابع تغییر
(ab)	(ad)	(ab)	(ad)									
۰/۲۹۹ ^{ns}	۰/۴۲۴ ^{ns}	۰/۳۹ ^{ns}	۰/۴۳ ^{ns}	۰/۲۳ ^{ns}	۰/۴۵ ^{ns}	۱/۱۴ ^{ns}	۱/۶۱ ^{ns}	۱/۱۳ ^{ns}	۰/۵۶ ^{ns}	تیمار تلقیح باکتریایی		
۴۲۹/۵ ^{**}	۲۹۲/۶ ^{**}	۸۱/۷۵ ^{**}	۸۱/۹۱ ^{**}	۲۸۷/۴ ^{**}	۲۹۲/۳ ^{**}	۵۶/۸۲ ^{**}	۴۵/۸۷ ^{**}	۲۱۱/۶ ^{**}	۱۶۸/۶۲ ^{**}	تیمار گاز SO ₂		
۳۰/۷ ^{**}	۳/۲۸ ^{**}	۶/۸۴ ^{**}	۴/۹۹ ^{**}	۹/۸۰ ^{**}	۱۹/۴۸ ^{**}	۲۳/۲۴ ^{**}	۱۵/۳۸ ^{**}	۶۳/۸۱ ^{**}	۴۹/۶۱ ^{**}	اثر متقابل تلقیح و SO ₂		

^{**}: معنی‌دار در سطح ۱٪

^{*}: معنی‌دار در سطح ۵٪

^{ns}: معنی‌دار نیست



شکل ۲: تغییرات تراکم روزنه و کرک اپی‌درم فوقانی در شبدر ایرانی تحت غلظت ۲ ppm SO₂ نسبت به شاهد. تراکم روزنه (ob=10) در گیاه شاهد (a) و گیاه تحت غلظت ۲ ppm (b)، تراکم کرک (بزرگنمایی ۴۰۰×) در گیاه شاهد (c) و در گیاه تحت غلظت ۲ ppm SO₂ (d)

جدول ۲: مقایسه میانگین‌های اثر گاز SO₂ (۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ ppm) بر تراکم روزنه، گشودگی روزنه و اندازه کرک (μm) و تراکم کرک در اپی‌درم تحتانی (ab) و فوقانی (ad) برگ گیاهان ۴۰ روزه شبدر ایرانی. حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها مطابق آزمون دانکن است. داده‌ها میانگین ۳ تکرار ±SE است. مقایسه برای هر ردیف جداگانه انجام شده است.

شاخص	غلظت‌های مختلف گاز SO ₂ (ppm)				
	۰	۰/۵	۱	۱/۵	۲
تراکم روزنه ad (mm ²)	۱۳/۳۳ ^a ± ۰/۱	۱۲/۷۸ ^a ± ۰/۳	۱۰/۶ ^b ± ۰/۲	۸/۵۲ ^c ± ۰/۲	۶/۴۴ ^d ± ۰/۳
تراکم روزنه ab (mm ²)	۱۶/۳ ^d ± ۰/۲	۱۶/۴ ^d ± ۰/۱	۱۸/۴ ^c ± ۰/۱	۱۹/۸ ^b ± ۰/۲	۲۱/۶۱ ^a ± ۰/۱
تراکم کرک ad (mm ²)	۶ ^b ± ۰/۲	۵/۷۸ ^b ± ۰/۱	۶/۱۲ ^b ± ۰/۲	۹ ^a ± ۰/۲	۹/۴۲ ^a ± ۰/۳
تراکم کرک ab (mm ²)	۸ ^b ± ۰/۲	۷/۸۷ ^b ± ۰/۱	۸ ^b ± ۰/۱	۱۱ ^a ± ۰/۳	۱۱/۲۲ ^a ± ۰/۴
دهانه روزنه (ad) (μm)	۸/۵۳ ^d ± ۰/۰۴	۸/۵۰ ^d ± ۰/۰۴	۹/۶۷ ^c ± ۰/۰۸	۱۱/۸ ^b ± ۰/۰۷	۱۳/۴ ^a ± ۰/۰۹
دهانه روزنه (ab) (μm)	۱۲/۲۵ ^a ± ۰/۰۴	۱۲/۲۰ ^a ± ۰/۰۳	۱۱/۱ ^b ± ۰/۰۵	۹/۰۲ ^c ± ۰/۰۴	۷/۰۶ ^d ± ۰/۰۵
اندازه کرک (ad) (μm)	۱۴۷/۶ ^b ± ۵/۴	۱۵۲/۱ ^b ± ۶/۴	۱۵۵/۵ ^b ± ۳/۳	۱۵۷/۱ ^b ± ۶/۵	۲۷۷/۸ ^a ± ۶/۳
اندازه کرک (ab) (μm)	۳۳۷/۶ ^b ± ۴/۳	۳۴۲/۱ ^b ± ۵/۲	۳۴۵/۵ ^b ± ۴/۵	۳۴۷/۳ ^b ± ۵/۴	۴۶۷/۶ ^a ± ۶/۱

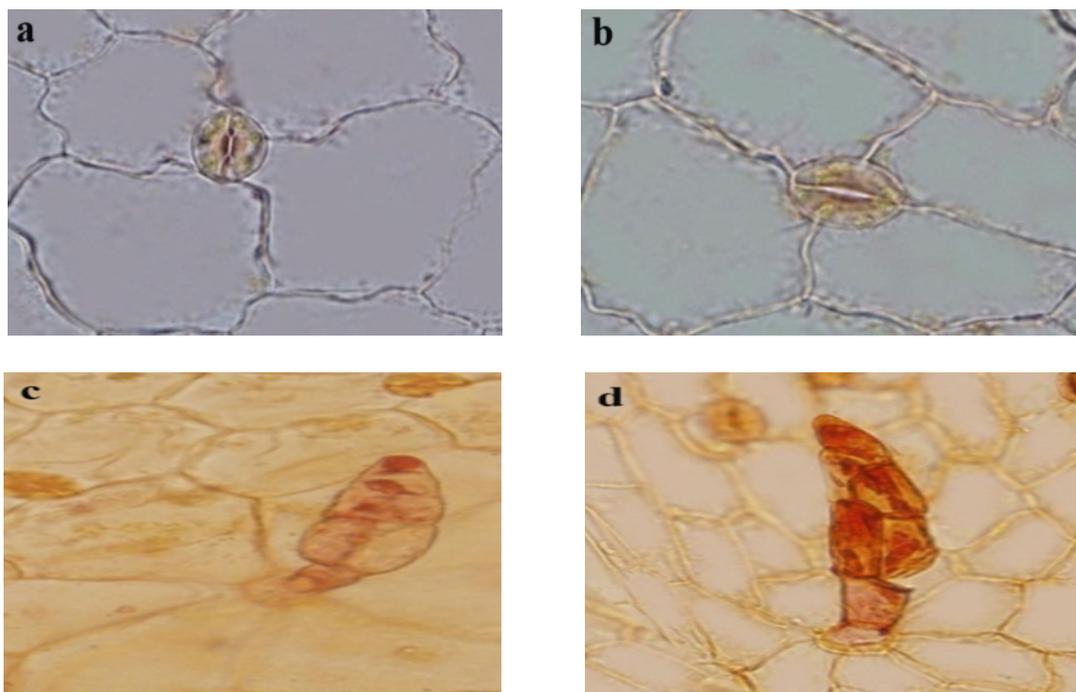
جدول ۳: مقایسه میانگین‌های اثر متقابل گاز SO_2 (۰، ۱/۵، ۱، ۲ ppm) و تلقیح باکتریایی (بدون تلقیح، تلقیح با ریزوبیوم بومی و استاندارد بر تراکم روزنه و کرک در اپی‌درم تحتانی (ab) و فوقانی (ad) برگ گیاهان ۴۰ روزه شبدر ایرانی. حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها مطابق آزمون دانکن است. داده‌ها میانگین ۳ تکرار $\pm SE$ است. مقایسه برای هر ستون جداگانه انجام شده است.

تلقیح	گاز SO_2 (ppm)	تراکم در mm^2	
		کرک ab	کرک ad
بدون تلقیح -R	۰	۱۳/۳۵ ^a ±۰/۳	۱۶/۳ ^c ±۰/۳
	۰/۵	۱۲/۶۷ ^a ±۰/۶	۱۶/۶۷ ^c ±۰/۳
	۱	۱۰ ^{b,c} ±۰	۱۹ ^c ±۰
	۱/۵	۷/۶۷ ^d ±۰/۳	۱۰/۳ ^a ±۰/۳
	۲	۵/۶۸ ^c ±۰/۲	۱۰/۶۷ ^a ±۰/۴
تلقیح با ریزوبیوم بومی	۰	۱۳ ^a ±۰/۴	۱۶/۲۷ ^c ±۰/۳
	۰/۵	۱۲/۵۹ ^a ±۰/۳	۱۶/۳ ^c ±۰/۳
	۱	۱۱ ^b ±۰	۱۸/۳۳ ^d ±۰
	۱/۵	۹ ^c ±۰	۱۹/۷ ^c ±۰/۲
	۲	۶/۶۷ ^d ±۰/۳	۲۱/۳۳ ^b ±۰/۲
تلقیح با ریزوبیوم استاندارد	۰	۱۳/۶ ^a ±۰/۲	۱۶ ^c ±۰
	۰/۵	۱۳ ^a ±۰/۵	۱۶/۴۳ ^c ±۰/۳
	۱	۱۰/۶۷ ^b ±۰/۲	۱۸ ^d ±۰
	۱/۵	۹ ^c ±۰	۱۹/۶ ^c ±۰/۲
	۲	۷ ^d ±۰/۵	۸/۸ ^b ±۰/۴

اثر تلقیح باکتریایی و گاز SO_2 بر گشودگی روزنه و اندازه کرک

الف- اثر گاز SO_2 به تنهایی: گشودگی روزنه تحت غلظت SO_2 ۰/۵ ppm در هر دو سطح فوقانی و تحتانی برگ نسبت به گیاهان شاهد (۰ ppm) تغییرات معنی‌داری را نشان نداد ولی در غلظت‌های بالاتر SO_2 (۱، ۱/۵ و ۲ ppm) گشودگی روزنه در اپی‌درم فوقانی و تحتانی متناسب با افزایش شدت تنش به ترتیب افزایش و کاهش یافت (شکل ۳). افزایش گشودگی روزنه اپی‌درم فوقانی در غلظت‌های ۱، ۱/۵ و ۲ ppm به ترتیب ۳۸/۳۳، ۱۳/۳۶ و ۵۷/۰۹ درصد و کاهش گشودگی روزنه در اپی‌درم تحتانی به ترتیب ۹/۳۸، ۲۶/۳۶ و ۴۲/۳۶ محاسبه گردید. اندازه کرک تا غلظت ۱/۵ ppm نسبت به گیاهان شاهد اختلاف معنی‌داری را در هر دو سطح برگ نشان نداد ولی تحت غلظت ۲ ppm در هر دو سطح برگ افزایش معنی‌داری را نسبت به شاهد داشت (شکل ۳). افزایش اندازه کرک در اپی‌درم فوقانی و تحتانی در غلظت ۲ ppm نسبت به شاهد به ترتیب ۸۸/۲۱ و ۳۸/۵۰ درصد محاسبه گردید (جدول ۴).

ب- اثر متقابل گاز SO_2 و تلقیح ریزوبیومی: در اپی‌درم فوقانی بیشترین میزان گشودگی روزنه در گیاهان بدون تلقیح و غلظت SO_2 ۲ ppm با ۶۶/۳۱ درصد افزایش نسبت به گیاهان شاهد مشاهده شد. این افزایش در همان تیمار گازی در شبدر تلقیح ریزوبیومی سویه بومی و استاندارد به ترتیب ۵۴ و ۵۳/۳۳ درصد اندازه‌گیری گردید. در اپی‌درم تحتانی کمترین میزان گشودگی روزنه در گیاهان بدون تلقیح و غلظت ۲ ppm گاز SO_2 با ۴۵/۶۲ درصد کاهش نسبت به گیاهان شاهد اندازه‌گیری شد که میزان کاهش در همین غلظت گاز در گیاهان تلقیحی با سویه بومی و استاندارد به ترتیب ۴۰ و ۴۱ درصد بود. بلندترین کرک در هر دو سطح برگ در گیاهان بدون تلقیح و غلظت ۲ ppm مشاهده شد که در اپی‌درم فوقانی و تحتانی به ترتیب ۱۲۹ و ۵۶/۴۶ درصد افزایش نسبت به گیاهان شاهد نشان داد. این افزایش در همان تیمار گازی برای گیاهات تلقیح‌شده با سویه بومی به ترتیب ۶۸ و ۳۰ درصد و برای گیاهان تلقیح‌شده با سویه استاندارد ۶۶ و ۳۰ درصد محاسبه شد (جدول ۴).



شکل ۳: تغییرات گشودگی روزنه و طول کرک در اپی‌درم فوقانی گیاه شبدر ایرانی تحت غلظت ۲ ppm گاز SO₂ نسبت به گیاه شاهد. گشودگی روزنه (بزرگنمایی ۱۰۰×) در گیاه شاهد (a) و گشودگی روزنه (بزرگنمایی ۱۰۰×) در گیاه تحت غلظت ۲ ppm (b)، طول کرک (بزرگنمایی ۴۰۰×) گیاه شاهد (c) و طول کرک (ob=40) گیاه تحت غلظت ۲ ppm گاز SO₂ (d).

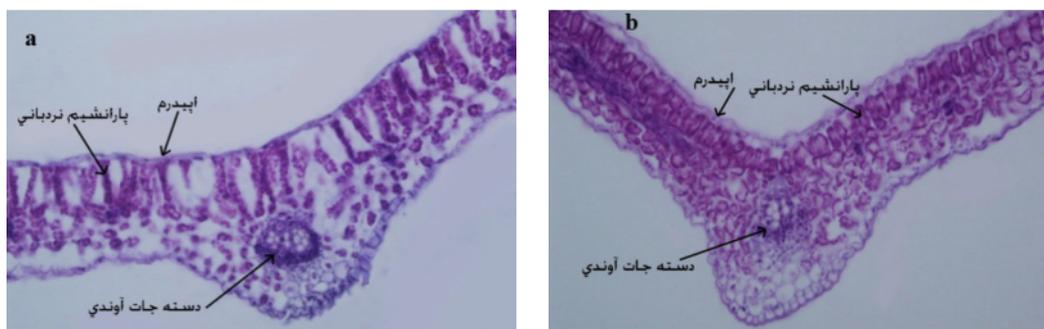
جدول ۴: مقایسه میانگین‌های اثر متقابل گاز SO₂ (۰، ۰/۵، ۱/۵، ۲ ppm) و تلقیح (بدون تلقیح، تلقیح با ریزوبیوم بومی و استاندارد بر دهانه روزنه (μm) و اندازه کرک (μm) اپی‌درم تحتانی (ab) و فوقانی (ad) گیاهان ۴۰ روزه شبدر ایرانی. حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها مطابق آزمون دانکن است. داده‌ها میانگین ۳ تکرار ±SE است. مقایسه برای هر ستون جداگانه انجام شده است.

تلقیح	SO ₂ ppm	دهانه روزنه		اندازه کرک	
		(ab)	(ad)	(ab)	(ad)
بدون تلقیح -R	۰	۸/۵۵ ^{±۰/۰۸}	۱۲/۲۳ ^{±۰/۰۶}	۳۳۷/۴ ^{±۶/۵}	۱۴۷/۴ ^{±۴/۶}
	۰/۵	۸/۵۴ ^{±۰/۰۷}	۱۲/۲۱ ^{±۰/۰۷}	۳۴۱/۲ ^{±۷/۳}	۱۵۱/۳ ^{±۹/۳}
	۱	۱۰/۲۹ ^{±۰/۰۳}	۱۰/۴۶ ^{±۰/۰۴}	۳۴۱/۷ ^{±۵/۱}	۱۵۱/۸ ^{±۷/۶}
	۱/۵	۱۲/۴۴ ^{±۰/۰۳}	۸/۵۹ ^{±۰/۰۶}	۳۴۷/۶ ^{±۹/۲}	۱۵۷/۶ ^{±۸/۱}
	۲	۱۴/۲۲ ^{±۰/۰۹}	۶/۶۵ ^{±۰/۰۵}	۵۲۷/۹ ^{±۶/۷}	۳۳۷/۸ ^{±۶/۲}
تلقیح با ریزوبیوم بومی	۰	۸/۵۱ ^{±۰/۰۹}	۱۲/۲۷ ^{±۰/۰۹}	۳۳۶/۴ ^{±۹/۳}	۱۴۶/۸ ^{±۷/۸}
	۰/۵	۸/۵۳ ^{±۰/۰۷}	۱۲/۲۳ ^{±۰/۰۵}	۳۴۰/۴ ^{±۸/۶}	۱۵۰/۴ ^{±۸/۶}
	۱	۹/۳۹ ^{±۰/۰۳}	۱۱/۳۷ ^{±۰/۰۴}	۳۴۵/۹ ^{±۵/۲}	۱۵۵/۹ ^{±۶/۴}
	۱/۵	۱۱/۴۷ ^{±۰/۰۱}	۹/۲۶ ^{±۰/۰۷}	۳۵۲ ^{±۹/۷}	۱۶۲/۱ ^{±۸/۵}
	۲	۱۳/۱۱ ^{±۰/۰۶}	۷/۳۱ ^{±۰/۰۶}	۴۳۷/۹ ^{±۶/۵}	۲۴۷/۹ ^{±۴/۹}
تلقیح با ریزوبیوم استاندارد	۰	۸/۵۳ ^{±۰/۰۶}	۱۲/۲۷ ^{±۰/۰۴}	۳۳۹/۰۳ ^{±۸/۳}	۱۴۸ ^{±۹/۵}
	۰/۵	۸/۵۰ ^{±۰/۰۹}	۱۲/۲۴ ^{±۰/۰۷}	۳۴۴/۵ ^{±۸/۱}	۱۵۴/۷ ^{±۷/۴}
	۱	۹/۳۲ ^{±۰/۰۴}	۱۱/۳۵ ^{±۰/۰۹}	۳۴۸/۸ ^{±۵/۲}	۱۵۸/۸ ^{±۶/۴}
	۱/۵	۱۱/۴۶ ^{±۰/۰۳}	۹/۲۳ ^{±۰/۰۶}	۳۴۱/۵ ^{±۹/۲}	۱۵۱/۵ ^{±۷/۹}
	۲	۱۳/۱۶ ^{±۰/۰۴}	۷/۲۲ ^{±۰/۰۱}	۴۳۷/۸ ^{±۹/۷}	۲۴۴/۸ ^{±۷/۴}

اثر تلقیح باکتریایی و گاز SO₂ بر طول سلول نردبانی و قطر سلول اسفنجی

الف- اثر گاز SO₂ به تنهایی: گیاهان در معرض غلظت ppm SO₂ ۰/۵ نسبت به گیاهان شاهد (۰ ppm) تغییرات معنی‌داری را در طول سلول‌های نردبانی و قطر سلول‌های اسفنجی برگ نشان ندادند، ولی تحت غلظت‌های بالاتر SO₂ (۱، ۱/۵ و ppm ۲) طول سلول‌های نردبانی و قطر سلول‌های اسفنجی برگ کاهش معنی‌داری را نسبت به گیاهان شاهد نشان دادند (شکل ۴). کمترین میزان طول سلول‌های نردبانی و قطر سلول‌های اسفنجی در گیاهان تحت غلظت ۲ ppm به ترتیب معادل ۱۱/۱۰ μm (۲۰ درصد کاهش نسبت به شاهد) و ۳۲/۱۱ μm (۳۲ درصد کاهش نسبت به شاهد) مشاهده شد (جدول ۵).

ب- اثر متقابل گاز SO₂ و تلقیح ریزوبیومی: کمترین میزان طول سلول‌های نردبانی و قطر سلول‌های اسفنجی برگ، در گیاهان تلقیح‌نیافته و غلظت SO₂ ۲ ppm مشاهده شد که کاهش به ترتیب ۲۳/۰۲ و ۳۸/۶۹ درصد را نسبت به گیاهان شاهد (بدون تلقیح و ppm ۰ گاز) نشان دادند. در همین غلظت گازی کاهش طول سلول نردبانی و قطر سلول اسفنجی برای گیاهان تلقیحی با سویه بومی به ترتیب ۱۸/۸۷ و ۳۰/۷ درصد و برای گیاهان تلقیحی با سویه استاندارد ۱۸/۸ و ۳۱/۱ درصد محاسبه گردید. بیشترین میزان طول سلول‌های نردبانی و قطر سلول‌های اسفنجی برگ در گیاهان تلقیح‌یافته و تلقیح‌نیافته و تحت غلظت‌های ۰ و ppm ۰/۵ گاز مشاهده شد (جدول ۶).



شکل ۴: تغییرات طول سلول‌های نردبانی (بزرگنمایی ۴۰۰x) در برگ گیاه شبر ایرانی تحت غلظت ۲ ppm گاز SO₂ نسبت به گیاه شاهد. سلول‌های نردبانی در برگ گیاه شاهد (a) و طول سلول‌ها در برگ گیاه تحت غلظت ۲ ppm (b).

جدول ۵: مقایسه میانگین‌های اثر گاز SO₂ (۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ ppm) بر طول سلول نردبانی و قطر سلول اسفنجی (μm) گیاهان ۴۰ روزه شبر ایرانی. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها مطابق آزمون دانکن است. داده‌ها میانگین ۳ تکرار ± SE است. مقایسه برای هر ردیف جداگانه انجام شده است.

غلظت‌های مختلف گاز SO ₂ (ppm)					شاخص
۲	۱/۵	۱	۰/۵	۰	
۳۳/۱۱ ^d ± ۰/۲	۲۵/۰۳ ± ۰/۳	۲۷/۱۶ ^b ± ۰/۱	۲۸/۸۵ ^a ± ۰/۱	۲۸/۹۳ ^a ± ۰/۲	طول سلول نردبانی (μm) میانگین
۲۰/۱۱	۱۳/۵۱	۶/۱۱	۰/۲۷	-	*
۱۱/۱ ^d ± ۰/۰۹	۱۳/۱ ^c ± ۰/۰۸	۱۴/۹۵ ^b ± ۰/۰۹	۱۶/۶ ^a ± ۰/۰۳	۱۶/۶۳ ^a ± ۰/۰۴	قطر سلول اسفنجی (μm) میانگین
۳۲/۲۵	۲۱/۲۲	۲۸/۱۴	۰/۱۸	-	*

* = درصد تغییر نسبت به شاهد

جدول ۶: مقایسه میانگین‌های اثر متقابل گاز SO_2 (۰، ۱/۵، ۰، ۱/۵، ۲ppm) و تلقیح باکتریایی (بدون تلقیح R-، تلقیح با ریزوبیوم بومی و استاندارد) بر طول سلول نردبانی و قطر سلول اسفنجی (μm) گیاهان ۴۰ روزه شبدر ایرانی. حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها مطابق آزمون دانکن است. داده‌ها میانگین ۳ تکرار $\pm SE$ است و مقایسه برای هر ستون جداگانه انجام شده است.

تلقیح	SO_2 (ppm)	طول سلول نردبانی (μm)	قطر سلول اسفنجی (μm)
بدون تلقیح R-	۰	۲۸/۸۸ ^{ab} ± ۰/۳	۱۶/۶۷ ^a ± ۰/۰۵
	۰/۵	۲۸/۸۳ ^{ab} ± ۰/۲	۱۶/۶۲ ^a ± ۰/۰۴
	۱	۲۶/۵۵ ^d ± ۰/۱	۱۴/۳۵ ^c ± ۰/۰۲
	۱/۵	۲۴/۲۰ ^e ± ۰/۱	۱۲/۵۸ ^c ± ۰/۰۳
	۲	۲۲/۲۳ ^e ± ۰/۱	۱۰/۲۲ ^e ± ۰/۰۵
تلقیح با ریزوبیوم بومی	۰	۲۹/۴۷ ^a ± ۰/۴	۱۶/۶۳ ^a ± ۰/۰۴
	۰/۵	۲۸/۷۲ ^{ab} ± ۰/۳	۱۶/۵۷ ^a ± ۰/۰۲
	۱	۲۷/۳۹ ^c ± ۰/۱	۱۵/۲۱ ^b ± ۰/۰۳
	۱/۵	۲۵/۳۶ ^c ± ۰/۰۹	۱۳/۲۱ ^d ± ۰/۰۴
	۲	۲۳/۶۳ ^f ± ۰/۰۹	۱۱/۵۵ ^f ± ۰/۰۸
تلقیح با ریزوبیوم استاندارد	۰	۲۸/۴۳ ^b ± ۰/۴	۱۶/۶۰ ^a ± ۰/۰۹
	۰/۵	۲۸/۹۰ ^{ab} ± ۰/۳	۱۶/۵۵ ^a ± ۰/۰۹
	۱	۲۷/۵۴ ^c ± ۰/۱	۱۵/۲۸ ^b ± ۰/۰۳
	۱/۵	۲۵/۵۱ ^c ± ۰/۱	۱۳/۲۵ ^d ± ۰/۰۸
	۲	۲۳/۴۵ ^f ± ۰/۲	۱۱/۴۸ ^f ± ۰/۰۴

بحث

دهنده آلودگی‌های زیست محیطی در نظر می‌گیرند (۳۴). بنابراین عدم تغییر آناتومی گیاه به دنبال تلقیح ریزوبیومی شبدر بیان کننده این مطلب است که تلقیح ریزوبیومی شبدر برای گیاه تنش محسوب نمی‌شود و گیاهان به‌طور طبیعی با باکتری‌های محرک رشد همزیستی برقرار می‌کنند؛ بنابراین گیاه نیازی به تغییر آناتومی خود ندارد.

از نظر محققین وقتی غلظت گاز SO_2 از حد طبیعی خود که بین ۰/۵-۱/۵ ppm می‌باشد، بیشتر شود آلودگی گاز SO_2 رخ می‌دهد (۳۵ و ۳۶). بنابراین غلظت ۰/۵ ppm غلظت سمی برای گیاه نمی‌باشد. از طرفی تاثیر گاز SO_2 بر گیاهان وابسته به گونه گیاهی، مرحله نمو گیاه، فاکتورهای بیرونی مثل خاک، فصل و دما، مدت زمان قرار گرفتن در معرض SO_2 و غلظت SO_2 متفاوت است (۸ و ۳۷). برخی محققین از آناتومی گیاهان، علاوه بر استفاده در سیستماتیک، در بیان حضور آلودگی‌های زیست محیطی استفاده می‌کنند. تغییرات آناتومی گیاه به‌عنوان یک تکنیک اخطار دهنده آلودگی‌های زیست محیطی می‌باشد (۳۴). در مطالعه حاضر نتایج اختلاف معنی‌داری را در خصوص تراکم روزنه و کرک، اندازه دهانه روزنه و اندازه کرک بین برگ گیاهان تیمار شده با SO_2 و گیاهان شاهد (۰ ppm) نشان داد. تراکم روزنه در گیاهان قرار گرفته تحت غلظت ۰/۵ ppm در هر دو سطح برگ تغییر معنی‌داری نشان نداد ولی تحت غلظت‌های ۱، ۱/۵ و ۲ ppm SO_2 تراکم روزنه در اپیدرم تحتانی با افزایش

ریزوباکترهای محرک رشد گیاه مثل ریزوبیوم سبب افزایش رشد گیاه می‌شوند که این افزایش رشد می‌تواند به صورت مستقیم و غیرمستقیم اتفاق بیفتد (۲۹). باکتری در حالت مستقیم با تثبیت نیتروژن، محلول‌سازی فسفر، افزایش آهن در دسترس، تولید هورمون‌های گیاهی و ویتامین‌ها و در حالت غیرمستقیم با افزایش مقاومت به تنش‌های زیستی و غیر زیستی سبب رشد گیاه می‌شود (۳۰). در این مطالعه ریزوبیوم بومی و استاندارد به‌تنهایی بر روی تراکم روزنه، تراکم کرک، دهانه روزنه، اندازه کرک، طول سلول‌های نردبانی و قطر سلول‌های اسفنجی تاثیر معنی‌داری نداشتند و این شاخص‌ها در گیاهان تلقیح‌یافته نسبت به گیاهان تلقیح‌نیافته تغییر معنی‌داری را نشان ندادند. در مطالعه‌ای بر روی گیاه موتان *Lotus japonicum* تلقیح‌شده با سویه‌ای از ریزوبیوم هیچ تفاوتی در ساختار کرک قبل و بعد از تلقیح با ریزوبیوم مشاهده نشد (۳۱). از نظر محققین سیستم روزنه‌ای در بسیاری از گیاهان به‌عنوان یک سیستم طبیعی عمل می‌کند که در مقابله با باکتری‌های بیماری‌زا تغییر نموده و در این حالت تغییرات آناتومی، در سازش و بقا گیاه می‌تواند موثر باشد (۳۲). به‌طوری که در گیاه *Lycopersicon esculentum* تلقیح شده با باکتری *Xanthomonas campestris* بسته شدن روزنه‌ها و کاهش دهانه روزنه القا شد (۳۳). همچنین محققین تغییرات آناتومی گیاه را به‌عنوان یک تکنیک آگاه کننده و اخطار

بلند ممکن است به‌عنوان یک فیلتر و محافظ عمل کنند و ذرات و مولکول‌های آلودگی را از دهانه روزنه دور نگه دارند (۷).

بررسی اثرات آلودگی هوا بر گیاهان *T. Trifolium repense*، *pretense* و *Acer saccharum* کاهش دهانه روزنه و افزایش طول کرک و تراکم کرک را در هر دو سطح برگ نشان داد (۴۰). همچنین بررسی گیاهان شبدر سفید و شبدر قرمز در مناطق آلوده هوا، کاهش تراکم روزنه و افزایش تراکم و طول کرک را نشان داد (۷). گیاه *Tithonia diversifolia* در مناطق آلوده طول کرک بیشتر و تراکم کرک کمتر را نسبت به گیاهان قرار گرفته در مناطق غیرآلوده داشتند (۴۱). اندازه دهانه روزنه و تراکم روزنه در سطح فوقانی برگ گیاه *Psoralea corylifolia* در اثر تیمار با گاز SO_2 کاهش یافت (۴۲).

در بررسی حاضر تحت غلظت SO_2 ۰/۵ ppm، طول سلول‌های نردبانی و قطر سلول‌های اسفنجی برگ در گیاهان تحت تیمار تغییرات معنی‌داری را نسبت به گیاهان تحت غلظت ۰ ppm نشان نداد ولی تحت غلظت‌های بالاتر SO_2 (۱، ۱/۵ و ۲ ppm) کاهش معنی‌داری را نسبت به گیاهان شاهد نشان داد. در گیاهان *Trifolium repense*، *T. montanum*، *T. repense* و *Lotus repense* تحت آلودگی هوا طول سلول‌های نردبانی کاهش پیدا کرد ولی قطر سلول‌های اسفنجی در همه گیاهان به جز *Lotus repense* نسبت به شاهد تغییر معنی‌داری نداشت. در گیاه *Lotus repense* قطر سلول‌های اسفنجی نسبت به گیاهان آلوده کاهش معنی‌داری را نشان داد (۲۶). کاهش در طول سلول‌های نردبانی می‌تواند به این علت باشد که SO_2 به کلروپلاست سلول‌های نردبانی آسیب وارد می‌کند (۴۳). محققان گزارش کردند که تخریب کلروفیل و فتوسنتز توسط SO_2 ابتدا در سلول‌های نردبانی برگ اتفاق می‌افتد (۴۴).

نتیجه‌گیری

غلظت SO_2 ۰/۵ ppm بر شاخص‌های آناتومیکی برگ شبدر ایرانی تاثیر معنی‌داری ندارد ولی غلظت‌های بالاتر روی این شاخص‌ها اثر گذاشته و شرایط تنشی برای گیاه ایجاد نموده است. تعدادی از گیاهان با افزایش تعداد و اندازه کرک، تغییر در تعداد روزنه و گشودگی روزنه و تغییر اندازه سلول‌های مزوفیل برگ در برابر آلاینده‌های محیطی و هوا مقابله می‌کنند. همانطور که مشاهده شد اثر گاز SO_2 (غلظت‌های بالاتر از ۰/۵ ppm) به عنوان یک تنش با تغییر آناتومیکی برگ همراه شد. عدم تاثیر

شدت تنش افزایش یافت درحالی‌که در اپی‌درم فوقانی تراکم روزنه با افزایش شدت تنش کاهش معنی‌داری را نسبت به گیاهان شاهد نشان داد. کاهش تراکم روزنه در سطح فوقانی می‌تواند مقدار گاز SO_2 ای که وارد بافت‌های برگ می‌شود را کاهش دهد و بنابراین از گیاه در برابر سمیت این گاز محافظت کند (۷).

گشودگی دهانه روزنه در گیاهان قرارگرفته تحت غلظت ppm ۰/۵ SO_2 نسبت به گیاهان تحت غلظت ppm ۰ در هر دو سطح برگ تغییرات معنی‌داری را نشان نداد، ولی تحت غلظت‌های بالاتر SO_2 (۱، ۱/۵ و ۲ ppm) گشودگی روزنه در اپی‌درم فوقانی با افزایش شدت تنش افزایش یافت درحالی‌که در اپی‌درم تحتانی دهانه روزنه با افزایش شدت تنش کاهش معنی‌داری را نسبت به گیاهان شاهد نشان داد. به‌نظر می‌رسد که افزایش دهانه روزنه به کاهش تورژسانس سلول‌های همراه روزنه مربوط باشد. یک جذب سریع از SO_2 توسط این سلول‌های همراه باعث تغییراتی در نفوذپذیری غشا و کاهش در تورژسانس سلولی آن‌ها می‌شود که ممکن است افزایش در گشودگی روزنه را توضیح دهد (۳۸). بسته شدن شکاف‌های روزنه‌ای که در سطوح برگ‌ها (۳۵) همچنین در غلظت‌های خیلی بالای SO_2 یا در مدت زمان‌های خیلی طولانی در معرض SO_2 قرار گرفتن (۳۸) رخ می‌دهد باعث تجمع CO_2 در حفره‌های زیر روزنه‌ای و در نتیجه متوقف شدن فتوسنتز می‌شوند (۳۹). کاهش دهانه روزنه در اپی‌درم تحتانی برای جلوگیری از ورود بیشتر SO_2 به داخل برگ مفید است. از آنجایی که گشودگی دهانه روزنه در اپی‌درم فوقانی توسط اثر SO_2 افزایش می‌یابد پس کاهش دهانه روزنه در اپی‌درم تحتانی می‌تواند یک مکانیسم باشد که توسط گیاه برای جلوگیری از ورود بیشتر SO_2 به برگ به کار می‌رود.

افزایش تراکم کرک در غلظت‌های ۱/۵ و ۲ ppm در هر دو سطح برگ مشاهده شد درحالی‌که در غلظت‌های ۰/۵ و ۱ ppm تراکم کرک در هر دو سطح برگ تغییر معنی‌داری را نسبت به گیاهان تحت غلظت ۰ ppm نشان نداد. می‌توان گفت که غلظت‌های زیاد SO_2 (۱/۵ و ۲ ppm) به‌صورت تنش محیطی می‌تواند تشکیل کرک را تحریک کند و سبب افزایش تراکم کرک شود. اندازه کرک در غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۱/۵ ppm SO_2 نسبت به گیاهان شاهد اختلاف معنی‌داری را در هر دو سطح برگ نشان نداد ولی تحت غلظت ۲ ppm اندازه کرک در هر دو سطح برگ افزایش معنی‌داری را نسبت به گیاهان شاهد نشان داد. کرک‌های

11. Yang J, Kloepper JW, Ryu CM. Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Plant Sci.* 2009; 14(1): 1-4.
12. Erdemli S, Colak E, Kendir H. Determination of some plant and agricultural characteristics in Persian clover (*Trifolium resupinatum* L.). *Tarim Bilimleri Dergisi.* 2007; 13(3): 240-245.
13. Ates E. Influence of some hard seededness-breaking treatments on germination in Persian clover (*Trifolium resupinatum* ssp. *typicum* Fiori Et Paol.) seeds. *Rom. Agric. Res.* 2011; 28: 229-236.
14. Abbas SM, Kamel EA. *Rhizobium* as a biological agent for preventing heavy metal stress. *Asian J Plant Sci.* 2004; 3(4): 416-424.
15. Abbasi MR. Genetic diversity of Persian clover (*Trifolium resupinatum*) gene pools in National Plant Gene Bank of Iran. *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research.* 2008; 16(1): 37-49.persian
16. Swift M, Bignell D. Standard methods for assessment of soil biodiversity and land use practice. International centre for research in Agroforestry (ICRAF) Southeast Asia 2001. Available from: URL: <http://www.icraf.cgiar.org/sea>.
17. Molla AH, Shamsuddin ZH, Halimi MS, Morziah M, et al. Potential for enhancement of root growth and nodulation of soybean co-inoculated with *Azospirillum* and *Bradyrhizobium* in laboratory systems. *Soil Bio. Biochem.* 2001; 33: 457-463.
18. Caetano-Anolles G, Wall LG, De Micheli AT, Macchi EM, et al. Role of motility and chemotaxis in efficiency of nodulation by *Rhizobium meliloti*. *Plant Physiol.* 1988; 86: 1228-1235.
19. Sadovinkova YN, Bespalova LA, Antonyuk LP. Wheat gram agglutinin is a grown factor for bacterium *Azospirillum brasilense*. *Dokl. Biochem. Biophys.* 2003; 398:103-105.
20. Bai Y, Zhou X, smith DL. Crop ecology, management and quality: enhanced soybean plant growth resulting from coinoculation of Bacillus strains with *Bradyrhizobium japonicum*. *Crop Sci.* 2003; 43: 1774-1781.
21. Wang YX, Oyaizu H. Evaluation of the phytoremediation potential of four plant species for dibenzofu-ran-contaminated soil. *J. of Hazard. Mater.* 2009; 168: 760-764.
22. Bashan Y, Levanony H, Mitiku G. Changes in proton efflux of intact wheat roots induced by *Azospirillum brasilense* Cd. *Can. J. Microbiol.* 1989; 35: 691-697.
23. Agrawal M, Nandi PK, Rao DN. Effects of sulphur dioxide fumigation on soil system and

تلقیح ریزوبیومی به تنهایی بر آناتومی برگ تاکید بر تنش نبودن تلقیح ریزوبیومی برای شبدر دارد. با برقراری یک رابطه موفق و کاراً بین شبدر-ریزوبیوم که شامل ایجاد گرهک و استقرار ریزوبیوم در درون این گرهک‌ها و برقراری تجانس بین شبدر و سویه ریزوبیوم که در برقراری یک همزیستی مفید و کارآمد موثرتر است می‌توان اثر آلودگی SO₂ را کاهش داد.

تشکر و قدردانی

از حوزه معاونت محترم پژوهشی و فناوری دانشگاه اراک که حمایت مالی این تحقیق (طرح پژوهشی ۹۱/۱۴۰۵ مورخ ۹۱/۲/۲۶) را به‌عهده داشتند صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

1. Rakwal R, Agrawal GK, Kubo A, Yonekura M, et al. Defense/stress responses elicited in rice seedlings exposed to the gaseous air pollutant sulfur dioxide. *Environ. Exp. Bot.* 2003; 49: 223-235.
2. Irshad AH, Fayaz Ahmad S, Sultan P. Effect of Sulphur dioxide on the biochemical parameters of Spinach (*Spinacea oleracia*). *Trakia J. Sci.* 2011; 9(1): 24-27.
3. Smith SJ, Aardenne JV, Klimont Z, Andres RJ, et al. Anthropogenic sulfur dioxide emissions: 1850–2005. *Atmos. Chem. Phys.* 2011; 11(3): 1101–1116.
4. Hill GR, Thomas MD. Influence of leaf destruction by sulfur dioxide and clipping on yield of alfalfa. *Plant physiol.* 1933; 8:334-345.
5. Solberg RA, Adams DF. Histological responses of some plant leaves to hydrogen fluoride and sulfur dioxide. *Am. J. Bot.* 1956; 43(10): 755-760.
6. Pyatt BF. Lichens as indicators of air pollution in a steel producing town in south wales. *Environ. Pollut.* 1970; 1: 45-55.
7. Sharma GK. Cuticular features as indicators of environmental pollution. *Water Air Soil poll.* 1977; 8(1): 15-19.
8. Lang C, Popko J, Wirtz M, Hell R. et al. Sulphite oxidase as key enzyme for protecting plants against sulphur dioxide. *Plant Cell Environ.* 2007; 30(4): 447–455.
9. Sahgl M, Johri BN. The changing face of rhizobial systematics. *Curr. Sci.* 2003; 84(1): 43-48.
10. Ahemad M, Khan MS. Functional aspects of plant growth promoting rhizobacteria: recent advancements. *Insight Microbiology.* 2011; 1(3): 39-54.

- growth behaviour of *Vicia faba* plants. *Plant Soil*. 1985; 86(1): 69-78.
24. Cocking EC, Davey MR, Kothari SL, Srivastava JS. et al. Altering the specificity control of the interaction between rhizobia and plant. *Symbiosis*. 1992; 14: 123-130.
25. Noori M. Characterization of the Iranian species of *Shophorea* and *Ammodendron* (Leguminosea: Sophorea). Phd thesis, University of London and Royal Botanic Gurden, Kew, UK. 2002.
26. Gostin IN. Air pollution effects on the leaf structure of some *Fabaceae* species. *Not. Bot. Horti. Agrobi.* 2009; 37(2): 57-63.
27. Kiernan JA. Histological and histochemical methods: theory and practice. 3th edn. Oxford. UK: Butterworth-Heinemann. 1999.
28. Lillie RD. Histopathologic technic and practical histochemistry. 3rd Ed. New York: the Blakiston Company. 1965.
29. Persello-Cartieaux F, Nussaume L, Robaglia C. Tales from the underground: molecular plant-rhizobacteria interactions. *Plant Cell Environ*. 2003; 26(2): 189-199.
30. Timmusk S. Mechanism of action of the plant growth promoting bacterium *Paenibacillus polymyxa*. Uppsala, Sweden: Acta Universities Upsaliensis. Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology 908. 2003; 40pp
31. Maekawa-Yoshikawa M, Muller J, Takeda N, Maekawa T, et al. The temperature-sensitive *brush* mutant of the legume *Lotus japonicus* reveals a link between root development and nodule infection by rhizobia. *Plant Physiol*. 2009; 149: 1785-1796.
32. Melotto M, Underwood W, Koczan J, Nomura K, et al. Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell*. 2006; 126(5): 969-980.
33. Romas LJ, Volin RB. Role of stomatal opening and frequency on infection of *Lycopersicon* spp. by *Xanthomonas campestris* spv. vesicatoria. *Aps. Symp. Ser.* 1987; 77(9): 1311-1317.
34. Omosun G, Markson AA, Mbanasor O. Growth and anatomy of *Amaranthus Hybridus* as affected by diferrent crude oil concentrations. *Am.Eurasian J. Scientific Res.* 2008; 3 (1): 70-74.
35. Wali B, Iqbal M, Mahmooduzzafar. Anatomical and functional responses of *Calendula officinalis* L. to SO₂ stress as observed at different stages of plant development. *Flora*. 2007; 202: 268-280.
36. Khan I, Ahmad A, Iqbal M. Sulphur in theenvironment. In Tandon P, Khatri S, Abrol Y. P, (eds). Biodiversity and its significance. New Delhi: IKBooks; 2006; 90-99.
37. Hijano CF, Dom'inguez MDP, Gim'enez RGS, 'anchez PH, et al. Higher plants as bioindicators of sulphur dioxide emissions in urban environments. *Environ. Monit. Assess.* 2005; 111: 75-88.
38. Singh SN, Yunus M, Srivastava K, KulshreshthaK, et al. Response of *Calendula officinalis* L. to long-term fumigation with SO₂. *Environ. Pollut.* 1985; 39: 17-25.
39. Wali B, Iqbal M, Mahmooduzzafar. Plant growth, stomatal response, pigments and photosynthesis of *Althea officinalis* as affected by SO₂ stress. *Indian J. Plant Physiol.* 2004; 9: 224-233.
40. Garg KK, Varshney CK. Effect of air pollution on the leaf epidermis at the submicroscopic level. *Cell. Mol. Life Sci.* 1980; 36(12): 1364-1366.
41. Duldulao MCG, Gomez RA. Effects of vehicular emission on morphological characteristics of young and mature leaves of sunflower (*Tithonia diversifolia*) and Napier grass (*Pennisetum purpureum*). *BSU grad. School Res. J.* 2008; 85: 142-151.
42. Tanvir-Ali S, Mahmooduzzafar, Abdin MZ, Iqbal M. Ontogenetic changes in foliar features and psoralen content of *Psoralea corylifolia* Linn.exposed to SO₂ stress. *J. Environ. Biol.* 2008; 29(5): 661-668.
43. Krishnaya NSR, Bedi SJ. Effect of sulphur dioxide and ascorbic acid on the plastid ultrastructure of *Azadirachta indica* leaves. *Ann. Bot-London.* 1980; 64(3): 311-313.
44. Hui-zhen Q, Zhu-jun W, Jia-xi W, Da-fu Q, et al. The effects of the harmful gases SO₂ and HF on plant leaf structure. *Acta Bot.Sin.* 1980; 22(3): 232-236.

Effects Inoculation With Two strain of *Rhizobium* on Anatomical Indexes of Persian Clover (*Trifolium resupinatum*) Under SO₂ Pollution

Askary M. Ph.D.^{1*}, Bayat, L. M.Sc.²

1. Biology Department, Faculty of Sciences, Arak University, Arak 38156-8-8349, Iran

2. M.Sc. in Plant Physiology, Biology Department, Faculty of Sciences, Arak University

* Email corresponding author: m-askary@araku.ac.ir

Received: 9 Dec. 2012

Accepted: 30 Apr. 2013

Abstract

Aim: The aim of this study was to evaluate the effects of rhizobial inoculation on the anatomical parameters of clover under SO₂ pollution.

Material and methods: 31 day-old plants (no-inoculated and inoculated with two strains of *Rhizobium*) exposed to the different concentrations of SO₂ (0 as a control, 0.5, 1, 1.5 and 2 ppm) for 5 consecutive days for 2 hours per day. The anatomical parameters of 40 day-old plants were Then investigated.

Results: Under high SO₂ concentrations (1, 1.5 and 2ppm), length of the palisade cells and diameter of the spongy cells decreased in both leaf surfaces. Stomatal density decreased in adaxial epidermis and increased in abaxial epidermis. Also, stomatal opening increased in adaxial epidermis and decreased in abaxial epidermis. Trichome density in both leaf surfaces significantly increased in 1.5 and 2ppm SO₂ compared with control plants. Under 2 ppm, trichome length increased significantly in both leaf surfaces. Inoculation of clover with two strains of *Rhizobium* significantly reduced the negative effects of high SO₂ concentration.

Conclusion: The results indicate the negative effects of high concentrations of SO₂ air pollution on the some anatomical parameters and the positive effects of bacterial inoculation on resistance to air SO₂ pollution stress.

Keywords: Anatomical parameters, Clover, *Rhizobium*, SO₂ pollution