نشریه تولید گیاهان زراعی
جلد دوازدهم، شماره سوم، پاییز ۹۸
۱۳۹-۱۵۶
http://ejcp.gau.ac.ir
DOI: 10.22069/ejcp.2019.16511.2229

کمی‌سازی اثر همزیستی با قارچ‌های *Piriformospora indica* و *Trichoderma longibrachiatum* بر برخی صفات رشدی و فیزیولوژیک کلزا تحت تنش سرب

مهرانوش امامیان طبرستانی[۱]، همت‌اله پیردشتی[۲*]، محمدعلی تاجیک قنبری[۳]، فردین صادق‌زاده[۴]

[۱] دانشجوی دکتری زراعت، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
[۲] دانشیار گروه زراعت، پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
[۳] دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
[۴] استادیار گروه علوم خاک، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۱/۲۵ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۷/۰۳

چکیده

سابقه و هدف: به‌طور متوسط خاک‌های کشاورزی در بسیاری از نقاط جهان با عناصر سنگین فلزی آلوده می‌گردد. در این میان، سرب با طیف گسترده‌ای از اثرات نامطلوب مانند کاهش رشد طولی و زیست‌توده ریشه، تسریع پیری برگ، جلوگیری از بیوسنتز کلروفیل و جوانه‌زنی بذر، دخالت در جذب مواد مغذی و اختلال در فتوسنتز خالص، تنفس و نفوذ پذیری غشای سلولی بر رشد و متابولیسم گیاهان تأثیر می‌گذارد. بنابراین استفاده از روشی سریع و ایمن برای حذف آلاینده‌ها با حداقل هزینه و تأثیر بر محیط زیست ضروری است. یکی از بهترین روش‌ها گیاه‌پالایی می‌باشد که در این بین گیاهان خانواده شب‌بو مانند کلزا (*Brassica napus* L.) به‌دلیل تولید زیست‌توده فراوان توانایی ویژه‌ای در پالایش خاک‌های آلوده دارند. از سوی دیگر زیست‌پالایی نیز از جمله روش‌هایی است که در سال‌های اخیر برای حذف آلاینده‌ها مورد توجه قرار گرفته است. استفاده از انواع ریزجانداران مانند جلبک‌ها، قارچ‌ها و باکتری‌ها جهت افزایش کارایی این روش اهمیت بسیاری دارد. بنابراین هدف از انجام این پژوهش ارزیابی تأثیر قارچ‌های پیریفورموسپورا (*Piriformospora indica*) و تریکودرما (*Trichoderma longibrachiatum*) بر صفات رشدی و فیزیولوژیک کلزا تحت تنش سرب بود.

مواد و روش‌ها: این پژوهش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی و در سه تکرار انجام شد. تیمارهای آزمایشی شامل چهار سطح عنصر سنگین سرب از منبع نیترات سرب (صفر، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰ میلی گرم در کیلوگرم خاک) و سه تیمار قارچی (شاهد، پیریفورموسپورا و تریکودرما) بود. پس از گذشت ۶۰ روز از کاشت کلزا (رقم هایولا ۴۰۱) و اتمام دوره رشد رویشی و قبل از گلدهی صفات رویشی و برخی صفات فیزیولوژیک اندازه‌گیری شدند. برای کمی‌سازی اثر تنش سرب از تجزیه رگرسیونی و معادله خطی و دو تکه‌ای استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد با افزایش سطح سرب از صفر به ۱۵۰۰ میلی‌گرم تعداد گره و برگ، قطر ساقه، وزن تر برگ و وزن خشک ساقه (بین ۲۰ تا ۵۸ درصد) به‌صورت خطی و دو تکه‌ای کاهش یافتند. همچنین تلقیح قارچ‌های پیریفورموسپورا و تریکودرما موجب افزایش قطر و وزن خشک ساقه شدند. همچنین مشاهده شد قارچ‌های مذکور در سطوح مختلف سرب بر صفات رویشی اثر مثبتی داشتند به‌طوری‌که کاهش ارتفاع بوته، سطح برگ، وزن تر ساقه و اندام هوایی و وزن خشک برگ و اندام هوایی در سطح ۱۵۰۰ میلی‌گرم سرب نسبت به سطح صفر از ۲۷، ۷۴، ۶۸، ۶۵، ۶۹ و ۷۰ درصد در شاهد به ۱۲، ۴۴، ۳۵،

* مسئول مکاتبه: h.pirdashti@sanru.ac.ir

۳۶، ۵۲ و ۵۲ درصد در همزیستی با پیریفورموسپورا و ۳۱، ٤۸، ۵۸، ۵۳، ۵۲ و ۵۳ درصد پس از بکارگیری تریکودرما رسید. همچنین میزان نشت الکترولیت تا سطح ۵۰۰ میلی‌گرم با شیب ۰/۰۰۰۰۸٤ و سپس با شیب ۰/۰۰۱۸ روند افزایشی را نشان داد. در مقایسه تلقیح گیاه با پیریفورموسپورا و تریکودرما نشت الکترولیت را تنها حدود دو درصد کاهش داد. به‌علاوه اثر متقابل سرب و قارچ بر سبزینگی برگ، کلروفیل $a+b$، محتوای نسبی آب برگ و پرولین معنی‌دار بود و کاهش سبزینگی برگ و کلروفیل $a+b$ در سطح ۱۵۰۰ میلی‌گرم نسبت به شاهد به‌ترتیب از حدود ۱۸ و ۳۵ درصد در عدم تلقیح به حدود ۷ و ۲۷ درصد در پیریفورموسپورا و ۱۳ و ۵ درصد در تریکودرما کاهش یافت. بر اساس نتایج همبستگی بین صفات مورفولوژیک و فیزیولوژیک، بیشترین همبستگی مربوط به سطح برگ و محتوای نسبی آب برگ به‌میزان ۰/۸۰ بود.

نتیجه‌گیری: در مجموع، نتایج بیانگر حساسیت بیشتر صفات رویشی نسبت به سمیت سرب بود. در میان این صفات نیز بیشترین حساسیت در وزن خشک ساقه و اندام هوایی مشاهده شد. تلقیح کلزا با قارچ‌های پیریفورموسپورا و تریکودرما در برخی صفات موجب کاهش این حساسیت گردید. با توجه به این نتایج به نظر می‌رسد این قارچ‌ها می‌توانند تا حدودی اثر سمیت سرب را در گیاه کاهش دهند و موجب افزایش تحمل آن به تنش سرب شوند.

واژه‌های کلیدی: پرولین، تریکودرما، سرب، شبه‌میکوریز، کلزا

مقدمه

به‌طور متوسط خاک‌های کشاورزی در بسیاری از نقاط جهان با فلزات سنگینی مانند کادمیم، مس، روی، نیکل، کبالت، کروم، آرسنیک و سرب آلوده می‌گردد. این آلودگی می‌تواند به‌دلیل استفاده طولانی از کودهای فسفاته، کاربرد فاضلاب، دود ناشی از کارخانه‌ها، ضایعات صنعتی و روش‌های نامطلوب آبیاری در زمین‌های کشاورزی باشد (٦۵). در نهایت آلودگی به آن‌ها موجب افزایش مشکلات بوم‌شناختی، تکاملی، تغذیه‌ای و محیطی می‌گردد (٤٤). این عناصر با تأثیر بر رشد گیاهان نیز می‌توانند منجر به کاهش کمی و کیفی محصولات کشاورزی و در حالت‌های شدید نابودی تنوع گیاهی در مناطق آلوده گردند (۳۷). در این میان، سرب نیز با طیف گسترده‌ای از اثرات نامطلوب مانند کاهش رشد طولی و زیست‌توده ریشه، تسریع پیری برگ، جلوگیری از بیوسنتز کلروفیل و جوانه‌زنی بذر، دخالت در جذب مواد مغذی و اختلال در فتوسنتز خالص، تنفس و نفوذ پذیری غشای سلولی بر رشد و متابولیسم گیاهان تأثیر می‌گذارد (۵۷). در مطالعاتی در همین رابطه اثرات سمیت آن در گیاهانی مانند ذرت (٤۱) و کنگر فرنگی (۳٤) مشاهده و گزارش گردید. بنابراین با توجه به اثرات نامطلوب این آلاینده‌ها، استفاده از یک روش سریع و ایمن برای حذف آن‌ها با حداقل هزینه و تأثیر بر محیط زیست ضروری است (۳۸).

در این میان، یکی از بهترین روش‌ها گیاه‌پالایی می‌باشد که در آن سازگاری مقاومتی برخی از گیاهان امکان ذخیره غلظت‌های بالایی از فلزات سنگین را در بافت‌های خود بدون بروز علایم مسمومیت داشته که موجب حذف آن‌ها و احیا دوباره محیط‌زیست می‌شوند (٦۰). برخی از این گیاهان شامل گیاهان خانواده شب‌بو، آفتابگردان و جو می‌باشد (۱۱). در این بین گیاهان خانواده شب‌بو به‌دلیل تولید زیست‌توده فراوان توانایی ویژه‌ای در پالایش خاک‌های آلوده دارند. یکی از گیاهان این خانواده کلزا (*Brassica napus* L.) می‌باشد که گیاه علفی یک ساله و روغنی است و تولید آن از سال ۱۹۷۵ تا ۲۰۱٤ شش برابر افزایش یافته و ماده خشک آن بین سه تا هفت تن در هکتار می‌باشد. این گیاه بیش‌اندوز و

استخراج کننده فلزات سنگین می‌باشد (۱۵). در همین رابطه در پژوهشی با بررسی گیاه‌پالایی چندین انباشتگر در خاک معدنی منطقه ایرانکوه مشاهده شد منداب و کلزا به‌دلیل رشد رویشی مناسب، زیست‌توده بالا و تجمع بالای روی، سرب و کادمیم از جمله گونه‌های مناسب جهت گیاه‌پالایی محسوب می‌شوند (۱۸).

از سوی دیگر زیست‌پالایی نیز از جمله روش‌هایی است که در سال‌های اخیر برای حذف آلاینده‌ها مورد توجه قرار گرفته است. استفاده از انواع ریزجاندارن از جمله جلبک‌ها، قارچ‌ها و باکتری‌ها در این زمینه اهمیت بسیاری دارد (٦٧). در این میان مشاهده شده است که برخی از قارچ‌ها نیز می‌توانند ضمن کاهش سمیت فلزی و رشد بهتر گیاهان، کارایی گیاه‌پالایی گیاه میزبان را افزایش دهند (٤٠). در این بین ورما و همکاران (۱۹۹۸) گونه جدیدی از قارچ‌های اندوفیت ریشه را با نام *Piriformospora indica* معرفی کردند که از بازیدیومیست‌ها بوده و ویژگی شبیه قارچ‌های میکوریز دارند (٦٢). این قارچ‌ها شبه‌میکوریز بوده و می‌توانند به‌عنوان عامل کنترل زیستی قوی در برابر عوامل بیماری‌زایی ریشه عمل کنند و با طیف گسترده‌ای از تحمل به تنش‌های زنده و غیرزنده مانند شوری، دمای پایین و سمیت فلزات سنگین، بهبود رشد و عملکرد زیست‌توده را برای میزبان خود فراهم کنند (۸، ۲۱، ٤٣). در همین رابطه تحقیقات انجام شده بیانگر افزایش تحمل به فلزات سنگینی مانند کادمیم و سرب در گیاهانی مانند توتون (۲۷)، گندم (۵۵)، و گوجه‌فرنگی (۵۲) پس از بکارگیری این قارچ بود.

برخی از گونه‌های تریکودرما به‌طور معمول در همه خاک‌ها حضور دارند و توانایی تجزیه زیستی آلاینده‌ها و پاکسازی محیط آلوده را دارد. این قارچ‌های همزیست فرصت‌طلب و غیربیماری‌زای گیاهی در انواع خاک‌ها یافت می‌شوند. بعضی از گونه‌های این قارچ با سطوح ریشه کلونی‌های قوی و پایداری برقرار کرده و به درون اپیدرم و سلول‌های زیر سطح آن نفوذ می‌کنند (۲۵، ٦٣، ٦٤). پژوهش‌های مختلف نشان داده است که برخی از گونه‌های تریکودرما قادرند به‌طور مستقیم با ریشه گیاهان همزیست شده و به‌عنوان افزایش‌دهنده رشد گیاه، سبب بهبود رشد (۵٦) و کنترل زیستی تنش‌های زنده از قبیل قارچ‌های بیماری‌زا (۲۹) و تنش‌های غیرزنده از جمله شوری (۲٦)، خشکی (۷) و فلزات سنگین (٤) شوند. بنابراین هدف از انجام این پژوهش ارزیابی چگونگی تأثیر دو قارچ *Piriformospora indica* و *Trichoderma longibrachiatum* بر برخی صفات رشدی و فیزیولوژیک کلزا تحت تنش سرب بود.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در تابستان و پاییز سال ۱۳۹٦ به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی و در سه تکرار انجام شد. تیمارهای آزمایشی شامل چهار سطح عنصر سنگین سرب از منبع نیترات سرب (صفر، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک) و سه تیمار قارچی (شاهد، پیریفورموسپورا (*Piriformospora indica*) و تریکودرما (*Trichoderma longibrachiatum*)) بود. قارچ‌های مورد مطالعه از پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان تهیه شدند. برای این منظور، قارچ ها در محیط کشت PDB[1] و محیط کشت مایع کفر (۳۰) کشت و سپس به مدت دو هفته در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه روی شیکر قرار گرفتند. پس از گذشت مدت زمان مذکور که رشد رویشی قارچ ها به حداکثر خود رسید، سوسپانسیونی با غلظت حدود ۱×۱۰^{۸} واحد

۱. عصاره سیب‌زمینی و دکستروز

کلونی در میلی لیتر (CFU/ml) تهیه و جهت تلقیح استفاده شدند. سپس خاک مورد نظر (جدول ۱) به مدت یک ساعت در اتوکلاو استریل و سپس با مقادیر مورد نظر عنصر سرب مخلوط گردید. پس از گذشت چهار هفته از مخلوط کردن خاک با عنصر، ابتدا بذور کلزا رقم هایولا ٤٠١ (تهیه شده از شرکت توسعه و کشت دانه‌های روغنی) ضدعفونی، سپس به‌مدت ٢٤ ساعت جوانه‌دار و پس از آن بذور جوانه‌دار با سوسپانسیون قارچی به مدت یک ساعت تلقیح و در گلدان‌های پلاستیکی به ارتفاع ١٠ سانتی‌متر و قطر ١٢ سانتی متر کشت شدند. پس از گذشت ٦٠ روز از کاشت و اتمام دوره رشد رویشی و قبل از گلدهی نمونه‌ای از هر گلدان انتخاب و صفات تعداد برگ، گره، ارتفاع بوته، قطر ساقه، سطح برگ، وزن تر و خشک برگ، ساقه و بوته و برخی صفات فیزیولوژیک مانند کلروفیل $a+b$، سبزینگی برگ، محتوای آب نسبی برگ، میزان نشت الکترولیت و مقدار پرولین اندازه‌گیری شدند.

جدول ١- برخی مشخصات فیزیکی و شیمیایی خاک مورد آزمایش (عمق ٣٠ -٠ سانتی‌متری)

Table 1- Some physical and chemical characteristics of the studied soil (0- 30cm depth)

بافت Texture	رس Clay	سیلت Silt	شن Sand	نیتروژن کل N	فسفر قابل جذب P	پتاسیم قابل جذب K	اسیدیته pH	هدایت الکتریکی (دسی‌زیمنس بر متر) EC($dS.m^{-1}$)
	درصد (%)				(قسمت در میلیون) (ppm)			
لومی- رسی Clay-loam	35	38	27	0.25	14.1	270	7.56	1.46

برای اندازه‌گیری صفات رویشی ابتدا یک بوته از هر گلدان انتخاب و تعداد برگ و گره آن شمارش و سپس صفاتی مانند ارتفاع بوته، قطر ساقه و سطح برگ به‌ترتیب با خط‌کش مدرج، کولیس دیجیتالی و نرم‌افزار Digimizer نسخه ٤ اندازه‌گیری گردید. سپس وزن تر برگ، ساقه و بوته اندازه‌گیری و پس از آن برای اندازه‌گیری وزن خشک برگ، ساقه و بوته نمونه‌های گیاهی به‌مدت ٤٨ ساعت در آون با دمای ٧٠ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند.

برای اندازه‌گیری کلروفیل و سبزینگی برگ نمونه‌هایی از آخرین برگ گسترش‌یافته گیاه انتخاب گردید. سپس سنجش کلروفیل با استفاده از روش پورا (٢٠٠٢) در طول موج ($A_{652.4}$) ٦٥٢/٤ و ($A_{665.2}$) ٦٦٥/٢ خوانده و میزان کلروفیل کل (Chl_{a+b}) از مجموع کلروفیل $a + b$ و بر حسب میکروگرم در میلی‌لیتر گزارش گردید (٤٥). سبزینگی برگ نیز در با استفاده از دستگاه SPAD (SPAD-502 Minolta, Japan) اندازه‌گیری شد.

محتوای آب نسبی برگ نیز (RWC) از آخرین برگ توسعه یافته گیاه نمونه تهیه و بلافاصله وزن تر آن‌ها اندازه‌گیری شد (FW). سپس نمونه‌های برگی به لوله آزمایش حاوی آب مقطر منتقل و به مدت ٢٤ ساعت نگه‌داری و سپس نمونه‌ها وزن شد (TW). پس از آن نمونه‌ها در آون ٧٠ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ٢٤ ساعت قرار گرفت و سپس توزین انجام گردید (DW). محتوای رطوبت نسبی برگ‌ها با استفاده از رابطه ١ محاسبه شد (٤٨).

رابطه ١: $$RWC(\%) = \frac{Fw-Dw}{Tw-Dw} \times 100$$

به‌منظور اندازه‌گیری نشت الکترولیت، نمونه‌ی برگی در لوله‌های آزمایش حاوی یک میلی‌لیتر آب مقطر قرار گرفت. پس از گذشت ٢٤ ساعت، هدایت

الکتریکی هر نمونه با استفاده از دستگاه EC متر (CON 410) اندازه‌گیری شد (EC_1). به منظور اندازه‌گیری میزان کل نشت الکترولیت‌ها در اثر مرگ سلول، لوله‌های آزمایش به مدت ۲۰ دقیقه در دستگاه بن ماری با دمای ۹۰ درجه قرار گرفته و مجدداً هدایت الکتریکی نمونه‌ها ثبت گردید (EC_2). سپس درصد نشت الکترولیت‌ها با استفاده از رابطه ۲ محاسبه گردید (٤٢).

رابطه ۲: $$\text{درصد نشت الکترولیت} = EC_1 / EC_2 \times 100$$

اندازه‌گیری میزان پرولین با استفاده از روش بیتس و همکاران (۱۹۷۳) به‌دست آمد. بر این اساس، نیم گرم ماده تر گیاهی با هاون خرد و درون یک تیوب ریخته و سپس ده میلی لیتر سولفوسالیسیلیک اسید سه درصد آماده شده به آن اضافه و تیوب در ۱۵۰۰۰ دور به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ گردید. مقدار دو میلی‌لیتر از عصاره‌ی صاف شده درون تیوب جدید ریخته و دو میلی‌لیتر اسید نین‌هیدرین و دو میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال به آن افزوده و سپس نمونه‌ها در حمام آب گرم به مدت یک ساعت حرارت داده و پس از آن درون حمام یخ قرار داده شد. مقدار چهار میلی‌لیتر تولوئن به محلول اضافه و سپس با دستگاه ورتکس به هم زده شد. سپس محلول‌ها در طول موج ۵۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (۱۰).

آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۲ انجام و میانگین‌ها با استفاده از آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) در سطح احتمال پنج درصد مورد مقایسه قرار گرفتند. همچنین برای کمی‌سازی اثر تنش سرب از تجزیه رگرسیونی و برازش معادله خطی (رابطه ۳) و دو تکه‌ای (رابطه ٤) (۹) و برای رسم منحنی‌ها از نرم افزار Excel استفاده شد.

رابطه ۳: $$y = b_1 x + a$$

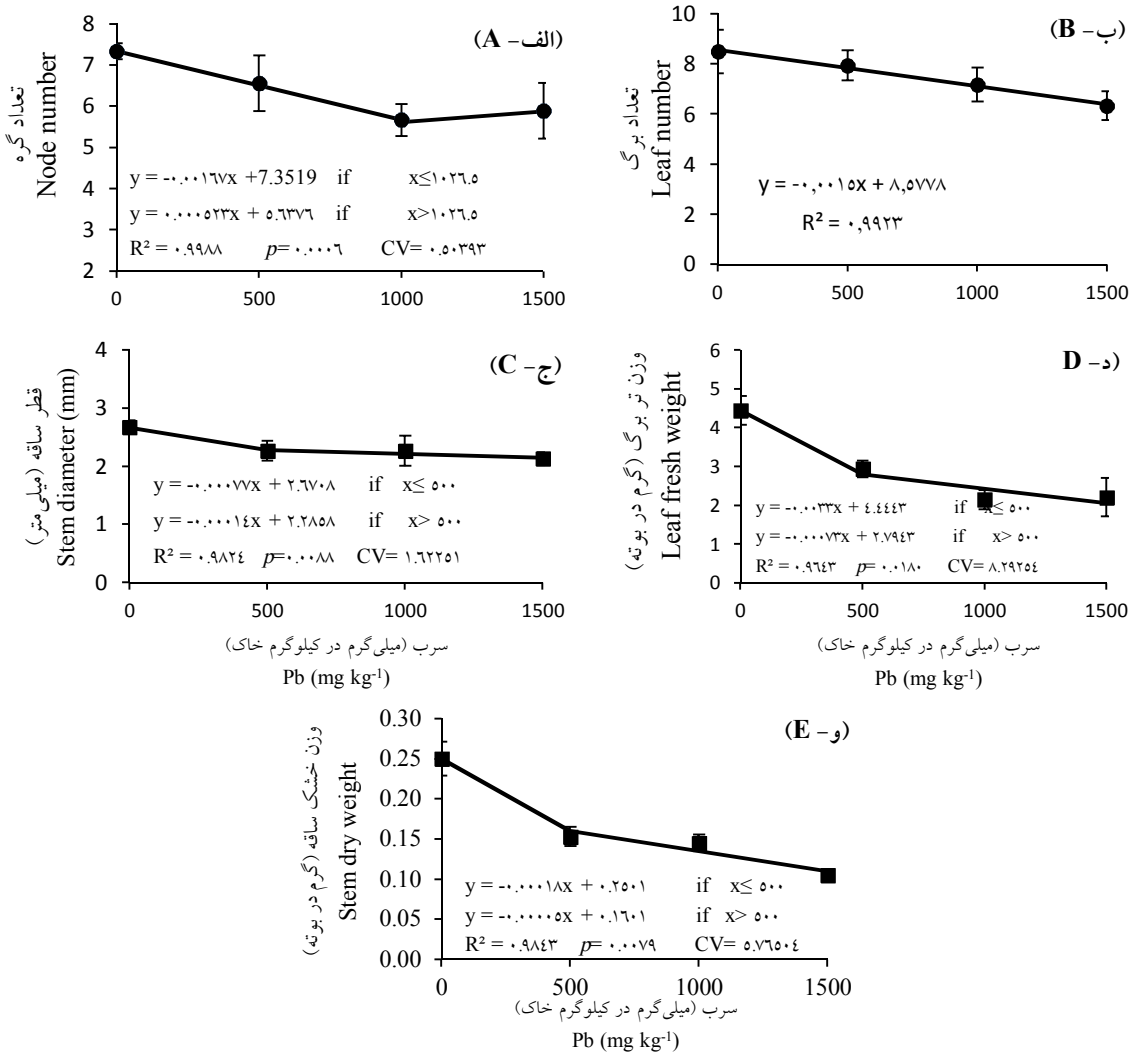
رابطه ٤: $$y = b_1 x + a \quad \text{if} \quad x \le x_0$$
$$y = (b_1 x_0 + a) + b_2 (x - x_0) \quad \text{if} \quad x > x_0$$

در این روابط a: عرض از مبدأ در سطح بدون تنش (غلظت صفر سرب). b_1 و b_2: شیب تغییرات مؤلفه به‌ترتیب در مرحله ۱ و ۲. x_0: نقطه چرخش بین دو مرحله.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه رگرسیونی اثر سطوح مختلف سرب بر صفات مورفولوژیک کلزا (شکل ۱- الف- و) نشان داد که روند تغییرات تعداد برگ به‌صورت خطی و تعداد گره، قطر ساقه، وزن تر برگ و وزن خشک ساقه به‌صورت دو تکه‌ای کاهش یافتند. شیب این کاهش برای تعداد برگ ۰/۰۰۱۵ و به‌صورت خطی (شکل ۱- ب) اما برای قطر ساقه، وزن تر برگ و وزن خشک ساقه ابتدا تا سطح ۵۰۰ میلی‌گرم سرب در کیلوگرم خاک به‌ترتیب ۰/۰۰۰۷۷، ۰/۰۰۳۳ و ۰/۰۰۰۱۸ و سپس ۰/۰۰۰۱٤، ۰/۰۰۰۷۳ و ۰/۰۰۰۰۵ و به‌صورت دو تکه‌ای بود (شکل ۱- ج- و). در صورتی‌که تعداد گره تا حدود سطح ۱۰۲٦ میلی‌گرم سرب در کیلوگرم خاک ابتدا با شیب حدود ۰/۰۰۱٦۷ کاهش اما پس از آن با شیب کمی (۰/۰۰۰۵۲۳) روند افزایشی را نشان داد (شکل۱- الف). اما به‌طور کلی تعداد گره و برگ، قطر ساقه، وزن تر برگ و وزن خشک ساقه در سطح ۱۵۰۰ میلی‌گرم سرب در کیلوگرم خاک نسبت به شاهد به‌ترتیب حدود ۲۰، ۲۵، ۲۰، ۵۰، ۵۸ درصد کاهش داشتند (شکل ۱- الف- و). در همین رابطه تبریزی و همکاران (۲۰۱۵) مشاهده کردند افزایش غلظت سرب و کادمیم موجب

کاهش تعداد برگ، قطر ساقه، وزن تر و خشک انـدام هـوایی و وزن خشـک در گیـاه رزمـاری شـد (۵۹). همچنین در مطالعات دیگری نیـز بـا افـزایش فلـزات سنگینی مانند مس و سرب در ماش (۳۶) و کـروم در ریحان (۶۱) نیز صفات رشدی کاهش یافت. در همین زمینه بیان شده است زمانی‌که یون‌های فلزات سـنگین در مقادیر زیاد در محیط وجود داشته باشند بـه‌وسـیله ریشه گیاهان جـذب و پـس از انتقـال بـه انـدام‌هـای هوایی موجب اختلال در سوخت و ساز گیاه می‌شوند (۳۹).

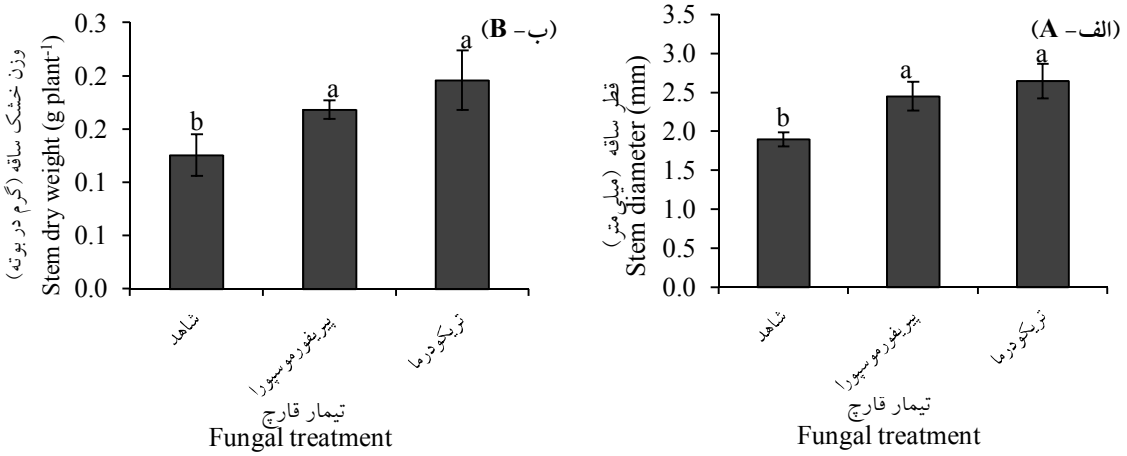


شکل ۱- روند تغییر تعداد گره (الف)، تعداد برگ (ب)، قطر ساقه (ج)، وزن تر برگ (د) و وزن خشک ساقه (ه) کلزا در پاسخ به مقادیر مختلف سرب

Figure 1- The change trend of node number (A), leaf number (B), stem diameter (C), leaf fresh weight (D) and stem dry weight (E) of canola in response to different levels of lead

انباشـته شـدن فلـزات سـنگین بـا آسـیب بـه ساختارهایی نظیـر کلروپلاسـت، میتوکنـدری، هسـته، دیواره سلولی و غشای سلولی باعث از دسـت رفـتن عملکـرد انـدام‌هـا و در نتیجـه اخـتلال در عملکـرد فیزیولوژیکی طبیعـی شـامل فتوسـنتز، تـنفس، سـنتز پروتئین، تقسیم سلولی رشد گیاه مـی‌شـود (۴۹). امـا

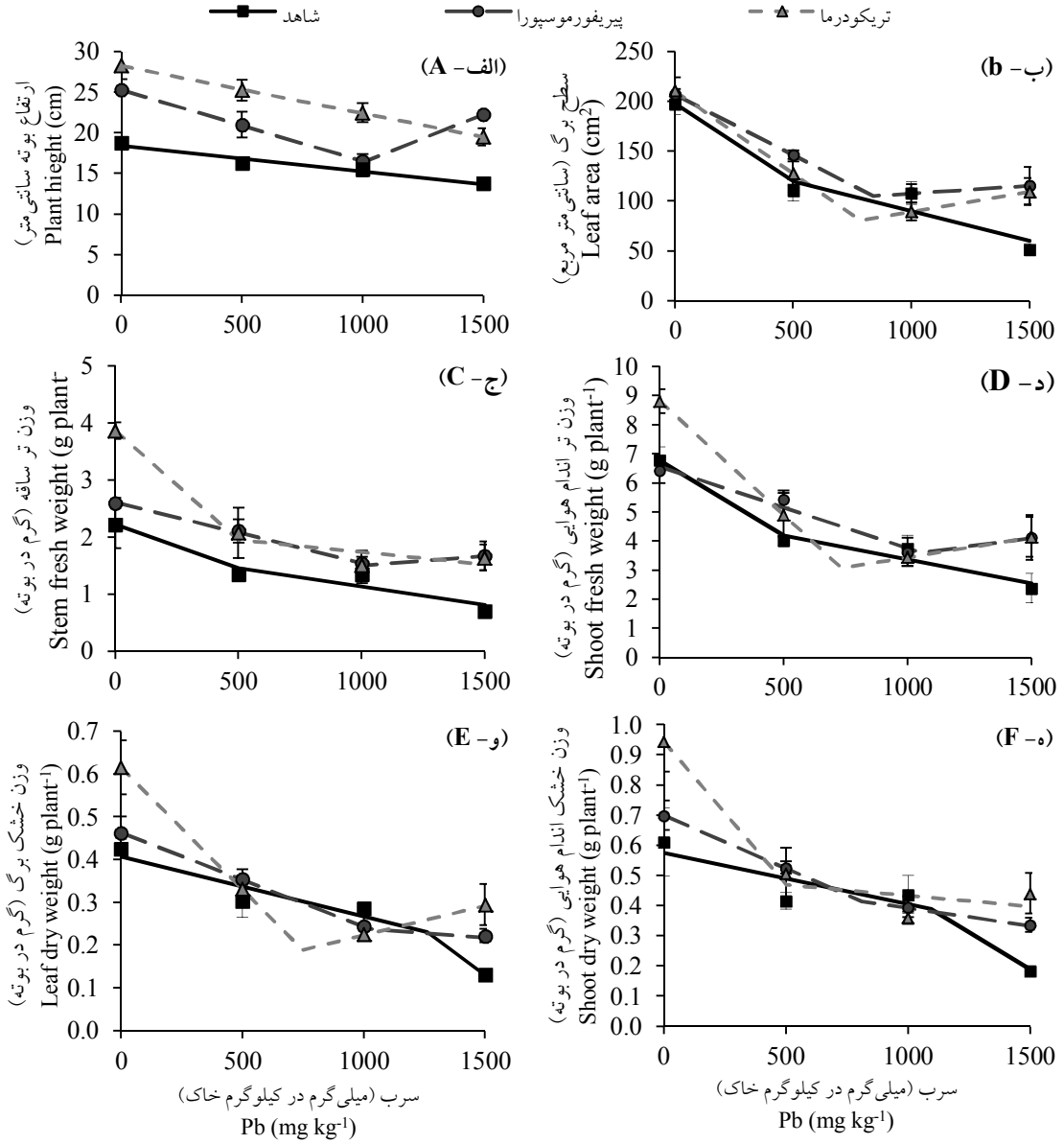
میزان این کاهش و اختلال در عملکرد قسمت‌های مختلف گیاه متفاوت بود. دلیل اصلی چنین پاسخی تفاوت در میزان انتقال سرب به بخش های مختلف گیاه است. این میزان از ریشه تا برگ کاهش می‌یابد و بنابراین قسمت های مختلف گیاه درک متفاوتی از میزان سرب و در کل عناصر سنگین در گیاه دارند (۷۱). علاوه بر این فعالیت سیستم دفاعی و آنزیم های آنتی اکسیدانی در بخش های مختلف گیاه نیز متفاوت است (۱٤، ۲۳). بنابراین بخش‌های مختلف گیاه پاسخ متفاوتی به افزایش سرب نشان دادند. تلقیح قارچ‌های پیریفورموسپورا و تریکودرما موجب افزایش حدود ۲۹ و ۳۹ درصدی قطر و حدود ۳٤ و ٥٦ درصدی وزن خشک ساقه شدند که این افزایش در تلقیح با قارچ تریکودرما بیشتر بود (شکل ۲- الف و ب). پیش‌تر نیز بهبود قطر و وزن خشک ساقه در گیاه دارویی ریحان (۱٦) و وزن خشک ساقه در گیاه فلفل سیاه (۳) و گندم (٥۳) با بکارگیری دو قارچ پیریفورموسپورا و تریکودرما گزارش شده بود. در همین رابطه کاپور وهمکاران (۲۰۰٤) بیان داشتند که همزیستی میکوریزایی به‌وسیله قارچ گلوموس از طریق بهبود گسترش هیف‌های قارچ در منافذ خاک، سبب افزایش وزن خشک گیاه رازیانه گردید (۳۲). همچنین پژوهشگران افزایش هورمون‌های رشد مانند ایندول استیک اسید را دلیل افزایش رشد در ریشه و ساقه بوته‌های گوجه‌فرنگی تلقیح شده با قارچ تریکودرما بیان کردند (۲۲). در پژوهشی مشابه کاربرد پیریفورموسپورا با افزایش میزان رشد از طریق مسیرهای بیوشیمیایی درگیر در تولید هورمون‌های رشد و یا بهبود جذب عناصر غذایی، توانست سبب افزایش توان سازگاری و رقابتی بالای گیاه میزبان شود (۷۰). همچنین مشاهده شد این قارچ در مواجهه با فلزات سنگین سرب و کادمیم به‌ترتیب موجب افزایش وزن خشک اندام هوایی و ریشه در گیاه جو (۳۳) و قطر ساقه و وزن خشک اندام هوایی در گیاه گندم (٥٤) گردید. در همین زمینه بیان شد فلزات سنگین مانند کادمیم، سرب، نیکل از طریق جایگزینی با فلز منیزیم مرکزی موجود در ساختار کلروفیل مانع دریافت نور شده و از این طریق به فتوسنتز آسیب می‌رسانند. در مقایسه، قارچ‌های میکوریز با فراهم کردن منیزیم بیشتر می‌توانند سبب افزایش غلظت کلروفیل و در نتیجه فتوسنتز بهتر و تولید زیست‌توده بیشتری شود (۳۱).



شکل ۲- اثر ساده قارچ‌های پیریفورموسپورا (*P. indica*) و تریکودرما (*T. longibrachiatum*) بر قطر ساقه (الف) و وزن خشک ساقه (ب) کلزا

Figure 2- Simple effect of *Piriformospora* (*P. indica*) and *Trichoderma* (*T. longibrachiatum*) on stem diameter (A) and stem dry weight (B) of canola

بر اساس یافته‌ها، قارچ‌های پیریفورموسپورا و تریکودرما در سطوح مختلف سرب (صفر، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم) بر صفات رویشی اثر مثبتی نشان دادند (شکل ۳). به‌طوری‌که در تلقیح کلزا با قارچ پیریفورموپسپورا ارتفاع بوته، سطح برگ، وزن تر ساقه و اندام هوایی به‌ترتیب تا حدود سطح ۱۰۰۶، ۸٤۰، ۱۰۳۳ و ۱۰۵٤ میلی‌گرم سرب در کیلوگرم خاک ابتدا با شیب ۰/۰۰۸۷، ۰/۱۲۱۲، ۰/۰۰۱۱ و ۰/۰۰۲۸ کاهش اما سپس با شیب ۰/۰۱۱۷، ۰/۰۱۵٤، ۰/۰۰۰۳ و ۰/۰۰۱۱ افزایش یافتند (شکل ۳- الف- د). در تلقیح با قارچ تریکودرما نیز سطح برگ، وزن تر اندام هوایی و وزن خشک برگ به‌ترتیب تا حدود سطح ۷۸٦، ۷۳٤ و ۷٤۷ میلی‌گرم سرب در کیلوگرم خاک کاهش اما پس از آن روند افزایشی داشتند (شکل ۳- ب، د و و). در مقایسه، در تیمار عدم تلقیح تمام صفات مذکور تا سطح ۱۵۰۰ میلی‌گرم سرب در کیلوگرم خاک به‌صورت خطی و دو تکه‌ای کاهش یافتند. به‌طور کلی کاهش ارتفاع بوته، سطح برگ، وزن تر ساقه و اندام هوایی و وزن خشک برگ و اندام هوایی در سطح ۱۵۰۰ میلی‌گرم سرب در کیلوگرم خاک نسبت به سطح صفر از ۲۷، ۷٤، ٦۸، ٦۵، ٦۹ و ۷۰ درصد در شاهد به ۱۲، ٤٤، ۳۵، ۳٦، ۵۲ و ۵۲ درصد در همزیستی با پیریفورموسپورا و ۳۱، ٤۸، ۵۸، ۵۳، ۵۲ و ۵۳ درصد پس از بکارگیری تریکودرما رسید (شکل ۳- الف- ه). این نتایج نشان‌دهنده کاهش اثر منفی تنش عنصر سرب با تیمارهای قارچی بود. در پژوهش‌های دیگر اثر قارچ‌های پیریفورموسپورا و تریکودرما در تحمل به عناصر سنگین مس و کادمیم در گیاهان دارویی ریحان (۱٦) و بادرنجبویه و خرفه (٦٦) مورد بررسی قرار گرفت و مشاهده شد تلقیح این قارچ‌ها با این گیاهان موجب بهبود صفات رویشی و تحمل آن‌ها نسبت به عنصر مس و کادمیم شدند. به‌طوری‌که رشد این گیاهان با افزایش سطوح عنصر سنگین مس و کادمیم کاهش یافت اما این کاهش در گیاهان تلقیح شده در تمام سطوح کمتر از عدم تلقیح بود. نتایج مشابهی در بررسی همزیستی قارچ پیریفورموسپورا در تحمل به عنصر سرب و کادمیم در گیاه جو (۳۳) و استویا (۵۰) مشاهده گردید. از طرفی مشاهده شد تلقیح گیاه خردل با گونه *Trichoderma atroviride* در خاک آلوده به کادمیم و نیکل تأثیری در بهبود رشد گیاه در خاک غیر آلوده نداشت اما باعث افزایش رشد گیاه در خاک آلوده شد (۱۳). به نظر می‌رسد که قارچ‌های شبه‌میکوریزا مانند پیریفورموسپورا در فراهمی و متابولیسم عناصر غذایی مورد نیاز گیاه کارایی ویژه داشته و موجب افزایش میزان این عناصر در گیاهان تلقیح شده می‌گردد که این ویژگی برای گیاهان در شرایط تنش از اهمیت به‌سزایی برخوردار می‌باشد (۱). به‌علاوه بیان شده است قارچ تریکودما نیز با افزایش قابلیت دسترسی عناصر، افزایش سطح تماس ریشه با خاک و ظرفیت جذب مواد غذایی توسط گیاه سبب بهبود ویژگی‌های رشدی گیاه در مواجه با تنش فلزات سنگین می‌شود (۲). همچنین در بررسی این صفات مشاهده شد که بیشترین حساسیت به افزایش سرب مربوط به وزن خشک اندام‌های گیاه بود. چون تولید ماده خشک و رشد و نمو گیاه حاصل اجرای فرآیند فتوسنتز و تثبیت دی‌اکسید کربن است و اجرای این فرآیند زمینه لازم را برای تولید سایر بیومولکول‌های مورد نیاز سلول نظیر پروتئین‌ها، لیپیدها و ویتامین‌ها فراهم می‌کند (۵۱). از آن‌جایی که سرب از راه‌های مختلف بر فتوسنتز گیاهان تأثیر می‌گذارد از جمله آن می‌توان به کاهش بیوسنتز کلروفیل از طریق کاهش غلظت عناصر ضروری منیزیم و آهن در برگ‌ها، ایجاد کمپلکس با پروتئین‌های فتوسنتزی و افزایش فعالیت کلروفیلاز جهت تجزیه کلروفیل اشاره کرد (۳٤) که این فرآیند در نهایت موجب بیشتر شدن حساسیت وزن خشک گیاه به عنصر سنگین سرب می‌شود.

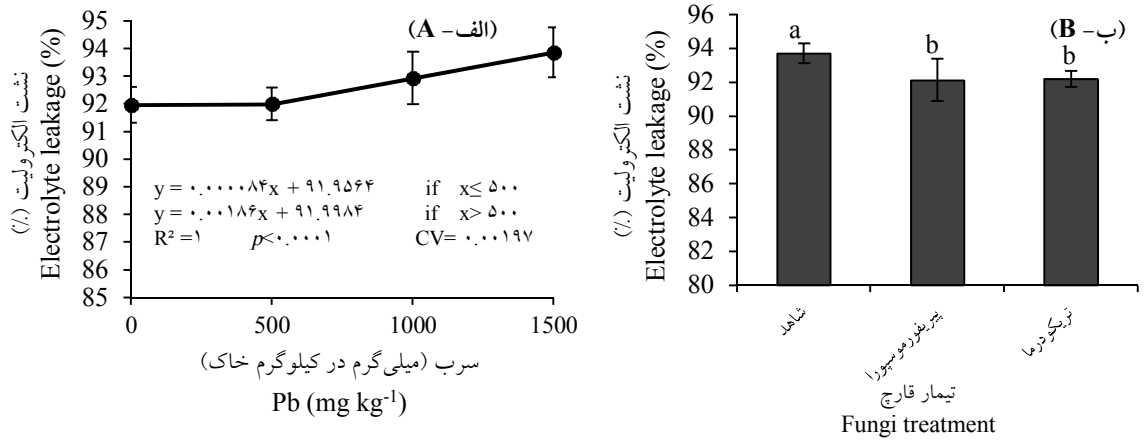


شکل۳- اثر متقابل سرب و قارچ‌های پیریفورموسپورا (*P. indica*) و تریکودرما (*T. longibrachiatum*) بر ارتفاع بوته (الف)، سطح برگ (ب)، وزن تر ساقه (ج)، وزن تر اندام هوایی (د)، وزن خشک برگ (و) و وزن خشک اندام هوایی (ه)

Figure 3- The interaction of lead and *Piriformospora (P. indica) and Trichoderma (T. longibrachiatum)* fungi on plant height (A), leaf area (B), stem fresh weight (C), shoot fresh weight (D), leaf dry weight (E) and shoot dry weight (F)

بر اساس یافته‌ها میزان نشت الکترولیت با افزایش سطح سرب روند افزایشی را نشان داد و تا سطح ۵۰۰ میلی‌گرم سرب در کیلوگرم خاک با شیب ۰/۰۰۰۰۸٤ و سپس با افزایش شیب به ۰/۰۰۱۸ به روند افزایشی خود ادامه داد (شکل ٤- الف). در همین رابطه مشاهده شد افزودن دو عنصر کادمیم و سرب در گیاه لوبیا (۱۲) و نخود (۱۷) میزان نشت الکترولیت را نسبت به شاهد افزایش دادند. به‌نظر می‌رسد تنش‌های محیطی از طریق ایجاد رادیکال‌های آزاد اکسیژن در داخل سلول، موجب کاهش پایداری غشاء و افزایش نشت مواد سیتوپلاسمی از آن شده و در نتیجه افزایش نشت الکترولیت را در پی دارد (٦). در پژوهش

حاضر، تلقیح گیاه کلزا با قارچ‌های پیریفورموسپورا و تریکودرما نشت الکترولیت را حدود دو درصد کاهش داد (شکل ٤- ب). علاوه بر این، صفات سطح برگ ($r= -۰/٦۰^{*}$)، ارتفاع بوته ($r= -۰/۷۵^{**}$)، قطر ساقه ($r= -۰/۷۰^{*}$) و وزن تر ساقه ($r= -۰/۵۹^{*}$) همبستگی منفی و معنی‌داری با آن داشتند (داده‌ها نشان داده نشد). در پژوهش‌های مشابه روی استویا و خرفه نیز مشاهده شد قارچ *Pi* موجب کاهش میزان نشت الکترولیت در اثر سمیت مس و کادمیم شده است (٤٧، ٦٦). دلیل این کاهش می‌تواند با نقش حفاظتی قارچ‌های همزیست و افزایش سازگاری گیاه به شرایط محیطی و به‌خصوص در شرایط تنش‌زا مرتبط باشد، چرا که این قارچ‌ها از طریق کاهش جذب عناصر سنگین و با ایجاد تغییراتی در سیستم دفاعی گیاه مانند فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی می‌توانند آسیب‌های ناشی از سمیت عنصر سنگین را کاهش دهند (۲۸).

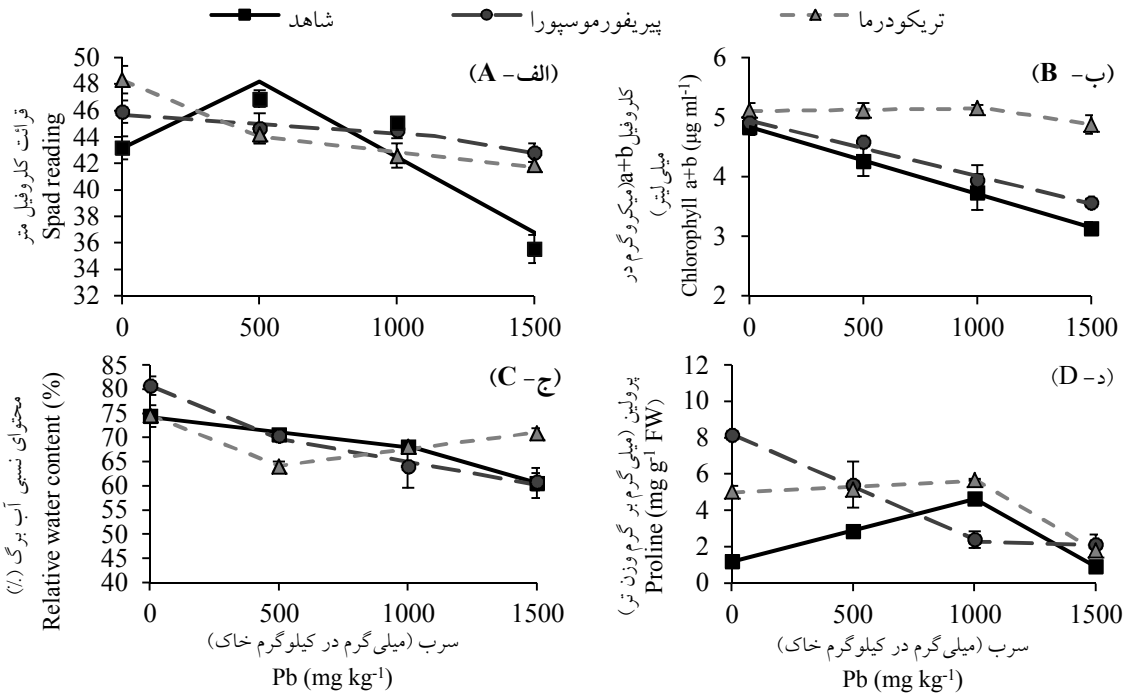


شکل ٤- اثر ساده سرب (الف) و پیریفورموسپورا (*P. indica*) و تریکودرما (*T. longibrachiatum*) (ب) بر میزان نشت الکترولیت کلزا

Figure 2- Simple effect of lead (A) and *Piriformospora (P. indica) and Trichoderma (T. longibrachiatum)* (B) on electrolyte leakage of canola

همچنین قارچ‌های پیریفورموسپورا و تریکودرما تا حدودی باعث کاهش اثر منفی عنصر سنگین سرب بر سبزینگی برگ و کلروفیل *a+b* گیاه کلزا شدند (شکل ٥- الف و ب). به‌طوری‌که کاهش سبزینگی برگ و کلروفیل *a+b* در سطح ۱۵۰۰ میلی‌گرم سرب در کیلوگرم خاک نسبت به شاهد به‌ترتیب از حدود ۱۸ و ۳۵ درصد در عدم تلقیح به حدود ۷ و ۲۷ درصد در پیریفورموسپورا و ۱۳ و ٥ درصد در تریکودرما رسید (شکل ٥- الف و ب). در پژوهش‌های پیشین نیز بکارگیری قارچ‌های میکوریزا و پیریفورموسپورا در گیاه استویا (٦٨) و قارچ پیریفورموسپورا در جو در سطوح مختلف سرب (۳۳) و گوجه‌فرنگی (۲۰) موجب افزایش سبزینگی برگ نسبت به شاهد شد. همچنین قارچ‌های پیریفورموسپورا و تریکودرما در تلقیح با ماش سبز (۵۰) موجب افزایش کلروفیل *a*، *b* و *a+b* نسبت به عدم تلقیح شدند. در پژوهش‌های دیگری نیز با تلقیح گیاه گندم و کلم چینی با قارچ پیریفورموسپورا تحت تنش کادمیم و خشکی میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی بیشتر از شاهد بود (۵۵، ۵۸). در همین زمینه قاسم‌نژاد و بابایی‌زاد (۲۰۱۱) در پژوهشی روی کنگر فرنگی دریافتند گیاهان تلقیح‌یافته با قارچ پیریفورموسپورا برگ‌های پهن‌تری در مقایسه با گیاهان شاهد تولید کردند و بیان داشتند افزایش پهنای برگ در واقع منجر به افزایش میزان کلروفیل و در نهایت

راندمان فتوسنتزی برگ می‌شود (۱۹). در این آزمایش نیز سبزینگی برگ و کلروفیل $a+b$ با سطح برگ همبستگی مثبت و معنی‌داری داشتند. علاوه بر این سبزینگی برگ با تعداد برگ و وزن تر و خشک برگ، ساقه و اندام هوایی و کلروفیل $a+b$ نیز با ارتفاع بوته، قطر ساقه، وزن تر ساقه و اندام هوایی و وزن خشک برگ، ساقه و اندام هوایی همبستگی مثبت و معنی‌داری را نشان دادند که بیشترین همبستگی با سبزینگی برگ مربوط به وزن خشک برگ و اندام هوایی به‌میزان ۰/۷۳ و با کلروفیل $a+b$ مربوط به ارتفاع بوته به‌میزان ۰/۷۲ بود (داده‌ها نشان داده نشد). اما در محتوای نسبی آب برگ فقط قارچ تریکودرما بر کاهش اثر سرب تأثیر داشت و در سطح ۱۵۰۰ میلی‌گرم سرب در کیلوگرم خاک از حدود ۱۹ درصد در گیاهان شاهد به پنج درصد در گیاهان همزیست با تریکودرما رسید. اما قارچ پیریفورموسپورا نتوانست بر کاهش اثر سرب در سطح ۱۵۰۰ میلی‌گرم سرب در کیلوگرم خاک تأثیر مثبتی داشته باشد. اگرچه در سطح صفر سرب این قارچ توانست محتوای نسبی آب برگ را حدود هشت درصد نسبت به عدم تلقیح افزایش دهد (شکل ۵-ج). در این رابطه مشاهده شد قارچ‌های پیریفورموسپورا و تریکودرما موجب افزایش محتوای نسبی آب برگ در گیاه گندم گردید (۵۳). همچنین کاهش محتوای نسبی آب برگ در گیاه‌های بنگدانه تحت تنش کادمیم (۳۵) و گیاه گندم تحت تنش شوری و کم‌آبی (٤٦) به‌ترتیب با تلقیح قارچ‌های میکوریز و پیریفورموسپورا کاهش یافت. به‌نظر می‌رسد گیاهان تلقیح شده با قارچ پیریفورموسپورا از طریق تغییر در مورفولوژی ریشه و طویل کردن سیستم ریشه گیاه میزبان و افزایش سطح جذب از طریق ریسه‌های قارچ موجب افزایش جذب آب و بهبود روابط می‌گردد (۵). همچنین در همین رابطه بیان شده است افزایش محتوای نسبی آب برگ در گیاهان تلقیح شده با قارچ پیریفورموسپورا ممکن است به‌دلیل سازوکار قدرتمند آن در تنظیم اسمزی باشد، چرا که بیشترین میزان تجمع کربوهیدرات‌های محلول و پرولین در این تیمار وجود دارد و چون گیاهان تلقیح شده امکان بیشتری برای تداوم فتوسنتز و تولید اسیدهای آلی جهت تأمین ساختارهای کربنی و انرژی برای تنظیم اسمزی داشته‌اند. در نتیجه با محیط اطراف خود سریع‌تر سازگار شده و در نتیجه توانستند جذب آب بهتری را انجام دهند (٢٤). به‌علاوه، میزان پرولین در قارچ‌های پیریفورموسپورا و تریکودرما با افزایش میزان سرب از شاهد تا سطح ۱۵۰۰ میلی گرم به‌ترتیب حدود ٧٤ و ٦٤ درصد کاهش یافت که این کاهش در تیمار عدم تلقیح حدود ۲۵ درصد بود. اگرچه کاهش پرولین با افزایش میزان سرب در تیمار عدم تلقیح کمتر بود اما به‌طور کلی پرولین کلزا در تلقیح با قارچ‌های پیریفورموسپورا و تریکودرما سطح بالاتری نسبت به تیمار عدم تلقیح از خود نشان داد. به‌طوری‌که به‌ترتیب حدود هفت و چهار برابر در سطح صفر سرب و حدود دو برابر در سطح ۱۵۰۰ میلی گرم بیشتر بود (شکل ۵- د). در پژوهش‌های مشابهی تولید پرولین در گیاه‌های بنگدانه تحت تنش کادمیم در تلقیح با قارچ‌های میکوریز (۳۵) و در برنج تحت تنش آرسنیک (٤٣) در تلقیح با پیریفورموسپورا افزایش یافت. چون پرولین در تعدیل تنش‌های محیطی از جمله فلزات سنگین نقش مهمی دارد و احتمالاً در سلول‌های تحت تنش نقش آنتی‌اکسیدانی را ایفا می‌کند (٦٩). در بررسی همبستگی محتوای نسبی آب برگ و پرولین با تمام صفات رویشی مورد بررسی مشاهده شد محتوای نسبی آب برگ با تمام این صفات به غیر از ارتفاع بوته و قطر ساقه همبستگی مثبت و معنی‌داری داشت که بیشترین همبستگی مربوط به سطح برگ به‌میزان ۰/۸۰ بود. در مقایسه، پرولین تنها با ارتفاع بوته به‌میزان ۰/٦٤ همبستگی معنی‌داری را نشان داد (داده‌ها نشان داده نشد).



شکل ۵- اثر متقابل سرب و قارچ‌های پیریفورموسپورا (*P. indica*) و تریکودرما (*T. longibrachiatum*) بر قرائت کلروفیل متر (الف)، کلروفیل *a+b* (ب)، محتوای نسبی آب برگ (ج) و پرولین (د) گیاه کلزا

Figure 5. The interaction of lead and *Piriformospora* (*P. indica*) and *Trichoderma* (*T. longibrachiatum*) on spad reading (A), chlorophyll *a+b* (B), relative water content (C) and proline (D) of canola plant

نتیجه‌گیری کلی

در مجموع، نتایج بیانگر حساسیت بیشتر صفات رویشی اندازه‌گیری شده نسبت به سمیت سرب بود. در میان این صفات بیشترین حساسیت نیز در وزن خشک ساقه و اندام هوایی مشاهده شد. همچنین در تمام صفات بررسی شده افزایش حساسیت به سرب در گستره‌ی حدود ۵۰۰ تا ۱۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک متغیر بود. از طرفی تلقیح گیاه کلزا با قارچ‌های پیریفورموسپورا و تریکودرما در برخی صفات موجب کاهش این حساسیت گردید. بیشترین کاهش اثر منفی سرب در صفات رویشی در وزن تر ساقه و سطح برگ در تلقیح با قارچ پیریفورموسپورا و در بین صفات فیزیولوژیک در کلروفیل *a+b* در تلقیح با قارچ تریکودرما بود. بیشترین همبستگی بین صفات مورفولوژیک و فیزیولوژیک مربوط به سطح برگ و محتوای نسبی آب برگ به‌میزان ۰/۸۰ بود. با توجه به این نتایج به نظر می‌رسد تلقیح قارچ‌های پیریفورموسپورا و تریکودرما با گیاه کلزا می‌توانند تا حدودی با کاهش اثر سمیت سرب در گیاه موجب افزایش تحمل و در نتیجه بهبود فرآیند گیاه‌پالایی شود.

References

1. Abo-Ghalia, H.H., and Khalafallah A.A. 2008. Responses of wheat plants associated with arbuscular mycorrhizal fungi to short-term water stress followed by recovery at three growth stages. J. Appl. Sci. Res. 4: 5. 570-580.
2. Abouzina, H.F., Saber, M., Hoballah, E., El-Ashry, S., and Zaghloul, A.M. 2013. Yield attributes and oil safety in the hyperaccumulator canola plant grown in

a bioremediated sewaged soil. J. Agr. Sci. Tech. 3: A. 1010-1016.
3. Anith, K.N., Faseela, K.M., Archana, P.A. and Prathapan, K.D. 2011. Compatibility of *Piriformospora indica* and *Trichoderma harzianum* as dual inoculants in black pepper (*Piper nigrum* L.). Symbiosis. 55: 1. 11-17.
4. Arriagada, C., Aranda, E., Sampedro, I., Garcia-Romera, I. and Ocampo, J.A. 2009. Contribution of the saprobic fungi Trametes versicolor and *Trichoderma harzianum* and the arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus deserticola* and *G. claroideum* to arsenic tolerance of Eucalyptus globulus. Bioresour. Technol. 100: 24. 6250-6257.
5. Auge, R.M. 2001. Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. Mycorrhiza. 11: 1. 3-42.
6. Azari, A., Modares Sanavi, S.A.M., Askari, H., Ghanati, F., Naji, A.M., and Alizade, B. 2012. Effect of salinity stress on morphological and physiological of canola and turnip (*Brassica napus* and *B. rapa*). Iran. J. Crop Sci. 14: 2. 121-135. (in Persian).
7. Bae, H., Sicher, R.C., Kim, M.S., Kim, S.H., Strem, M.D., Melnick, R.L., and Bailey, B.A. 2009. The beneficial endophyte *Trichoderma hamatum* isolate DIS 219b promotes growth and delays the onset of the drought response in *Theobroma cacao*. J. Exp. Bot. 60: 11. 3279-3295.
8. Bagde, U.S., Prasad, R., and Varma, A. 2010. Interaction of Mycobiont: *Piriformospora Indica* with Medicinal plants and plants of Economic importance. Afr. J. Biotechnol. 9: 54. 9214-9226.
9. Bakhshandeh, E., Soltani, A., Zeinali, E., and Kallate-Arabi, M. 2012. Prediction of plant height by allometric relationships in field-grown wheat. Cereal Res. Commun. 40: 3. 487-496.
10. Bates, L.S., Waldren, R.P., and Teare, I.D. 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant Soil. 39: 1. 205-207.
11. Belouchrani, A.S., Mameri, N., Abdi, N., Grib, H., Lounici, H., and Drouiche, N. 2016. Phytoremediation of soil contaminated with Zn using Canola *(Brassica napus* L.). Ecol. Eng. 95: 43-49.
12. Bhardwaj, P., Chaturvedi, A.K., and Prasad, P. 2009. Effect of enhanced lead and cadmium in soil on physiological and biochemical attributes of *Phaseolus vulgaris* L. Nat. Sci. 7: 8. 63-75.
13. Cao, L., Jiang, M., Zeng, Z., Du, A., Tan, H., and Liu, Y. 2008. *Trichoderma atroviride* F6 improve phytoextraction efficiency of mustard (*Brassica juncea* (L.) Coss. var. *foliosa Bailey*) in Cd, Ni contaminated soils. Chemosphere. 71: 9. 1769-1773.
14. Devi Chinmayee, M., Anu M, S., Mahesh, B., Mary sheeba, A., Mini, I., and Swapna, T.S. 2014. A comparative study of heavy metal accumulation and antioxidant responses in *Jatropha curcas* L. J. Environ. Sci. Toxicol. Food Technol. 8: 7. 58-67.
15. Dhiman, S.S., Selvaraj, C., Li, J., Singh, R., Zhao, X., Kim, D., Kim, J.Y., Kang, Y.C. and Lee, J.K. 2016. Phytoremediation of metal-contaminated soils by the hyperaccumulator canola (*Brassica napus* L.) and the use of its biomass for ethanol production. Fuel. 183: 107-114.
16. Faghih Abdollahi, L., Pirdashti, H., Yaghoubian, Y. and Alavi, S.M. 2015. Effect of *Piriformospora indica* and *Trichoderma tomentosum* fungi on basil (*Ocimum basilicum* L.) growth under copper nitrate levels. Electron. J. Soil Manag. Sustain. Prod. 5: 1. 113-127. (in Persian)
17. Garg, N. and Aggarwal, N. 2012. Effect of mycorrhizal inoculations on heavy metal uptake and stress alleviation of *Cajanus cajan* (L.) Millsp genotypes grown in cadmium and lead contaminated soils. Plant Growth Regul. 66: 1. 9-26.
18. Ghaderian, M. and Nosouhi, S. 2015. The capability of uptake and removal of toxic heavy metals from the industrial discharge of Mobarakeh Steel Complex by some metal accumulating plants. J. Plant Proc. Func. 4: 12. 43-49. (in Persian).

19. Ghasemnezhad, A. and Babaeizad, V. 2011. The influence of piri fungus (*Priformospora indica*) on vegetative growth and the content of caffeic acid of leaves of artichoke (*Cynara scolymus* L.) plant. J. Plant Prod. 18: 1. 133-140. (In Persian).
20. Ghorbani, A, razavi, S.M., Ghasemi omran, V., Pirdashti, H., and Ramezani, M. 2016. Effect of endophyte fungal symbiosis of *Piriformospora india* on morphological character and photosynthesis pigments in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). New Cell. Mol. Biotech. J. 6: 24. 57-64. (in Persian).
21. Gill, S.S., Gill, R., Trivedi, D.K., Anjum, N.A., Sharma, K.K., Ansari, M.W., Ansari, A.A., Johri, A.K., Prasad, R., Pereira, E., Varma, A., and Tuteja, N. 2016. *Piriformospora indica*: Potential and Significance in Plant Stress Tolerance. Front. Microbiol. 7: 332. 1-20.
22. Gravel, V., Antoun, H., and Tweddell, R.J. 2007. Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: Possible role of indole acetic acid (IAA). Soil Biol. Biochem. 39: 8. 1968-1977.
23. Haji Hosseini, R., Khanlarian, M., and Ghorbanli, M. 2007. Effect of Lead on Germination, Growth and Activity of Catalase and Peroxidase Enzyme in Root and Shoot of Two Cultivars of *Brassica napus* L. J. Biol. Sci. 7: 4. 592-598.
24. Hajinia, S., Zarea, M.J., Mohammadi Goltapeh, E., and Rejali, F. 2011. Investigating the efficacy of endophytic fungus *Piriformosporaindica* and *Azospirillum* strains on alleviation of detrimental effect of salt stress on wheat (*Triticum aestivum* cv. Sardari). Environ. Stresses Crop Sci. 4: 1. 21-31. (In Persian)
25. Harman, G., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I., and Lorito, M. 2004. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. Nat. Rev. Microbiol. 2: 1. 43-56.
26. Hashem, A., Abd_Allah, E.F., Alqarawi, A.A., Al Huqail, A.A., and Egamberdieva, D. 2014. Alleviation of abiotic salt stress in *Ochradenus baccatus* (Del.) by *Trichoderma hamatum* (Bonord.) Bainier. J. Plant Interact. 9: 1. 857-868.
27. Hui, F., Liu, J., Gao, Q., and Lou, B. 2015. *Piriformospora indica* confers cadmium tolerance in Nicotiana tabacum. J. Environ. Sci. 37: 184-191.
28. Janouskova, M., Pavikova, D., and Vosatka, M. 2006. Potential contribution of arbuscular mycorrhiza to cadmium immobilisation in soil. Chemosphere. 65: 11. 1959-1965.
29. John, R.P., Tyagi, R.D., Prevost, D., Brar, S.K., Pouleur, S., and Surampalli, R.Y. 2010. Mycoparasitic *Trichoderma viride* as a biocontrol agent against *Fusarium oxysporum* f. sp. *adzuki* and *Pythium arrhenomanes* and as a growth promoter of soybean. Crop Prot. 29: 12. 1452-1459.
30. Kaefer, E. 1977. Meiotic and mitotic recombination in *Aspergillus* and its chromosomal aberrations. Adv. Genet. 19: 33-131.
31. Kapoor, R., and Bhatnagar, A.K. 2007. Attenuation of cadmium toxicity in mycorrhizal celery (*Apium graveolens* L.). J. Microbial. Biotechnol. 23: 8. 1083-1089.
32. Kapoor, R., Giri, B., and Mukerji, K.G. 2004. Improved growth and essential oil yield and quality in *Foeniculum vulgare* Mill on mycorrhizal inoculation supplemented with P-fertilizer. Bioresour. Technol. 93: 3. 307-311.
33. Karimi, F., Sepehri, M., Afuni, M., and Hajabbasi, M.A. 2015. Effect of endophytic fungus, *Piriformospora indica*, on barley resistance to lead. Water Soil Sci. (J. Sci. & Technol. Agric. & Natur. Resour.). 19: 71. 311-320. (In Persian)
34. Karimi, N., Khanahmadi, M. and Moradi, B. 2013. The effects of lead on some physiological parameters of Artichoke. J. Plant Prod. 20: 1. 49-62. (In Persian)
35. Kazemalilou, S., and Rasouli-Sadaghiani, M.H. 2012. Effect of soil

cadmium pollution on some physiological parameters of Hyoscyamus plant in presence/absence of growth-promoting microorganisms. Water Soil Sci. 22: 4. 17-30. (in Persian)
36. Kehstegar, M., Afshar, S.A., and Nematpour, S.F. 2014. Effect of heavy metals cu and pb on some growth characteristics, proline content and lipid peroxidation in two varieties of mung bean (*Vigna radiate*). J. Crop Ecophysiol. 8: 3. 363-374. (In Persian)
37. Khan, A.G. 2005. Role of soil microbes in the rhizospheres of plants growing on trace element contaminated soils in phytoremediation. J. Trace Elem. Med. Biol. 18: 4. 355-364.
38. Khosravi, F., Savaghebi Firoozabadi, G.H., and Farahbakhsh, H. 2009. The effect of potassium chloride on cadmium uptake by canola and sunflower in a polluted soil. J.Water Soil. 23: 3. 28-35. (In Persian).
39. Li, Q., Cai, S., Mo, C., Chu, B., Peng, L., and Yang, F. 2010. Toxic effects of heavy metals and their accumulation in vegetables grown in a saline soil. Ecotoxicol. Environ. Saf. 73: 1. 84-88.
40. Li, X., Li, W., Chu, L., White Jr, J.F., Xionga, Z., and Li, H. 2016. Diversity and heavy metal tolerance of endophytic fungi from *Dysphania ambrosioides*, a hyperaccumulator from Pb–Zn contaminated soils. J. Plant Interact. 11: 1. 186-192.
41. Lin, C., Liu, J., Liu, L., Zhu, T., Sheng, L., and Wang, D. 2009. Soil amendment application frequency contributes to phytoextraction of lead by sunflower at different nutrient levels. Environ. Exp. Bot. 65: 2-3. 410-416.
42. Lutts, S., Kinet, J.M., and Bouharmont, J. 1995. Changes in plant response to NaCl during development of rice (*Oryza sativa* L.) varieties differing in salinity resistance. J. Exp. Bot. 46: 12. 1843-1852.
43. Mohd, S., Shukla, J., Kushwaha, A.S., Mandrah, K., Shankar, J., Arjaria, N., Saxena, P.N., Narayan, R., Roy, S.K., and Kumar, M. 2017. Endophytic Fungi *Piriformospora indica* Mediated Protection of Host from Arsenic Toxicity. Front. Microbiol. 8: 754. 1-14.
44. Nagajyoti, P.C., Lee, K.D., and Sreekanth, T.V.M. 2010. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. Environ. Chem. Lett. 8: 3. 199-216.
45. Porra, R.J. 2002. The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls *a* and *b*. Photosynth. Res. 73: 1-3. 149-156.
46. Rahimi Tanha, S., Ghasemnajad, A., Babaeizadeh, V., and Alaeddin, M.Z. 2016. *Piriformospora indica* mutualistic effect on *Cynara scolymus* (L.) under water and saline stress. J. Plant Prod. Res. 23: 4. 37-57. (In Persian)
47. Ramzanpour Ahmadchali, A. 2016. Effect of *Piriformospora* indica endophyt fungi on copper tolerance of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) medicinal plant in a controlled conditions. M.Sc. thesis of science degree in agronomy. Sari Agric. Sci. Nat. Res. Univ. 115p. (In Persian)
48. Ritchie, S.W., Nguyen, H.T., and Holaday, A.S. 1990. Leaf water content and gas exchange parameters of two wheat genotypes differing in drought resistance. Crop Sci. 30: 1. 105-111.
49. Salazar, M.J., and Pignata, M.L. 2014. Lead accumulation in plants grown in polluted soils. Screening of native species for phytoremediation. J. Geochem. Explor. 137: 29-36.
50. Salimi Tamalla, N., Seraj, F., Pirdashti, H., and Yaghoubian, Y. 2014. The effect of seed biopriming by *Piriformospora indica* and *Trichoderma virens* on the growth, morphological and physiological parameters of mung bean (*Vigna radiata* L.) seedlings. Iran. J. Seed Sci. Res. 1: 2. 67-78. (In Persian)
51. Saremi Rad, B., Esfandiari E.A., Shokrpour, M., Sofalian, O., Avanes, A., and Mousavi, S.B. 2014. Cadmium effects on some morphological and physiological parameters in wheat at seedling stage. J. Plant Res. (Iran. J. Biol.). 27: 1. 1-11. (In Persian)
52. Sartipnia, N., Khavari-Nejad, R.A., Babaeizad, V., Nejad-Sattari, T., and Najafi, F. 2013. Effect of Piriformospora indica on antioxidant enzymes activity

of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) under lead stress. Int. J. Biosci. 3: 12. 55-64.

53. Seraj, F., Salimi Tamali, N., Pirdashti, H., and Yaghoubian, Y. 2018. The response of wheat (*Triticum aestivum* L.) vegetative and physiological attributes to salt stress and effect of seed biopriming by *Piriformospora indica* and *Trichoderma virens* in improving salinity compatibility. Iran. J. Seed Sci. Technol. 6: 2. 77-90. (In Persian)
54. Shahabivand, S., and aliloo, A.A. 2016. *Piriformospora indica* promotes growth and antioxidant activities of wheat plant under cadmium stress. YYU. J. Agri. Sci. 26: 3. 333-340.
55. Shahabivand, S., Maivan, H.Z., Goltapeh, E.M., Sharifi, M., and Aliloo, A.A. 2012. The effects of root endophyte and arbuscular mycorrhizal fungi on growth and cadmium accumulation in wheat under cadmium toxicity. Plant Physiol. Bioch. 60: 53-58.
56. Sharma, P., Patel, A.N., Saini, M.K., and Deep, S. 2012. Field demonstration of *Trichoderma harzianum* as a plant growth promoter in wheat (*Triticum aestivum* L.). J. Agric. Sci. 4: 8. 65-73.
57. Shu, X., Yin, L., Zhang, Q., and Wang, W. 2011. Effect of Pb toxicity on leaf growth, antioxidant enzyme activities, and photosynthesis in cuttings and seedlings of *Jatropha curcas* L. Environ. Sci. Pollut. Res. 19: 3. 893-902.
58. Sun, C., Johnson, J.M., Cai, D., Sherameti, I., Oelmuller, R., and Lou, B. 2010. *Piriformospora indica* confers drought tolerance in Chinese cabbage leaves by stimulating antioxidant enzymes, the expression of drought-related genes and the plastid-localized CAS protein. J. Plant Physiol. 167: 12. 1009-1017
59. Tabrizi, L., Mohammadi, S., Delshad, M., and Moteshare Zadeh, B. 2015. The effect of arbuscular mycorrhizal fungi on growth and yield of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) under lead and cadmium stress. Environ. Sci. 13: 2. 37-48. (In Persian)
60. Tashakori Fard, E., Taghavi Ghasemkheyli, F., Pirdashti, H., Tajick Ghanbary, M.A., and Bahmanyar, M.A. 2017. Symbiotic effect of *Trichoderma atroviride* on growth characteristics and yield of two cultivars of rapeseed (*Brassica napus* L.) in a contaminated soil treated with copper nitrate. Iran. J. Field Crops Res. 15: 1. 74-86.
61. Tashakorizadeh, M., and Saeidnejad, A.H. 2017. Effect of different concentrations of chromium (III) on morphological characteristics and essential oil chemical composition of basil. Water Soil Sci. 27: 1. 135-145. (In Persian)
62. Verma, S., Varma, A., Rexer, K.H., Kost, G., Sarbhoy, A., Bisen Butehorn, P., and Franken, P. 1998. *Piriformospora indica*, gen. et sp. nov., a new root-colonizing fungus. Mycologia. 90: 5. 896–903.
63. Waghunde, R.R., Shelake, R.M., and Sabalpara, A.N. 2016. *Trichoderma*: A significant fungus for agriculture and environment. Afr. J. Agric. Res. 11: 22. 1952-1962.
64. Wang, M., and Zhou, Q. 2005. Single and joint toxicity of chlorimuron-ethyl, cadmium, and copper acting on wheat *Triticum aestivum*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 60: 2. 169-175.
65. Yadav, S.K. 2010. Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. S. Afr. J. Bot. 76: 2. 167-179.
66. Yaghubian, Y. 2015. The effect of *Piriformospora indica* and *Trichoderma spp.* on cadmium tolerance in medicinal herbs of *Melissa officinalis* L. and Purple (*Portulaca oleracea* L.). PhD. thesis of science degree in agronomy. Ramin Agric. Nat. Res. Univ. Khouzestan. 186p. (In Persian)
67. Zafar, S., Aqil, F., and Ahmad, E. 2007. Metal tolerance and biosorption potential of filamentous fungi isolated from metal contaminated agricultural soil. Bioresour. Technol. 98: 13. 2557-61.
68. Zare Hoseini, R., Mohammadi Goltapeh, E., Kalatejari, S., and Dehghani Mashkani, M. 2015. Effect of Vermicompost and Fungi Inoculation on Growth Characteristics and Steviosid Content of *Stevia rebaudiana* Bert. J. Med. Plants. 4: 56. 179-188. (In Persian).

69. Zhang, H.H., Tang, M., and Zheng, C. 2010. Effect of inoculation with AM fungi on lead uptake, translocation and stress alleviation of *Zea mays* L. seedlings planting in soil with increasing lead concentrations. Eur. J. Soil. Biol. 46: 5. 306-311.
70. Zhang, H.W., Song, Y.C., and Tan, R.X. 2006. Biology and chemistry of endophytes. Nat. Prod. Rep. 23: 5. 753-771.
71. Zhou, J., Zhang, Z., Zhang, Y., Wei, Y., and Jiang, Z. 2018. Effects of lead stress on the growth, physiology, and cellular structure of privet seedlings. Plos One 13: 3. 1-17.