Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Journal of Plant Production Research

Print ISSN: 2322-2050
Online ISSN: 2322-2778

Application of Symbiotic Fungi to Reduce the Phytotoxic Effect of Chromium in Lettuce (*Lactuca sativa* L.) in hydroponic condition

Zahra Majnooni Heris[1], Rasoul Azarmi[*2], Ali Akbar Shokouhian[3], Behrouz Esmailpour[4], Ali Shahi Gharalar[5]

1. M.Sc. Student, Dept. of Horticulture Science, Faculty of Agriculture, Mohaghegh Ardabili University, Ardabil, Iran. E-mail: z.majnooni2017@gmail.com
2. Corresponding Author, Associate Prof., Dept. of Horticulture Science, Faculty of Agriculture, Mohaghegh Ardabili University, Ardabil, Iran. E-mail: r_azarmi@uma.ac.ir
3. Associate Prof., Dept. of Horticulture Science, Faculty of Agriculture, Mohaghegh Ardabili University, Ardabil, Iran. E-mail: shokouhiana@yahoo.com
4. Professor, Dept. of Horticulture Science, Faculty of Agriculture, Mohaghegh Ardabili University, Ardabil, Iran. E-mail: behsmaiel@yahoo.com
5. Assistant Prof., Dept. of Horticulture Science, Faculty of Agriculture, Mohaghegh Ardabili University, Ardabil, Iran. E-mail: a.shahi@uma.ac.ir

Article Info

Article type:
Full Length Research Paper

Article history:
Received: 06.25.2022
Revised: 07.23.2022
Accepted: 03.07.2023

Keywords:
Chromium toxicity,
Lettuce,
Mycorrhiza,
Soilless system

ABSTRACT

Background and Objectives: Chromium (Cr) is a toxic metal usually found in many regions and countries, because of excessive discharge of Cr-containing effluents resulting from industrial and agricultural activities. In higher plants, Cr is not essential to plant growth. Exposure to Cr may cause tissue necrosis and limit chlorophyll production. In particular, it is usually involved in electron transfer and induce production of reactive oxygen species (ROS) e.g., hydroxyl radicals and superoxide radicals, resulting in oxidative stresses and damages to plant cells and tissues. Symbiosis fungi significantly accelerate plant growth by improving water and nutrient uptake, early flowering, seed production and greater photosynthetic rate. These fungi change the production of secondary metabolites and enhance adaptation and tolerance to biotic and abiotic stresses. This study aimed to investigate the role of mycorrhizal and endophytic fungi (*Glomus intradises and P. indica*) as possible tools to reduce the phytotoxicity of Cr.

Materials and Methods: In order to evaluate the effect of different concentrations of Cr (0, 3 and 15 mg L^{-1}), and symbiotic fungi on growth and physiological properties of lettuce (*Lactuca sativa* cv. Little Jem), an experiment was carried out as factorial split plot based on Completely randomized design with four replications as soilless system at research greenhouse of University of Mohaghegh Ardabili, in 2021. In this experiment Cr and nitrogen content, root colonization, root and shoot dry weight, leaf number, stem and leaf dry and fresh weight, chlorophyll and carotenoid content, stomatal conductance, electrolyte leakage, ascorbate peroxidase and catalase activities, hydrogen peroxide and were measured.

Results: The results showed that by increasing the concentration of Cr from 0 to 15 mg L^{-1} in the nutrient solution, the root symbiosis percentage decreased by 20%, root dry weight by 11.7%, shoot dry weight by 12.9% and soluble protein by 10.3%. The symbiosis of lettuce roots with symbiotic fungi significantly increased root and shoot dry weight, leaf number and soluble protein compared to non-inoculated plants. Plants

inoculated with symbiotic fungi *P. indica* and *G. intradises* were able to reduce the negative effects of Cr toxicity by reducing Cr absorption and increasing the percentage of symbiosis, nitrogen content, chlorophyll content, ascorbate peroxidase activity and hydrogen peroxide.

Conclusion: The results show that with increasing the concentration of Cr in the nutrient solution, lettuce growth decreased and the use of symbiotic fungi could improve the physiological and biochemical characteristics of lettuce under Cr stress.

Cite this article: Majnooni Heris, Zahra, Azarmi, Rasoul, Shokouhian, Ali Akbar, Esmailpour, Behrouz, Shahi Gharalar, Ali. 2023. Application of Symbiotic Fungi to Reduce the Phytotoxic Effect of Chromium in Lettuce (*Lactuca sativa* L.) in hydroponic condition. *Journal of Plant Production Research*, 30 (2), 57-75.

© The Author(s).
DOI: 10.22069/JOPP.2023.20334.2946
Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی

شاپا چاپی: ۲۳۲۲-۲۰۵۰
شاپا آنلاین: ۲۳۲۲-۲۷۷۸

کاربرد قارچ‌های همزیست در کاهش اثرات سمی کروم در گیاه کاهو در شرایط هیدروپونیک

زهرا مجنونی هریس[۱]، رسول آذرمی*[۲]، علی‌اکبر شکوهیان[۳]، بهروز اسماعیل‌پور[۴]، علی شاهی قره‌لر[۵]

۱. دانشجوی کارشناسی‌ارشد گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران. رایانامه: z.majnooni2017@gmail.com
۲. نویسنده مسئول، دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران. رایانامه: r_azarmi@uma.ac.ir
۳. دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران. رایانامه: shokouhiana@yahoo.com
۴. استاد گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران. رایانامه: behsmaiel@yahoo.com
۵. استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران. رایانامه: a.shahi@uma.ac.ir

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
مقاله کامل علمی- پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۴/۰۴
تاریخ ویرایش: ۱۴۰۱/۰۵/۰۱
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۱۶

واژه‌های کلیدی:
تنش کروم،
کاهو،
کشت بدون خاک،
میکوریز

چکیده

سابقه و هدف: کروم یکی از فلزات سنگین است که معمولاً به دلیل تخلیه بیش از حد پساب‌های حاوی کروم ناشی از فعالیت‌های صنعتی و کشاورزی در بسیاری از مناطق و کشورها یافت می‌شود. در گیاهان آلی، کروم برای رشد آن‌ها ضروری نیست و سمیت کروم ممکن است علایمی مانند سوختگی بافت و کاهش سنتز کلروفیل را نشان دهند. قارچ‌های همزیستی با بهبود جذب آب و مواد معدنی، گلدهی زودرس، تولید بذر و شدت فتوسنتزی بیش‌تر، رشد و نمو گیاه را به طور قابل‌توجهی تسریع می‌کنند. این قارچ‌ها تولید متابولیت‌های ثانویه را تغییر داده و سازگاری و تحمل را در برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی افزایش می‌دهند. این مطالعه با هدف بررسی نقش قارچ‌های میکوریزا *Piriphormospora indica* و *Glomus intradises* به عنوان راهکار ممکن برای کاهش سمیت گیاهی کروم انجام شد.

مواد و روش‌ها: به منظور بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف کروم (۰، ۳ و ۱۵ میلی‌گرم در لیتر در محلول غذایی) و قارچ‌های همزیست (بدون تلقیح، قارچ *P. indica* و *G. intradises* و ترکیب دو قارچ همزیست) بر رشد، خصوصیات فیزیولوژیکی و زیست‌شیمیایی کاهو برگ قرمز (*Lactuca sativa* cv. Little jem)، آزمایشی به صورت فاکتوریل، در قالب طرح کاملاً تصادفی در چهار تکرار در سال ۱۴۰۰ به‌صورت کشت هیدروپونیک در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه محقق اردبیلی اجرا گردید. در این پژوهش مقدار کروم و نیتروژن برگ، درصد همزیستی ریشه، وزن خشک ریشه و اندام هوایی، تعداد برگ، محتوای کلروفیل و کارتنوئید، هدایت روزنه‌ای برگ، پروتئین محلول، نشت الکترولیت، آسکوربات پراکسیداز، کاتالاز و پراکسید هیدروژن مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که با افزایش غلظت کروم از ۰ به ۱۵ میلی‌گرم در لیتر در محلول غذایی درصد همزیستی ریشه ۲۰ درصد، وزن خشک ریشه ۱۱/۷ درصد، وزن خشک اندام هوایی ۱۲/۹ درصد و پروتئین محلول ۱۰/۳ درصد کاهش نشان داد. همزیستی ریشه کاهو با قارچ‌های همزیست وزن خشک ریشه و اندام هوایی، تعداد برگ و پروتئین محلول را در مقایسه با گیاهان تلقیح نشده به‌طور معنی‌داری افزایش داد. گیاهان همزیست با *P. indica* و *G. intradises* توانست اثرات منفی سمیت کروم را از طریق کاهش جذب کروم و افزایش درصد همزیستی، مقدار نیتروژن، محتوای کلروفیل و فعالیت آنزیم‌های اسکوربات پراکسیداز و پرکسید هیدروژن کاهش دهد.

نتیجه‌گیری: نتایج بیان می‌دارد که با افزایش غلظت کروم در محلول غذایی خصویات رشدی کاهو کاهش یافت و استفاده از قارچ‌های همزیست توانست خصوصیات فیزیولوژیکی و زیست‌شیمیایی کاهو را در شرایط تنش کروم بهبود بخشد.

استناد: مجنونی هریس، زهرا، آذرمی، رسول، شکوهیان، علی‌اکبر، اسماعیل‌پور، بهروز، شاهی قره‌لر، علی (۱۴۰۲). کاربرد قارچ‌های همزیست در کاهش اثرات سمی کروم در گیاه کاهو در شرایط هیدروپونیک. *نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی*، ۳۰ (۲)، ۷۵-۵۷.
DOI: 10.22069/JOPP.2023.20334.2946

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

© نویسندگان.

مقدمه

کاهو (*Lactuca Sativa* L.) یکی از سبزی‌های مهم برگی بوده که به صورت سالاد و تازه‌خوری مصرف می‌شود. این گیاه سرشار از ویتامین‌ها و مواد مغذی ضروری مانند آهن، منگنز، فسفر، پتاسیم، بتاکاروتن و ویتامین ث می‌باشد که برای سلامتی انسان ضروری است (۱). بیش‌تر کاهوهایی که برای اهداف تجاری در گلخانه پرورش داده می‌شود در سیستم بدون خاک کشت می‌شود. انتشار مواد شیمیایی سمی مانند فلزات سنگین به محیط‌زیست به یک نگرانی عمده برای محیط‌زیست و سلامت انسان تبدیل شده است (۲). کروم یک فلز سنگین بسیار سمی برای گیاهان است و به دلیل انتشار کنترل نشده از فعالیت‌های صنعتی و استفاده از ترکیبات حاوی کروم در کشاورزی، از جمله آفت‌کش‌ها، کودها و لجن فاضلاب، آن به یک آلاینده زیست محیطی جدی تبدیل شده است (۳). کروم طیف وسیعی از حالت‌های اکسیداسیون دارد، اما پایدارترین و رایج‌ترین حالت‌های کروم "شش ظرفیتی" و کروم "سه ظرفیتی" هستند (۴). کروم شش ظرفیتی بیش‌ترین تأثیر مضر بر رشد و نمو گیاهان دارد. کروم بر فرایندهای مختلف رشد، شاخص‌های فتوسنتزی شامل تثبیت دی‌اکسیدکربن، انتقال الکترون، فسفوریلاسیون نوری و فعالیت‌های آنزیمی تأثیر می‌گذارد. غلظت‌های بالای کروم بر رشد ریشه نیز تأثیر می‌گذارد و سبب پژمردگی و پلاسمولیز سلول‌های ریشه‌ای می‌گردد (۵). یکی از راهکارهای مؤثر برای کاهش اثرات سمی فلزات سنگین در گیاهان، استفاده از میکروارگانیسم‌های مفید به‌ویژه قارچ‌های همزیست ریشه می‌باشد در بررسی اثر کروم بر فتوسنتز گیاه چای مشاهده شد که غلظت‌های بالای کروم شش ظرفیتی (۱ میلی‌مولار) می‌تواند سبب تخریب غشاء کلروپلاستی و کاهش میزان فتوسنتز در گیاه شود (۶). قارچ پیریفورموسپورا اندیکا (*Piriformospora indica*) یک قارچ اندوفیتیک و همزیست ریشه گیاهان بوده که در شرایط طبیعی رشد و شرایط تنش در رشد گیاهان نقش به‌سزایی دارد. این قارچ در بیش‌تر خصوصیات مشابه قارچ‌های میکوریز آربوسکولار است (۷ و ۸). کاربرد قارچ اندوفیت *P. indica* در گیاه دارویی نعناع فلفلی سبب تحریک سنتز ترکیبات فنلی و افزایش جذب فسفر و پتاسیم و کاهش اثرات منفی تنش شوری شده است (۹). قارچ میکوریزا آربوسکولار از مهم‌ترین گروه‌های قارچی، متعلق به شاخه *Glomeromycota* هستند همزیستی آن با ریشه گیاهان آلی، یکی از مهم‌ترین انواع همزیستی اجباری در طبیعت بوده که فواید بسیاری از جمله جذب آب و عناصر معدنی برای گیاه میزبان دارد. این قارچ با ریشه بیش از ۹۷ درصد گیاهان همزیستی دارند (۱۰) و یک رابطه مستقیم بین خاک و ریشه‌ها برقرار می‌کنند و با افزایش جذب آب و موادمعدنی و سنتز متابولیت‌های ثانویه در تحمل به تنش‌های محیطی از جمله آلودگی فلزات سنگین و بیماری‌ها نقش دارند (۱۱). نتایج بررسی اثر قارچ میکوریز بر گیاه لوبیا در خاک‌های آلوده به عنصر کادمیم نشان داد که با افزودن کادمیم به خاک، زیست‌توده و رشد ریشه گیاه کاهش یافت ولی در حضور قارچ مایکوریزی فلز کادمیم نتوانست اثر منفی معنی‌داری بر زیست‌توده گیاه داشته باشد (۱۲). بنابراین کاربرد قارچ ریشه در بوم‌نظام‌های آلوده به فلزهای سنگین، راهکاری برای بهبود رشد و کاهش مقدار فلزهای سنگین در اندام‌های هوایی گیاهان به‌شمار می‌آید (۱۳). سازوکارهایی که قارچ میکوریز آربوسکولار به‌وسیله آن‌ها کاهش تنش فلزات سنگین را در گیاهان اعمال می‌کند شامل کلاته شدن و بی‌تحرکی فلزات سنگین در میسلیوم‌های خارجی، بهبود تغذیه معدنی به‌ویژه فسفر و تغییر pH ریزوسفر می‌باشد (۱۴).

هدف از این پژوهش بررسی تأثیر قارچ‌های همزیست بر تعدیل تنش کروم بود و مطالعه‌های کمی روی تأثیر قارچ‌های همزیست به ویژه پریفورموسپورا اندیکا بر رشد و خصوصیات فیزیولوژیکی کاهو تحت تنش کروم در سیستم کشت هیدروپونیک انجام شده است.

مواد و روش‌ها

کاشت بذر و اعمال تیمارها: این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در ۴ تکرار به‌صورت هیدروپونیک در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه محقق اردبیلی در سال ۱۴۰۰ اجرا گردید. برای اجرای این آزمایش بذر کاهو (*Lactuca sativa cv.* Little jem) از شرکت پاکان بذر تهیه و در سینی‌های کشت حاوی کوکوپیت و پرلایت کشت شدند. دانهال‌ها با ظهور چهارمین برگ حقیقی به گلدان‌های با بستر محتوی کوکوپیت و پرلایت (نسبت ۵۰ به ۵۰) منتقل شدند. تیمار کروم در سه سطح ۰، ۳ و ۱۵ میلی‌گرم در لیتر به فرم کرومات پتاسیم شش ظرفیتی ($KCrO_4$) به همراه محلول غذایی اعمال شد. غلظت‌های مختلف کروم پس از استقرار کامل گیاه یعنی دو هفته پس از انتقال دانهال به گلدان و به مدت یک ماه اعمال شد. تیمار قارچ همزیست شامل بدون تلقیح، قارچ *P. indica*، قارچ *G. intradises* و ترکیب دو قارچ بودند. برای تهیه *P. indica*، این قارچ در ظروف پتری در محیط Hill & Käfer کشت شد. پلیت‌ها به مدت ۲ هفته در محفظه رشد با دمای ۱±۲۹ درجه سلسیوس در تاریکی قرار گرفتند. یک تکه از قارچ به قطر ۱۰ میلی‌متر در عمق ۱ سانتی‌متری زیر بذر کاهو قرار داده شد. قارچ‌های میکوریزا (*G. intraradices*) از گروه خاک‌شناسی دانشگاه تبریز تهیه شد مایع تلقیح قارچ‌های یاد شده در قسمت پایین ریشه قرار داده شد و بین مایع تلقیح و ریشه گیاه یک لایه خاک وجود داشت (۱۵). برای تلقیح آن، این قارچ با خاک گلدان به صورت یکنواخت مخلوط شد و سپس بذر کاشته شد قارچ همزیست *G. intradises* از گروه خاکشناسی دانشگاه تبریز و قارچ *P. indica* در آزمایشگاه دانشگاه محقق اردبیلی از طریق محیط کشت هیل تهیه گردید. در این آزمایش برای تهیه محلول غذایی از فرمولاسیون هوگلند تغییریافته استفاده گردید (۱۶). حجم محلول غذایی برای آبیاری هر گیاه در هر گلدان ۴۰۰–۲۰۰ میلی‌لیتر در روز بود.

تعیین مقدار کروم: مقدار کروم در اندام‌های هوایی کاهو به روش جذب اتمی تعیین شد. برای تهیه عصاره نمونه‌ها، نیم‌گرم از وزن خشک ماده گیاهی را به روش هضم خشک عصاره‌گیری شد. سپس با دستگاه جذب اتمی (Jena AAS) تعیین گردید.

اندازه‌گیری درصد همزیستی: در پایان آزمایش برخی از بخش‌های ریشه جدا شدند، برای تعیین کلونیزاسیون، ریشه‌ها در اتانول ۵۰ درصد قرار گرفتند. برای رنگ‌آمیزی و بررسی کلونیزاسیون ریشه چندین قطعه نازک از ریشه اصلی گیاه انتخاب و با آب شسته شد و نمونه‌های ریشه را به مدت ۵ دقیقه در محلول هیدروکسید پتاسیم ۱۰ درصد قرار داده شد و در ادامه در محلول اسید رقیق ۱ درصد اسید کلریدریک قرار داده شدند؛ در نهایت از رنگ تریپان بلو ۲۰ درصد از قبل گرم شده به مدت ۵ دقیقه استفاده شد و درصد کلونیزاسیون ریشه با استفاده از خطوط متقاطع اندازه‌گیری شد. درصد همزیستی ریشه از طریق رابطه ۱ محاسبه گردید:

$$\text{درصد همریستی ریشه} = \frac{\text{تعداد نقاط دارای همزیستی قارچ}}{\text{تعداد کل نقاط}} \times ۱۰۰ \quad (۱)$$

اندازه‌گیری وزن خشک اندام هوایی و ریشه و تعداد برگ: دو ماه پس از انتقال دانهال به گلدان، گیاه از گلدان خارج و به اندام هوایی و ریشه تقسیم گردید. سپس این اندام‌ها در پاکت قرار گرفته و در آون در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شد در نهایت وزن خشک آن‌ها با ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۰۱ ثبت شد. تعداد برگ کاهو از طریق شمارش تعداد برگ به دست آمد.

اندازه‌گیری کلروفیل *a*، *b* و کارتنوئید: اندازه‌گیری محتوای کلروفیل *a*، *b* و کارتنوئید برگ با استفاده از روش (Arnon, 1949) انجام شد (۱۷). اندازه‌گیری کلروفیل *a* و *b* و کارتنوئید به ترتیب در طول موج‌های ۶۶۳، ۶۴۶ و ۴۷۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر (Jenway 6705 UV/ VIS Spectrophotometer, England) قرائت انجام شد. محتوای کلروفیل *a* و *b* و کارتنوئید بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر محاسبه شد.

اندازه‌گیری هدایت روزنه‌ای: هدایت روزنه‌ای برگ توسط دستگاه پرومتر (SC-1, America) از برگ بالغ در روز آفتابی از ساعت ۹ تا ۱۱ انجام شد.

اندازه‌گیری درصد نشت الکترولیت: برای اندازه‌گیری درصد نشت الکترولیت تعداد دو برگ نسبتاً بالغ از هر بوته انتخاب و به تعداد ۱۲ عدد دیسک یکسان تهیه و در ۲۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه در داخل فالکون غوطه‌ور شدند. پس از ۲۴ ساعت نگهداری در تاریکی، هدایت الکتریکی نمونه‌ها توسط دستگاه هدایت‌سنج قرائت شد. سپس نمونه‌ها را به مدت ۲۰ دقیقه در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و هدایت الکتریکی آن‌ها دوباره پس از سرد شدن ثبت شد. درصد نشت الکترولیت از رابطه ۲ محاسبه گردید (۱۸).

$$EL(\%)=(EC0/EC1+EC1)\times 100 \quad (۲)$$

اندازه‌گیری پروتئین کل: برای سنجش پروتئین محلول از روش برادفورد (۱۹) استفاده شد. ۰/۱ گرم از بافت برگ در ۳ میلی‌لیتر بافر فسفات در هاون چینی بر روی یخ به طور کامل هموژنیزه شد. سپس به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره را با ۳ میلی‌لیتر معرف براد فورد مخلوط کرده و بعد از چند ثانیه ورتکس میزان جذب در طول موج ۵۹۵ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Jenway 6705 UV/ VIS Spectrophotometer, England) قرائت شد.

سنجش پراکسید هیدروژن (H_2O_2): مقدار پراکسید هیدروژن طبق واکنش پراکسید هیدروژن با یدید پتاسیم انجام گردید (۲۰). برای این منظور ۰/۲ گرم بافت تر گیاه در ۳ میلی‌لیتر تری کلرو استیک اسید سرد یک درصد (TCA) در هاون چینی بر روی یخ هموژنیزه شد. سپس در ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید سپس ۲ میلی‌لیتر یدید پتاسیم یک میلی‌مولار و ۵۰۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار (pH=۷) و ۵۰۰ میکرولیتر عصاره مخلوط گردیدند. محلول همگن به دست آمده به مدت یک ساعت در تاریکی در دمای اتاق نگهداری شد. سپس جذب

نمونه در طول موج ۳۹۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر (Jenway 6705 UV/ VIS Spectrophotometer, England) قرائت شد. غلظت پراکسید هیدروژن بر حسب میکرومول بر گرم وزن تر با استفاده از منحنی استاندارد تعیین شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز: برای این منظور ۹۰۰ میکرولیتر از محلول A (بافر فسفات، اسید اسکوربیک و EDTA) و ۹۰۰ میکرولیتر از محلول B (بافر فسفات و پراکسید هیدروژن) مخلوط شده و مخلوط حاصل بلانک (Blank) گردید. کووت مربوط به نمونه بلانک شامل همه اجزاء واکنشی به غیر از نمونه آنزیمی بود. سپس ۲۰۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی به کووت حاوی مخلوط واکنش A و B اضافه شده و جذب در طول موج ۲۹۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر (Jenway 6705 UV/ VIS Spectrophotometer, England) قرائت گردید پس از یک دقیقه توقف دوباره میزان جذب قرائت شده و اختلاف جذب محاسبه و عدد نهایی به‌صورت $Umin^{-1}mg\ pr$ گزارش گردید (۲۱).

اندازه‌گیری کاتالاز: برای اندازه‌گیری کاتالاز مقدار ۱/۹۱ میلی‌لیتر بافر فسفات، یک میلی‌لیتر پراکسید هیدروژن دو میلی‌مولار و ۲۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی (در دمای ۳۰ درجه در لوله آزمایش) مخلوط گردید. سپس ۳ دقیقه صبر کرده و بعد ۴ میلی‌لیتر معرف تیتانیوم اضافه شد بعد از ورتکس در ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ انجام شد سرانجام در طول موج ۴۲۰ نانومتر قرائت گردید (۲۲).

نتایج و بحث

کروم: نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد اثر ساده و متقابل تیمار کروم و قارچ‌های همزیست بر محتوای کروم برگ معنی‌دار بود (جدول ۱). به‌طوری‌که با افزایش غلظت کروم در محلول غذایی مقدار کروم برگ گیاه کاهو در تیمار بدون تلقیح افزایش یافت ولی تلقیح ریشه کاهو با قارچ همزیست توانست مقدار کروم برگ را کاهش دهد و بیش‌ترین تأثیر کاهش کروم مربوط به ترکیب قارچ همزیست *P. indica* و *G. intradises* بود. به‌طوری‌که در تیمار کروم ۳ میلی‌گرم در لیتر، مقدار کروم برگ در گیاهان غیرهمزیست در مقایسه با گیاهان همزیست با ترکیب تیمار قارچ *P. indica* و *G. intradises* در حدود ۲۴/۵ درصد بیش‌تر بود هم‌چنین در تیمار کروم ۱۵ میلی‌گرم در لیتر، مقدار کروم برگ در گیاهان غیرهمزیست در مقایسه با گیاهان همزیست‌شده با ترکیب تیمار قارچ *P. indica* و *G intradises* در حدود ۲۲/۷ درصد بیش‌تر بود (جدول ۲). براساس نتایج این مطالعه، قارچ‌های همزیست در تعدیل سمیت کروم نقش دارند و نتایج این پژوهش همسو با یافته‌های دیویس و همکاران (۲۰۰۲) بود که گزارش کردند قارچ میکوریز می‌تواند تا حدودی سمیت کروم را تعدیل نماید. گیاهان همزیست با قارچ میکوریز در مقایسه با گیاهان غیرهمزیست می‌تواند جذب عناصر با حلالیت کم مثل فسفر را افزایش دهد و مقاومت به بیماری، خشکی و سایر تنش‌های غیرزیستی را که در مکان‌های گیاه‌پالایی کروم وجود دارد را افزایش می‌دهد (۲۳).

جدول ۱- تجزیه واریانس تأثیر تیمار کروم و قارچ‌های همزیست بر صفات کاهو.

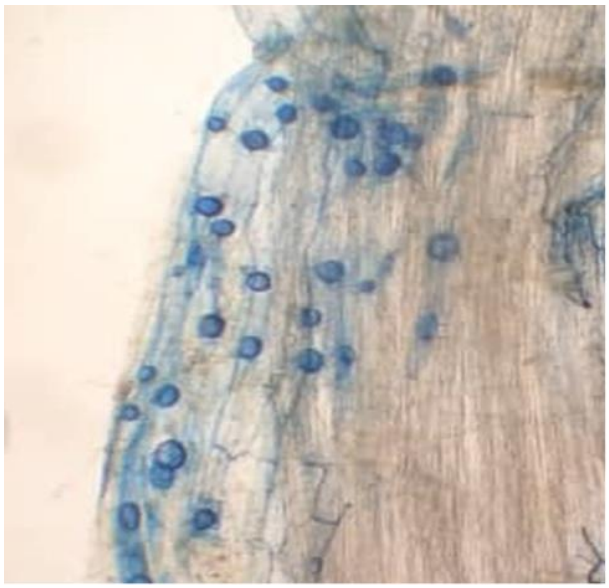
Table 1. Analysis of variance The effect of chromium and symbiotic fungi treatment on lettuce traits.

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	کروم Chromium	درصد همزیستی Colonization percentage	وزن خشک اندام هوایی Shoot dry weight parts	وزن خشک ریشه Root dry weight of roots	تعداد برگ Leaf number	کلروفیل a Chlorophyll *a*	کلروفیل b Chlorophyll *b*	کارتنوئید Carotenoids	هدایت روزنه‌ای Stomata enductance	نشت الکترولیت Electrolyte leakage	پروتئین محلول Soluble protein	آسکوربات پراکسیداز Ascorbate peroxidase	کاتالاز Catalase	پروکسید هیدروژن Hydrogen peroxide
کروم Chromium	2	4677.588**	660.437**	4.050**	0.211**	26.396^{ns}	0.218**	0.022**	0.016**	101.967**	36.150**	0.005**	0.789**	0.003**	0.001**
قارچ Fungus	3	284.125**	15743.187**	6.467**	0.091**	18.694^{ns}	0.297**	0.049**	0.051**	180.638**	28.022**	0.007**	0.081**	0.001*	0.000**
کروم × قارچ Chromium × fungus	6	250.253**	75.271**	0.136^{ns}	0.006^{ns}	2.674^{ns}	0.013*	0.008**	0.003*	8.785**	6.429**	0.000^{ns}	0.018**	0.00008^{ns}	6.374E-5**
خطا Error		7.538E29	13.507	0.631	0.011	8.750	0.006	0.001	0.001	2.081	1.889	0.001	0.005	0.0001	1.003E-5
ضریب تغییرات (درصد) C.V. (%)	36	17.32	6.7	11.2	5.8	9.6	17.2	12.9	10.9	4.6	5.9	9.6	15.74	8.71	9.94

**، *، ^{ns} به ترتیب معنی‌دار بودن و غیرمعنی‌دار بودن را در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد نشان می‌دهد

**, *, ^{ns} indicate significance and non-significance at 1 and 5% probability levels, respectively

درصد همزیستی ریشه: بر اساس نتایج تجزیه واریانس داده‌ها اثر ساده و متقابل تیمار کروم و قارچ‌های همزیست *P. indica* و *G. intradises* بر شاخص درصد همزیستی ریشه معنی‌دار بود (جدول ۱). نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بیش‌ترین درصد همزیستی مربوط به قارچ *P. indica* تحت غلظت شاهد کروم بود. اگرچه از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری بین *P. indica* و *G. intradises* و اثر ترکیبی آن‌ها وجود نداشت ولی درصد همزیستی همه قارچ‌ها با افزایش غلظت کروم در محلول غذایی کاهش یافت به‌طوری‌که کم‌ترین درصد همزیستی (۶۲/۲ درصد) در ریشه کاهو مربوط به تیمار قارچ *G. intradises* تحت غلظت ۱۵ میلی‌گرم در لیتر کروم بود. بیش‌ترین درصد همزیستی مربوط به قارچ همزیست *P. indica* و تیمار بدون کروم بود (جدول ۲). همان‌طور که در شکل ۱ نشان داده شده است قارچ‌های همزیست *P. indica* با ریشه کاهو رابطه همزیستی ایجاد می‌کند. کروم باعث کاهش درصد همزیستی قارچ با ریشه کاهو شد. این قارچ با برقراری رابطه همزیستی با گیاهان میزبان و از طریق افزایش جذب عناصر معدنی توسط ریشه به عنوان یک قارچ محرک رشد گیاه شناخته می‌شود (۲۴). در پژوهشی که روی گیاه آفتابگردان (۱۵) در شرایط آلودگی با فلز سنگین سرب و همزیستی با قارچ میکوریز صورت گرفت نتایج نشان داد که با افزایش غلظت فلز سنگین، درصد کلونیزاسیون ریشه کاهش پیدا می‌کند که با نتایج این پژوهش همخوانی دارد. صدمه به گیاه در اثر سمیت کروم موجب کاهش سنتز کربوهیدرات می‌شود و گیاه قادر به تامین کربوهیدرات کافی برای قارچ‌های همزیست نمی‌شود (۲۵). احتمال می‌رود یکی از دلایل کاهش درصد کلونیزاسیون، صدمه گیاه ناشی از غلظت زیاد کروم در خاک باشد که نتیجه آن می‌تواند منجر به کاهش کربوهیدرات در گیاه و کاهش درصد همزیستی باشد.



شکل ۱- همزیستی قارچ پریفورموسپورا ایندیکا با ریشه کاهو.

Fig. 1. Symbiosis of *P. indica* fungus with lettuce root.

وزن خشک اندام هوایی و ریشه و تعداد برگ: نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۱) نشان می‌دهد که اثر ساده تیمار کروم و قارچ‌های همزیست بر وزن خشک اندام هوایی و ریشه معنی‌دار گردید. جدول مقایسه میانگین داده‌ها نشان می‌دهد (جدول ۴) با افزایش غلظت کروم در محلول غذایی از صفر به ۱۵ میلی‌گرم بر لیتر وزن خشک اندام هوایی و ریشه کاهش یافت و تلقیح ریشه کاهو با قارچ‌های *P. indica* و *G. intradises* باعث افزایش وزن خشک اندام هوایی و ریشه شد (جدول ۵). بر اساس نتایج تجزیه واریانس داده‌ها تعداد برگ متأثر از اثر ساده کروم و اثر متقابل تیمار کروم و قارچ‌های همزیست قرار نگرفت. طبق نتایج به دست آمده تعداد برگ در کاهوهای تلقیح شده با قارچ همزیست بیش‌تر از گیاهان بدون تلقیح بود (جدول ۵). اثر سمی کروم در رشد و نمو گیاهان شامل تغییر در رشد ریشه، ساقه و برگ گیاهان است که بر وزن خشک محصول اثر می‌گذارد (۲۶). کاهش زیست‌توده هوایی به‌دلیل کاهش رشد ریشه‌ها و به دنبال آن کاهش انتقال آب و مواد معدنی از ریشه‌ها به بخش‌های هوایی گیاه می‌باشد. کاهش بیومس گیاه به خاطر تغییر در متابولیسم نیتروژن و کربوهیدرات، کاهش سنتز پروتئین و واکنش‌های فتوسنتزی تحت تنش کروم گزارش شده است (۲۷). پژوهش انجام شده توسط سوبراهمانیام (۲۸) نشان داد که غلظت‌های سمی کروم به‌طور معنی‌داری وزن خشک بخش‌های مختلف گیاه را کاهش داده و کاهش وزن خشک بخش‌های هوایی نسبت به ریشه‌ها بیش‌تر است که با نتایج به‌دست آمده در این پژوهش مطابقت دارد (۲۸). استفاده از قارچ‌های همزیست *P. indica* و *G. intradises* اثرات منفی سمیت کروم را بر این صفات کاهش داد. یکی از ویژگی‌های مهم قارچ *P. indica* این است که رشد را در اکثر گیاهان همزیست افزایش می‌دهد. به‌طوری‌که تلقیح گیاه کلم چینی (۲۹) و ذرت (۳۰) با این قارچ موجب افزایش در مقدار وزن تر و خشک گردید. گیاهانی که با قارچ *P. indica* تیمار شده‌اند، میزان اکسین بیش‌تری نسبت به شاهد دارند. هورمون سیتوکینین تولید شده توسط قارچ نیز موجب رشد جوانه‌های جانبی و به‌دنبال آن افزایش وزن تر و خشک اندام هوایی می‌شود (۳۱) به احتمال زیاد کاربرد قارچ همزیست در گیاه از طریق افزایش سرعت رشد، تخصیص و انتقال مواد غذایی بین ریشه و ساقه موجب افزایش جذب و انتقال عناصر معدنی و به موازات آن وزن خشک گیاه افزایش می‌یابد. نتایج این آزمایش، با نتایج برخی از پژوهش‌گران در مطالعه روی گیاه یونجه (۳۲) مبنی بر افزایش وزن خشک گیاه در همزیستی میکوریزی مطابقت داشت.

محتوای کلروفیل *a*، *b* و کارتنوئید: جدول ۱ نشان می‌دهد که اثر ساده و متقابل کلروفیل *a*، *b* و کارتنوئید متأثر از تیمار کروم و قارچ *P. indica* و *G. intradises* قرار گرفت. براساس مقایسه میانگین داده‌ها، سمیت کروم باعث کاهش رنگیزه‌های فتوسنتزی شد بیش‌ترین محتوای کلروفیل *a*، *b* در کاهوهای تغذیه شده با غلظت صفر میلی‌گرم در لیتر کروم و تلقیح شده با ترکیب قارچ‌های همزیست *P. indica* و *G. intradises* به‌دست آمد در حالی‌که کم‌ترین محتوای کلروفیل *a*، *b* و کارتنوئید در کاهوهای تغذیه شده با ۱۵ میلی‌گرم در لیتر کروم و تلقیح نشده با قارچ همزیست حاصل شد (جدول ۲). یافته‌های پژوهش فوق با نتایج بسیاری از پژوهش‌گران در بررسی اثر کروم بر محتوای رنگدانه‌های فتوسنتزی در گیاهان گندم (۲۸) و جعفری (۳۳) مطابقت دارد. مقدار بالای کروم با کاهش فعالیت آنزیم δ-آمینولوولونیک اسید دهیدراتاز از اتصال منیزیم به مولکول پروتوپورفیرین جلوگیری

می‌کند، درنتیجه محتوای رنگدانه‌های کلروفیل کاهش می‌یابد (۳۴). کاروتنوئیدها نقش اساسی در حفاظت نوری کلروفیل در مقابل آسیب‌های اکسیداسیون نوری بوسیله کاهش گونه‌های اکسیژن فعال در چرخه گزانتوفیل دارند (۳۵). محتوای کلروفیل در گیاهان همزیست با میکوریز نسبت به گیاهان شاهد بیش‌تر است و این به دلیل افزایش جذب آب و عناصر معدنی به‌ویژه نیتروژن و منیزیم در گیاهان همزیست نسبت به شاهد است. قارچ‌های پیریفورموسپورا و تریکودرما در تلقیح با ماش سبز موجب افزایش کلروفیل *b*، *a* و *a+b* نسبت به گیاهان عدم تلقیح شدند (۳۶).

جدول ۲- مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت‌های مختلف کروم و قارچ همزیست روی رشد و خصوصیات فیزیولوژیکی کاهو.

Table 2. Comparison of the mean of interaction effects of different concentrations of chromium and symbiotic fungi on growth and physiological properties of lettuce.

کروم Chromium ($mg\ L^{-1}$)	قارچ همزیست Symbiosis fungi	کروم Chromium ($mg\ kg^{-1}$ DW)	درصد همزیستی ریشه (درصد) Root coloniation	کلروفیل *a* ($mg\ g^{-1}FW$) Chlorophyll *a*	کلروفیل *b* ($mg\ g^{-1}FW$) Chlorophyll *b*	کارتنوئید ($mg\ g^{-1}FW$) Carotenoid
0	شاهد	0 ^{e}	0 ^{e}	0.296 ^{de}	0.204 ^{de}	0.243 ^{cd}
	P. indica	0 ^{e}	82.2 ^{a}	0.560 ^{bc}	0.257 ^{b}	0.295 ^{b}
	Mycoriza	0 ^{e}	78.5 ^{ab}	0.550 ^{bc}	0.228 ^{bcd}	0.291 ^{bc}
	P. indica× Mycoriza	0 ^{e}	81.0 ^{a}	0.780 ^{a}	0.399 ^{a}	0.420 ^{a}
3	شاهد	4.40 ^{d}	0^{e}	0.242 ^{de}	0.186 ^{e}	0.219 ^{d}
	P. indica	3.31 ^{d}	73.0 ^{bc}	0.549 ^{bc}	0.255 ^{bc}	0.292 ^{bc}
	Mycoriza	3.60 ^{d}	72.5 ^{c}	0.465 ^{c}	0.220 ^{cde}	0.288 ^{bc}
	P. indica× Mycoriza	3.32 ^{d}	74.0 ^{bc}	0.662 ^{b}	0.375 ^{a}	0.406 ^{a}
15	شاهد	25.19 ^{a}	0 ^{e}	0.204 ^{e}	0.140 ^{f}	0.196 ^{d}
	P. indica	21.27 ^{b}	64.0 ^{d}	0.331 ^{d}	0.250 ^{bc}	0.232 ^{d}
	Mycoriza	22.46 ^{b}	62.2 ^{d}	0.297 ^{de}	0.210 ^{de}	0.280 ^{bc}
	P. indica× Mycoriza	19.53 ^{c}	64.2 ^{d}	0.446 ^{c}	0.209 ^{de}	0.302 ^{b}

میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد بر اساس آزمون چنددامنه‌ای دانکن می‌باشند

Means with at least one similar letter have no significant difference at 5% of probability level based on Duncan's multiple range test

هدایت روزنه‌ای برگ: بر اساس نتایج تجزیه واریانس داده‌ها هدایت روزنه‌ای برگ به‌طور معنی‌داری متأثر از اثر ساده و متقابل غلظت‌های مختلف کروم و قارچ همزیست *P. indica* و *G. intradises* قرار گرفت (جدول ۱). به طوری که با افزایش غلظت کروم در محلول غذایی هدایت روزنه‌ای برگ کاهش نشان داد و این کاهش در غلظت ۱۵ میلی‌گرم در لیتر کروم شدیدتر بود. اما با کاربرد قارچ *P. indica* و *G. intradises* از اثرات منفی سمیت کروم کاسته شد و هدایت روزنه‌ای برگ افزایش یافت. گیاهانی که با قارچ همزیست کلونیزه شده بودند هدایت روزنه‌ای برگ بیش‌تری نسبت به گیاهان عدم تیمار با قارچ همزیست تحت غلظت‌های ۳ و ۱۵ میلی‌گرم در لیتر کروم داشتند (جدول ۳).

کروم سبب مهار انتقال آب از ریشه به اندام هوایی می‌گردد. ظرفیت بالای اکسیداتیو کروم شش ظرفیتی سبب تخریب غشاء سلول‌های نگهبان روزنه می‌گردد و از این طریق باعث افزایش شدت تعرق و افزایش هدایت روزنه‌ای و اتلاف آب موجود در گیاه می‌گردد (۳۷) در صورت متحمل بودن گیاه به فلزات سنگین، گیاه می‌تواند با اعمال سازوکارهای دفاعی از تخریب غشا سلول‌های نگهبان جلوگیری نموده و یا از طریق کاهش هدایت روزنه‌ای و کاهش تعرق در اتلاف آب کنترل بیش‌تری اعمال نماید. در غلظت‌های بالای کروم (۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر) گیاه توانست میزان تعرق و هدایت روزنه‌ای را کاهش داده تا کارایی لحظه‌ای مصرف آب را تنظیم نموده و اثرات ثانویه ناشی از تنش کروم را تا حدودی جبران نماید (۳۸) کاهش هدایت روزنه‌ای میزان دسترسی سلول‌های فتوسنتزکننده را به دی اکسید کربن را کاهش می‌دهد که برآیند آن عدم تامین متابولیت‌های مورد نیاز برای رشد و نمو سلول‌های گیاهی است (۵). قارچ میکوریز با تسهیل جذب آب از طریق گسترش ریزوسفر گیاه، حفظ هدایت روزنه‌ای و تورژسانس سلول و بهبود جذب عناصر معدنی باعث بهبود وضعیت رطوبتی گیاه شده و منجر به کاهش اثرات مضر تنش‌ها می‌شود (۳۹).

درصد نشت الکترولیت: نتایج جدول ۱ نشان می‌دهد که اثر ساده و متقابل تیمار کروم و قارچ *P. indica* و *G. intradises* درصد نشت الکترولیت برگ را به‌طور معنی‌داری تحت‌تأثیر قرار داد. براساس نتایج مقایسه میانگین داده‌ها با تشدید تنش کروم، درصد نشت الکترولیت برگ کاهو افزایش یافت. به‌طوری‌که در سمیت کروم ۱۵ میلی‌گرم در لیتر نشت الکترولیت در حدود ۲۸ درصد نسبت به گیاهان شاهد بدون کروم کاهش نشان داد. از طرفی بررسی اثر ترکیبی تیمار کروم و قارچ‌های همزیست بیانگر آن است که تلقیح با قارچ‌های همزیست توانست درصد نشت الکترولیت را کاهش دهد (جدول ۳). کاربرد قارچ‌های همزیست *G. intradises* و *P. indica* و اثر ترکیبی آن‌ها توانست اثرات سمی کروم بر نشت الکترولیت را کاهش دهد. نفوذپذیری غشای پلاسمایی به الکترولیت‌ها در گیاهان همزیست با مایکوریزا بسیار کم‌تر از گیاهان بدون میکوریز است. افزایش ثبات غشا به‌واسطه قارچ‌های میکوریز به افزایش جذب فسفر، کلسیم، پتاسیم و افزایش تولید آنتی‌اکسیدانت‌ها نسبت داده شده است (۴۰). در پژوهشی که بر روی گیاه نعناع فلفلی صورت گرفت، نتایج بیانگر این بود که همزیستی با قارچ باعث بهبود پایداری غشاء در این گیاه شد (۴۱) که با نتایج حاصل از این پژوهش مطابقت دارد. 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 (۴۲).

پروتئین محلول: پروتئین محلول متأثر از اثر ساده تیمار کروم و قارچ *P. indica* و *G. intradises* قرار گرفت (جدول ۱) به طوری که با افزایش غلظت کروم در محلول غذایی پروتئین محلول برگ کاهش یافت. مقدار پروتئین محلول در تیمار شاهد کروم در حدود ۱۱/۵ درصد بیش‌تر از کروم ۱۵ میلی‌گرم بر لیتر بود (جدول ۴). محتوای پروتئین محلول در قارچ‌های همزیست با میکوریز نسبت به تیمار بدون همزیست ۱۸/۳ درصد افزایش نشان داد (جدول ۵). بهاردواج و همکاران (۴۳) گزارش کردند که محتوای پروتئین‌های محلول با افزایش غلظت فلز سنگین سرب و کادمیوم به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. گزارش شده است که کاهش در محتوای پروتئین در غلظت‌های بالای فلز کروم می‌تواند احتمالاً به علت کاهش در سنتز بعضی پروتئین‌ها و یا افزایش فعالیت آنزیم‌های پروتئولیتیک و تولید گونه‌های فعال اکسیژن باشد. در گیاه خرفه افزایش میزان پروتئین‌های آنزیمی

مانند آنزیم‌های آنتی اکسیدان و افزایش اسمولیت‌ها در سلول‌های گیاهی، از کاهش شدید میزان پروتئین در شرایط تنش کروم جلوگیری نمود و از این طریق اثرات تخریبی ناشی از تنش کروم را به حداقل رساند همزیستی با قارچ‌های مختلف میکوریز باعث افزایش معنی‌دار در میزان پروتئین محلول در برگ‌های گیاه شاهتوت درشرایط بدون تنش شد (۴۴).

محتوای پراکسید هیدروژن: نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۱) نشان می‌دهد که اثر ساده و متقابل کروم و قارچ‌های همزیست بر تجمع پراکسید هیدروژن معنی‌دار بود. تنش کروم باعث افزایش معنی‌دار در فعالیت پراکسید هیدروژن برگ گیاهان تلقیح شده با قارچ شد و در بین قارچ‌های همزیست، قارچ *P. indica* بیش‌ترین تأثیر را در کاهش تولید پراکسید هیدروژن داشت. با تشدید تنش کروم مقدار تولید پراکسید هیدروژن در گیاهان غیرهمزیست در مقایسه با گیاهان همزیست با قارچ بیش‌تر بود (جدول ۳). پراکسید هیدروژن در فرایندهای حیاتی سلول نقش دارد که در کلروپلاست، میتوکندری و پراکسی زوم تولید می‌شود و در مقادیر زیاد برای سلول سمی بوده و تنش اکسیداتیو ایجاد می‌کند. مقدار پراکسید هیدروژن یکی از شاخص‌های مهم در ارزیابی شدت تنش در گیاه می‌باشد. در شرایط تنش فلزات سنگین مقدار پراکسید هیدروژن بیش‌تر می‌شود (۲۸).

آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی اسکوربات پراکسیداز و کاتالاز: نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۱) نشان می‌دهد. تیمار کروم و قارچ *P. indica* و *G. intradises* بر فعالیت آنزیم‌های اسکوربات پراکسیداز و کاتالاز تأثیر معنی‌داری داشت. همان‌طور که از جدول ۲ مشاهده می‌شود، فعالیت آنزیم اسکوربات پراکسیداز در گیاهان شاهد کروم و در تلقیح و بدون تلقیح قارچ همزیست از نظر آماری اختلاف معنی‌داری از هم نداشتند. در حالی که فعالیت این آنزیم در تنش کروم شدید (۱۵ میلی‌گرم بر لیتر) و در کاهوهای تلقیح شده با *P. indica* و ترکیب *P. indica* و *G. intradises* در مقایسه با کاهوهای بدون تلقیح با قارچ بیش‌تر بود. فعالیت آسکوربات پراکسیداز برگ در گیاهان تیمار شده با کروم ۱۵ میلی‌گرم بر لیتر محلول غذایی و در تلقیح با *P. indica* در حدود ۲۴/۲ درصد بیش‌تر از گیاهان بدون تلقیح با قارچ همزیست بود (جدول ۳). براساس نتایج تجزیه واریانس داده‌ها، فعالیت آنزیم کاتالاز فقط متأثر از اثرات ساده کروم و قارچ‌های همزیست قرار گرفت به این صورت که فعالیت آنزیم در گیاهان تغذیه شده با غلظت ۱۵ میلی‌گرم در لیتر بیش‌تر از تیمار شاهد و ۳ میلی‌گرم در لیتر بود (جدول ۴). هم‌چنین کروم می‌تواند سبب تغییر کلروپلاست و ساختمان غشا، پراکسیداسیون لیپیدهای غشا و کاهش فعالیت آسکوربات پراکسیداز در گیاهان شود (۴۵) تنش کروم باعث افزایش در فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز و کاتالاز در گیاه گندم شد که می‌تواند دلیلی بر افزایش رادیکال‌های آزاد تحت تنش کروم باشد (۴۶). قارچ‌های همزیست در شرایط مختلف از طریق سازوکارهای متفاوت بر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان گیاهان اثر می‌گذارد. مطابق با نتایج این پژوهش، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان با افزایش غلظت کروم در گیاه سویا نیز بیش‌تر شد (۴۷). هم‌چنین یافته‌های مالار و همکاران (۴۸) نشان دادند که فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و پراکسیداز در بافت‌های برگ و ریشه گیاه *Eichhornia crassipes* تحت تیمار با سرب افزایش یافت. ترکیبات آنتی‌اکسیدان موجب حذف گونه‌های فعال اکسیژن در بخش‌های مختلف سلول گیاهی می‌شوند. در نتیجه، تعادل بین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدان‌ها و محتوای گونه‌های فعال اکسیژن برای حفظ رشد طبیعی گیاه لازم است (۴۹).

جدول ۳- مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت‌های مختلف کروم و قارچ همزیست روی رشد و خصوصیات فیزیولوژیکی کاهو.

Table 3. Comparison of the mean of interaction effects of different concentrations of chromium and symbiotic fungi on growth and physiological properties of lettuce.

آسکوربات پراکسیداز (Umin^{-1}mg pr) Ascorbate peroxidase	پراکسید هیدروژن (U min $^{-1}$ mg pro) Hydrogen peroxide	نشت الکترولیت (درصد) Electrolyte leakage	هدایت روزنه‌ای (mmol m^{-2} s^{-1}) Stomatal conductance	قارچ همزیست Symbiosis fungi	کروم Chromium (mg L^{-1})
0.212 ^{d}	0.095 ^{e}	21.72 ^{bc}	28.975 ^{ef}	شاهد	0
0.270 ^{cd}	0.088 ^{j}	21.37 ^{c}	39.525 ^{a}	*P. indica*	
0.269 ^{cd}	0.094 ^{e}	21.42 ^{c}	33.450 ^{bc}	Mycoriza	
0.296^{cd}	0.094 ^{e}	21.57 ^{c}	32.300^{bcd}	*P. indica*× Mycoriza	
0.320 ^{cd}	0.101 ^{c}	26.27 ^{a}	27.850 ^{f}	شاهد	3
0.380 ^{c}	0.095 ^{e}	23.07 ^{bc}	34.075 ^{b}	*P. indica*	
0.314 ^{cd}	0.100 ^{c}	21.93 ^{bc}	31.775 ^{d}	Mycoriza	
0.548 ^{b}	0.097 ^{cd}	22.95 ^{bc}	29.025 ^{ef}	*P. indica*× Mycoriza	
0.583 ^{b}	0.122 ^{a}	28.22 ^{a}	22.200 ^{g}	شاهد	15
0.814 ^{a}	0.107 ^{b}	23.92 ^{b}	33.075 ^{bcd}	*P. indica*	
0.587 ^{b}	0.107 ^{b}	22.48 ^{bc}	30.950 ^{de}	Mycoriza	
0.793 ^{a}	0.105 ^{bc}	23.20 ^{bc}	27.900 ^{f}	*P. indica*× Mycoriza	

میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد بر اساس آزمون چنددامنه‌ای دانکن می‌باشند

Means with at least one similar letter have no significant difference at 5% of probability level based on Duncan's multiple range test

جدول ۴- مقایسه میانگین اثر ساده غلظت‌های مختلف کروم بر خصوصیات کاهو.

Table 4. Comparison of the mean simple effect of different concentrations of chromium on lettuce properties.

کاتالاز Catalase (U min^{-1} mg pr)	پروتئین Protein (mg g^{-1} FW)	تعداد برگ Leaf number	وزن خشک ریشه (گرم) Root dry weight (g)	وزن خشک اندام هوایی (گرم) Dry weight of shoot (g)	کروم (mg l^{-1})
0.102^{b}	0.347^{a}	31.94 ^{a}	1.88 ^{a}	7.49 ^{a}	0
0.113^{b}	0.327^{b}	30.81 ^{a}	1.83 ^{a}	7.23 ^{a}	3
0.128 ^{a}	0.311 ^{b}	29.38 ^{a}	1.66 ^{b}	6.52 ^{b}	15

میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد بر اساس آزمون چنددامنه‌ای دانکن می‌باشند

Means with at least one similar letter have no significant difference at 5% of probability level based on Duncan's multiple range test

جدول ۵- مقایسه میانگین اثر ساده قارچ‌های همزیست بر خصوصیات کاهو.

Table 5. Comparison of the mean simple effect of symbiotic fungi on lettuce properties.

کاتالاز Catalase (U min^{-1} mg pr)	پروتئین Protein (mg g^{-1} FW)	تعداد برگ Leaf number	وزن خشک ریشه (گرم) Root dry weight (g)	وزن خشک اندام هوایی (گرم) Dry weight of shoot (g)	قارچ همزیست Fungus coexist
0.104 b	0.295 b	29.25 a	1.70 b	6.03 b	شاهد
0.106b	0.344a	31.17 a	1.87 a	7.72 a	*P. indica*
0.123 a	0.349 a	32.17 a	1.86 a	7.21 a	Mycoriza
0.125 a	0.326 a	30.25 a	1.75 b	7.37 a	*P. indica*× Mycoriza

میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد بر اساس آزمون چنددامنه‌ای دانکن می‌باشند

Means with at least one similar letter have no significant difference at 5% of probability level based on Duncan's multiple range test

نتیجه‌گیری کلی

نتایج پژوهش نشان داد که کروم در محلول غذایی باعث کاهش معنی‌دار در خصوصیات رشدی و فیزیولوژیکی کاهو شد. اثرات سمی کروم در غلظت ۱۵ میلی‌گرم در لیتر محلول غذایی نسبت به غلظت ۳ میلی‌گرم در لیتر محلول غذایی شدیدتر بود. قارچ‌های همزیست مثل *P. indica* و *G. intradises* باعث بهبود در رشد کاهو شد هم‌چنین توانست خصوصیات فیزیولوژیکی و زیست‌شیمیایی کاهو را تحت تنش کروم بهبود بخشد. اثرات سمی کروم روی خصوصیات ریخت‌شناسی قابل‌توجه نبود که این می‌تواند به دلیل مقاومت بیش‌تر کاهوهای برگ قرمز به شرایط تنش باشد.

منابع

1. Jordao, C. P., Nascentes, C. C., Fontes, R. L. F., Cecon, P. R. & Pereira, J. L. (2007). Effects of composted urban solid wastes addition on yield and metal contents of lettuce. *J. Braz. Chem. Soc.* 18, 195-204.
2. Gao, Y. Z. & Zhu, L. Z. (2005). Phytoremediation for phenanthrene and pyrene contaminated soils. *J. Environ. Sci-Amsterdam.* 17, 14-18.
3. Kuo, S., Lai, M. S. & Lin, C. W. (2006). Influence of solution acidity and $CaCl_2$ concentration on the removal of heavy metals from metal-contaminated rice soils. *Environ. Pollut.* 144, 918-925.
4. Ashraf, A., Bibi, I., Niazi, N. K., Ok, Y. S., Murtaza, G., Shahid, M., Kunhikrishnan, A., Li, D. & Mahmood, T. (2017). Chromium (VI) sorption efficiency of acid-activated banana peel over organo-montmorillonite in aqueous solutions. *Int. J. Phytoremediation*. 19, 605-613.
5. Shamsu, H., Gulshan, K., Mohammad, I., Arif, S. H., Bhumi, N. & Aqil, A. (2012). Physiological changes induced by chromium stress in plants: an overview. *Protoplasma*. 249, 599-611.
6. Jianmin, T., Jingyi, X., Yongsheng, W., Yansheng, L. & Qian, T. (2012). Effects of high concentration of chromium stress on physiological and biochemical characters and accumulation of chromium in tea plant (*Camellia sinensis* L.). *Afr. J. Biotech.* 11 (9), 2248-2255.
7. Varma, A., Sativa, S., Sahay, N., Butehorn, B. & Franken, P. (1998). *Piriformospora indica*, a cultivable plant growth-promoting root endophyte. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2741-2744.

8.Wu, Q. S., Zou, Y. N., Liu, W., Ye, X. F., Zai, H. F. & Zhao, L. J. (2010). Alleviation of salt stress in citrus seedlings inoculated with mycorrhiza: changes in leaf antioxidant defense systems. *Plant Soil Environ.* 56, 470-475.
9.Gholami, A., Khalvandi, M., Amerian, M., Pirdashti, H. & Baradaran, M. (2017). Effects of *Piriformospora indica* fungi symbiotic on the quantity of essential oil and some physiological parameters of peppermint in saline conditions. *Iran J. Plant Biol.* 32, 1-20. [In Persian]
10.Smith, S. E. & Read, D. J. (2008). Mycorrhizal Symbiosis. 3rd ed. San Diego, CA: Academic Press, 787p.
11.Rasooli Sadeghiani, M., Vahedi, R. & Brin, M. (2018). Effect of rhizosphere on soil element availability in the presence of biochar and compost, pruning wastes and mycorrhizal inoculation. *J. Soil Manag. Sustain. Prod.* 8 (1), 107-124.
12.Becerril, F. R., Calantzis Turnau, C., Caussanel, J. P., Belimov, A. A., Gianinazzi, S., Strasser, R. J. & Pearson, V. G. (2002). Cadmium accumulation and buffering of cadmium industed stress by arbuscular mycorrhiza in three *Pisum sativum* L. genotypes. *J. Exp. Bot.* 53, 1177-1185.
13.Heydarian, A., Tawhidi Moghaddam, H. & Kasraei, P. (2017). Evaluation of the effect of *Glomus intraradices* on quantitative and qualitative characteristics of wheat under nickel stress conditions. Iran. *Crop Sci.* 48 (3), 685-693.
14.Gonzalez-Guerrero, M., Alcon-Aguilar, C., Mooney, M., Balderas, A., MacDiarmid, C. W., Edie, D. J. & Ferrol, N. (2005). Characterization of a Gloms intraradices gene encoding a putative Zn transporter of the cation diffusion facilitator family. *Fungal Genet. Biol.* 42 (2), 130-140.
15.Daneshfar, A., Asgharzadeh, N., Ostan, Sh. & Khoshrou, B. (2018). The role of Rhizophagus irregularis in modulating lead uptake by sunflower. *Agric. Knowl. Sustain. Prod.* 28 (1), 27-50.
16.Hoagland, D. R. & Arnon, D. S. (1950). The water culture method for growing plants without soil. California Agriculture Experimental Station Circular. 374, 1-32.
17.Arnon, D. (1949). Copper Enzymes in Isolated Chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* 24 (1), 1-15.
18.Errsus, S. & Barrett, D. (2010). Determination of membrane integrity in onion tissues treated by pulsed electric fields: Use of microscopic images and ion leakage measurements. *Innov. Food Sci. Emer. Technol.* 11 (14), 598-603.
19.Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
20.Sergiev, I., Alexieva, V. & Karanov, E. (1997). Effect of spermine, atrazine and combination between them on some endogenous protective systems and stress markers in plants. Comptes Rendus de l'Academie Bulgare des Sciences, 51, 121-124.
21.Nakano, Y. & Asada, K. (1987). Purification of ascorbate peroxidase in Spinach chloroplasts; its inactivation in Ascorbate-depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical. *Plant Cell Physiol.* 28 (1), 131-140.
22.Gong, M., Li, Y., Dai, X. & Tian, M. 1997. Involvement of calcium and calmodulin in the acquisition of HS induced thermotolerance in maize seeding, *J. Plant Physiol.* 150, 615-621.
23.Davies, F. T., Puryear, J. D., Newton, R. J., Egilla, J. N. & Grossi, J. A. S. (2002). Mycorrhizal fungi increase chromium uptake by sunflower plants: influence on tissue mineral concentration, growth, and gas exchange. *J. Plant Nutr.* 25, 2389-2407.
24.Varma, A., Fekete, A., Srivastava, A., Saxena, A. K., Frommberger, M., Li, D., Gschwendter, S., Sheramati, I., Oelmueller, R., Kopplin, P. S., Tripathi, S. & Hartmann, A. (2012). Inhibitory interactions of rhizobacteria with the symbiotic fungus *Piriformospora indica*. In: Varma, A., Oelmueller, R. (eds.) Sebacinales. Springer, Berlin.

34.Bera, A. K., Kanta-Bokaria, A. K. & Bokaria, K. (1999). Effect of tannery effluent on seed germination, seedling growth and chloroplast pigment content in mungbean (*Vigna radiate* L. Wilczek), *Environ. Ecol.* 17, 958-961.
35.Behera, R. K. & Mishra, P. C. (2002). High Irradiance and water stress induce alterations in pigment composition and chloroplast activities of primary wheat leaves. *J. Plant. Physiol.* 159, 967-973.
36.Salimi Tamalla, N., Seraj, F., Pirdashti, H. & 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 (26), 7-78. [In Persian]
37.Arun, K. S., Cervantes, C., Herminia, L. T. & Avudainayagamd, S. (2005). Chromium toxicity in plants. *Environ. Int.* 31, 739-753.
38.Castro, R. O., Trujillo, M. M., Bucio, J. L., Cervantes, C. & Dubrovsky, J. (2007). Effects of dichromate on growth and root system architecture of *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Sci.* 172, 684-691.
39.Kumar, A., Sharma, S., Mishra, S. & Dames, J. F. (2015). Arbuscular mycorrhizal inoculation improves growth and antioxidative response of *Jatropha curcas* (L.) under Na_2SO_4 salt stress. *Plant Bio System.* 149, 260-269.
40.Feng, G., Zhang, F. S., Li, X., Tian, C. Y., Tang, C. & Rengel, Z. (2002). Improved tolerance of maize plants to salt stress by arbuscular mycorrhiza is related to higher accumulation of soluble sugars in roots. *Mycorrhiza*. 12, 185-190.
41.Pirdashti, H., Khalondi, M., Amerian, M., Firoozabadi Brothers, M. & Gholami, A. (2017). Interaction of *Piriformospora indica* with Mentha piperita on the quantity and quality of essential oil and some physiological parameters under salinity stress. *Plant Proc. Func.* 6 (21), 161-184. [In Persian]
25.Pal, P., McMillan, A. M. S. & Saggar, S. (2016). Pathways of dicyandiamide uptake in pasture plants: A laboratory study. *Biol. Fertil. Soils.* 52, 539-546.
26.Shanker, A. K., Cervantes, C., Loza-Tavera, H. & Avudainayagam, S. (2005). Chromium toxicity in plants. *Environ. Int.* 31, 739-753.
27.Sharma, D. C., Shrama, C. P. & Tripathi, R. D. (2003). Phyto-toxic lesions of chromium in maize, *Chemosphere*, 51, 63-68.
28.Subrahamamyam, D. (2008). Effects of chromium toxicity on leaf photosynthetic characteristics and oxidative changes in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Photosynthetica*. 46 (3), 339-345.
29.Sun, C., Johnson, J. M., Cai, D., Sherameti, I., Oelmuller, R. & 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, 1009-1017.
30.Kumar, M., Yadav, V., Tuteja, N. & Johri, A. K. (2009). Antioxidant enzyme activities in maize plants colonized with *Piriformospora indica*. *Microbiol*. 155, 780-790.
31.Kari Dolatabadi, H., Mohammadi Gol Tapeh, E., Moeini, A. & Verma, A. (2012). Evaluation of the effect of concentration of auxin and fungi Piriformospora indica and Sebacina vermifera the peppermint (*Mentha piperita*) and thyme (*Thymus vulgaris*) in vitro. *JMP*. 2 (9), 13-22.
32.Karami, A. & Zarea, M. J. (2014). Physiological and nutritional response of inoculated alfalfa (*Medicago sativa*. cv. hamedani) with the fungus Piriformospora indica and bacterium *Azospirillum* spp. under salt stress. *J. Crop Prod.* 7 (1), 109-129. [In Persian]
33.Zakir, A., Lahouti, M., Silk Chi, P. & Ijtihad, H. (2005). The effect of Cr^{3+} and Cr^{6+} accumulation on growth and chlorophyll content in parsley (*Petroselinum crispum*) *J. Biol.* 18, 101-109.

42. Azari, A., Modares Sanavi, S.A.M., Askari, H., Ghanati, F., Naji, A.M. & 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]
43. Bhardwaj, P., Chaturvedi, A. K. & Prasad, P. (2009). Effect of enhanced lead and cadmium in soil on physiological and biochemical attributes of *Phaseolus vulgaris* L. *Nat. Sci.* 7, 63-75.
44. Shi, S. M., Chen, K. & Gao, Y. (2016). Arbuscular mycorrhizal fungus species dependency governs better plant physiological characteristics and leaf quality of mulberry (*Morus alba* L.) seedlings. *Front. Microbiol.* 7, 1030.
45. Olutoyosi, A., Ndakidemi, P., Snyman, R. & Odendaal, J. (2012). Assessment of metal concentrations, chlorophyll content and photosynthesis in Phragmites australis along the Lower Diep river, CapeTown, south Africa. *Energy Environ. Sci.* 2 (1), 128-139.
46. Shafi, M., Bakht, J., Hassan, M. J., Raziuddin, M. & Zhang, G. (2009). Effect of cadmium and salinity stresses on growth and antioxidant enzyme activities of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 82, 772-776.
47. Sundarmoorthy, P., Sankarganesh, K., Selvaraj, M., Baskaran, L. & Chidambaram, A. A. (2015). Chromium induced changes in soybean (*Glycine max* L.) metabolism. W*orld Scientific News.* 10, 145-178.
48. Malar, S., Vikram, S. S., Favas, P. J. & Perumal, V. (2016). Lead heavy metal toxicity induced changes on growth and antioxidative enzymes level in water hyacinths [*Eichhornia crassipes* (Mart.)]. *Bot. stud.* 55 (1), 1-11.
49. Molassiotis, A., Satipoulos, T., Tanou, G., Diamantidis, G. & Therios, I. (2005). Boron-induced oxidative damage and antioxidant and uncleolytic responses in shoot tips culture of apple rootstock EM9 (*Malus domestica* Borkh.). *Environ. Exp. Bot.* 56, 54-62.