Research Article

Agricultural Engineering., 46(2) (2023) 159-177

ISSN (P): 2588-526X

DOI: 10.22055/AGEN.2023.44266.1678

ISSN (E): 2588-5944

# Effect of *Claroideoglomus etunicatum* inoculation on nickel phytoremediation and uptake of some micronutrients by maize (*Zea mays* L.)

M. Hemmati Tabar[1], S. Amanifar[2,*], E. Vatankhah[3] and E. Malekzadeh[4]

1. Former M.Sc., Student Department. of Soil Science Engineering, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Znjan, Iran
2. Assistant Professor, Department. of Soil Science Engineering, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Znjan, Iran
3. Assistant Professor, Department. of Biology, Faculty of Science, University of Zanjan, Znjan, Iran
4. Assistant Professor, Department. of Soil Science Engineering, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

Received: 15 July 2023 Accepted: 18 September 2023 *Corresponding Author: amanifar@znu.ac.ir

## Abstract

**Introduction:** Nickel (Ni) is a fundamental micronutrient in plants but hampers plant growth and metabolism at elevated levels in the soil. Ni toxicity to plants is manifested mainly by the decrease in germination efficiency, the inhibition of growth and root branching, damage to the photosynthetic apparatus, and the induction of oxidative stress. In recent years, the use of arbuscular mycorrhiza (AM) has gained importance for its role in enabling plants to tolerate Ni toxicity. However, information about their effectiveness in alleviating Ni stress is scanty. The process of element transport in plants may be assumed to be different among heavy metal concentrations in the substrate. Consequently, whether AM fungi enhance the metal transport to shoots (phytoextraction) or immobilize them in the roots (phytostabilization) mainly depends on metal concentration in the substrate. Moreover, Ni has been reported to compete with other micronutrients for absorption sites, which would trigger different changes of elements concentrations. The aim of this study was to investigate the role of AM fungus in alleviating Ni stress and its possible function in plant nutrition.

**Materials and Methods:** In this study, the effects of mycorrhizal inoculation of maize with *Claroideoglomus etunicatum* on alleviation of Ni impact on plant were evaluated. Some growth characteristics of the plant, phosphorus content, micronutrients (iron, zinc, and copper) and Ni concentration in shoot and root, and Bradford reactive soil glomalin (BRSG) were assessed. Accordingly, a two-factor experiment (AM inoculation × Ni levels) in completely randomized design was done. The factors included the different concentrations of nickel (control (Ni0), 50 (Ni50), 100 (Ni100) and 250 (Ni250) mg $kg^{-1}$), and arbuscular mycorrhiza inoculation (control without inoculation (NM) and inoculation with *C. etunicatum* (AM)). Plants were grown in the greenhouse for 90 days and then the growth parameters were recorded. The concentration of phosphorus was measured spectrophotometrically and the concentration of iron, zinc, copper, and nickel in digested plant samples was determined by ICP-OES. Bio-concentration factor and translocation factor were also calculated. The colorimetric method was used to quantify Bradford-

© 2023 The Author(s). Published by Shahid Chamran University of Ahvaz. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

reactive soil glomalin. The Bradford protein assay was utilized to determine the concentration of easily extractable and total Bradford-reactive soil glomalin using bovine serum albumin (BSA) as a standard.

**Results and Discussion:** Increasing the nickel concentration in soil decreased the dry weight of root and shoot, and this decrease was significant in both inoculated and non-inoculated plants at Ni250 treatment ($p \leq 0.05$). Plants inoculated with AM fungus showed significantly higher height and dry weight of shoots than plants without inoculation ($p \leq 0.05$), but the effect of mycorrhizal inoculation on the dry weight of roots was not statistically significant. The effect of nickel on the colonization percentage of roots and easily extractable Bradford-reactive soil glomalin (EE-BRSG) was significant. EE-BRSG was higher at all levels of nickel in inoculated plants than in non-inoculated ones. Moreover, with the increase of nickel concentration in soil up to 100 mg $Kg^{-1}$, total Bradford reactive soil glomalin (T-BRSG) increased. The concentration of phosphorus in the shoots and roots of inoculated plants was higher than in non-inoculated plants. Mycorrhizal inoculation significantly increased the concentration of zinc and copper in the aerial part. Moreover, nickel treatment did not show a statistically significant effect on the concentration of copper in the aerial part and iron in the roots. Inoculation with AM fungus showed a significant impact on the nickel concentration of the shoots and roots, and the concentration of nickel in the roots of inoculated plants at Ni250 level was significantly higher than plants without inoculation by 29% ($p<0.05$). Mycorrhizal plants had lower nickel concentrations in the aerial part at Ni100 and Ni250 by 30% and 33% respectively, compared to the NM plants. The translocation factors in inoculated plants at Ni100 and Ni250 levels were significantly lower than that in non-inoculated plants, which indicates the role of fungi in preventing the transfer of nickel to the aerial parts and its accumulation in the roots. Moreover, inoculated plants in the Ni100 and Ni250 treatments showed a significantly lower bio-concentration factor by 36% and 22%, respectively, compared to non-inoculated plants.

**Conclusion:** The results showed that AM colonization of *Zea mays* plant can help to reduce the toxicity of nickel by increasing plant growth and uptake of phosphorus, zinc and copper. AM colonization had a prominent impact in preventing the nickel transfer to the aerial parts and its accumulation in the roots. It seems that AM fungi can be used for phytostabilization of heavy metals in soils.

***Keywords: Bradford-reactive soil glomalin, micronutrients, nickel toxicity, arbuscular mycorrhizal fungi***

مهندسی زراعی (مجله علمی کشاورزی) جلد ۴۶ شماره۲، تابستان ۱۴۰۲

مقاله پژوهشی

# اثر مایه‌زنی با قارچ *Claroideoglomus etunicatum* بر گیاه‌پالایی نیکل و جذب برخی عناصر ریزمغذی توسط گیاه ذرت (*Zea mays* L.)

مروارید همتی‌تبار[۱]، ستاره امانی‌فر[۲*]، الهه وطن‌خواه[۳] و الهام ملک‌زاده[۴]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد گروه مهندسی علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران
۲- استادیار گروه مهندسی علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران
۳- استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران
۴- استادیار گروه مهندسی علوم خاک، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

**تاریخچه مقاله**

(دریافت: ۱۴۰۲/۰۴/۲۴

پذیرش نهایی: ۱۴۰۲/۰۶/۲۷

***کلمات کلیدی:***

***عناصر ریزمغذی،***

***سمیت نیکل،***

***گلومالین واکنش‌پذیر بردفورد،***

***میکوریزا آربوسکولار***

* عهده دار مکاتبات

Email: amanifar@znu.ac.ir

**چکیده**

**استفاده از قارچ‌های میکوریزا آربوسکولار به دلیل نقش آن‌ها در توانمندسازی گیاهان برای مقاومت در برابر سمیت نیکل اهمیت دارد. در این مطالعه اثر مایه‌زنی گیاه ذرت با قارچ *Claroideoglomus etunicatum* بر ویژگی‌های رشدی، غلظت فسفر، نیکل و برخی عناصر ریزمغذی و محتوای گلومالین خاک-واکنش‌پذیر بردفورد (BRSG) در سطوح مختلف نیکل خاک ارزیابی شد. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا شد. عامل اول شامل سطوح مختلف کاربرد نیکل (شاهد، ۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰ میلی‌گرم نیکل بر کیلوگرم خاک) و عامل دوم شامل سطوح کاربرد قارچ میکوریزا آربوسکولار (شاهد بدون مایه‌زنی و مایه‌زنی شده با *C. etunicatum*) بود. گیاهان مایه‌زنی شده ارتفاع بوته و وزن خشک بخش هوایی بیشتری را نسبت به گیاهان بدون مایه‌زنی نشان دادند. BRSG ساده قابل استخراج (EE-BRSG) در تمام سطوح نیکل بطور معنی‌داری در گیاهان مایه‌زنی شده بیشتر از بدون مایه‌زنی بود. در تیمار Ni100، BRSG کل (T-BRSG) به‌میزان ۱۵/۸ درصد نسبت به سطح شاهد نیکل افزایش نشان داد. همچنین اثر مایه‌زنی میکوریزی بر غلظت فسفر، روی و مس بخش هوایی افزایشی و معنی‌دار بود. غلظت نیکل در بخش هوایی گیاهان مایه‌زنی شده در تیمارهای Ni100 و Ni250 به‌ترتیب به‌میزان ۳۰ و ۳۳ درصد کمتر از گیاهان بدون مایه‌زنی بود. فاکتور انتقال در گیاهان مایه‌زنی شده در همه سطوح به‌جز سطح Ni50 بطور معنی‌داری کمتر از گیاهان بدون مایه‌زنی بود. این مطالعه پتانسیل همزیستی میکوریزا آربوسکولار را در راستای فناوری تثبیت گیاهی نشان می‌دهد و بهره‌برداری از این قارچ‌ها می‌تواند در تثبیت گیاهی نیکل در خاک‌هایی با آلودگی زیاد و در سطح وسیع موثر باشد.**

## مقدمه

نیکل در غلظت کم (۰/۰۵-۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن خشک) به عنوان یک عنصر ضروری برای رشد و نمو گیاه در نظر گرفته می‌شود، در حالی‌که در غلظت‌های بالا برای گیاهان سمی می‌شود. کمبود نیکل باعث کاهش رشد، پیری و اختلال در جذب نیتروژن و آهن در گیاهان می‌شود. نیکل همچنین نقش مهمی در سنتز فیتوالکسین‌ها و پاسخ گیاهان به انواع مختلف تنش دارد (۱۸). با این حال، بیش‌بود نیکل در گیاهان در مقایسه با کمبود آن محتمل‌تر است (۱). بیش‌بود نیکل با اثرات نامطلوب زیادی در گیاهان مانند کاهش جوانه‌زنی، رشد گیاه، تقسیم سلولی، تولید زیست توده، جذب مواد مغذی، فتوسنتز، کلروز برگ، تعرق و نکروز برگ همراه است (۴۸). سمیت نیکل منجر به کاهش فعالیت آنزیم‌های غشائی می‌شود و در عملکرد غشاء اختلال ایجاد می‌کند (۴۲). در حضور نیکل، غلظت عناصر در اندام‌های گیاهی ممکن است افزایش یا کاهش یابد یا اثر نیکل بر جذب آن‌ها بی‌تأثیر باشد. کاهش جذب عناصر ریزمغذی در شرایط بیش‌بود نیکل ممکن است به دلیل رقابت کاتیون $Ni^{2+}$ با عناصر غذایی با شعاع یونی مشابه $Ni^{2+}$ باشد. چنین مکانیسمی برای کاهش جذب $Mg^{2+}$، $Fe^{2+}$ و $Zn^{2+}$ در حضور $Ni^{2+}$ پیشنهاد شده است (۴۷).

در میان راهکارهایی که برای پاکسازی خاک‌های آلوده به فلزات سنگین بکار می‌رود زیست‌پالایی[1] با توجه به راندمان بالا و مقرون به‌صرفه بودن بسیار مورد توجه قرار گرفته است (۳۱). در میان روش‌های مختلف زیست‌پالایی، قارچ‌پالایی[2] با قارچ‌های میکوریزا آربوسکولار[3] (AM) به دلیل توانایی آن در افزایش سطح ریشه به عنوان روشی مؤثر در نظر گرفته می‌شود و کلنیزاسیون میکوریزی ممکن است جذب فلزهای سنگین را توسط گیاهان تسهیل کند (۷). ارتباط ریشه‌های گیاه با قارچ‌های AM فراگیرترین ارتباط همزیستی در طبیعت است که در آن همزیست قارچی مواد مغذی را برای میزبان خود فراهم می‌کند و در مقابل گیاهان منابع کربن را برای قارچ‌های AM فراهم می‌کنند. همزیستی با قارچ‌های AM غالبا موجب کاهش تنش فلزات سنگین در گیاهان می‌شود (۷). برخی از راهکارهای اتخاذ شده توسط قارچ‌های AM در کاهش سمیت فلزات سنگین و تأثیر بر جذب و تجمع آنها عبارتند از افزایش زیست توده (که منجر به رقیق شدن ماده سمی می‌شود)، تقویت سیستم آنتی‌اکسیدانی و القای تولید متابولیت‌های تیول درگیر در غیرپویایی فلزات (۱۶). همچنین کلاته شدن و غیرپویا شدن فلزات سنگین در میسیلیوم‌های خارجی، بهبود تغذیه معدنی به‌ویژه فسفر و تنظیم بیان ژن ناقل‌های فلزی از سایر سازوکارهایی است که قارچ‌های AM برای کاهش تنش فلزات سنگین برای گیاهان میزبان اعمال می‌کنند (۱۰). علاوه بر این بیان شده است که در بسترهای آلوده که جذب عناصرغذایی و رشد گیاه ممکن است کم شود، قارچ‌های AM، گیاهان را برای استفاده از مکان های جدید برای جذب عناصر غذایی توانمند می‌سازند (۴۹). قارچ‌های AM بر فراهمی زیستی فلزات سنگین در محیط ریشه گیاه میزبان تاثیر می‌گذارند و غالبا با غیرپویا کردن آنها در سیستم ریشه انتقالشان به اندام هوایی را کاهش می‌دهند و به این ترتیب اثرات ویژه‌ای بر جذب فلزات سنگین توسط گیاهان از خاک و همین‌طور انتقال آن‌ها به اندام‌های هوایی دارند (۲۸). اگرچه برخی پژوهشگران افزایش تجمع فلزات سنگین را نیز در گیاهان همزیست با قارچ AM نشان داده‌اند (۳۲). بنابراین به نظر می‌رسد کارایی این همزیستی در جذب و انتقال فلزات سنگین به نوع و غلظت فراهم فلز، گونه گیاه، گونه اکوتیپ قارچ و شرایط محیطی بستگی دارد (۲۰، ۴۱).

1- Bioremediation
2- Mycoremediation
3- Arbuscular Mycorrhiza

پژوهشگران کاهش تنش اکسیداتیو و افزایش میزان رشد در گیاه مایه‌زنی شده با قارچ AM را در خاک‌های آلوده به نیکل گزارش کرده‌اند (۴۸). پژوهشگران طی مطالعاتی که انجام دادند افزایش مقاومت و رشد گیاه و همین‌طور تجمع نیکل در ریشه و ممانعت از انتقال نیکل به اندام‌های هوایی در گیاه *Colosphospermom mopane* مایه‌زنی شده با قارچ AM را در خاک‌های آلوده به نیکل گزارش کرده‌اند (۳۳). همچنین افزایش میزان رشد گیاه *Cajanus cajan* مایه‌زنی شده با قارچ *Rhizoglomus intraradices* و کاهش انتقال نیکل به بخش هوایی و تجمع آن در ریشه گیاهان میکوریزی در خاک‌های آلوده به نیکل گزارش شده است (۴۵). پژوهشگران طی مطالعاتی که روی صفات مورفولوژیک و محتوای عناصر ریز و درشت مغذی گیاه *Lavandula angustifolia* L. تلقیح شده با قارچ *Funneliformis mosseae* انجام دادند به این نتیجه رسیدند که در تیمارهای مایه‌زنی شده با قارچ اشاره شده صفاتی نظیر ارتفاع بوته، تعداد شاخه، وزن تر و خشک ریشه و اندام‌های هوایی گیاه در خاک‌های آلوده به نیکل و سرب افزایش می‌یابد (۳۹). برخی پژوهشگران اظهار داشته‌اند فرآیند جذب و انتقال عناصر در گیاهان ممکن است در غلظت‌های مختلف فلز سنگین در بستر رشد متفاوت باشد. در نتیجه اینکه آیا قارچ‌های AM انتقال فلز سنگین را به بخش هوایی افزایش می‌دهند یا در ریشه‌ها تثبیت می‌کنند (تثبیت گیاهی) به غلظت فلز سنگین در بستر رشد نیز بستگی دارد (۲۰). علاوه بر این گزارش شده است که فلزات سنگین از جمله نیکل با سایر عناصر برای مکان‌های جذب در ریشه رقابت می‌کند که باعث تغییرات متفاوتی در غلظت عناصر می‌شود (۳۹). بدین منظور در پژوهش حاضر ویژگی‌های رشدی ذرت و محتوای نیکل و برخی عناصر غذایی تحت سطوح مختلف نیکل در گیاهان مایه‌زنی شده با قارچ *Claroideoglomus etunicatum* و بدون مایه‌زنی مورد بررسی قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

خاک برای کشت گلدانی از عمق صفر تا ۲۵ سانتی‌متری جمع‌آوری شد. پس از هوا خشک کردن و گذراندن خاک از الک دو میلیمتری، ویژگی‌های مهم خاک با روش‌های استاندارد آزمایشگاهی اندازه‌گیری شد (۵). بافت خاک لوم شنی (به روش هیدرومتری) با pH ۷/۷ (در عصاره گل اشباع)، شوری ۱/۱ دسی‌زیمنس بر متر (در عصاره گل اشباع)، کربن آلی ۹ گرم بر کیلوگرم (به روش والکلی بلک)، کربنات کلسیم معادل ۲۱/۳ درصد (به روش خنثی سازی با اسیدکلریدریک)، فسفر قابل دسترس ۱۳/۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم (به روش اولسن) و پتاسیم ۲۴۷ میلی‌گرم بر کیلوگرم (به روش روش استات آمونیم) بود. خاک جمع‌آوری شده از الک ۵ میلی‌متری عبور داده شد و در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس به مدت ۲ ساعت برای حذف گونه‌های قارچ AM بومی احتمالی اتوکلاو شد. خاک‌ها با مقادیر صفر، ۵۰ ، ۱۰۰ و ۲۵۰ میلی‌گرم نیکل بر کیلوگرم (از منبع سولفات نیکل ($NiSO_4(H_2O)_6$)) تیمار شدند. برای اطمینان از توزیع یکنواخت نیکل در خاک، خاک تیمار شده به مدت ۱۰ هفته با اعمال دوره‌های تر و خشک شدن متوالی در دمای ۲۰-۲۵ درجه سلسیوس خوابانده شد. همچنین در پایان دوره خوابانیدن غلظت نیکل قابل جذب خاک (قابل استخراج با DTPA (DTPA-TEA-$CaCl_2$، pH = 7.3)) با استفاده از دستگاه ICP-OES اندازه‌گیری شد که به ترتیب برابر با ۱/۴، ۱۲/۴، ۲۳/۹ و ۴۵/۱ میلی‌گرم نیکل بر کیلوگرم خاک در سطوح صفر، ۵۰ ، ۱۰۰ و ۲۵۰ میلی‌گرم نیکل اضافه شده به‌ازای هر کیلوگرم خاک بود.

آزمایش گلخانه‌ای به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا شد. عامل اول شامل سطوح مختلف کاربرد نیکل (صفر (Ni0)، ۵۰ (Ni50)، ۱۰۰ (Ni100) و ۲۵۰ (Ni250) میلی‌گرم نیکل بر کیلوگرم خاک) و عامل دوم شامل سطوح

کاربرد قارچ AM (شاهد بدون مایه‌زنی (NM) و مایه-زنی شده با *C. etunicatum* (AM) بود.

مایه تلقیح قارچ *Claroideoglomus etunicatum* شامل مخلوطی از خاک ریزوسفری با اسپور (دارای ۱۵ اسپور در گرم مایه تلقیح)، هیف و قطعات ریشه بود. تلقیح قارچ AM به میزان ۲۰۰ گرم به ازای هر گلدان صورت گرفت و به همان میزان مایه تلقیح اتوکلاو شده به گلدان‌های بدون تلقیح اضافه شد.

سه کیلوگرم خاک به هر گلدان پلاستیکی (قطر ۲۰ سانتی‌متر و ارتفاع ۲۵ سانتی‌متر) اضافه شد. بذرهای ذرت علوفه‌ای پس از ضدعفونی سطحی با هیپوکلریت سدیم یک درصد به مدت ۱۵ دقیقه و سپس چندین بار شستشو با آب مقطر، برای جوانه‌زنی در سینی نشاء کاشته شدند. چهار روز پس از جوانه‌زنی دو گیاهچه که دارای رشد یکنواخت بودند انتخاب و در هر گلدان کاشته شدند. برای حفظ ۸۰ درصد ظرفیت نگهداری آب خاک از آب مقطر استفاده شد. پس از طی سه ماه برداشت گیاه انجام شد و ارتفاع بوته با متر اندازه‌گیری شد. زیست‌توده تر در دمای ۷۰ درجه سلسیوس تا رسیدن به وزن ثابت خشک شد و سپس توزین گردید. ریشه‌ها و بخش هوایی خشک شده ذرت آسیاب شده و هضم نمونه‌ها به روش هضم تر با استفاده از اسید نیتریک غلیظ (۶۵٪) و آب اکسیژنه ۳۰٪ انجام شد. میزان فسفر با روش رنگ-سنجی وانادات-مولیبدات اندازه‌گیری شد (۸). علاوه بر این، غلظت آهن، روی، مس و نیکل در نمونه‌های گیاهی با دستگاه ICP-OES در عصاره حاصل از هضم تعیین شد. فاکتور تغلیظ زیستی و فاکتور انتقال با استفاده از رابطه‌های زیر محاسبه شد (۵۰) :

$$\text{فاکتور تغلیظ زیستی (BCF)} = \frac{\text{غلظت نیکل در بخش هوایی } (\mathrm{mg\,kg^{-1}})}{\text{غلظت نیکل در خاک } (\mathrm{mg\,kg^{-1}}).}$$

$$\text{فاکتور انتقال (TF)} = \frac{\text{غلظت نیکل در بخش هوایی گیاه } (\mathrm{mg\,kg^{-1}})}{\text{غلظت نیکل در ریشه گیاه } (\mathrm{mg\,kg^{-1}})}$$

جهت برآورد درصد کلنیزاسیون ریشه، حدود یک گرم از ریشه‌های ظریف و ریز از هر گلدان جدا و با استفاده از تریپان بلو (۰/۰۵ درصد) در لاکتوگلیسرول رنگ‌آمیزی شدند و درصد کلنیزاسیون با روش تقاطع خطوط شبکه محاسبه شد (۳۸). عصاره‌گیری گلومالین به روش بیان شده توسط روزیر و همکاران[1] (۴۳) انجام شد. از آن جایی که روش بردفورد به طور اختصاصی گلومالین را اندازه‌گیری نمی‌کند، پیشنهاد شده است که به جای گلومالین از گلومالین خاک-واکنش‌پذیر بردفورد[2] (BRSG) استفاده شود. برای عصاره‌گیری گلومالین ساده قابل استخراج- واکنش‌پذیر بردفورد (EE-BRSG) یک گرم خاک (عبور داده شده از الک ۲ میلی‌متری) را داخل لوله سانتریفیوژ قرارداده و ۸ میلی‌لیتر محلول سیترات سدیم ۲۰ میلی‌مولار با pH=۷ اضافه کرده و ۳۰ ثانیه ورتکس شد. سپس به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس اتوکلاو گردید، سپس با دور ۵۰۰۰ در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد. محلول صاف رویی جهت اندازه‌گیری با دستگاه اسپکتروفتومتر برداشته شد. این استخراج ممکن است شامل گلومالین به تازگی تولید شده باشد. برای گلومالین کل-واکنش‌پذیر بردفورد (T-BRSG) ۸ میلی‌لیتر سیترات سدیم ۵۰ میلی‌مولار با pH=۸ به یک گرم خاک (همان نمونه خاک از مرحله قبلی) اضافه شده و سپس در سیکل‌های پیوسته اتوکلاو به مدت ۱ ساعت در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس استخراج شد و فرآیند استخراج تا زمانی ادامه یافت که مایع رویی به رنگ شفاف/زرد روشن درآمد. پس از هربار اتوکلاو مایع رویی با سانتریفیوژ در با دور ۵۰۰۰ در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه جدا و فیلتر شد. مقدار گلومالین موجود در عصاره صاف با استفاده از روش بردفورد (۴) و استانداردهای آلبومین سرم گاوی (صفر، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰

1- Rosier *et al.*
2- Bradford reactive soil glomalin (BRSG)

میکروگرم بر میلی‌لیتر) در طول موج ۵۹۵ نانومتر اندازه گیری شد (۱۱).

برای تجزیه و تحلیل آماری از نرم افزارهای SPSS و Excel استفاده شد. آزمون نرمال بودن توزیع داده‌ها و سپس تحلیل واریانس و مقایسه میانگین آنها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۳ انجام شد. تحلیل واریانس دوطرفه (سطوح نیکل × مایه‌زنی میکوریزآربوسکولار) و مقایسه میانگین چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد برای مقایسه تفاوت بین تیمارها در کلیه پارامترهای اندازه‌گیری شده مورد استفاده قرار گرفت ولی بررسی آماری درصد کلنیزاسیون ریشه‌ها با استفاده از تحلیل واریانس یک‌طرفه (اثر سطوح نیکل) صورت گرفت.

## نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس نشان دهنده اثر معنی‌دار محتوای نیکل خاک بر وزن خشک بخش هوایی، ریشه-ها و ارتفاع بوته‌های ذرت بود (جدول ۱). مایه‌زنی با قارچ *C. etunicatum* اثر معنی‌داری بر وزن خشک ریشه‌های ذرت نشان نداد ولی در سطح احتمال ۰/۰۱ بر وزن خشک بخش هوایی و ارتفاع بوته‌ها معنی‌دار بود. همچنین اثر متقابل سطوح نیکل و قارچ میکوریزی فقط بر ارتفاع بوته‌ها در سطح احتمال ۰/۰۵ معنی‌دار بود (جدول ۱). وزن خشک بخش هوایی گیاهان مایه‌زنی شده در تمام سطوح نیکل بطور معنی‌داری بیشتر از گیاهان شاهد بدون مایه‌زنی بود (شکل ۱- A). در گیاهان بدون مایه‌زنی با افزایش سطح نیکل به ۱۰۰ میلی-گرم بر کیلوگرم خاک وزن خشک ریشه‌ها بطور معنی-داری کاهش یافت، ولی کاهش مشاهده شده در مقایسه با تیمار Ni250 معنی‌دار نبود (شکل ۱-B).

با افزایش سطح نیکل به ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک، ارتفاع بوته‌ها بطور معنی‌داری در گیاهان مایه‌زنی شده کاهش یافت (شکل ۱-C). در گیاهان بدون مایه-زنی کاهش ارتفاع بوته‌ها فقط در Ni250 معنی‌دار بود. گیاهان مایه‌زنی شده در سطوح شاهد، Ni50 و Ni250 ارتفاع بوته بیشتری نسبت به گیاهان بدون مایه‌زنی نشان دادند ولی تفاوت مشاهده شده فقط در تیمار Ni250 معنی‌دار بود (شکل ۱-C). در پژوهش حاضر تأثیر منفی سمیت نیکل به شکل کاهش زیست‌توده گیاهی مشاهده شد. اثرات منفی نیکل بر زیست‌توده گیاهی توسط پژوهشگران گزارش شده است (۲۵). اثرات نامطلوب غلظت بالای نیکل بر رشد ریشه می‌تواند به دلیل تأخیر در تقسیم سلولی و تغییر میتوز در ناحیه رأس ریشه باشد (۲۴) که بطور مشابه در سویا و عدس (۲۱) و گوجه فرنگی (۲۹) گزارش شده است. کاهش عملکرد بخش هوایی با کاربرد نیکل در ذرت نیز گزارش شده است (۳۵). تغییر فرآیندهای اصلی فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی سلول‌های گیاهی، به عنوان مثال فعالیت‌های فتوسنتزی و تعرق برگ، محتوای کلروفیل برگ، اختلال در نفوذپذیری غشاء و اختلال در جذب عناصر غذایی در شرایط سمیت نیکل گزارش شده است که می‌تواند عملکرد گیاه را کاهش دهد (۳۵).

در پژوهش حاضر وزن خشک بخش هوایی در گیاهان میکوریزی نسبت به گیاهان بدون مایه‌زنی بیشتر بود (شکل۱-A). به‌طور کلی به نظر می‌رسد که گیاهان میکوریزی شانس بیشتری برای بقا و رشد در خاک‌های آلوده به فلزات سنگین نسبت به گیاهان غیرمیکوریزی دارند. گیاهان میکوریزی به دلیل شبکه گسترده هیف-های خارج ریشه‌ای، تماس بیشتری با توده خاک دارند که می‌تواند حجم بیشتری از خاک را که در غیاب همزیست برای ریشه در دسترس نیست، آشکار سازد و جذب عناصر را بهبود بخشد (۱۳).

**جدول(۱) تجزیه واریانس (مقادیر F محاسبه شده) اثر سطوح نیکل و مایه‌زنی قارچ *C. etunicatum* و برهمکنش آن‌ها بر ویژگی‌های مطالعه شده در خاک و گیاه.**

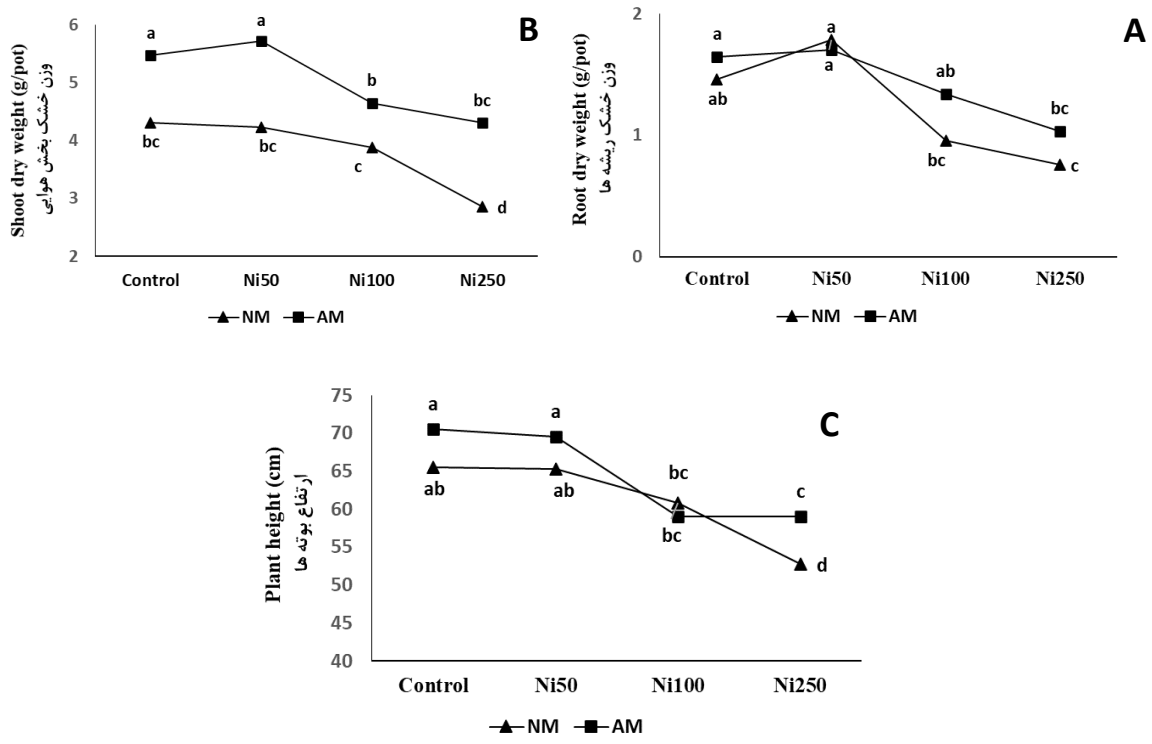
**Table (1) Analysis of variance (F values) on the effects of nickel levels and *C. etunicatum* inoculation, and their interaction on the studied characteristics in soil and plant.**

| Source of Variance منابع تغییر | Shoot dry weight وزن خشک بخش هوایی | Root dry weight وزن خشک ریشه | Plant height ارتفاع بوته | Shoot P فسفر بخش هوایی | Root P فسفر ریشه | Shoot Ni نیکل بخش هوایی | Root Ni نیکل ریشه | Root colonization کلنیزاسیون ریشه | T-BRSG گلومالین کل |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | F values مقادیر F | | | | | | | | |
| نیکل Ni | $12.04^{**}$ | $9.29^{**}$ | $22.59^{***}$ | $36.13^{***}$ | $5.73^{**}$ | $515.1^{***}$ | $3497.9^{***}$ | $5.65^{*}$ | $12.13^{***}$ |
| قارچ fungus | $19.24^{**}$ | $2.91^{ns}$ | $9.75^{**}$ | $8.52^{*}$ | $7.12^{*}$ | $84.1^{***}$ | $174.57^{***}$ | - | $0.543^{ns}$ |
| نیکل×قارچ Ni×Fungus | $1.17^{ns}$ | $0.526^{ns}$ | $3.44^{*}$ | $0.595^{ns}$ | $1.26^{ns}$ | $31.4^{***}$ | $93.37^{***}$ | - | $0.282^{ns}$ |

| Source of Variance منابع تغییر | EE-BRSG گلومالین به سهولت قابل استخراج | Transfer factor فاکتور انتقال | Bio-concentration Factor فاکتور تغلیظ زیستی | Shoot Zn روی بخش هوایی | Root Zn روی ریشه | Shoot Cu مس بخش هوایی | Root Cu مس ریشه | Shoot Fe آهن بخش هوایی | Root Fe آهن ریشه |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | F values مقادیر F | | | | | | | | |
| نیکل Ni | $32.1^{***}$ | $3921.7^{***}$ | $520.9^{***}$ | $10.9^{***}$ | $6.34^{**}$ | $2.92^{ns}$ | $4.76^{*}$ | $5.15^{*}$ | $0.608^{ns}$ |
| قارچ fungus | $356.4^{***}$ | $1709.6^{***}$ | $19.23^{***}$ | $22.2^{***}$ | $14.4^{**}$ | $13.22^{**}$ | $6.73^{*}$ | $0.58^{ns}$ | $3.91^{ns}$ |
| نیکل×قارچ Ni×Fungus | $4.73^{*}$ | $441.3^{***}$ | $4.64^{*}$ | $1.03^{ns}$ | $1.21^{ns}$ | $0.946^{ns}$ | $7.51^{**}$ | $1.25^{ns}$ | $0.72^{ns}$ |

$^{ns}$، $^{*}$، $^{**}$، $^{***}$ به ترتیب نشان‌دهنده غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۵، ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ می‌باشد.

$^{ns}$, $^{*}$, $^{**}$, $^{***}$ indicate non-significant and significant at 0.05, 0.01, 0.001 probability levels respectively.




**شکل (۱) اثر سطوح نیکل و مایه‌زنی قارچ میکوریزی بر وزن خشک بخش هوایی (A) و ریشه (B) و ارتفاع بوته‌ها (C). تیمار مایه‌زنی با قارچ میکوریزی و بدون مایه‌زنی به‌ترتیب با AM و NM مشخص شده است. حروف انگلیسی غیرمشابه نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۵ براساس آزمون چنددامنه‌ای دانکن می‌باشند.**

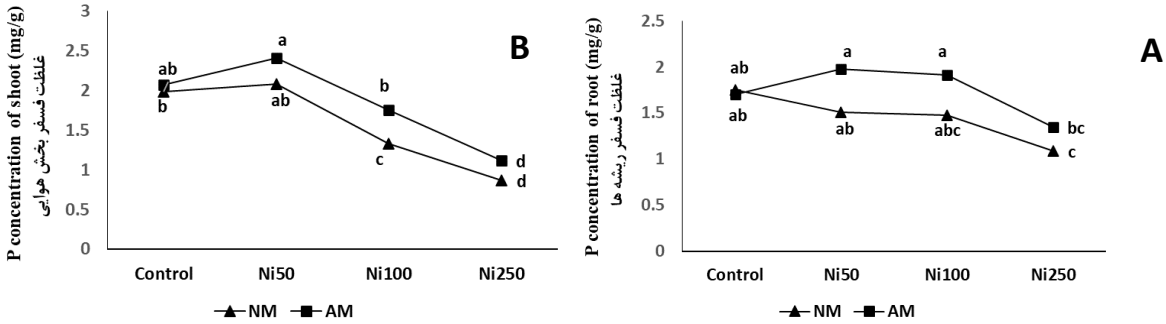
**Figure (1) Effect of nickel levels and mycorrhizal inoculation on the shoot (A) and root (B) dry weights and plant height (C). AM and NM are representing mycorrhizal inoculated and non-inoculated plants. Different letters indicate significant differences according to the Duncan's Multiple Range Test (P<0.05).**

اثر اصلی نیکل و مایه‌زنی قارچ AM بر غلظت فسفر بخش هوایی و ریشه‌ها به ترتیب در سطح احتمال ۰/۰۰۱ و ۰/۰۵ معنی‌دار بود. برهمکنش عامل‌های اصلی آزمایش بطور معنی‌داری غلظت فسفر ریشه و بخش هوایی را تحت تاثیر قرار نداد(جدول ۱). همان‌طور که در شکل ۲-B مشاهده می‌شود غلظت فسفر ریشه گیاهان مایه‌زنی شده در سطوح Ni50، Ni100 و Ni250 بیشتر از گیاهان بدون مایه‌زنی بود، اگرچه تفاوت مشاهده شده از نظر آماری معنی‌دار نبود. در مورد غلظت فسفر بخش هوایی نیز روند مشابهی دیده شد و تفاوت مشاهده شده میان گیاهان مایه‌زنی شده و بدون مایه‌زنی فقط در تیمار Ni100 معنی‌دار بود (شکل ۲-A). قارچ‌های AM در جذب فسفر کاملاً مؤثر هستند، زیرا هیف‌های آن‌ها در مقایسه با ریشه‌های گیاه سطح بیشتری در واحد حجم دارند و می‌توانند فسفر را به طور موثر به سلول‌های گیاه میزبان منتقل کنند (۱۳، ۱۹).

اثر نیکل بر درصد کلنیزاسیون ریشه‌ها معنی‌دار بود ($p\leq0.05$) (جدول ۱) و در تیمار Ni250 کاهش معنی‌داری در کلنیزاسیون ریشه‌ها مشاهده شد (شکل ۳-A). همچنین اثر نیکل ($p\leq0.001$)، کلنیزاسیون قارچی ($p\leq0.001$) و برهمکنش قارچ و نیکل ($p\leq0.05$) بر محتوای گلومالین ساده قابل استخراج EE-BRSG

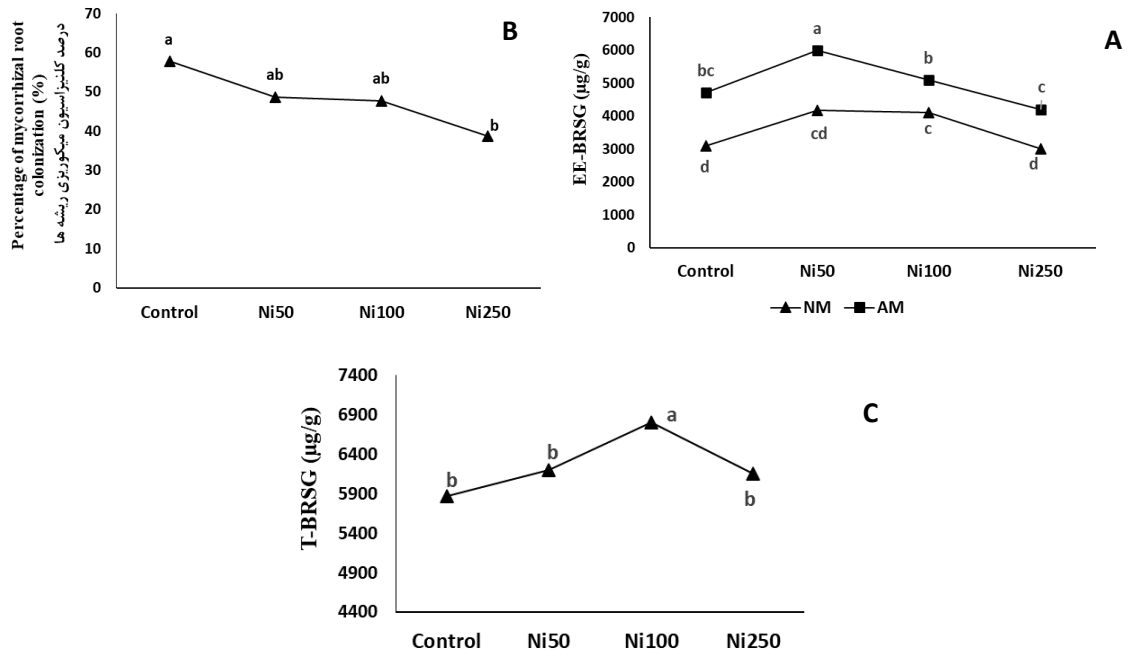
معنی‌دار بود (جدول ۱). با این حال همانطور که در جدول ۱ دیده می‌شود فقط نیکل اثر معنی‌داری در سطح احتمال ۰/۰۰۱ بر گلومالین کل (T-BRSG) نشان داد. مقدار EE-BRSG در تمام سطوح نیکل بطور معنی-داری در گیاهان مایه‌زنی شده بیشتر از تیمار بدون مایه-زنی بود (شکل۳-B). در تیمارهای میکوریزی سطح Ni50 منجر به افزایش معنی‌دار EE-BRSG گردید و در سطوح نیکل بالاتر تولید این جزء از گلومالین کاهش نشان داد ولی میزان EE-BRSG در تیمارهای Ni100 و Ni250 از نظر آماری تفاوت معنی‌داری با شاهد نداشت (شکل ۳-B). همان‌طور که در شکل ۳-C مشاهده می‌شود تیمار Ni100 سبب افزایش معنی‌دار T-BRSG نسبت به شاهد و Ni50 به‌ترتیب به میزان ۱۵/۸ و ۹/۹ درصد شد. در تیمار Ni250 میزان T-BRSG نسبت به Ni100 به‌میزان ۹/۶ درصد کاهش نشان داد ($p\leq0.05$) و تفاوت معنی‌داری با شاهد و Ni50 نداشت.

در این مطالعه کاهش معنی‌دار میزان کلنیزاسیون میکوریزی ریشه در سطح Ni250 رخ داد. کاهش یا افزایش کلنیزاسیون ریشه در اثر کاربرد فلزات سنگین توسط پژوهشگران گزارش شده است. احتمالا شدت کلنیزاسیون قارچ‌های AM در ریشه‌ها بستگی به شرایط گیاه میزبان دارد؛ وضعیت فتوسنتزی گیاه می‌تواند شدت کلنیزاسیون قارچ را در ریشه‌ها تعیین کند. به نظر می‌رسد محدودیت عرضه کربن به دلیل کاهش فتوسنتز از یک سو و اثر سمیت زیستی نیکل بر توسعه ساختارهای قارچی از سوی دیگر می‌تواند بر استقرار قارچ‌های AM در ریشه تأثیر منفی داشته باشد (۱۳).




**شکل(۲) اثر سطوح نیکل و مایه‌زنی قارچ میکوریزی بر غلظت فسفر بخش هوایی (A) و ریشه (B). تیمار مایه‌زنی با قارچ میکوریزی و بدون مایه‌زنی به‌ترتیب با AM و NM مشخص شده است. حروف انگلیسی غیرمشابه نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۵ براساس آزمون چنددامنه‌ای دانکن می‌باشند.**

**Figure(2) Effect of nickel levels and mycorrhizal inoculation on the P concentration of shoot (A) and root (B). AM and NM are representing mycorrhizal inoculated and non-inoculated plants. Different letters indicate significant differences according to the Duncan's Multiple Range Test (P<0.05).**




**شکل(۳) اثر سطوح نیکل بر درصد کلنیزاسیون ریشه (A)، EE-BRSG (B) و T-BRSG (C). تیمار مایه‌زنی با قارچ میکوریزی و بدون مایه‌زنی به‌ترتیب با AM و NM مشخص شده است. حروف انگلیسی غیرمشابه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۵ براساس آزمون چنددامنه‌ای دانکن می‌باشند.**

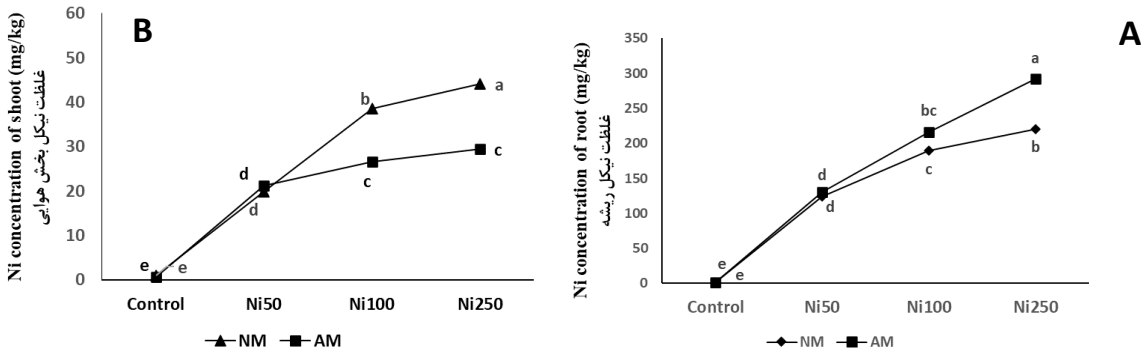
**Figure(3) Effect of nickel levels and mycorrhizal inoculation on the root colonization percentage (A), T-BRSG (B) and EE-BRSG content (C). AM and NM are representing mycorrhizal inoculated and non-inoculated plants. Different letters indicate significant differences according to the Duncan's Multiple Range Test (P<0.05).**

گلومالین، که تشابه توالی اسید آمینه بالایی (همولوژی) با پروتئین شوک حرارتی ۶۰ گیاهی دارد (۱۲)، یک پروتئین آبگریز مقاوم به پروتئولیز، دما، pH و دناتوره شدن می‌باشد. گلومالین به‌عنوان شاخصی از زیست‌توده قارچ‌های AM درنظر گرفته می‌شود. پژوهشگران اظهار داشته‌اند که آنچه به‌عنوان گلومالین با روش بردفورد سنجش می‌شود در واقع پروتئین‌های خاک مرتبط با گلومالین است (۲۷). توانایی گلومالین در غیرپویا سازی چندین گونه فلزات سنگین قبلاً نشان داده شده است (۱۴، ۳۰). علاوه بر این، گلومالین در حالی‌که ثبات همزیستی را افزایش می‌دهد، نقش مهمی در کاهش دسترسی عناصر بالقوه سمی از طریق تثبیت آنها ایفا می‌کند. در این راستا، آلودگی خاک به فلزات سنگین بر تولید گلومالین قارچ‌های AM تأثیر می‌گذارد. گلومالین ترکیبی از دیواره هیف و اسپور قارچ AM است. مطالعات قبلی نشان داده است که در شرایط نامناسب برای رشد هیف قارچ‌های AM، محتوای گلومالین افزایش یافته است. احتمالاً این می‌تواند راهکاری برای بهبود زیستگاه قارچ باشد (۴۰) که در حضور سطح بالای فلزات سنگین یا برای کاهش محدودیت‌های فیزیکی/ فضایی برای توسعه هیف اتفاق می‌افتد. ترسیب فلزات سنگین توسط گلومالین ممکن است مکانیسم دیگری باشد که توسط آن قارچ‌های AM می‌تواند شرایط محیطی را برای توسعه خود بهبود بخشد. برخی پژوهشگران اظهار داشته‌اند که EE-BRSG جزء تازه تولید شده گلومالین است و اتصال آن به ذرات خاک کمتر از T-BRSG می‌باشد (۵۱). فاکتور انتقال کمتر در گیاهان مایه‌زنی شده در سطوح بالاتر نیکل (شکل ۵-A) ممکن است نشان‌دهنده نقش مهم گلومالین در غیرپویا شدن نیکل باشد. این همولوگ

پروتئین شوک حرارتی۶۰ نقش حفاظتی در قارچ‌های AM ایفا می‌کند و می‌تواند دسترسی زیستی فلزات و سمیت آن‌ها را برای قارچ و گیاه میزبان کاهش دهد.

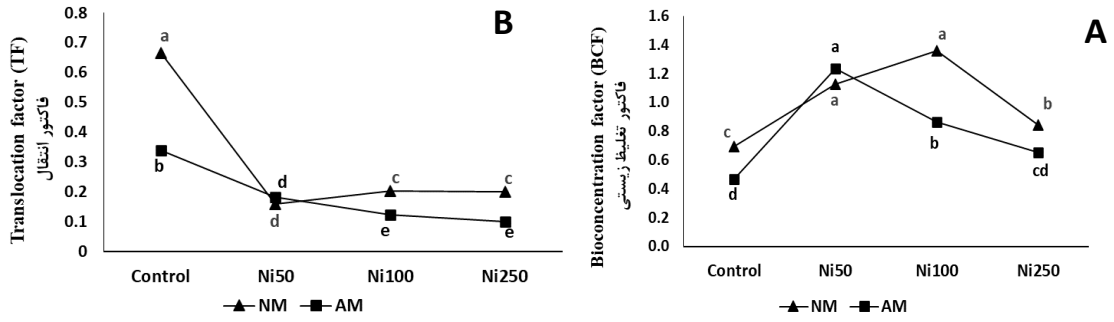
تیمار نیکل اثر معنی‌داری بر غلظت نیکل بخش هوایی داشت ($p\leq0.001$) و اثر مایه‌زنی با قارچ و برهمکنش عامل‌های آزمایشی نیز بر این پارامتر معنی‌دار بود ($p\leq0.001$) (جدول ۱). همچنین اثر نیکل ($p\leq0.001$)، مایه‌زنی قارچی ($p\leq0.001$) و برهمکنش قارچ و نیکل ($p\leq0.001$) بر غلظت نیکل ریشه‌ها معنی‌دار بود (جدول ۱). تفاوت مشاهده شده در غلظت نیکل بخش هوایی در گیاهان مایه‌زنی شده و بدون مایه‌زنی در تیمارهای Ni100 و Ni250 معنی‌دار بود و گیاهان میکوریزی بطور معنی‌داری غلظت نیکل کمتری به‌ترتیب به‌میزان ۳۰ و ۳۳ درصد در بخش هوایی نسبت به گیاهان بدون مایه‌زنی در سطوح نیکل اشاره شده نشان دادند (شکل ۴-A). غلظت نیکل ریشه‌ها در سطوح شاهد، Ni50 و Ni100 تفاوت معنی‌داری بین گیاهان مایه‌زنی شده و بدون مایه‌زنی نداشت ولی غلظت نیکل ریشه‌ها در سطح Ni250 در گیاهان مایه‌زنی شده به‌میزان ۲۹ درصد بیشتر از گیاهان بدون مایه‌زنی بود ($p\leq0.05$) (شکل ۴-B).

اثر نیکل ($p\leq0.001$)، کلنیزاسیون قارچی ($p\leq0.001$) و برهمکنش قارچ و نیکل ($p\leq0.001$) بر فاکتور انتقال معنی‌دار بود (جدول ۱). همچنین عامل‌های آزمایشی ($p\leq0.001$) و برهمکنش آن‌ها ($p\leq0.05$) اثر معنی‌داری بر فاکتور تغلیظ زیستی نشان دادند (جدول ۱). فاکتور انتقال در گیاهان مایه‌زنی شده و بدون مایه-زنی در سطح Ni50 تفاوت معنی‌داری نداشت ولی در سایر سطوح این فاکتور در گیاهان مایه‌زنی شده بطور معنی‌داری کمتر از گیاهان بدون مایه‌زنی بود (شکل ۵-A). همانطور که در شکل ۵-B مشاهده می‌شود گیاهان مایه‌زنی شده در تیمارهای Ni100 و Ni250 بطور معنی‌داری فاکتور تغلیظ زیستی کمتری به ترتیب به میزان ۳۶ و ۲۲ درصد نسبت به گیاهان بدون مایه‌زنی نشان دادند.




**شکل(٤) اثر سطوح نیکل و مایه‌زنی قارچ میکوریزی بر غلظت نیکل بخش هوایی (A) و ریشه (B). تیمار مایه‌زنی با قارچ میکوریزی و بدون مایه‌زنی به‌ترتیب با AM و NM مشخص شده است. حروف انگلیسی غیرمشابه نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۵ براساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن می‌باشند.**

**Figure(4) Effect of nickel levels and mycorrhizal inoculation on the Ni concentration of shoot (A) and root (B). AM and NM are representing mycorrhizal inoculated and non-inoculated plants. Different letters indicate significant differences according to the Duncan's Multiple Range Test (P<0.05).**




**شکل(۵) اثر سطوح نیکل و مایه‌زنی قارچ میکوریزی بر شاخص انتقال (TF) (A) و فاکتور تغلیظ زیستی (B). تیمار مایه‌زنی با قارچ میکوریزی و بدون مایه‌زنی به‌ترتیب با AM و NM مشخص شده است. حروف انگلیسی غیرمشابه نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۵ براساس آزمون چنددامنه‌ای دانکن می‌باشند.**

**Figure(5) Effect of nickel levels and mycorrhizal inoculation on the translocation factor (TF) (A) and bio-concentration factor (BCF) (B). AM and NM are representing mycorrhizal inoculated and non-inoculated plants. Different letters indicate significant differences according to the Duncan's Multiple Range Test (P<0.05).**

غلظت نیکل بیشتر در ریشه گیاهان مایه‌زنی شده میکوریزی نسبت به گیاهان بدون مایه‌زنی بویژه در تیمار Ni250 و فاکتور انتقال کمتر در گیاهان مایه‌زنی شده نشان‌دهنده این امر است که مایه‌زنی میکوریزی به تحمل گیاه در شرایط سمیت نیکل کمک می‌کند، زیرا بیشتر نیکل جذب شده می‌تواند در ریشه‌ها متوقف شود و در نتیجه اختلال در فرآیندهای بیوشیمیایی در بخش هوایی به حداقل برسد. نتایج ما نشان می‌دهد که قارچ‌های AM احتمالاً با متوقف کردن فلزات سمی در بافت‌های قارچی و یا ریشه فراهمی زیستی آنها را در بخش هوایی کاهش می‌دهند (۳). پژوهشگران نتایج مشابهی را در گیاه فستوکای میکوریزی در خاک آلوده به نیکل گزارش کرده‌اند (۴۶). همچنین افزایش جذب مس، نیکل، سرب و روی در ریشه‌های میکوریزی گونه‌های علفی چند ساله (۲۳) و روی در تنباکوی وحشی میکوریزی گزارش شده است (۳).

کاربرد نیکل باعث افزایش تدریجی غلظت نیکل در اندام هوایی و همچنین در ریشه شد. میزان افزایش غلظت نیکل در ریشه‌ها در سطوح پایین‌تر نسبت به سطوح بالاتر نیکل اعمال‌شده نسبتاً کمتر بود. افزایش در غلظت نیکل ریشه و بخش هوایی با کاربرد نیکل در خردل، عدس و نخود (۱۷) گزارش شده است. بدیهی است که این افزایش به دلیل افزایش در دسترس بودن نیکل بوده است. مقایسه غلظت نیکل اندام هوایی و ریشه نشان داد که در ریشه در مقایسه با اندام هوایی نیکل بسیار بیشتری انباشته شده است. تفاوت ژنوتیپی گیاهان زراعی از نظر تحمل به سمیت نیکل مربوط به سرعت انتقال کم نیکل از ریشه به اندام هوایی است (۵۲). پژوهشگران مشاهده کردند که یک گرادیان غلظت نیکل در ذرت و برنج به ترتیب ریشه > پایه ساقه > اندام هوایی (ساقه / غلاف) وجود داشت (۱۵). همچنین باید توجه داشت که بخش قابل ملاحظه‌ای از نیکل جذب شده به دلیل کمپلکس شدن آن در داخل دیواره‌های سلول‌های پارانشیمی آوند چوبی از طریق تبادل کاتیونی و توقیف در واکوئل‌ها در ریشه‌ها ذخیره می‌شود و به همین دلیل غلظت بالاتری از نیکل در ریشه‌ها مشاهده می‌شود (۴۴).

**جدول(۲) اثر سطوح نیکل و مایه‌زنی قارچ *C. etunicatum* بر غلظت روی، مس و آهن بخش هوایی و ریشه (میلی‌گرم بر گرم وزن خشک).**

**Table(2) The effect of nickel levels and *C. etunicatum* inoculation on the concentration of zinc, copper and iron of the shoot and root (mg $g^{-1}$ dry weight).**

| Ni levels سطوح نیکل | Fungal treatment تیمار قارچ | Concentration of micronutrients (mg $g^{-1}$) غلظت عناصر ریزمغذی (mg $g^{-1}$) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Shoot Zn روی بخش هوایی | Root Zn روی ریشه | Shoot Cu مس بخش هوایی | Root Cu مس ریشه | Shoot Fe آهن بخش هوایی | Root Fe آهن ریشه |
| Control | NM | 0.052 bc | 0.080 bcd | 0.013 b | 0.025 b | 0.0903 ab | 0.112 a |
| | AM | 0.072 a | 0.088 abc | 0.023 a | 0.061 a | 0.0838 bc | 0.098 a |
| 50 | NM | 0.058 ab | 0.075 bcd | 0.022 ab | 0.038 b | 0.0901 ab | 0.108 a |
| | AM | 0.061 ab | 0.101 a | 0.029 a | 0.037 b | 0.0823 a | 0.127 a |
| 100 | NM | 0.049 bc | 0.067 cd | 0.015 b | 0.046 b | 0.0886 ab | 0.134 a |
| | AM | 0.062 ab | 0.095 ab | 0.021 ab | 0.027 b | 0.0875 abc | 0.101 a |
| 250 | NM | 0.038 bc | 0.042 e | 0.011 b | 0.022 b | 0.0819 c | 0.109 a |
| | AM | 0.050 c | 0.065 d | 0.019 ab | 0.031 b | 0.0822 c | 0.114 a |

تیمار مایه‌زنی با قارچ میکوریزی و بدون مایه‌زنی به‌ترتیب با AM و NM مشخص شده است. حروف انگلیسی غیرمشابه در هر ستون نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۵ براساس آزمون چنددامنه‌ای دانکن می‌باشند.

AM and NM are representing mycorrhizal inoculated and non-inoculated plants. Different letters in each column indicate significant differences according to the Duncan's Multiple Range Test ($P<0.05$)

اثر اصلی نیکل و مایه‌زنی قارچی بر غلظت روی بخش هوایی در سطح احتمال ۰/۰۰۱ و بر غلظت روی ریشه در سطح احتمال ۰/۰۱ معنی‌دار بود ولی برهمکنش آن‌ها اثر معنی‌داری بر غلظت این عنصر نشان نداد (جدول ۱). در این پژوهش با افزایش غلظت نیکل خاک غلظت روی بخش هوایی و ریشه‌ها کاهش یافت و مایه-زنی میکوریزی غلظت روی ریشه را به میزان ۳۴/۶، ۴۱/۷ و ۵۴/۷ درصد به‌ترتیب در تیمارهای Ni50، Ni100 و Ni250 افزایش داد. همچنین مایه‌زنی میکوریزی غلظت روی بخش هوایی را در سطح شاهد نیکل بطور معنی‌داری به میزان ۳۸/۴ درصد افزایش داد ولی در سایر سطوح نیکل تفاوت مشاهده شده از نظر آماری معنی‌دار نبود (جدول ۲). پژوهشگران اظهار داشته‌اند که نیکل می‌تواند جذب عناصر ضروری را مهار کند و باعث کمبود عناصر مغذی شود. به ویژه، نیکل با کاتیون‌های دو ظرفیتی دیگر مانند کلسیم، مس، منیزیم، منگنز، آهن و روی رقابت می‌کند. کاهش غلظت روی با افزایش سطح نیکل خاک می‌تواند به دلیل برهمکنش منفی یا آنتاگونیسم نیکل و روی باشد. کاهش مشابهی در غلظت روی بافت‌های گیاهی در ذرت نیز گزارش شده است (۲). به‌نظر می‌رسد در طول فرآیند جذب، رقابت $Ni^{2+}$ و $Zn^{2+}$ برای مکان‌های جذب در ریشه مستقیماً جذب روی را مهار می‌کند (۲) .

اثر اصلی نیکل بر غلظت آهن بخش هوایی معنی‌دار بود ($p\leq0.05$) ولی اثر مایه‌زنی با قارچ و برهمکنش عامل‌های آزمایشی بر غلظت آهن بخش هوایی معنی‌دار نبود (جدول ۱). مایه‌زنی میکوریزی، نیکل و برهمکنش قارچ و نیکل غلظت آهن ریشه را به‌طور معنی‌داری تحت تاثیر قرار نداد (جدول ۱). در این پژوهش غلظت آهن بخش هوایی با افزایش سطح نیکل خاک به ۲۵۰ میلی-گرم نیکل بر کیلوگرم خاک کاهش یافت ولی تفاوت معنی‌داری بین گیاهان با و بدون مایه‌زنی با قارچ وجود نداشت (جدول ۲). برخی پژوهشگران کاهش میزان آهن کل جو و یولاف را ناشی از افزایش غلظت نیکل

گزارش کرده‌اند، در حالی که در گونه‌های گیاهی دیگر نشان داده شده است که محتوای آهن بدون تغییر بوده یا افزایش یافته است (۳۶). در برخی از گیاهانی که در خاک‌های طبیعی غنی از نیکل زندگی می‌کنند، همبستگی مستقیمی بین غلظت نیکل و آهن در سطح ریشه وجود دارد. برخی پژوهشگران اظهار داشته‌اند که افزایش جذب آهن عاملی برای مقابله با سمیت نیکل است (۳۶). پژوهشگران نتایج مشابهی را مبنی بر کاهش غلظت آهن بخش هوایی در خاک‌های آلوده به نیکل در اسطوخودوس (۳۹) و ذرت (۲، ۳۵) گزارش کرده‌اند. در حضور غلظت سمی نیکل به دلیل کاهش تنفس و رشد ریشه و اختلال در عملکرد غشای سلول‌های ریشه، جذب آهن توسط ریشه و انتقال آن به اندام‌های هوایی کاهش می‌یابد؛ در نتیجه کمبود آهن در بافت‌های گیاهی ایجاد می‌شود (۲، ۳۹).

اثر اصلی مایه‌زنی قارچی ($p\leq0.01$) بر غلظت مس بخش هوایی معنی‌دار بود ولی تیمار نیکل و برهمکنش عامل‌های آزمایشی اثر معنی‌داری بر غلظت این عنصر در بخش هوایی نداشت (جدول ۱). همچنین تیمار نیکل ($p\leq0.05$) و مایه‌زنی قارچی ($p\leq0.05$) و برهمکنش آن‌ها ($p\leq0.01$) اثر معنی‌داری بر غلظت مس ریشه نشان داد (جدول ۱). گیاهان مایه‌زنی شده در تمام سطوح نیکل غلظت مس بیشتری در بخش هوایی نسبت به گیاهان بدون مایه‌زنی داشتند (جدول ۲). در ریشه‌ها روند مشابهی وجود نداشت و افزودن نیکل به خاک سبب کاهش غلظت مس ریشه‌ها گردید و تفاوت مشاهده شده بین گیاهان مایه‌زنی شده و بدون مایه‌زنی فقط در سطح شاهد نیکل معنی‌دار بود (جدول ۲). پژوهشگران گزارش کردند که کاربرد نیکل غلظت مس در اندام هوایی شنبلیله را کاهش داد (۳۴). رفتار متضاد نیکل و مس ممکن است به این دلیل باشد که هر دو کاتیون‌های مس و نیکل با رقابت برای مکان‌های تبادلی در خاک و ریشه گیاهان، دسترسی یکدیگر را کاهش دهند (۳۴). از سوی دیگر، برخی پژوهشگران هیچ رابطه مشخصی بین نیکل و مس در گیاهان مشاهده نکردند (۳۷). در پژوهش حاضر غلظت مس ریشه‌ها روند مشخصی را در رابطه با سطح نیکل افزوده شده به خاک نشان نداد. این مشاهدات مطابق با مشاهدات ناروال و همکاران[1] (۳۵) بود که هیچ رابطه‌ای بین مس و سطوح نیکل در ریشه ذرت مشاهده نکردند.

در پژوهش حاضر غلظت فسفر، روی و مس بخش هوایی و ریشه‌ها بطور مثبت تحت تأثیر مایه‌زنی میکوریزی قرار گرفت. این نتایج مطابق با سایر مطالعاتی است که گزارش کردند کلنیزاسیون AM باعث افزایش جذب مس و روی (۲۶)، فسفر، مس و روی (۶) و فسفر و پتاسیم (۹) به ترتیب در ذرت، شبدر قرمز و آفتابگردان شده است. این احتمال وجود دارد که همزیستی AM به افزایش جذب مواد معدنی به منظور کاهش سمیت نیکل کمک کرده است. برخی پژوهشگران به این نتیجه رسیدند که محتوای بالای نیکل ریشه در گیاهچه‌های میکوریزی با افزایش محتوای فسفر مرتبط بوده و مکانیسم سمیت‌زدایی را از طریق اتصال پلی‌فسفات به نیکل نشان می‌دهد (۲۲).

## نتیجه‌گیری کلی

نتایج این مطالعه نشان داد که کلنیزاسیون AM با افزایش رشد گیاه از طریق جذب مواد معدنی به‌ویژه روی و مس به کاهش سمیت نیکل کمک می‌کند و نقش برجسته‌ای در ممانعت از انتقال نیکل به بخش‌های هوایی و تجمع آن در ریشه دارد. یافته‌های این پژوهش از این فرضیه پشتیبانی می‌کنند که همزیستی AM به کاهش انتقال نیکل به بخش هوایی و تحمل گیاه به سمیت نیکل کمک می‌کند و می‌تواند به طور موثر در راهکارهای گیاه‌پالایی در سطح وسیعی گنجانده شود.

1- Narwal *et al.*

**References**

1. Alloway, B.J. 2012. Heavy metals in soils: trace metals and metalloids in soils and their bioavailability. Springer Science and Business Media. London, UK. pp:313-335.

2. Amjad, M., Raza, H., Murtaza, B., Abbas, G., Imran, M., Shahid, M., Naeem, M.A., Zakir, A., and Iqbal, M.M. 2019. Nickel toxicity induced changes in nutrient dynamics and antioxidant profiling in two maize (*Zea mays* L.) hybrids. Plants, 9(1): 5.

3. Audet, P. and Charest, C. 2008. Allocation plasticity and plant–metal partitioning: meta-analytical perspectives in phytoremediation. Environmental Pollution, 156(2): 290-296.

4. Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72(2):248-254.

5. Carter, M.R. and Gregorich, E.G. 2007. Soil sampling and methods of analysis. Chemical Rubber Company Press. Boca Raton, Florida. 1264p.

6. Chen, B., Christie, P., and Li, X. 2001. A modified glass bead compartment cultivation system for studies on nutrient and trace metal uptake by arbuscular mycorrhiza. Chemosphere, 42(2): 185-192.

7. Chibuike, G. 2013. Use of mycorrhiza in soil remediation: a review. Scientific Research and Essays, 8(35): 679-1687.

8. Cottenie, A. 1980. Soil and plant testing as a basis of fertilizer recommendations. FAO Soils Bulletin38/2. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. 118p.

9. Davies Jr, F., Puryear, J., Newton, R., Egilla, J., and Saraiva Grossi, J. 2002. Mycorrhizal fungi increase chromium uptake by sunflower plants: influence on tissue mineral concentration, growth, and gas exchange. Journal of Plant Nutrition, 25(11): 2389-2407.

10. Dhiman, M., Sharma, L., Kaushik, P., Singh, A., and Sharma, M.M. 2022. Mycorrhiza: an ecofriendly bio-tool for better survival of plants in nature. Sustainability, 14(16): 10220.

11. Emran, M., Gispert, M., and Pardini, G. 2012. Patterns of soil organic carbon, glomalin and structural stability in abandoned Mediterranean terraced lands. European Journal of Soil Science, 63(5): 637-649.

12. Gadkar, V. and Rillig, M.C. 2006. The arbuscular mycorrhizal fungal protein glomalin is a putative homolog of heat shock protein 60. FEMS Microbiology Letters, 263(1): 93-101.

13. Garg, N. and Saroy, K. 2020. Interactive effects of polyamines and arbuscular mycorrhiza in modulating plant biomass, $N_2$ fixation, ureide, and trehalose metabolism in *Cajanus cajan* (L.) Millsp. genotypes under nickel stress. Environmental Science and Pollution Research, 27(3): 3043-3064.

14. Gonzalez-Chavez, M., Carrillo-Gonzalez, R., Wright, S., and Nichols, K. 2004. The role of glomalin, a protein produced by arbuscular mycorrhizal fungi, in sequestering potentially toxic elements. Environmental Pollution, 130(3): 317-323.

15. Guo, Y. and Marschner, H. 1995. Uptake, distribution, and binding of cadmium and nickel in different plant species. Journal of Plant Nutrition, 18(12): 2691-2706.

16. Gupta, S., Kala, R., and Gupta, V. 1996. A note on effect of nickel application on rabi cereals. New Botanist, 23: 237-239.

17. Gupta, S., Thokchom, S.D., and Kapoor, R. 2023. Arbuscular mycorrhiza fungus alleviates arsenic mediated disturbances in tricarboxylic acid cycle and nitrogen metabolism in *Triticum aestivum* L. Plant Physiology and Biochemistry, 197: 107631.

18. Hassan, M.U., Chattha, M.U., Khan, I., Chattha, M.B., Aamer, M., Nawaz, M., Ali, A., Khan, M.A.U., and Khan, T.A. 2019. Nickel toxicity in plants: reasons, toxic effects, tolerance mechanisms, and remediation possibilities—a review. Environmental Science and Pollution Research, 26: 12673-12688.

19. Horsch, C.C., Antunes, P.M., and Kallenbach, C.M. 2023. Arbuscular mycorrhizal fungal communities with contrasting life-history traits influence host nutrient acquisition. Mycorrhiza, 33(1-2): 1-14.

20. Huang, X., Ho, S.H., Zhu, S., Ma, F., Wu, J., Yang, J., and Wang, L. 2017. Adaptive response of arbuscular mycorrhizal symbiosis to accumulation of elements and translocation in *Phragmites australis* affected by cadmium stress. Journal of Environmental Management, 197: 448-455.

21. Jamal, A., Ayub, N., Usman, M., and Khan, A.G. 2002. Arbuscular mycorrhizal fungi enhance zinc and nickel uptake from contaminated soil by soybean and lentil. International Journal of Phytoremediation, 4(3): 205-221.

22. Jones, M.D. and Hutchinson, T.C. 1988. Nickel toxicity in mycorrhizal birch seedlings infected with *Lactarius rufus* or *Scleroderma flavidum* II .Uptake of nickel, calcium, magnesium phosphorus and iron. New Phytologist, 108(4): 461-470.

23. Killham, K.A. and Firestone, M. 1983. Vesicular arbuscular mycorrhizal mediation of grass response to acidic and heavy metal depositions. Plant and Soil, 72: 39-48.

24. Kozhevnikova, A., Seregin, I., Bystrova, E., and Ivanov, V. 2007. Effects of heavy metals and strontium on division of root cap cells and meristem structural organization. Russian Journal of Plant Physiology, 54: 257-266.

25. Kumar, A., Jigyasu ,D.K., Subrahmanyam, G., Mondal, R., Shabnam, A.A., Cabral-Pinto, M., Malyan, S.K., Chaturvedi, A.K., Gupta, D.K., and Fagodiya, R.K. 2021. Nickel in terrestrial biota: Comprehensive review on contamination, toxicity, tolerance and its remediation approaches. Chemosphere, 275: 129996.

26. Liu, A., Hamel, C., Hamilton, R., Ma, B., and Smith, D. 2000. Acquisition of Cu, Zn, Mn and Fe by mycorrhizal maize (*Zea mays* L.) grown in soil at different P and micronutrient levels. Mycorrhiza, 9: 331-336.

27. Lovelock, C.E., Wright, S.F., and Nichols, K.A. 2004. Using glomalin as an indicator for arbuscular mycorrhizal hyphal growth: an example from a tropical rain forest soil. Soil Biology and Biochemistry, 36(6): 1009-1012.

28. Luxmi, S., Singh, R., Ahmed, S., Gandhi, S.G., and Bhanwaria, R. 2023. *Glomus fasciculatum* an arbuscular mycorrhizal fungus alleviate the adverse effects of lead, arsenic, nickel, and improves growth parameters of *Monarda citriodora* Cerv. ex Lag (lemon beebalm). Rhizosphere, 27: 100753.

29. Madhaiyan, M., Poonguzhali, S., and Sa, T. 2007. Metal tolerating methylotrophic bacteria reduces nickel and cadmium toxicity and promotes plant growth of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). Chemosphere, 69(2): 220-228.

30. Malekzadeh, E., Aliasgharzad ,N., Majidi, J., Abdolalizadeh, J., and Aghebati-Maleki, L. 2016. Contribution of glomalin to Pb sequestration by arbuscular mycorrhizal fungus in a sand culture system with clover plant. European Journal of Soil Biology, 74: 45-51.

31. Mani, D. and Kumar ,C. 2014. Biotechnological advances in bioremediation of heavy metals contaminated ecosystems: an overview with special reference to phytoremediation. International Journal of Environmental Science and Technology, 11: 843-872.

32. Mani, D., Kumar, C., and Patel, N.K. 2015. Integrated micro-biochemical approach for phytoremediation of cadmium and zinc contaminated soils. Ecotoxicology and Environmental Safety, 111: 86-95.

33. Manyiwa, T. and Ultra Jr, V.U. 2022. Soil amendments and arbuscular mycorrhiza influenced the growth and heavy metal accumulation of *Colosphospermum Mopane* (Kirk Ex Benth.) in heavy metal contaminated soil. Soil and Sediment Contamination: An International Journal, 31(1): 81-96.

34. Matraszek-Gawron, R. and Hawrylak-Nowak, B. 2019. Micronutrient status and selected physiological parameters of roots in nickel-exposed *Sinapis alba* L. affected by different sulphur levels. Plants, 8(11): 440.

35. Narwal, R., Singh, M., and Singh, J. 1991. Effect of nickel enriched sewage water on the accumulation of nickel and other heavy metals in corn. Journal of the Indian Society of Soil Science, 39(1): 123-128.

36. Pandolfini, T., Gabbrielli, R., and Ciscato, M. 1996. Nickel toxicity in two durum wheat cultivars differing in drought sensitivity. Journal of Plant Nutrition, 19(12): 1611-1627.

37. Patel, P., Wallace, A., and Mueller, R. 1976. Some effects of copper, cobalt, cadmium, zinc, nickel, and chromium on growth and mineral element concentration in chrysanthemum1. Journal of the American Society for Horticultural Science, 101(5): 553-556.

38. Phillips, J. and Hayman, D. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. Transactions of the British mycological Society, 55(1): 158-161.

39. Pirsarandib, Y., Hassanpouraghdam, M.B., Rasouli, F., Aazami, M.A., Puglisi, I., and Baglieri, A. 2022. Phytoremediation of soil contaminated with heavy metals via arbuscular mycorrhiza (*funneliformis mosseae*) inoculation ameliorates the growth responses and essential oil content in lavender (*lavandula angustifolia* L.). Agronomy, 12(5): 1221.

40. Purin, S. and Rillig, M.C. 2007. The arbuscular mycorrhizal fungal protein glomalin: Limitations, progress, and a new hypothesis for its function. Pedobiologia, 51(2): 123-130.

41. Rasouli, F., Hassanpouraghdam, M.B., Pirsarandib, Y., Aazami, M.A., Asadi, M., Ercisli, S., Mehrabani, L.V., Puglisi, I., and Baglieri, A. 2023. Improvements in the biochemical responses and Pb and Ni phytoremediation of lavender (*Lavandula angustifolia* L.) plants through *Funneliformis mosseae* inoculation. BMC Plant Biology, 23(1): 252.

42. Ros, R., Morales, A., Segura, J., and Picazo, I. 1992. In vivo and in vitro effects of nickel and cadmium on the plasmalemma ATPase from rice (*Oryza sativa* L.) shoots and roots. Plant Science, 83(1): 1-6.

43. Rosier, C.L., Hoye, A.T., and Rillig, M.C. 2006. Glomalin-related soil protein: assessment of current detection and quantification tools. Soil Biology and Biochemistry, 38(8): 2205-2211.

44. Sachan, P. and Lal, N. 2017. An overview of nickel ($Ni^{2+}$) essentiality, toxicity and tolerance strategies in plants. Asian Journal of Biology, 2(4): 1-15.

45. Saroy, K. and Garg, N. 2021. Relative effectiveness of arbuscular mycorrhiza and polyamines in modulating ROS generation and ascorbate-glutathione cycle in *Cajanus cajan* under nickel stress. Environmental Science and Pollution Research, 28(35): 48872-48889.

46. Shabani, L., Sabzalian, M.R., and Mostafavi pour, S. 2016. Arbuscular mycorrhiza affects nickel translocation and expression of ABC transporter and metallothionein genes in *Festuca arundinacea*. Mycorrhiza, 26: 67-76.

47. Sreekanth, T., Nagajyothi, P., Lee, K., and Prasad, T. 2013. Occurrence, physiological responses and toxicity of nickel in plants. International Journal of Environmental Science and Technology, 10: 1129-1140.

48. Turan, V. 2021. Arbuscular mycorrhizal fungi and pistachio husk biochar combination reduces Ni distribution in mungbean plant and improves plant antioxidants and soil enzymes. Physiologia Plantarum, 173(1): 418-429.

49. Vannini, C., Carpentieri, A., Salvioli, A., Novero, M., Marsoni, M., Testa, L., de Pinto, M.C., Amoresano, A., Ortolani, F., and Bracale, M. 2016. An interdomain network: the endobacterium of a mycorrhizal fungus promotes antioxidative responses in both fungal and plant hosts. New Phytologist, 211(1): 265-275.

50. Wang, F.Y., Lin, X.G., and Yin, R. 2007. Inoculation with arbuscular mycorrhizal fungus *Acaulospora mellea* decreases Cu phytoextraction by maize from Cu-contaminated soil. Pedobiologia, 51(2): 99-109.

51. Wright, S., Green, V., and Cavigelli, M. 2007. Glomalin in aggregate size classes from three different farming systems. Soil and Tillage Research, 94(2): 546-549.

52. Yang, X., Baligar, V., Martens, D., and Clark, R. 1996. Plant tolerance to nickel toxicity: I. Influx, transport, and accumulation of nickel in four species. Journal of Plant Nutrition, 19(1): 73-85.