اثر آلودگی کادمیم بر رشد یونجه و تثبیت بیولوژیک نیتروژن توسط جدایه‌های بومی سینوریزوبیوم ملیلوتی

اسماعیل معمار کوچه‌باغ و حسین بشارتی[۱]*

دانشجوی سابق کارشناسی ارشد دانشگاه زنجان گروه خاکشناسی؛ **smaeil_ memar@yahoo.com**

عضو هیأت علمی موسسه تحقیقات خاک و آب؛ **Hbesharati@swri.ir**

چکیده

بسیاری از جنبه‌های اثرات فلزات سنگین از جمله کادمیم بر باکتری‌های ریزوبیوم و همزیستی ریزوبیوم-لگومینوز هنوز کاملاً شناخته شده نیست. در این تحقیق اثرات سطوح مختلف کادمیم بر رشد، توان همزیستی جدایه های سینوریزوبیوم ملیلوتی بومی خاک‌های استان زنجان و میزان تثبیت نیتروژن در سطوح مختلف آلودگی بررسی گردید. برای دستیابی به جدایه‌های بومی خاک‌های آلوده، نمونه‌هایی از غده‌های ریشه یونجه از مزارع استان زنجان که آلوده به فلزات سنگین از جمله کادمیم بودند، تهیه و پس از جداسازی باکتری‌های ریزوبیوم در محیط کشت اختصاصی این باکتری‌ها، کشت خالص هر جدایه تهیه گردید. بررسی مقاومت جدایه‌ها به سمیت کادمیم در محیط کشت HEPES-MES حاوی مقادیر مختلف کادمیم (۱۵۰،...، ۰،۱۰،۲۰ میلی‌گرم در لیتر) و بررسی وضعیت رشد کلنی‌ها در مقایسه با شاهد انجام شد. به منظور تعیین توان جدایه‌ها در تثبیت نیتروژن در شرایط آلودگی کادمیم، تعدادی از جدایه‌های بسیار مؤثر که مقاومت آنها به فلز سنگین متفاوت بود (نسبتاً حساس و مقاوم)، انتخاب شدند. تیمارها در آزمون گلخانه‌ای شامل پنج تیمار تلقیح با جدایه‌های سینوریزوبیوم ملیلوتی (S_6، S_{12}، S_{17}، S_{41} و S_{51})، و تیمار شاهد و نیز پنج سطح کادمیم (۰،۲،۱۰،۲۰ میلی‌گرم در کیلوگرم)، بودند که در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج با نرم افزار آماری MSTATC مورد تجزیه و تحلیل قرارگرفت. براساس نتایج ، جدایه‌های سینوریزوبیوم ملیلوتی از لحاظ کارایی تثبیت نیتروژن در چهار گروه بسیار مؤثر (۱۷/۸ درصد از جدایه‌ها)، مؤثر (۳۷/۸ درصد از جدایه‌ها)، نسبتاً مؤثر (۱۷/۸ درصد از جدایه‌ها) و بدون تأثیر (۲۶/۶ درصد از جدایه‌ها) قرار گرفتند. نتایج بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار ($P<0.05$) در بین سویه‌ها از نظر میزان تحمل به کادمیم بود و سویه‌ها به سه گروه حساس، نسبتاً حساس و مقاوم تفکیک شدند. نتایج آزمون تأثیر کادمیم بر رشد یونجه و توان تثبیت نیتروژن توسط جدایه‌ها نشان داد کمترین مقدار عملکرد مربوط به تیمار شاهد و بیشترین مقدار آن مربوط به سویه‌های مقاوم به فلز سنگین بود. سویه S_{51} از نظر توان تثبیت نیتروژن به عنوان برترین سویه‌ها شناخته شدند، درحالیکه سایر سویه‌ها تقریباً تأثیری مشابه یکدیگر داشتند. سویه‌های S_{17} و S_3 به ترتیب به عنوان مقاوم‌ترین و حساس‌ترین سویه‌ها به کادمیم بودند.

واژه‌های کلیدی: ریزوبیوم، توان گره‌زایی، سینوریزوبیوم ملیلوتی، مقاوم به کادمیم، استان زنجان

مقدمه

آلودگی محیط زیست یکی از مشکلاتی است که در قرن حاضر بشر با آن مواجه می‌باشد. بسیاری از فعالیت‌های انسان نظیر بهره‌برداری از معادن، مصرف بی رویه کودهای شیمیایی (بویژه با کیفیت

---

[۱] نویسنده مسئول، آدرس: کرج، میدان استاندارد، بعد از رزکان نو، بلوار امام خمینی، موسسه تحقیقات خاک و آب کد پستی ۳۱۱-۳۱۷۸۵

* دریافت: آذر ۱۳۹۰ و پذیرش: اردیبهشت ۱۳۹۱

نامناسب)، کاربرد فاضلاب برای آبیاری مزارع، استفاده از سوخت‌های فسیلی و فعالیت‌هایی از این قبیل عامل لودگی محیط زیست بویژه اکوسیستم خاک به انواع آلاینده ها بخصوص عناصر سنگین می باشند. با توسعه صنایع، آلودگی خاک به عناصر سنگین روز به روز بیشتر و جدی‌تر می‌شود. کادمیم یک عنصر سنگین مهم است که می‌تواند محیط خاک را آلوده کند و تجمع کادمیم گیاهان را بشدت تحت تأثیر قرار می‌دهد (بارسلو و پوشنریدر، ۱۹۹۰). کادمیم بر زیتوده و فعایت میکروارگانیسم‌های خاک و نیز گیاهان اثر منفی دارد (لیو و همکاران،۲۰۰۵ وبناویدز و همکاران، ۲۰۰۵). یزدان‌پناه و همکاران (۱۳۸۵) در تحقیقی اثر مقادیر ۰، ۱۵۰ و ۳۰۰ میکروگرم کادمیم در گرم خاک و ۰، ۷۵۰ و ۱۵۰۰ میکروگرم روی بر گرم خاک را بر تنفس میکروبی در دو خاک آهکی و غیرآهکی بررسی نموده و دریافتند که تنفس میکروبی که بیانگر جمعیت و فعالیت میکروب‌ها در خاک می‌باشد، در خاک آهکی بیشتر از خاک غیرآهکی بوده و تأثیر منفی کادمیم بر تنفس بیشتر از روی بود. با افزایش غلظت این دو عنصر سنگین اثرات منفی بر تنفس بارزتر بود. در بسیاری از پژوهش‌ها اثر سوء کادمیم بر فرایندگره زایی و تثبیت بیولوژیک نیتروژن در گیاهان تیره لگومینوز از جمله یونجه به اثبات رسیده است. در یک تحقیق اثر مقادیر مختلف کادمیم (۰، ۰/۵، ۱، ۳، ۵، ۱۰ و ۵۰ میلی-گرم کادمیم در کیلوگرم خاک) بر رشد و تثبیت نیتروژن گیاه یونجه در آزمایش گلخانه‌ای بررسی گردید. نتایج نشان داد غلظت‌های کم کادمیم اثر ناچیزی بر جوانه‌زنی بذر یونجه، زیتوده بخش هوایی گیاه، ارتفاع گیاه و محتوای کلروفیل داشت. با افزایش غلظت کادمیم، اثر سوء کادمیم بر شاخص‌های مذکور افزایش یافت. وزن گره‌های ریشه و فعالیت آنزیم نیتروژناز با افزایش غلظت کادمیم کاهش یافت به‌طوری‌که در غلظت ۵ میلی‌گرم کادمیم در کیلوگرم خاک و بالاتر، شاخص اندازه‌گیری شده به شدت کاهش یافتند (انسی و همکاران، ۲۰۰۵).

پورتر و شریدان (۱۹۸۱) محلول‌های حاوی کادمیم، مس، سرب، فلوئور و روی را در غلظت‌های ۰/۰۱ تا ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در کشت یونجه بکار برده و اثر آنها را بر احیاء استیلن بررسی کردند. اثر عناصر از بدون تأثیر (فلوئور) تا ۴۲٪ کاهش (۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر سرب) تا ۱۰۰درصد کاهش (غلظت ۱۰ میکروگرم در میلی لیتر کادمیم; ۱۰۰ میکروگرم در میلی-لیتر مس، آرسنیک و روی) متغیر بود. سپهری و همکاران (۱۳۸۵) در بررسی اثرات آلودگی خاک به کادمیم بر گره-زایی و تثبیت نیتروژن در گیاه یونجه با کاربرد مقادیر ۰، ۲، ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی گرم کادمیم در کیلوگرم خاک و شش سویه باکتری همزیست دریافتند که آلودگی کادمیم تأثیر قابل ملاحظه‌ای بر شاخص‌های اندازه‌گیری شده داشت و شدت تأثیر منفی کادمیم به غلظت‌های کادمیم مصرفی و سویه‌های تلقیح شده بستگی داشت. در سویه‌های حساس و غلظت‌های بالای کادمیم، کاهش شاخص‌های اندازه-گیری شده حداکثر بود. شیردیل و همکاران (۲۰۱۲) در مطالعه اثر کادمیم بر رشد و تثبیت بیولوژیک نیتروژن در گیاه سویا مقادیر ۰، ۴، ۸ و ۱۶ میلی‌گرم در کیلوگرم کادمیم (به صورت نیترات کادمیم) بکار بردند. رشد سویا، گره‌زایی و تثبیت نیتروژن با افزایش غلظت کادمیم به شدت کاهش یافت. حداکثر کاهش در طول ریشه و ساقه، تثبیت نیتروژن، گره‌زایی و جذب کادمیم در بالاترین غلظت کادمیم مصرفی مشاهده شد.

حافظی و همکاران (۱۳۸۸) در یک آزمایش گلدانی تأثیر کادمیم بر گره‌زایی و تثبیت نیتروژن در گیاه یونجه را بررسی نمودند. آنها مقادیر ۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرو مولار کلرور کادمیم به گلدان‌های حاوی پرلیت اضافه نموده و با اندازه‌گیری برخی شاخص‌ها دریافتند که رشد، فعالیت گره‌زایی، تثبیت نیتروژن در گره‌های ریشه در گیاهان تلقیح شده با سوش‌های مختلف باکتری همزیست، با افزایش غلظت کادمیم کاهش یافت و این کاهش در مورد سوش‌های مختلف متفاوت بود، به-طوری که بین سوش‌ها تفاوت معنی‌داری وجود داشت.

ویلاسانته و همکاران (۲۰۰۵) در طی تحقیقی، اثر عناصر سنگین کادمیم و جیوه بر گیاه یونجه را در شرایط کشت هیدروپونیک مورد بررسی قرار دادند. آنها با بررسی‌های میکروسکوپی سلول‌های ریشه یونجه دریافتند که هر دو عنصر سنگین نه تنها باعث غلبه بر ترکیبات حفاظتی تولید شده توسط گیاه شدند، بلکه باعث نکروزه شدن و از بین رفتن سلول‌ها گردیدند.

در یک تحقیق گیاهان لگوم(نخود، یونجه، لوتوس) در خاک و محیط بدون خاک کشت شده و اثر کادمیم بر آنها بررسی گردید. کلرور کادمیم در غلظت‌های ۰/۵، ۵، ۱۰ و ۱۵ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک خشک و مقادیر ۱، ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میکرو مولار در محیط بدون خاک، مصرف شدند. در یونجه فعالیت تثبیت نیتروژن با افزایش غلظت کادمیم روند نزولی نشان داد به‌طوری‌که در غلظت‌های ۰/۵، ۵، ۱۰ و ۱۵ به ترتیب ۳۳/۲ ، ۳۳/۵ ،۳۰/۷ و ۲۹/۰ میکرومولار در ساعت به ازای هر گرم وزن تازه گرهها بود. در آزمایشی به منظور تعیین اثر لجن فاضلاب حاوی عناصر سنگین بر رشد، جذب عناصر و تثبیت نیتروژن در دو گیاه یونجه و سویا مقادیر ۳۵ و ۷۰

تن در هکتار لجن فاضلاب در دو خاک مختلف مصرف گردید. در هر دو خاک وزن خشک و تثبیت نیتروژن در گیاهان یونجه و سویا با کاربرد لجن به‌طور معنی‌دار کاهش یافت (ایواضی،۲۰۰۳). با توجه به آلودگی بسیاری از اراضی کشاورزی استان زنجان به فلزات سنگین که ناشی از فعالیت کارخانه‌های فرآوری سرب و روی در این استان می‌باشد (گلچین و همکاران، ۱۳۸۵)، تاکنون در خصوص تأثیر آلودگی بر عملکرد یونجه و فرآیند تثبیت بیولوژیک نیتروژن در یونجه‌زارهای استان زنجان تحقیقی با بکارگیری جدایه‌های بومی خاک‌های استان انجام نشده است، لذا این تحقیق با هدف بررسی اثرات آلودگی کادمیم بر جدایه‌های بومی سینوریزوبیوم ملیلوتی (همزیست با گیاه یونجه) و تثبیت نیتروژن مولکولی و نیز جداسازی سویه‌های مقاوم به کادمیم انجام گرفت.

مواد و روشها

بسیاری از مزارع یونجه استان زنجان به علت قرار گرفتن مزارع در نزدیکی کارخانجات سرب و روی و کنار جاده‌ها، آلوده به فلزات سنگین از جمله کادمیم می‌باشند. برای تهیه نمونه‌های گره از گیاه یونجه، از مزارع مختلف بوته‌های یونجه انتخاب و اقدام به جداسازی گره از ریشه بوته‌ها گردید. جداسازی و تهیه جدایه‌های خالص سینوریزوبیوم ملیلوتی از گره‌های ریشه‌ای یونجه، در محیط کشت اختصاصی باکتری‌های ریزوبیوم (Yeast Manitol Agar) انجام شد. گره‌ها پس از ضدعفونی سطحی در محلول استریل شده سرم فیزیولوژیک له شده و سوسپانسیون حاصل در سطح پلیتهای حاوی محیط کشت اختصاصی باکتری‌های ریزوبیوم پخش گردید و پلیتها در انکوباتور با دمای حدود ۲۵درجه سانتیگراد قرار گرفتند (بک و همکاران ،۱۹۹۳).

معمولاً تشخیص‌نهایی هرگونه ریزوبیوم براساس توان برقراری همزیستی یعنی ایجاد گره بر سیستم ریشه‌ای گیاه میزبان انجام می‌گیرد. بنابراین از آزمون آلودگی گیاه میزبان (Plant Infection Test) به منظور اطمینان از همزیست بودن جدایه‌های ریزوبیومی خالص‌سازی شده استفاده گردید (وین سنت، ۱۹۸۲). در مرحله بعدی پژوهش، توان تثبیت نیتروژن ۴۵ جدایه ریزوبیومی در آزمایش گلخانه‌ای به همراه تیمار شاهد (بدون تلقیح باکتری) و دو تیمار نیتروژنی (۳۵ و ۷۰ میلی‌گرم نیتروژن در کیلوگرم ازمنبع نیترات آمونیم) در گلدان‌های یک کیلوگرمی حاوی مخلوطی از ماسه و پرلیت استریل (به نسبت ۹ به ۱ وزنی- وزنی) در قالب طرح کاملاً تصادفی و با ۳ تکرار انجام گردید. بذور سالم و یکنواخت یونجه رقم همدانی پس از ضدعفونی سطحی (به مدت ۵دقیقه) با محلول هیپوکلریت سدیم ۵ درصد (وین سنت، ۱۹۸۲). در پتری‌های آب-آگار یک درصد جوانه‌دار شده و در گلدان‌ها کاشته شدند و به هر گیاهک یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون جدایه‌های مورد نظر (حاوی 10^7 سلول باکتری در هر میلی‌لیتر) اضافه گردید. پس از یک هفته تعداد گیاهان هر گلدان به ۶ بوته تقلیل یافت. در تیمارهای نیتروژنی محلول نیترات آمونیم با غلظت ۳۵ و ۷۰ میلی‌گرم نیتروژن در لیتر در سه تقسیط به فاصله ۱۵ روز در گلدان‌ها به میزان ۲۰۰میلی لیتر در هر گلدان مصرف گردید. متوسط درجه حرارت روزانه و شبانه گلخانه به ترتیب در ۲۶ و۱۸ درجه سانتی گراد تنظیم گردید. گیاهان پس از ۶۰ روز برداشت شده و وضعیت گره‌بندی ریشه تعیین و وزن خشک قسمت هوایی هر گیاه اندازه‌گیری شد. سپس میزان S.E.[1] جدایه ها با استفاده از رابطه زیر محاسبه گردید (بک و همکاران ،۱۹۹۳) :

$$S.E. = \frac{T_1 - T_0}{T_2 - T_0} \times ۱۰۰$$

T_0 = وزن خشک تیمار شاهد

T_1= وزن خشک تیمار تلقیح شده با سویهٔ باکتری

T_2= وزن خشک تیمار۷۰ میلی‌گرم در کیلوگرم نیتروژن

تجزیه و تحلیل‌های آماری نتایج مؤثر بودن همزیستی با استفاده از نرم افزار Mstatc و رسم نمودارها با نرم افزار Excel انجام شد.

در قسمت بعدی تحقیق مقاومت نسبی باکتری‌های سینوریزوبیوم ملیلوتی در سطوح مختلف کادمیم تعیین شد، بدین منظور از محیط کشت جامد H.M.[2] حاوی مقادیر مختلف کادمیم (۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۰، ۸۰،۹۰ ،۱۰۰، ۱۱۰، ۱۲۰، ۱۳۰، ۱۴۰، ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر) استفاده شد (آنجل و همکاران،۱۹۹۲). کادمیم به‌صورت کلرور کادمیم در محیط کشت مصرف گردید. جدایه‌های مورد به صورت لکه‌گذاری در محیط‌های حاوی مقادیر مختلف کادمیم کشت شده و با توجه به میزان رشد و حالت کلنی در محیط کشت حاوی کادمیم به سه گروه مقاوم، نسبتاً حساس و حساس تفکیک شدند (مقاوم: باکتری رشد کامل داشته و شبیه شاهد- حساس: باکتری فاقد رشد- نسبتاً حساس: باکتری نسبت به شاهد دچار کاهش رشد است). برای بررسی تأثیر سطوح مختلف کادمیم بر رشد، توان گره‌زایی و تثبیت نیتروژن سویه‌های سینوریزوبیوم ملیلوتی، آزمایش گلخانه‌ای کشت یونجه به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار

1. Symbiotic Efficiency
2. HEPES-MES

انجام شد. فاکتورها شامل ۵ سطح کادمیم (۰، ۲، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ میلی‌گرم کادمیم در کیلوگرم با کاربرد کلرور کادمیم بصورت محلول در آب به گلدان‌ها اضافه گردید) و تلقیح با سویه‌های مختلف باکتری (۵ سویه باکتری، شاهد بدون تلقیح و تیمار ۷۰ میلی‌گرم در کیلوگرم نیتروژن) بودند. جدایه‌های باکتری استفاده شده در این آزمایش، از بین۴۵ جدایه خالص شده سینوریزوبیوم ملیلوتی براساس مقاومت به کادمیم و میزان کارایی همزیستی انتخاب شدند. در هر گلدان تعداد ۶ بذر جوانه‌دار کاشته شد و هر گیاهک با یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون (با جمعیت 10^7 سلول باکتری در هر میلی‌لیتر) جدایه‌های منتخب تلقیح گردید. گلدان‌ها به مدت سه ماه در اتاقک رشد با شدت روشنایی ۱۰ تا ۱۲ هزار کوکس، طول روز ۱۲ تا ۱۶ ساعت، درجه حرارت روزانه ۲۸ و شبانه ۱۸ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. در پایان دورهٔ رشد، بخش هوایی هر گیاه از محل طوقه قطع و پس از شستشو با آب معمولی و آب مقطر در آون تهویه‌دار با حرارت ۶۵ تا ۷۰ درجه سانتیگراد خشک گردیدند. سیستم ریشه‌ای گیاه نیز از بستر خارج و وضعیت گره‌بندی مورد بررسی قرار گرفت. بعلاوه درصد نیتروژن بخش هوایی گیاه به روش کجلدال اندازه‌گیری و بر اساس آن مقدار کل نیتروژن جذب شده در اندام هوایی گیاه محاسبه گردید. تجزیه و تحلیل آماری نتایج با نرم افزار Mstatc انجام گرفت و نمودارها با استفاده از نرم افزار Excel رسم گردیدند.

نتایج و بحث

معمولاً تشخیص‌نهایی هرگونه ریزوبیوم براساس توان برقراری همزیستی یعنی ایجاد گره بر سیستم ریشه‌ای گیاه میزبان انجام می‌گیرد. از آنجا که تمام ۴۵سویه خالص سازی شده توانستند در آزمون آلوده سازی گیاه میزبان (plant infection test) بر روی سیستم ریشه‌ای میزبان گره ایجاد کنند (وین سنت، ۱۹۸۲[7])، لذا می‌توان جدایه‌ها را سینوریزوبیوم تلقی نمود (البته این جنس اخیرا با نام Ensifer شناخته می‌شود). نتایج آزمایش نشان داد بین سویه‌های سینوریزوبیوم از نظر توان گره‌زایی بر روی ریشهٔ گیاه یونجه اختلاف معنی‌دار وجود دارد. بیشترین تعداد گره (تعداد در بوته) به ترتیب در سویه‌های S_{41}، S_{51}، S_6، S_{17}، S_{43}، S_{49} و S_{64} مشاهده شد و سویه‌های S_1، S_3، S_{23}، S_8 و S_{18} دارای کمترین توان گره-زایی بودند، به طوری‌که تعداد گره‌های ایجاد شده توسط این سویه‌ها حدود ۷۰ درصد کمتر از سویه‌های برتر از نظر این صفت بود (جدول **شماره** ۱).

در آزمون بررسی توان تثبیت نیتروژن مولکولی سویه‌های سینوریزوبیوم ملیلوتی که در قالب طرح کاملا تصادفی انجام شد، سویه‌ها براساس شاخص‌های وزن خشک بخش هوایی گیاه و کارایی همزیستی با یکدیگر مقایسه شدند. تجزیه واریانس اثر جدایه‌ها بر وزن خشک بخش هوایی یونجه و کارایی همزیستی نشان داد که اثر تیمارها (جدایه‌ها و سطوح کود نیتروژنی) بر شاخص‌های مذکور در سطح ۱درصد معنی‌دار می‌باشد (جدول۲).

مقایسه میانگین جدایه‌ها از لحاظ کارایی همزیستی نشان داد که جدایه S_6 با ۱۵۲درصد بیشترین و جدایه S_3 با ۲۹ درصد کمترین کارایی همزیستی را دارا بودند. هشت جدایه (۱۷/۷۷ درصد از جدایه‌ها) بسیار مؤثر، ۱۷جدایه (۳۷/۷۷درصد از جدایه ها) مؤثر، هشت جدایه (۱۷/۷۷ درصد از جدایه‌ها) نسبتاً مؤثر و ۱۲ جدایه (۲۶/۶۶درصد از جدایه‌ها) غیر مؤثر بودند (جدول **شماره**۳).

نتایج بررسی میزان تحمل جدایه‌های سینوریزوبیوم ملیلوتی به سطوح مختلف کادمیم نشان داد که میزان رشد جدایه‌ها در سطوح مختلف کادمیم متفاوت می‌باشد، برخی از جدایه‌ها در بالاترین سطح اعمال شده کادمیم (۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر) به خوبی رشد کردند در حالیکه برخی سویه‌های دیگر در غلظت بالای ۲۰ میلی‌گرم در لیتر کادمیم قادر به رشد نبودند (جدول **شماره** ۴). همانطوری‌که در جدول مذکور مشخص است، برخی جدایه‌ها رشدشان در سطوح مختلف آلودگی کاملا شبیه شاهد بوده و در جدول با تیره ترین رنگ مشخص شده‌اند و در واقع جدایه‌های مقاوم می‌باشند. برخی دیگر از جدایه‌ها در سطوح مختلف آلودگی رشد خوبی داشته ولی میزان رشد و وضعیت کلنی تحت تأثیر آلودگی قرار گرفت که با رنگ روشن تر از گروه اول مشخص شده‌اند و در نهایت در بعضی از جدایه‌ها رشد و وضعیت کلنی بشدت تحت تأثیر آلودگی قرار گرفت که با روشن ترین رنگ در جدول مشخص شده و جدایه‌های حساس به آلودگی هستند.

شاخص MRL[1] (حداکثر غلظت کادمیم که در آن غلظت رشد جدایه ها قابل مشاهده بود) و نسبت سویه‌هایی که در غلظت‌های مختلف کادمیم دارای رشد قابل مشاهده بودند، محاسبه گردید. نتایج نشان داد ۶۰ درصد جدایه‌ها دارای تحمل کم به کادمیم بودند (رشد در غلظت‌های ۱۰ تا ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کادمیم)، ۲۶/۷درصد از جدایه‌ها دارای تحمل متوسط بوده و تا غلظت ۳۵ میلی‌گرم در کیلوگرم کادمیم رشد کردند و ۸/۹ درصد از جدایه‌ها توانایی تحمل سطوح ۷۰ تا ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کادمیم را دارا بوده و مقاومت خوبی از نظر تحمل کادمیم از خود نشان دادند درحالیکه ۴/۴ درصد از سویه‌ها (سویه‌های S_{12} و S_{17}) دارای مقاومت بسیار زیادی از نظر تحمل به کادمیم بودند و تا

[1] Maximum Resistant Level

آخرین سطح اعمال شده کادمیم (۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر) رشد قابل ملاحظه‌ای داشتند (شکل **شماره** ۱).

برای انجام کشت گلخانه‌ای یونجه بر اساس نتایج اندازه گیری مقاومت جدایه‌ها به کادمیم و نیز میزان کارایی آنها از پنج جدایه S_6، S_{12}، S_{17}، S_{41} و S_{51} استفاده گردید که کارایی همزیستی (S.E.) آنها به ترتیب ۱۵۳،۵۷،۸۶،۱۳۹و ۷۳ درصد بوده و بجز جدایه S_{51} که نسبتا حساس بود، همه آنها مقاوم به کادمیم شناخته شدند (جدول۴).

نتایج تجزیه واریانس تأثیر کادمیم و جدایه‌های سینوریزوبیوم ملیلوتی بر وزن خشک اندام هوایی گیاه یونجه در کشت گلخانه‌ای نشان داد که اثر اصلی سویه، کادمیم و نیز اثرات متقابل آنها بر وزن خشک بخش هوایی یونجه، غلظت نیتروژن در اندام هوایی و کل نیتروژن اندام هوایی در سطح ۱درصد معنی‌دار می‌باشد (جدول **شماره** ۵).

مقایسه میانگین‌ها (شکل **شماره** ۲) نشان داد که تمام جدایه‌های مورد استفاده سبب افزایش وزن خشک اندام هوایی گیاه نسبت به تیمار شاهد (تیمار بدون باکتری و بدون کود نیتروژن) گردیدند. جدایه‌های S_{51} و S_6 به ترتیب ۴/۵ و ۳/۸ برابر نسبت به شاهد افزایش ایجاد نموده و مؤثرترین جدایه‌ها در افزایش وزن خشک یونجه بودند. از نتایج مقایسه میانگین‌ها (شکل **شماره** ۲) این‌گونه استنباط می‌شود که سویه‌های S_6 وS_{51} که از نظر تأثیر بر وزن خشک بخش هوایی گیاه برترین جدایه‌ها بودند. کمترین مقدار وزن خشک مربوط به در تیمار شاهد و بیشترین مقدار آن در گیاهان تلقیح شده با سویه‌های مقاوم و .S.E بالا بود.

مقایسه میانگین اثر جدایه‌های مختلف سینوریزوبیوم ملیلوتی بر غلظت نیتروژن اندام هوایی نشان داد سویه S_{17} بیشترین و سویه S_6 کمترین مقدار غلظت نیتروژن اندام هوایی یونجه را به خود اختصاص دادند. بجز سویه S_6 سایر سویه‌ها نسبت به تیمار شاهد بطور معنی‌داری غلظت نیتروژن اندام هوایی یونجه را افزایش دادند (شکل۳). بین مقاومترین جدایه به کادمیم با .S.E متوسط (S_{17}) و سویه مقاوم با .S.E بالا (S_{41}) از لحاظ غلظت نیتروژن اندام هوایی یونجه اختلاف معنی‌داری وجود نداشت، اما بین سویه مقاوم به کادمیم با بیشترین .S.E با دو تیمار یاد شده تفاوت معنی‌دار مشاهده شد. مقدار کاهش غلظت نیتروژن اندام هوایی در جدایه نسبتاً حساس به کادمیم نسبت به جدایه مقاوم به کادمیم ۳/۸ درصد بود.

تمام جدایه‌ها نسبت به شاهد بطور معنی‌داری کل نیتروژن اندام هوایی یونجه را افزایش دادند. بیشترین و کمترین مقدار کل نیتروژن اندام هوایی یونجه به ترتیب مربوط به جدایه‌های دارای کارآیی همزیستی متوسط و بالا (S_{51} و S_6) و سویه S_{41} می‌باشند (شکل۴).

مقایسه میانگین سطوح کادمیم بر وزن خشک بخش هوایی یونجه مشخص نمود که با افزایش غلظت کادمیم مصرفی، از وزن خشک اندام هوایی بطور معنی‌داری کاسته شد. حداکثر مقدار این شاخص در تیمار شاهد (۰/۶ گرم در بوته) و حداقل مقدار آن در تیمار ۳۰ میلی‌گرم کادمیم بر کیلوگرم خاک، (۰/۲گرم در بوته) بود به طوری‌که این تیمار نسبت به شاهد ۶۷ درصد کاهش نشان داد. بین تیمار شاهد و سایر سطوح کادمیم اختلاف معنی‌داری وجود داشت و همچنین بین سطوح کادمیم نیز تفاوت معنی‌داری بود (جدول۶). مقایسه میانگین سطوح کادمیم بیانگر آن است که با افزایش مقدار کادمیم، غلظت نیتروژن اندام هوایی گیاه کاهش یافت، به طوری‌که بیشترین غلظت نیتروژن (۲/۹۴٪) مربوط به تیمار شاهد (سطح صفر کادمیم) و کمترین مقدار آن (۲/۱۵٪) متعلق به تیمار ۳۰ میلی‌گرم کادمیم بر کیلوگرم می‌باشد (جدول۶). بین تیمارهای ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم کادمیم بر کیلوگرم خاک اختلاف معنی‌داری از نظر تأثیر بر شاخص مورد ارزیابی مشاهده نشد، اما بین تیمار شاهد و سایر سطوح کادمیم اعمال شده، تفاوت معنی‌دار بود (جدول۶). مقایسه میانگین‌سطوح کادمیم بر کل نیتروژن اندام هوایی یونجه نشان داد که همانند وزن خشک و غلظت نیتروژن، کل نیتروژن اندام هوایی نیز با افزایش مقدار کادمیم، کاهش یافت، به طوری‌که بیشترین نیتروژن اندام هوایی (۱/۸۱۷) مربوط به تیمار شاهد (سطح صفر کادمیم) و کمترین مقدار آن (۰/۵۲۹) متعلق به تیمار ۳۰ میلی‌گرم کادمیم بر کیلوگرم می‌باشد. تمام سطوح کادمیم با شاهد اختلاف معنی‌داری داشتند، به‌علاوه تفاوت بین سطوح کادمیم نیز معنی‌دار بود (جدول۶).

اثرات متقابل جدایه‌ها و سطوح مختلف کادمیم بر وزن خشک اندام هوایی گیاه در سطح ۱ درصد معنی‌دار گردید (جدول ۵). نتایج مقایسه میانگین اثرات متقابل سطوح مختلف کادمیم و جدایه‌ها نشان داد که با افزایش سطوح کادمیم، تأثیر سویه‌های در افزایش مقدار وزن خشک اندام هوایی یونجه کاهش یافت و این کاهش در مورد سویه‌های مختلف متفاوت بود، به طوری‌که بیشترین مقدار وزن خشک (۰/۷۴۰۸ گرم در گلدان) مربوط به گیاه تلقیح شده با سویهٔ S_6 در سطح صفر کادمیم و کمترین مقدار آن (۰/۱۴۰۱ گرم در گلدان) در تیمار S_{12} و در سطح ۳۰ میلی‌گرم کادمیم بر کیلوگرم مشاهده گردید (جدول۷). بطورکلی سویه‌های مقاوم به غلظت‌های بالای

کادمیم در مقایسه با سویه‌های حساس کمتر تحت تأثیر غلظت‌های بالای کادمیم قرار گرفتند.

اثرات متقابل جدایه‌ها و سطوح مختلف کادمیم بر غلظت نیتروژن اندام هوایی گیاه در سطح ۱ درصد معنی‌دار گردید (جدول ۵). نتایج مقایسه میانگین سطوح مختلف کادمیم جدایه‌های باکتری نشان داد که سطوح مختلف کادمیم تأثیر سویه‌های مورد مطالعه بر مقدار تثبیت نیتروژن را تغییر دادند، به طوری‌که بیشترین درصد نیتروژن (۳/۰۳۳٪) مربوط به گیاهان تلقیح شده با سویهٔ S_{41} در سطح صفر کادمیم و کمترین مقدار آن (۲/۳۶۷٪) در تیمار S_6 و در سطح ۳۰ میلی‌گرم کادمیم بر کیلوگرم خاک مشاهده گردید. نکته شایان توجه این است که با وجود آنکه دو جدایه S_{41} و S_6 هر دو دارای SE. بالا بوده و به عنوان سویه‌های مقاوم به کادمیم گروه‌بندی شده‌اند، ولی در کشت گلدانی یونجه در سطوح بالای کادمیم عکس‌العمل یکسانی نداشته و اثرات سوء کادمیم بر سویه S_6 بیشتر می‌باشد. مشابه این وضعیت در مورد وزن خشک بخش هوایی و کل نیتروژن بخش هوایی نیز مشاهده گردید. بطورکلی با افزایش سطوح کادمیم، تأثیر سویه‌ها بر غلظت نیتروژن اندام هوایی یونجه کاسته شد ولی این کاهش در سویه‌های مختلف متفاوت بود (جدول ۸).

با توجه به اثرات کادمیم بر همزیستی جدایه‌های سینوریزوبیوم ملیلوتی، اثر متقابل جدایه‌های مختلف و سطوح کادمیم بر مقدار کل نیتروژن اندام هوایی یونجه در سطح ۱ درصد معنی‌دار گردید (جدول ۵). جدایه‌های مختلف تأثیر متفاوتی بر مقدار کل جذب نیتروژن داشتند. بیشترین و کمترین مقدار این شاخص به ترتیب متعلق به جدایه‌های S_6 (دارای کارایی همزیستی حداکثر) در سطح صفر کادمیم و S_{41} در سطح ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم می‌باشد. به طورکلی اعمال سطوح مختلف کادمیم سبب کاهش مقدار نیتروژن اندام هوایی گیاه شده است (شکل۵).

نتیجه کلی

به‌طورکلی اگر غلظت عناصر سنگین از جمله کادمیم در خاک از حد قابل تحمل گیاه و میکروارگانیسم‌های خاکزی فراتر رود، باعث کاهش رشد، کاهش فعالیت و در نهایت باعث از بین رفتن آنها خواهد شد. البته میزان حدمجاز عناصر سنگین در خاک بستگی زیادی به خصوصیات خاک، نوع گیاه، شرایط اقلیمی و ... بستگی دارد، لذا حداکثر مجاز غلظت عناصر سنگین در خاک، در کشورهای مختلف و حتی مناطق مختلف یک کشور متفاوت تعریف می‌شود. لازم به ذکر است که حدمجاز کادمیم در خاک حدود ۳ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک می‌باشد (شند و همکاران،۱۹۸۵). در مجموع مقاومت میکروارگانیسم‌ها به اثرات سمی عناصر سنگین بیشتر از گیاهان می‌باشد. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که حدود ۶۰٪ از جدایه‌های مورد مطالعه دارای تحمل کم به کادمیم بوده، درحالیکه ۸/۹ درصد از سویه‌ها توانایی تحمل سطوح ۷۰ تا ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کادمیم را دارا بوده و مقاومت خوبی از نظر تحمل کادمیم نشان دادند. ۴/۴ درصد از سویه‌ها نیز دارای مقاومت بسیار زیادی از نظر تحمل کادمیم بودند و تا غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم کادمیم بر کیلوگرم رشد قابل ملاحظه‌ای داشتند. تفاوت بین جدایه‌های مختلف سینوریزوبیوم به کادمیم توسط برخی از محققین نیز گزارش شده است (حافظی و همکاران، ۱۳۸۸ و سپهری و همکاران، ۱۳۸۵). به‌طورکلی مقاومت میکروارگانیسم‌های همزیست با گیاهان در برابر تنش‌های محیطی از قبیل شوری، خشکی، حرارت و سایر تنش‌ها بیشتر از گیاهان همزیست آنها می‌باشد (زهران، ۱۹۹۱). تنش‌های محیطی سبب بازداری نسبی یا کامل مراحل اولیه همزیستی شده و انتقال پیام‌ها و سیگنال‌ها بین گیاه و باکتری ریزوبیوم را دچار اختلال می‌نماید (هانگریا و همکاران، ۱۹۹۱) و در خصوص عناصر سنگین حتی سبب کاهش رشد و در مواقعی نابودی گیاه می‌گردد (ایبکی و همکاران، ۱۹۹۶). در پژوهش حاضر نیز اثر آلودگی کادمیم بر رشد و وزن خشک بخش هوایی یونجه کاملاً محرز بوده و با افزایش سطوح آلودگی کاهش معنی‌دار وزن خشک بخش هوایی یونجه حادث گردید (جدول۷). نکته شایان توجه آن است که با افزایش غلظت کادمیم در خاک، رشد و تثبیت نیتروژن و وزن خشک گیاه یونجه کاهش نشان داد ولی در گیاهان تلقیح شده با سویه‌های مقاوم به کادمیم اثرات سمی کادمیم بر گیاه کمتر شده به‌طوری‌که در شاهد بدون باکتری هنگامی که غلظت کادمیم از صفر به ۳۰ میلی‌گرم در کیلوگرم افزایش یافت وزن خشک بخش هوایی یونجه حدود ۴۴ درصد کاهش نشان داد در حالیکه این کاهش در خصوص گیاهانی که با یکی از جدایه‌های مناسب تلقیح شده بود به حدود ۱۱ درصد رسید. لذا نتایج این تحقیق به خوبی بیانگر این موضوع است که با وجود مقاومت و تحمل کمتر گیاهان میزبان در مقابل تنش‌ها در مقایسه با باکتری‌های همزیست، می‌توان با یافتن جدایه‌های مناسب و تلقیح آنها به گیاه میزبان تحمل آنها به تنش ناشی از آلودگی را افزایش داد و میزان آسیب گیاهان به آلودگی را کاهش داده و از کاهش رشد و عملکرد در شرایط آلودگی تاحدی جلوگیری نمود.

جدول ۱- وضعیت گره بندی ریشه گیاه یونجه به تفکیک جدایه‌های تلقیح شده به گیاه

ردیف	شماره نمونه	تعداد گره	ردیف	شماره نمونه	تعداد گره	ردیف	شماره نمونه	تعداد گره
۱	N_1	۳	۱۶	N_{21}	۶	۳۱	N_{48}	۹
۲	N_2	۷	۱۷	N_{22}	۷	۳۲	N_{49}	۱۲
۳	N_3	۳	۱۸	N_{23}	۳	۳۳	N_{50}	۹
۴	N_6	۱۲	۱۹	N_{24}	۷	۳۴	N_{51}	۱۳
۵	N_7	۴	۲۰	N_{26}	۷	۳۵	N_{52}	۹
۶	N_8	۴	۲۱	N_{27}	۸	۳۶	N_{54}	۱۱
۷	N_9	۸	۲۲	N_{30}	۱۱	۳۷	N_{55}	۶
۸	N_{10}	۱۰	۲۳	N_{36}	۸	۳۸	N_{57}	۵
۹	N_{11}	۸	۲۴	N_{37}	۵	۳۹	N_{58}	۸
۱۰	N_{12}	۱۱	۲۵	N_{40}	۱۰	۴۰	N_{59}	۶
۱۱	N_{16}	۹	۲۶	N_{41}	۱۳	۴۱	N_{60}	۹
۱۲	N_{17}	۱۲	۲۷	N_{42}	۶	۴۲	N_{62}	۱۰
۱۳	N_{18}	۴	۲۸	N_{43}	۱۳	۴۳	N_{63}	۷
۱۴	N_{19}	۷	۲۹	N_{44}	۱۰	۴۴	N_{64}	۱۲
۱۵	N_{20}	۷	۳۰	N_{47}	۶	۴۵	N_{65}	۱۰

جدول ۲- تجزیه واریانس اثر سویه‌های ریزوبیومی بر صفات ارزیابی شده در آزمون توان تثبیت نیتروژن مولکولی

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات(MS)	
		وزن خشک اندام هوایی	کارایی همزیستی (S.E.)
سویه باکتری یا سطح نیتروژن	۴۷	۱/۶۳۶ **	۱۳۷۶۹۱/۶۶۷ **
(خطای آزمایش)	۹۶	۰/۰۰۲	۱۷۳/۳۳۳
C.V(%)	-----	۱/۲۸	۲/۸۰

جدول ۳- مقایسه میانگین سویه ها از لحاظ کارایی همزیستی **

ردیف	جدایه	میانگین وزن خشک بخش هوایی گیاه (g/plant)		میانگین کارایی همزیستی (٪)		درجه مؤثر بودن*	ردیف	جدایه	میانگین وزن خشک بخش هوایی گیاه (g/plant)		میانگین کارایی همزیستی (٪)		درجه مؤثر بودن*
۱	S_6	۰/۶۷۱۵	a	۱۵۲/۰	a	H.E	۲۵	S_{16}	۰/۳۸۴۷	mno	۷۸/۶۷	opq	E
۲	S_{41}	۰/۵۸۹۸	b	۱۳۹/۰	b	H.E	۲۶	S_{58}	۰/۳۸۲۷	mno	۷۸/۰۰	pq	E
۳	S_{36}	۰/۵۳۳۴	c	۱۲۲/۳	c	H.E	۲۷	S_{64}	۰/۳۷۶۴	nopq	۷۵/۶۷	qr	E
۴	S_{43}	۰/۵۱۸۳	cd	۱۱۸/۳	d	H.E	۲۸	S_{57}	۰/۳۶۹۱	opqr	۷۴/۳۳	rs	RE
۵	S_{59}	۰/۵۰۰۱	de	۱۱۰/۷	e	H.E	۲۹	S_{51}	۰/۳۶۰۳	pqr	۷۲/۳۳	st	RE
۶	S_{27}	۰/۴۹۴۲	e	۱۱۰/۳	e	H.E	۳۰	S_{26}	۰/۳۵۸۰	qrs	۷۰/۶۷	tu	RE
۷	S_{63}	۰/۴۷۱۲	f	۱۰۳/۷	f	H.E	۳۱	S_{48}	۰/۳۵۷۱	qrs	۶۸/۰۰	uv	RE
۸	S_{49}	۰/۴۶۴۲	fg	۱۰۱/۷	fg	H.E	۳۲	S_{54}	۰/۳۴۹۹	rs	۶۶/۳۳	vm	RE
۹	N_{70}	۰/۴۵۸۱	fg	۱۰۰/۰	g	E	۳۳	S_{44}	۰/۳۳۵۶	st	۶۳/۶۷	w	RE
۱۰	S_{40}	۰/۴۵۶۷	fg	۹۹/۶۷	g	E	۳۴	S_{24}	۰/۳۱۸۷	t	۵۸/۶۷	x	RE
۱۱	S_{52}	۰/۴۵۶۵	fg	۹۹/۳۳	g	E	۳۵	S_{12}	۰/۳۱۳۴	t	۵۷/۰۰	x	RE
۱۲	S_{55}	۰/۴۴۴۸	gh	۹۶/۳۳	h	E	۳۶	S_{47}	۰/۲۷۰۴	u	۴۳/۶۷	y	IE
۱۳	S_{22}	۰/۴۲۹۵	hi	۹۲/۰۰	i	E	۳۷	S_{18}	۰/۲۶۶۶	u	۴۳/۳۳	y	IE
۱۴	S_{10}	۰/۴۲۳۸	hij	۹۰/۶۷	i	E	۳۸	S_{50}	۰/۲۶۵۰	u	۴۳/۰۰	y	IE
۱۵	S_{60}	۰/۴۲۱۴	ikj	۸۹/۰۰	ij	E	۳۹	S_{23}	۰/۲۶۲۰	u	۴۱/۶۷	y	IE

IE	۴۱/۶۷	y	۰/۲۶۰۳	uv	S_1	۴۰	E	۸۷/۳۳	jk	۰/۴۱۳۳	ijkl	S_{17}	۱۶
IE	۳۸/۰۰	z	۰/۲۴۷۳	uvx	S_{19}	۴۱	E	۸۶/۳۳	jkl	۰/۴۱۱۸	ijkl	S_{37}	۱۷
IE	۳۵/۳۳	z[	۰/۲۳۸۸	vwx	S_{21}	۴۲	E	۸۶/۳۳	jkl	۰/۴۱۱۴	ijkl	S_{30}	۱۸
IE	۳۵/۰۰	z[	۰/۲۳۸۳	vwx	S_{42}	۴۳	E	۸۴/۳۳	klm	۰/۴۰۵۱	jklm	S_9	۱۹
IE	۳۳/۳۳	[\	۰/۲۳۱۹	wx	S_8	۴۴	E	۸۴/۰۰	lm	۰/۴۰۴۹	jklm	S_{66}	۲۰
IE	۳۲/۳۳	[\	۰/۲۲۶۸	wx	S_{20}	۴۵	E	۸۲/۰۰	mn	۰/۳۹۷۹	klmn	S_{11}	۲۱
IE	۳۰/۳۳	\]	۰/۲۲۴۶	wx	S_2	۴۶	E	۸۲/۰۰	mn	۰/۳۹۷۱	klmn	S_7	۲۲
IE	۲۹/۰۰	]	۰/۲۱۷۲	x	S_3	۴۷	E	۸۱/۳۳	mno	۰/۳۹۵۱	lmn	N_{35}	۲۳
IE	۰/۰۰۰۰	^	۰/۱۲۲۰	y	Control	۴۸	E	۷۹/۳۳	nop	۰/۳۸۹۳	lmno	S_{62}	۲۴

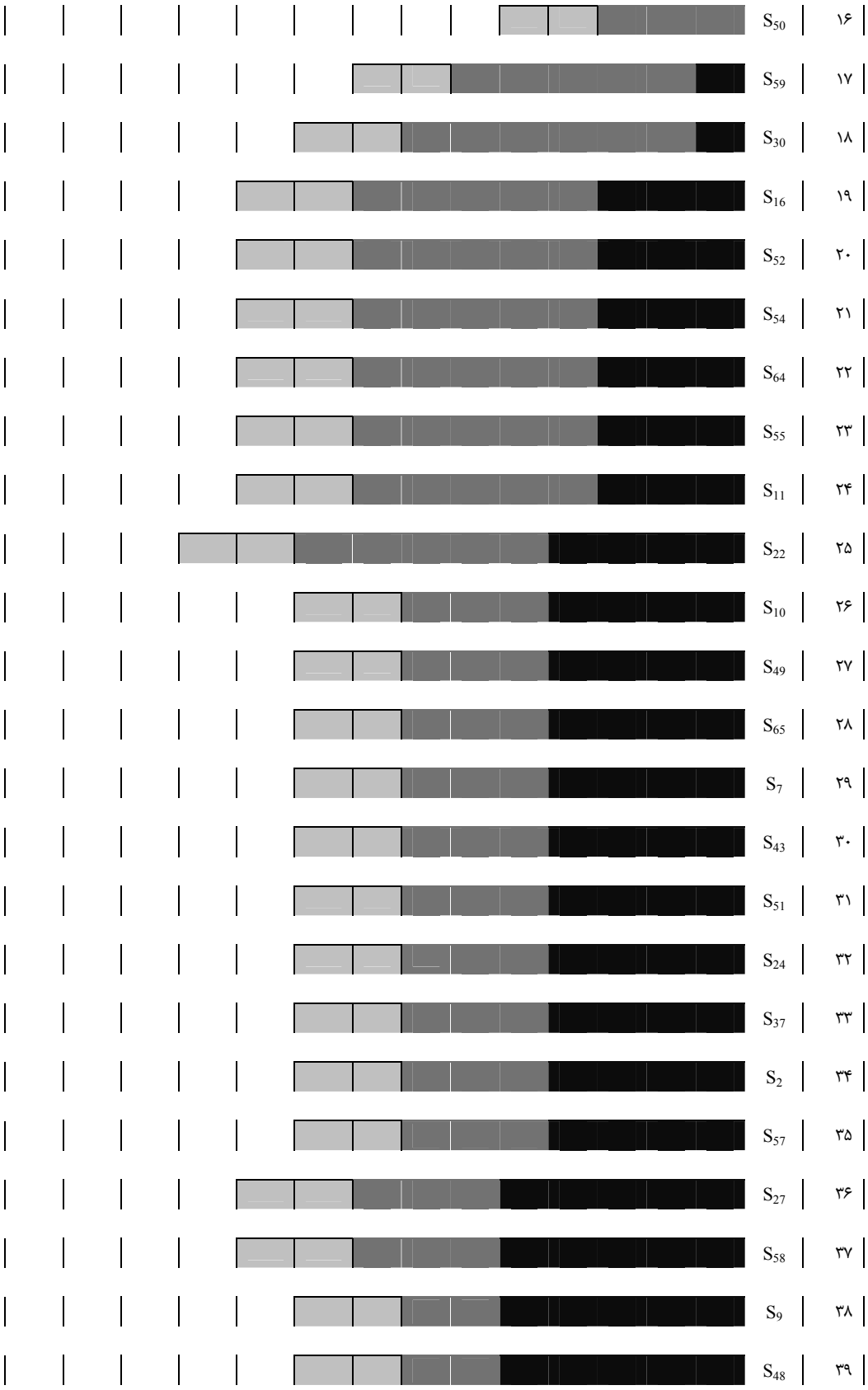
*HE، E ،RE(Relatively Effective) و IE(In-Effective) به ترتیب بسیارمؤثر[1]، مؤثر[2]، نسبتاً مؤثر[3] و بدون تأثیر[4] می‌باشند.

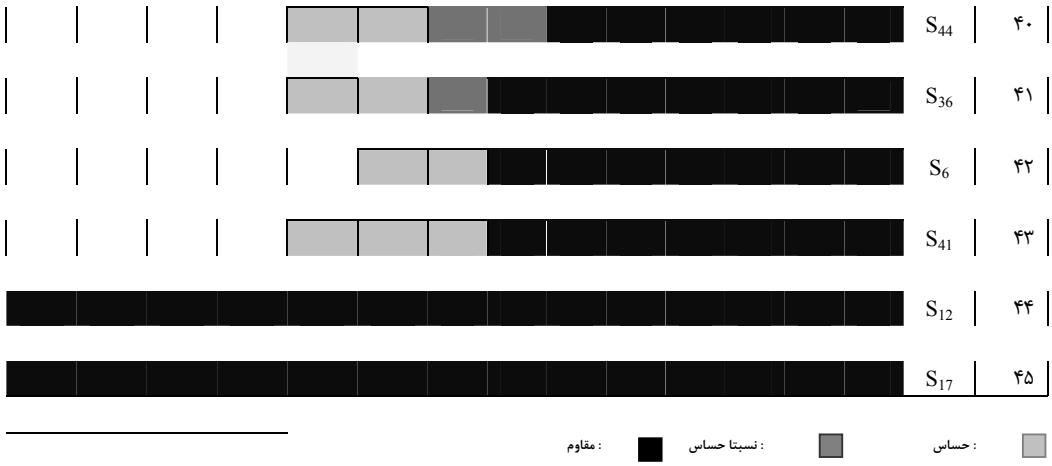
**میانگین‌هایی که حداقل یک حرف مشترک دارند، از لحاظ آماری (روش دانکن) در سطح ۱ درصد تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

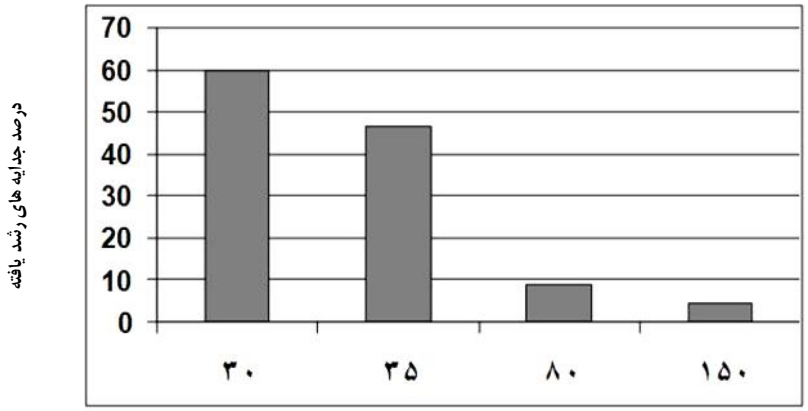
جدول ۴- میزان تحمل جدایه ها به سمیت کادمیم

ردیف		سطوح کادمیم (میلی‌گرم در لیتر)														
		۱۰	۲۰	۳۰	۴۰	۵۰	۶۰	۷۰	۸۰	۹۰	۱۰۰	۱۱۰	۱۲۰	۱۳۰	۱۴۰	۱۵۰
۱	S_{23}															
۲	S_3															
۳	S_8															
۴	S_{19}															
۵	S_{20}															
۶	S_{21}															
۷	S_{42}															
۸	S_{18}															
۹	S_1															
۱۰	S_{26}															
۱۱	S_{63}															
۱۲	S_{62}															
۱۳	S_{40}															
۱۴	S_{47}															
۱۵	S_{60}															

1. Highly Effective
2. Effective
3. Relatively Effective
4. In-Effective


S50 ۱۶
S59 ۱۷
S30 ۱۸
S16 ۱۹
S52 ۲۰
S54 ۲۱
S64 ۲۲
S55 ۲۳
S11 ۲۴
S22 ۲۵
S10 ۲۶
S49 ۲۷
S65 ۲۸
S7 ۲۹
S43 ۳۰
S51 ۳۱
S24 ۳۲
S37 ۳۳
S2 ۳۴
S57 ۳۵
S27 ۳۶
S58 ۳۷
S9 ۳۸
S48 ۳۹



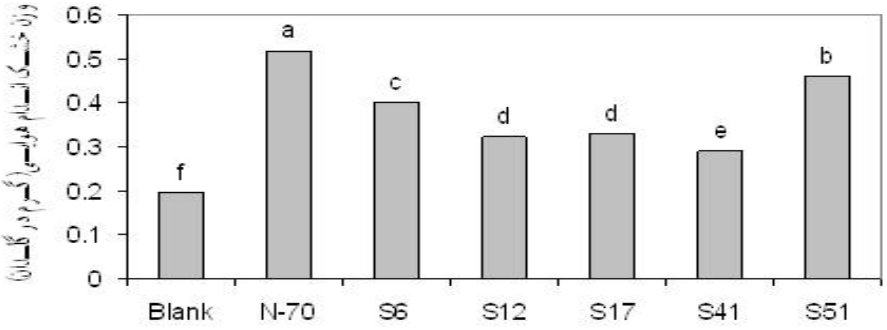


شکل ۱- درصد سویه‌های دارای رشد قابل مشاهده در غلظت‌های مختلف کادمیم

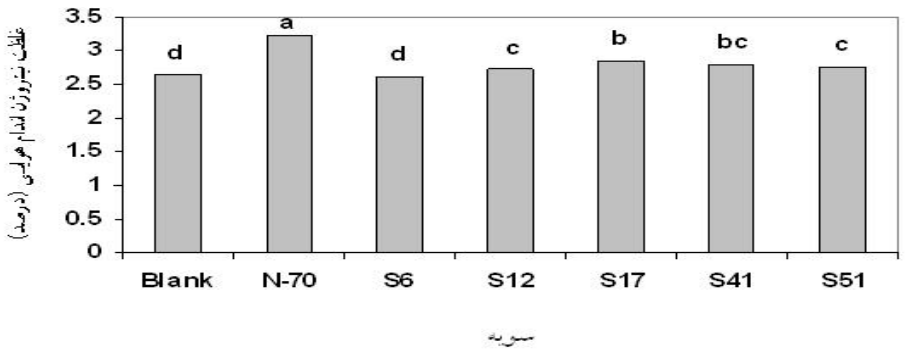
جدول ۵- تجزیه واریانس اثر سطوح کادمیم و جدایه‌های ریزوبیومی بر صفات اندازه گیری شده در کشت گلخانه ای یونجه

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات (MS)		
		وزن خشک اندام هوایی	غلظت نیتروژن در اندام هوایی	کل نیتروژن اندام هوایی
سویه	۶	۰/۱۷۷ **	۰/۶۳۷ **	۰/۰۲۰ **
کادمیم	۴	۰/۷۱۸ **	۰/۲۹۱ **	۰/۰۷۰ **
سویه × کادمیم	۲۴	۰/۰۳۰ **	۰/۰۳۴ **	۰/۰۰۳ **
خطای آزمایش	۷۰	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۷	۰/۰۰۱
C.V		۲/۵۰	۲/۹۰	۳/۶۸

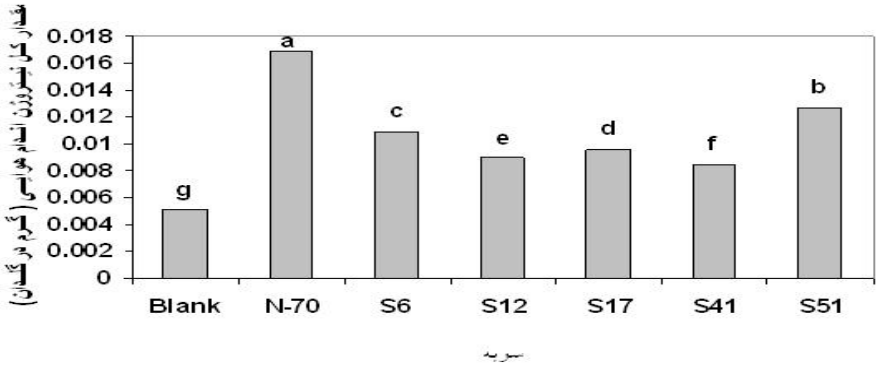
** معنی‌دار در سطح ۱ درصد



شکل ۲- اثر اصلی جدایه بر وزن خشک بخش هوایی یونجه



شکل ۳- اثر جدایه بر غلظت نیتروژن اندام هوایی یونجه



شکل ۴- اثر جدایه بر مقدار کل نیتروژن اندام هوایی یونجه

جدول ۶- مقایسه میانگین سطوح مختلف کادمیم از لحاظ صفات اندازه گیری شده در گیاه یونجه

سطوح کادمیم (میلیگرم در کیلوگرم)	وزن خشک اندام هوایی (گرم در بوته)	کل نیتروژن اندام هوایی (درصد)	میانگین غلظت نیتروژن در اندام هوایی (درصد)
۰	۰/۶۰۷۷a	۲/۹۴۳a	۱/۸۱۷a
۲	۰/۵۰۵۶b	۲/۸۷۱b	۱/۴۸۱b
۱۰	۰/۲۶۹۳c	۲/۷۸۱c	۰/۷۵۴۸c
۲۰	۰/۲۱۸۷d	۲/۷۲۹c	۰/۵۹۷۵d
۳۰	۰/۱۹۹۰e	۲/۱۵۰d	۰/۵۲۹۵e

در هر ستون میانگین‌هایی که حداقل یک حرف مشترک دارند، از لحاظ آماری (روش دانکن) در سطح ۱ درصد تفاوت معنی‌داری ندارند

جدول ۷- مقایسه میانگین اثرات متقابل کادمیم و جدایه‌ها بر وزن خشک اندام هوایی یونجه (گرم در گلدان)

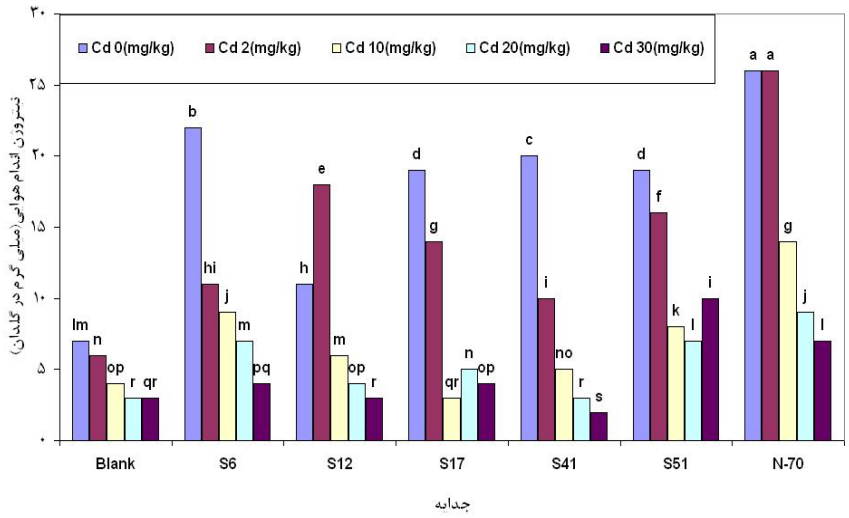
Cd(mg/kg)	Blank	$S_{۶}$	$S_{۱۲}$	$S_{۱۷}$	$S_{۴۱}$	$S_{۵۱}$	N-70
۰	۰/۲۸۳۳mn	۰/۷۴۰۸c	۰/۴۲۸۸ij	۰/۶۴۲۵e	۰/۶۷۷۳d	۰/۶۸۸۷d	۰/۷۹۲۴b
۵	۰/۲۹۰۱mn	۰/۳۵۸۴k	۰/۴۱۴۸ij	۰/۴۳۹۰ij	۰/۶۲۳۴e	۰/۵۷۲۸f	۰/۸۵۲۶a
۱۰	۰/۲۴۴۰mn	۰/۴۱۸۵j	۰/۴۷۵۷h	۰/۶۸۶۰d	۰/۳۲۵۵l	۰/۴۹۵۶gh	۰/۸۱۲۴b
۲۰	۰/۱۸۹۳o	۰/۳۲۹۰l	۰/۲۹۷۵mn	۰/۴۴۴۲i	۰/۶۲۰۳e	۰/۳۰۱۰m	۰/۵۱۲۲g
۳۰	۰/۱۵۹۵p	۰/۱۵۶۰p	۰/۱۴۰۱p	۰/۵۷۰۶f	۰/۳۶۱۲k	۰/۲۸۶۷mn	۰/۵۶۶۷f

میانگین‌هایی که حداقل یک حرف مشترک دارند، از لحاظ آماری (روش دانکن) در سطح ۱ درصد تفاوت معنی‌داری بایکدیگر ندارند

جدول ۸- مقایسه میانگین اثرات متقابل کادمیم و جدایه‌ها بر غلظت نیتروژن اندام هوایی(درصد)

Cd (mg/kg)	Blank	$S_{۶}$	$S_{۱۲}$	$S_{۱۷}$	$S_{۴۱}$	$S_{۵۱}$	N-70
۰	۲/۶۶ fghi	۳/۰۰ c	۲/۷۳ efghi	۲/۹۶ cd	۳/۰۳ bc	۲/۸۶ cdef	۳/۳۳ a
۲	۲/۵۳ijkl	۲/۷۶ de	۲/۸۶ cdef	۲/۹۳ cde	۲/۹۳ c	۲/۷۶ defgh	۳/۳۰ a
۱۰	۲/۶۰hijk	۲/۵۰jkl	۲/۷۳ efghi	۲/۸۳ cdefg	۲/۷۳ Efghi	۲/۸۳ cdefg	۳/۲۳ a
۲۰	۲/۶۶ fghij	۲/۳۴۰ kl	۲/۷۳ efg	۲/۷۶ defghi	۲/۷۰ fghij	۲/۶۳ ghij	۳/۲۰ ab
۳۰	۲/۶۶ fghi	۲/۳۶ l	۲/۵۶ hijkl	۲/۷۳ efghi	۲/۵۳ ijkl	۲/۶۰ fghij	۳/۰۳ bc

میانگین‌هایی که حداقل یک حرف مشترک دارند، از لحاظ آماری (روش دانکن) در سطح ۱ درصد تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند



شکل ۵- مقایسه میانگین اثرات متقابل کادمیم و جدایه‌ها بر مقدار کل نیتروژن اندام هوایی (میلی‌گرم در گلدان)

فهرست منابع:

۱. حافظی، م.، نمکی شوشتری، ع.، اسرار، ز و ترکزان، م. ۱۳۸۸. تأثیرات غلظت‌های سمی کادمیم بر میزان گره‌زایی و تثبیت ازت سوش‌های مختلف باکتری سینوریزوبیوم ملیلوتی (وحشی و دارای پلازمید) در گیاه یونجه (*Medicago sativa*). مجله زیست شناسی ایران. جلد ۲۲، شماره ۴، صفحات ۶۳۵-۶۲۶.

۲. سپهری، م.، صالح راستین، ن.، اسدی رحمانی، هـ. و علیخانی، ح. ۱۳۸۵. اثرات آلودگی خاک به کادمیم بر توان گره‌زایی و تثبیت نیتروژن سویه‌های بومی سینوریزوبیوم ملیلوتی (*Sinorhizobium meliloti*). مجله علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی. سال دهم، شماره اول، صفحات ۱۶۳-۱۵۳.

۳. گلچین،ا. صفوی،ع. و آتش نما، ک. ۱۳۸۵. گونه‌های گیاهی بومی ابر جاذب Pbو Zn در استان زنجان. مجموعه مقالات همایش خاک، محیط زیست و توسعه پایدار. ۱۷-۱۸ آبانماه .۱۳۸۵.کرج. پردیس کشاورزی و منابع طبیعی.

۴. یزدان‌پناه، ن.، فتوت، ا.، لکزیان، ا. و حق‌نیا، غ. ۱۳۸۵. مجله علوم و صنایع کشاورزی، ویژه خاک، آب و هوا، جلد ۲۲ شماره ۱. صفحات ۱۴۵-۱۳۵.

5. Angele, J.S., P.S. McGrath and M. A. Chaudari. 1992. Effects of media components on toxicity of Cd to Rhizobia. Water, Air ans Soil pollution. 64:627-633.
6. Barcelo, J. and Ch. Poschenrider. 1990. Plant water relations as affected by heavy metal stress: A review. J. Plant Nutr., 13(1): 1-37.
7. Beck, D. P., L. A. Materon, and F. Afandi. 1993. Practical *Rhizobium*–legume Technology Manual. Technical Manual. No.19. ICARDA, Aleppo.
8. Benavides, M. P., S. M., Gallego, M. L. Tomaro. 2005. Cadmium toxicity in plants. Braz. J. Plant Physiol. 17(1): 21-34.
9. En Ci, Gao, Ming, Y. X. Yu. 2005. Effect of Cadmium on growth and nitrogen fixation of Alfalfa. J. Anhui Agric. Sci. http://en.cnki.com.cn/Journal_en/D-D000-AHNY-2010-12.htm
10. Eivazi. F. 2003. Nitrogen fixation of soybean and alfalfa on sew aye sludge an ended soils. Agriculture, Eco. & Env., 30(1-2): 129-136.
11. Hungria, M., , C.M., Josephand, D.A. Philips, 1991. *Rhizobium* nod-gene inducers exuded naturally from roots of common bean(*Phaseolus vulgaris* L.). Plant Physiol., 97:759-764.
12. Ibekwe, A.M., J.S. Angle, R.L. Chaney and P. van Berkum . 1996. Sewage sludge and heavy metal effects on nodulation and nitrogen fixation in legumes. J. Environ. Qual., 25: 1032-1040.
13. Li ao, M., Y. K., Luo, X. M. Zhao, and C. Y. Huong. 2005. Toxicity of cadmium to soil microbial biomass and its activity: Effect of incubation time on Cd ecological dose in a paddy soil. J. Zhejiang Univ. Sci. B. 6(10): 974–980.
14. Porter, J. R., R. P. Sheridan. 1981. Inhibition of nitrogen fixation in Alfalfa by Arsenat, Heavy metals fluoride, and simulated acid rain. Plant physiol., 68: 143-148.
15. Sheirdil, R. A., K., Bashir, R. Hayat, and M. S. Akhtar. 2012. Effect of Cadmium on soybean (*Glycine max* L.) growth and nitrogen fixation. African J. Biotech. 11(8): 1886-1891.
16. Villasante, C. O., R. R. Alvarez, F. F. D., Campo, R. O. Carpena-Ruiz, and L. E. Hernandez. 2005. Cellular damage induced by cadmium and mercury in *Medicago sativa*. J. Exp. Bot., 56 (418): 2239-2251.
17. shende, G.B., C. Chakrabart, R.P. Rai, V.J. Nashikkar, D.G. Kshirsagar, P.B. Deshbratar and A.S. Juwarkar. 1986. Status of wastewater treatment and agricultural reuse with special reference to Indian experience and research and development needs. In: Pescod M.B. and A. Arrar(eds.) FAO regional seminar on the treatment and use of sewage effluent for irrigation. Niscosia, Cyprus. Pp. 185-209.
18. Vincent, J.M. 1982. Nitrogen fixation in legume. Academic Press.
19. Zabolotny, A. I., T. A., Budkevich, D. P. Bazhonov, V. E. Tsyganov. 2009. Cd accumulation in roots and nitrogen-fixing activity of root nodules in leguminous plants. Intl. Symp." Root Research and Aoolications" 2-4 september, Boku, Vienna, Austeria..
20. Zahran, H.H. 1999. *Rhizobium*-Legume symbiosis and nitrogen fixation under sever conditions and in an arid climate. Microbiol. and Molec. Biol., 63:968-989.