

اثرات آلودگی دی اکسید گوگرد بر برخی ویژگی های بیوشیمیایی یونجه (*Medicago sativa*) تلقیح شده با ریزوبیوم

مهری عسکری^{۱*}، شیما حسین خانی هزاوه^۲، فریبا امینی^۱

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱۲/۱۷؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۵/۱)

چکیده

دی اکسید گوگرد (SO_2) یکی از آلاینده های مهم اتمسفر است که سبب القاء اثرات منفی در فیزیولوژی و بیوشیمی سلولی گیاهان می شود. از طرفی تلقیح ریزوبیومی می تواند سبب افزایش مقاومت گیاه نسبت به تنش های زیستی و غیر زیستی شود. در این مطالعه، اثرات غلظت های مختلف گاز دی اکسید گوگرد (۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ ppm) بر میزان رنگیزه های فتوسنتزی، پرولین، پروتئین، گوگرد، پتاسیم و فسفر گیاه یونجه تلقیح یافته با ریزوبیوم (سویه بومی و استاندارد) در شهر اراک ارزیابی شد. نتایج نشان داد که غلظت های بالای دی اکسید گوگرد (۱، ۱/۵ و ۲ ppm) سبب کاهش میزان رنگیزه های فتوسنتزی، پروتئین، پتاسیم، فسفر و افزایش مقدار گوگرد و پرولین در مقایسه با گیاهان کنترل شد. در غلظت پایین گاز SO_2 (۰/۵ ppm) افزایش میزان رنگیزه های فتوسنتزی، پروتئین، پتاسیم و فسفر مشاهده شد. تلقیح ریزوبیومی به تنهایی سبب افزایش میزان رنگیزه های فتوسنتزی، پروتئین، پتاسیم و فسفر شد ولی بر مقدار پرولین و جذب عنصر گوگرد تأثیر معنی داری نداشت. تلقیح یونجه با دو سویه ریزوبیوم تغییرات ناشی از غلظت های بالای گاز SO_2 را بر این شاخص های بیوشیمیایی به طور معنی داری (در سطح ۰/۰۱) در مقایسه با گیاهان شاهد کاهش داد. بنابراین مایه تلقیح ریزوبیومی می تواند مقاومت گیاهان میزبان را نسبت به تنش آلودگی SO_2 هوا افزایش دهد و به عنوان کود زیستی استفاده شود.

واژه های کلیدی: آلودگی هوا، پروتئین، پرولین، رنگیزه فتوسنتزی، عناصر ضروری، مایه تلقیح ریزوبیومی

۱ و ۲. به ترتیب استادیار و دانشجوی کارشناسی ارشد گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اراک

*: مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: m-askary@araku.ac.ir

مقدمه

کاربرد شایع زغال سنگ و نفت خام به عنوان منبع انرژی برای صنایع، آتش سوزی جنگل ها، فوران های آتشفشانی، ذوب سنگ معدن و تولید آهن، فولاد، آلومینیم، مس، سرب، روی و طلا منجر به نشر حجم زیادی آلاینده گاز دی اکسید گوگرد SO_2 به اتمسفر می شود (۲۹ و ۳۷). با وجود تنوع زیاد منابع تولید کننده این آلاینده در طبیعت، محققین معتقدند که به دلیل استفاده از نفت و زغال به عنوان منبع انرژی در بخش صنایع، ۹۰٪ از SO_2 منتشر شده به هوا نتیجه فعالیت های انسانی می باشد (۲۳). گاز دی اکسید گوگرد در غلظت های پایین به عنوان یک ماده ی غذایی تأمین کننده گوگرد مورد نیاز گیاه دارای اثرات مثبتی در رشد و نمو گیاه می باشد (۲۷). اما غلظت های بالا، اثرات منفی بر متابولیسم و فرایندهای رشد و نمو گیاه دارد. اثرات منفی SO_2 بر گیاهان بسیار گسترده است. SO_2 به طور طبیعی به میزان ۵ ppm - ۰/۵ ppm در مناطق شهری وجود دارد و به میزان ۲ ppm یا بیشتر در مکان های با هوای آلوده وجود دارد که منبع اصلی گوگرد اتمسفری می باشد، بنابراین زمانی که غلظت این گاز از حد طبیعی خود که بین ۵ ppm - ۰/۵ ppm می باشد، بیشتر شود آلودگی گاز SO_2 رخ می دهد (۲۴). این گاز به آسانی از طریق روزنه ها وارد برگ شده و بر ساختار کلروپلاست اثر گذاشته و در نهایت رشد و نمو گیاه را تحت تأثیر قرار می دهد (۳۳). تغییرات فیزیولوژیکی ناشی از تنش SO_2 شامل کاهش فعالیت فتوسنتزی، افزایش تنفس، تغییر تولید آنزیم ها، تغییر رشد و تغییر جذب عناصر غذایی می باشد. میزان تغییرات، به غلظت گاز SO_2 ، مدت زمان قرار گرفتن در معرض گاز، حساسیت نسبی گیاه نسبت به گاز و مکانیسم هایی که گیاه برای زدودن این گاز به کار می گیرد یا توانایی گیاه برای ترمیم آسیب های ناشی از تنش این گاز، بستگی دارد (۲۱ و ۲۵).

ریزوباکترهای محرک رشد گیاه مثل ریزوبیوم ضمن افزایش رشد گیاهان همزیست با آنها می توانند از اثرات زیان آور عوامل تنش زای محیطی جلوگیری کنند (۳۴ و ۴۳). ریزوبیوم مشهورترین باکتری محرک رشد گیاه و آندوفیت طبیعی گیاهان

خانواده بقولات است. در هنگام تنش های غیرزیستی، ریزوبیوم با القای یکسری تغییرات فیزیکی و شیمیایی در گیاهان، سبب افزایش مقاومت به تنش می شود، فرآیندی که به عنوان مقاومت سیستمیک القایی (Induced Systemic Resistance) مطرح می شود (۱۸). از جمله این مکانیسم ها می توان به تولید آنزیم ای سی سی - دآمیناز (ACC deaminase)، تولید هورمون هایی مثل آبسزیک اسید که موجب بسته شدن روزنه ها می شود و آنتی اکسیدان هایی مثل سوپراکسید دیسموتاز اشاره کرد. تولید ترکیبات اسمولیت که در هنگام تنش منجر به ایجاد تعادل اسمزی در گیاه می شوند نیز از دیگر سازوکارها می باشد (۳۵). به همین علت همزیستی لگوم - ریزوبیوم به عنوان کاندیدای خوب در زیست پالایی آلاینده ها پیشنهاد شده است (۱۸).

گیاه یونجه (*Medicago sativa*) به عنوان ملکه نباتات علوفه ای با سطح زیر کشت ۳۲ میلیون هکتار در جهان، علوفه غالب در مناطقی با آب و هوای معتدل است (۲۰). مطالعه حاضر به منظور ارزیابی اثرات گاز SO_2 هوا بر برخی شاخص های بیوشیمیایی گیاه یونجه و ارزیابی اثرات دو سویه باکتری ریزوبیوم (استاندارد و بومی) بر کاهش اثرات منفی آلودگی گاز SO_2 هوا در سال ۹۱-۱۳۹۰ و در آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه اراک صورت گرفت تا در صورت بقاء و تولید زیست توده کافی در حضور آلاینده SO_2 ، کاشت گیاه علوفه ای یونجه در اطراف شهرهای آلوده مثل اراک پیشنهاد گردد.

مواد و روش ها

تهیه باکتری و آماده سازی مایه تلقیح: ریزوبیوم بومی از ریشه گیاه یونجه جمع آوری شده از زمین های مزروعی اطراف اراک استخراج شد (۳۹). ریزوبیوم استاندارد (*Rhizobium meliloti* PTCC 1684) از سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران تهیه شد. از آنجا که غلظت بهینه ریزوبیوم جهت تحریک رشد یونجه 10^5 سی اف یو بر میلی لیتر ($cfu mL^{-1}$) گزارش شده (۱۳)، غلظت فوق از هر دو سویه ریزوبیوم (*Rhizobium*

meliloti بومی و استاندارد تهیه گردید.

تهیه و تلقیح بذر: بذر یونجه رقم همدانی (*Medicago sativa*) cv. Hamedani از مرکز تحقیقات جهاد کشاورزی اراک تهیه شد. پس از سترون سازی (۴۱)، بذرها به سه گروه تقسیم شدند. یک گروه از بذرها در مایه تلقیح باکتری بومی تحت خلاء و درجه حرارت محیط به مدت ۲ ساعت قرار داده شد. گروه دوم مایه تلقیح باکتری استاندارد را با همان شرایط بالا و گروه سوم (شاهد) در همان شرایط و در بافر فسفات استریل (بدون باکتری) قرار گرفتند. بعد از جوانه زنی، بذرها به میکروتیوب های استریل درون گلدان (۲۲ در ۳۱ سانتی متر) و حاوی دو لیتر محلول غذایی منتقل شدند. اکسیژن دهی به وسیله پمپ هوا انجام شد. هر گلدان محتوی بذرهایی یونجه شاهد یا تلقیح شده، یک تیمار در نظر گرفته شد. این ظروف در شرایط محیط در درجه حرارت ۲۰°C در شب و ۲۵°C در روز و فتوپریود ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند.

تزریق گاز SO₂: گاز دی اکسید گوگرد ۰/۱ درصد از پتروشیمی شازند اراک تهیه شد. ۳۵ روز پس از رشد گیاهان، تزریق گاز SO₂ در غلظت های مختلف ۰ (شاهد)، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ ppm به ظروف محتوی گیاهان تلقیح نشده، گیاهان تلقیح شده با ریزوبیوم بومی و استاندارد انجام شد (۱). تزریق گاز به وسیله سرنگ به مدت ۶ روز و هر روز ۲ ساعت با بستن کامل درب ظروف پلاستیکی به فضای بالای گلدان ها، با توجه به فضای هوای بالای هر ظرف انجام شد (۲۲).

سنجش فاکتورهای فیزیولوژیک و عناصر: اندازه گیری مقادیر کلروفیل a، b و کلروفیل کل به روش آرنون (۴)، کاروتنوئید به روش لیچتالر و ولبورن (۲۶)، پرولین به روش بتز (۹)، پروتئین کل به روش برادفورد (۱۲)، گوگرد به روش وزن سنجی (۱۵) پتاسیم به روش فلیم فوتومتری (۴۰) و فسفر به روش اسپکتروفتومتری (۱۶) در گیاهان یونجه ۴۵ روزه انجام شد. آزمایش در طرح کاملاً تصادفی در قالب آزمایشات فاکتوریل در سه تکرار انجام شد. جهت آنالیز داده ها از نرم افزار SPSS 16،

برای مقایسه میانگین ها از آزمون دانکن و برای رسم نمودارها از برنامه Excel استفاده گردید.

نتایج

نتایج حاصل از بررسی گیاهان یونجه ۴۵ روزه، اثر معنی دار (سطح ۰/۰۱) تلقیح باکتریایی را بر میزان رنگیزه های فتوسنتزی، پروتئین، فسفر و پتاسیم نشان داد. اما تلقیح اثر معنی داری بر میزان پرولین و گوگرد نداشت (جدول ۱). میزان کلروفیل a، b، کلروفیل کل، کاروتنوئیدها، پروتئین، فسفر و پتاسیم در گیاهان تلقیح شده با ریزوبیوم ملیوتی نسبت به گیاهان تلقیح نشده بیشتر بود و اثر سویه بومی ریزوبیوم نسبت به سویه استاندارد بر میزان این شاخص ها چشمگیرتر بود. سویه بومی ریزوبیوم ملیوتی به ترتیب باعث افزایش ۲۶/۷۱، ۳۲/۹۴، ۲۴/۷۹ و ۳۶/۶۶ درصدی و سویه استاندارد باعث افزایش ۱۱/۶۴، ۱۶/۴۷، ۱۰/۰۸ و ۳۱/۱۱ درصدی میزان کلروفیل a، b، کلروفیل کل و کاروتنوئیدهای گیاهان تلقیح شده نسبت به گیاهان شاهد (تلقیح نشده) شد. تلقیح یونجه با سویه بومی ریزوبیوم به ترتیب سبب افزایش ۳۸/۴۶، ۷۸/۱۶ و ۵۳/۶۱ درصدی و تلقیح با سویه استاندارد افزایش ۲۵/۶۴، ۶۶/۴۱ و ۲۵/۲۶ درصدی میزان پروتئین، پتاسیم و فسفر شد (جدول ۲).

تیمار گاز SO₂ بر تمامی شاخص های بیوشیمیایی مورد بررسی اثر معنی داری (سطح ۰/۰۱) داشت (جدول ۱). اما اثر گاز SO₂ بر شاخص های بیوشیمیایی مورد بررسی وابسته به غلظت متفاوت بود. به طوری که غلظت ۰/۵ ppm گاز SO₂ باعث افزایش معنی دار کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل، کاروتنوئیدها، پروتئین، پتاسیم و فسفر به ترتیب به میزان ۳۴/۹۲، ۱۸/۷۵، ۳۰/۸۲، ۱۷/۰۲، ۱۹، ۳۸/۶۷ و ۳۱/۳۱٪ نسبت به گیاهان شاهد شد. میزان پرولین و گوگرد در گیاهان تحت غلظت ۰/۵ ppm گاز SO₂ تغییر معنی داری نسبت به گیاهان شاهد نداشت. ولی با افزایش غلظت گاز SO₂ کاهش معنی داری در میزان رنگیزه های فتوسنتزی، پروتئین، پتاسیم و فسفر نسبت به شاهد مشاهده شد. به طوری که در غلظت

جدول ۱. آنالیز واریانس اثر تلقیح ریزوبیومی، تیمار SO_2 و اثر برهمکنش آنها بر شاخص های بیوشیمیایی گیاهان یونجه ۴۵ روزه

صفات										درجه آزادی		منابع تغییرات
فسفر	پتاسیم	گوگرد	پروتئین	کاروتنوئید	پرولین	کلروفیل کل	کلروفیل b	کلروفیل a				
۳/۸۰۲**	۲۴۱۴/۱۱۱**	۵/۱۶۰ ^{ns}	۴۶/۲۲۲**	۵/۴۱۴**	۱۵/۸۵۱ ^{ns}	۱۳۵۵**	۰/۲۹۳**	۰/۵۶۹**	۲ تیمار تلقیح ریزوبیوم			
۹/۱۶۷**	۲۱۹۲/۷۲۲**	۱۱/۲۷۱**	۱۹/۶۶۲**	۱/۹۶۵**	۱۰۳۳۱۳**	۵/۸۱۲**	۰/۵۱۷**	۳/۰۸۵**	۴ تیمار SO ₂			
۰/۰۵۵۸*	۱۲۸/۸۶۶**	۰/۰۲۹*	۱۳/۵۰۱**	۰/۰۱۹**	۴/۳۰۳**	۰/۰۷۴**	۰/۰۰۸**	۰/۰۱۹**	۸ اثر برهمکنش تلقیح باکتری - SO ₂			
۰/۰۱۵	۴/۵۴۰	۰/۰۰۶	۰/۰۴۱	۰/۰۰۴	۰/۱۱۹	۰/۰۰۴	۰/۰۰۱	۰/۰۰۲	۳۰ خطا			

* : معنی دار در سطح پنج درصد ** : معنی دار در سطح یک درصد ns : معنی دار نیست

جدول ۲. مقایسه میانگین های اثر تلقیح باکتریایی بر میزان شاخص های بیوشیمیایی گیاه یونجه ۴۵ روزه براساس میلی گرم بر گرم وزن تر ($mg\ g^{-1}\ FW$) و وزن خشک ($mg\ g^{-1}\ DW$) برگ

شاخص	بدون تلقیح -R	تلقیح با ریزوبیوم بومی R_n	تلقیح با ریزوبیوم استاندارد R_s
کلروفیل a ($mg\ g^{-1}\ FW$)	۱/۴۶ ^c ±۰/۱۲	۱/۸۵ ^a ±۰/۱۵	۱/۶۳ ^b ±۰/۱۴
کلروفیل b ($mg\ g^{-1}\ FW$)	۰/۸۵ ^c ±۰/۰۵	۱/۱۳ ^a ±۰/۰۷	۰/۹۹ ^b ±۰/۰۵
کلروفیل کل ($mg\ g^{-1}\ FW$)	۲/۳۸ ^c ±۰/۱۵	۲/۹۷ ^a ±۰/۲۲	۲/۶۲ ^b ±۰/۲
کارتونیدها ($mg\ g^{-1}\ FW$)	۰/۹۰ ^c ±۰/۱۲	۱/۲۳ ^a ±۰/۱۵	۱/۱۸ ^b ±۰/۱۴
پروتئین ($mg\ g^{-1}\ FW$)	۸/۹۷ ^c ±۰/۹۴	۱۲/۴۲ ^a ±۱/۳	۱۱/۲۷ ^b ±۱/۱۷
پتاسیم ($mg\ g^{-1}\ DW$)	۲۲/۵۱ ^c ±۲/۰۳	۴۲/۱۳ ^a ±۴/۰۱	۳۷/۴۶ ^b ±۴/۰۵
فسفر ($mg\ g^{-1}\ DW$)	۱/۹۴ ^b ±۰/۲۲	۲/۹۸ ^a ±۰/۲۵	۲/۴۳ ^b ±۰/۲۰

حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار بین میانگین ها مطابق آزمون دانکن است. هر عدد میانگین ۳ تکرار $\pm SE$ است. مقایسه ردیفی انجام شده است.

جدول ۳. مقایسه میانگین های اثر غلظت های مختلف گاز SO_2 (۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ ppm) بر میزان شاخص های بیوشیمیایی گیاه یونجه ۴۵ روزه براساس میلی گرم بر گرم وزن تر (mg g^{-1} FW) و وزن خشک (mg g^{-1} DW) برگ

شاخص	غلظت های مختلف گاز SO_2 (ppm)				
	۰	۰/۵	۱	۱/۵	۲
کلروفیل a (mg g^{-1} FW)	$1/89^b \pm 0/08$	$2/55^a \pm 0/07$	$1/42^c \pm 0/05$	$1/25^d \pm 0/03$	$1/12^e \pm 0/04$
کلروفیل b (mg g^{-1} FW)	$1/12^b \pm 0/04$	$1/33^a \pm 0/06$	$0/96^c \pm 0/04$	$0/83^d \pm 0/03$	$0/72^e \pm 0/03$
کلروفیل کل (mg g^{-1} FW)	$3/05^b \pm 0/13$	$3/99^a \pm 0/11$	$2/43^c \pm 0/08$	$2/11^d \pm 0/05$	$1/98^e \pm 0/04$
کاروتنوئیدها (mg g^{-1} FW)	$1/41^b \pm 0/04$	$1/65^a \pm 0/09$	$1/09^c \pm 0/03$	$0/87^d \pm 0/03$	$0/45^e \pm 0/05$
پروکلین (pmol g^{-1} FW)	$2/05^d \pm 0/09$	$2/07^d \pm 0/14$	$3/72^c \pm 0/84$	$7/52^b \pm 0/34$	$9/55^a \pm 0/33$
پروتئین (mg g^{-1} FW)	$14/34^b \pm 0/9$	$17/07^a \pm 0/45$	$9/17^c \pm 0/13$	$7/42^d \pm 0/19$	$5/47^e \pm 0/28$
گوگرد (mg g^{-1} FW)	$1/2^d \pm 0/01$	$1/4^d \pm 0/03$	$2/51^c \pm 0/05$	$3/23^b \pm 0/03$	$4/02^a \pm 0/07$
پتاسیم (mg g^{-1} DW)	$42/22^b \pm 4/8$	$58/55^a \pm 5/07$	$34/67^c \pm 4/05$	$26/22^d \pm 2/7$	$17/83^e \pm 1/64$
فسفر (mg g^{-1} DW)	$2/97^b \pm 0/15$	$3/9^a \pm 0/19$	$2/23^c \pm 0/10$	$1/76^d \pm 0/12$	$1/36^e \pm 0/10$

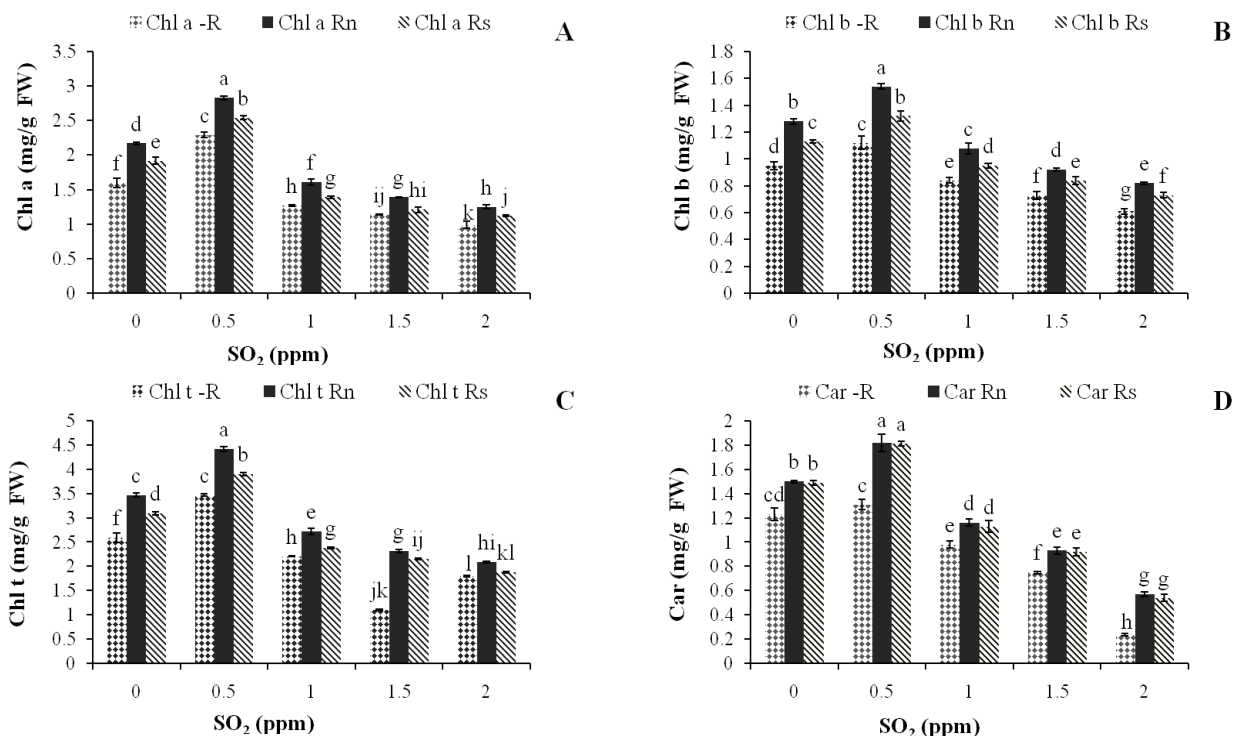
حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار بین میانگین ها مطابق آزمون دانکن است. هر عدد جدول میانگین $\pm$ تکرار $\pm$ SE است. مقایسه برای هر شاخص ردیفی انجام شده است.

نشده تحت غلظت ۲ ppm گاز مشاهده شد. در گیاهان تلقیح شده با ریزوبیوم بومی تحت غلظت ۰/۵ ppm گاز به ترتیب افزایش ۷۶/۸۷، ۶۲/۱۱، ۷۱/۰۹ و ۴۷/۹۷ درصدی میزان کلروفیل a ، b ، کلروفیل کل و کاروتنوئیدها نسبت به شاهد مشاهده شد (شکل ۱). میزان پروتئین در گیاهان تلقیح نشده، تلقیح شده با ریزوبیوم استاندارد و بومی در معرض غلظت ۰/۵ ppm گاز به ترتیب افزایش ۱/۷، ۱/۹۱ و ۲/۱۴ برابری را نسبت به شاهد نشان داد (شکل ۲). افزایش ۵۱/۳۷ و ۸۴/۲۱ درصدی به ترتیب در میزان پتاسیم و فسفر گیاهان تلقیح شده با ریزوبیوم بومی تحت غلظت ۰/۵ ppm گاز مشاهده شد (شکل ۳). میزان پروکلین و گوگرد در گیاهان تحت غلظت ۰/۵ ppm تغییر معنی داری نسبت به شاهد نداشت.

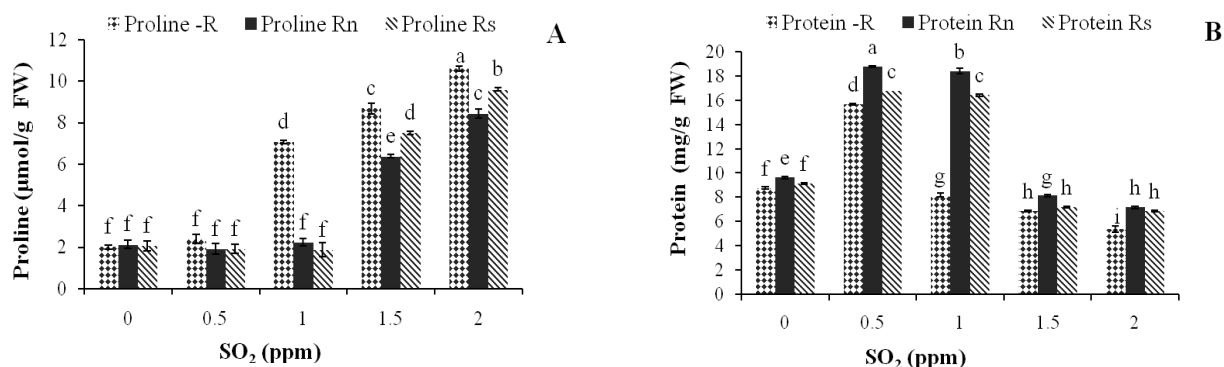
در گیاهان تحت غلظت های بالاتر گاز SO_2 (۱، ۱/۵ و ۲ ppm)، تلقیح باکتریایی اثرات بازدارندگی تنش گازی را کمتر نمود. به طوری که در گیاهان تلقیح نشده در معرض ۲ ppm گاز دی اکسید گوگرد میزان کلروفیل a ، b ، کلروفیل کل و کاروتنوئیدها به ترتیب کاهش ۴۰/۷۴، ۳۵/۷۱، ۳۵/۰۸ و ۶۸/۰۹ درصدی را نسبت به گیاهان شاهد داشتند اما در گیاهان

۲ ppm گاز SO_2 میزان کلروفیل a ، b ، کلروفیل کل و کاروتنوئیدها به ترتیب کاهش ۴۰/۷۴، ۳۵/۷۱، ۳۵/۰۸ و ۶۸/۰۹ درصدی را نسبت به شاهد (۰ ppm) از خود نشان دادند. غلظت ۲ ppm گاز SO_2 باعث کاهش ۶۱/۸۵، ۵۷/۷۶ و ۵۴/۲۱ درصدی میزان پروتئین، پتاسیم و فسفر به ترتیب نسبت به شاهد شد. افزایش غلظت گاز SO_2 (۱، ۱/۵ و ۲ ppm) باعث افزایش معنی دار میزان پروکلین و گوگرد شد به طوری که در گیاهان تحت غلظت ۱/۵ و ۲ ppm گاز SO_2 به ترتیب میزان پروکلین افزایش ۳/۶۶ و ۴/۷ برابری و میزان گوگرد افزایش ۲/۶۹ و ۳/۴ برابری نسبت به شاهد را از خود نشان دادند (جدول ۳).

اثر برهمکنش تلقیح باکتریایی و گاز SO_2 بر میزان رنگیزه های فتوسنتزی، پروکلین، پروتئین، پتاسیم (سطح ۰/۰۱) گوگرد و فسفر (سطح ۰/۰۵) اثر معنی داری داشت (جدول ۱). به دنبال تلقیح باکتریایی تأثیرات ناشی از غلظت های مختلف گاز SO_2 بر شاخص های بیوشیمیایی گیاهان یونجه تغییر کرد. بیشترین میزان رنگیزه های فتوسنتزی، پروتئین، عناصر فسفر و پتاسیم در گیاهان تلقیح شده با ریزوبیوم بومی در معرض غلظت ۰/۵ ppm گاز و کمترین این شاخص ها در گیاهان تلقیح



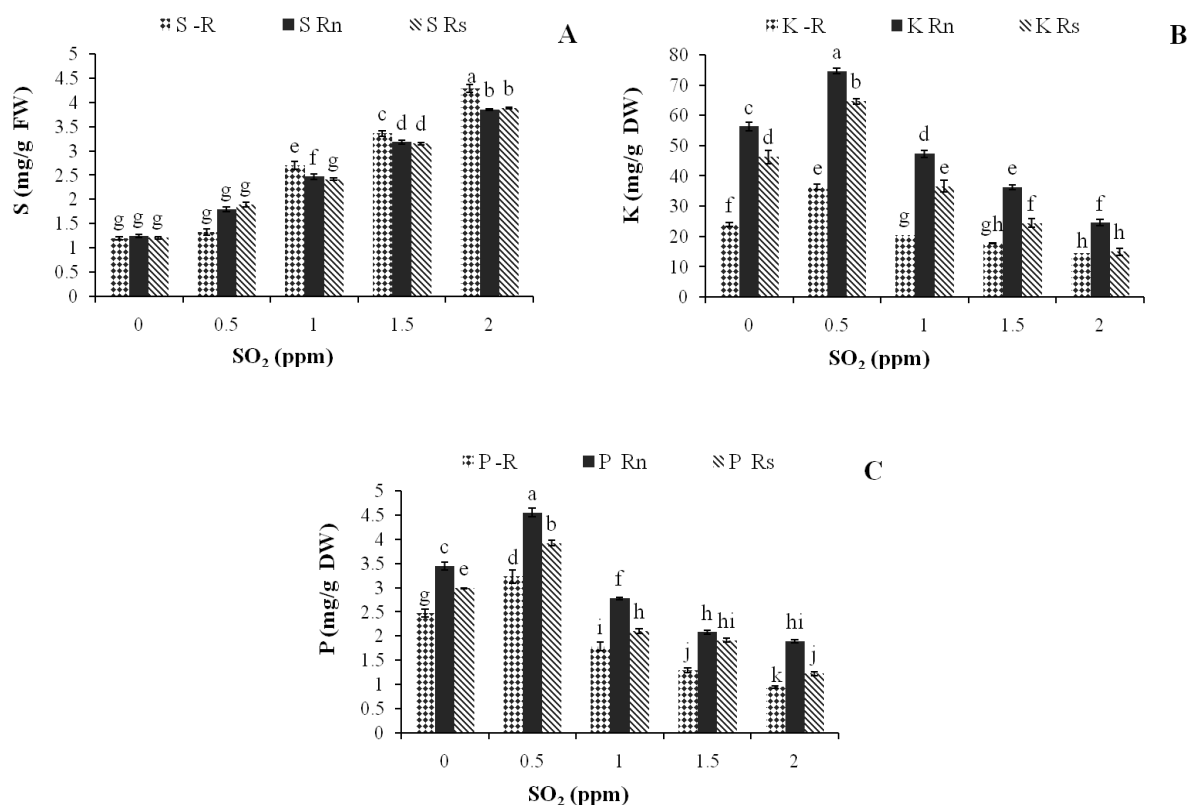
شکل ۱. اثر متقابل گاز SO₂ و تلقیح باکتریایی (بدون تلقیح -R، تلقیح با ریزوبیوم بومی R_n و استاندارد R_s) بر میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی گیاهان یونجه ۴۵ روزه. خطوط نشان‌دهنده خطای استاندارد (SE) و حروف غیرمشابه نشان‌دهنده معنی‌دار بودن براساس آزمون دانکن (سطح ۰/۰۱) می‌باشد.



شکل ۲. اثر متقابل گاز SO₂ و تلقیح باکتریایی (بدون تلقیح -R، تلقیح با ریزوبیوم بومی R_n و استاندارد R_s) بر میزان پروتئین و پروتئین گیاهان یونجه ۴۵ روزه. خطوط نشان‌دهنده خطای استاندارد (SE) و حروف غیرمشابه نشان‌دهنده معنی‌دار بودن براساس آزمون دانکن (سطح ۰/۰۱) می‌باشد.

به‌دنبال تلقیح با ریزوبیوم استاندارد و بومی به‌ترتیب به ۲۱/۷۷ و ۱۸/۲۴ درصد تغییر نمود (شکل ۲). هم‌چنین کاهش ۵۴/۲۱ مقدار فسفر در این گیاهان در اثر تلقیح با ریزوبیوم بومی و استاندارد به‌ترتیب به ۲۰/۲۰ و ۲۳/۰۸ درصد رسید (شکل ۳).

تلقیح‌یافته با ریزوبیوم بومی تحت همین غلظت گاز، میزان کاهش رنگیزه‌های فوق به‌ترتیب تنها ۲۱/۸۷، ۱۳/۶۸، ۱۹/۳۱ و ۵۳/۶۶ درصد مشاهده گردید (شکل ۱). کاهش ۶۱/۸۵ درصدی میزان پروتئین در گیاهان تلقیح نشده در معرض SO₂ ۲ ppm،



شکل ۳. اثر متقابل گاز SO₂ و تلقیح باکتریایی (بدون تلقیح -R، تلقیح با ریزوبیوم بومی R_n و استاندارد R_s) بر میزان گوگرد، پتاسیم و فسفر گیاهان یونجه ۴۵ روزه. خطوط نشان دهنده خطای استاندارد (SE) و حروف غیر مشابه نشان دهنده معنی دار بودن براساس آزمون دانکن (سطح ۰/۰۱) می باشد.

بحث

در این پژوهش میزان رنگیزه های فتوسنتزی، پروتئین، فسفر و پتاسیم در گیاهان تلقیح شده با ریزوبیوم میلیوتی سویه بومی و استاندارد نسبت به گیاهان تلقیح نشده بیشتر بود و اثر سویه بومی ریزوبیوم میلیوتی نسبت به سویه استاندارد بر افزایش این شاخص ها چشمگیرتر بود. یکی از پاسخ های گیاهان تلقیح شده با باکترهای محرک رشد از جمله ریزوبیوم به صورت افزایش رنگیزه های فتوسنتزی، افزایش فتوسنتز و در نهایت افزایش رشد و محصول گیاه است (۲) که مشابه افزایش ۲۵ درصدی رنگیزه های فتوسنتزی در ذرت تلقیح یافته با آزوسپریلوم برازیلنس (۳۸)، افزایش کلروفیل و شدت فتوسنتز در برنج تلقیح یافته با تعدادی ریزوباکترهای آزاد دارای فعالیت تثبیت کنندگی نیتروژن (۲) و افزایش رنگیزه های فتوسنتزی

در گیاهان یونجه تلقیح شده با ریزوبیوم بومی در غلظت ۲ ppm نسبت به شاهد اصلاً کاهش پتاسیم مشاهده نشد. درحالی که در گیاهان تلقیح نشده و تلقیح شده با ریزوبیوم استاندارد در معرض همین غلظت گاز میزان پتاسیم به ترتیب کاهش ۵۷/۷۶، ۳۷/۵ درصدی را نسبت به گیاهان شاهد نشان دادند (شکل ۳). بیشترین و کمترین میزان پرولین و گوگرد به ترتیب در گیاهان تلقیح نشده تحت غلظت ۲ ppm گاز و گیاهان تلقیح نشده تحت غلظت صفر ppm گاز مشاهده شد. در غلظت ۲ ppm گاز، میزان پرولین در گیاهان تلقیح نشده، تلقیح شده با ریزوبیوم استاندارد و بومی به ترتیب افزایش ۴/۷، ۴/۷ و ۴/۲۲ برابری (شکل ۲) و میزان گوگرد در گیاهان فوق به ترتیب افزایش ۳/۴، ۳/۲ و ۳/۲ برابری را نسبت به گیاهان شاهد نشان داد (شکل ۳).

شبدر ایرانی تلقیح یافته با ریزوبیوم ملیلوتی است (۱۰). افزایش این رنگیزه‌ها به افزایش تثبیت نیتروژن توسط این باکتری‌ها برمی‌گردد. ترکیبات نیتروژنه حاصل از تثبیت نیتروژن در گرهک‌های ریشه به شکل آلانتوئین و اسیدهای آلانتوئیک به ریشه ترشح و به برگ‌ها منتقل می‌شوند و در بیوسنتز کلروفیل و پروتئین‌های ضروری برای فتوسنتز استفاده می‌شوند (۱۱). به‌دنبال تلقیح باکتریایی جذب برخی عناصر مثل منیزیم (۱۶) که در ساختمان کلروفیل، وجود دارد افزایش می‌یابد. با توجه به نقش نیتروژن و منیزیم در بیوسنتز کلروفیل، بنابراین مقدار کلروفیل برگ گیاهان تلقیحی افزایش می‌یابد و این هم سازوکاری جهت افزایش محصولات فتوسنتزی و در نتیجه رشد بهتر گیاه میزبان است (۸). تلقیح ریزوبیومی یونجه باعث افزایش میزان پروتئین گیاه یونجه شد اما بر میزان پرولین این گیاه تأثیری نداشت. نتایج مشابه افزایش محتوای پروتئینی دانه سویا (۳۰) را در اثر تلقیح باکتریایی نشان می‌دهد. باکتری با افزایش جذب نیتروژن توسط ریشه و هم‌چنین افزایش تثبیت نیتروژن باعث افزایش میزان پروتئین و در نهایت افزایش رشد گیاه می‌شود (۳۱). هم‌چنین عدم تغییر میزان پرولین در اثر تلقیح بیانگر این امر است که تلقیح ریزوبیومی برای گیاه یک تنش محسوب نمی‌شود. تلقیح باکتریایی به‌تنهایی بر میزان گوگرد گیاه تأثیری نداشت ولی بر میزان پتاسیم و فسفر گیاه تأثیر معنی‌داری داشت. مقدار پتاسیم و فسفر در تلقیح با باکتری بومی نسبت به باکتری استاندارد افزایش بیشتری را نشان داد. نتایج مشابه در گیاهان گندم (۳۱) و ستاریا (۴۲) مشاهده گردید. به عقیده برخی محققین اثرات سودمند تلقیح باکتریایی اساساً ناشی از تغییرات فیزیولوژیک و مورفولوژیک ریشه مثل افزایش تعداد تارهای کشنده و ریشه‌های جانبی گیاهان تلقیح شده می‌باشد که سبب افزایش کارایی جذب آب و مواد معدنی توسط ریشه می‌شود (۱۷). باکتری با تأثیر بر روی پمپ‌های الکتروژنیک و یا ازدیاد تراوش پروتونی از ریشه نیروی محرک لازم جهت جذب فسفر و پتاسیم را فراهم می‌کند (۱۴). مهم‌ترین مکانیسم تحریک توسط سویه‌های ریزوبیومی، تولید

فیتوهورمون‌های ایندولی می‌باشد که نتیجه آن رشد بهتر ریشه، به‌دنبال آن افزایش جذب آب و عناصر غذایی (فسفر، نیتروژن، و پتاسیم) توسط گیاه و افزایش رشد می‌باشد. باکتری‌های ریزوبیومی توانایی تولید این فیتوهورمون‌ها را دارند اما این توانایی در بین گونه‌های مختلف ریزوبیومی و نیز در بین سویه‌های متعلق به هر گونه، یکسان نیست، بنابراین اثر گونه‌ها و سویه‌های مختلف ریزوبیومی بر گیاه متفاوت است (۱۹) همان‌طور که در این تحقیق نیز اثر سویه بومی و استاندارد ریزوبیوم ملیلوتی روی گیاه یونجه متفاوت بود. مشابه اثرات مثبت تلقیح گندم و ذرت با سویه‌های همولوگ (ایزوله شده از ریشه‌های استریل همان گیاه) که بیشتر از اثرات سویه‌های هترولوگ (ایزوله شده از ریشه سایر گیاهان) بر گیاهان تلقیح یافته بود و به همین علت محققین مطرح می‌کنند که ژنوتیپ گیاهی و سویه همولوگ باکتری نقش مهمی در برقراری جریانات تثبیت زیستی نیتروژن بازی می‌کنند (۵ و ۷).

در این تحقیق گاز SO_2 اثر معنی‌داری بر شاخص‌های بیوشیمیایی یونجه داشت. غلظت 0.5 ppm گاز SO_2 باعث افزایش معنی‌دار رنگیزه‌های فتوسنتزی، پروتئین، پتاسیم و فسفر نسبت به گیاهان شاهد شد ولی تأثیر معنی‌داری بر میزان پرولین و گوگرد نداشت. برعکس تحت غلظت ۱، $1/5$ و 2 ppm کاهش معنی‌داری در میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی، پروتئین، پتاسیم و فسفر و افزایش معنی‌داری در میزان پرولین و گوگرد نسبت به شاهد مشاهده شد. نتایج مشابه در گیاهان اسفناج (۲۳) و همیشه بهار (۳۶) مشاهده شده است. از نظر محققین وقتی غلظت گاز SO_2 از حد طبیعی که بین $0.5 - 0.05 \text{ ppm}$ می‌باشد، بیشتر شود آلودگی گاز SO_2 رخ می‌دهد (۲۴). بنابراین غلظت 0.5 ppm غلظت سمی برای گیاه نمی‌باشد. از طرفی تأثیر گاز SO_2 بر گیاهان وابسته به گونه گیاهی، مدت زمان در معرض گاز قرار گرفتن و غلظت گاز متفاوت است (۲۱). دی‌اکسید گوگرد هوا در غلظت‌های پایین دارای اثرات مثبت بر رشد و نمو گیاه می‌باشد و به‌عنوان یک منبع تأمین‌کننده گوگرد مورد نیاز گیاه محسوب می‌شود. گوگرد از عناصر ضروری برای

رشد گیاهان است. گیاه می تواند آنیون های سولفات را از خاک جذب کند یا مستقیماً از طریق برگ ها SO_2 را از جو دریافت کند و پس از طی کردن مسیرهای آنزیمی عنصر گوگرد را در ساخت مولکول های آلی، آمینو اسیدهایی مثل سیستئین و متیونین که سپس پروتئین را تشکیل می دهند، به کار برد. جذب اضافه و زیاد گوگرد از خاک یا اتمسفر می تواند باعث آسیب به گیاهان شود (۳۲). گاز SO_2 در غلظت های بالا درون سلول با آب واکنش می دهد و به سولفیت تبدیل می شود. سولفیت به عنوان یک رادیکال آزاد عمل کرده، به سوبستراهای متعددی حمله می کند و باعث تخریب کلروپلاست، رنگیزه های فتوسنتزی، آنزیم های فتوسنتزی، بازدارندگی سنتز پروتئین و یا افزایش تجزیه پروتئین، کاهش رشد و در نتیجه کاهش جذب عناصر مختلف از جمله فسفر و پتاسیم می شود (۳۲ و ۳۶). تحت غلظت های بالای گاز میزان پرولین افزایش یافت. پرولین به عنوان یک ماده تنظیم کننده اسمزی و عامل حفاظت کننده ماکرومولکول ها و ساختمان غشاء در مقابل تخریب القا شده بوسیله رادیکال های آزاد می باشد (۲۸).

نتایج مشابه در شلغم هندی (*Brassica juncea*) و ترب سفید (*Raphanus sativus*) در معرض گاز SO_2 مشاهده شد (۳). تحقیقات نشان داده که گیاهان محتوای کلی گوگردشان را با قرار گرفتن مداوم در معرض SO_2 اتمسفری افزایش می دهند. گیاهان عالی قادر به تنظیم محتوای گوگرد کلی خود از طریق ایجاد یک تعادل بین غلظت سولفیت و سولفات هستند. این تعادل از طریق تشکیل سولفیت در حضور نور و یا تشکیل سولفات در تاریکی با روشی مشابه ایجاد می شود، قسمتی از SO_2 تجمع یافته توسط گیاه با ذرات معدنی ترکیب شده و به سولفات تبدیل می شود که قسمتی از آن در ساختار ذرات آلی مثل آمینو اسیدها و پروتئین های محتوی گوگرد استفاده می شود و قسمتی دیگر به عنوان SO_2 یا SH_2 توسط عمل تبادل گازی طبیعی حذف می شود (۲۳). در گیاه باقلا (*Vicia faba*) در معرض SO_2 افزایش محتوای گوگرد و کاهش میزان فسفر و پتاسیم در مقایسه با گیاهان شاهد مشاهده شد (۱).

نتایج تحقیق حاضر نشان دهنده افزایش مقاومت گیاه یونجه در معرض غلظت های بالای SO_2 به دنبال تلقیح ریزوبیومی است. بیشترین میزان رنگیزه های فتوسنتزی، پروتئین و عناصر فسفر و پتاسیم به ترتیب در گیاهان تلقیح شده با ریزوبیوم بومی و غلظت ppm ۵/۰ گاز و کمترین میزان شاخص های فوق در گیاهان تلقیح نشده و غلظت ppm ۲ گاز مشاهده شد. میزان رنگیزه های فتوسنتزی، پروتئین و عناصر فسفر و پتاسیم که در غلظت های بالای SO_2 کاهش نشان دادند در تلقیح با باکتری کاهش کمتری را نسبت به گیاهان تلقیح نیافته نشان دادند. کاهش شرایط تنشی به دنبال تلقیح باکتریایی در گزارشات مختلفی ذکر شده است (۶). هم چنین افزایش مقدار پرولین و گوگرد ناشی از تنش گاز SO_2 در گیاهان تلقیح یافته با ریزوبیوم به میزان کمتری مشاهده شد. تلقیح میکروارگانیسم های همزیست در شرایط تنش میزان عملکرد و تغذیه معدنی گیاهان را بهبود می بخشد و باعث کاهش و بهبود شرایط تنشی می شود (۴۴). باکتری ریزوبیوم همزیست با لگوم ها در کاهش شرایط تنشی نقش مهم و مؤثری را ایفا می کند. ریزوبیوم با تولید ترکیباتی همچون انواع هورمون ها، ویتامین ها، ترکیبات اسمولیت مثل پرولین، تولید ACC-دآمیناز و تولید آنتی اکسیدان های آنزیمی تحت شرایط تنش، در کاهش شرایط تنش برای گیاهان مؤثر است. درواقع ریزوبیوم در هنگام تنش سبب القای سازوکارهای دفاعی گیاه و ایجاد مقاومت در گیاه می شود (۱۸).

نتیجه گیری

غلظت ppm ۵/۰ گاز SO_2 برای گیاه تنش محسوب نمی شود و گیاه به عنوان منبع گوگرد از آن استفاده می کند؛ اما غلظت های بالاتر گاز با ایجاد شرایط تنشی اثرات منفی بر گیاه می گذارد. با برقراری یک رابطه همزیستی موفق و کارا بین یونجه - ریزوبیوم می توان علاوه بر رشد گیاه، اثر آلودگی SO_2 را کاهش داد و در این راستا باکتری بومی به دلیل همزیستی کارآمدتر، تأثیر بیشتری بر کاهش اثرات تنش SO_2 بر رشد گیاه یونجه

دارد. باکتری با اثر بر شاخص‌های رشد گیاه مثل افزایش سطح جذب ریشه، هم‌چنین افزایش کلروفیل و پروتئین اثرات مثبت خود را بر گیاه یونجه اعمال می‌نماید.

منابع

1. Agrawal, M., P. K. Nandi and D. N. Rao. 1985. Effects of sulphur dioxide fumigation on soil system and growth behaviour of *Vicia faba* plants. *Plant and Soil* 86(1): 69-78.
2. Alam, M. S., Z. J. Cui, T. Yamagishi and R. Ishii. 2001. Grain Yield and related physiological characteristics of rice plant (*Oriza sativa* L.) inoculated with free-living rhizobacteria. *Plant Production Science* 4(2): 126-130.
3. Anjali, M. N. Kumar, Singh and K. Pal. 2012. Effect of sulphur dioxide on plant biochemicals. *International Journal Of Pharma Professional's Research* 3(2): 627-633.
4. Arnon, D. I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenyloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology* 24: 1-15.
5. Askary, M., A. Mostajeran, R. Amooaghaei and M. Mostajeran. 2009. Influence of the Co-inoculation *Azospirillum brasilense* and *Rhizobium meliloti* plus 2,4-D on grain yield and N, P, K content of *Triticum aestivum*. *American-Eurasian Journal Agricultural and Environmntal Science* 5(3): 296-307.
6. Bagheri, A. R. 2011. Effect of salinity and inoculation with *Azospirillum* on carbohydrate production, nitrogen status and yield of barley. *African Journal of Biotechnology* 10(45): 9089-9096.
7. Baldani, J. I. and V. L. D. Baldani. 2005. History on the biological nitrogen fixation research in gramiaceous plants: special amphasis on the brazilian experience. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences* 77(3):1-50.
8. Bashan, Y., J. J. Bustillos, L. A. Leyva, J. P. Hernandez and M. Bacilio. 2006. Increase in auxiliary photoprotective photosynthetic pigments in wheat seedlings induced by *Azospirillum brasilense*. *Biology and Fertility of Soils* 42: 279-285.
9. Bates, L. S., R. P. Waldren and I. D. Teare, 1973. Rapid determination of free proline for water stress stydies. *Plant and Soil* 29: 205-207.
10. Bayat, L. and M. Askari. 2013. Inoculation effects of *Rhizobium* on the tolerance increase of Persian clover (*Trifolium resupinatum*) under SO₂ pollution. *Plant Process and Function* 2 (1) :35-46 (In Farsi).
11. Bejandi, T. K., R. S. Sharifii, M. Sedghi and A. Na-var. 2012. Effects of plant density, *Rhizobium* inoculation and microelements on nodolation, chlorophyll cotent and yield of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Annals of Biological Research* 3:951-958.
12. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
13. Caetano-Anolles, G., L. G. Wall, A. T. De-Micheli, E. M. Macchi, W. D. Bauer and G. Favelukes. 1988. Role of motility and chemotaxis in efficiency of nodulation by *Rhizobium meliloti*. *Plant Physiology* 86: 1228-1235.
14. Carrillo, A. E., C. Y. Li and Y. Bashan. 2002. Increased acidification in the rhizosphere of cactus seedlings induced by *Azospirillum brasilense*. *Naturwissenschaften* 89: 428-432.
15. Chapman, H. D. and P. F. Pratt. 1973. Métodos de Análisis Para Suelos, Plantas y Aguas. Trillas, Mexico.
16. Creus, C. M., R. J. Sueldo and C. A. Barassi. 2004. Water relations and yield in *Azospirillum* inoculated Wheat exposed to drought in the field. *Canadian Journal of Botany* 82: 273-281.
17. Dalla-Santa, O. R., R. F. Hornandez, G. L. M. Alvarez, P. R. Junior and C. R. Soccol. 2004. *Azospirillum* sp. Inoculation in wheat, barley and oats seeds greenhouse experiments. *Brazilian Archive of Biology and Technology* 47(6): 843-850.
18. Dimkpa, C., T. Weinand and F. Asch. 2009. Plant-rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. *Plant, Cell and Environment* 32: 1682-1694.
19. Etesami, H. and H. Alikhani 2011. Evaluation of plant growth hormones production (auxins) ability by Iranian soils rhizobial strains and effects of superior strains application on wheat growth indexes and the loss of chemical fertilizers. *Agronomy Journal (Pajouhesh and Sazandegi)* 92: 53-62.
20. Graham, P. H. and C. P. Vance. 2003. Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiology* 131: 872-877.
21. Hijano, C. F., M. D. P. Dom'inguez, R. G. Gim'enez, P. H. S 'anchez and I. S. Garc'ia. 2005. Higher plants as bioindicators of sulphur dioxide emissions in urban environments. *Environmental Monitoring and Assessment* 111: 75-88.
22. Hosseinkhani Hezave, Sh. and M. Askari. 2013. Effects of rhizobia inoculation on anatomical indexes of alfalfa leaf (*Medicago sativa*) under SO₂ pollution. *Plant Process and Function* 2(2): 41-52 (in Farsi).

23. Irshad, A. H., S. Fayaz Ahmad and P. Sultan. 2011. Effect of sulphur dioxide on the biochemical parameters of spinach (*Spinacea oleracia*). *Trakia Journal of Sciences* 9(1): 24-27.
24. Khan, I., A. Ahmad and M. Iqbal. 2006. Sulphur in the environment. PP. 90-99. In: P. Tandon, S. Khatri and Y.P. Abrol (Ed.), Biodiversity and its Significance. IK International, New Delhi.
25. Lang, C., J. Popko, M. Wirtz, R. Hell, C. Herschbach, J. Kreuzwieser, H. Rennenberg, R. R. Mendel and R. Hansch. 2007. Sulphite oxidase as key enzyme for protecting plants against sulphur dioxide. *Plant, Cell and Environment* 30: 447-455.
26. Lichtenthaler, H. K. and A. R. Wellburn. 1983. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions* 11: 591-592.
27. Li, L. and H. Yi. 2012. Effect of sulfur dioxide on ROS production, gene expression and antioxidant enzyme activity in Arabidopsis plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 58: 46-53.
28. López-Carrion, A. I., R. Castellano, M. A. Rosales, J. M. Ruiz and L. Romero. 2008. Role of nitric oxide under saline stress: Implications on proline metabolism. *Biologia Plantrum* 52: 587-591.
29. Rakwal, R., G. K. Agrawal, A. Kubo, M. Yonekura, S. Tamogami, H. Saji and H. Iwahashi. 2003. Defense/stress responses elicited in rice seedlings exposed to the gaseous air pollutant sulfur dioxide. *Environmental and Experimental Botany* 49: 223-235.
30. Regitano, M. A., S. M. Carpi, G. M. Camara, C. E. Bagio and E. A. Marcos. 1995. Effects of nitrogen sources on soybean (*Glycine max* (L) Merrill) oil characteristics and seed storeability. *Tropical Science* 35: 135-140.
31. Saubidet, M. I., N. Fatta and A. J. Barneix. 2002. The effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* on growth and nitrogen utilization by wheat plants. *Plant and Soil* 245: 215-222.
32. Sha, C., T. Wang, T. J. Lu. 2010. Relative sensitivity of Wetland plants to SO₂ pollution. *Wetlands* 30: 1023- 1030.
33. Silva, A. A. E., E. M. Varanda and J. Barosela. 2006. Resistance and susceptibility of alfalfa (*Medicago sativa* L.) cultivars to the aphid *Therioaphis maculate* (Homoptera: Aphididae): insect biology and cultivar evaluation. *Insect Science* 13: 55-60.
34. Singh, J. S. 2013. Plant Growth Promoting Rhizobacteria. *Resonance* 18(3): 275-281.
35. Smith, S. J., J. V. Aardenne, Z. Klimont, R. J. Andres, A. Volke and S. Delgado Arias. 2011. Anthropogenic sulfur dioxide emissions: 1850-2005. *Atmospheric Chemistry and Physics* 11: 1101-1116.
36. Sighn, S. N., M. Yunus, K. Srivastava, K. Kulshreshtha and J. Ahmad. 1985. Response of *Calendula officinalis* L. to long- term fumigation with SO₂. *Environmental Pollution* 39: 17-25.
37. Swain, S. C. and S. K. Padhi. 2013. Effect of sulphur dioxide on growth, chlorophyll and sulphur contents of pomegranate. *Tropical Agricultural Research & Extension* 16(1): 21-24.
38. Swedrzyńska, D. and A. Sawicka. 2000. Effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* on development and yielding of mize (*Zea mays* ssp. *Saccharata* L.) under different cultivation conditions. *Polish Journal of Environmental Studies* 9: 505-509.
39. Swift, M. and D. Bignell. 2001. Standard methods for assessment of soil biodiversity and land use practice. International centre for research in Agroforestry (ICRAF) Southeast Asia. Retrieved from <http://www.icraf.cgiar.org/sea>. Accessed 15 September 2009.
40. Wang, B. S. and K. F. Zhao. 1995. Comparison of extractive methods of Na⁺, K⁺ in wheat leave. *Plant Physiology Communication* 31(1): 50-52.
41. Wang, Y. X. and H. Oyaizu. 2009. Evaluation of the phytoremediation potential of four plant species for dibenzofuran-contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials* 168: 760-764.
42. Wu, S. C., Z. H. Caob, Z. G. Lib, K. C. Cheunga and M. H. Wonga. 2005. Effects of biofertilizer containing N- fixer, P and K solubilizers and AM fungi on maize growth: a greenhouse trial. *Geoderma* 125: 155-166.
43. Yang, J., J. W. Kloepper and C. Ryu. 2009. Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Plant Science* 14(1): 1-4.
44. Yue, H., W. Mo, C. Li, Y. Zheng and H. Li. 2007. The salt stress relief and growth promoting effect of Rs-5 on cotton. *Plant and Soil* 297: 139-145.