روابط خاک و گیاه / سال سیزدهم / شماره سوم / پاییز ۱۴۰۱ / صفحات ۹۰-۷۷

مقاله پژوهشی

تأثیر قارچ‌های *Serendipita indica* و *Rhizophagus irregularis* بر رشد و وضعیت تغذیه‌ای کاهو تحت تنش کروم در سیستم آبکشت

زهرا مجنونی هریس[۱]، رسول آذرمی*، علی اکبر شکوهیان، بهروز اسماعیل‌پور و علی شاهی قره‌لر

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۵/۲۸؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۹/۲)

چکیده

کروم (Cr^{+6}) یکی از فلزات سنگین است که می‌تواند فرآیندهای فیزیولوژیک را در گیاهان مختل کند. یکی از راه‌کارها برای تعدیل تنش فلزات سنگین، همزیستی ریشه گیاهان با قارچ‌های همزیست است. بنابراین به‌منظور بررسی تأثیر کروم و قارچ همزیست بر صفات رشدی و فیزیولوژیک کاهوبرگ قرمز (*Lactuca sativa* L. cv. Little Gem)، آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در چهار تکرار به‌صورت سیستم آبکشت اجرا شد. تیمارهای آزمایشی شامل عنصر سنگین کروم در سه سطح صفر، ۳ و ۱۵ میلی‌گرم در لیتر و قارچ‌های همزیست در چهار سطح شاهد، قارچ میکوریز *Rhizophagus irregularis* و قارچ *Serendipita indica* و ترکیب دو قارچ بود. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت کروم در محلول غذایی، کلونیزاسیون قارچ با ریشه، وزن تازه برگ و ریشه، محتوای کلروفیل کل، طول ریشه، مقدار نیتروژن، فسفر و پتاسیم به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. اما افزایش غلظت کروم در محلول غذایی موجب افزایش محتوای آنتوسیانین، کربوهیدرات‌های محلول و مالون دی‌آلدئید شد. همزیستی قارچ‌های *S.indica* و *R. irregularis* با گیاهان تحت تنش کروم باعث افزایش معنی‌دار محتوای کلروفیل کل، نیتروژن، فسفر و پتاسیم در مقایسه با گیاهان رشد یافته در تیمار کروم تنها و بدون قارچ‌های همزیست شد. نتایج نشان داد که کاربرد قارچ‌های *S. indica* و *R. irregularis* در شرایط سمّیت کروم منجر به بهبود رشد و صفات فیزیولوژیک و کاهش مقدار کروم در برگ کاهو شده و سبب تعدیل سمّیت کروم شد.

واژه‌های کلیدی: قارچ همزیست، کاهو، کروم، هیدروپونیک، عنصر سنگین.

مقدمه

کاهو (*Lactuca sativa* L.) از خانواده آستراسه (Asteraceae) و یکی از محبوب‌ترین سبزی‌های برگی در ایران و جهان است (۱۰ و ۱۴) که به علت داشتن مواد معدنی، ویتامین‌ها، فیبر و ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در تغذیه و سلامتی انسان اهمیت دارد (۵). مدیریت تغذیه گیاهان از عوامل کلیدی در تعیین کمّیت و کیفیت سبزی‌های برگی است. از این‌رو، کشت بدون خاک به‌عنوان یک ابزار مهم برای نیل به این هدف است که امکان کنترل دقیق تغذیه گیاه را فراهم می‌کند (۳۱). وابستگی زیاد تولیدات کشاورزی به کودهای شیمیایی چالش جدی را از نظر محیط‌زیست، بهداشت عمومی و امنیت غذایی ایجاد می‌کند. وجود عناصر آلاینده،

۱- گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: r_azarmi@uma.ac.ir

مانند کروم در کودهای شیمیایی و تجمع این عناصر سنگین موجب آلودگی آب‌های زیرزمینی و ورود آن به زنجیره غذایی می‌شود (۴۱). کروم هفتمین عنصر فراوان روی کره زمین و یکی از مهم‌ترین آلاینده‌های مهم محیطی است که طی فرآیندهای وسیع صنعتی در خاک رها شده و باعث مسمومیت گیاهان و ریزجانداران مفید می‌شود (۱). کروم شش ظرفیتی (VI) بسیار سمّی و متحرک است در حالی که کروم سه ظرفیتی (III) سمّیت کم‌تری دارد. از آنجا که گیاهان بدون ناقل اختصاصی برای انتقال کروم هستند بنابراین توسط ناقل یون-هایی مانند سولفات یا آهن جذب می‌شود (۳۴). کروم با آسیب به فرآیندهای متابولیکی ضروری گیاهان، بر رشد گیاهان تأثیر منفی می‌گذارد (۳۷). گیاهان کروم را از طریق ریشه جذب کرده و باعث آسیب به ریشه، عدم تعادل مواد معدنی و همچنین کلروز برگ می‌شود. سمّیت کروم بیوسنتز کلروفیل را با مهار فعالیت آنزیم‌های حیاتی هدف قرار می‌دهد. علاوه بر این، کروم با هدف قرار دادن مولکول‌های زیستی و غشاءهای سلولی منجر به تنش اکسیداتیو، تحریک کلروز، پژمردگی برگ‌ها و تأخیر در رشد گیاه می‌شود (۳۵). یکی از راه‌کارهای مؤثر برای کاهش آثار سمّی فلزات سنگین در گیاهان، استفاده از ریزجانداران مفید به ویژه قارچ‌های همزیست ریشه است. قارچ‌های میکوریز از ریزجانداران مهم خاک به‌شمار می‌آیند. همزیستی قارچ‌های میکوریز با ریشه گیاهان آلی، یکی از مهم-ترین انواع همزیستی اجباری در طبیعت بوده که فواید بسیاری از جمله جذب آب و عناصر معدنی و مقاومت گیاه به تنش‌های محیطی مانند آلودگی فلزات سنگین و بیماری‌ها برای گیاه میزبان دارد. این قارچ‌ها با تولید میسیلیوم‌هایی که دارای طول بیش‌تر و قطر کم‌تر نسبت به ریشه گیاه هستند امکان دسترسی به منابع، در سطوحی که ریشه قادر به نفوذ در آن نیست را فراهم می‌آورد (۲۶). قارچ اندوفیت *S. indica* در طیف گسترده‌ای از گونه‌های گیاهی با تشکیل کلنی در ریشه باعث تحریک رشد می‌شود. در آزمایشی کاربرد قارچ *S. indica* موجب افزایش وزن تازه بوته، ارتفاع گیاه و طول ریشه گیاهان کلم پیچ و اسفناج شد (۲۹). نتایج بررسی وو و همکاران (۴۲) نشان داد که همزیستی قارچ میکوریز می‌تواند سمّیت کروم را از طریق غیرمتحرک کردن کروم در ریشه و همچنین غیرفعال کردن کروم در اسپورها و هیف‌ها و بهبود وضعیت تغذیه‌ای گیاهان به‌طور قابل توجهی تعدیل کند. تاکنون پژوهشی در مورد تأثیر قارچ *S. indica* در تعدیل تنش کروم در سیستم کشت بدون خاک برای گیاه کاهو انجام نشده است. بنابراین این پژوهش به‌منظور بررسی تأثیر برهمکنش کروم و قارچ‌های همزیست بر ویژگی‌های مورفولوژیک و بیوشیمیایی کاهو انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

به‌منظور ارزیابی تأثیر عنصر کروم و قارچ همزیست بر رشد و وضعیت تغذیه‌ای کاهو، آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در چهار تکرار به‌صورت کشت بدون خاک در گلخانه دانشگاه محقق اردبیلی در سال ۱۴۰۰ اجرا شد. تیمارها شامل کروم و قارچ‌های همزیست *S. indica* و *R. irregularis* بودند. تیمار کروم در سه سطح صفر (شاهد)، ۳ و ۱۵ میلی‌گرم در لیتر به فرم کرومات پتاسیم شش ظرفیتی به همراه محلول غذایی اعمال شد و تیمار قارچ‌های همزیست شامل بدون تلقیح (شاهد)، قارچ میکوریز *R. irregularis*، قارچ *S. indica* و ترکیب دو قارچ *S. indica* و *R. irregularis* بودند. برای تهیه *S. indica*، این قارچ در ظروف پتری در محیط Kafe Hill - کشت شد. پلیت‌ها به مدت ۲ هفته در محفظه رشد با دمای ۱±۲۹ درجه سلسیوس قرار گرفتند. قارچ میکوریز (*R. irregularis*) از گروه خاک‌شناسی دانشگاه تبریز تهیه شد. به‌منظور اجرای این آزمایش، بذر کاهوی برگ قرمز (*Lactuca sativa* cv.Little Gem) در سینی‌های کشت حاوی کوکوپیت و پرلیت به نسبت ۱:۱ کشت شد. برای تلقیح قارچ *S. indica* یک تکه از قارچ به قطر ۱۰ میلی‌متر در عمق ۱ سانتی‌متری زیر بذر کاهو قرار داده شد و برای تلقیح میکوریز، این قارچ با بستر کشت به‌صورت یکنواخت مخلوط شد و سپس بذر کاشته شد

(۱۲). دانهال‌ها با ظهور چهارمین برگ حقیقی به گلدان پنج لیتری با محیط کشت کوکوپیت و پرلیت با حجم مساوی از هریک منتقل شدند. پس از انتقال گیاهچه‌ها به بستر اصلی کشت گیاهان دو بار در روز و در هر نوبت ۲۰۰ میلی‌لیتر محلول غذایی با ترکیب شیمیایی با واحد $mg\ L^{-1}$ (NH_4<10; NO_3=150; PO_4=50; K= 160; Ca= 150; Mg= 50; Fe=3; Mn=0.5; Zn= 0.44; Cu= 0.03; B= 0.01;) آبیاری شدند (۱۷). مقدار pH محلول غذایی برابر۶/۲ و رسانایی الکتریکی برابر ۱/۶ دسی‌زیمنس بر متر تنظیم شده بود. میانگین دمای گلخانه در روز ۲±۱۹ درجه سلسیوس و در شب ۲± ۱۵ درجه سلسیوس و میانگین رطوبت نسبی ۷۰ درصد بود.

اندازه‌گیری وزن تازه برگ و ریشه و طول ریشه: در پایان دوره آزمایش (دو ماه پس از کاشت)، گیاه از بستر کشت خارج شده و به برگ و ریشه تقسیم شد. سپس وزن تازه برگ و ریشه با استفاده از ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۰۱ گرم اندازه‌گیری شد. سپس این اندام‌ها در آون در دمای ۷۰ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شدند و در نهایت وزن خشک آن‌ها با ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۰۱ گرم ثبت شد. همچنین نسبت وزن خشک برگ به ریشه محاسبه شد. طول ریشه کاهو با خط‌کش اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری درصد کلونیزاسیون ریشه: برای اندازه‌گیری درصد کلونیزاسیون ریشه در هر بوته از روش فیلیپ و هایمن استفاده شد (۲۸). در ابتدا چندین قطعه نازک از ریشه گیاه جدا شده و با آب شسته شد و نمونه‌های ریشه به طول یک سانتی‌متر برش داده شدند. ابتدا ریشه‌ها در محلول هیدروکسید پتاسیم ۱۰ درصد و سپس در محلول اسید کلریدریک یک درصد به مدت ۵ دقیقه نگهداری شدند؛ در نهایت ریشه‌ها در محلول رنگ تریپان بلو ۰/۰۵ درصد به مدت یک ساعت در دمای ۹۰ درجه سلسیوس قرار داده شد و درصد کلونیزاسیون ریشه با استفاده از خطوط متقاطع اندازه‌گیری گردید. برای تعیین درصد کلونیزاسیون با استفاده از روش تقاطع قسمت‌هایی از ریشه که رنگ گرفته بودند و خطوط را قطع کرده بودند شمارش شد و سپس کلیه قسمت‌های ریشه که خطوط را قطع کرده بودند شمارش شدند. اندازه‌گیری درصد کلونیزاسیون با استفاده از روش تقاطع از طریق رابطه زیر به‌دست آمد:

/ (همزیستی دارای تقاطع)

(۱) ۱۰۰ × (همه خطوط قطع شده توسط ریشه)

اندازه‌گیری کلروفیل کل: اندازه‌گیری محتوای کلروفیل کل با استفاده از روش آرنون (۲) انجام شد. برای انجام آن، مقدار ۰/۱ گرم از بافت تازه برگ با ۳ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد در درون هاون چینی به‌طور کامل هموژن شد. محلول حاصل در ۶۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. اندازه‌گیری کلروفیل a و b با دستگاه اسپکتروفتومتر (6705 UV/VIS Spectrophotometer, England) به‌ترتیب در طول موج‌های ۶۶۳ و ۶۴۶ نانومتر انجام شد. محتوای کلروفیل بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تازه از رابطه زیر محاسبه شد:

$$Chl.T = \frac{(20.2 \times D645) + (8.02 \times D663) \times V}{1000 \times W} \quad (۲)$$

که در این رابطه D645: کلروفیل *b*، D663: کلروفیل *a*، V: حجم عصاره، W: وزن نمونه برگ است.

سنجش آنتوسیانین: برای اندازه‌گیری آنتوسیانین ۰/۲ گرم از نمونه گیاهی با ۳ میلی‌لیتر متانول اسیدی (متانول و اسید کلریدریک به نسبت ۹۹ به ۱ مخلوط و خوب ساییده شد و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. به دنبال آن محلول‌رویی به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سلسیوس و در تاریکی نگه‌داری شدند. میزان جذب رنگیزه آنتوسیانین در طول موج ۵۵۰ نانومتر قرائت شد. محتوای آنتوسیانین کل براساس مقدار سیانیدین ۳–گلیکوزید به‌عنوان آنتوسیانین غالب محاسبه شد (۴۳).

سنجش کربوهیدرات‌های محلول: محتوای کربوهیدرات‌های محلول نمونه‌ها با استفاده از معرف آنترون اندازه‌گیری شد (۱۱). مقدار ۰/۱ گرم بافت تازه برگ در ۵ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد هموژن شد. سپس محلول به مدت ۶۰ دقیقه در بن‌ماری با دمای ۹۵ درجه سلسیوس قرار گرفت تا کربوهیدرات‌های محلول استخراج شوند. سپس به ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره تهیه

شده ۳ میلی‌لیتر معرف آنترون افزوده شد و پس از ورتکس به مدت ۲۰ دقیقه در بن ماری آب جوش قرار گرفت. پس از سرد شدن، جذب نمونه‌ها در طول موج ۶۲۰ نانومتر با دستگاه طیف‌سنج (6705 UV/VIS Spectrophotometer, England) قرائت شد. از گلوکز با غلظت‌های صفر تا ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر به‌عنوان محلول‌های استاندارد استفاده شد.

تعیین محتوای کروم: برای تهیه عصاره نمونه‌ها، ۰/۵ گرم از برگ آسیاب شده در کوره به مدت ۴ ساعت در دمای ۵۵۰ درجه سلسیوس خاکستر شد. سپس با استفاده از اسید کلریدریک ۶ نرمال عصاره برگ آماده شد و مقدار کروم در عصاره با دستگاه جذب اتمی مدل Jena AAS در طول موج ۳۵۷ نانومتر تعیین شد.

سنجش محتوای نیتروژن، فسفر و پتاسیم برگ: مقدار نیتروژن کل در برگ طی مراحل هضم نمونه، تقطیر و تیتراسیون به روش کجلدال اندازه‌گیری شد. برای هضم نمونه‌ها، برگ‌های خشک شده در آون با آسیاب برقی به‌صورت یکنواخت پودر شدند. سپس ۰/۵ گرم از پودر آماده به لوله‌های هضم که حاوی قرص‌های کاتالیزور بود افزوده شد و در پی آن ۱۰ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۹۸ درصد به لوله‌ها افزوده شد لوله‌های هضم روی اجاق هضم قرار گرفته تا رنگ محلول به‌صورت سبز کم‌رنگ و شفاف ظاهر شود. سپس نیتروژن موجود در سولفات آمونیوم به‌صورت گاز آمونیاک آزاد و توسط اسیدبوریک به بورات آمونیوم تبدیل و با استفاده از اسید سولفوریک ۰/۱ نرمال تیتر شد و آنگاه با محاسبه اسید مصرفی مقدار نیتروژن به‌دست آمد. سرانجام مقدار نیتروژن کل در بافت خشک برگ‌ها محاسبه شد. برای اندازه‌گیری فسفر، به ۲ میلی‌لیتر عصاره حاصل از هضم خشک، ۲ میلی‌لیتر معرف نیترو وانادومولیبدات و ۸ میلی‌لیتر آب مقطر افزوده شد و پس از گذشت یک ساعت و تشکیل کمپلکس زرد رنگ، مقدار جذب محلول‌ها در طول موج ۴۳۰ نانومتر، توسط دستگاه طیف‌سنج نوری (6705 UV/VIS Spectrophotometer, England) قرائت شد. غلظت پتاسیم در نمونه‌های گیاهی توسط دستگاه فلایم فتومتر (PEP 7 and PEP 7/C, Jenway, UK) با استفاده از روش شعله‌سنجی اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری میزان مالون دی‌آلدئید (MDA): برای این منظور، مقدار ۰/۱ گرم ماده تازه گیاهی به همراه سه میلی‌لیتر تری‌کربوکسیلیک اسید یک درصد هموژن شد. سپس به ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره رویی، ۲ میلی‌لیتر محلول ۰/۵ درصد تیوباربیتویک اسید حاوی تتراکلرواستیک اسید ۲۰ درصد افزوده شد. مخلوط واکنش در دمای ۹۵ درجه سیلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه در حمام بخار قرار گرفت و سپس واکنش در آب یخ متوقف شد. سرانجام جذب محلول رویی حاصل در دو طول موج ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر قرائت شده و از طریق رابطه زیر محاسبه شد (۱۶):

$$MAD= (A532-A600) /155 \quad (۳)$$

که در این رابطه A: جذب و MDA: مالون دی‌آلدئید است.

تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ انجام شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد انجام شد.

نتایج و بحث

وزن تازه برگ و ریشه: براساس نتایج تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۱)، وزن تازه برگ به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر اثر ساده کروم و قارچ همزیست قرار گرفت. اما اثر برهم‌کنش آن‌ها بر این صفت معنی‌دار نشد. همچنین اثر اصلی قارچ‌های همزیست بر شاخص وزن تازه ریشه نیز معنی‌دار بود. به‌طوری که با افزایش غلظت کروم از صفر به ۱۵ میلی‌گرم در لیتر، وزن تازه برگ و ریشه به‌ترتیب ۲۲ و ۱۸ درصد کاهش یافت. گیاهان تلقیح شده با *S. indica* و *R. irregularis* در مقایسه با گیاهان شاهد ۱۳/۵ درصد وزن تازه ریشه بیش‌تری داشتند (جدول ۲). کاهش صفات رویشی در اثر سمیّت کروم ممکن است ناشی از کاهش رشد ریشه‌ها و به دنبال آن کاهش انتقال آب و مواد معدنی از ریشه‌ها به بخش‌های هوایی گیاه باشد (۹ و ۳۶). براساس نتایج این پژوهش، کاهش رشد برگ در اثر کاربرد کروم ممکن است ناشی از کاهش درصد کلونیزاسیون

جدول ۱. تجزیه واریانس تأثیر تیمارهای کروم و قارچ‌های همزیست بر صفات رشدی کاهو

Table 1. Analysis of variance of the effect of chromium and symbiotic fungi treatments on lettuce growth traits

		میانگین مربعات (Mean Squares)					
منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	وزن تازه برگ Shoot fresh weight	وزن تازه ریشه Root fresh weight	طول ریشه Root length	نسبت برگ به ریشه Shoot to root ratio	کلونیزاسیون ریشه Root colonization	کروم Chromium
کروم (Cr)	2	2706.35**	136.13**	5.81^{ns}	0.041^{ns} *	660.43**	2250*
قارچ (Fungus)	3	760.65*	13.43^{ns}	93.17**	0.663*	15743.18**	11.25**
کروم × قارچ (Cr × Fungus)	6	125.39^{ns}	1.001^{ns}	1.51^{ns}	0.170^{ns}	75.27**	6.60**
خطا (Error)	36	200.40	7.37	13.79	0.157	13.50	0.958
ضریب تغییرات CV(%)		11.2	9.6	12.9	10.1	6.7	11.4

ns ،** و *: به‌ترتیب بیانگر اثر غیرمعنی‌دار و اثر معنی‌دار در سطوح احتمال یک و پنج درصد است.

ns, ** and * denote non-significant and significant effects at the 1 and 5 % probability levels, respectively.

جدول ۲. مقایسه میانگین اثر اصلی کروم و قارچ‌های همزیست بر صفات رشدی کاهو

Table 2. Mean comparisons of the main effects of chromium and symbiotic fungi on lettuce growth traits

	تیمارها Treatments	وزن تازه برگ Shoot fresh weight (g plant^{-1})	وزن تازه ریشه Root fresh weight (g plant^{-1})	طول ریشه Root length (cm)	نسبت برگ به ریشه Shoot to root ratio	کربوهیدرات‌های محلول Soluble carbohydrates (mg g^{-1} FW)
Cr	0	139 a	30.5 a	29.4 a	3.95 a	0. 12 b
	3	124 b	29.3 a	28.5 a	3.91 a	0. 13 b
	15	113 c	25.0 b	28.2 a	3.85 a	0 .14 a
Fungi	شاهد	115 b	27.0 a	24.6 b	3.57 b	0.15 a
	S.indica	122 ab	29.2 a	30.7 a	4.10 a	0.13 b
	R. irregularis	130 a	29.0 a	29.4 a	3.90 a	0.12 b
	S.indica × *R. irregularis*	133 a	27.8 a	30.0 a	4.04 a	0.12 b

حروف مشابه در هر ستون و هر گروه بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد است.

Means with the same letters in each column and each group indicate no significant difference based on Duncan's test at 5% level.

ریشه و محتوای کلروفیل، کاهش جذب عناصر نیتروژن، فسفر و پتاسیم و آسیب به غشاء سلولی باشد. استفاده از قارچ‌های همزیست *S. indica* و *R. irregularis* وزن تازه برگ را بهبود بخشید. یافته‌های پژوهش‌گران دیگر در گیاه کلم چینی (۴۰) و ذرت (۲۱) نشان می‌دهد که قارچ *S. indica* موجب افزایش وزن تازه برگ شد. یکی از ویژگی‌های مهم قارچ *S. indica* این است که رشد را در اکثر گیاهان همزیست افزایش داده و به‌عنوان یک کود بیولوژیک قلمداد می‌شود. گیاهانی که با قارچ *S. indica* تیمار شده‌اند، میزان اکسین بیش‌تری نسبت به شاهد دارند. با توجه به نقش اکسین در انگیزش ریشه نابجا در گیاه سالم و قلمه‌ها، افزایش ریشه‌های جانبی می‌تواند ساده‌ترین دلیل از چگونگی اثر قارچ بر رشد گیاهان باشد (۸).

نسبت وزن خشک برگ به ریشه: نتایج تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۱) نشان داد که اثر ساده تیمار قارچ‌های همزیست بر نسبت وزن خشک برگ به ریشه معنی‌دار شد و ریشه کاهوی همزیست با قارچ‌های *S.indica* و *R. irregularis* نسبت به گیاهان غیرهمزیست از نسبت وزن خشک برگ به ریشه بیش‌تری برخوردار بودند (جدول ۲). با توجه به نتایج این پژوهش، تأثیر قارچ‌های همزیست بر وزن ریشه از نظر آماری معنی‌دار نبود ولی اثر این تیمار بر وزن برگ از نظر آماری معنی‌دار بود که این امر می‌تواند باعث افزایش نسبت وزن خشک برگ به ریشه شود.

طول ریشه: جدول (۱) نشان می‌دهد که اثر اصلی قارچ‌های همزیست بر طول ریشه معنی‌دار بود. با این‌حال تأثیر تیمار کروم بر طول ریشه معنی‌داری نبود به‌طوری که با افزایش غلظت کروم در محلول غذایی طول ریشه کاهش یافت. طول ریشه در گیاهان تلقیح نشده با قارچ نسبت به گیاهان تلقیح شده با *S. indica* در حدود ۲۰ درصد کم‌تر بود و اختلاف معنی‌داری از نظر آماری بین تیمار قارچ‌های همزیست وجود نداشت (جدول ۲). همسو با نتایج پژوهش حاضر، افزایش طول ریشه در همزیستی با قارچ *S. indica* در نعناع فلفلی و آویشن (۱۹) نیز گزارش شده است. اثربخشی مثبت قارچ همزیست ممکن است به‌خاطر سنتز هورمون‌های محرک رشد مانند ایندول استیک اسید توسط قارچ‌های همزیست باشد که باعث افزایش رشد طولی ریشه شده و از طرفی قارچ‌های همزیست با گسترش شبکه میسلیومی در ریشه گیاه موجب افزایش سطح ریشه می‌شود (۷).

درصد کلونیزاسیون ریشه: براساس نتایج تجزیه واریانس داده‌ها، درصد کلونیزاسیون ریشه تحت تاثیر آثار ساده و برهمکنش تیمار کروم و قارچ‌های همزیست قرار گرفت (جدول ۱). نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بیش‌ترین درصد همزیستی (۸۲ درصد) مربوط به قارچ *S. indica* تحت غلظت صفر کروم بود. اگر چه از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری بین *S. indica* و *R. irregularis* و اثر ترکیبی آن‌ها وجود نداشت ولی درصد همزیستی همه قارچ‌ها با افزایش غلظت کروم در محلول غذایی کاهش یافت به‌طوری که کم‌ترین درصد همزیستی (۶۲ درصد) در ریشه کاهو مربوط به تیمار قارچ *R. irregularis* تحت غلظت ۱۵ میلی‌گرم در لیتر کروم بود (جدول ۴). افزایش غلظت کروم باعث کاهش درصد همزیستی قارچ با ریشه کاهو شد. در پژوهشی که روی گیاه آفتابگردان (۶) در شرایط آلودگی با فلز سنگین سرب و همزیستی با قارچ میکوریز صورت گرفت، نتایج نشان داد که با افزایش غلظت فلز سنگین، درصد کلونیزاسیون ریشه کاهش پیدا می‌کند که با نتایج این پژوهش همخوانی دارد. صدمه به گیاه در اثر سمیّت کروم موجب کاهش سنتز کربوهیدرات شده و گیاه قادر به تأمین کربوهیدرات کافی برای قارچ‌های همزیست نمی‌شود (۲۷).

غلظت کروم برگ: جدول (۱) نشان می‌دهد که آثار ساده و برهمکنش تیمار کروم و قارچ‌های همزیست بر محتوای کروم برگ معنی‌دار بود. به‌طوری که با افزایش غلظت کروم در محلول غذایی مقدار کروم برگ گیاه کاهو افزایش یافت ولی تلقیح ریشه کاهو با قارچ همزیست توانست مقدار کروم در برگ را کاهش دهد و بیش‌ترین تأثیر کاهش کروم مربوط به ترکیب قارچ‌های همزیست *S. indica* و *R. irregularis* بود. مقدار کروم در برگ گیاهان تلقیح نشده در مقایسه با گیاهان همزیست با ترکیب قارچ‌های *S. indica* و *R. irregularis* تحت غلظت‌های ۳ و ۱۵ میلی‌گرم در لیتر کروم به‌ترتیب ۲۴/۵ و ۲۲/۷ درصد بیش‌تر بود (جدول ۴). نتایج این بررسی همسو با یافته‌های دیویس و همکاران (۷) در قارچ میکوریز بوده است و این قارچ توانست تا حدودی سمیّت کروم را در گیاه آفتابگردان تعدیل کند. حضور قارچ همزیست سبب تثبیت فلزات سنگین در میسلیوم‌های خود و یا در ریشه گیاه شده و از انتقال آن به اندام هوایی جلوگیری می‌کند. همچنین کروم با تشکیل کمپلکس و تسهیل تولید متابولیت‌های گوگردی مقاومت گیاه را به کروم افزایش می‌دهد (۴۳).

مقدار نیتروژن، فسفر و پتاسیم: جدول (۳) نشان می‌دهد که مقدار نیتروژن، فسفر و پتاسیم برگ از آثار ساده و برهمکنش

جدول ۳. تجزیه واریانس تأثیر تیمارهای کروم و قارچ‌های همزیست بر صفات فیزیولوژیک کاهو

Table 3. Analysis of variance of the effect of chromium and symbiotic fungi treatments on lettuce physiological traits

میانگین مربعات (Mean Squares)								
مالون دی‌آلدئید Malon dialdehyde	کربوهیدرات‌های محلول Soluble carbohydrates	آنتوسیانین Anthocyanine	پتاسیم Potassium	فسفر Phosphorous	نیتروژن Nitrogen	کلروفیل Chlotophyll	درجه آزادی df	منابع تغییرات S.O.V
35.50**	0.002**	290.65**	2.340**	0.119**	0.419**	0.012**	2	کروم (Cr)
13.59**	0.003**	187.85**	1.478**	0.058**	0.553**	0.016**	3	قارچ (Fungus)
4.80**	8.75^{ns}	12.19*	0.153**	0.012**	0.033*	0.001**	6	کروم × قارچ (Cr × Fungus)
0.135	0.0003	0.193	6.667E-5	0.002	0.015	0.0001	36	خطا (Error)
13.2	12.89	10.80	0.58	8.30	4.19	8.2		ضریب تغییرات CV(%)

ns ،** و *: به‌ترتیب بیانگر اثر غیرمعنی‌دار و اثر معنی‌دار در سطوح احتمال یک و پنج درصد است.

ns, ** and * denote non-significant and significant effects at the 1 and 5 % probability levels, respectively.

جدول ۴. مقایسه میانگین اثر برهم‌کنش کروم و قارچ‌های همزیست بر صفات فیزیولوژیک کاهو

Table 3. Mean comparisons of the interaction effect of chromium and symbiotic fungi on lettuce physiological traits

مالون دی‌آلدئید Malone di aldehyde (mg g^{-1} FW)	فسفر (درصد) Phosphorus (٪)	پتاسیم Potassium (٪)	نیتروژن Nitrogen (٪)	کروم Chromium (mg kg^{-1} DW)	کلونیزاسیون ریشه Root colonization (٪)	قارچ همزیست Symbiotic fungus	کروم (mg L^{-1}) Chromium
1.60 ^{d}	0.580 ^{cd}	4.32 ^{e}	2.88 ^{cde}	0 ^{e}	0 ^{e}	شاهد	0
1.40 ^{d}	0.655 ^{ab}	4.98 ^{b}	3.21 ^{a}	0 ^{e}	82.2 ^{a}	*S. indica*	
1.18 ^{d}	0.685 ^{a}	5.12 ^{a}	3.19 ^{a}	0 ^{e}	78.5 ^{ab}	*R. irregularis*	
1.45 ^{d}	0.582 ^{cd}	4.88 ^{c}	3.06 ^{ab}	0 ^{e}	81.0 ^{a}	*S.indica* × *R. irregularis*	
3.58 ^{b}	0.430 ^{f}	3.94 ^{h}	2.67 ^{f}	4.40 ^{d}	0^{e}	شاهد	3
2.43 ^{c}	0.520 ^{e}	4.88 ^{c}	2.99 ^{cd}	3.31 ^{d}	73.0 ^{bc}	*S. indica*	
1.61 ^{d}	0.620 ^{bc}	4.32 ^{e}	3.14 ^{ab}	3.60 ^{d}	72.5 ^{c}	*R. irregularis*	
2.51 ^{c}	0.540 ^{de}	4.04 ^{g}	2.84 ^{def}	3.32 ^{d}	74.0 ^{bc}	*S.indica* × *R. irregularis*	
7.69 ^{a}	0.310 ^{g}	3.75 ^{g}	2.33 ^{g}	25.19 ^{a}	0 ^{e}	شاهد	15
3.51 ^{b}	0.435 ^{f}	4.60 ^{d}	2.97^{cde}	21.27 ^{b}	64.0^{d}	*S. indica*	
2.66 ^{c}	0.510 ^{e}	4.13 ^{f}	2.96 ^{cde}	22.46 ^{b}	62.2^{d}	*R. irregularis*	
3.57 ^{b}	0.560 ^{de}	3.85 ^{i}	2.78 ^{ef}	19.53 ^{c}	64.2^{d}	*S.indica* × *R. irregularis*	

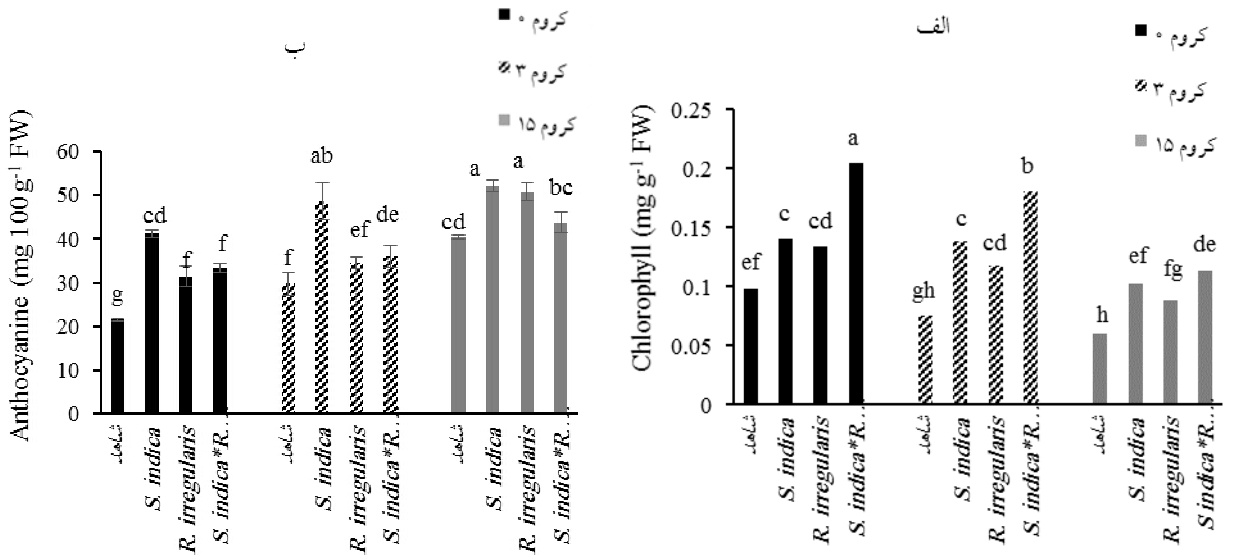
حروف مشابه در هر ستون بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد است.

Means with the same letters in each column indicate no significant difference based on Duncan's test at 5% level.

کروم و قارچ‌های همزیست تاثیر معنی‌دار پذیرفت. به‌طوری که با افزایش غلظت کروم از تیمار شاهد به ۱۵ میلی‌گرم در لیتر در محلول غذایی، مقدار نیتروژن برگ ۱۹ درصد کاهش یافت. مقدار فسفر کل برگ با افزایش غلظت کروم در محلول غذایی به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. بیش‌ترین مقدار فسفر برگ در گیاهان تغذیه شده با غلظت صفر میلی‌گرم در لیتر کروم و همزیست با میکوریز *R. irregularis* در حدود ۲۹ درصد بیش‌تر از گیاهان تغذیه شده با کروم ۱۵ میلی‌گرم در لیتر و بدون تلقیح با قارچ همزیست بود. روند تغییرات مقدار پتاسیم برگ مشابه مقدار فسفر بود (جدول ۴). تیمار ترکیب دو قارچ *S. indica* و میکوریز *R. irregularis* به ویژه در زمان سمّیت کروم سبب کاهش معنی‌دار مقدار عناصر پتاسیم و فسفر شد. همزیستی ریشه با قارچ‌ها بر افزایش مقدار نیتروژن در گیاه کاهو تأثیر معنی‌داری داشت. در سطوح بالای آلودگی کروم، کارایی قارچ‌های همزیست به ویژه *S. indica* در افزایش مقدار نیتروژن در برگ مشهودتر بود که این امر می‌تواند یکی از عوامل تعدیل آثار سمی کروم در این گیاه باشد (جدول ۴). با افزایش غلظت کروم کارایی قارچ‌های همزیست در افزایش مقدار فسفر برگ واضح بود. نتایج این پژوهش همسو با یافته‌های دیویس و همکاران (۷) بود که گزارش کردند با افزایش غلظت کروم، مقدار نیتروژن، فسفر و پتاسیم برگ کاهش نشان یافت و همزیستی با قارچ میکوریز مقدار این عناصر را در بافت گیاه آفتابگردان نسبت به گیاهان بدون تلقیح افزایش داد. نتایج پژوهش روی گیاه کاهو (۱۸) نشان داد که همزیستی با قارچ میکوریز نسبت به گیاهان غیرهمزیست می‌تواند باعث افزایش معنی‌دار نیتروژن برگ شود. روند کاهشی در محتوای نیتروژن، فسفر و پتاسیم و عناصر دیگر در شرایط سمّیت کروم می‌تواند ناشی از کاهش رشد ریشه و اختلال در توسعه ریشه در بستر رشد و کاهش سنتز ATP در اثر آسیب به غشاء سلولی باشد (۷). افزایش میزان نیتروژن در گیاهان تیمار شده با قارچ میکوریز ممکن است به دلیل گسترش مسیلیوم‌های خارجی قارچ آربوسکولار و فراهمی بیش‌تر نیتروژن برای گیاه و همچنین جذب بیش‌تر آمونیوم به خاطر اسیدی شدن محیط ریزوسفر ریشه گیاه باشد (۱۵ و ۲۵). همزیستی ریشه گیاهان با قارچ مایکوریز در مقایسه با گیاهان غیرهمزیست می‌تواند جذب عناصر فسفر و پتاسیم را افزایش دهد (۷).

محتوای کلروفیل کل: با توجه به نتایج تجزیه واریانس داده‌ها، غلظت کلروفیل کل متأثر از آثار ساده و برهمکنش تیمار کروم و قارچ‌های *S. indica* و *R. irregularis* بود (جدول ۳). مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بیش‌ترین محتوای کلروفیل کل (۰/۲۰۵ میلی‌گرم بر گرم وزن تازه) در گیاهان تغذیه شده با غلظت صفر میلی‌گرم در لیتر کروم و همزیست با ترکیب دو قارچ‌های همزیست به‌دست آمد به‌طوری که با تشدید سمّیت کروم محتوای کلروفیل کل نسبت به شاهد بدون کروم کاهش یافت. قارچ‌های همزیست باعث افزایش محتوای کلروفیل شده و آثار سمّیت کروم را تعدیل کردند (شکل ۱-الف). نتایج این پژوهش نشان داد که با افزایش غلظت کروم در محلول غذایی، محتوای کلروفیل کل در برگ کاهش می‌یابد که با نتایج بسیاری از پژوهش‌گران در بررسی اثر کروم بر محتوای رنگیزه‌های گیاهی در گیاهان برنج (۳۸)، ذرت (۳۰)، گندم (۳۹) و جعفری (۴۵) همخوانی دارد. سنتز رنگیزه کلروفیل به ذخیره کافی از عنصر منیزیم در مولکول پروتوپورفیرین که پیش‌ساز سنتز کلروفیل می‌باشد وابسته است. به‌نظر می‌رسد مقدار زیاد کروم از اتصال منیزیم به مولکول پروتوپورفیرین جلوگیری می‌کند، و درنتیجه محتوای رنگیزه کلروفیل کاهش می‌یابد (۴). نتایج یانگ و همکاران (۴۴) نشان داد که میزان کلروفیل در گیاهان دارای همزیستی نسبت به گیاهان شاهد بیش‌تر است و این ممکن است به دلیل افزایش جذب آب و عناصر غذایی به ویژه منیزیم و نیتروژن در گیاهان همزیست نسبت به شاهد باشد (۲۳). کاهش محتوای کلروفیل کل در برگ به خاطر آن است که این رقم کاهو دارای برگ قرمز بود و محتوای آنتوسیانین بیش‌تری داشت.

آنتوسیانین: براساس نتایج تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۳)، مقدار آنتوسیانین برگ به‌طور معنی‌داری متأثر از آثار ساده و برهمکنش کروم و قارچ *S. indica*، *R. irregularis* بود



شکل ۱. مقایسه میانگین اثر برهمکنش غلظت کروم و قارچ‌های همزیست *S. indica* و *G. intraradices* بر کلروفیل کل (الف) و آنتوسیانین (ب)؛ ستون‌هایی که دارای حروف مشترک هستند براساس آزمون دانکن در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌دار ندارند.

Fig. 1. Mean comparisons of the interaction effect of chromium concentration and and symbiotic fungi (*S. indica* and *G. intraradices*) on total chlorophyl (A) and anthocyanine (B); Bars with similar letters are not significantly different (Duncan, $p < 0.05$).

به‌طوری که با افزایش غلظت کروم در محلول غذایی مقدار رنگیزه آنتوسیانین برگ افزایش یافت و تلقیح ریشه گیاهان با قارچ همزیست منجر به افزایش رنگیزه آنتوسیانین در برگ کاهو شد (شکل ۱–ب). مقدار رنگیزه آنتوسیانین در گیاهان تغذیه شده با ۱۵ میلی‌گرم در لیتر کروم و تلقیح شده با قارچ *S. indica* در حدود ۴۱ درصد بیش‌تر از تیمار شاهد کروم و بدون همزیست با قارچ بود. آنتوسیانین‌ها گروهی از رنگیزه‌های گیاهی هستند که مسئول رنگ قرمز، بنفش و آبی در گل‌ها، میوه‌ها و سبزیجات هستند و در پاسخ به تنش‌های مختلف از جمله فلزات سنگین در گیاهان افزایش می‌یابد (۱۳). تحت تنش عناصر سنگین، میزان آنتوسیانین در گیاه افزایش می‌یابد، زیرا این ترکیبات به‌عنوان آنتی‌اکسیدان عمل کرده و آثار تخریبی رادیکال‌های آزاد اکسیژن را در گیاهان کاهش می‌دهد (۲۴). نتایج مشابهی مبنی بر افزایش تجمع آنتوسیانین در کاربرد قارچ میکوریز در گیاه ریحان (۲۲) و نعناع (۳) نیز گزارش شده است. هم‌راستا با این نتایج، افزایش محتوای آنتوسیانین در شلغم همزیست با میکوریز گزارش شده است (۲۰).

کربوهیدرات‌های محلول: نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان می‌دهد که اثر ساده تیمار کروم و قارچ *S. indica* و *R. irregularis* بر محتوای کربوهیدرات‌های محلول معنی‌داری شد (جدول ۳) اما اثر برهم‌کنش آن‌ها معنی‌دار نشد. مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد با افزایش غلظت کروم در محلول غذایی مقدار کربوهیدرات‌های محلول برگ افزایش یافت. به‌طوری که با افزایش غلظت کروم از صفر به ۱۵ میلی‌گرم بر لیتر مقدار کربوهیدرات‌های محلول ۱۳ درصد افزایش یافت (جدول ۴). مقدار کربوهیدرات‌های محلول در گیاهان غیرهمزیست نسبت به گیاهان همزیست با قارچ به‌طور معنی‌داری بیش‌تر بود ولی بین قارچ‌های همزیست اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (جدول ۲). کربوهیدرات‌های محلول یکی از اسمولیت‌های سازگار هستند که به‌عنوان محافظت‌کننده اسمزی در تنظیم اسمزی سلول نقش دارند و در پاسخ به تنش‌های محیطی تجمع می‌یابند. زیرا کربوهیدرات‌های محلول در شرایط تنش‌های غیرزیستی نقش اساسی در حفاظت، تنظیم اسمزی، ذخیره کربن و مهار رادیکال آزاد دارند (۳۳). تنش‌های

مختلف مانند شوری، خشکی، دمای کم و سمّیت فلزات سنگین که به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم منجر به تجمع گونه‌های اکسیژن فعال می‌شوند، باعث تجمع کربوهیدرات‌های محلول شده که به‌عنوان مکانیسم سازشی پاسخ به تنش است (۳۲).

مالون دی‌آلدئید: جدول (۳) نشان می‌دهد که مالون دی‌آلدئید به‌طور معنی‌داری متأثر از آثار ساده و برهمکنش کروم و قارچ-های همزیست *S.indica* و *R. irregularis* بود. به‌طوری که با افزایش غلظت کروم، مقدار مالون دی‌آلدئید نیز افزایش یافت. در تیمار شاهد کروم، بین گیاهان همزیست و غیرهمزیست با قارچ اختلاف معنی‌داری از نظر میزان مالون دی‌آلدئید وجود نداشت در حالی که با افزایش غلظت کروم در محلول غذایی به ویژه در غلظت ۱۵ میلی‌گرم در لیتر، بین کاهوهای همزیست و غیرهمزیست با قارچ تفاوت چشمگیری از نظر میزان مالون دی‌آلدئید وجود داشت (جدول ۴). گیاهان همزیست با *S. indica* و *R. irregularis* مقدار مالون دی‌آلدئید کم‌تری در مقایسه با گیاهان غیرهمزیست داشتند. در شرایط تنش کروم، با افزایش شدید رادیکال‌های آزاد اکسیژن محتوای مالون دی‌آلدئید نیز افزایش نشان داد. تغییرات در فعالیت‌های مختلف فیزیولوژیک و بیوشیمیایی در ریحان مقدس *Ocimum tenuiflorum* نشان‌دهنده آن است که تنش کروم با تولید مالون دی‌آلدئید، موجب تحریک تخریب غشاء می‌شود (۳۷). نتایج رحمتی و خارا (۳۰) بیان‌کننده کاهش میزان مالون دی‌آلدهید در گیاه ذرت همزیست با قارچ مایکوریز *R. irregularis* در معرض تنش کروم بوده است. آن‌ها گزارش کردند میکوریز، تنش اکسیداتیو و تولید گونه‌های فعال اکسیژن را تعدیل کرده و میزان آسیب عوامل تنش‌زا در گیاهان میکوریزی نسبت به سایر گیاهان کم‌تر بود. در نتیجه، میزان مالون دی‌آلدهید در این گیاهان کاهش یافته بود.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این پژوهش بیان‌گر آن است که تنش کروم باعث کاهش ویژگی‌های رشدی و فیزیولوژیک کاهو شد و به ویژه آثار سمّی کروم با غلظت ۱۵ میلی‌گرم در لیتر نسبت به ۳ میلی‌گرم در لیتر در محلول غذایی شدیدتر بود. قارچ‌های همزیست *S. indica* و *R. irregularis* باعث بهبود رشد و ویژگی‌های فیزیولوژیک در کاهوی برگ قرمز شد. همچنین این قارچ‌ها جذب کروم توسط کاهوی برگ قرمز را کاهش داده و جذب عناصر پرمصرف مانند نیتروژن، فسفر و پتاسیم را افزایش داد.

منابع مورد استفاده

1. Aldoobie, N.F., Beltagi, M.S., 2013. Physiological, biochemical and molecular responses of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants to heavy metals stress. *African Journal of Biotechnology* 12(29): 4614–4622.
2. Arnon, D., 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts.Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology* 24(1): 1–15.
3. Bagheri, S., Ebrahimi, M.A., Davazdah Emami, S., Minooyi Moghadam, J., 2014. Terpenoids and phenolic compounds production of mint genotypes in response to mycorrhizal bio-elicitors. *Technical Journal of Engineering and Applied Sciences* 4: 339–348.
4. Bera, A.K., Kanta-Bokaria, A.K., Bokaria, K., 1999. Effect of tannery effluent on seed germination, seedling growth and chloroplast pigment content in mungbean (*Vigna radiate* L.Wilczek). *Environment and Ecology* 17: 958–961.
5. Camejo, D., Frutos, A., Mestre, T.C., Pinero, M.D.C., Rivero, R.M., Martinez, V., 2020. Artificial light impacts the physical and nutritional quality of lettuce. *Horticulture Environment and Biotechnology* 61: 69–82.
6. Daneshfar, A., Asgharzadeh, N., Ostan, Sh., Khoshrou, B., 2018. The role of *Rhizophagus irregularis* in modulating lead uptake by sunflower. *Agricultural Knowledge and Sustainable Production* 1: 37–50.
7. Davies, F.T., Puryear, J.D., Newton, R.J., Egilla, J.N., Grossi, J.A.S., 2002. Mycorrhizal fungi increase chromium uptake by sunflower plants: influence on tissue mineral concentration, growth, and gas exchange. *Jounal of Plant Nutrition* 25: 2389–2407.
8. Druege, U., Baltruschat, H., Franken, P., 2007. *Piriformospora indica* promotes adventitious root formation in cuttings. *Scientia Horticulture* 112: 422–426.
9. Eun, S.O., Youn, H.S., Lee, Y., 2002. Lead disturbs microtubule organization in root meristem of *Zea mays*.

Physiology of Plants 110: 357–365.
10. FAO (Food and Agriculture Organization). Agricultural Statistical Database for 2018. Available online: http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC.
11. Gerhardst, P., Murray, R.G.E., Wood, W.A., Krieg, R.R., 1994. Methods for General and Molecular Bacteriology. ASM, Washington DC, ISBN 1- 55581-048-9 p.518.
12. Hajiboland, R., Aliasgharzadeh, N., Laiegh, S.F., Poschenrieder, C., 2010. Colonization with arbuscular mycorrhizal fungi improves salinity tolerance of tomato (*Solanum lycopersicum L.*) plants. *Plant and Soil*. 331(1): 313–327.
13. Hale, K.L., Mcgrath, S.P., Lombi, E., Stack, S.M., Terry, N., Pickering, I.J., George, G.N., Pilon-Smits, E.A.H., 2001. Molybdenum sequestration in *Brassica* species. A role for anthocyanins, *Plant Physiology* 126: 1391–1402.
14. Adamse, P., 1988. Mutants as an Aid to The Study of Higher Plant Photomorphogenesis. PhD Thesis, Agriculture University, Wageningen, The Netherlands.
15. Hawkins, H.J. George, E., 2001. Reduced nitrogen transport through arbuscular mycorrhizal hypha to *Triticum aestivum* L. supplied with ammonium vs. nitrate nutrition. *Annals of Botany* 87(3): 303–311.
16. Heath, R.L., Packer, L., 1968. Photo peroxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 125(1): 189–98.
17. Hoagland, D.R. and Arnon, D.S. 1950. The water culture method for growing plants without soil. *California Agriculture Experimental Station Circular*. 374: 1–32.
18. Ismailpour, B., Amani, N., 2014. The effect of inoculation with mycorrhizal fungus on the growth and nutrient uptake of lettuce (*Lactua sativa L.*) cultivar. *Journal of Soil Management and Sustainable Production.* 4(2): 49–69.
19. Kari Dolatabadi, H., Mohammadi GolTapeh, E., Moeini, A., Verma, A., 2012. Evaluation of the effect of concentration of auxin and fungi *Piriformospora indica* and *Sebacina vermifera* on the peppermint (*Mentha piperita*) and thyme (*Thymus vulgaris*) in *vitro. Journal of Medicinal Plants*. 2(9): 13–22.
20. Khalid, M., Hassani, D., Bilal, M., Liao, J., Huang, D., 2017. Elevation of secondary metabolites synthesis in *Brassica campestris* ssp. chinensis L. via exogenous inoculation of *Piriformospora indica* with appropriate fertilizer. *Plos One* 12: 1–18.
21. Kumar, M., Yadav, V., Tuteja, N., Johri, A.K., 2009. Antioxidant enzyme activities in maize plants colonized with *Piriformospora indica. Microbiology* 155: 780–790.
22. Lee, J., Scagel, C.F., 2009. Chicoric acid found in basil (*Ocimum basilicum* L.) leaves. *Journal Food Chemistry* 115: 650–656.
23. Mathur, N., Vyas, A., 1995. Influence of VA mycorrhizae on net photosynthesis and transpiration of *Ziziphus mauritiana*. *Journal of Plant Physiology* 147: 328–330.
24. Neill, S.O., Gould, K.S., Kilmartin, P.A. Mitchell, K.A., Markham, K.R., 2002. Antioxidant activities of red versus green leaves in *Elatostema reugosum*. *Plant Cell and Environment* 25: 539–547.
25. Neumann, E., Eckhard, G., 2010. Nutrient uptake: The arbuscular mycorrhiza fungal symbiosis as a plant nutrient acquisition strategy. In: Koltai, H., Kampulink, Y. (Eds.), Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function. Springer, US, pp. 137–167.
26. Noorbakhsh, N., Mirzaei, J., Heydari, M., Karamshahi, A., 2014. The importance of mycorrhizal fungi in the sustainable development of Zagros forests, the second national conference on natural resources of Iran with the focus on forest science, Sanandaj NRREFS02_017.10.
27. Pal, P., McMillan, A.M.S., Saggar, S. 2016. Pathways of dicyandiamide uptake in pasture plants: A laboratory study. *Biology and Fertility of Soils* 52: 539–546.
28. Phillips, J.M., Hayman, D.S., 1970. Transactions of the British. *Mycological Society* 55(1): 158–161.
29. Rashmi, K., Naveena Lavania Latha, J., Naga Sowjanya, T., Kiranmayi, P., Venugopal Rao, M., Menon, C.P.S., Maruthi Mohan, P., 2003. Colonization of cruciferous plants by *Piriformospora indica*. *Scientific Correspondence* 85(12): 1672–1674.
30. Rahmaty, R., Khara, J., 2011. Effects of vesicular arbuscular mycorrhiza *Glomus intraradices* on photosynthetic pigments, antioxidant enzymes, lipid peroxidation, and chromium accumulation in maize plants treated with chromium, *Turkish Journal of Biology* 35: 51–58.
31. Resh, H.M., 1997. Hydroponic Food Production. Woodbridge Press, Santa Barbara, CA.
32. Roitsch, T., Ehne, R., 2000. Regulation of source/sink relations by cytokinins. *Plant Growth Regulation* 32: 359–367.
33. Sami, F., Yusuf, M., Faizan, M., Faraz, A., Hayat, S., 2016. Role of sugars under abiotic stress. *Plant Physiology and Biochemistry* 109: 54–61.
34. Scoccianti, V., Crinelli, R., Tirillini, B., Mancinelli, V., Speranza, A., 2006. Uptake and toxicity of Cr (III) in celery seedlings. *Chemosphere* 64: 1695–1703.
35. Shamsu, H., Gulshan, K., Mohammad, I., Arif, S.H., Bhumi, N. Aqil, A., 2012. Physiological changes induced by chromium stress in plants: an overview. *Protoplasma*. 249: 599–611.
36. Shanker, A.K., Cervantes, C., Loza-Tavera, H., Avudainayagam, S., 2005. Chromium toxicity in plants.

Environment International 31: 739–753.
37. Shanker, A.K., Djanaguiraman, M., Venkateswarlu, B., 2009. Chromium interactions in plants: Current status and future strategies. *Metallomics* 1: 375–383.
38. Singh, A.K., Misra, P., Tandon, P.K., 2006. Phytotoxicity of chromium in paddy (*Oryza sativa* L.) plants. *Journal of Environmental Biology* 27: 283–285.
39. Subrahamamyam, D., 2008. Effects of chromium toxicity on leaf photosynthetic characteristics and oxidative changes in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Photosynthetica*. 46(3): 339–345.
40. Sun, C., Johnson, J.M., Cai, D., Sherameti, I., Oelmuller, R. Lou, B., 2010. *Piriformospora indica* confers drought tolerance in Chinese cabbage leaves by stimulating antioxidant enzymes, the expression of drought-related genes and the plastid-localized CAS protein. *Journal of Plant Physiology* 167: 1009–1017.
41. Torabian, A.M., 2002. Investigation of the effect of irrigation with wastewater on the uptake of heavy metals by leafy vegetables south of Tehran. *Journal of Soil and Water Sciences* 2(16): 189–196.
42. Wrolstad, R.E., Durest, R.W., Lee, J., 2005. Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. *Trend in Food Science and Technology* 16: 423–428.
43. Wu, S., Zhang, X., Chen, B., Wu, Z., Li, T., Hu, Y., Sun, Y., Wang, Y., 2016. Chromium immobilization by extraradical mycelium of arbuscular mycorrhiza contributes to plant chromium tolerance. *Environmental and Experimental Botany* 122: 10–18.
44. Yang, G., Liu, N., Lu, W., Wang, S., Kan, H., Zhang, Y., Xu, L. Chen, Y. 2014. The interaction between arbuscular mycorrhizal fungi and soil phosphorus availability influences plant community productivity and ecosystem stability. *Ecology* 102: 1072–1082.
45. Zakir, A., Lahouti, M., Abrisham Chi, P., Ijtihadi, H., 2005. The effect of Cr^{3+} and Cr^{6+} accumulation on growth and chlorophyll content in parsley (*Petroselinum crispum*). *Journal of Biology* 18: 109–101.
46. Zarea, M.J., Chordia, P., and Varma, A., 2012. *Piriformospora indica* versus salt stress. In: Varma, A., Kost, G., Oelmuller, R. (Eds.), *Piriformospora indica*. Soil Biology, vol. 33. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 263–268.

The Effect of *Serendipita indica* and *Rhizophagus irregularis* Fungi on The Growth and Nutritional Status of Lettuce Under Chromium Stress in Soilless Culture

Z. Majnooni Heris[1], R. Azarmi[*], A. A. Shokouhian, B. Esmailpour and A. Shahi Gharalar

(Received: 19 August 2022; Accepted: 23 November 2022)

Abstract

Chromium (Cr^{+6}) is one of the heavy metals that can disrupt various physiological processes in plants. One of the strategies to moderate the heavy metals stress is the symbiosis of plant roots with symbiotic fungi. Therefore, in order to investigate the effect of chromium and symbiotic fungus on the growth and physiological characteristics of red lettuce (*Lactuca sativa* L. cv. Little Gem), a factorial experiment was carried out as factorial based on completely randomized design in four replications as a hydroponic culture. The experimental treatments included chromium in three levels of 0 3 and 15 mg L^{-1}, and symbiotic fungi in four levels of control, *Rhizophagus irregularis*, *Serendipita indica* and *R. irregularis* + *S. indica*. The results showed that by increasing the concentration of Cr in the nutrient solution, leaf and root fresh weights, total chlorophyll, root length, nitrogen, phosphorus and potassium decreased significantly. But increasing the concentration of chromium in the nutrient solution increased the content of leaf Cr, anthocyanine, soluble carbohydrates and malondialdehyde increased. The symbiotic relation of *S. indica* and *R. irregularis* with Cr-stressed plants showed a significant increase in root colonization percentage, total chlorophyll content, nitrogen, phosphorus and potassium compared with the plants grown under Cr treatment alone and without symbiotic fungi. The findings showed that the symbiosis of *S. indica* and *R. irregularis* fungi with lettuce under the Cr stress conditions led to the improvement of growth and physiological traits, reduced the content of leaf chromium and moderated the chromium toxicity.

Keywords: Chromium, Symbiotic fungi, *Lactuca sativa,* Hydroponic, Heavy metal.

Background and Objective: Due to the limited arable lands and the rising growth of the global population, there are increasing concerns about the food insecurity. As a result, larger quantities of agrochemical substances, such as mineral fertilizers, will have to be used in order to meet the food needs of the growing world population. However, the high dependence of the agricultural production on mineral fertilizers has imposed serious challenges in terms of the environmental issues, public health, and food safety. Fertilizers are one of the main sources of arsenic (As), cadmium (Cd), lead (Pb) and chromium (Cr) (3). The Cr is a toxic metal usually found in soil and water, causing environmental pollution. Symbiotic fungi have excelled in alleviating the stress caused by toxic elements in plants, and its beneficial role was mainly based on external and internal plant mechanisms (5). Changes in the morphological and physiological traits of plants

1- Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.
*: Corresponding author, Email: r_azarmi@uma.ac.ir

associated with symbiotic fungi can probably increase plant tolerance to Cr stress (1 and 4). Few studies are available about the combined effects of symbiotic fungi and chromium toxicity in soilless culture. This study aimed to investigate the role of symbiotic fungi as possible tools to reduce the phytotoxicity of Cr in lettuce.

Methods: This research was carried out as factorial based on completely randomized design with four replications in hydroponic system at a greenhouse in the University of Mohaghegh Ardabilli. *S. indica* was cultured in Petri dishes on a Hill-Kafer medium (2). The plates were placed in a growth chamber at 29 ± 1 °C in dark for 2 weeks. To impose the fungal treatment, one fungal plug of 10 mm in diameter was placed at a distance of 1 cm below the seed of lettuce. The inoculum of *R. irregularis* was added to the growing medum of the pot and 1 cm of substrate was covered and then lettuce seeds were placed on it. Experimental treatments included Cr stress in three levels of 0, 3 and 15 mg L^{-1} and symbiotic fungi in four levels of control, *R. irregularis, S. indica*, and combination of the two fungi (*R. irregularis* + *S. indica*). In this experiment, parameters such as root and shoot fresh weights, root length, total chlorophyll, root colonization, Cr, N, P and K contents, anthocyanine pigment, soluble carbohydrates and malondialdehyde were measured.

Results: The results showed that Cr stress at 15 mg L^{-1} compared to the control reduced shoot and root fresh weights and soluble carbohydrates by 22, 18 and 13%, respectively. The highest root colonization percentage (82%) was observed in the combination of *S. indica* fungus and no Cr stress (control) and the lowest percentage of symbiotic (62%) was found in the combination of *R. irregularis* fungus and Cr stress at 15 mg L^{-1}. Symbiotic relation of *S. indica* and *R. irregularis* with Cr-stressed plants resulted in a significant increase in the contents of Cr, N, P and K in the leaf compared with the plants grown under Cr stress. Plants inoculated with symbiotic fungi enhanced anthocyanine, total chlorophyll, malondialdehyde in order to reduce the Cr-induced oxidative damage in lettuce.

Conclusions: In general, it is concluded that with increasing the concentration of Cr in the nutrient solution, lettuce growth decreased and the symbiotic fungi could improve the morphological characteristics and yield of lettuce under Cr stress.

References:

1. Daneshfar, A., Asgharzadeh, N., Ostan, Sh., Khoshrou, B., 2018. The role of *Rhizophagus irregularis* in modulating lead uptake by sunflower. *Agricultural Knowledge and Sustainable Production* 1: 37–50.
2. Hill, T.W., Kafer, E., 2001. Improved protocols for *Aspergillus* minimal medium: trace element and minimal medium salt stock solutions. *Fungal Genetic and Biology* 48(1): 20–21.
3. Latifi, Z., Jalali M., 201. Trace element contaminants in mineral fertilizers used in Iran. *Environmental Science and Pollution Research* 21: 31917–31928.
4. Marcela, R., Arango, M., Marta, R., Beltrano, J., 2011. Inoculation with mycorrhizal fungi modifies proline metabolism and increases chromium tolerance in pepper plants (*Capsicum annuum* L.). *Brazilian Society of Plant Physiology* 23(1): 15–25.
5. Wu, S., Zh., X., Huang, L., Chen, B., 2019. Arbuscular mycorrhiza and plant chromium tolerance. *Soil Ecology Letters* 1(3-4): 94–104.