

بررسی پاسخ‌های ریخت‌شناختی و بیوشیمیایی برخی گونه‌های چمن تلقیح شده با قارچ قارچ‌ریشه‌ای در شرایط تنش عنصر سرب

کمال غلامی پور فرد^۱، هدایت زکی‌زاده^{۲*}، محمود قاسم‌نژاد^۳، محسن کافی^۴ و فرهاد رجالی^۵
۱، ۲ و ۳. دانشجوی دکتری، استادیار و دانشیار، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت
۴. استاد، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج
۵. دانشیار، مؤسسه تحقیقات خاک و آب، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۳/۵ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۰/۱۹)

چکیده

کشت گیاهان پوششی مناسب در مدیریت خاک و آب‌های آلوده به فلزهای سنگین می‌تواند مهم باشد. در این پژوهش، دو گونه قارچ قارچ‌ریشه‌ای یا مایکوریزا (*Glomus intraradices* و *Glomus mosseae*) بر جذب عنصر سرب، بهبود ویژگی‌های رشدی و تقویت سامانه پاداکسندگی (آنتی‌اکسیدانی) چهار گونه چمن سردسیری، فستوکای پابلند (*Festuca aurandiance*)، فستوکای آبی (*Festuca ovina*)، چچم چندساله (*Lolium perenne*) و علف گندمی بلند (*Agropyron elongatum*) بررسی شد. گیاهان تلقیح شده با قارچ‌ریشه با غلظت‌های مختلف سرب (۰، ۲۰۰۰ و ۳۰۰۰ میکرومولار) تیمار شدند. نتایج بررسی‌ها نشان داد، قارچ قارچ‌ریشه، به‌ویژه *G. intraradices*، توانایی پرکنه شدن (کلونیزاسیون) با ریشه گونه‌های چمن در خاک آلوده به سرب را دارند. بیشترین درصد پرکنه شدن در گونه علف گندمی بلند مشاهده شد. قارچ‌های قارچ‌ریشه سبب افزایش وزن خشک اندام‌های هوایی، ریشه و میزان جذب سرب در گونه‌های مختلف چمن شدند. گونه فستوکای پابلند تلقیح شده با قارچ قارچ‌ریشه گونه *G. intraradices* بیشترین میزان جذب سرب را داشت. افزون بر این، قارچ قارچ‌ریشه مانع افزایش بیشتر پراکسید هیدروژن و مالون‌دی‌آلدئید برگ در رویارویی با تنش سرب شد و میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز را در گونه‌های مختلف چمن افزایش داد. در مجموع، قارچ قارچ‌ریشه توانست با تقویت سامانه پاداکسندگی و بهبود رشد چمن‌ها میزان سرب بیشتری را جذب کند، بدون آنکه نشانه‌های آسیب‌دیدگی نشان دهد.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های پاداکسندگی، علف گندمی، فستوکا، فلزهای سنگین، گیاه پالایی.

The study of morphological and biochemical responses of some mycorrhizae-inoculated turfgrass species to lead stress

Kamal Gholamipour Fard¹, Hedayat Zakizadeh^{2*}, Mahmood Ghasemnezhad³, Mohsen Kafi⁴ and Farhad Rejali⁵
1, 2, 3. Ph.D. Candidate, Assistant Professor and Associate Professor, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran
4. Professor, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
5. Associate Professor, Soil and Water Research Institute, Agricultural Research and Development Research Organization, Karaj, Iran
(Received: May 25, 2016 - Accepted: Jan. 8, 2017)

ABSTRACT

Cultivation of appropriate cover plants could be important on managing polluted soil and water with heavy metals. In the present study, effects of two mycorrhizae species (*Glomus intraradices* and *Glomus mosseae*) on lead accumulation, improving growth parameters and enzymatic antioxidant system of four cool-season turfgrass species, *Festuca aurandiance*, *Festuca ovina*, *Lolium perenne*, and *Agropyron elongatum* were investigated. Mycorrhizae inoculated plants were treated with different lead concentrations (0, 2000 and 3000 μM). Results showed that mycorrhizae fungus, especially *G. intraradices* has potential to colonizing with roots of different turfgrass species under lead polluted soil. The highest colonization percentage was found with *Agropyron elongatum* species. Mycorrhizae fungi led to an increase in root and shoot dry weight and Pb uptake at all studied turfgrass species. The maximum Pb uptake was found in *Festuca aurandiance* which inoculated by *G. intraradices*. Furthermore, mycorrhizae fungi could suppress increasing of leaf H_2O_2 and malondialdehyde when exposed to lead stress and increased antioxidant enzyme activities such as catalase, peroxidase and superoxide dismutase in all turfgrass species. Overall, mycorrhizae could increase lead accumulation by enhancing enzymatic antioxidant system and improving turfgrass growth without observing any damage symptoms.

Keywords: *Agropyron*, enzymatic antioxidants, *Festuca*, heavy metals, *Phytoremediation*.

* Corresponding author E-mail: Zakizadeh@guilan.ac.ir, Zakizadeh55@yahoo.com

مقدمه

افزایش فعالیت‌های صنعتی در مناطق مختلف جهان منجر به مشکلات گسترده زیست‌محیطی شده است (Hu *et al.*, 2013). فلزهای سنگین به دلیل داشتن ویژگی‌هایی مانند حلالیت پایین در محیط، جهش‌زایی و سرطان‌زایی به‌عنوان آلاینده‌های زیست‌محیطی زیان‌بار به‌شمار می‌آیند (Diels *et al.*, 2002). بنابراین، ورود حجم بالای فلزهای سنگین، مشکلات و مخاطره‌های جدی برای انسان و محیط‌زیست را به همراه داشته است (McIntyre, 2003). سرب (Pb) از نظر انتشار، گسترده‌ترین عنصر سنگین در محیط‌زیست است (Tong *et al.*, 2000)، که منبع عمده آن ناشی از فعالیت‌های انسان مانند استخراج معادن، ذوب فلزها، سوخت‌های فسیلی، مواد منفجره، فعالیت‌های کشاورزی و فاضلاب‌های شهری است (Khan, 2005). به‌طورکلی، روش‌های فیزیکیوشیمیایی برای استخراج و تثبیت فلزهای سنگین بسیار پرهزینه و از لحاظ محیط‌زیست تخریب‌کننده است (Abouloos *et al.*, 2006) و بیشتر برای نواحی کوچک که بایستی به‌سرعت رفع آلودگی شوند، مناسب هستند، درحالی‌که روش گیاه‌پالایی افزون بر نداشتن این مشکلات، امکان بازیافت زیستی فلزها را نیز فراهم می‌کند (Etim, 2012). به‌طورکلی، با گسترش شهرنشینی، چمن‌ها از عنصرهای ضروری و بخش جدایی‌ناپذیر فضای سبز هستند. باین‌حال، به دلیل نیاز آبی بالای چمن‌ها و کمبود منابع آب با کیفیت در بسیاری از شهرهای کشور، کاشت آن‌ها دچار محدودیت شده است (Najafi, 2008). بنابراین، استفاده از پساب‌های شهری به‌عنوان یک منبع فرعی آب در آبیاری گیاهان زینتی مانند چمن‌ها مقرون‌به‌صرفه است، به‌ویژه به دلیل غیرخوراکی بودن این گیاهان، میزان نگرانی عمومی در نتیجه استفاده از پساب تا حد زیادی کمتر از گیاهان زراعی و باغی مثمر است (Gamito *et al.*, 1999). این در حالی است که کاربرد پساب تصفیه‌شده شهری در کشاورزی به دلیل مخاطره‌های زیست‌محیطی و بهداشتی امکان‌پذیر نیست یا نیازمند مدیریت خاصی است (Losada *et al.*, 2009). میزان جذب و تحمل در برابر

فلزهای سنگین توسط گیاهان می‌تواند به‌وسیله ریزجاندارانی که با ریشه‌های گیاهان رابطه همزیستی دارند، تحت تأثیر قرار گیرد (Miransari, 2010). قارچ آربوسکولار مایکوریزا^۱ (AMF) با ریشه بیشتر گونه‌های گیاهی رابطه همزیستی برقرار می‌کند (Miransari, 2010). این قارچ به‌طور گسترده در زیست‌بوم‌های طبیعی و کشاورزی پراکنده است (Punamiya *et al.*, 2010). قارچ‌های AMF قابلیت دسترسی به مواد غذایی و تحمل گیاه به تنش‌های زیستی و غیرزیستی مانند تنش خشکی و فلزهای سنگین را افزایش می‌دهند (González-Guerrero *et al.*, 2009). گزارش‌های فراوان و متناقضی در ارتباط با تأثیر قارچ‌ریشه (مایکوریزا) بر افزایش و کاهش جذب فلزهای سنگین وجود دارد. قارچ قارچ‌ریشه‌ای با افزایش حلالیت مواد کانی (Al Agely *et al.*, 2005; Trotta *et al.*, 2006)، توسعه ناحیه جذب، افزایش حجم خاک در دسترس و کارایی انتقال توسط ریشه (هیف) باعث افزایش جذب فلزها در گیاهان می‌شود (Rabie, 2005). از سویی گزارش شده است، قارچ قارچ‌ریشه با ترشح ترکیب‌های آلی (مانند گلومالین) در خاک موجب کلاته شدن یون‌های فلزی شده و از این طریق جذب فلزها را کاهش می‌دهد (Jiang *et al.*, 2016). همزیستی AMF با ریشه گیاهان یکی از همزیستی‌های سودمند و مؤثر در فناوری گیاه‌پالایی آلاینده‌های خاک است. کارایی این همزیستی به عامل‌های مختلفی مانند گونه گیاهی، نوع قارچ و ویژگی‌های شیمیایی خاک وابسته است (Li & Feng, 2001). توانایی مطلوب در تجمع فلزهای سنگین مانند سرب، کادمیوم، مس، روی و نیکل (Wen & Fu, 2008)، رشد گسترده، تولید مقادیر بالای زیست‌توده و نیاز به سرزنی مداوم و در نتیجه خروج آلاینده‌ها از محیط، موجب شده است که از ویژگی گیاه پالایی چمن‌ها در احیاء زمین‌های آلوده استفاده شود (Qu *et al.*, 2015; Taghizadeh *et al.*, 2003). از این‌رو، شناسایی گونه‌های انباشته‌گر و مقاوم به فلزهای سنگین، افزون بر استفاده از آن‌ها در مناطق آلوده

ریخته شد. دو ماه پس از کاشت هنگامی که گیاهان به طور کامل مستقر شدند، نترات سرب (۰، ۲۰۰۰ و ۳۰۰۰ میکرومولار) که از شرکت مرک آلمان تهیه شده بود هر چهار روز یکبار روی گیاهان آبپاشی شد. از آنجایی که در فضای سبز نیز روش معمول آبیاری به صورت آبپاشی است این روش آبیاری انتخاب شد. با توجه به رشد بالای چمن‌ها، به طور میانگین هر هشت روز یکبار عمل سرزنی انجام شد و از بافت‌های حاصل از چند سرزنی، به منظور تأمین بافت برای سنجش فراسنجه (پارامترهای مختلف استفاده شد. یک ماه پس از اعمال تیمار سرب، ویژگی‌های وزن خشک اندام‌های هوایی و ریشه، میزان جذب سرب، درصد پرگنه شدن (کلونیزاسیون) ریشه، مالون‌دی‌آلدئید (MDA)، پراکسید هیدروژن (H_2O_2)، فعالیت آنزیم‌های کاتالاز (CAT)، پراکسیداز (POD) و سوپراکسید دیسموتاز (SOD) گیاهان بررسی شد. این آزمایش در گلخانه تحقیقاتی دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان با شرایط نوری ۳۰۰ تا ۶۰۰ میکرومول بر مترمربع در ثانیه، رطوبت نسبی 80 ± 5 درصد و دوره نوری نزدیک به ۱۱ ساعت روشنایی و ۱۳ ساعت تاریکی، انجام شد.

ارزیابی صفات: به منظور تعیین درصد پرگنه شدن ریشه، از ریشه‌های مویین تازه نمونه برداری و آنگاه ریشه‌ها با آب مقطر شستشو شد. برای بی‌رنگ کردن ریشه‌ها از محلول ۱۰ درصد پتاسیم هیدروکسید و آب‌اکسیژنه قلیایی استفاده شد. پس از غوطه‌وری در کلریدریک اسید ۱۰ درصد، رنگ‌آمیزی نمونه‌ها با محلول تریپان بلو در لاکتو گلیسرول انجام شد (Philips & Hayman, 1970). سپس ریشه‌ها از محلول تریپان بلو خارج و با استفاده از روش Kormanik & McGraw (1982) درصد پرگنه شدن ریشه تعیین شد. برای محاسبه وزن خشک ریشه‌ها نیز در پایان آزمایش پس از خارج کردن گیاهان از گلدان ریشه‌ها جدا شده و پس از شستشو و جدا شدن ذرات ماسه، به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۷۰ درجه سلسیوس خشک و وزن خشک آن‌ها ثبت شد. برای اندازه‌گیری میزان MDA نمونه‌های تازه برگ‌گی در هاون چینی ریخته و پس از افزودن نیتروژن مایع با دسته هاون ساییده و همگن

مانند مناطق صنعتی، معادن، پالایشگاه‌ها، کارخانه‌ها و حاشیه بزرگراه‌ها، می‌تواند در بهره‌وری بهینه از پساب و مدیریت آب بسیار مؤثر باشد و باعث بهبود و حفظ منابع آبی کشور شود. بنابراین، هدف از این پژوهش، بررسی تأثیر همزیستی دو گونه قارچ AM با چهار گونه چمن سردسیری در افزایش تحمل و جذب بیشتر فلز سنگین سرب و انتخاب مناسب‌ترین گونه چمن که ویژگی‌های یادشده را داشته باشد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و اعمال تیمار

در این پژوهش، تأثیر دو نوع قارچ قارچ‌ریشه‌ای (*Glomus intraradices* و *Glomus mosseae*) در افزایش میزان تحمل به فلز سنگین سرب را در چهار گونه چمن سردسیری فستوکای پابلند^۱ (*Festuca aurandiance*)، فستوکای آبی^۲ (*Festuca ovina*)، چچم چندساله^۳ (*Lolium perenne*) و علف گندمی بلند (*Agropyron elongatum*) بررسی شد. گیاهان در گلدان‌های استوانه‌ای به ترتیب با قطر دهانه ۱۶ و ارتفاع ۶۰ سانتی‌متر به صورت آزمایش فاکتوریل و در قالب طرح کامل تصادفی با چهار تکرار کشت شدند. محیط کشت گلدان‌ها شامل نسبت ۳:۱ از خاک باغچه و ماسه، در آغاز در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس به مدت ۱/۵ ساعت اتوکلاو و سپس در گلدان‌های شسته و ضدعفونی‌شده، ریخته شد. با توجه به اینکه خاک‌ها تنوع گسترده‌ای از ریزجانداران دارند و امکان بررسی تأثیر گونه مورد آزمایش وجود داشته باشد، خاک‌ها اتوکلاو شدند. پس از آماده‌سازی گلدان‌ها و پیش از پر کردن کامل آن‌ها، میزانی ماسه ضدعفونی شده همراه با ۲۰۰ گرم مایه تلقیح سالم و فعال که از شرکت زیست فناوری توران تهیه شده بود در عمق فعالیت ریشه‌ها ریخته و سپس بذره‌های چمن کاشته شدند. لازم به یادآوری است در گلدان‌های شاهد میزان یکسانی از مایه تلقیح اتوکلاو شده (دو مرتبه در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس، هر بار به مدت ۲۵ دقیقه)

1. Tall fescue
2. Red fescue
3. Perennial ryegrass

شدند. سپس ۱ میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار به آن افزوده و به کمک سانتیفریوژ در دمای ۴ درجه سلسیوس عصاره‌گیری شد. به محلول روشنآور، تری‌کلرو استیک اسید (TCA) ۲۰ درصد حاوی ۰/۵ درصد تیوباربی‌تیوریک اسید اضافه شد و پس از قرار گرفتن در حمام آب جوش بی‌درنگ در یخ سرد و دوباره سانتیفریوژ شد. جذب مایع با دستگاه طیف‌سنج نوری (اسپکتروفوتومتر، مدل T80+UV/VIS PG Instrument Ltd) در طول موج ۵۳۲ نانومتر و نیز طول موج غیراختصاصی ۶۰۰ نانومتر به منظور حذف جذب دیگر رنگیزه‌های اختصاصی اندازه‌گیری شد (Heath & Packer, 1968). سنجش میزان H_2O_2 درون‌یاخته‌ای، بافت برگی با استفاده از نیتروژن مایع در هاون آسیاب و پس از افزودن محلول TCA ۰/۱ درصد، مخلوط حاصل سانتیفریوژ شد. به محلول رویی، بافر فسفات (۱۰ میلی‌مولار با pH=۷) و یدید پتاسیم ۱ مولار افزوده و پس از قرار گرفتن به مدت یک ساعت در تاریکی، میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۳۹۰ نانومتر خوانده شد. در پایان میزان پراکسید هیدروژن برحسب میکرومولار از طریق منحنی استاندارد که با غلظت‌های مختلف ۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن رسم شده بود به دست آمد (Sergiev *et al.*, 1997). برای استخراج آنزیم‌های پاداکسندگی (آنتی‌اکسیدانی)، قطعه‌ای از بافت برگ در حضور نیتروژن مایع آسیاب و پس از افزودن بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار به آن، به مدت ۱۵ دقیقه با ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه (rpm) در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتیفریوژ شد. از محلول روشنآور^۱ برای سنجش آنزیم‌های CAT، POD و SOD استفاده شد. برای سنجش فعالیت آنزیم SOD از محلول واکنش حاوی نیتروبلو تترازولیوم (NBT) ۷۵ میکرومولار، ریبوفلاوین ۲ میکرومولار، متیونین ۱۳ میلی‌مولار، EDTA ۰/۱ میلی‌مولار، بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار (pH=۷) و عصاره آنزیمی استفاده شد. محلول به مدت ۱۵ دقیقه در مقابل دو عدد لامپ فلورسنت ۴۰ وات در دستگاه لرزاننده (shaker) قرار

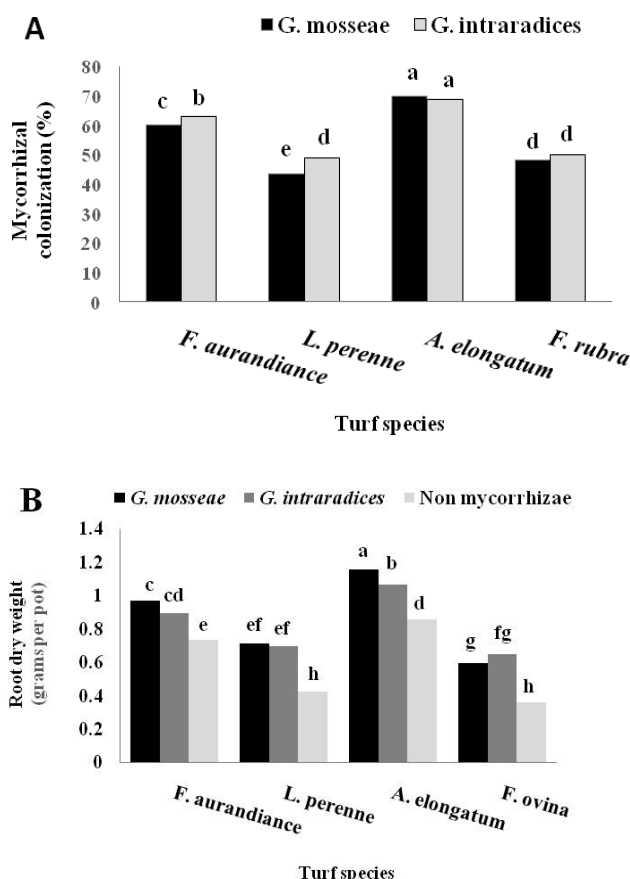
گرفت و میزان جذب آن در طول موج ۵۶۰ نانومتر اندازه‌گیری و فعالیت آنزیم برحسب $\mu\text{Mol/g FW}$ محاسبه شد (Beauchamp & Fridovich, 1971). میزان فعالیت آنزیم POD با استفاده از بافر سنجشی که حاوی آب اکسیژنه ۴۵ میلی‌مولار، گایاکول ۲۲۵ میلی‌مولار، بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار و عصاره آنزیمی سنجش و میزان جذب آن در طول موج ۴۷۰ نانومتر با دستگاه طیف‌سنج نوری اندازه‌گیری شد. در نهایت میزان فعالیت آنزیمی با استفاده از قانون بیرلامبرت و با ضریب خاموشی گایاکول پراکسیداز $26/6 \mu\text{M}^{-1}\text{c}^{-1}\text{m}$ محاسبه و فعالیت آنزیم برحسب $\mu\text{Mol/g FW}\cdot\text{min}$ بیان شد. سنجش فعالیت CAT با استفاده از محلول واکنش حاوی آب اکسیژنه ۱۰ میلی‌مولار، بافر فسفات ۲۵ میلی‌مولار (pH=۷)، EDTA ۰/۱ میلی‌مولار و عصاره آنزیمی انجام شد. سرعت واکنش آنزیمی به صورت تغییرات جذب بر زمان (OD/min) در طول موج ۲۴۰ نانومتر برای ۱ دقیقه ثبت شد. فعالیت آنزیمی با استفاده از فرمول بیرلامبرت و با ضریب خاموشی کاتالاز $40 \text{ mM}^{-1}\text{c}^{-1}\text{m}$ محاسبه شد و فعالیت آنزیم در نهایت برحسب $\mu\text{Mol/g FW}\cdot\text{min}$ محاسبه شد. برای اندازه‌گیری سرب ۲ گرم از بافت برگ خشک‌شده در آون با دمای ۶۰ درجه سلسیوس را از الک ۰/۵ میلی‌متری گذرانده و پس از قرار گرفتن در بوتله چینی، در دمای ۵۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۴ ساعت سوزانده شد. پس از سرد شدن ۱۰ میلی‌لیتر کلریدریک اسید ۱:۱۰ روی آن‌ها ریخته شد و روی هیتر ۷۰ درجه سلسیوس قرار داده شدند. پس از کامل شدن هضم نمونه‌ها، از کاغذ صافی واتمن ۴۲ عبور داده و به بالن ۵۰ میلی‌لیتری منتقل و به حجم رسانده شد. میزان سرب توسط دستگاه جذب اتمی (مدل Spectra AA 220) اندازه‌گیری شد (Sun *et al.*, 2009). تجزیه واریانس داده‌های به‌دست‌آمده از این آزمایش با استفاده از نرم‌افزار SAS و برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel استفاده شد. مقایسه میانگین داده‌ها نیز با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن (DMRT) در نرم‌افزار MSTAT-C انجام گرفت.

نتایج و بحث

پرگنه شدن

نتایج این پژوهش نشان داد، قارچ آربوسکولار قارچ‌ریشه‌ای گونه‌های *G. mosseae* و *G. intraradices* در شرایط آلودگی با فلز سنگین سرب توانایی پرگنه شدن با ریشه گونه‌های چمن را دارند و آلودگی سرب تأثیر منفی بر پرگنه شدن آن ندارد. این نشان‌دهنده کارایی این دو گونه قارچ در خاک‌های آلوده به سرب است. نتایج همسانی نیز پیشتر در نعنای وحشی (*Mentha arvensis*) و ذرت (*Zea mays*) گزارش شده است (Gupta et al., 2002; Malekzadeh et al., 2011). بیشترین درصد پرگنه شدن در گونه علف گندمی بلند با ۶۸/۸ و ۷۰ درصد به ترتیب پس از تلقیح *G. mosseae* و *G. intraradices* و کمترین آن

با ۴۳/۴ درصد در گونه چچم چندساله با *G. mosseae* مشاهده شد (شکل ۱A). به‌طور کلی، قارچ قارچ‌ریشه‌ای گونه *G. intraradices* همزیستی بهتری با گونه‌های چمن مورد بررسی برقرار کرد. بنابراین، نتایج این بررسی، وجود اختلاف معنی‌دار گونه‌های چمن به همزیستی با گونه‌های قارچ‌ریشه‌ای را نشان داد. ویژگی‌های ریخت‌شناختی ریشه گیاه میزبان از جمله عامل‌های مهم در برقراری همزیستی گیاه با قارچ قارچ‌ریشه است (Hetrick et al., 1991). افزون بر ساختار ریشه، ویژگی‌های دیگری مانند ویژگی‌های فیزیولوژیکی گیاه، کنترل‌های ژنتیکی و چگونگی ارسال پیام‌های شیمیایی بین دو همزیست می‌تواند روی وابستگی گیاه به قارچ قارچ‌ریشه نقش داشته باشد (Fitter, 1989).



شکل ۱. برهمکنش گونه چمن و قارچ قارچ‌ریشه‌ای بر درصد پرگنه شدن (A) و وزن خشک ریشه (B).

* حرف‌های همسان روی ستون‌ها اختلاف معنی‌دار با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد را نشان نمی‌دهند.

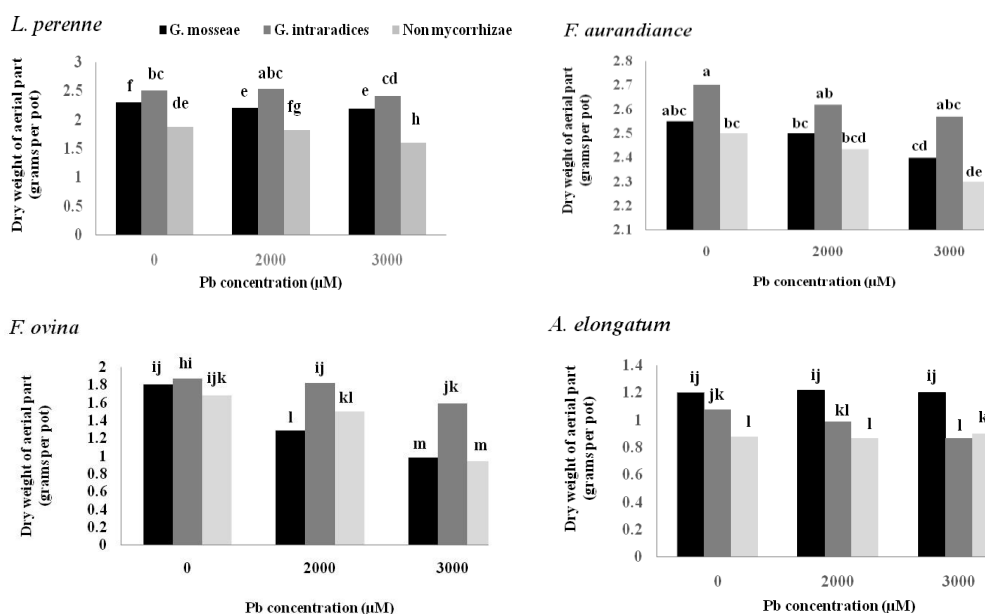
Figure 1. The interaction between AMF species and turf species on colonization percentage (A) and root dry weight (B).

* The same letter indicates no significant difference among treatments (Duncan's test, $P < 0.05$).

نشان داد (شکل ۱B). حضور قارچ‌ریشه در محیط کشت آلوده به سرب موجب شد میزان زیست‌توده گونه‌های چمن نسبت به گیاهانی که با قارچ قارچ‌ریشه تلقیح نشده بودند، بیشتر باشد و این افزایش در ریشه‌های گیاهان بسیار بیشتر از بخش‌های هوایی بود. تحقیقات پیشین نیز نشان دادند، قارچ‌ریشه به سمیت فلزهای سنگین خاک مقاوم است (Orłowska *et al.*, 2011) و باعث افزایش زیست‌توده گیاهان یونجه، سدوم و چچم چندساله می‌شود (Hu *et al.*, 2013; Kanwal *et al.*, 2015). همچنین این قارچ می‌تواند با افزایش حجم خاک در دسترس (Kanwal *et al.*, 2015) و تأمین بیشتر مواد غذایی، افزایش رشد گیاه را به دنبال داشته باشد (Vivas *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2007) و با "تأثیر رقیق‌کنندگی" بر فلزهای سنگین به‌طور غیرمستقیم از شدت آسیب بکاهد (Chen *et al.*, 2007). در بین گونه‌های مورد بررسی، علف گندمی بلند بیشترین میزان زیست‌توده را داشت، که یکی از دلایل آن احتمال دارد میزان پرگنه شدن بالای آن با قارچ قارچ‌ریشه‌ای باشد. میزان رشد گیاه یکی از شاخص‌هایی است که برای اندازه‌گیری تحمل گیاهان به محیط‌های آلوده به فلزهای سنگین به کار می‌رود (Souza *et al.*, 2011).

وزن خشک اندام‌های هوایی و ریشه

نتایج بررسی سطوح مختلف سرب و تلقیح با قارچ قارچ‌ریشه‌ای بر هر چهار گونه چمن مورد بررسی نشان داد، افزایش غلظت سرب در خاک تأثیر منفی بر شاخص‌های رشدی این گیاهان دارد (شکل ۲) و میزان زیست‌توده گیاه کاهش می‌یابد که احتمال دارد به دلیل تنش اکسایشی (اکسیداتیو) و در پی آن اختلال در فعالیت‌های سوخت‌وسازی (متابولیکی) مهم مانند نورساخت (فتوسنتز) و تنفس باشد (Benavides *et al.*, 2005). اما با این حال چمن علف گندمی بلند تلقیح‌شده با گونه *G. mosseae*، هنگامی که در معرض سرب قرار گرفت در مقایسه با شاهد کاهش در میزان وزن خشک اندام‌های هوایی آن در هیچ‌کدام از سطوح تیماری مشاهده نشد (شکل ۲). بیشترین تأثیرپذیری مربوط به ترکیب تیماری چمن فستوکای آبی، غلظت ۳۰۰۰ میکرومولار سرب و قارچ‌ریشه گونه *G. mosseae* بود که وزن خشک اندام‌های هوایی آن نسبت به شاهد در حدود ۴۵ درصد کاهش یافت. گونه علف گندمی بلند تلقیح‌شده با گونه *G. mosseae* با ۱/۶ گرم وزن خشک ریشه در هر گلدان، بیشترین و فستوکای آبی شاهد با ۰/۳۶ گرم کمترین وزن خشک ریشه در هر گلدان را



شکل ۲. برهمکنش گونه‌های چمن، گونه‌های قارچ‌ریشه‌ای و فلز سنگین سرب بر میزان وزن خشک اندام‌های هوایی.

* حرف‌های همسان روی ستون‌ها اختلاف معنی‌دار با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد را نشان نمی‌دهند.

Figure 2. The interaction between AMF species, turf species and lead levels on dry weight of aerial part.

* The same letter indicates no significant difference among treatments (Duncan's test, $P < 0.05$).

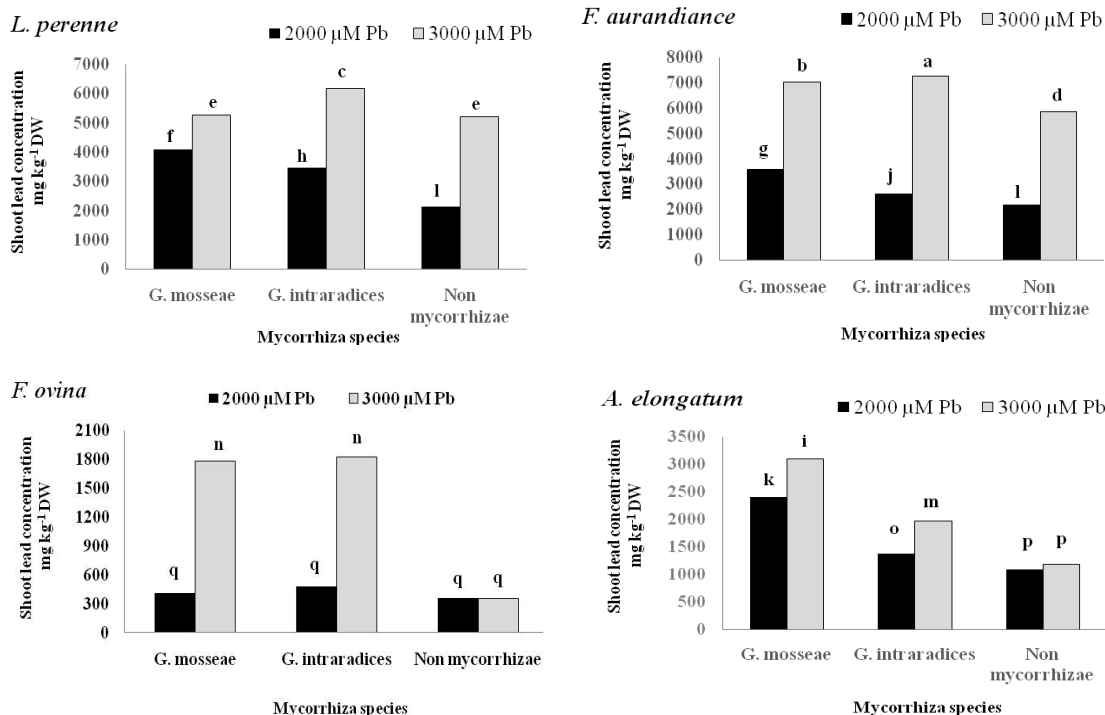
میزان سرب در شاخساره

با توجه به معنی‌دار شدن برهمکنش سه‌گانه میزان سرب، ترکیب تیماری فستوکای پابلند، غلظت ۳۰۰۰ میکرومولار سرب و قارچ‌ریشه گونه *G. intraradices* و همچنین گونه فستوکای آبی، غلظت ۳۰۰۰ میکرومولار سرب و بدون تلقیح قارچ‌ریشه به ترتیب با ۷۲۷۷ و ۳۵۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن خشک بیشترین و کمترین میزان سرب را نشان دادند (شکل ۳). با افزایش غلظت سرب، میزان سرب در اندام‌های هوایی گونه‌های چمن نیز افزایش یافت و گونه فستوکای پابلند بیشترین میزان سرب را نشان داد. جذب بالای فلز به همراه تولید زیست‌توده بالا یکی از ویژگی‌های ضروری گونه‌های گیاه‌پالاست (Khan, 2005). در این زمینه گونه فستوکای پابلند بسیار مناسب است. همزیستی با قارچ قارچ‌ریشه به‌ویژه گونه *G. intraradices* تأثیر معنی‌داری بر افزایش سرب در گونه‌های چمن داشت. به‌طوری‌که ترکیب تیماری فستوکای آبی، غلظت ۳۰۰۰

میکرومولار سرب، و *G. intraradices* نسبت به همین ترکیب تیماری، اما بدون تلقیح قارچ‌ریشه حدود ۴۰۰ درصد افزایش تجمع سرب در شاخساره را نشان داد. نتایج همسانی مبنی بر افزایش تجمع سرب به‌واسطه قارچ قارچ‌ریشه در شاهدانه (Citterio *et al.*, 2005)، علف وتیور (Punamiya *et al.*, 2010)، شبدر و یونجه (Yang *et al.*, 2016) می‌توان گفت که قارچ‌ریشه به‌ویژه گونه *G. mosseae* با افزایش حلالیت سرب جذب و انتقال سرب از ریشه به ساقه را نیز تسریع می‌کند (Agely *et al.*, 2005; Trotta *et al.*, 2006).

پراکسید هیدروژن و مالون‌دی‌آلدئید

میزان MDA (معیاری برای سنجش پراکسیده‌شدن چربی‌های غشا) و H_2O_2 در اندازه‌گیری آسیب‌های فلزهای سنگین به بافت‌های گیاهی استفاده می‌شود. نتایج بررسی‌ها نشان داد، در اغلب ترکیب‌های تیماری با افزایش غلظت سرب، میزان H_2O_2 و MDA در بافت گیاه نیز افزایش یافت.



شکل ۳. برهمکنش گونه‌های چمن، گونه‌های قارچ‌ریشه‌ای و فلز سنگین سرب بر میزان تجمع سرب.

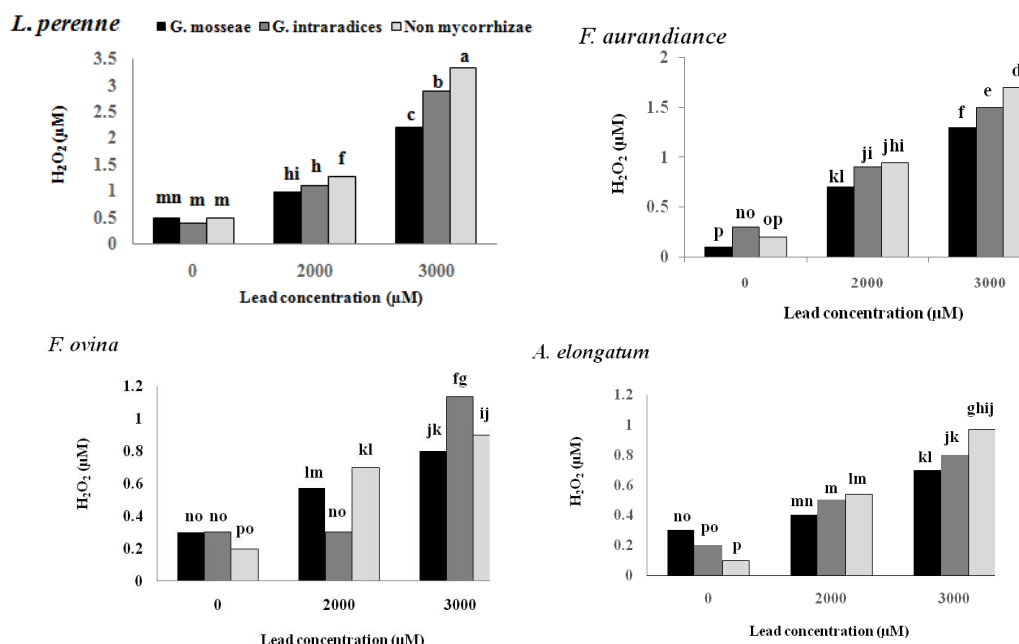
* حرف‌های همسان روی ستون‌ها اختلاف معنی‌دار با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد را نشان نمی‌دهند.
Figure 3. The interaction between AMF species, turf species and lead levels on lead accumulation of aerial part
* The same letter indicates no significant difference among treatments (Duncan's test, $P < 0.05$).

نشان دادند. در تیمار ۳۰۰۰ میکرومولار سرب، ترکیب تیماری گونه چمن علف گندمی بلند و گونه قارچ *G. mosseae*، کمترین افزایش (۱۳۳ درصد) و ترکیب تیماری گونه چمن چچم چندساله و گونه قارچ *G. intraradices* بیشترین افزایش (۶۲۱ درصد) را در میزان پراکسید هیدروژن نشان دادند (شکل ۴).

فعالیت آنزیم‌های پاداکسندگی

با توجه به جدول ۱، در اغلب ترکیب‌های تیماری بالا رفتن غلظت سرب باعث افزایش فعالیت هر سه آنزیم CAT، POD و SOD در گیاهان تلقیح شده با قارچ‌ریشه و شاهد شده است. نتایج همسانی نیز پیشتر گزارش شده است (Garg & Aggarwal, 2012; Li et al., 2012)، به‌استثنا گونه فستوکای آبی که میزان فعالیت آنزیم‌های SOD و CAT در غلظت ۳۰۰۰ میکرومولار سرب، نسبت به شاهد کاهش یافت. در اغلب ترکیب‌های تیماری همزیستی هر دو گونه قارچ قارچ‌ریشه‌ای موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های پاداکسندگی شد که موافق با یافته‌های پیشین است (Wu et al., 2008; Kanwal et al., 2015).

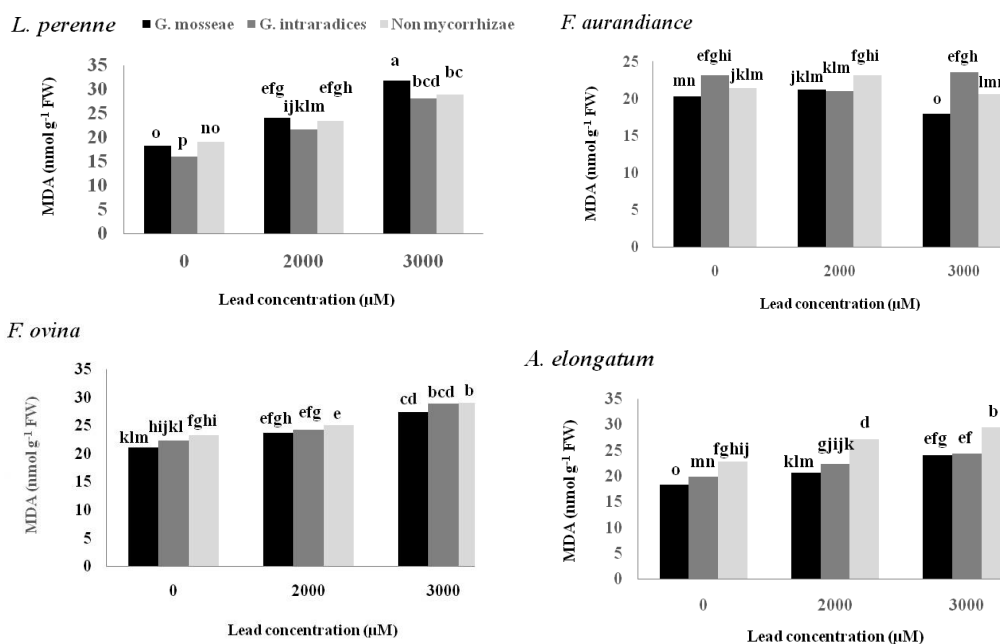
سرب موجب افزایش پراکسید شدن چربی‌های غشاء و در نتیجه کاهش نفوذپذیری آن می‌شود (Wang et al., 2012)، که ممکن است در نتیجه تشکیل پی‌درپی آلکان‌های کوتاه زنجیره و آلدئیدهای اسید چرب توسط یون‌های این عنصر باشد (Yang et al., 2015). همچنین در تیمارهای سرب بین تلقیح قارچ‌ریشه‌ای (هر دو گونه) و تلقیح نشدن در همه گونه‌های چمن تفاوت معنی‌داری در میزان H_2O_2 و MDA وجود داشت، که نشان می‌دهد همزیستی قارچ‌ریشه‌ای می‌تواند به گیاهان برای افزایش استحکام غشاء و کاهش آسیب اکسایشی القاء شده توسط آلودگی سرب کمک کند. نتایج همسانی نیز در ارتباط با افزایش پراکسید هیدروژن (Sun et al., 2010) و MDA (Yang et al., 2015) گزارش شد. با توجه به شکل ۵، ترکیب تیماری چمن چچم چندساله، غلظت ۳۰۰۰ میکرومولار سرب و قارچ‌ریشه گونه *G. mosseae* نسبت به شاهد بیشترین افزایش تولید MDA (۷۴ درصد) را داشت و ترکیب تیماری چمن فستوکای پابلند، تیمار ۲۰۰۰ و ۳۰۰۰ میکرومولار سرب و قارچ‌ریشه گونه *G. mosseae* نسبت به شاهد نزدیک به ۱۰ درصد کاهش



شکل ۴. برهمکنش گونه‌های چمن، گونه‌های قارچ‌ریشه‌ای و فلز سنگین سرب بر میزان پراکسید هیدروژن. * حرف‌های همسان روی ستون‌ها اختلاف معنی‌دار با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد را نشان نمی‌دهند.

Figure 4. The interaction between AMF species, turf species and lead levels on H_2O_2 contents.

* The same letter indicates no significant difference among treatments (Duncan's test, $P < 0.05$).



شکل ۵. برهمکنش گونه‌های چمن، گونه‌های قارچ‌ریشه‌ای و فلز سنگین سرب بر میزان MDA.

* حرف‌های همسان روی ستون‌ها اختلاف معنی‌دار با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد را نشان نمی‌دهند.

Figure 5. The interaction between AMF species, turf species and lead levels on MDA contents.

* The same letter indicates no significant difference among treatments (Duncan's test, P < 0.05).

افزایش دهد (Garg & Chandel, 2015). بیشترین میزان فعالیت آنزیم‌های پاداکسندگی در گونه فستوکای پابلند در غلظت ۳۰۰۰ میکرومولار سرب مشاهده شد که در مورد آنزیم POD در همراهی با قارچ قارچ‌ریشه گونه *G. intraradices* و آنزیم CAT تلقیح شده با گونه نیز مشاهده شد. در ارتباط با آنزیم SOD نیز تفاوت معنی‌داری بین تلقیح با گونه *G. intraradices* و *G. mosseae* وجود نداشت (جدول ۱).

افزایش فعالیت این آنزیم‌ها در گونه‌های فستوکای آبی و چچم چندساله، هنگامی که غلظت تیمار سرب به ۳۰۰۰ میکرومولار سرب رسید روند کاهشی پیدا کرد. از سویی نتایج مربوط به اندازه‌گیری رادیکال آزاد H₂O₂ و MDA نشان داد، میزان تنش وارد شده به این دو گونه بسیار بالا است. بنابراین، وجود یک سازوکار (مکانیسم) پاداکسندگی بالا می‌تواند ظرفیت گیاهان قارچ‌ریشه‌ای را برای حذف رایکال‌های آزاد اکسیژن بسته به گونه گیاهی

جدول ۱. برهمکنش گونه‌های چمن، گونه‌های قارچ‌ریشه و فلز سنگین سرب بر میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز (U/g FW) و سوپر اکسید دیسموتاز (U/g FW min)

Table 1. The interaction among AMF species, turf species and lead levels on CAT, POD (U/g FW min) and SOD (U/g FW) activity

Enzyme	Mycorrhizae			Non mycorrhizae			<i>G. mosseae</i>			<i>G. intraradices</i>			
	Pb levels (μM)	0	2000	3000	0	2000	3000	0	2000	3000	0	2000	3000
CAT	<i>F. aurandiance</i>	0.33klmno	0.3lmnop	0.71defgh	0.57ghi	0.46hijk	0.84cde	0.49hij	0.98abc	1.097ab			
	<i>L. perenne</i>	0.19pqrs	0.76def	0.29mnopq	0.42ijklm	1.18a	0.57ghi	0.37klmno	0.9bcd	0.6fgh			
	<i>A. elongatum</i>	0.13s	0.42ijklm	0.72defg	0.15s	0.4jklmn	0.67efg	0.18qrs	0.27nopqr	0.31lmno			
	<i>F. ovina</i>	0.29mnopq	0.43jklm	0.17rs	0.39jklmno	0.71defg	0.26opqr	0.44hijkl	1.015abc	0.39jklmno			
POD	<i>F. aurandiance</i>	0.7ghijkl	0.82defghi	0.9def	0.65ijkl	0.88def	1.1abc	0.61klm	0.92def	1.2a			
	<i>L. perenne</i>	0.47mnop	1.12ab	0.95cde	0.57lmno	1.19a	1.13a	0.97bcd	1.16a	0.84defg			
	<i>A. elongatum</i>	0.53lmnop	0.57lmno	0.58lmn	0.77fghijk	0.81defghi	0.83defgh	0.79efghij	0.67ghijkl	0.67ghijkl			
	<i>F. ovina</i>	0.37p	0.41op	0.42nop	0.58lmn	0.62jklm	0.65ijkl	0.61klm	0.7ghijkl	0.67hijkl			
SOD	<i>F. aurandiance</i>	178hij	198fgh	169ijk	146klm	276ab	289a	225de	290a	296a			
	<i>L. perenne</i>	136lmn	185hi	175hij	228de	245.5cd	276ab	215efg	259bc	221def			
	<i>A. elongatum</i>	116no	252bc	228de	196gh	183.2hi	226.2de	220ef	257bc	286a			
	<i>F. ovina</i>	132mn	138.5lmn	102o	157jkl	178hij	119.5no	164.7jk	186hi	164.7ijk			

* The same letter indicates no significant difference among treatments (Duncan's test, P < 0.05)

نتیجه‌گیری کلی

داشته باشد. رقم علف گندمی بلند به خاطر داشتن استحکام غشایی بالا (با توجه به داده‌های میزان H_2O_2 و MDA) و همزیستی بالایی (بیش از ۷۰ درصد) که با هر دو گونه قارچ قارچ‌ریشه‌ای برقرار کرد، تحمل بسیار بالایی در مقابل تنش سرب از خود نشان داد. همچنین نتایج این بررسی استفاده از قارچ قارچ‌ریشه‌ای به‌عنوان یک فناوری زیستی سالم و سازگار با محیط طبیعی را در پاک‌سازی فلزهای سنگین از محیط توسط گیاهان پیشنهاد و امکان بررسی بهینه کاربرد آب‌های آلوده به فلز سنگین را در آبیاری چمن‌ها با بهره‌گیری از قارچ قارچ‌ریشه‌ای فراهم می‌کند. باین حال، سازوکارهای دقیق افزایش جذب و انباشتگی سرب، افزایش تحمل چمن‌ها به تنش فلز سنگین سرب و چگونگی برهمکنش این فلز با گونه‌های مختلف قارچ قارچ‌ریشه‌ای در چمن‌ها هنوز به‌طور کامل، مشخص نشده و به پژوهش‌های همه‌جانبه و بیشتری نیاز است.

در این پژوهش گونه فستوکای آبی بیشتر از سه گونه دیگر تحت تأثیر اثر زیان‌بار سرب قرار گرفت، به‌طوری‌که نزدیک به ۵۰ درصد از وزن خشک اندام‌های هوایی آن کاسته شد. همچنین گیاهان تلقیح‌شده با قارچ‌ریشه رشد بیشتر و در نتیجه تحمل بالاتری نسبت به سرب نشان دادند. وجود قارچ قارچ‌ریشه‌ای همچنین باعث افزایش جذب سرب به‌وسیله گونه‌های چمن شد. با توجه به فعالیت بالای آنزیم‌های پاداکسندگی در گونه فستوکای پابلند و همچنین میزان تولید کم H_2O_2 و MDA می‌توان گفت که این‌گونه توانسته است با تنش ناشی از فلز سنگین سرب رویارویی کند. افزون بر این، این‌گونه همزیستی مناسب‌تری (بیش از ۶۰ درصد پرگنه شدن) با قارچ‌های قارچ‌ریشه‌ای نشان داد که توانسته است میزان تحمل بیشتری نسبت به تنش سرب

REFERENCES

1. Aboulroos, S. A., Helal, M. I. D. & Kamel, M. M. (2006). Remediation of Pb and Cd polluted soils using in situ immobilization and phytoextraction techniques. *Soil & Sediment Contamination*, 15, 199-215.
2. Al Agely, A., Sylvia, D. & Ma, L. Q. (2005). Mycorrhizae Increase Arsenic Uptake by the Hyperaccumulator Chinese Brake Fern (L.) (*Pteris vittata* L.). *Journal of environmental quality*, 34: 2181-2186.
3. Beauchamp, C. & Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 44, 276-287.
4. Benavides, M. P., Gallego, S. M. & Tomaro, M. L. (2005). Cadmium toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17, 21-34.
5. Chen, B. D., Zhu, Y. G., Duan, J., Xiao, X. Y. & Smith, S. E. (2007). Effects of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* on growth and metal uptake by four plant species in copper mine tailings. *Environmental Pollution*, 147, 374-380.
6. Citterio, S., Prato, N., Fumagalli, P., Aina, R., Massa, N., Santagostino, A., Sgorbati, S. & Berta, G. (2005). The arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* induces growth and metal accumulation changes in *Cannabis sativa* L. *Chemosphere*, 59, 21-29.
7. Diels, L., Van der Lelie, N. & Bastiaens, L. (2002). New developments in treatment of heavy metal contaminated soils. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 1, 75-82.
8. Etim, E. E. (2012). Phytoremediation and its mechanisms: a review. *International Journal of Environment and Bioenergy*, 2, 120-136.
9. Gamito, P., Arsenio, A., Faleiro, M. L., Brito, J. C. & Beltrao, J. (1999). The influence of waste water treatment on irrigation water quality. In: *Improved Crop quality by Nutrient management* (pp. 267-270). Springer, Dordrecht.
10. Garg, N. & Aggarwal, N. (2012). Effect of mycorrhizal inoculations on heavy metal uptake and stress alleviation of *Cajanus cajan* (L.) Millsp. genotypes grown in cadmium and lead contaminated soils. *Plant Growth Regulation*, 66, 9-26.
11. Garg, N. & Chandel, S. (2015). Role of arbuscular mycorrhiza in arresting reactive oxygen species (ROS) and strengthening antioxidant defense in *Cajanus cajan* (L.) Millsp. nodules under salinity (NaCl) and cadmium (Cd) stress. *Plant Growth Regulation*, 75, 521-534.
12. Gholamipour, K., Ghasemnezhad, M., Zakizadeh, H., Kafi, M & Rejali, F. (2016). Evaluation of six cold-season turfgrasses responses to lead phytotoxicity for screening a tolerant species. *Caspian Journal of Environmental Sciences*. 14. In Press.

13. González-Guerrero, M., Benabdellah, K., Ferrol, N. & Azcón-Aguilar, C. (2009). Mechanisms underlying heavy metal tolerance in arbuscular mycorrhizas. *Mycorrhizas-Functional Processes and Ecological Impact*. Springer.
14. Gupta, M. L., Prasad, A., Ram, M. & Kumal, S. (2002). Effect of the AM Fungus *G. fasciculatum* on the Essential Oil Yield Condition Related Characters and Nutrient Acquisition in the Crops of Different Cultivars of Menthol Mint (*Mentha arvensis*) under Field Conditions. *Bioresource Technology*, 81, 77-79.
15. Heath, R. L. & Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125, 189-198.
16. Hu, J., Wu, S., Wu, F., Leung, H. M., Lin, X. & Wong, M. H. (2013). Arbuscular mycorrhizal fungi enhance both absorption and stabilization of Cd by Alfred stonecrop (*Sedum alfredii* Hance) and perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) in a Cd-contaminated acidic soil. *Chemosphere*, 93, 1359-1365.
17. Jiang, Q. Y., Zhuo, F., Long, Sh. H., Zhao, H. D., Yang, D. J., Ye, Zh. H., Li, Sh. Sh. & Jing, Y. X. (2016). Can arbuscular mycorrhizal fungi reduce Cd uptake and alleviate Cd toxicity of *Lonicera japonica* grown in Cd-added soils?. *Scientific Reports*, 6, 21805.
18. Kanwal, S., Bano, A. & Malik, R. N. (2015). Effects of Arbuscular Mycorrhizal Fungi on Metals Uptake, Physiological and Biochemical Response of *Medicago Sativa* L. with Increasing Zn and Cd Concentrations in Soil. *American Journal of Plant Sciences*, 6, 2906.
19. Khan, A. G. (2005). Role of soil microbes in the rhizospheres of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 18, 355-364.
20. Kormanik, P. P. & McGraw, A. C. (1982). Quantification of vesicular-arbuscular mycorrhizae in plant roots. IN: *Methods and Principles of Mycorrhizal Research* (N. C. Schenck, Ed.), pp. 37-47. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minn.
21. Li, X., Bu, N., Li, Y., Ma, L., Xin, S. & Zhang, L. (2012). Growth, photosynthesis and antioxidant responses of endophyte infected and non-infected rice under lead stress conditions. *Journal of Hazardous Materials*, 213, 55-61.
22. Li, X. L. & Feng, G. (2001). *Ecology and physiology of arbuscular mycorrhiza*. Huawen, Beijing.
23. Losada, H., Rivera, J., Vieyra, J. & Cortés, J. (2009). The role of urban agriculture in waste management in Mexico City. *Urban Agriculture Magazine*, 40-41.
24. Malekzadeh, E., Alikhani, H. A., Savaghebi-Firoozabadi, G. R. & Zarei, M. (2011). Influence of arbuscular mycorrhizal fungi and an improving growth bacterium on Cd uptake and maize growth in Cd-polluted soils. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 9, 1213-1223.
25. McIntyre, T. (2003). Phytoremediation of heavy metals from soils. *Phytoremediation*. Springer.
26. Miransari, M. (2010) Contribution of arbuscular mycorrhizal symbiosis to plant growth under different types of soil stress. *Plant Biology*, 12, 563-569. (in Farsi)
27. Najafi, P. (2008). Studying the microbial contamination from irrigation grass with municipal treated wastewater. *Journal of Ecology*, 44, 32-27.
28. Orłowska, E., Przybyłowicz, W., Orłowski, D., Turnau, K. & Mesjasz-Przybyłowicz, J. (2011). The effect of mycorrhiza on the growth and elemental composition of Ni-hyperaccumulating plant *Berkheya coddii* Roessler. *Environmental Pollution*, 159, 3730-3738.
29. Punamiya, P., Datta, R., Sarkar, D., Barber, S., Patel, M. & Das, P. (2010). Symbiotic role of *Glomus mosseae* in phytoextraction of lead in vetiver grass [*Chrysopogon zizanioides* (L.)]. *Journal of Hazardous Materials*, 177, 465-474.
30. Qu, R. L., Li, D., Du, R. & Qu, R. (2003). Lead uptake by roots of four turfgrass species in hydroponic cultures. *HortScience*, 38, 623-626.
31. Rabie, H. G. (2005). Contribution of arbuscular mycorrhizal fungus to red kidney and wheat plants tolerance grown in heavy metal-polluted soil. *African Journal of Biotechnology*, 4(4), 332.
32. Sergiev, I., Alexieva, V. & Karanov, E. (1997). Effect of spermine, atrazine and combination between them on some endogenous protective systems and stress markers in plants. *Comptes rendus de l'Académie Bulgare des Sciences*, 51, 121-124.
33. Souza, L. A., Andrade, S. A., Souza, S. C. & Schiavinato, M. A. (2011). Tolerância e potencial fitorremediador de *stizolobium aterrimum* associada ao fungo micorrízico arbuscular *glomus etunicatum* em solo contaminado por chumbo. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 35, 1441-1451.
34. Sun, S. Q., He, M., Cao, T., Yusuyin, Y., Han, W. & Li, J. L. (2010). Antioxidative responses related to H₂O₂ depletion in *Hypnum plumaeforme* under the combined stress induced by Pb and Ni. *Environmental Monitoring and Assessment*, 163, 303-312.
35. Sun, Y. B., Zhou, Q. X., An, J., Liu, W. T. & Liu, R. (2009). Chelator-enhanced phytoextraction of heavy metals from contaminated soil irrigated by industrial wastewater with the hyperaccumulator plant (*Sedum alfredii* Hance). *Geoderma*, 150, 106-112.

36. Taghizadeh, M., Kafi, M. & Ftahi Moghadam, M. R. (2015). Breeding by In vitro Culture to Improve Tolerance and Accumulation of Lead in *Cynodon Dactylon* L. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 17, 1851-1860.
37. Tong, S., Schirnding, Y. E. V. & Prapamontol, T. (2000). Environmental lead exposure: a public health problem of global dimensions. *Bulletin of the World Health Organization*, 78, 1068-1077.
38. Trotta, A., Falaschi, P., Cornara, L., Minganti, V., Fusconi, A., Drava, G. & Berta, G. (2006). Arbuscular mycorrhizae increase the arsenic translocation factor in the as hyperaccumulating fern *Pteris vittata* L. *Chemosphere*, 65, 74-81.
39. Vivas, A., Vörös, I., Biró, B., Campos, E., Barea, J. M. & Azcón, R. (2003). Symbiotic efficiency of autochthonous arbuscular mycorrhizal fungus (*G. mosseae*) and *Brevibacillus* sp. isolated from cadmium polluted soil under increasing cadmium levels. *Environmental Pollution*, 126, 179-189.
40. Wang, P., Zhang, S., Wang, C. & Lu, J. (2012). Effects of Pb on the oxidative stress and antioxidant response in a Pb bioaccumulator plant *Vallisneria natans*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 78, 28-34.
41. Wen, L. & Fu, D. F. (2008). The phytoremediation of ryegrass on multiple heavy metal soils by two reinforced methods. *China Environmental Science*, 9, 786-790.
42. Wu, Q. S., Xia, R. X. & Zou, Y. N. (2008) Improved soil structure and citrus growth after inoculation with three arbuscular mycorrhizal fungi under drought stress. *European Journal of Soil Biology*, 44, 122-128.
43. Yang, Y., Han, X., Liang, Y., Ghosh, A., Chen, J. & Tang, M. (2015). The Combined Effects of Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF) and Lead (Pb) Stress on Pb Accumulation, Plant Growth Parameters, Photosynthesis, and Antioxidant Enzymes in *Robinia pseudoacacia* L. *PloS one*, 10(12), e0145726.
44. Yang, Y., Liang, Y., Han, X., Chiu, T., Ghosh, A., Chen, H. & Tang, M. (2016). The roles of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) in phytoremediation and tree-herb interactions in Pb contaminated soil. *Scientific Reports*, 6, 462-469.