



تأثیر اسید سالیسیلیک و باکتری سودوموناس پوتیدا بر ویژگی‌های آنزیمی گیاه کینوا در خاک شور آلوده به آرسنیک

محمود نبی‌زاده^۱، علیرضا آستارائی*^۲ و امیر لکزیان^۳

۱) دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران.

۲) دانشیار گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران.

۳) استاد گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران.

* ایمیل نویسنده مسئول: astarai@um.ac.ir

چکیده:

زمینه و هدف: با توجه به این که برخی از مناطق کشور مانند خراسان رضوی، اصفهان، کرمان و سایر استان‌ها آلوده به آرسنیک هستند، و از طرفی اکثر خاک‌های ایران با درجات مختلف شوری همراه بوده و کمتر عملیات مدیریتی زراعی مانند انتخاب گیاه مناسب و یا کاربرد اسیدهای آلی مانند اسید سالیسیلیک استفاده شده است، بنابراین این تحقیق با اهداف ذیل انجام شد: ۱) بررسی تأثیر تلقیح باکتری سودوموناس پوتیدا در شرایط تنش شوری خاک، ۲) بررسی تأثیر آلودگی آرسنیک در شرایط تنش شوری خاک، ۳) بررسی تأثیر محلول پاشی اسید سالیسیلیک بر گیاه کینوا کشت شده در خاک شور و ۴) اثرات دوگانه و سه گانه تیمارهای آزمایشی بر برخی از خصوصیات کمی و کیفی گیاه کینوا.

روش پژوهش: این طرح بصورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی شامل فاکتور اول ۱) خاک شاهد (بدون تلقیح باکتری سودوموناس پوتیدا، ۲) تلقیح باکتری سودوموناس پوتیدا، فاکتور دوم دو سطح آرسنیک (صفر و ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و فاکتور سوم محلول پاشی دو سطح اسید سالیسیلیک (صفر و ۰/۵ میلی‌مولار) به صورت گلدانی، در مجموع ۲۴ گلدان با حجم ۵۰۰۰ سانتی‌متر مکعب روی گیاه کینوا رقم *Titicaca* با سه تکرار انجام گردید. برای تهیه خاک شور فاقد آرسنیک از عمق صفر تا ۳۰ سانتی‌متری از روستای قریه اره واقع در ۴۵ کیلومتری جاده مشهد-سرخس نمونه‌برداری گردید. پس از خشک کردن با هوا و کوبیدن، نمونه‌ها با کمک الک دو میلی‌متری الک شده و سپس بخشی از آن‌ها به منظور تجزیه‌های اولیه به آزمایشگاه علوم خاک منتقل گردید. پس از آماده‌سازی خاک، ۴ کیلوگرم خاک به هر گلدان منتقل گردید. سپس نمک آرسنیک ($\text{Na}_2\text{AsH}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$) به مقدار ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک به گلدان‌ها اضافه و هم زده شد، پس از کشت گیاه کینوا رقم *Titicaca*، هنگامی که گیاهان به مرحله دوبرگی رسیدند، محیط کشت مایع حاوی باکتری سودوموناس در سه مرحله (با فواصل ۵ روزه) اضافه شدند و محلول پاشی گیاهان در مرحله ۴ برگی با اسید سالیسیلیک طی ۵ مرحله (با فواصل ۶ روزه) انجام شد. سپس پارامترهای رنگیزه‌های فتوسنتزی (Lichtenthaler, 1987)، فعالیت آنتی‌اکسیدانی (Brand-Williams et al, 1995)، پرولین (Bates et al, 1973) و کاتالاز (Dhindsa et al, 1981) برگ‌های تازه گیاه در آزمایشگاه خاکشناسی دانشگاه فردوسی انجام گردید.

یافته‌ها: نتایج تجزیه واریانس اثر متقابل سه گانه آرسنیک×اسیدسالیسیلیک×باکتری نشان داد که اثر متقابل سه گانه بر کاروتنوئید در سطح ۱ درصد ($p < 0.01$)، و بر مقادیر کلروفیل a، پرولین و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در سطح ۵ درصد ($p < 0.05$) معنی‌دار شدند. نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل سه گانه سطوح آرسنیک، محلول‌پاشی اسیدسالیسیلیک و باکتری نشان داد که در سطح صفر آرسنیک+ محلول پاشی ۰/۵ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک + تلقیح باکتری نقش مثبت و معنی‌داری بر مقدار کلروفیل a (۱۰/۷۶ میکروگرم بر گرم وزن تر) معادل ۲۵/۱۱٪ و کاروتنوئید (۳/۵۳ میکروگرم بر گرم وزن تر) معادل ۲۵/۱۷٪ نسبت به شاهد هر یک (خاک شور) افزایش نشان داد. همچنین حضور آرسنیک (۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) + محلول‌پاشی ۰/۵ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک + تلقیح باکتری موجب افزایش معنی‌دار پرولین (۸/۲۳ میکروگرم بر گرم وزن تر) معادل ۲۲/۲۹٪ نسبت به نمونه شاهد شد که اثرات مثبت محلول‌پاشی اسید سالیسیلیک و باکتری را در شرایط تنش شوری همراه با آلودگی آرسنیک در خاک نشان داد. آرسنیک (۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) + محلول‌پاشی ۰/۵ میلی‌مولار اسید سالیسیلیک + تلقیح باکتری افزایش معنی‌داری بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه کینوا (۴۵/۰۳ میکروگرم بر گرم وزن تر) معادل ۴۷/۸۸٪ نسبت به نمونه شاهد داشت.

نتیجه‌گیری: استفاده از باکتری سودوموناس پوتیدا و اسید سالیسیلیک می‌تواند با تنظیم سطوح متابولیت‌های مختلف آنزیمی آنتی‌اکسیدانی، متابولیت‌های ثانویه و ترکیبات کلرات‌کننده فلز، تحمل گیاهان را در برابر تنش‌های شوری و فلزات سنگین افزایش دهند. در این تحقیق اسید سالیسیلیک در شرایط شوری طبیعی خاک (۸/۱۶ dS/m) باعث افزایش کلروفیل a، کاروتنوئید، پرولین و فعالیت آنتی‌اکسیدانی به ترتیب به میزان ۱۴٪، ۹/۶٪، ۶/۴٪ و ۸/۷٪ شد. از طرفی دیگر، در شرایط شوری طبیعی خاک (۸/۱۶ dS/m) با آلودگی ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم آرسنیک در خاک باعث افزایش شدید پرولین گیاه به میزان ۲۰/۶۵٪ شده که منجر به افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی به میزان ۳۸/۰۲٪ شده است. تلقیح باکتری سودوموناس پوتیدا به خاک شور آلوده به آرسنیک باعث افزایش پرولین گیاه به میزان ۲۲/۲۹٪ و افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی به میزان ۴۷/۸۸٪ شده است که بهبود زیادی در محتوای کلروفیل، کاروتنوئید و فتوسنتز گیاه کینوا گردیده است.

کلیدواژه‌ها: آرسنیک، سالیسیلیک اسید، باکتری سودوموناس پوتیدا، کینوا

مقدمه

آرسنیک به همراه شوری خاک و همچنین آلودگی آرسنیک به تنهایی دو مشکل عمده زیست محیطی در سراسر جهان هستند (Parvez et al., 2020). استفاده مفید و مناسب از خاک‌های آلوده به شوری و فلزات سنگین برای تضمین امنیت غذایی برای جمعیت فزاینده جهان مهم است و نیاز به اصلاحات مناسبی است که بتواند خاک‌های آلوده را اصلاح کرده و جذب فلزات سمی توسط محصولات غذایی را محدود کند (Shabbir et al, 2021).

آرسنیک فلزی سمی و یکی از آلاینده‌های اصلی در محیط زیست محسوب می‌شود. ریشه‌ها معمولاً اولین بافتی هستند که در معرض آرسنیک قرار می‌گیرند، زمانی که این فلز توسط گیاهان جذب می‌شود از گسترش و تکثیر ریشه جلوگیری می‌کند. آرسنیک با فرآیندهای متابولیک متنوع در سلول‌ها مانند تعامل با گروه‌های سولفیدری (SH) و جایگزینی با فسفات در آدنوزین تری فسفات (ATP)، تداخل ایجاد می‌کند و در نتیجه عملکرد سلولی را که منجر به سمیت گیاه می‌شود، مختل می‌کند (Ullrich-Eberius et al, 1989). ایجاد سمیت توسط آرسنیک در گیاهان با تولید گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) مرتبط بوده و در نتیجه منجر به پراکسیداسیون لیپیدی و آسیب به اسیدهای نوکلئیک و پروتئین‌ها می‌شود (Aksakal and Esim 2015): (Chandrakar et al, 2017; Chandrakar et al, 2016).

علاوه بر خواص شیمیایی خاک، فعالیت‌های میکروبی خاک نیز بر فراهمی زیستی فلز و گونه‌زایی در سیستم خاک-گیاه تأثیر می‌گذارد (Ahmad et al, 2016). در واقع، میکروارگانیسم‌های موجود در خاک در بسیاری از فرآیندهای بیوژئوشیمیایی مهم که بر رفتار و سرنوشت یک فلز در سیستم خاک-گیاه حاکم است، درگیر هستند (Mishra et al, 2017). فعالیت میکروبی خاک می‌تواند بر جذب یا دفع آرسنیک، حلالیت، فراهمی زیستی، تحرک و انتقال از خاک به گیاه با تغییر گونه‌زایی شیمیایی آرسنیک در خاک تأثیر بگذارد (Mishra et al, 2017). سودوموناس پوتیدا باکتری گرم منفی است که در خاک و زیستگاه‌های

تغییرات آب و هوایی، کمبود آب، و افزایش شوری از جمله سوءتغذیه و مشکلات مزمن رژیم غذایی، چالش‌های اصلی برای کشاورزی پایدار و همچنین برای امنیت غذایی و تغذیه‌ای جمعیت در حال رشد هستند و تنوع بخشیدن به سیستم‌های کشت با معرفی محصولات جدید برای دستیابی به اهداف کشاورزی پایدار اهمیت دارند (Shukla et al, 2019). کینوا یک گیاه مناسب است که به دلیل سازگاری بالا با طیف وسیعی از شرایط رشد ممکن است به پایداری محیطی و غذایی کمک کند، کشت این گیاه به دلیل ویژگی‌های عملکردی که در شرایط تنش‌های شوری و خشکی دارد و همچنین اهمیت تغذیه‌ای که در کشورهای توسعه نیافته و در حال توسعه با شرایط آب و هوایی خشک و خیلی خشک در حال گسترش می‌باشد (Bazile et al, 2015). همچنین کینوا می‌تواند به بهره‌وری بالاتری دست یابد و کیفیت غذایی را در محیط‌های مختلف که محصولات معمولی نمی‌توانند عملکرد خوبی داشته باشند، حفظ کند. علاوه بر این، کینوا پتانسیل مقاومت در برابر تنش‌های مختلف مانند شوری، خشکسالی و شرایط یخبندان را دارد (Jacobsen et al, 2003; González et al, 2021). این گیاه یک محصول سالانه، عمدتاً خود‌گرده افشان، دو لپه‌ای و C₃ برای تثبیت CO₂ در طول فتوسنتز است (Jacobsen et al, 2003). به نظر می‌رسد کشت محصولات غذایی هالوفیت مانند کینوا (*Chenopodium quinoa Willd*) امیدوارکننده‌ترین رویکرد برای رسیدگی به مسئله شوری خاک باشد (Abbas et al, 2021). کینوا قادر به تحمل تنش شوری زیاد و تنش خشکی است و همچنان قادر به تولید دانه‌های غنی از مواد مغذی با کیفیت بالا است (Abbas et al, 2021). با این حال، هنگامی که کینوا تحت تنش آرسنیک (Shabbir et al, 2020) یا ترکیب آرسنیک و شوری (Parvez et al., 2020) رشد می‌کند، رشد آن به طور قابل توجهی کاهش می‌یابد و دانه‌های آن به دلیل تجمع بیشتر برای مصرف انسان نامناسب می‌شوند.

متعادل می‌شود (Mishra et al, 2013; Talukdar and Talukdar, 2013). علاوه بر این، استفاده از باکتری‌های حل‌کننده فسفات نیز در هنگام استفاده از سایر میکروب‌های ریزوسفری مقاوم به فلز برای افزایش بهره‌وری و پایداری گیاهان در خاک‌های آلوده، اثرات مفید بسیاری را نشان می‌دهد (Tian et al, 2014).

حدود ۲۰ درصد از زمین‌های کشاورزی جهان به صورت کشت آبی است و ۴۵ درصد از آن صرفاً برای تامین غذا استفاده شده است (Weil et al, 2016). خاک‌های متأثر از نمک بیش از ۲۰ درصد از زمین‌های زیر کشت آبی جهان را اشغال کرده است. در برخی از کشورها نیمی از خاک‌های تحت کشت آبی متأثر از املاح هستند (Qadir et al, 2014). نمونه‌هایی از مناطق مهم تخریب‌شده زمین‌های ناشی از نمک در گذشته و حال شامل حوضه دریای آرال (آسیای مرکزی) بیش از ۵۰٪ خاک‌های زیرکشت آبی می‌باشد، درحوضه هندوستان گنگ (هند) بالغ بر ۶/۷۴ میلیون هکتار از زمین‌های تحت تأثیر نمک بوده و برآورد شده است که مشکل تخریب زمین ناشی از شوری تا سال ۲۰۵۰ بالغ بر ۱۶/۲ میلیون هکتار گسترش یابد، درحوضه سند (پاکستان) تقریباً ۶ میلیون هکتار (۳۵-۴۰٪ از کل سطح خاک زیر کشت آبی) این مشکلات را تجربه کرده است، مساحت خاک شور در چین حدود ۳۶/۹۳ میلیون هکتار است که حدود یک سوم کل زمین‌های قابل کشت را تشکیل می‌دهد، درخاورمیانه ۲۰×۱۰۶ هکتار تحت تأثیر افزایش شوری خاک است که دلیل آن روش‌های بد آبیاری، نرخ تبخیر بالا، و افزایش شوری آبهای زیرزمینی است. علاوه بر این، بهره‌وری از اراضی آبی حوضه فرات (سوریه، عراق) به طور جدی توسط شوری محدود شده است و در مصر، ۱۰۶ × ۱ هکتار از اراضی قابل کشت در امتداد رود نیل تحت تأثیر نمک قرار دارد. تجمع نمک در حوضه رود اردن بر تولیدات کشاورزی در سوریه و اردن تأثیر منفی گذاشته است (Qadir et al, 2014). اینها همه مناطق کم بارش هستند که تبخیر و تعرق بالقوه سالانه بیشتر از بارش

آبی حاوی اکسیژن یافت می‌شود و کلنی شدن آن با ریشه‌های گیاه به طور گسترده به باکتری‌ها اجازه می‌دهد از مواد مغذی ریشه استفاده کرده و در سطح ریشه و در ریزوسفر رشد کنند (Patten & Glick, 2002). با این وجود، سودوموناس پوتیدا موجب ترغیب رشد گیاه می‌شود و از گیاهان در برابر عوامل بیماری‌زا محافظت می‌کند که به طور غیر مستقیم رشد گیاه را افزایش می‌دهد (Ma et al, 2011). در تحقیقی گزارش شده است که استفاده از باکتری سودوموناس پوتیدا موجب بهبود سطح رنگدانه‌های فتوسنتزی در مقایسه با گیاه شاهد شده است و این در حالی است که قرار گرفتن در معرض آرسنات (۵۰ میکرومولار) به تنهایی به طور قابل توجهی رنگدانه‌های فتوسنتزی گیاه برنج را کاهش داده است (Awasthi et al, 2018).

گزارشات متعددی نشان می‌دهد که اسید سالیسیلیک نیز می‌تواند نقشی محوری در محافظت از گیاهان در برابر تنش‌های محیطی، از جمله فلزات سنگین ایفا کند، بنابراین سمیت فلزات سنگین را کاهش داده، بر جذب و یا تجمع آن‌ها در اندام‌های گیاهی تأثیر می‌گذارد (Safari et al, 2018; Guo et al, 2019). همچنین در از بین بردن گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و یا کاهش تجمع گونه‌های فعال اکسیژن موثر می‌باشد. از جمله اثرات مثبت اسید سالیسیلیک می‌توان به تقویت سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی (Wang et al, 2019)، محافظت از ثبات و یکپارچگی غشاء (Belkadi et al, 2015)، تعامل با هورمون‌های گیاهی (Tamás et al, 2015) و بهبود عملکرد فتوسنتزی (Yin et al, 2018) اشاره کرد.

تولیدگونه‌های فعال اکسیژن (ROS) در گیاهان توسط آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی تنظیم می‌شود که رادیکال‌های آزاد را حذف می‌کنند و در نتیجه سلول‌ها را از آسیب‌های اکسیداتیو محافظت می‌کنند. در حضور باکتری‌های محرک رشد مقاوم به فلز، تنش اکسیداتیو به دلیل کاهش جذب آرسنیک به میزان قابل توجهی کاهش می‌یابد، در نتیجه سطوح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مورد نیاز در سلول

صورت گلدانی بر روی گیاه کینوا رقم *Titicaca* با سه تکرار انجام گردید.

برای اعمال تیمارهای مورد نظر در مجموع ۲۴ گلدان با حجم ۵۰۰۰ سانتی متر مکعب تهیه شد. برای تهیه خاک شور فاقد آرسنیک از عمق صفر تا ۳۰ سانتی متری از روستای قریه اره واقع در ۴۵ کیلومتری جاده مشهد- سرخس نمونه برداری گردید. پس از هوا خشک کردن و کوبیدن، نمونه ها با کمک الک دو میلی متری الک شده و سپس بخشی از آن ها به منظور تجزیه های اولیه به آزمایشگاه علوم خاک منتقل گردید (جدول ۱).

پارامترهای اسیدیته (pH) و هدایت الکتریکی عصاره اشباع خاک (EC_e) به ترتیب با استفاده از دستگاه های pH متر (METROHM632) و هدایت سنج الکتریکی (JENWAY 4310) اندازه گیری گردید. غلظت آرسنیک کل در خاک با روش هضم با تیزاب سلطانی (Behera, 2006) اندازه گیری شد. غلظت کاتیونهای دو ظرفیتی کلسیم و منیزیم محلول به روش تیتراسیون (EDTA) (Richards, 1954) و غلظت کاتیون تک ظرفیتی سدیم محلول با استفاده از دستگاه فلیم فتومتر (JENWAY-PFP7) در عصاره اشباع خاک اندازه گیری شدند. بافت خاک به روش هیدرومتری (Page et al, 1982) تعیین شد. کربن آلی محلول به روش (Walkley and Black, 1934)، پتاسیم قابل دسترس به روش (Chapman, 1965) و با دستگاه فلیم فتومتر، فسفر قابل استفاده به روش (Olsen et al, 1982) اندازه گیری شد.

۴ کیلوگرم خاک به هر گلدان منتقل گردید. سپس تیمار آرسنیک ۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم خاک (mg As/pot ۱۶۰) با استفاده از نمک آرسنیک ($\text{Na}_2\text{AsHO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) اضافه گردید، این عمل هر ۴ روز یکبار، طی ۴ مرحله به تیمارها اضافه شد. به منظور به تعادل رسیدن آرسنیک در خاک، پس از گذشت ۸ هفته از آخرین مرحله اضافه کردن نمک آرسنیک، تعداد ۱۰ بذر گیاه کینوا در عمق ۱ سانتی متری خاک هر گلدان کشت و آبیاری انجام شد. ۴ هفته پس از کشت تعداد گیاهچه ها

سالانه است (Weil et al, 2016). در کشور ما نیز از ۶/۸ میلیون هکتار زمین کشاورزی حدود ۴/۳ میلیون هکتار جزو اراضی شور محسوب می شوند، بیشتر زمین های شور در مناطق شمال شرق، شرق، جنوب شرقی، مرکزی، و اراضی حوزه خلیج فارس و دریای عمان قرار دارند (Moameni, 2010).

با توجه به این که برخی از مناطق کشور مانند خراسان رضوی، اصفهان، کرمان و غیره آلوده به آرسنیک هستند (Khadem Moghadam Igdellou et al, 2019) و طبق جدول استانداردهای آلودگی منابع خاک حد مجاز آرسنیک در خاک های قلیایی ۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم ذکر شده است، همچنین اکثر خاک های ایران با درجات مختلف شوری همراه بوده و کمتر عملیات مدیریتی زراعی مانند انتخاب گیاه مناسب و یا کاربرد اسیدهای آلی مانند اسید سالیسیلیک استفاده می شود، بنابراین تحقیقی با اهداف ذیل انجام شد: (۱) بررسی تاثیر باکتری سودوموناس پوتیدا در شرایط تنش شوری خاک، (۲) بررسی تاثیر آلودگی آرسنیک در شرایط تنش شوری خاک، (۳) بررسی تاثیر محلول پاشی اسید سالیسیلیک بر گیاه کینوا کشت شده در خاک شور و (۴) اثرات دوگانه و سه گانه تیمارهای آزمایشی بر برخی از خصوصیات کمی و کیفی گیاه کینوا.

مواد و روش ها

در این پژوهش، تنش شوری خاک همراه با آلودگی به آرسنیک تحت تاثیر اسید سالیسیلیک و باکتری سودوموناس در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه فردوسی مشهد به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی مورد بررسی قرار گرفت. فاکتورهای آزمایشی شامل فاکتور اول تلقیح با باکتری شامل دو سطح (۱) تلقیح با باکتری، (۲) عدم تلقیح با باکتری، فاکتور دوم دو سطح آرسنیک (صفر و ۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم) و فاکتور سوم محلول پاشی دو سطح اسید سالیسیلیک (صفر و ۰/۵ میلی مولار) به

مولار را به آن اضافه کرده و به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی قرار داده و میزان جذب آن در طول موج ۵۱۷ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر (biochrom Libra S22) قرائت گردید. پارامتر فعالیت آنتی اکسیدانی به کمک فرمول زیر محاسبه شد.

$$[1 - \frac{A_{sample}}{A_{control}}] \times 100 = (\%) \text{ فعالیت آنتی اکسیدانی}$$

A sample = نمونه آزمایشی در طول موج ۵۱۷ نانومتر

Acontrol = نمونه شاهد در طول موج ۵۱۷ نانومتر

اندازه‌گیری پرولین

برای اندازه‌گیری پرولین ۰/۵ گرم از بافت تازه برگ که خرد شده است را با ۱۰ میلی لیتر اسید سولفوسالیک ۱۰ درصد حل گردید و سپس فیلتر شد. از این مایع فیلتر شده ۲ میلی لیتر برداشته و با ۲ میلی لیتر اسید ناین هیدرین و ۲ میلی لیتر اسید استیک مخلوط گردید و به مدت یک ساعت در حمام آب گرم ۱۰۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد. غلظت پرولین نمونه‌ها از روی منحنی استاندارد و با استفاده از فرمول زیر به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۲۰ نانومتر محاسبه گردید (Bates et al, 1973).

$$Y = 0.0012X + 0.269$$

Y = غلظت پرولین

X = مقدار جذب قرائت شده توسط دستگاه اسپکتروفتومتر

تهیه عصاره آنزیمی

یک گرم بافت گیاه در یک هاون چینی محتوی ۳ میلی لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی مولار (pH=7.4) حاوی (EDTA) یک میلی مولار، فنیل متان سولفونیل فلورید (PMSF) یک میلی مولار و پلی وینیل پیرولیدون (PVP) یک درصد سائیده شد. تمام مراحل استخراج و سنجش در محیط با دمای پایین انجام شد عصاره حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در سانتریفیوژ یخچال دار (۲۲۰۰۰g) و دمای ۴ درجه سانتی گراد قرار گرفت. از محلول رویی برای اندازه‌گیری آنزیم کاتالاز و فعالیت آنتی اکسیدانی استفاده گردید.

به ۲ گیاهچه در هر گلدان تنک شد. هنگامی که گیاهان به مرحله دوبرگی رسیدند، محیط کشت مایع حاوی باکتری سودوموناس در سه مرحله (با فواصل ۵ روزه) به خاک گلدان‌ها اضافه شدند و محلول پاشی گیاهان در مرحله ۴ برگگی با اسید سالیسیلیک طی ۵ مرحله (با فواصل ۶ روزه) انجام شد. گلدان‌ها هر سه روز یکبار و بسته به نیاز رطوبتی آبیاری شدند. پس از گذشت ۵ ماه از تاریخ کشت، گیاهان هر گلدان برداشت شد.

اندازه‌گیری رنگیزه‌های فتوسنتزی

برای اندازه‌گیری رنگیزه‌های کلروفیل و کاروتنوئیدها از روش لیچن تالر (Lichtenthaler, 1987) استفاده شد. در این روش ۰/۱ گرم از وزن تر برگ به همراه ۵ میلی‌لیتر استون ۱۰۰ درصد در هاون چینی سائیده شد. عصاره حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در ۲۵۰۰ دور، سانتریفیوژ شده و سپس توسط اسپکتروفتومتر در طول موج‌های ۶۴۶/۸، ۶۶۳/۲۰ و ۴۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. برای محاسبه کلروفیل a، کلروفیل b و کاروتنوئید از روابط ۱ و ۲ و ۳ استفاده شد:

$$Chla = (12.25 A663.2 - 2.79 A646.8) \quad (1)$$

$$Chlb = (21.21 A646.8 - 5.1 A663.2) \quad (2)$$

$$Car = \{1000 A470 - 1.8Chla - 85.02Chlb\} / 198 \quad (3)$$

در این فرمول Chla، Chlb و Car به ترتیب غلظت

کلروفیل a، b و کاروتنوئیدها می‌باشد.

(A) میزان جذب قرائت شده در هر طول موج توسط

اسپکتروفتومتر می‌باشد).

اندازه‌گیری فعالیت آنتی اکسیدانی

برای انجام این آزمایش از روش براند-ویلیامز (۱۹۹۲) استفاده شد. این روش بر اساس میزان مهار رادیکال آزاد با استفاده از ۲ و ۲ دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل می‌باشد. ابتدا ۳/۹ میلی لیتر از محلول DPPH تهیه شده (۰/۱۵ mM در ۳۳۸ ملی لیتر متانول) داخل لوله آزمایش ریخته و ۰/۱ میلی لیتر از عصاره متانولی ۰/۰۰۰۰۶

اندازه‌گیری فعالیت کاتالاز

میانگین‌ها با آزمون دانکن در سطح احتمال آماری ۵ درصد انجام گردید.

نتایج و بحث

نتایج خاک قبل از شروع آزمایش بیانگر آن است که بافت خاک لومی و بر اساس هدایت الکتریکی عصاره اشباع، خاک با شوری زیاد، مقادیر فسفر قابل دسترس کم، پتاسیم کم و نیتروژن کم می‌باشد (جدول ۱).

نتایج تجزیه واریانس تیمارهای آزمایشی نشان داد که اثرات ساده تیمارهای آرسنیک و اسید سالیسیلیک و باکتری بر کلروفیل a، کلروفیل کل، کاروتنوئید، پرولین، کاتالاز و فعالیت آنتی اکسیدانی در سطح یک درصد ($p < 0.01$) و بر مقدار کلروفیل b در سطح ۵ درصد ($p < 0.05$) معنی دار شدند (جدول ۲). اثر متقابل آرسنیک و اسید سالیسیلیک بر کلروفیل a در سطح یک درصد ($p < 0.01$)، و بر مقدار فعالیت آنتی اکسیدانی در سطح ۵ درصد معنی دار شد (جدول ۲). اثر متقابل آرسنیک و باکتری بر پرولین در سطح یک درصد ($p < 0.01$)، و بر مقدار کلروفیل b و کلروفیل کل در سطح ۵ درصد ($p < 0.05$) معنی دار شد (جدول ۲). اثر متقابل اسید سالیسیلیک و باکتری بر کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کاروتنوئید برگ در سطح ۵ درصد ($p < 0.05$)، و بر پرولین و فعالیت آنتی اکسیدانی در سطح ۱ درصد ($p < 0.01$) معنی دار شد (جدول ۲). در حالی که اثر متقابل سه گانه آرسنیک × اسید سالیسیلیک × باکتری بر کاروتنوئید در سطح ۱ درصد ($p < 0.01$)، و بر مقادیر کلروفیل a، پرولین و فعالیت آنتی اکسیدانی در سطح ۵ درصد ($p < 0.05$) معنی دار شد (جدول ۲).

برای انجام این آزمایش از روش (1981) et al Dhindsa استفاده شد. در ابتدا ۲/۸۷ میلی لیتر بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی مولار (pH=۷/۴) و ۳۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۱/۵ میلی مولار را به لوله آزمایش اضافه کرده سپس با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی واکنش شروع می‌شود و تغییرات جذب از زمان شروع تا یک دقیقه بعد از آن محاسبه گردید. مقدار کاهش جذب پراکسید هیدروژن در نمونه‌ها با طول موج ۲۴۰ نانومتر به عنوان مقدار فعالیت آنزیم کاتالاز در نظر گرفته شد. یک واحد آنزیمی کاتالاز مقدار آنزیمی است که یک میلی مول پراکسید هیدروژن را در یک دقیقه تجزیه می‌کند.

آماده سازی آگار برای کشت باکتری سودوموناس پوتیدا

آماده‌سازی مواد مغذی آگار برای کشت در لوله‌های آزمایش مشابه آماده‌سازی محیط رشد بود. ماده مغذی آگار شامل ۵ درصد پیتون از ۳ درصد عصاره گوشت و ۱۲ درصد آگار بود. آگار مغذی از Merck Sdn.Bhd خریداری شد. ماده مغذی برای کشت استوک با تعلیق ۲۰ گرم در ۱ لیتر آب غیر معدنی و حرارت دادن در حمام آب جوش یا در جریان بخار و اتوکلاو حدود ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد تهیه شد (Azoddein et al. 2015). سودوموناس پوتیدا سویه 1696 (PTCC) از مرکز تحقیقات میکروبی ایران در تهران (به دلیل پاکسازی بسیار موثر بسیاری از فلزات سنگین) تهیه شد.

داده‌های حاصل از آزمایش با نرم افزار آماری JMP نسخه ۱۴ مورد تجزیه آماری قرار گرفت و مقایسه

جدول ۱. برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی اولیه خاک آزمایشی مورد استفاده در این مطالعه

SAR ($\frac{meq/l}{meq/l}$)	Mg ⁺⁺ _(Av) (meq/l)	Ca ⁺⁺ _(Av) (meq/l)	Na ⁺ _(Av) (meq/l)	K _(Av) (mg/kg)	P _(Av) (mg/kg)	OC (%)	N (%)	Total As (mg/kg)	EC _e (dS/m)	pH	بافت
۹/۹۶	۱۱/۲۵	۲۵/۷۸	۴۲/۸۴	۱۰۹/۸۴	۵/۰۸	۰/۶۲	۰/۰۸	۰/۱	۸/۱۶	۸/۱۷	لومی

جدول ۲. تجزیه واریانس تیمارهای آزمایشی بر پارامترهای اندازه‌گیری شده

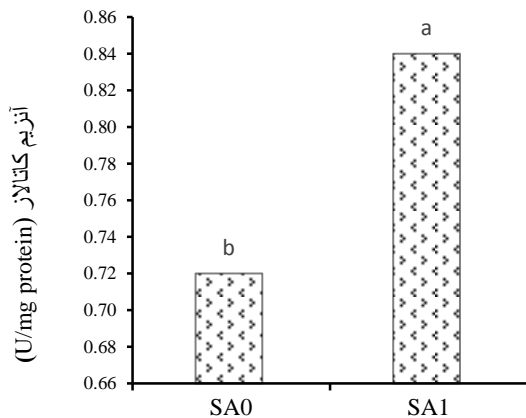
منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات					
		کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل کل	کاروتنوئید	پرولین	کاتالاز
آرسنیک (a)	۱	۲۰/۲۵**	۲/۷۷*	۳۸/۰۱**	۰/۳۲**	۱۱/۰۷**	۰/۰۸۴**
سالیسیلیک اسید (b)	۱	۱۶/۷۹**	۲/۲۶*	۳۱/۴۱**	۰/۸۶**	۰/۴۸**	۰/۰۸۹**
باکتری (c)	۱	۵/۳۲**	۳/۳۷*	۱۷/۱۸**	۱/۰۱**	۱/۸۹**	۰/۰۴۹**
(a*b)	۱	۰/۹۷**	۰/۱۰ ^{ns}	۰/۴۴ ^{ns}	۰/۰۰۵ ^{ns}	۰/۲۱*	۰/۰۰۰۵ ^{ns}
(a*c)	۱	۰/۰۱۷ ^{ns}	۱/۶۸*	۱/۳۵*	۰/۰۱۵ ^{ns}	۰/۸۳**	۰/۰۰۰۳ ^{ns}
(b*c)	۱	۰/۲۲**	۱/۳۶*	۲/۶۸*	۰/۱۶*	۱/۲۸**	۰/۰۰۲۵ ^{ns}
(a*b*c)	۱	۰/۲۲*	۰/۵۹ ^{ns}	۰/۰۸۶ ^{ns}	۰/۳۳**	۰/۲۶*	۰/۰۰۰۰۸ ^{ns}
خطا	۱۶	۰/۰۳۳	۰/۱۳	۰/۱۵	۰/۰۰۷۶	۰/۰۱۶	۰/۰۰۰۷

**،* و ns به ترتیب معنی داری در سطح ۱ درصد، معنی داری در سطح ۵ درصد، عدم وجود اختلاف معنی دار

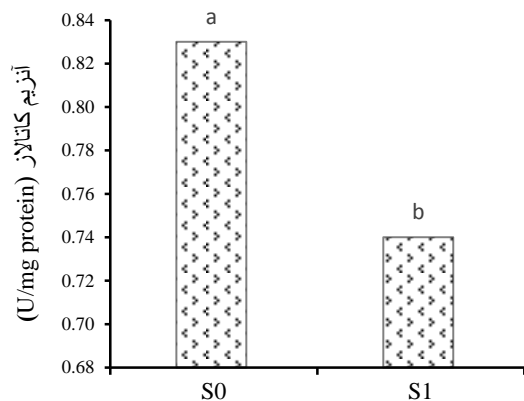
اثرات ساده تیمارهای آزمایشی (اسید سالیسیلیک، باکتری و آرسنیک) بر مقدار آنزیم کاتالاز

نتایج مقایسه میانگین اثر ساده باکتری سودوموناس پوتیدا (تلقیح و عدم تلقیح) نشان داد تیمارهای دارای باکتری مقدار کاتالاز کمتری (۱۰/۸۴-٪) نسبت به شاهد داشته اند (شکل ۱). زمانی که گیاهان تحت تاثیر تنش‌های مختلف نظیر شوری و فلزات سنگین قرار می‌گیرند دچار تنش اکسیداتیو می‌شوند (Mittler, 2002)، گیاه برای مقابله با این تنش‌ها آنزیم‌های آنتی اکسیدانی مانند کاتالاز تولید می‌کنند (Parida et al, 2004). با توجه به شکل ۱ تلقیح خاک توسط باکتری سودوموناس پوتیدا در کاهش تنش اکسیداتیو بسیار موثر می‌باشد.

تلقیح باکتری (S1)، عدم تلقیح باکتری (S0) نتایج مقایسه میانگین اثر ساده سالیسیلیک اسید (صفر و ۰/۵ میلی مولار) نشان داد که محلول پاشی اسید سالیسیلیک باعث افزایش آنزیم کاتالاز به میزان ۱۶/۶۶٪ نسبت به شاهد گردیده است (شکل ۲). نتایج حاصل از این تحقیق با تحقیقی مشابه که به منظور بررسی تاثیر سالیسیلیک اسید (۰/۵ میلی مولار) در سطوح مختلف خاک شور (۸۰ و ۱۲۰ میلی مولار کلرید سدیم) بر گیاه گندم انجام گردیده است همخوانی دارد (Erdal et al, 2011).



شکل ۲. اثر ساده اسید سالیسیلیک بر مقدار کاتالاز گیاه (p<0.01)



شکل ۱. اثر ساده باکتری سودوموناس پوتیدا بر مقدار کاتالاز گیاه (p<0.01)

آرسنیک (۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم) همراه با تنش شوری خاک + تلقیح باکتری موجب افزایش کلروفیل b معادل ۱۷/۶۱٪ نسبت به همین تیمار آرسنیک+ بدون باکتری شد (جدول ۳).

جدول ۳. اثر متقابل آرسنیک و باکتری بر مقادیر کلروفیل b و کلروفیل کل

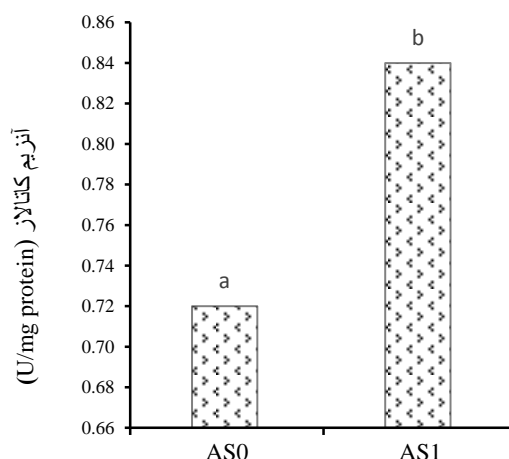
سطوح آرسنیک (mg/kg)	سطوح باکتری	کلروفیل b	کلروفیل کل
صفر	عدم تلقیح	۳/۰۴ ^b	۱۲/۲۸ ^b
صفر	با تلقیح	۴/۳۲ ^a	۱۴/۴۵ ^a
۴۰	عدم تلقیح	۲/۸۹ ^b	۱۱/۴۵ ^c
۴۰	با تلقیح	۳/۱۱ ^b	۱۰/۲۴ ^d

در هر ستون میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک بایکدیگر تفاوت معنی‌دار ندارند ($P < 0.05$)

در تحقیقی گزارش شده است که تلقیح باکتری سودوموناس پوتیدا در سطح صفر جیوه+ خاک شور (۸/۶۵ dS/m) باعث افزایش مقدار کلروفیل b (۹۰/۴۷٪) نسبت به شاهد (فقط خاک شور) گردیده است (Alsaleh et al., 2021). قرار گرفتن در معرض آرسنیک به تغییر ساختار کلروپلاست، تخریب غشاها و همچنین تغییرات در تجمع و انتقال یون‌ها منجر می‌شود که در نهایت به کاهش محتوای کلروفیل در برگ گیاه برنج می‌شود (Srivastava et al., 2013). تولید گونه‌های اکسیژن پذیر ناشی از آرسنیک نیز برای آسیب رساندن به دستگاه فتوسنتزی و محتوای پروتئین و در نتیجه کاهش آنها شناخته شده است (Adir et al., 2003). در تحقیقی با بررسی بر روی گیاه برنج گزارش شده است که افزایش محتوای کلروفیل در برگ‌های برنج تلقیح شده با باکتری سودوموناس پوتیدا به تجمع کمتر آرسنیک منتهی شده است که از اثرات سمی آرسنیک جلوگیری می‌کند (Awasthi et al., 2018).

اسید سالیسیلیک ۰/۵ مولار (SAI)، سطح صفر اسید سالیسیلیک (SAO)

نتایج مقایسه میانگین اثر ساده آرسنیک (صفر، ۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم) نشان داد تیمارهایی که دارای آرسنیک هستند آنزیم کاتالاز بیشتری (۱۶/۶۶٪) نسبت به شاهد دارند (شکل ۳). آنزیم‌های خاک به عنوان شاخص‌های حساس برای آلودگی فلزات سنگین در خاک در نظر گرفته می‌شوند و برای نظارت بر سلامت خاک مورد استفاده قرار گرفته اند (Wang et al, 2007). نتایج حاصل از این آزمایش با تحقیقی که بر روی آرسنیک (۱۰۰ میکرومولار) در خاک شور (۱۰۰ میلی مولار NaCl) بر روی گیاه *Cakile maritima* صورت گرفته است همخوانی دارد (Demir et al, 2013).



شکل ۳. اثر ساده آرسنیک بر مقدار کاتالاز گیاه ($p < 0.01$)
سطح ۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم آرسنیک (AS1)، سطح صفر آرسنیک (AS0)

اثر متقابل آرسنیک و باکتری سودوموناس پوتیدا بر مقادیر کلروفیل b و کلروفیل کل

نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل سطوح آرسنیک (صفر، ۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم) و باکتری (تلقیح، عدم تلقیح) نشان داد که تیمار سطح صفر آرسنیک+ تلقیح با باکتری موجب افزایش معنی‌دار کلروفیل b (۴۲/۱٪) و کلروفیل کل (۱۷/۶۷٪) نسبت به شاهد در گیاه کینوا گردید (جدول ۳)، که بیانگر نقش مثبت باکتری در شرایط تنش شوری خاک است. این نقش باکتری همچنین با تنش آلودگی

اثر متقابل سه گانه سطوح آرسنیک، محلول پاشی اسیدسالیسیلیک و باکتری سودوموناس پوتیدا بر مقادیر کلروفیل *a* کاروتنوئید، پرولین و فعالیت آنتی اکسیدانی نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل سه گانه سطوح آرسنیک، محلول پاشی اسیدسالیسیلیک و باکتری (تلقیح، عدم تلقیح) نشان داد که تیمار سطح صفر آرسنیک+محلول پاشی ۰/۵ میلی مولار اسید سالیسیلیک +تلقیح باکتری می‌تواند نقش مثبتی و معنی داری بر کلروفیل *a* معادل ۲۵/۱۱٪ و کاروتنوئید معادل ۲۵/۱۷٪ نسبت به شاهد (شرایط خاک با تنش شوری) داشته باشد. همچنین حضور آرسنیک (۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم)+محلول پاشی ۰/۵ میلی مولار اسید سالیسیلیک +تلقیح باکتری موجب افزایش معنی دار پرولین معادل ۲۲/۲۹٪ نسبت به شاهد شد که اثرات مثبت محلول پاشی اسید سالیسیلیک و باکتری را در شرایط تنش‌های شوری همراه با آلودگی آرسنیک در خاک نشان می‌دهد. تیمار آرسنیک (۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم)+محلول پاشی ۰/۵ میلی مولار اسید سالیسیلیک +تلقیح باکتری افزایش معنی دار فعالیت آنتی اکسیدانی گیاه کینوا را معادل ۴۷/۸۸٪ نسبت به شاهد نشان داد (جدول ۵).

اگرچه آرسنیک در سیتوپلاسم سلول گیاهی یک فلز ردوکس نیست، اما به راحتی از فرم آرسنات به فرم آرسنیت کاهش می‌یابد، در نتیجه در تولید گونه‌های فعال اکسیژن دخالت می‌کند و در نهایت موجب آسیب اکسیداتیو به بیومولکول ها می‌شود (Gunes et al, 2009). در تحقیقی که توسط فاضلیان و اسرار بر روی گیاه بابونه انجام شد گزارش کردند زمانی که گیاه بابونه در تنش آرسنیک قرار داشته است استفاده از اسید سالیسیلیک موجب افزایش سرعت رشد گیاه، فتوسنتز و کاهش تجمع آرسنیک در برگ‌ها می‌شود (Fazelian and Asrar, 2011). اهمیت عملکردی انباشت پرولین ناشی از فلزات سنگین در چنین شرایطی احتمالاً در سهم آن در حفظ تعادل آب نهفته است، زیرا فلزات سنگین این تعادل را مختل می‌کنند (Costa and Morel, 1994; Schatet al, 1997).

اثر متقابل تیمارهای اسید سالیسیلیک و باکتری بر مقادیر کلروفیل *b* و کلروفیل کل

نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل سطوح اسیدسالیسیلیک (صفر و ۰/۵ میلی مولار) و باکتری (تلقیح، عدم تلقیح) نشان داد که محلول پاشی ۰/۵ میلی مولار اسید سالیسیلیک +تلقیح باکتری موجب افزایش معنی دار کلروفیل *b* (۴۷/۴۰٪) و کلروفیل کل (۳۸/۰۸٪) نسبت به شاهد در گیاه کینوا گردید (جدول ۴). با توجه به جدول ۵ کاملاً مشخص است که کاربرد همزمان سودوموناس پوتیدا و اسید سالیسیلیک بر مقدار کلروفیل گیاه به طور قابل توجهی مفید بوده است. در تحقیقی بر روی گیاه کانولا نتیجه گرفته شد که استفاده از باکتری سودوموناس پوتیدا و سالیسیلیک اسید باعث افزایش مقادیر کلروفیل *b* و کل در گیاه کانولا می‌گردد که با نتایج حاصل از این تحقیق همخوانی دارد (Khoshfarman-Borji et al, 2020). همچنین در تحقیقی با بررسی اسید سالیسیلیک و باکتری‌های محرک رشد گزارش شده است که کاربرد همزمان باکتری‌های محرک رشد و اسید سالیسیلیک به طور قابل توجهی باعث افزایش ترکیبات فنلی برگ و محتوای کلروفیل در گیاه آفتابگردان شده است (Khan et al, 2018). چندین مطالعه نشان داده اند که باکتری‌های محرک رشد و اسید سالیسیلیک در گیاه کلزا به دلیل نقش آن در مدیریت یکپارچه مواد مغذی و تکثیر ریشه و تولید آگروپلی ساکارید، مزایای متعددی بر رشد و عملکرد گیاه دارد (Khan et al., 2018; Naseem et al., 2018).

جدول ۴. اثر متقابل تیمار اسید سالیسیلیک و باکتری بر مقادیر

کلروفیل *b* و کلروفیل کل

سطوح اسید سالیسیلیک (mM)	سطوح باکتری	کلروفیل <i>b</i>	کلروفیل کل
صفر	عدم تلقیح	۲/۸۹ ^b	۱۰/۴۵ ^d
	تلقیح	۳/۱۷ ^b	۱۱/۴۷ ^c
۰/۵	عدم تلقیح	۳/۰۳ ^b	۱۲/۰۷ ^b
	تلقیح	۴/۲۶ ^a	۱۴/۴۳ ^a

در هر ستون میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک بایکدیگر تفاوت معنی دار ندارند (P<0.05)

جدول ۵. اثر متقابل تیمارهای آرسنیک، اسید سالیسیلیک و باکتری بر مقادیر کلروفیل a، کاروتنوئید، پرولین و فعالیت آنتی اکسیدانی

فعالیت آنتی اکسیدانی	پرولین	کاروتنوئید	کلروفیل a	باکتری سودوموناس پوتیدا	سطوح اسیدسالیسیلیک (mM)	سطوح آرسنیک (mg/kg)
	($\mu\text{g/g fw}$)					
۳۰/۴۵ ^g	۶/۷۳ ^d	۲/۸۲ ^c	۸/۶۰ ^d	عدم تلقیح	صفر	
۳۰/۷۳ ^g	۵/۵۴ ^f	۳/۱۰ ^b	۹/۴۹ ^c	تلقیح		صفر
۳۳/۱۰ ^f	۷/۱۶ ^c	۳/۰۹ ^b	۹/۸۷ ^b	عدم تلقیح	۰/۵	
۳۴/۸۰ ^e	۶/۴۸ ^e	۳/۵۳ ^a	۱۰/۷۶ ^a	تلقیح		
۴۲/۰۳ ^c	۸/۱۲ ^a	۲/۲۶ ^d	۶/۵۰ ^g	عدم تلقیح	صفر	
۴۰/۸۶ ^d	۷/۲۵ ^c	۳/۱۳ ^b	۷/۱۱ ^f	تلقیح		۴۰
۴۲/۷۶ ^b	۷/۷۵ ^b	۳/۰۸ ^b	۸/۱۹ ^e	عدم تلقیح	۰/۵	
۴۵/۰۳ ^a	۸/۲۳ ^a	۳/۱۴ ^b	۹/۵۷ ^{bc}	تلقیح		

در هرستون میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک بایکدیگر تفاوت معنی‌دار ندارند ($P < 0.05$)

آنتی اکسیدان‌ها، مواد مغذی فلزی، اسمولیت ها، متابولیت‌های ثانویه و ترکیبات کلات کننده فلز، تحمل گیاهان در برابر تنش‌های شوری و فلزات سنگین افزایش می‌یابند. در این تحقیق نیز اسید سالیسیلیک در شرایط شوری طبیعی خاک ($8/16 \text{ dS/m}$) باعث افزایش کلروفیل a به میزان 14% ، افزایش کاروتنوئید به میزان $9/6\%$ ، افزایش پرولین به میزان $6/4\%$ ، و افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی به میزان $8/7\%$ شد. در حالی که در شرایط شوری طبیعی خاک ($8/16 \text{ dS/m}$) آلودگی 40 میلی گرم برکیلوگرم آرسنیک در خاک باعث افزایش پرولین گیاه به میزان $20/65\%$ ، افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی به میزان $38/02\%$ شده است. تلقیح باکتری سودوموناس پوتیدا به خاک شور آلوده به آرسنیک باعث افزایش پرولین گیاه به میزان $22/29\%$ ، افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی به میزان $47/88\%$ شده است که بهبود زیادی در محتوای کلروفیل، کاروتنوئید، فتوسنتز گیاه کینوا گردیده است.

سپاسگزاری

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند مراتب تشکر صمیمانه خود را از دانشگاه فردوسی مشهد که هزینه‌های این طرح را متقبل شدند و ما را در امکان انجام کار و ارتقای کمی و کیفی این پژوهش یاری نمودند، اعلام می‌کند.

بنابراین کاهش کمبود آب با واسطه پرولین ممکن است به طور قابل ملاحظه‌ای به سازگاری سلول‌های گیاهی با شرایط سمیت فلز کمک کند. نتایج مربوط به پرولین در جدول ۵ نیز نشان می‌دهد که تنش آرسنیک موجب افزایش تجمع آن در گیاه کینوا گردیده است. گزارشات متعددی نشان از تجمع پرولین در گیاهان سویا و ذرت برای مقابله با آرسنیک (Chandrakar et al, 2017؛ Selim et al, 2021)، گیاه گوجه فرنگی برای مقابله با مس، کادمیم و سرب (kisa, 2019) گزارش شده است.

نتیجه گیری

گیاهان تحت تنش‌های شوری و فلزات سمی مقدار زیادی گونه‌های فعال اکسیژن تولید می‌کنند که در نهایت منجر به تنش اکسیداتیو می‌شود. تنش اکسیداتیو موجب پراکسیداسیون لیپیدی، اکسیداسیون پروتئین و اسیدهای نوکلئیک در سطح سلولی می‌شود. سازگاری گیاهان با سمیت فلزات سنگین به مکانیسم‌های جذب، تجمع، تخریب، جداسازی و تحمل بستگی دارد. کاربرد باکتری‌های محرک رشد یکی از این مکانیسم‌های تحمل است. اسید سالیسیلیک نقش مهمی در تعدیل پاسخ‌های تنش‌های شوری و فلزات سنگین ایفا می‌کند. با تنظیم سطوح متابولیت‌های مختلف آنزیم‌های آنتی اکسیدانی،

Reference:

- Adir, N., Zer, H., Shochat, S., & Ohad, I. (2003). Photoinhibition—a historical perspective. *Photosynthesis research*, 76(1), 343-370.
- Ahmad, I., Akhtar, M. J., Asghar, H. N., Ghafoor, U., & Shahid, M. (2016). Differential effects of plant growth-promoting rhizobacteria on maize growth and cadmium uptake. *Journal of plant growth regulation*, 35(2), 303-315.
- Aksakal O, Esim N, (2015). Evaluation of arsenic trioxide genotoxicity in wheat seedlings using oxidative system and RAPD assays. *Environ. Sci Pollut Res* 22:7120–7128
- Alsaleh, A. E., Astaraei, A.R., Emami, H., & Lakzian, A. (2021). Impact of *Pseudomonas putida* Inoculation on Alleviating Mercury Stress in Turnip Planted on a Saline Soil. *Malaysian Journal of Soil Science*, 25, 67-85.
- Awasthi, S., Chauhan, R., Dwivedi, S., Srivastava, S., Srivastava, S., & Tripathi, R. D. (2018). A consortium of alga (*Chlorella vulgaris*) and bacterium (*Pseudomonas putida*) for amelioration of arsenic toxicity in rice: A promising and feasible approach. *Environmental and Experimental Botany*, 150, 115-126.
- Azodein, A.A.M., R.M. Yunus, N.M. Sulaiman, A.B. Bustary and K. Sabar. (2015). Mercury removal using *Pseudomonas putida* (attc 49128): effect of acclimatization time, speed and temperature of incubator. *World Academy of Science, Engineering and Technology. International Journal of Biotechnology and Bioengineering* 9(2): 204-209.
- Erdal, S., Aydın, M., Genisel, M., Taspınar, M. S., Dumlupınar, R., Kaya, O., & Gorcek, Z. (2011). Effects of salicylic acid on wheat salt sensitivity. *African Journal of Biotechnology*, 10(30), 5713-5718.
- Bates, L.S., Waldren, R.P., Teare, I.D., (1973). "Rapid determination of free Pro for water stress studies". *Plant Soil*, 39: 205–217.
- Bazile, D., Bertero, H. D., & Nieto, C. (2015). State of the art report on quinoa around the world in 2013.
- Behera, P. K. (2006). *Soil and Solid Waste Analysis*. New Delhi: Dominant Publishers and Distributors.
- Belkadi, A., De Haro, A., Obregon, S., Chaïbi, W., & Djebali, W. (2015). Positive effects of salicylic acid pretreatment on the composition of flax plastidial membrane lipids under cadmium stress. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(2), 1457-1467.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. and Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT- Food Science and Technology*. 28(1): 25-30.
- Chandrakar V, Naithani SC, Keshavkant S, (2016). Arsenic-induced metabolic disturbances and their mitigation mechanisms in crop plants: a review. *Biologia* 71:367–377
- Chandrakar V, Yadu B, Meena RK, Dubey A, Keshavkant S, (2017), Arsenic-induced genotoxic responses and their amelioration by diphenylene iodonium, 24-epibrassinolide and proline in *Glycine max L*. *Plant Physiol Biochem* 112:74–86.
- Chapman, H.D. 1965. Total exchangeable bases. *Methods of soil analysis*. Part 2. Chemical and microbiological properties.
- Costa, G., & Morel, J. L. (1994). Efficiency of h⁺-atpase activity on cadmium uptake by four cultivars of lettuce. *Journal of plant nutrition*, 17(4), 627-637.
- Demir, E., Dinler, B. S., & Ozdener, Y. (2013). Biochemical effects of arsenic stress in the leaves of halophyte *Cakile maritima* (scop.) plants under salinity. *Fresenius Environ Bull*, 22, 3465-3473.
- Dhindsa, R. S., Plumb-Dhindsa, P. A. M. E. L. A., & Thorpe, T. A. (1981). Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *Journal of Experimental botany*, 32(1), 93-101.
- Fazelian N, Asrar Z, (2011). Arsenic and salicylic acid interaction on the growth and some other physiological parameters in *Matricaria recutita*. *J Plant Biol* 8:1–11.
- G., Amjad, M., Saqib, M., Murtaza, B., Naeem, M.A., Shabbir, A., Murtaza, G., (2021). Soil sodicity is more detrimental than salinity for quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.): a multivariate comparison of physiological, biochemical and nutritional quality attributes. *J. Agron. Crop Sci.* 207, 59–73.
- González, J. A., Hinojosa, L., Mercado, M. I., Fernández-Turiel, J. L., Bazile, D., Ponessa, G. I., ... & Ebrahim, M. E. (2021). A long journey of CICA-17 quinoa variety to salinity conditions in Egypt: Mineral concentration in the seeds. *Plants*, 10(2), 407.
- Gunes A, Pilbeam DJ, Inal A, (2009). Effect of arsenic-phosphorous interaction on arsenic-induced oxidative stress in chickpea plants. *Plant Soil* 314:211–220.
- Guo, J., Zhou, R., Ren, X., Jia, H., Hua, L., Xu, H., & Wei, T. (2018). Effects of salicylic acid, Epi-brassinolide and calcium on stress alleviation and Cd accumulation in tomato plants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 157, 491-496.
- Jacobsen, S. E., Mujica, A., & Jensen, C. R. (2003). The resistance of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) to adverse abiotic factors. *Food reviews international*, 19(1-2), 99-109.
- Khadem Moghadam Igdellou, N., & Golchin, A. (2019). Risk Assessment of Contamination of the Country's Soil and Water Resources with Arsenic. *Iranian Journal of Soil and Water Research*, 50(7), 1595-1617.
- Khan N, Zandi P, Ali S, Mehmood A, Shahid MA and Yang J (2018) Impact of salicylic acid and PGPR on the drought tolerance and phytoremediation potential of *Helianthus annuus*. *Frontiers in microbiology* 9, 1–15.

- Khoshfarman-Borji, H., Yali, M. P., & Bozorg-Amirkalae, M. (2020). Induction of resistance against *Brevicoryne brassicae* by *Pseudomonas putida* and salicylic acid in canola. *Bulletin of Entomological Research*, 110(5), 597-610.
- Kisa, D. (2019). Responses of phytochelatin and proline-related genes expression associated with heavy metal stress in *Solanum lycopersicum*. *Acta Bot. Croat.* 78, 9–16.
- Lichtenthaler, H. K. (1987) Chlorophylls and carotenoids; Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology* 48:350-382.
- Ma Y, Prasad MNV, Rajkumar M, Freitas H, (2011) Plant growth promoting rhizobacteria and endophytes accelerate phytoremediation of metalliferous soils. *Biotechnol Adv* 29(2):248–258
- Mishra S, Srivastava S, Dwivedi S, Tripathi RD, (2013) Investigation of biochemical responses of *Bacopa monnieri* L. upon exposure to arsenate. *Environ Toxicol* 28:419–430
- Mishra, J., Singh, R., & Arora, N. K. (2017). Alleviation of heavy metal stress in plants and remediation of soil by rhizosphere microorganisms. *Frontiers in microbiology*, 8, 1706.nontolerant ecotype of *Silene vulgaris*. *Physiol Plant* 1997; 101:477–82.
- Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* 7: 405-410.
- Moameni, A. (2010). Geographical Distribution and Salinity Levels of Soil Resources of Iran. 24(3), 203-215. [in Persian]
- Naseem H, Ahsan M, Shahid MA and Khan N (2018) Exopolysaccharides producing rhizobacteria and their role in plant growth and drought tolerance. *Journal of Basic Microbiology* 58, 1009–1022.
- Olsen, S.R., Sommers, L.E., and Page, A.L. 1982. *Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties of Phosphorus.* ASA Monograph, (9); 403-430.
- Page, A.L., Miller, R.H., and Keeney, D.R. 1982. *Method of soil analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties.* American Society of Agronomy. In Soil Science Society of America, Vol. 1159.
- Parida A, Das AB, Mitra B (2004) Effects of salt on growth, ion accumulation, photosynthesis and leaf anatomy of the mangrove, *Bruguiera parviflora*. *Trees Struct Funct* 18: 167-174.
- Parvez, S., Abbas, G., Shahid, M., Amjad, M., Hussain, M., Asad, S.A., Imran, M., Naeem, M.A., (2020). Effect of salinity on physiological, biochemical and photostabilizing attributes of two genotypes of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) exposed to arsenic stress. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*
- Patten, C. L., & Glick, B. R. (2002). Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Applied and environmental microbiology*, 68(8), 3795-3801.
- Qadir, M., Quillerou, E., Nangia, V., Murtaza, G., Singh, M., Thomas, R.J., et al., (2014). Economics of salt-induced land degradation and restoration. *Nat. Resour. Forum* 38, 282295.
- Richards, L.A. 1954. Diagnosis and improvement of saline and alkali soils. In: L.A. Richards (ed.). *U. S. Salinity Laboratory Staff, USDA Hand book NO. 60.* Washangton, DC, USA, 160 P.
- Safari, F., Akramian, M., Salehi-Arjmand, H., & Khadivi, A. (2019). Physiological and molecular mechanisms underlying salicylic acid-mitigated mercury toxicity in lemon balm (*Melissa officinalis* L.). *Ecotoxicology and environmental safety*, 183, 109542.
- Schat, H., Sharma, S. S., & Vooijs, R. (1997). Heavy metal- induced accumulation of free proline in a metal-tolerant and a nontolerant ecotype of *Silene vulgaris*. *Physiologia plantarum*, 101(3), 477-482.
- Selim, S., Abuelsoud, W., Al-Sanea, M. M., & AbdElgawad, H. (2021). Elevated CO₂ differently suppresses the arsenic oxide nanoparticles-induced stress in C3 (*Hordeum vulgare*) and C4 (*Zea mays*) plants via altered homeostasis in metabolites specifically proline and anthocyanin metabolism. *Plant Physiology and Biochemistry*, 166, 235-245.
- Shabbir, A., Abbas, G., Asad, S.A., Razzaq, H., Haq, M.A., Amjad, M., (2020). Effects of arsenite on physiological, biochemical and grain yield attributes of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.): implications for phytoremediation and health risk assessment. *Int. J. Phytoremediation*.
- Shabbir, A., Saqib, M., Murtaza, G., Abbas, G., Imran, M., Rizwan, M., & Javeed, H. M. R. (2021). Biochar mitigates arsenic-induced human health risks and phytotoxicity in quinoa under saline conditions by modulating ionic and oxidative stress responses. *Environmental Pollution*, 287, 117348.
- Shukla, P. R., Skeg, J., Buendia, E. C., Masson-Delmotte, V., Pörtner, H. O., Roberts, D. C., ... & Malley, J. (2019). *Climate Change and Land: an IPCC special report on climate change, desertification, land degradation, sustainable land management, food security, and greenhouse gas fluxes in terrestrial ecosystems.*
- Srivastava, S., Srivastava, A.K., Singh, B., Suprasanna, P., D'souza, S.F., (2013). The effect of arsenic on pigment composition and photosynthesis in *Hydrilla verticillata*. *Biol. Plant* 1–6.
- Talukdar T, Talukdar D, (2013), Response of antioxidative enzymes to arsenic induced phytotoxicity in leaves of amedicinal daisy, *Wedelia chinensis* Merrill. *J Nat Sci Biol Med* 4:383–388
- Tamás, L., Mistrik, I., Alemayehu, A., Zelinová, V., Bočová, B., & Huttová, J. (2015). Salicylic acid alleviates cadmium-induced stress responses through the inhibition of Cd-induced auxin-mediated reactive oxygen species production in barley root tips. *Journal of Plant Physiology*, 173, 1-8.

- Tian J, Peng XW, Li X, Sun YJ, Feng HM, Jiang ZP, (2014), Isolation and characterization of twobacteria with heavy metal resistance and phosphate solubilizing capability. *Huan Jing Ke Xue* 35:2334–2340.
- Ullrich-Eberius CI, Sanz A, Novacky AJ, (1989), Evaluation of arsenate- and vanadate-associated changes of electrical membrane potential and phosphate transport in *Lemna gibba*. *Journal of Experimental Botany* 40: 119-128.
- Walkley, A. and Black, I.A. 1934. An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Science*, 37(1): 29-38.
- Wang YP, Shi YJ, Wang H, Lin Q, Chen XC, Chen YX (2007) The influence of soil heavy metals pollution on soil microbial biomass, enzyme activity, and community composition near a copper smelter. *Ecotoxicol Environ Saf* 67:75–81.
- Wang, Y. Y., Wang, Y., Li, G. Z., & Hao, L. (2019). Salicylic acid-altering *Arabidopsis* plant response to cadmium exposure: Underlying mechanisms affecting antioxidation and photosynthesis-related processes. *Ecotoxicology and environmental safety*, 169, 645-653.
- Weil, R.R., Brady, N.C., (2016). *The Nature and Properties of Soils*, fifteenth ed. Pearson, Columbus, OH (Chapter 10).
- Yin, Q. S., Yuan, X., Jiang, Y. G., Huang, L. L., Li, G. Z., & Hao, L. (2018). Salicylic acid-mediated alleviation in NO₂ phytotoxicity correlated to increased expression levels of the genes related to photosynthesis and carbon metabolism in *Arabidopsis*. *Environmental and Experimental Botany*, 156, 141-150.



Print ISSN: 2251-7480
Online ISSN: 2251-7400

Journal of
**Water and Soil
Resources Conservation
(WSRCJ)**

Web site:

<https://wsrcj.srbiau.ac.ir>

Email:

iauwsrcj@srbiau.ac.ir
iauwsrcj@gmail.com

**Vol. 12
No. 2 (46)
Winter 2023**

Received:
2022-07-11

Accepted:
2022-10-17

Pages: 65-78



The Effect of Salicylic Acid and Pseudomonas Putida Bacteria on Enzyme Properties of Quinoa Plant in Saline Soil Contaminated With Arsenic

Mahmoud Nabizadeh¹, Ali Reza Astarai^{*2} and Amir Lakzian³

1) MSc. Students of Soil Science Department, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.

2) Associate Professor of Soil Science, Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.

3) Professor of Soil Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.

*Corresponding author email: astaraei@um.ac.ir

Abstract

Introduction: Due to the fact that some of the country's regions, such as Khorasan Razavi, Isfahan, Kerman, etc., are contaminated with arsenic (As), and on the other hand, most of Iran's soils are associated with different degrees of salinity and few agricultural management operations like plant selection or applying organic acids such as salicylic acid (SA) have been used, therefore, this research is conducted with the following objectives: 1) Investigate the effect of Pseudomonas putida (P. Putida) bacteria inoculation in soil salinity stress conditions, 2) Investigate the effect of arsenic pollution in soil salinity stress conditions, 3) Investigate the effect of salicylic acid foliar application on cultivated quinoa plant in saline soil and 4) Dual and tripartite effects of experimental treatments on some quantitative and qualitative characteristics of the quinoa plant (*Titicaca* cultivar).

Methods: A completely randomized design (factorial), including the first factor 1) control soil (no inoculation of Pseudomonas putida bacteria, 2) inoculation of Pseudomonas putida bacteria, the second factor: two levels of arsenic (0 and 40 mg/kg) and the third factor: foliar spraying of two levels of salicylic acid (0 and 0.5 mM) in total of 24 pots with a volume of 5000 cubic centimeters were prepared to apply the desired treatments in three replications. To provide saline soil without arsenic, samples are taken from the depth of 0 to 30 cm from Areh village located 45 km of Mashhad-Sarkhos Road. After air-drying and pounding, the samples are sieved with a two-millimeter sieve, and then part of it is moved to the soil science laboratory for preliminary analysis. After preparing the soil, 4 kg of soil is transferred to each pot. Then arsenic salt ($\text{Na}_2\text{AsH}_4\text{O}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) is added to the pots with the amount of 40 mg/kg of soil. After quinoa plant cultivation, *Titicaca* variety, when the plants reached the two-leaf stage, the liquid culture medium containing Pseudomonas bacteria is added in three stages (with 5 days intervals). In the following, the plants are sprayed with salicylic acid solution at the 4-leaf stage in 5 stages (with 6 days intervals). Subsequently, the parameters of photosynthetic pigments' (Lichtenthaler, 1987) antioxidant activity, (Brand-Williams et al, 1995), proline (Bates et al, 1973) and catalase (Dhindsa et al, 1981) of plants' new leaves are carried out in the soil science laboratory of Ferdowsi University.

Results: The results of the analysis of variance of the triple interaction effects of arsenic \times salicylic acid \times bacteria illustrate that the triple interaction effect on carotenoid is significant at the level of 1% ($p < 0.01$), and the values of chlorophyll a, proline and antioxidant activity are significant at the level of 5% ($p < 0.05$). The results of comparing the average of the triple interaction effects of arsenic levels, salicylic acid and bacteria show that at the zero level of arsenic + spraying solution 0.5 mM salicylic acid + the presence of bacteria can have a positive and significant role on the amount of chlorophyll a (10.76 micrograms per gram of fresh weight) equivalent to +25.11% and carotenoid (3.53 $\mu\text{g/g}$ fresh weight) equal to +25.17 % compared to the control samples (soil with salinity stress). Also, the presence of arsenic (40 mg/kg) + 0.5 mM salicylic acid solution spraying + the presence of bacteria caused a significant increase in proline (8.23 $\mu\text{g/g}$ fresh weight) equivalent to +22.29% compared to the control samples, which demonstrates the positive effects of spraying salicylic acid and bacteria in the conditions of salinity stress with arsenic contamination in the soil. Arsenic (40 mg/kg) + 0.5 mM salicylic acid solution + the presence of bacteria shows a significant rise in the antioxidant activity of quinoa plant (45.03 $\mu\text{g/g}$ fresh weight) equivalent to +47.88% compared to the control sample.

Conclusion: The application of Pseudomonas putida bacteria and salicylic acid can enhance the tolerance of plants against salinity stress and heavy metals by regulating the levels of different metabolites of antioxidant enzymes, secondary metabolites, and metal-chelating compounds. In this research, salicylic acid under natural soil salinity conditions (8.16 dS/m) increases chlorophyll a, carotenoid, proline, and antioxidant activity to +14%, +9.6%, +6.4% and +8.7%, respectively. On the other hand, under natural soil salinity conditions (8.16 dS/m) with 40 mg/kg of arsenic contamination in the soil, it has significantly increased plant proline equivalent to 20.65%, which led to a significant rise in antioxidant activity equivalent to +38.02%. The inoculation of Pseudomonas putida bacteria in saline soil contaminated with arsenic significantly boost proline of the plant equal to +22.29% and antioxidant activity equal to +47.88%, which greatly improved the content of chlorophyll, carotenoid and photosynthesis of quinoa plant.

Keywords: Arsenic, Salicylic acid, Pseudomonas putida bacteria, Quinoa