نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی
جلد بیست و هشتم، شماره اول، ۱۴۰۰
۱۲۷-۱۳۹
http://jopp.gau.ac.ir
DOI: 10.22069/jopp.2021.17481.2614

اثر آرسنیک و کود زیستی فسفاته بر ویژگی‌های فیزیولوژیکی و زیست–شیمیایی توده بومی نعنا سبز (*Mentha spicata* L.)

جمال حکمتی[۱]، *یوسف حمیداوغلی[۲]، بهروز اسماعیل‌پور[۳] و محمود قاسم‌نژاد[۴]

[۱]دانشجوی دکتری گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران،
[۲]دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران،
[۳]دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران،
[۴]استاد گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۰/۲۲؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۱/۱۰

چکیده

سابقه و هدف: نعنا سبز به عنوان یک سبزی و گیاه دارویی به صورت مستقیم و غیر مستقیم در سبد غذایی افراد جامعه قرار دارد. کشت این گیاه در زمین‌های آلوده به فلزات سنگین و یا در مزارع سبزی با آب‌های نامتعارف، فاضلاب‌ها و پساب کارخانه‌ها و واحدهای صنعتی، نه تنها موجب افزایش تجمع عناصر سنگین و به‌ویژه آرسنیک در گیاه می‌شود بلکه روی خصوصیات رشدی گیاهان و سلامتی افراد مصرف‌کننده تأثیر دارد. بر این اساس پژوهش حاضر برای ارزیابی تأثیر کود زیستی فسفاته در کاهش سمّیت فلز سنگین آرسنیک بر ویژگی‌های فیزیولوژیکی و زیست–شیمیایی در گیاه نعنا سبز انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش، تأثیر کود زیستی فسفاته در افزایش تحمل به تنش آرسنیک در نعنا سبز، به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در شش تکرار در گلخانه گروه علوم باغبانی دانشگاه گیلان ارزیابی شد. فاکتورها شامل سطوح مختلف آرسنیک (صفر، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک) و کود زیستی فسفاته (صفر و نیم میلی‌گرم از کود زیستی فسفاته) بود. داده‌برداری از گیاهان حدود دو ماه بعد از کاشت صورت گرفت و خصوصیات ریخت‌شناسی گیاه (تعداد برگ، تعداد ساقه، ارتفاع بوته، وزن‌تر و خشک اندام هوایی و ریشه، وزن خشک ساقه و سطح برگ اندازه‌گیری شد. ویژگی‌های زیست-شیمیایی از جمله محتوای کلروفیل و کاروتنوئیدهای برگ، کربوهیدرات، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت و پرولین اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که با افزایش غلظت آرسنیک از صفر تا ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم، مقدار وزن خشک ریشه، وزن تر گیاه، تعداد برگ، میزان کاروتنوئید به‌ترتیب به ۲/۶۵ (گرم)، ۲/۸ (گرم)، ۴/۸۸ (عدد)، ۲/۰۵ (میلی‌گرم بر گرم وزن‌تر) واحد کاهش یافت. کاربرد کود زیستی فسفاته نیز باعث افزایش محتوای رطوبت نسبی، وزن تر گیاه، میزان کاروتنوئید برگ شد. مقایسه میانگین اثر متقابل کود زیستی فسفاته × آرسنیک نشان داد که کم‌ترین ارتفاع گیاه، وزن خشک گیاه و سطح برگ مربوط به سطح ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم آرسنیک و بدون کاربرد کود زیستی به‌ترتیب ۱۱/۲۸ (سانتی‌متر)، ۸/۲۸ (گرم)، ۱۲/۰۵۲ (سانتی‌مترمربع) بود.

* مسئول مکاتبه: hamidoghli@guilan.ac.ir

نتیجه‌گیری: کاربرد کود زیستی فسفاته در مقایسه با شاهد، در سطوح مختلف آرسنیک، میزان پرولین، پلی‌فنل اکسیداز، پراکسیداز، کربوهیدرات، کلروفیل کل، کلروفیل a و b را افزایش و مقدار آرسنیک ریشه و شاخه را کاهش داد. نتایج نشان داد که کود زیستی فسفاته توانسته است تا حدودی باعث بهبود رشد و افزایش مقاومت گیاهان نعنا سبز نسبت به تنش آرسنیک گردد.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، پرولین، فلزات سنگین، کلروفیل

مقدمه

امروزه یکی از مسائل زیست‌محیطی، آلوده‌شدن منابع آب، خاک و گیاهان با فلزات سنگینی نظیر آرسنیک می‌باشد (۵). فلزات سنگین به فلزها و شبه‌فلزهایی با چگالی بالای ۵ گرم بر سانتی‌مترمکعب و عدد اتمی بالای ۲۰ گفته می‌شود (۱٤). آرسنیک به‌دلیل ماندگاری بالایی که در خاک دارد یکی از خطرناک‌ترین نوع فلزات سنگین می‌باشد. این شبه فلز از عناصر غیر ضروری و غیر محلول در آب می‌باشد (۳).

آرسنیک جذب فسفر توسط گیاه را کاهش می‌دهد و با اثر متقابل با گروه‌های سولفیدریل، باعث اختلال در ایجاد انرژی سلول می‌گردد (۳). هم‌چنین با کاهش برخی از آنزیم‌های حیاتی، مانند گلوتامین سینتتاز، گلوتامات سینتتاز و نیترات ردوکتاز، باعث تولید گونه‌های فعال اکسیژن[1] یا رادیکال‌های آزاد (سوپراکسید، هیدروکسیل، پراکسید هیدروژن و اکسیژن منفرد) می‌شود. افزایش بیش از اندازه رادیکال‌های آزاد سبب تخریب اسیدهای آمینه، پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک و لیپیدهای غشای سلولی و در نتیجه تغییر فعالیت غشای سلولی و توقف رشد گیاه می‌شوند (۲۳).

حد مجاز آرسنیک در خاک ۱٤ میلی‌گرم در کیلوگرم، حد مجاز آن در گیاه ۰/۱ تا ۰/۵ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن خشک و حد سمی آن در گیاه ۲ میلی‌گرم در کیلوگرم است (۲۹). فعالیت‌های انسانی و صنعتی، استفاده از کود شیمیایی و سموم دفع آفات منجر به افزایش روز افزون آرسنیک در خاک و انباشت آن‌ها در گیاهان شده و در نتیجه رشد آن‌ها را تحت‌تأثیر قرار می‌دهد. علاوه بر این ارسنیک به‌صورت غیرمستقیم سلامت انسان را نیز تهدید می‌کند (۲۲). فلزات سنگین سمی به DNA آسیب می‌رسانند و به احتمال زیاد اثرات سرطان‌زایی آن‌ها در حیوانات و انسان‌ها از قابلیت جهش‌زایی این فلزات سرچشمه می‌گیرند. آرسنیک باعث ایجاد سرطان پوست، مثانه، ریه و کبد در انسان می‌گردد (۲۳).

تشکری‌زاده و همکاران (۲۰۱٦) نکروزه شدن برگ‌های مسن و کلروزه شدن برگ‌های جوان در ریحان را از جمله علائم سمیت آرسنیک گزارش کرده‌اند (۲۱).

در سال‌های اخیر توجه به روش‌های زیستی برای مقابله با تنش فلزات سنگین شامل استفاده از موجودات ذره‌بینی (باکتری‌های محرک رشد مانند حل‌کننده‌های فسفات و پتاسیم و باکتری‌های آزادزی تثبیت‌کننده نیتروژن، ریزوبیوم‌ها، قارچ مایکوریز) به‌دلیل تأثیر در رشد و عملکرد گیاهان، اهمیت زیادی پیدا کرده است (۹). هم‌چنین کودهای زیستی نیز با سازوکارهایی مانند: ۱- هدایت یون‌های فلزی به خارج از سلول، ۲- ذخیره یون‌های فلزی در داخل سلول، ۳- تبدیل فلزات سّمی به فرم‌های با سمیت کم‌تر (کلاته کردن)، ٤- جذب یا واجذب فلزات باعث کاهش اثرات سمیت فلزات سنگین می‌شوند

1- Reactive Oxygen Species

(۲٤). نعمتی و گلچین (۲۰۱۵) گزارش دادند، که کاربرد کودهای زیستی، رشد و عملکرد گیاه گوجه‌فرنگی را در شرایط تنش کادمیم افزایش می‌دهد (۲٦).

کود زیستی فسفاته بارور ۲، حاوی دو نوع باکتری حل‌کننده فسفات از گونه‌های *Bacillus lentus* و *Pseudomonas putida* است که با تولید اسیدهای آلی و اسید فسفاتاز، فسفر نامحلول خاک را به فرم محلول تبدیل می‌کند. این کود باعث افزایش دوام برگ (استفاده بهینه از انرژی خورشیدی و فتوسنتز) و توسعه سیستم ریشه‌ای (بهبود جذب آب) در شرایط تنش می‌شود (۱۹).

نعنا (*Mentha spicata* L.) متعلق به تیره نعنایان (*Lamiaceae*) گیاهی علفی، چند ساله، معطر می‌باشد که به‌علت وجود آنتوسیانین به رنگ بنفش دیده می‌شود و مثل سایر گیاهان خانواده نعنایان حاوی اسانس می‌باشد. این گیاه به‌دلیل استفاده دارویی و هم‌چنین سبزی خوراکی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. از مواد مؤثره نعنا، در صنایع داروسازی، صنایع غذایی، بهداشتی- آرایشی، شیرینی‌پزی، نوشابه‌سازی و صنایع ادویه‌ای استفاده می‌شود (۲۷). در مزارع سبزی با آب‌های نامتعارف، فاضلاب‌ها و پساب کارخانه‌ها و واحدهای صنعتی، خطر تجمع عناصر سنگین در پژوهش حاضر تأثیر کود زیستی فسفاته در کاهش سمّیت فلز سنگین آرسنیک در خصوصیات رشدی و زیست-شیمیایی گیاه نعنا سبز مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

به‌منظور بررسی تأثیر سطوح مختلف کود زیستی فسفاته بر شاخص‌های فیزیولوژیکی و زیست-شیمیایی گیاه نعنا سبز تحت تنش آرسنیک، آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ٦ تکرار در گلخانه گروه علوم باغبانی دانشگاه گیلان در سال ۱۳۹۵ اجرا گردید. فاکتورهای آزمایش شامل کود زیستی فسفاته در دو سطح (صفر و نیم میلی‌گرم) از شرکت زیست‌فناور سبز و خاک (لومی-شنی) آلوده به آرسنیک با سه سطح (صفر، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک تهیه شده از شرکت معدن طلای زره شوران واقع دراستان آذربایجان غربی، شهرستان تکاب) بود. در این آزمایش، ساقه‌های زیرزمینی توده بومی نعنا سبز تهیه شده از شهرستان بوکان در گلدان‌های حاوی خاک (لوم-شنی) آلوده به آرسنیک (آلودگی طبیعی) کشت شدند. کود زیستی فسفاته همراه آب آبیاری به پای گلدان‌ها داده شد.

برای انجام این پژوهش نمونه خاک‌ها پس از انتقال به آزمایشگاه جهت همگن‌سازی ذرات از الک ۲ میلی‌متر عبور داده شده و برخی از ویژگی‌های فیزیکی-شیمیایی نظیر بافت‌خاک با روش هیدرومتری، میزان ماده آلی با روش اکسیداسیون مرطوب، واکنش خاک (pH) در گل اشباع و قابلیت رسانایی الکتریکی (EC) در عصاره گل اشباع، نیتروژن خاک با روش کجلدال، فسفر به روش اولسن (مقدار ۲/۵ گرم خاک هوا خشک عبور داده شده از الک ۲ میلی‌متری را وزن کرده و در ارلن مایر ۲۵۰ ریخته شد؛ سپس مقدار ۵۰ میلی‌لیتر محلول بی‌کربنات سدیم ۱/۵ نرمال و یک قاشق زغال فعال را به آن اضافه و نیم ساعت شیک شده؛ سپس محتویات آن صاف شده و محتوای فسفر موجود در عصاره با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت گردید، پتاسیم با استفاده از دستگاه فلم‌فتومتر و هم‌چنین میزان کربنات کلسیم معادل به روش تیتراسیون برگشتی در نمونه‌های خاک اندازه‌گیری شدند و با توجه به نتایج به‌دست آمده از این آزمایش‌ها، خاک مطلوب انتخاب شد. هم‌چنین پس از اندازه‌گیری آرسنیک خاکی که از معدن طلای زره شوران شهرستان تکاب، واقع در

استان آذربایجان غربی تهیه شده بود؛ غلظت آرسنیک به‌وسیله دستگاه جذب اتمی اندازه گیری شد و با اضافه کردن آرسنیک به غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم رسید. در این پژوهش گلدان‌های (ارتفاع ۱۵، طول ٤٥ و عرض ۳۵ سانتی‌متر) حاوی خاک و ماسه بادی (به نسبت دو به یک) با ۳٦ عدد گیاه نعنا سبز در دمای گلخانه ٦±۲۵ با رطوبت نسبی ٦۵ درصد، مورد تیمار قرار گرفتند.

جدول ۱- خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک.

Table 1. The physical and chemical properties of soil.

بافت خاک Soil texture	درصد شن (%)	درصد سیلت Silt (%)	درصد رس Clay (%)	فسفر P (ppm)	پتاسیم K (ppm)	نیتروژن N (%)	ماده آلی Organic matter (%)	کربنات کلسیم (%)	اسیدیته pH	هدایت الکتریکی EC (dsm^{-1})
لومی Loam	50	36	14	3.8	263	0.12	0.45	19.1	7.3	1.38

اندازه‌گیری صفات: این آزمایش در گلخانه و آزمایشگاه‌های دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان در سال۱۳۹۵ اجرا گردید. داده‌برداری از گیاهان حدود دو ماه بعد از کاشت صورت گرفت و خصوصیات ریخت‌شناسی گیاه (تعداد برگ، تعداد ساقه، ارتفاع بوته، وزن‌تر و خشک اندام هوایی و ریشه، وزن خشک ساقه و سطح برگ با دستگاه سطح‌سنج مدل ADC اندازه‌گیری شد. ویژگی‌های زیست-شیمیایی از جمله محتوای کلروفیل و کاروتنوئیدهای برگ با استفاده از روش آرنون اندازه‌گیری گردید. برای این منظور ۰/۱ گرم از بافت‌تر برگ در ۱۰ میلی‌لیتر استون ۸۰٪ حل شد، محلول در ٤۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ده دقیقه سانتریفوژ گردید و پس از جمع‌آوری محلول رویی، جذب نوری در طول موج‌های ٤۷۰، ٦٤٦/۸، ٦٦۳/۲ نانومتر قرائت گردید (۲).

برای اندازه‌گیری محتوای نسبی آب (RWC) حدود نیم گرم از جوان‌ترین برگ توسعه‌یافته‌تر (fW) به‌مدت ۲٤ ساعت در آب دیونیزه در هوای آزاد قرار داده شد و توزین گردید (tW) سپس؛ به مدت ۲٤ ساعت در آون در دمای ۷۰ درجه قرار داه شد و پس از توزین با استفاده از رابطه ۱ تعیین شد (dW) (۲۸).

$$RWC=\left[\left(fW - dW\right) / \left(tW - dW\right)\right] \times 100 \quad (۱)$$

برای اندازه‌گیری میزان پرولین حدود ۰/۱ گرم از بافت برگی جوان در دو میلی‌لیتر اسید سولفوسالیسیلیک حل شد و در دمای چهار درجه سانتی‌گراد و سرعت ٤۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس در فالکون دیگری یک میلی‌لیتر معرف ناین‌هیدرین و یک میلی‌لیتر اسید استیک گلایسال خالص و یک میلی‌لیتر عصاره حاصل ریخته شد. لوله‌ها به مدت یک ساعت در بن‌ماری قرار گرفتند و پس اضافه کردن ۲ میلی‌لیتر تولوئن به هر کدام از لوله‌ها به‌مدت ۱۵ تا ۲۰ ثانیه ورتکس گردید. پس از تشکیل دو فاز جداگانه فاز رنگی بالایی جدا شده و مقدار جذب در طول‌موج ۵۲۵ نانومتر قرائت شد (٤)، جهت اندازه‌گیری کربوهیدرات‌های محلول، ۰/۱ گرم بافت برگی در یک میلی‌لیتر الکل ۹۵درصد حل گردید و به‌مدت ۳۰ ثانیه ورتکس شد. پس از جداسازی محلول رویی دوبار و در هر بار یک

میلی‌لیتر الکل ۷۰درصد به آن اضافه شد (همه موارد در حمام یخ و نور کم انجام شد). عصاره ۱۵ دقیقه با سرعت ۳۵۰۰ دور دقیقه سانتریفوژ گردید. بعد از جداسازی محلول رویی ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره برداشته شد و پس از اضافه کردن سه میلی‌لیتر آنترون به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب جوش قرار داده شد و سپس میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ٦٢٥ نانومتر قرائت شد (۱۳).

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و پلی‌فنل‌اکسیداز به روش‌های زیر صورت گرفت. برای استخراج عصاره پروتئینی برگ ۰/۰۵ از بافت برگی توزین گردید و با یک میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار pH=٦/٨ در یک هاون چینی و در حمام یخ هموژنیزه شد. هموژنات همراه با یک میلی‌لیتر از محلول حاصل از شستشوی هاون، داخل لوله سانتریفوژ ریخته شد و مدت ۲۰ دقیقه در۱۷٦۰۰ گرم در دمای چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. سوپرناتانت به عنوان عصاره پروتئینی برگ به‌منظور اندازه‌گیری مقدار پروتئین‌های محلول و بررسی فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، پلی‌فنل اکسیداز مورد استفاده قرار گرفت (۱۲). برای سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز محلول واکنش در حجم نهایی ۳ میلی‌لیتر برای پراکسیداز شامل ۲/۷۹ میلی‌لیتر بافر فسفات سدیم ۲۵ میلی‌مولار pH=۷ ۱۰۰ میکرولیتر گایاکول ۰/٦ مولار، ۱۰۰ میکرولیتر پراکسیدهیدروژن، ۱/۲ مولار و ۱۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. تغییرات جذب محلول واکنش در طول موج ٤٧٠ نانومتر اندازه‌گیری شد و فعالیت آنزیم براساس میکرومول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین بیان گردید (١٤). برای سنجش فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز، محلول واکنش در حجم نهایی ۳ میلی‌لیتر برای پلی فنل‌اکسیداز شامل ۲/۸ میلی‌لیتر بافر فسفات سدیم ۲۵ میلی‌مولار با pH=٦/٨، ۱۰۰ میکرولیتر پیروگالول ۰/۳ مولار، ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. تغییرات جذب محلول واکنش نسبت به شاهد در طول موج ٤٢٠ نانومتر اندازه‌گیری شد و فعالیت آنزیم براساس میکرومول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین بیان گردید (١٦). اندازه‌گیری پروتئین‌های محلول بر اساس روش برادفورد انجام شد (٦).

برای اندازه‌گیری غلظت آرسنیک در گیاه مقدار یک گرم پودر ماده خشک گیاه را در یک بالن ۱۰۰ میلی‌لیتری ریخته و سپس ۱۰ میلی‌لیتر نیتریک اسید ۱:۱ به آن اضافه شد و به‌مدت پانزده دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد. پس از سرد شدن مجدداً ۵ میلی‌لیتر اسید نیتریک ۱:۱ اضافه شد و دوباره به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد. سپس دو میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه شد. سپس پنج میلی‌لیتر کلریدریک اسید غلیظ به آن اضافه شد و بدون جوشیدن حرارت داده شد. پس از سرد شدن عصاره را با کاغذ صافی واتمن صاف نموده و با دستگاه جذب اتمی اندازه‌گیری شد (۲۹). داده‌های حاصل از این آزمایش با نرم‌افزار آماری SAS 9.1 تجزیه واریانس گردید و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

نتایج و بحث

تعداد برگ: نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که تنش فلز سنگین آرسنیک در سطح احتمال یک درصد به‌طور معنی‌داری، تعداد برگ را تحت‌تأثیر قرار داد (جدول ۲). مقایسه میانگین اثر آرسنیک بر تعداد برگ نشان داد که با افزایش غلظت آرسنیک میزان این شاخص کاهش پیدا کرد (جدول ۳).

جدول ۲- تجزیه واریانس اثرات کود زیستی فسفاته و تنش آرسنیک بر شاخص‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه نعناع سبز.

Table 2. analysis of variance of the effects of phosphate Bio fertilizer and arsenic stress on physiological and biochemical parameters of greenmint.

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	میانگین مربعات						
		ارتفاع بوته Plant height	تعداد برگ Number of leaves	سطح برگ Leaf area	وزن تر شاخساره Shoot fresh weight	وزن خشک شاخساره Shoot dry weight	وزن تر ریشه Root fresh weight	محتوای رطوبت نسبی Relative Water content
آرسنیک Arsenic	2	502.14**	11269.14**	71644.05^{ns}	8468.2**	251.35**	6503.1**	65.05 ^{ns}
کود زیستی فسفاته Phosphate Fertilizer	1	132.15**	2874.4 ^{ns}	27580.3^{ns}	2956.1**	366.22**	159.34 ^{ns}	54.012*
آرسنیک × کود Arsenic × Phosphate Fertilizer	2	84.12**	7485.11 ^{ns}	33013.7**	712.4 ^{ns}	544.55**	94.14 ^{ns}	42.04 ^{ns}
خطا Error	30	11.04	4032.3	70125.1	220.47	10.99	96.85	3.01
ضریب تغییرات (درصد) CV (%)		11.17	21.12	18.15	19.05	16.88	20.11	8.97

ادامه جدول ۲-

Continue Table 2.

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	میانگین مربعات								
		پراکسیداز Peroxidase Activity	پرولین Proline	قند محلول Soluble sugar	کاروتنوئید Carotenoids	کلروفیل کل Chlorophyll total	کلروفیل b Chlorophyll b	کلروفیل a Chlorophill a	پلی فنل اکسیداز Poly phenol oxidase	آرسنیک ریشه Arsenic concentration of root	آرسنیک شاخه Arsenic concentration of plant
آرسنیک Arsenic	2	22.45**	9110.4**	0.007**	5.2**	7.55*	4.1 ^{ns}	10.29 *	1.5**	0.28**	46.9**
کود زیستی فسفاته Phosphate Fertilizer	1	1.4 ^{ns}	8099.46 ^{ns}	0.012**	5.2**	18.4**	17.71 ^{ns}	45.48**	0.03 ^{ns}	0.06*	1.64**
آرسنیک × کود Arsenic × Phosphate Fertilizer	2	0.5*	9120.47**	0.013**	1.5 ^{n}	6.16*	3.14*	9.14*	2.5**	0.04*	1.21**
خطا Error	30	0.6	6145.3	0.006	3.42	2.78	2.34	2.62	0.3	0.22	0.14
ضریب تغییرات (درصد) CV (%)		30.15	7.12	11.21	12.21	20.49	13.55	28.35	22.13	22.41	11.4

^{ns}، * و ** به‌ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪.

^{ns}, * and ** notsignificant and significant at 5% and 1% probability levels, respectively.

صفات رشد رویشی: نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که تنش فلز سنگین آرسنیک و کود زیستی فسفاته در سطح احتمال یک درصد به‌طور معنی‌داری، ارتفاع بوته، وزن تر و خشک شاخساره، وزن خشک ریشه، سطح برگ و تعداد را تحت‌تأثیر قرار دادند هم‌چنین اثر متقابل آرسنیک و کود زیستی فسفاته ارتفاع بوته و وزن خشک شاخساره و ریشه و هم‌چنین سطح برگ اثر معنی‌داری را نشان دادند (جدول ۲). مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که آرسنیک باعث کاهش ارتفاع گیاه و وزن تر وخشک شاخساره نعنا سبز شد، اما در حضور کود زیستی فسفاته اثر تنش ناشی از آرسنیک کاهش یافت به‌طوری‌که باعث افزایش ۳۵، ۲۷، ۲۰ و ۲۰ درصدی ارتفاع بوته، وزن تر، وزن خشک شاخساره و سطح برگ به ترتیب شد (جدول‌های ۳ و ۵).

در موافقت با این پژوهش، یو و همکاران (۳۱) نیز نشان داد که کاربرد سنگ فسفات موجب افزایش ارتفاع بوته، وزن خشک ساقه و ریشه، جذب نیتروژن و فسفات توسط نهال‌های گردو و حداکثر دسترسی به فسفر و نیتروژن خاک گردید. این نتیجه می‌تواند به‌دلیل تأثیر فسفر بر توسعه سیستم ریشه‌ای و در نتیجه افزایش میزان جذب آب و عناصر غذایی ضروری به ویژه نیتروژن باشد. هم‌چنین کریمی و همکاران (۲۰۱۰) گزارش دادند که آرسنیک با مختل کردن سوخت و ساز نیتروژن و با مهار فعالیت آنزیم‌هایی مانند گلوتامین سنتتاز، گلوتامات سنتتاز، نیترات ردوکتاز و فرآیند احیای نیترات سبب کاهش تولید پروتئین‌ها شده و رشد را متوقف می‌کند (۱۷). جاها و همکاران (۲۰۱۱) نیز باکتری‌های حل‌کننده فسفات را روی عملکرد ماش سبز مورد بررسی قرار داده و بیان کردند که تلقیح این باکتری‌ها باعث افزایش تعداد غلاف در بوته، وزن صد دانه، عملکرد دانه و عملکرد زیست توده شد (۱۵).

هم‌چنین مقایسه میانگین اثر آرسنیک بر وزن خشک ریشه نشان داد که با افزایش غلظت آرسنیک میزان این شاخص کاهش پیدا کرد (جدول ۳). که می‌تواند به دلیل سمیت یونی ناشی از آرسنیک در داخل گیاه و هم‌چنین کاهش کارایی فتوسنتز به دلیل وجود گونه‌های فعال اکسیژن و از طرفی متحمل شدن گیاه برای صرف انرژی بیش‌تر جهت حذف رادیکال‌های آزاد باشد. در موافقت با این پژوهش، کریمی و همکاران (۲۰۱۰) گزارش دادند که آرسنیک با مختل کردن سوخت و ساز نیتروژن سبب کاهش تولید پروتئین‌ها شده و رشد را متوقف می‌کند (۱۷). اما باکتری‌های حل‌کننده فسفات تا حدودی این اثرات منفی ناشی از آرسنیک را کاهش داده و باعث رشد و نمو و در نتیجه بهبود عملکرد ماش سبز شدند (۱۵).

محتوای رطوبت نسبی: نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که کود زیستی فسفاته در سطح احتمال یک درصد به‌طور معنی‌داری، محتوای رطوبت نسبی را تحت‌تأثیر قرار دادند (جدول ۲). مقایسه میانگین اثر کودزیستی فسفاته بر محتوای رطوبت نسبی نشان داد که با افزایش کود زیستی فسفاته میزان این شاخص افزایش پیدا کرد (جدول ٤). کود فسفاته باعث افزایش کارایی نگهداری آب می‌شود به عبارتی با کاهش مقدار تبخیر و تعرق محتوای رطوبت برگ را بالا می‌برند که با نتایج پژوهش‌های یو و همکاران (۳۱) مطابقت دارد.

جدول ۳- مقایسه میانگین اثر تنش آرسنیک بر شاخص‌های ریخت شناسی و زیست-شیمیایی گیاه نعنا سبز.

Table 3. Mean comparison of effect arsenic stress on morphological and biochemical characteristics of greenmint.

آرسنیک Arsenic	وزن تر ریشه (گرم) Root dry weight	وزن خشک ریشه (گرم) Root dry weight (gr)	وزن تر شاخساره (گرم) Shoot fresh weight (gr)	تعداد برگ Number of leaves	کاروتنوئید (میلی‌گرم بر گرم وزن تر) Carotenoids (mg/g)
0	403[a]	80.06 [a]	100.15 [a]	712.48 [a]	0.471 [a]
50	246[b]	46.7 [b]	64.22 [b]	521.45 [b]	0.333 [b]
100	155[c]	30.12 [c]	35.12 [c]	145.74 [c]	0.229 [c]

* حروف متفاوت اختلاف معنی‌دار در احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون LSD را نشان می‌دهند.

The different letters in each column show a significant difference at the 5% probability level based on the LSD test.

جدول ٤- مقایسه میانگین اثر کود زیستی فسفاته بر ویژگی‌های فیزیولوژیکی و زیست-شیمیایی گیاه نعنا سبز.

Table 4. Mean comparison of effect of phosphate biofertilizer on physiological and biochemical properties of greenmint.

کود زیستی فسفات Phosphate Fertilizer (mg/kg)	محتوای رطوبت نسبی RWC (%)	وزن تر شاخساره (گرم) Shoot fresh weight (gr)	کاروتنوئید (میلی‌گرم بر گرم وزن تر) Carotenoids (mg/g)
0	59.12 [b]	79.17 [b]	0.248 [b]
0.5	75.5 [a]	109.12 [a]	0.489 [a]

* حروف متفاوت اختلاف معنی‌دار در احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون LSD را نشان می‌دهند.

The different letters in each column show a significant difference at the 5% probability level based on the LSD test.

جدول ۵- مقایسه میانگین اثر متقابل کود زیستی فسفاته و تنش آرسنیک بر ویژگی‌های رشدی گیاه نعنا سبز.

Table 5. Mean comparison of interaction of phosphate biofertilizer and arsenic stress on growth characteristics of greenmint.

کود زیستی فسفاته Phosphate BioFertilizer	آرسنیک (میلی‌گرم بر لیتر) Arsenic levels in (mg L^{-1})	سطح برگ (سانتی‌مترمربع) Leaf area (cm^2)	وزن خشک شاخساره (گرم) Shoot dry weight (gr)	ارتفاع گیاه (سانتی‌متر) Plant height (cm)
0	0	30.245 [ab]	30.2 [ab]	40.16 [ab]
	50	20.3228 [c]	21.68 [c]	31.5 [bc]
	100	12.052 [e]	8.28 [d]	11.28 [d]
0.5	0	31.3568 [a]	31.3 [a]	41.14 [a]
	50	27.5441 [b]	28.5 [b]	38.18 [b]
	100	19.5442 [d]	15.8 [d]	26.25 [c]

* حروف متفاوت اختلاف معنی‌دار در احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون LSD را نشان می‌دهند.

The different letters in each column show a significant difference at the 5% probability level based on the LSD test.

رنگیزه‌های فتوسنتزی

کلروفیل a: نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که اثر تنش فلز سنگین آرسنیک، کود زیستی فسفاته و اثر متقابل کود × آرسنیک در سطح احتمال یک درصد به‌طور معنی‌داری، کلروفیل a را تحت‌تأثیر قرار دادند (جدول ۲). نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل تنش آرسنیک و کاربرد کود زیستی فسفاته بر این شاخص نشان داد که بیش‌ترین میزان کلروفیل‌های a در تیمار ۱۰۰ گرم کود زیستی (فسفاته) (۱۰/۱۲ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) بود. کم‌ترین آن (۲/۱۲ میلی‌گرم بر گرم وزن‌تر) نیز در تیمار شاهد و غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم آرسنیک مشاهده گردید (جدول ٦). مطالعات انجام شده روی گندم و لوبیا نشان می‌دهد که کلروز ایجاد شده در این گیاهان، نتیجه القای تنش اکسیداتیو توسط آرسنیک بوده که منجر به کاهش محتوی کلروفیل برگ‌ها، تغییر شکل کلروپلاست و تخریب ساختار کاروتنوئیدها می‌گردد (۲۰). تنش ناشی از آرسنیک باعث کاهش مقدار کلروفیل می‌شود، که این می‌تواند به‌دلیل کاهش میزان کلروفیل b و در نتیجه کاهش کارایی به دام انداختن انرژی توسط فتوسیستم II، آسیب به غشاء تیلاکوئید و کاهش فعالیت آنزیم روبیسکو، و زنجیره انتقال الکترون باشد که می‌تواند باعث کاهش فتوسنتز و رشد شود (۲۱).

کلروفیل b: نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که اثر تنش فلز سنگین آرسنیک، کود زیستی فسفاته و اثر متقابل کود × آرسنیک در سطح احتمال یک درصد به‌طور معنی‌داری، کلروفیل b را تحت‌تأثیر قرار دادند (جدول ۲). بیش‌ترین میزان کلروفیل b (٤/۱۸ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) در گیاهان پرورش یافته در شرایط بدون تنش آرسنیک (شاهد) و نیم گرم در ۱۰۰ گرم کود زیستی فسفاته حاصل گردید. کم‌ترین آن (۱/٦۷ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) در سطح سوم تنش (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و بدون استفاده از کود زیستی فسفاته مشاهده شد که با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری نشان داد (جدول ٦).

کلروفیل کل: نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که اثر تنش فلز سنگین آرسنیک، کود زیستی فسفاته و اثر متقابل کود × آرسنیک در سطح احتمال یک درصد به‌طور معنی‌داری، کلروفیل کل را تحت‌تأثیر قرار دادند (جدول ۲). بیش‌ترین میزان کلروفیل کل (١٤/٤ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) در گیاهان تیمار شده با کود زیستی فسفاته و در غلظت شاهد آرسنیک مشاهده شد. کم‌ترین آن نیز (۳/۵۲ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم آرسنیک و بدون استفاده از کود زیستی فسفاته حاصل گردید (جدول ٦). نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که آرسنیک باعث کاهش میزان کلروفیل و رشد و نمو گیاه می‌شود که این عمل می‌تواند ناشی از تخریب رنگیزه کلروفیل و در نتیجه کاهش فتوسنز و کاهش رشد و نمو باشد. که سایر پژوهشگران در این خصوص گزارش داند که افزایش غلظت آرسنیک باعث تغییر شکل کلروپلاست، گرد شدن و کوتاه شدن محور طولی سلول، تو رفتگی غشاء، خمیدگی و تخریب غشاء شده که در نتیجه موجب کاهش محتوای کلروفیل برگ می‌گردد (۲۰).

مقدار کربوهیدرات‌ها: نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که اثر تنش فلز سنگین آرسنیک، کود زیستی فسفاته و اثر متقابل کود × آرسنیک در سطح احتمال یک درصد به‌طور معنی‌داری، کربوهیدرات را تحت‌تأثیر قرار دادند (جدول ۲). نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل بیانگر آن بود که بیش‌ترین میزان کربوهیدرات‌ها (۰/٤۲ میلی‌گرم بر گرم وزن تازه) در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم آرسنیک و با کاربرد کود زیستی فسفاته حاصل شد کم‌ترین میزان کربوهیدرات‌ها (۰/۰۱۱ میلی‌گرم بر گرم وزن تازه) در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم آرسنیک و بدون

کاربرد کود زیستی فسفاته به دست آمد (جدول ٦). در گیاه گوجه‌فرنگی افزایش آرسنیک سبب بالاتر رفتن مقدار کربوهیدرات گردیده است (۱۸) که با یافته‌های این پژوهش مطابقت دارد.

میزان پرولین: نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که اثر تنش فلز سنگین آرسنیک، کود زیستی فسفاته و اثر متقابل کود × آرسنیک در سطح احتمال یک درصد به طور معنی‌داری، پرولین را تحت‌تأثیر قرار دادند (جدول ۲). نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که اثر تنش فلز سنگین آرسنیک، کود زیستی فسفاته و اثر متقابل کود × آرسنیک در سطح احتمال یک و پنج درصد به طور معنی‌داری، پرولین را تحت‌تأثیر قرار دادند (جدول ۲). بیش‌ترین میزان پرولین (۰/۵۲۱ میکروگرم بر گرم وزن تازه) در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم آرسنیک و استفاده از کود زیستی فسفاته به دست آمد و کم‌ترین آن (۰/۲۸۵ میکروگرم بر گرم وزن تازه) در تیمار نیم گرم کود زیستی فسفاته و بدون آلودگی با آرسنیک به‌دست آمد (جدول ٦). گونه‌های فعال اکسیژن می‌توانند مستقیماً به پروتئین‌ها، آمینواسیدها و اسیدهای نوکلئیک آسیب بزنند و باعث پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی شوند (۸).

فعالیت‌های آنزیمی: نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که اثر تنش فلز سنگین آرسنیک، کود زیستی فسفاته و اثر متقابل کود × آرسنیک در سطح احتمال یک درصد به‌طور معنی‌داری، فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز را تحت‌تأثیر قرار دادند (جدول ۲). نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل تنش آرسنیک و کود زیستی فسفاته بر این شاخص نشان داد که بیش‌ترین فعالیت آنزیم پراکسیداز (۹۲/٦ میکرومول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین) در تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم آرسنیک و بدون کاربرد کود زیستی فسفاته، کم‌ترین آن (٤۲/۱ میکرومول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین) در تیمار شاهد و کود ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم آرسنیک به‌دست آمد. در رابطه با فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز که بالاترین میزان این آنزیم (۰/۲۱ میکرومول بردقیقه بر میلی‌گرم پروتئین) در تیمار نیم گرم کود زیستی فسفاته و غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم آرسنیک به‌دست آمد و کم‌ترین مقدار آن (۰/۰۱ میکرومول بردقیقه بر میلی‌گرم پروتئین) نیز در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم آرسنیک و بدون کاربرد کود زیستی فسفاته به‌دست آمد (جدول ٦). گیاهان در پاسخ به تنش آرسنیک فعالیت آنزیم‌ها آنتی‌اکسیدانی مانند پراکسیداز و کاتالاز را افزایش می‌دهند و این آنزیم‌ها باعث تبدیل پراکسید هیدروژن به آب و اکسیژن می‌شوند (۱۰). در گیاه گوجه‌فرنگی افزایش آرسنیک سبب بالاتر رفتن فعالیت آنزیم پراکسیداز گردیده است (۱۸) که با یافته‌های این پژوهش مطابقت دارد.

غلظت آرسنیک در شاخساره و ریشه گیاه: نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل تیمارها نشان داد که بیش‌ترین مقدار آرسنیک در بخش هوایی ۰/٥٦ میلی‌گرم بر کیلوگرم در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم آرسنیک و بدون استفاده از کود زیستی فسفاته مشاهده گردید که با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم آرسنیک در تیمار نیم گرم کود زیستی فسفاته تفاوت معنی‌داری نداشت (جدول ٦). نتایجی که از تأثیرگذاری حل‌کننده‌های فسفاته بر محتوای فسفر بخش هوایی در گیاه مریم‌گلی به‌دست آمد، بیانگر افزایش میزان جذب فسفر توسط ریشه گیاهان تیمار شده با کودهای زیستی فسفاته به‌علت افزایش قابلیت دسترسی به فسفر و متعاقب آن بهبود ظرفیت ریشه برای جذب فسفر و انتقال آن به بخش هوایی گیاه می‌باشد (۱۱).

نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل آرسنیک و کود زیستی فسفاته بر میزان تجمع آرسنیک در ریشه نشان داد که بیش‌ترین میزان آرسنیک در ریشه (۸/۰۹ میلی‌گرم بر کیلوگرم) در تیمار شاهد کود و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم آرسنیک به‌دست آمد و کم‌ترین آن (۰/۲۸ میلی‌گرم بر کیلوگرم) در تیمار شاهد کود و شاهد آرسنیک به‌دست آمد (جدول ٦).

جدول ٦- مقایسه میانگین اثر متقابل کود زیستی فسفاته و تنش آرسنیک برشاخص‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه نعناع سبز (*Mentha spicata* L.).

Table 6. Mean Comparison of interaction phosphate Biofertilizer and arsenic stress on physiological and biochemical parameters of greenmint (*Mentha spicata* L.).

آرسنیک ریشه Arsenic concentration in the root (mg/kg)	آرسنیک شاخه Arsenic concentration of the plant (mg/kg)	کلروفیل a Chlorophill a (mg.g)	کلروفیل b Chlorophill b (mg.g)	کلروفیل کل Chlorophill total (mg.g)	قند محلول Solublesugar (mg.g)	پراکسیداز Peroxidase (μ mol $d^{-1}mg^{-1}$ protein)	پلی فنل اکسیداز Phenol oxidase enzyme (μ mol $d^{-1}mg^{-1}$ protein)	پرولین Proline (mg.g)	آرسنیک Arsenic levels in (mg L^{-1})	کود زیستی فسفاته Phosphate Fertilizer
0.28 f	0.33 c	8.42 bc	2.68 d	9.1 c	0.109 e	54.10 d	0.07 Cd	0.348 Cd	0	
3.29 d	0.45 b	5.41 c	2.18 e	6.49 d	0.011 f	65.01 e	0.01 e	0.319 d	50	0
8.09 a	0.56 a	2.12 d	1.68 f	3.52 e	0.21 d	92.6 a	0.13 c	0.396 c	100	
1.44 e	0.2 e	10.12 a	4.18 a	14.4 a	0.27 c	42.1 f	0.08 d	0.285 e	0	
4.45 c	0.25 d	8.63 b	3.64 b	13.12 b	0.32 b	78.19 c	0.16 b	0.413 b	50	0.5
6.58 b	0.54 a	5.44 c	3.12 c	12.15 bc	0.42 a	81.14 b	0.21 a	0.521 a	100	

حروف مشابه اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون LSD را نشان نمی‌دهد.

The different letters in each column show a significant difference at the 5% probability level based on the LSD test.

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به نتایج این پژوهش می‌توان نتیجه گرفت که عنصر سمی آسنیک تا حدود زیادی توسط گیاه نعنا سبز جذب شده و نشان‌دهنده گیاه پالایی گیاهان این خانواده باشد که خود می تواند اثرات سمی بر حیوان و انسان بگذارد. اما کاربرد کود فسفاته، به‌خصوص کود زیستی فسفاته می تواند کاهش جذب از طریق افزایش جذب فسفر و سایر عناصر نسبت به آرسنیک و در نتیجه کاهش اثرات سمی آرسنیک بهبود سرعت رشد و نمو شود و غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم کود زیستی فسفاته برای گیاه نعنا سبز می‌تواند مفید باشد.

منابع

1. Aghighi Shahverdi, M., Amini Dehaghi, M., Ataei Somagh, H. and Behnam Mamivanad, B. 2019. The effect of different nutritional systems with nitrogen and phosphorous fertilizers on quantitative and qualitative traits of basil (*Ocimum basilicum* L.). J. Plant Prod. 4: 1-14. (In Persian)
2. Arnon, D.I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. J. Plant physiol. 24: 1-15.
3. Asadi Karam, E., Keramat, B. and Mozaffari, H. 2017. Effect of interaction of triacontanol and arsenic on growth and some biochemical and physiological in soybean (*Glycine max*). J. Plant Res. 3: 1-11. (In Persian)
4. Bates, L.S., Waldren, R.P. and Teare, I.D. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. Int. J. Plant-Soil Relat. 39: 205-207.
5. Bijeni, M. and Asgharipour, M.R. 2016. Effect of mycorrhiza inoculation and phosphorus fertilizer on arsenic resistance of fenugreek. J. Greenhouse Cul. Sci. Tech. 26: 137-126. (In Persian)
6. Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. J. Anal. Biochem. 72: 248-254.
7. Chance, B. and Maehly, A.C. 1955. Assay of catalases and peroxidases. Meth. Enzymol. 2: 764-775.
8. Gill, S.S. and Tuteja, N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. J. Plant Physiol. Biochem. 48: 909-930.
9. Glick, B.R. 2010. Using soil bacteria to facilitate phytoremediation. Biotechnol. Adv. J. Soil Man. Sus Pro. 28: 367-374.
10. Hasanuzzaman, M. and Fujita, M. 2013. Exogenous sodium nitroprusside alleviates arsenic-induced oxidative stress in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings by enhancing antioxidant defense and glyoxalase system. J. Ecot. 22: 584-596.
11. Hashem Abadi, D., Zaredost, F., Barari Ziyabari, M., Zarchini, M., Kaviani, B., Jadid Solimandarabi, M., Torkashvand, A.M. and Zarchini, S. 2012 Influence of phosphot biofertilizer on quantity and quality features of marigold. Aust. J. Crop Sci. 6: 1101-1109.
12. Hung, K.T. and Kao, C.H. 2003. Nitric oxide counteracts the senescence of rice leaves induced by abscisic acid. J. Plant Physiol. 160: 871-879.
13. Irigoyen, J.J., Einerich, D.W. and Sánchez-Díaz, M. 1992. Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa (*Medicago sativa*) plants. Int. J. Plant Bio. 84: 55-60.
14. Javan Siamardi, S., Rezaei Kahkha, M.R., Safaei Moghaddam, A. and Noori, R. 2014. Survey of heavy metals concentration (Fe). Ni, Cu, Zn, (Pb) in farmland soils of Sistan central part. J. Envir. Health Eng. 1: 46-53. (In Persian)
15. Jha, A., Sharma, D. and Saxena, J. 2012. Effect of single and dual phosphate-solubilizing bacterial strain inoculations

on overall growth of mung bean plants. J. Arch. Agron. Soil Sci. 58: 967-981.
16. Kar, M. and Mishra, D. 1976. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. J. Plant Physiol. 57: 315-319.
17. Karimi, N., Ghaderian, S.M., Marofi, H. and Schat, H. 2010. Analysis of arsenic in soil and vegetation of a contaminated area in Zarshuran, Iran, identify two angiosperm arsenic hyperaccumulators. Int. J. Phytoremed. 12: 159-173.
18. Karimi, N. and Souri, Z. 2013. Metabolic adaptations to arsenic-induced oxidative stress in Isatis cappadocica. Iran. J. Plant Physiol. 11: 785-792.
19. Khatami, M., Rarmoudi, M. and Glavie, M. 2018. The effect of application of phosphorus biological and chemical fertilizers on flower yield, essential percentage and osmotic adjustments in chamomile medicinal plant in response to dehydration stress. J. Crop Prod. 4: 119-132. (In Persian)
20. Kranner, I. and Colville, L. 2011 Metals and seeds: Biochemical and molecular implication and their significance for seed germination. Environ. Exp. Bot. 72: 93-105.
21. Tashakorizadeh, M. and Saeidnejad, A.H. 2016. Effect of different concentrations of chromium (ш) on morphological characteristics and essential oil chemical composition of basil . Iran. J. Water. Soil. 27: 2-14. (In Persian)
22. Moreno-Jiménez, E., Esteban, E. and Peñalosa, J.M. 2012. The fate of arsenic in soil-plant systems. In Reviews of environmental contamination and toxicology. Springer. New York, NY, 53p.
23. Muhammadi, S., Heidari, M., Dehdarah, M. and Asgharipour, M.R. 2015. The effect of nitrogen and arsenic on photosynthetic pigments, enzyme activity Antioxidants and Minerals of Safflower (*Carthamus tinctorius* L.). J. Crop Prod. 4: 105-120. (In Persian)
24. Wani, P.A., Khan, M.S. and Zaidi, A. 2008. Chromium-reducing and plant growth-promoting Mesorhizobium improves chickpea growth in chromium-amended soil. Biotechnol. Lett. 30: 159-163.
25. Nemati, A. and Golchin, A. 2015. Effects of biological fertilizers on yield and concentrations of micronutrients in organs of tomato under cadmium stress. J. Soil Manage. Sust. Prod. 5: 45-64. (In Persian)
26. Omidbeigi, R., Sadrai Menjili, K. and Sefidkon, F. 2006. Effect of Sowing Dates in the Productivity of Fennel (*Foeniculum vulgare*) CV. Soroksari. Sci. J. Manage. Syst. 21: 465-479. (In Persian)
27. Ritchie, S.W., Nguyen, H.T. and Holaday, A.S. 1990. Leaf water content and gas-exchange parameters of two wheat genotypes differing in drought resistance. J. Crop Sci. 30: 105-111.
28. Safari, M. 2014. the tendency of conventional agriculture (intensive Agric.) sustainable agriculture (sustaniable Agric) solutions to improve the quality of soils in semi-arid regions of Iran. The first national conference on sustainable management of soil resources and the environment. Kerman Shahid Bahonar University. (In Persian)
29. Soon, Y.K. and Abboud, S. 1993. Distribution of nickel, manganese and cadmium in soil and crops in the Mobarakeh steel plant region. J. Water. Soil. Sci. 8: 55-67. (In Persian)
30. Yadollahi, P., Asgharipour, M.R. and Sheikhpour, S. 2014. Effect of ascorbic acid on the growth and photosynthetic pigments of basil under arsenic stress. J. Crop Ecophysiol. 4: 553-566. (In Persian)
31. Yu, X., Liu, X., Zhu, T.H., Liu, G.H. and Mao, C. 2012. Co-inoculation with phosphate-solubilizing and nitrogenfixing bacteria on solubilization of rock phosphate and their effect on growth promotion and nutrient uptake by walnut. Europ. J. Soil Bio. 90: 112-117.