Plant Prod., 2023, 45(4), 603-615
https://plantproduction.scu.ac.ir/
ISSN (P): 2588-543X; **ISSN (E):** 2588-5979
Doi: 10.22055/PPD.2023.41415.2048
Received: 21 July 2022
Accepted: 28 January 2023

Plant Productions
Research Article

Effects of mycorrhizal and rhizobium inoculation on some physiological and biochemical traits of soybean under copper toxicity

Sharareh Shiati[1], Jalil Khara[2]*, Siavash Hosseini Sarghein[3], Abdollah Hassanzade Ghorttapeh[4]

1- Ph.D. Student, Department of Biology, Faculty of Sciences, Urmia University, Urmia, Iran
2- Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Sciences, Urmia University, Urmia, Iran
3- Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Sciences, Urmia University, Urmia, Iran
4- Assistant Professor, Horticulture Crop Science Research Department, West Azarbaijan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, (AREEO) ,Urmia, Iran.

Citation: Shiati, Sh., Khara, J., Hosseini Sarghein, S., & Hassanzade Ghorttapeh, A. (2023). Effects of mycorrhizal and rhizobium inoculation on some physiological and biochemical traits of soybean under copper toxicity. *Plant Productions,* 45(4), 603-615.

Abstract

Introduction

Heavy metals enter the surroundings through natural means as well as human activities. These metals reduce biomass, growth and photosynthesis and absorption of nutrients, which ultimately lead to plant death. Heavy metals such as copper, induce oxidative stress in plants by producing reactive oxygen species. Nowadays, heavy metal refining by physical and chemical methods are less used for economic and environmental reasons, and biological refining has been introduced as an alternative method. Among these, we can refer to the inoculation of plants with mycorrhizal fungi and rhizobium, which can protect the plants against this stress. The purpose of this research was to study the effects of mycorrhiza and rhizobium on the physiological and biochemical traits of soybean under copper stress.

Materials and Methods

For this purpose, a factorial greenhouse experiment based on a randomized complete block design with three replications was performed in the Faculty of Science, Urmia University in 2021. Experimental factors included four levels of copper sulfate stress (0, 50, 400 and 200 mg/kg soil) and four inoculation treatments (control,

* **Corresponding Author:** Jalil Khara
E-mail: jakhara@yahoo.com

© 2023 The Author(s). Published by Shahid Chamran University of Ahvaz. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

mycorrhiza, rhizobium and mycorrhiza + rhizobium). Plants were colonized by inoculum *Glomus verusiforme* (for mycorrhiza) and *Rhizobium japonicum* (for rhizobium). The soybean plants were grown in 16 treatment groups with a diurnal regime of 16-hour light and 8 hours dark at 18-29°C. Forty days after planting, the harvest was done and the factors were examined. The studied traits included the activity of guaiacol peroxidase and catalase enzymes, malondialdehyde, fresh and dry weight, soluble sugar of shoots and roots and chlorophyll a and b content.

Results and Discussion

Results showed that chlorophyll a and b content, soluble sugar and dry and fresh weights of shoots and roots were significantly reduced in treated plants compared to the control. This decrease was less evident in Inoculated plants than in non- Inoculated samples. However, antioxidant enzymes activity and malondialdehyde increased under copper stress. Increased enzymatic activity was more dramatic in rhizobia and mycorrhizal plants samples than non- rhizobia and mycorrhizal ones, which was the opposite of malondialdehyde. Based on the results of this study, the use of fungi and rhizobia in copper stress conditions reduced the effects of stress. The highest enzymatic activity, soluble sugar, fresh and dry weight and photosynthetic pigments and the lowest amount of malondialdehyde were observed in co-inoculation with Mycorrhiza- Rhizobia and control, respectively. The efficiency of plants inoculated with rhizobium and mycorrhizal against copper stress can be due to the reduction of oxidative stress, high antioxidant capacity, maintenance of natural plant metabolism, increased phosphorus uptake, increasing the rate of photosynthesis, Impact on heavy metals bio-availability and improvement of nitrogen fixation e in these plants.

Conclusion

According to the results, it is concluded that copper stress has severe effects on effects on soybean (Saba cultivar) and inoculation with mycorrhizal fungi and rhizobia can somewhat reduce this stress. Furthermore arbuscular mycorrhiza and rhizobia had synergistic effects so in many cases co-inoculation was more effective than single inoculation. On the basis of these results, co-inoculation with *Glomus verusiforme* and *Rhizobium japonicum* is suggested for improving soybean tolerance to copper stress.

Keywords: Antioxidant enzymes, Photosynthetic pigments, Soluble sugar, Vesicular-arbuscular

تولیدات گیاهی، ۱۴۰۱، ۴۵(۴)، ۶۰۳-۶۱۵
https://plantproduction.scu.ac.ir/
ISSN (P): 2588-543X; **ISSN (E):** 2588-5979
Doi: 10.22055/ppd.2023.41415.2048
تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۴/۳۰
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۱/۰۸

تولیدات گیاهی
مقاله پژوهشی

تاثیرات تلقیح مایکوریزایی و ریزوبیوم بر برخی صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه سویا تحت سمیت مس

شراره شیعتی[۱]، جلیل خارا[۲]*، سیاوش حسینی سرقین[۳]، عبدالله حسن‌زاده قورت تپه[۴]

۱- دانشجوی دکتری زیست شناسی گیاهی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ایران
۲- دانشیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ایران
۳- استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ایران
۴- استادیار، بخش تحقیقات علوم زراعی و باغی مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان آذربایجان غربی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ارومیه، ایران

چکیده

فلزات سنگین از طریق پدیده‌های طبیعی و نیز فعالیت‌های انسانی وارد محیط اطراف می‌شوند. این فلزات سبب کاهش بیومس، کلروز، مهار رشد و فتوسنتز و نیز تغییراتی در جذب مواد مغذی شده که این عوامل در نهایت منجر به مرگ گیاه می‌شوند. مس از جمله فلزات سنگین است که با تولید گونه‌های فعال اکسیژن سبب القای استرس اکسیداتیو در گیاه می‌شود. امروزه پالایش فلزات سنگین توسط روش‌های فیزیکی و شیمیایی به دلایل اقتصادی و زیست محیطی کمتر مورد استفاده قرار می‌گیرند و پالایش زیستی به‌عنوان روشی جایگزین معرفی شده است. پالایش زیستی همانند تلقیح گیاهان با قارچ‌های میکوریز و ریزوبیوم روشی کارامد در جهت حفاظت از گیاهان در برابر تنش فلزات سنگین می‌باشد. هدف از انجام این آزمایش بررسی کاربرد میکوریز و ریزوبیوم بر صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه سویا تحت سمیت مس بود. به این منظور، آزمایشی گلخانه‌ای به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی و با سه تکرار در دانشکده علوم دانشگاه ارومیه در سال ۱۴۰۰ اجرا شد. فاکتورهای این آزمایش شامل سولفات مس در ۴ سطح (۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک) و چهار تیمار تلقیح (شاهد یا عدم تلقیح، میکوریزا، ریزوبیوم و میکوریزا+ ریزوبیوم) بودند. گیاهان تلقیح یافته با میکوریز و ریزوبیوم با مایه تلقیح حاوی *Glomus verusiforme* و *Rhizobium japonicum* آغشته شدند. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت مس فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی و نیز مالون دی‌آلدئید برگ و ریشه سویا افزایش پیدا کردند اما محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی، قند محلول و نیز وزن تر و خشک کاهش یافتند که این کاهش در گیاهان تلقیح یافته کمتر از گیاهان غیرهمزیست بود. بر اساس نتایج این پژوهش کاربرد قارچ‌های میکوریزا و ریزوبیوم در شرایط تنش مس باعث کاهش آثار تنش شد، به‌نحوی‌که بیشترین مقدار فعالیت آنزیمی، محتوای قند محلول، وزن تر و خشک و رنگیزه‌های فتوسنتزی و کمترین میزان مالون دی‌آلدئید به ترتیب در تیمار تلقیح دوجانبه میکوریز+ ریزوبیوم و تیمار شاهد مشاهده شد. بنابراین با بررسی مطالب فوق نتیجه‌گیری شد که تنش مس اثرات زیانباری بر روی گیاه سویا رقم صبا دارد و تلقیح گیاه با ریزوبیوم و میکوریز می‌تواند این تنش را تا حدودی تخفیف دهد. همچنین مشاهده شد که تأثیر تلقیح دوجانبه ریزوبیوم+ میکوریز موجب هم‌افزایی اثرات آن‌ها شده و نقش بیشتری در تعدیل تنش مس در مقایسه با تلقیح گیاهان با این میکروارگانیسم‌ها به تنهایی دارد. بر اساس این نتایج تلقیح توام ریزوبیوم ژاپونیکوم و قارچ میکوریز آربوسکولار به منظور افزایش تحمل گیاه سویا در برابر تنش مس پیشنهاد می‌شود.

کلیدواژه‌ها: آنزیم‌های آنتی اکسیدان، رنگیزه‌های فتوسنتزی، قند محلول، وزیکولار آربوسکولار

* **نویسنده مسئول:** جلیل خارا
رایانامه: jakhara@yahoo.com

© 2023 The Author(s). Published by Shahid Chamran University of Ahvaz. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

مقدمه

واژه‌ی فلزات سنگین شامل فلزات و شبه فلزاتی است که دانسیته یا جرم حجمی آن‌ها بیش از ۴ گرم بر سانتیمتر مکعب می‌باشد. فلزات سنگین گیاهی سمی و غیرضروری شامل سرب (Pb)، نیکل (Ni)، کادمیوم (Cd)، آرسنیک (As)، کبالت (Co)، کروم (Cr)، جیوه (Hg) و وانادیوم (V) می‌باشند، در حالی‌که از فلزات سنگین ضروری می‌توان مس (Cu)، روی (Zn)، آهن (Fe) و منگنز (Mn) را نام برد. تماس طولانی مدت و شدید با فلزات سنگین می‌تواند سبب ایجاد اثرات مخرب در گیاهان، حیوانات و یا انسان‌ها شود (Aprile and De Bellis, 2020). فلزات سنگین با القای تشکیل رادیکال‌های آزاد و گونه‌های فعال اکسیژن، سبب آسیب به سلول‌های گیاهی و اختلال در رشد کلی گیاه می‌شوند (Sharafi, 2016). مس از جمله عناصر میکرو است که بطور طبیعی در خاک وجود دارد و در رشد گیاه نقش اساسی دارد. این عنصر به دلیل نقش کلیدی خود در فرایندهایی نظیر زنجیره انتقال الکترون، فتوسنتز و تنفس، متابولیسم دیواره سلولی، محافظت در برابرتنش اکسیداتیو و بیوژنز کوفاکتور مولیبدن، یک فلز ضروری برای گیاهان به حساب می‌آید که کمبود آن می تواند منجر به اختلال در متابولیسم گیاه شود (Yruela, 2009)، اما غلظت بالای مس بسیار سمی است و می‌تواند مسیرهای فتوسنتزی و متابولیکی را در گیاهان مهار کند و در نهایت منجر به کاهش زیست توده و تأخیر در گل‌دهی و میوه‌دهی شود (Jin et al., 2015). بیش‌بود مس در بافت‌های گیاهی، به عنوان یک فلز سنگین، با افزایش رادیکال‌های آزاد سمی و القای تنش اکسیداتیو، سبب مسمومیت و کاهش رشد در گیاه می‌گردد، همچنین غلظت‌های بالای این عنصر در گیاهان می‌تواند سلامت انسان و موجودات را به خطر اندازد (Pietrini et al., 2019). مقدار عناصر کم مصرف و فلزات سنگین در گیاهان وابسته به ویژگی‌های فیزیکی- شیمیایی خاک و نیز توانایی گیاه برای تجمع این عناصر می‌باشد (Asgari Lajayer et al., 2015).

امروزه چندین تکنولوژی با هدف پالایش فلزات سنگین معرفی شده‌اند که از جمله آن‌ها می‌توان به استفاده از میکروارگانیسم‌ها اشاره کرد (Fan et al., 2008). آلاینده‌های آلی می‌توانند به طور نسبی و یا کامل توسط میکروارگانیسم‌های مختلف و یا عملکرد گیاهان سم زدایی و از بین روند، اما با توجه به ویژگی بنیادی فلزات سنگین (HM)، این ترکیبات تجزیه نمی‌شوند و فقط می‌توانند به اشکالی با سمیت و تحرک کمترتبدیل شوند که این امر منجر به کاهش زیست‌فراهمی فلزات سنگین می‌شود. روش‌های فیزیکی و شیمیایی حذف HM از محیط‌های آلوده به دلیل عدم اقبال عمومی و هزینه بالا، معمولاً در مقیاس‌های بزرگ قابل استفاده نیستند، از این‌رو پالایش زیستی که شامل استفاده از موجودات زنده و یا قطعات و بخش‌هایی از آن‌ها است به‌عنوان روشی جایگزین مورد استفاده قرار می‌گیرد (Suman et al., 2018)، که از این میان می‌توان به استفاده از قارچ‌های میکوریزی و ریزوبیوم اشاره کرد. این قارچ‌ها با گسترش سیستم ریشه‌ای گیاه میزبان و افزایش جذب فسفر و نیز با تحریک ترشح آنزیم فسفاتاز، فسفات موجود در خاک را به شکل محلول که فرم قابل جذب آن برای ریشه است در آورده و از این طریق فسفر مورد نیاز گیاه را تامین می‌کند (Bagheri et al., 2019). قارچ‌های میکوریزی همچنین دسترسی گیاهان به آب و مواد غذایی را افزایش می‌دهند. هیف‌های قارچ‌های میکوریز می‌توانند تا چندین سانتی‌متر در درون خاک گسترش یابند و مقادیر زیادی مواد مغذی و همچنین فلزات سنگین موجود در ریشه گیاهان میزبان را جذب کنند و از طریق تغییر سیستم‌های ریشه/ ریزوسفر دسترسی زیستی به فلزات را تحت تاثیر قرار می‌دهند. قارچ‌های میکوریزا همچنین در آلی کردن فلزات در ریزوسفر موثر هستند و با انباشت اشکال غیر سمی فلزات در ریشه‌ها و میسیلیوم‌ها به ثبیت گیاهی کمک می‌کنند. از این‌رو قارچ‌های میکوریزی کاندید مناسبی جهت پاکسازی اراضی و مکان‌های آلوده به فلزات سنگین می‌باشند. همچنین همزیستی لگوم- ریزوبیوم در تکنیک زیست پالایی اهمیت ویژه‌ای دارد. علاوه بر توانایی ریزوبیوم‌ها در ثبیت نیتروژن، این میکروارگانیسم‌ها قادرند با کلاته کردن، تغییر شکل، تجمع و جذب بر روی زیست فراهمی فلزات تاثیرگذارند. از طرفی لگوم‌ها بعنوان گیاهان مورد استفاده در تکنیک‌های گیاه پالایی شناخته می‌شوند. از جمله تکنیک‌های کارامد در جهت اصلاح زیستی محیط‌های آلوده به فلزات سنگین، استفاده از لگوم‌ها و میکروارگانیسم‌های همزیست آن‌ها می‌باشد (Abdu and Abdullahi, 2017). سویا (*Glycine max* L.) یک محصول غذایی مهم در آسیا و نیز یکی از رایج‌ترین محصولات زراعی است که به طور سنتی و تجاری در انواع مختلف خاک و طیف وسیعی از شرایط آب و هوایی کشت می‌شود (Nget et al., 2021).

در غلظت‌های بالا، مس می‌تواند با اتصال به گروه‌های سولفیدریل غشای سلولی یا القای پراکسیداسیون لیپید، منجر به آسیب غشا و تولید رادیکال های آزاد در اندامک های مختلف گیاه و نیز آسیب به ماکرومولکول‌ها، لیپیدها، کربوهیدرات‌ها و پروتئین شود (Emamverdian et al., 2015). گزارش‌ها حاکی از آن است که تنش‌های مس، سرب و کادمیوم با پراکسیداسیون

غشاهای کلروپلاست و نیز با تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)، جذب عناصر حیاتی مورد نیاز برای سنتز رنگیزه‌های فتوسنتزی مانند منیزیم، پتاسیم و کلسیم را به حداقل می‌رسانند و در نتیجه سبب کاهش میزان فتوسنتز و محتوای کلروفیل می‌شوند (Keller et al., 2015, Rizwan et al., 2016). از طرفی تنش فلزات سنگین سبب افزایش تولید آنتی اکسیدان‌های غیر آنزیمی مانند پرولین، آسکوربات و گلوتاتیون و نیز افزایش فعالیت آنتی اکسیدان‌های آنزیمی از جمله سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز(CAT)، گلوتاتیون ردوکتاز (GR) و آسکوربات پراکسیداز (APX) می‌شود (Chowardhara et al., 2020).

در مطالعه انجام شده توسط Schwalbert et al. (2019) بر روی گیاه سویا نشان داده شد که با افزایش غلظت مس میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی و بیومس کاهش می‌یابد اما میزان فعالیت آنزیمی و محتوای مالون دی‌آلدئید افزایش می‌یابد. نتایج مشابه در بررسی تاثیر تنش کروم بر پارامترهای فیزیولوژیکی گیاه سویا بدست آمده است (Sundarmoorthy et al., 2015). همچنین نتایج پژوهش انجام شده توسط Naghavi et al., (2011) حاکی از کاهش میزان بیومس و کلروفیل a و b و نیز افزایش محتوای قند در گیاه سویا تحت سمیت سرب و روی می‌باشد.

در مطالعه انجام شده توسط Reichman (2007) تاثیر مثبت تلقیح سویا با ریزوبیوم در کاهش اثرات مضر آرسنیک مشاهده شده است. نتایج مشابه در بررسی همزیستی لگوم‌ها- ریزوبیوم در تخفیف سمیت دیگر عناصر سنگین شامل کادمیوم، سرب و مس بدست آمده است (Chen et al., 2008). همچنین تاثیرات مثبت همزیستی میکوریزی در تخفیف سمیت فلزات سنگین گزارش شده است (Mohammadifard and Moghaddam, 2020; Dachuan and Jinyu, 2021).

هدف از انجام این پژوهش، ارزیابی کاربرد میکوریز و ریزوبیوم بر صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه سویا تحت سمیت مس بود.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در قالب آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح بلوک-های کامل تصادفی با سه تکرار در سال ۱۴۰۰ در اتاق کشت گروه زیست شناسی دانشگاه ارومیه اجرا شد. فاکتورهای آزمایش شامل سولفات مس در ۴ سطح ۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک و چهار تیمار تلقیح (شاهد یا عدم تلقیح، میکوریزا، ریزوبیوم و میکوریزا+ ریزوبیوم) بودند. گیاهان تلقیح یافته با میکوریز و ریزو بیوم با مایه تلقیح حاوی *Glomus versiforme* حاوی حدود ۷۰ تا ۱۰۰ اسپور در هر گرم و *Rhizobium japonicum* سویه RS-140 آغشته شدند. خاک و ماسه مورد استفاده در این پژوهش، از دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه به نسبت ۳:۱ تهیه و در دستگاه اتوکلاو استریل شد. سپس سولفات مس ($CuSo_4.5H_2O$) در مقادیر لازم تهیه و بطور کامل با خاک و ماسه مخلوط و برای رسیدن به حالت تعادل، دو ماه در کیسه‌های پلاستیکی نگهداری شدند. بذر گیاه سویا رقم صبا (L17) از موسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج تهیه شد. این رقم سویا در سال ۱۳۹۰ به عنوان یکی از ارقام متوسط رس و پر محصول مناسب اقلیم معتدل معرفی شد. رقم صبا (L17) مقاوم در برابر ریزش دانه و خوابیدگی بوته بوده و حاصل تلاقی تلاقی بین دو رقم Union و Elf می‌باشد (Hamidi et al., 2020).

مایه تلقیح باکتری *Rhizobium japonicum* از مرکز تحقیقات خاک و آب تهران و قارچ *Glomus verusiforme* از شرکت زیست‌فناور توران شاهرود تهیه گردید.

مقدار مصرف مایه تلقیح قارچی ۳۰ گرم در هر گلدان بود و در تیمار شاهد به ازای این میزان، خاکی که در دستگاه اتوکلاو استریلیزه شده بود، اضافه گردید. به منظور تلقیح با ریزوبیوم نیز بذر سویا قبل از کاشت به مدت ۳۰ ثانیه در مایه تلقیح *Rhizobium japonicum* قرار داده شد و سپس بذرها را از محلول خارج کرده و به مدت نیم ساعت روی پارچه‌ای تمیز پخش کرده تا خشک شوند و بلافاصله کشت انجام گرفت (Nakhzari Moghaddam et al., 2020). گیاهان در اتاق کشت با شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲۹-۱۸ درجه سانتی‌گراد رشد یافتند. در سه روز اول بعد از کشت به منظور تغذیه گیاهان از آب و پس از آن از آب و محلول هوگلند استفاده شد. مقدار محلول داده شده به هر گلدان بسته به دمای هوا از ۱۵۰ تا ۲۵۰ میلی‌لیتر در روز متغیر بود. در پایان دوره کشت ۴۰ روزه مرحله برداشت انجام و فاکتورهای مورد نظر مورد بررسی قرار گرفتند. صفات مورد مطالعه این پژوهش شامل میزان کلروفیل a وb، فعالیت آنزیم‌های گایاکول پراکسیداز و کاتالاز، محتوای قند محلول، مالون دی‌آلدئید (MDA) و وزن تر و خشک اندام هوایی و ریشه بود.

برای اندازه‌گیری رنگیزه‌های فتوسنتزی از روش Lichtenthaler and Wellburn (1985) استفاده شد.

اندازه‌گیری MDA با استفاده از روش Heath and Packer (1968) انجام شد و جذب نمونه‌ها در طول موج‌های ۵۳۲ نانومتر و ۶۰۰ نانومتر قرائت شد.

اندازه گیری قند محلول با استفاده از روش فنل سولفوریک اسید (Fales, 1951) انجام گرفت.

به منظور سنجش فعالیت آنزیم گایاکول‌پراکسیداز با استفاده از روش Asada (1981) انجام شد. مخلوط واکنش شامل ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار (pH= ۷)، ۰/۲ میلی‌لیتر H_2O_2 یک درصد و ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره استخراجی بود (بافر فسفات حاوی EDTA ۰/۱ میلی‌مولار و آسکوربات سدیم ۱ میلی-مولار بود). فعالیت این آنزیم به صورت کاهش جذب طی ۱ دقیقه در طول موج ۲۴۰ نانومتر محاسبه شد. برای سنجش میزان فعالیت از ضریب خاموشی $2.8mM^{-1}cm^{-1}$ استفاده شد.

برای سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز روش Aebi (1974) مورد استفاده قرار گرفت. مخلوط واکنش شامل ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار (pH= ۷)، ۰/۲میلی‌لیتر H_2O_2 یک درصد و ۰/۳میلی‌لیتر عصاره استخراجی بود. فعالیت این آنزیم به صورت کاهش جذب طی ۱ دقیقه در طول موج ۲۴۰ نانومتر محاسبه شد. برای سنجش میزان فعالیت از ضریب خاموشی $0.0436mM^{-1}cm^{-1}$ استفاده شد.

به منظور کاهش خطا، نمونه‌برداری و آزمایش‌ها با سه تکرار انجام شد. آنالیز آماری داده‌ها با استفاده ار نرم افزار SAS نسخه ۱,۹ و مقایسه میانگین صفات مورد مطالعه توسط آزمون دانکن در سطح احتمال $P\leq0.05$ انجام گرفت.

نتایج و بحث

مالون دی‌آلدئید (MDA)

تجزیه واریانس نشان داد که تأثیر سطوح مختلف تلقیح زیستی و همچنین غلظت سولفات مس بر میزان مالون دی‌آلدئید اندام هوایی و ریشه در سطح $p\leq0.01$ معنی دار بود اما اثر متقابل این دو عامل معنی‌دار نبود (جداول ۱ و ۲).

با افزایش غلظت مس میزان مالون دی‌آلدئید نیز افزایش یافته است که این افزایش در نمونه‌های تحت تیمار مس در مقایسه با نمونه‌های شاهد در سطح آماری $p\leq0.05$ معنی‌دار بود (جداول ۳ و ۴).

MDA محصول جانبی تجزیه اسیدهای چرب غیراشباع چندگانه می‌باشد و سطوح بالای آن حاکی از قرار گرفتن گیاهان در معرض یک تنش آنتی اکسیدانی است. MDA در واقع یک محصول سیتوتوکسیک پراکسیداسیون لیپیدی و بهترین معیار برای سنجش میزان آسیب‌های وارده به غشای سلولی در اثر تولید ROS است (Singh et al., 2020).

Table 1. Analysis of variance (mean squares) of some traits in shoot of soybean inoculated with mycorrhiza and rhizobium under copper stress conditions

S.O.V	df	Chlorophyll a	Chlorophyll b	Soluble sugar	MDA	shoot dry weight	shoot fresh weight	GPX	CAT
Block	2	8.09^{ns}	1.43^{ns}	5.68^{ns}	3.29^{ns}	0.00^{ns}	1.35^{ns}	0.17^{ns}	2.25^{ns}
Inoculation	3	32.36***	6.96***	390.91***	27.67***	0.16***	4.84**	23.37***	13.33***
Cu	3	413.92***	156.84***	1266.91***	1704.08***	1.86***	116.01***	474.50***	303.45***
Cu× Inoculation	9	3.71**	0.67^{ns}	3.24^{ns}	1.32^{ns}	0.04***	0.25^{ns}	0.81^{ns}	1.52^{ns}
Erorr	30	3.80	0.65	21.70	4.39	1.14	0.01	1.45	1.30
C.V (%)		25/60	21/80	5/88	7/69	29/40	24/50	13/59	22/83

*, ** and*** Represents a significance at a probability level of 5% ,1% and 0.1% respectively, and ns; non-significant.

Table 2. Analysis of variance (mean squares) of some traits in root of soybean inoculated with mycorrhiza and rhizobium under copper stress conditions

S.O.V	df	Soluble sugar	MDA	root dry weight	root fresh weight	GPX	CAT
Block	2	17.02^{ns}	6.73^{ns}	0.001^{ns}	0.15^{ns}	1.68^{ns}	0.37^{ns}
Inoculation	3	164.28***	36.21***	0.07***	8.43***	41.18***	22.50***
Cu	3	8192.50***	1679.16***	10.03***	200.73***	898.34***	463.77***
Cu× Inoculation	9	2.96^{ns}	0.86^{ns}	0.01*	0.19^{ns}	1.30^{ns}	0.80^{ns}
Erorr	30	5.85	9.38	0.005	1.49	3.89	1.88
C.V (%)	-	7.22	1.77	22.73	22.93	16.98	17.65

*, ** and*** Represents a significance at a probability level of 5% ,1% and 0.1% respectively, and ns; non-significant

Table 3. Comparison of some physiological and biochemical traits of soybean shoot under inoculation treatments and different levels of copper stress

	Chlorophyll a (mg/g FW)	Chlorophyll b (mg/g FW)	Soluble sugar (mg/g DW)	MDA (µmol/gFW)	Shoot fresh weight (g/plant)	GPX (µmol/gFWmin)	CAT (µmol/gFWmin)
Control	3.60^{c}	2.84^{c}	72.50^{c}	33.32^{a}	2.90^{b}	7.17^{c}	3.75^{c}
Mycorrhizal	7.18^{ab}	3.54^{b}	80.50^{b}	26.29^{b}	3.69^{ab}	8.58^{b}	4.83^{b}
Rizobium	7.77^{b}	3.76^{b}	77.58^{b}	25.31^{b}	3.50^{ab}	9.10^{b}	5.13^{b}
Mycorrhizal+Rizobium	5.76^{a}	4.69^{a}	86.16^{a}	20.72^{c}	4.44^{a}	10.56^{a}	6.31^{a}
Cu (ppm)							
0	15.29^{a}	5.23^{a}	118.83^{a}	16.01^{d}	7.78^{a}	2.20^{d}	0.47^{d}
50	8.71^{b}	4.38^{b}	86.25^{b}	20.56^{c}	4.131^{b}	5.88^{c}	1.97^{c}
100	4.80^{c}	1.47^{c}	68.17^{c}	29.37^{b}	1.47^{c}	10.58^{b}	5.83^{b}
200	1.66^{d}	0.45^{d}	43.50^{d}	43.07^{a}	0.45^{d}	16.75^{a}	11.74^{a}

Means with the same letter in each column are not significantly different at 5% level (Duncan's Multiple Range Test)

Table 4. Comparison of some physiological and biochemical traits of soybean root under inoculation treatments and different levels of copper stress

Inoculation treatments	Soluble sugar (mg/g DW)	MDA (mol/gFWµ)	root fresh weight (gr/plant)	GPX (mol/gFW/minµ)	CAT (mol/gFW/minµ)
Control	41.33^{d}	19.77^{c}	4.28^{c}	9.25^{c}	9.44^{c}
Mycorrhizal	46.83^{b}	21.65^{b}	5.50^{ab}	11.45^{b}	7.55^{b}
Rizobium	45.25^{b}	22.39^{ab}	5.22$^{a\,b}$	11.98^{b}	7.99^{b}
Mycorrhizal+ Rizobium	50.25^{a}	23.95^{a}	6.31^{a}	13.75^{a}	9.44^{a}
Cu (ppm)					
0	78.67^{a}	10.47^{d}	1.08^{a}	2.14^{d}	1.05^{d}
50	53.92^{b}	15.56^{c}	0.67^{b}	7.56^{c}	4.87^{c}
100	31.92^{c}	24.22^{b}	0.46^{c}	14.69^{b}	9.79^{b}
200	19.17^{d}	37.50^{a}	0.33^{d}	22.05^{a}	15.45^{a}

Means with the same letter in each column are not significantly different at 5% level (Duncan's Multiple Range Test)

نتایج حاصل از بررسی تأثیر مس بر روی سویا و عدسک آبی پرریشه حاکی از افزایش میزان پراکسیداسیون لیپیدها و محتوای MDA تحت این تنش است (Singh et al., 2020; Schwalbert et al., 2019). همچنین نتایج حاصل از مطالعه Giannakoula et al., (2012) بر روی نارنج نیز حاکی از افزایش محتوای MDA در اثر تنش فلزات سنگین می‌باشد.

بررسی نتایج این پژوهش نشان داد که نمونه‌های تلقیح یافته با میکوریز و ریزوبیوم در مقایسه با نمونه‌های غیرهمزیست محتوای مالون دی‌آلدئید پایین تری را در حضور تیمار مس نشان دادند. به نحوی که بیشترین میزان MDA مربوط به غلظت ppm 200 مس در شرایط عدم تلقیح با میکوریز و ریزوبیوم و کمترین آن مربوط به نمونه‌های شاهد در شرایط تلقیح توام با میکوریز و ریزوبیوم بود (جداول ۳ و ۴). کاهش سطح MDA تحت تنش مس در این گیاهان احتمالاً به دلیل کاهش استرس اکسیداتیو و ظرفیت بالای آنتی اکسیدانی از طریق تثبیت نیتروژن در گیاهان تلقیح شده با ریزوبیوم (Duan et al., 2022) و کاهش اثرات استرس اکسیداتیو توسط خاصیت جاروب کنندگی ROSها و حفظ متابولیسم طبیعی گیاه از طریق افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی در گیاهان همزیست با میکوریز (Luo et al., 2022) می‌باشد.

با توجه به افزایش پراکسیداسیون لیپیدها در این تحقیق، میتوان نتیجه گرفت که میزان ROSها در گیاه سویا تحت سمیت

مس افزایش یافته اســت. و تلقیح با ریزوبیوم و میکوریز ســبب تخفیف اثرات این تنش می‌شود.

آنزیم‌های کاتالاز و گایاکول پراکسیداز

جداول تجزیه واریانس نشان داد که تأثیر سطوح مختلف تلقیح زیستی و همچنین غلظت سولفات مس بر میزان میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و گایاکول پراکسیداز در سطح $p\leq0.01$ معنی‌دار بود اما اثر متقابل این دو عامل معنی‌دار نبود (جداول ۱ و ۲).

نتایج حاکی از آن است که با افزایش غلظت مس میزان فعالیت آنزیم نیز افزایش یافته است که این افزایش در نمونه‌های تحت تیمار مس در مقایسه با نمونه‌های شاهد در سطح آماری $p\leq0.05$معنی‌دار بود (جداول ۳ و ۴).

به منظور کاهش اثرات مضــر رادیکال‌های آزاد، در گیاهان ســازوکارهای دفاعی آنزیمی و غیرآنزیمی تکامل یافته اســت که آنتی اکسیدان‌های آنزیمی شامل سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کـاتـالاز (CAT)، آســکوربـات پراکســیـداز (APX)، گایاکول پراکسیداز (GPX) و گلوتاتیون ردوکتاز (GR) و آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی شــامـل آســکوربـات (AsA)،گلوتاتیون (GSH)، کاروتنوئیدها، آلکالوئیدها، توکوفرول‌ها، پرولین و ترکیبات فنلی می‌باشـند (Emamverdian et al., 2015). نتایج حاصل از بررسی تـأثـیـر مس و ســرب بر روی گیـاه دارویی آب قـاشــقی، (*Nephrolepis biserrata*) یک نوع سرخس گرمسیری) و باقلا نیز نشــان داد کـه میزان فعـالیـت آنزیم‌هـای کاتالاز و گایاکول پراکســیداز تحت تنش فلزات ســنگین افزایش یافته است (Yap et al., 2021; Manan et al., 2015; Nadgórska-Socha et al., 2013).

بررسی نتایج این پژوهش نشان داد که نمونه‌های تلقیح یافته با میکوریز و ریزوبیوم در مقایسه با نمونه‌های غیرهمزیست فعالیت آنزیمی بالاتری را در حضور تیمار مس نشان دادند. به نحوی که بیشترین میزان فعالیت هر دو آنزیم مربوط به غلظت 200ppm مس در شرایط تلقیح توام با میکوریز و ریزوبیوم و کمترین آن مربوط به نمونه‌های شاهد در شرایط عدم تلقیح بود (جداول ۳ و ۴). افزایش میزان فعالیت آنزیمی در این گیاهان احتمالا به دلیل تثبیت نیتروژن و افزایش جذب فسفر و تحریک آزادسازی فیتوهورمون‌ها می‌باشد (Fang et al., 2020). تولید متابولیت هـایی نظیر هورمون‌های محرک رشد نقـش مهمی در بیـان آنـزیم‌هـای آنتی‌اکسیدان ایفا مـی‌کنند و با توجه به نقش آنزیم-های کاتالاز و پراکسیداز در حـذف رادیکال سمی پراکسیدهیدروژن، افــزایش فعالیــت ایــن آنــزیم‌ها در تیمارهای تلقیح یافته، سبب حذف ROSها و افـزایش مقاومـت گیاه در برابر تنش می‌شود (Turan et al., 2013).

محتوای کلروفیل a و b

تجزیه واریانس نشــان داد که تأثیر ســطوح مختلف تلقیح زیستی و همچنین غلظت سولفات مس بر محتوای کلروفیل a و b در ســطح $p\leq0.01$ معنی دار بود اما اثر متقابل این دو عامل معنی‌دار نبود (جدول ۱).

نتایج این پژوهش حاکی از آن اســت که با افزایش غلظت مس میزان کلروفیل a وb کاهش یافته اســت که این کاهش در نمونه‌های تحت تیمار مس در مقایســه با نمونه‌های شــاهد در سطح آماری $p\leq0.05$ معنی‌دار بود (جداول ۳ و ۴).

از دلایل کاهش رنگیزه‌های فتوســنتزی تحت ســمیت فلزات ســنگین می‌توان به افزایش فعالیت آنزیم کلروفیلاز، واکنش‌های اکســیداســیون/ احیا مولکول‌های کلروفیل در اثر تولید ROS و مهار بیوســنتز کلروفیل به دلیل جایگزینی برخی فلزات ســنگین مانند جیوه، مس، ســرب، نیکل، کادمیوم و روی به جای منیزیم حلقه پورفیرین مولکول‌های کلروفیل اشــاره کرد (Riyazuddin et al., 2022). کاهش میزان کلروفیل a وb در گیاهان ســویا، یولاف، گیاه دارویی دان ســیاه، بامیه و گندم تحت ســمیت مس گزارش شــده اســت (Keller et al., 2015; Amin et al., 2019). بررســی نتایج این پژوهش نشان داد که نمونه‌های تلقیح یافته با میکوریز و ریزوبیوم در مقایســه با نمونه‌های غیرهمزیســت محتوای کلروفیلی بالاتری را در حضــور تیمار مس نشــان دادند. به نحوی که بیشــترین میزان مربوط به نمونه‌های شــاهد در شــرایط تلقیح توام با میکوریز و ریزوبیوم و کمترین آن مربوط به غلظت 200 ppm مس در شــرایط عدم تلقیح بود (جداول ۳ و ۴). افزایش محتوای کلروفیــل در این نمونــه‌هــا را می‌توان به افزایش جذب فسفر و محتوای بالاتر نیتروژن و نقش کلیدی این عناصــر بعنوان حامل انرژی در بیوســنتز کلروفیل و چرخه‌های حیــاتی فتوســنتز نســبت داد (Mathivanan et al., 2017; Rhahmaty and Khara, 2011).

محتوای قند محلول

با توجه به جداول تجزیه واریانس مشــاهده شــد که تأثیر سطوح مختلف تلقیح زیستی و همچنین غلظت سولفات مس بر محتوای قند محلول در سطح $p\leq0.01$ معنی‌دار بود اما اثر متقابل این دو عامل معنی‌دار نبود (جداول ۱ و ۲).

نتایج بیانگر آن اســت که با افزایش غلظت مس میزان قند محلول در اندام هوایی و ریشــه کاهش یافته است که این کاهش در نمونه‌های تحت تیمار مس در مقایســه با نمونه‌های شاهد در سطح آماری $p\leq0.05$ معنی‌دار بود (جداول ۳ و ۴).

از جمله مکانیسم‌های دفاعی گیاهان در برابر تنش فلزات سنگین، سنتز پلی‌پپتیدهای کلاته کننده این فلزات نظیر فیتوکلاتین‌ها و متالوتیونین‌ها است (Balzano et al., 2020). کاهش میزان قند در طی تنش از یک سو به دلیل مصرف شدن آن در جهت تولید فیتوکلاتین‌ها و از سوی دیگر به دلیل تاثیر فلزات سنگین بر روی برخی ازآنزیم‌های کلیدی چرخه کالوین و کاهش میزان سنتز قند می‌باشد (Raeesi sadati and Jahanbakhsh Godekahriz., 2015). مطالعات انجام شده حاکی از کاهش میزان قند محلول در گیاهان گندم و *Salvinia natans* L. (سرخس شناور) تحت سمیت فلزات سنگین می‌باشد (Raeesi sadati and Jahanbakhsh Godekahriz., 2015; Faraji and Dilmaghany, 2015; Mohan and Hosetti, 2006).

بررسی نتایج این پژوهش نشان داد که نمونه‌های تلقیح یافته با میکوریز و ریزوبیوم در مقایسه با نمونه‌های غیرهمزیست محتوای قند محلول بالاتری را در حضور تیمار مس نشان دادند. به نحوی که بیشترین میزان مربوط به نمونه‌های شاهد در شرایط تلقیح توام با میکوریز و ریزوبیوم و کمترین آن مربوط به غلظت 200 ppm مس در شرایط عدم تلقیح بود (جداول ۳ و ۴). افزایش میزان قند در این نمونه‌ها می‌تواند به دلیل افزایش نرخ فتوسنتز، بیان پروتئین‌های مربوط به متابولیسم قند نظیر ساکارز فسفات سنتاز و اینورتاز و نیز تحریک بیان ژن‌های دخیل در گلیکولیز باشد (Hu et al., 2020).

میزان وزن تر و خشک

با توجه به جداول تجزیه واریانس مشاهده شد که تأثیر سطوح مختلف تلقیح زیستی و همچنین غلظت سولفات مس بر میزان وزن تر و خشک ریشه و اندام هوایی در سطح $p\leq0.01$ معنی دار بود. همچنین اثر متقابل این دو عامل بر میزان وزن خشک اندام هوایی وریشه به ترتیب در سطح $p\leq0.01$ و $p\leq0.05$ معنی‌داربود (جداول ۱ و ۲).

نتایج بیانگر آن است که با افزایش غلظت مس میزان بیومس در اندام هوایی و ریشه کاهش یافته است که این کاهش در نمونه‌های تحت تیمار مس در مقایسه با نمونه‌های شاهد در سطح آماری $p\leq0.05$ معنی‌دار بود (جداول ۳، ۴ و ۵).

غلظت بالای مس به دلیل تولید بیش از حد ROS، کاهش جذب مواد مغذی و فعالیت‌های فتوسنتزی و نیز تخریب پکتین‌ها در دیواره سلولی و تیغه میانی سبب کاهش استحکام و بیومس گیاهی می‌شود (Hayat et al., 2021). نتایج مشابه با این مطالعه در پژوهش‌های دیگر نیز گزارش شده است (Aprile et al., 2019; Saleem et al., 2019; Romanova and Shuvaeva, 2015).

Table 5. Effect of interaction between inoculation treatment and copper levels on shoot and root dry weigh

Inoculation treatments	Cu(ppm)	Shoot dry weight (gr/plant)	Root dry weight (gr/plant)
Control	0	0.70^{cd}	0.70^{cd}
	50	0.33^{fg}	0.25^{efg}
	100	0.14^{hi}	0.08^{i}
	200	0.03^{i}	0.02^{i}
Mycorrhizal	0	0.82^{bc}	0.62^{bc}
	50	0.44^{ef}	0.31^{def}
	100	0.18^{ghi}	0.09^{hi}
	200	0.05^{hi}	0.04^{i}
Rizobium	0	0.92^{b}	0.72^{b}
	50	0.47^{ef}	0.34^{de}
	100	0.19^{ghi}	0.14^{ghi}
	200	0.06^{hi}	0.05^{i}
Mycorrhizal+ Rizobium	0	1.35^{a}	0.93^{a}
	50	0.62^{df}	0.41^{d}
	100	0.24^{gh}	0.20^{fgh}
	200	0.08^{hi}	0.07^{i}

Means with the same letter in each column are not significantly different at 5% level (Duncan's Multiple Range Test)

بررسی نتایج این پژوهش نشان داد که تحت تنش، میزان وزن تر و خشک در نمونه‌های تلقیح یافته با میکوریز و ریزوبیوم بیشتر از نمونه‌های غیرهمزیست می‌باشد. بیشترین میزان مربوط به نمونه‌های شاهد در شرایط تلقیح توام با میکوریز و ریزوبیوم و کمترین آن مربوط به غلظت 200ppm مس در شرایط عدم تلقیح بود (جداول ۳ و ۴). افزایش میزان بیومس در این نمونه‌ها می‌تواند به دلیل جذب بهتر آب و مواد غذایی به‌ویژه فسفر از طریق هیف‌های قارچی، محتوای بالاتر کربن، بهبود تثبیت نیتروژن و کاهش اثرات تنش اکسداتیو باشد (Saia et al., 2014).

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که گیاه سویا از لحاظ فیزیولوژیکی تغییراتی را تحت تاثیر تنش مس متحمل می‌شود. یکی از این تغییرات افزایش فعالیت آنزیم‌های پاداکساینده بعنوان مکانیسم دفاعی مهم در جهت مقابله با اثرات تخریبی ناشی از تنش فلز سنگین است که میزان این افزایش در گیاهان تلقیح یافته با میکوریز و ریزوبیوم بیشتر از گیاهان غیر همزیست بود. همچنین کاهش در میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی و میزان قند محلول می‌تواند از اثرات مخرب این تنش باشد هرچند که محتوای این صفات در گیاهان همزیست با ریزوبیوم و میکوریز بیشتر از گیاهان شاهد بود .به‌طور کلی می‌توان بیان کرد که همزیستی گیاه با قارچ‌های میکوریز و ریزوبیوم سبب کاهش اثرات مضر تنش مس می‌شود.

سپاس‌گزاری

بدین وسیله ازمعاونت پژوهشی دانشگاه ارومیه برای حمایت مالی این پژوهش تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

Abdu, N., and Abdullahi, A. A. (2017). Heavy metal remediation of contaminated soils (II): Legume-rhizobia symbiosis, mycorrhiza and other: A review. *Nigerian Journal of Scientific Research*, 16(6), 775-780.

Aebi, H. (1974). Methods of enzymatic analysis. Bergmeyer: Chemie Weinheim. 11, 673-84.

Amin, H., Arain, B. A., Jahangir, T. M., Abbasi, A. R., Mangi, J., Abbasi, M. S. & Amin, F. (2019). Copper (Cu) tolerance and accumulation potential in four native plant species: a comparative study for effective phytoextraction technique. *Geology, Ecology, and Landscapes*. ISSN: (Print) 2474-9508 (Online)

Asada, K. (1992). Ascorbate peroxidase and hydrogen peroxide scavenging enzyme in plants. *Journal of Plant Physiology*, 85, 235-241.

Asgari LeJjaier, H., Savaghebi firoozabadi, G. R., Motesharezadeh, B. & Hadian., J. (2016). Evaluation of trends in mineral nutrition uptake in Balangu (*Lallemantia Iberica*) under different copper and zinc application rates. *Iranian Journal of soil and water research*, 46(4), 791-799. [In Persian]

Aprile, A., & De Bellis, L. (2020). Editorial for special issue "Heavy metals Accumulation, Toxicity, and Detoxification in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(11), 4103.

Bagheri, V., Shamshiri, M. H, Alaei, H., & Salehi, H. (2019). Effect of three Species of arbuscular mycorrhizal fungi on growth and nutrients uptake in zinnia plant under drought stress conditions. *Journal of Plant Productions (Scientific Journal of Agriculture)*, 41(4), 83- 96. [In Persian]

Balzano, S., Sardo, A., Blasio, M., Chahine, T. B., Dell'Anno, F., Sansone, C., & Brunet C. (2020). Microalgal Metallothioneins and Phytochelatins and Their Potential Use in Bioremediation. *Frontiers in Microbiology*, 11, 517.

Chen, W. M., Wu, C. H., James, E. K., & Chang, J. S. (2008). Metal biosorption capability of Cupriavidus taiwanensis and its effects on heavy metal removal by nodulated Mimosa pudica. *Journal of Hazardous Materials*, 151(2-3), 364-371.

Chowardhara, B., Borgohain, P., Saha, B., Awasthi, J., & Panda, S. (2020). Differential oxidative stress responses in *Brassica juncea* (L.) Czern and Coss cultivars induced by cadmium at germination and early seedling stage. *Acta Physiologiae Plantarum*. 45(3).

Dachuan, Y., & Jinyu, Q. (2021).The physiological response of Ectomycorrhizal fungus *Lepista sordida* to Cd and Cu stress. *Peer Journal*, 9, e11115.

Duan, C., Mein, Y., Wang, Q., Wang, Y., Li, Q., Hong, M., Hu, S., Li, S., & Fang, L. (2020). Rhizobium Inoculation Enhances the Resistance of Alfalfa and Microbial Characteristics in Copper-Contaminated Soil. *Frontiersin in microbiology*, 12, 781831.

Emamverdian, A., Ding, Y., Mokhberdoran, F., & Xie, Y. (2015). Heavy metal stress and some mechanisms of plant defense response. *Scientific World Journal*, 2015756120.

Fales, F. (1951). The assimilation and degradation of carbohydrates by yeast cells. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 113-124.

Fan, T., Liu, Y., Feng, B., Zeng, G., Yang, C., Zhou, M., Zhou, H., Tan, Z., & Wang, X. (2008). Biosorption of cadmium (II), zinc (II) and lead (II) by Penicillium simplicissimum: Isotherms, kinetics and thermodynamics. *Journal of hazardous materials*, 160(2-3), 655-661.

Fang, L., Ju, W., Yang, C., Jin, X., Liu, D., Li, M., Yu, J., Zhao, W., & Zhang, C. (2020). Exogenous application of signaling molecules to enhance the resistance of legume-rhizobium symbiosis in Pb/Cd-contaminated soils. *Environmental Pollution*, 265(4), 114744.

Faraji, M., & Dilmaghani, K. (2015). Salicylic acid pretreatment effect on cadmium toxicity in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology)*, 27(4), 703-714. [In Persian]

Giannakoula, A., Therios, I., & Chatzissavvidis, C. (2021). Effect of lead and copper on photosynthetic apparatus in citrus (*Citrus aurantium* L.) plants. The role of antioxidants in oxidative damage as a response to heavy metal stress. *Plants (Basel)*, 10(1), 155.

Hamidi, A., Sadeghi, H., Gazor, H., Sheidaei, S., Oskoui, B., Mivechi Langroodi, H., Nouri, M., Alizadeh, S., Seifamiri, S., Zare, L., & Dashti, A. (2020). Study on effect of postharvest process on soybean two commercial cultivars Williams and Saba (L17) seed quality in Moghan region. *Iranian Journal of Seed Science and Technology*, 8(2), 271-288. [In Persian]

Heath, R. L., & Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolate chloroplasts I. Kinetics andstoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives in Biochemistry and Biophysics*, 125(1), 850- 857.

Hayat, K., Khan, A., Bibi, F., Murad, W., Fu, Y., Batiha, G. E. S., & Al-Harrasi, A. (2021). Effect of cadmium and copper exposure on growth, physio-chemicals and medicinal properties of *Cajanus cajan* L. (Pigeon Pea). *Metabolites*, 11(11), 769.

Hu, Y., Xie, W., & Chen, B. (2020). Arbuscular mycorrhiza improved drought tolerance of maize seedlings by altering photosystem II efficiency and the levels of key metabolites. *Chemical and biological technologies in agriculture*, 7, 20.

Jin, Z., Li, J., & Li, Y. (2015). Interactive effects of *Arbuscular mycorrhizal* fungi and copper stress on flowering phenology and reproduction of *Elsholtzia splendens*. *PLoS ONE*, 10(12), e0145793.

Keller, C., Rizwan, M., Davidian, J. C., Pokrovsky, O. S., Bovet, N., Chaurand, P., & Meunier, J. D. (2015). Effect of silicon on wheat seedlings (*Triticum turgidum* L.) grown in hydroponics and exposed to 0 to 30 µM Cu. *Planta*, 241(4), 847-60.

Luo, J., Yan, Q., Yang, G., & Wang, Y. (2022). Impact of the *Arbuscular mycorrhizal* fungus funneliformis mosseae on the physiological and defence responses of *Canna indica* to copper oxide nanoparticles stress. *Journal of Fungi (Basel)*, 8(5), 513.

Lichtenthaler, H. K., & Wellburn, A. R. (1985). Determination of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf in different solvents. *Biochemical Society Transactions*, 11, 591-592.

Manan, F. A., Mamat, D. D., Samad, A. A., Ong, Y. S., Ooh, K. F., & Chai, T. T. (2015). Heavy metal accumulation and antioxidant properties of *Nephrolepis biserrata* growing in heavy metal- contaminated soil. *Global NEST Journal*, 17, 544–554.

Mathivanan, S., Chidambaram, A. L. A., Robert, G. A., & Kalaikandhan, R. (2017). Impact of PGPR inoculation on photosynthetic pigment and protein. *The Journal of Agricultural Science*, 1, 29-36.

Mohammadifard, F., & Moghaddam, M. (2020). The effect of two mycorrhiza fungi species on biochemical characteristic and aerial parts dry biomass of coriander (*Coriandrum sativum* L.) under cadmium stress. *Journal of Plant Productions*, 45(1), DOI:10/22055/PPD.2020.30809.1817.

Mohan, B. S., & Hosetti, B. B. (2006). Phytotoxicity of cadmium on the physiological dynamics of *Salvinia natans* L. grown in macrophyte ponds. *Journal of Environmental Biology*, 27(4), 701-704.

Nadgórska-Socha, A., Kafel, A., Kandziora-Ciupa, M., Gospodarek, J., & Zawisza-Raszka, A. (2013). Accumulation of heavy metals and antioxidant responses in *Vicia faba* plants grown on monometallic contaminated soil. *Environmental Science and Pollution Research*, 20, 1124–1134.

Naghavi, F., Iranbakhsh, A. R., & Majd, A. (2011).The Effects of zinc and lead on seedling growth ob soybean (*Glycine max* L.). *Plant and Ecosystem*, 7(28), 81-97.

Nakhzari Moghaddam, A., Samsami, N., Rahemi Karizaki, A., & Gholinezhad, E. (2020). Effect of irrigation on physiological traits and seed yield of soybean under inoculation with mycorrhiza fungi and rhizobium bacteria. *Environmental Stresses in Crop Sciences*, 13(2), 413-423. [In Persian]

Nget, R., Aguilar, E. A., Cruz, P., Reaño, C., Sanchez, P., Reyes, M., & Prasad, V. (2021). Overview of farmers' perceptions of current status and constraints to soybean production in ratanakiri province of *Cambodia*. *Sustainability*, 13, 4433.

Pietrini, F., Carnevale, M., Beni, C., Zacchini, M., Gallucci, F., & Santangelo, E. (2019). Effect of different copper levels on growth and morpho-physiological parameters in Giant Reed (*Arundo donax* L.) in semi-hydroponic mesocosm experiment. *Water*, 11(9), 1837-1856.

Raeesi sadati, S. Y., & Jahanbakhsh Godekahriz, S. (2015). The effect of heavy metals on some of amino acids, soluble sugars content and total protein in two wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.). *Research in Crop Ecosystems*, 2(1), 85-95. [In Persian]

Rahmaty, R., & Khara, J. (2011). Effects of vesicular arbuscular mycorrhiza *Glomus* intraradices on photosynthetic pigments, antioxidant enzymes, lipid peroxidation, and chromium accumulation in maize plants treated with chromium. *Turkish Journal of Biology*, 35(1). 51- 58.

Reichman, S. M. (2007). The potential use of the legume-rhizobium symbiosis for the remediation of arsenic contaminated sites. *Soil Biology and Biochemistry*, 39(10), 2587-2593.

Riyazuddin, R., Nisha, N., Ejaz, B., Khan, M. I. R., Kumar, M., Ramteke, P. W., & Gupta, R. (2022). A comprehensive review on the heavy metal toxicity and sequestration in plants. *Biomolecules*, 12, 43.

Rizwan, M., Meunier, J. D., Davidian, J. C., Pokrovsky, O. S., Bovet, N., & Keller, C. (2016). Silicon alleviates Cd stress of wheat seedlings (*Triticum turgidum* L. cv. Claudio) grown in hydroponics. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(2), 1414-1427.

Romanova, T. E., & Shuvaeva, O. V. (2015). Identification of the binding forms of cadmium during accumulation by water hyacinth. *Chemical Speciation and Bioavailability*, 27(3), 139-145.

Saia, S., Amato, G., Frenda, A. S., Giambalvo, D., & Ruisi, P. (2014). Influence of arbuscular mycorrhizae on biomass production and nitrogen fixation of berseem clover plants subjected to water stress. *PloS one*, 9(3), e90738.

Saleem, M. H., Ali, S., Seleiman, M. F., Rizwan, M., Rehman, M., Aisha Akram, N., & Mubushar, M. (2019). Assessing the correlations between different traits in copper-sensitive and copper-resistant varieties of jute (*Corchorus capsularis* L.). *Plants*, 8(12), 545.

Schwalbert, R., Silva, L. O., Schwalbert, R. A., Tarouco, C. P., Fernandes, G. S., Marques, A. C. R., Costa, C. C., Hammerschmitt, R. K., Brunetto, G., & Nicoloso, F. T. (2019). Physiological responses of soybean (*Glycine max* L. Merrill) cultivars to copper excess. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, 91(4), e20190121.

Sharafi, Y. (2017). Effects of some heavy metals (Copper and Lead) on pollen germination and tube growth of some cherry (Pruons Of 0, 50, 100, 150, 200 And 250 Mg.L-1) on pollen germination and tube growth of ten sweet cherries cultivars of Tehran province were studied in Vitro. *Journal of plant productions*, 39(4), 79-86. [In Persian]

Singh, H., Kumar, D., & Soni, V. (2020). Copper and mercury induced oxidative stresses and antioxidant responses of *Spirodela polyrhiza* (L.) Schleid. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 17(23), 100781.

Suman, J., Uhlik, O., Viktorova, J., & Macek, T. (2018). Phytoextraction of heavy metals: A promising tool for clean-up of polluted environment? *Fronties Plant Sciences*, 9, 1476. Doi: 10.3389/fpls. 2018.01476.

Sundarmoorthy, P., Sankarganesh, K., Selvaraj, M., Baskaran, L., & Chidambaram, A. A. (2015). Chromium induced changes in Soybean (*Glycine max* L.) metabolism. World Scientific News, 16, 125-158.

Turan, M., Güllüce, M., Çakmak, R., & Şahin, F. (2013). Effect of plant growth-promoting rhizobacteria strain on freezing injury and antioxidant enzyme activity of wheat and barley. *Journal of Plant Nutrition*, 36(5), 731-748.

Yap, C. K., Yaacob, A., Tan, W. S., Al-Mutairi, K. A., Cheng, W. H., Wong, K. W., Berandah Edward, F., Ismail, M. S., You, C. F., Chew, W., Nulit, R., Ibrahim, M. H., Amin, B., & Sharifinia, M. (2020). Potentially toxic metals in the high-biomass non-hyperaccumulating plant amaranthus viridis: Human health risks and phytoremediation potentials. *Biology (Basel)*, 11(3), 389.

Yruela, I. (2009). Copper in plants: acquisition, transport and interactions. *Functional Plant Biology*, 36(5), 409-430.