نقش گلومالین تولیدی توسط قارچ *Rhizophagus irregularis* در تثبیت ریشه‌ای کادمیوم توسط شبدر سفید (*Trifolium repens* L.)

الهام ملک‌زاده[۱*]، ناصر علی‌اصغرزاد[۲]، جعفر مجیدی[۳]

(تاریخ دریافت: ۹۵/۱/۱۸ تاریخ پذیرش: ۹۵/۶/۲۰)

چکیده

تثبیت ریشه ای فلزات سنگین توسط گلومالین از جمله ساز و کارهای حفاظتی قارچ های میکوریزی در پاسخ به تنش فلزی است. با این پیش‌فرض، نقش قارچ *Rhizophagus irregularis* در همزیستی با گیاه شبدر سفید در تثبیت ریشه‌ای کادمیوم و تولید گلومالین و سهم آن در سکوستره‌سازی کادمیوم در ریشه بررسی گردید. آزمایشی گلدانی در آرایش فاکتوریل در قالب طرح بلوک کامل تصادفی شامل دو فاکتور، قارچ (با و بدون قارچ میکوریزی) و سطوح کادمیوم (۰، ۱۵، ۳۰ و ۴۵ میکرومولار Cd^{+2}) در پنج تکرار طراحی گردید. نتایج نشان داد کلنیزاسیون ریشه گیاهان توسط قارچ *Rhizophagus irregularis* منجر به بهبود تغذیه فسفری و وزن خشک اندام هوایی و ریشه در مقایسه با گیاهان غیرمیکوریزی گردید. با افزایش غلظت کادمیوم، کارآیی جذب و استخراج گیاهی افزایش و کارآیی انتقال گیاهی کادمیوم از ریشه به اندام هوایی کاهش یافت. کارآیی جذب گیاهی کادمیوم در گیاهان میکوریزی به طور معنی داری بیشتر از گیاهان غیرمیکوریزی بود. گرچه، کارآیی انتقال گیاهی از نظر آماری تفاوت معنی داری بین گیاهان میکوریزی و غیرمیکوریزی نداشت ولی این فاکتور در گیاهان میکوریزی کمتر از غیرمیکوریزی بود. از سوی دیگر، جذب کادمیوم در ریشه بیشتر از اندام هوایی بود، همچنین مقدار کادمیوم ریشه در گیاهان میکوریزی بیشتر از گیاهان غیرمیکوریزی بود. بنابراین، گیاه شبدر میکوریزی در تثبیت ریشه ای کادمیوم نقش موثرتری داشت. با افزایش غلظت کادمیوم، تولید گلومالین ریشه و مقدار کادمیوم سکوستره شده توسط آن نیز به طور معنی‌داری افزایش یافت. در نتیجه، سهم بیشتر ریشه گیاهان میکوریزی در جذب کادمیوم می‌تواند به دلیل سکوستره‌سازی کادمیوم در ساختارهای قارچی ریشه باشد. گلومالین به‌عنوان پروتئین القایی تنش و ترکیب مهم و موثر دیواره اسپور و هیف قارچ AM در حفاظت گیاه میزبان از اثرات سمی کادمیوم در نقش پروتئین شوک حرارتی و نیز کاهش قابلیت دسترسی زیستی آن، نقش مهم و کلیدی در تثبیت ریشه‌ای کادمیوم دارد.

واژه‌های کلیدی: الایزا، کادمیوم، گلومالین، گیاه پالایی، قارچ میکوریز آربوسکولار

۱- فارغ التحصیل دکتری بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز (مکاتبه کننده)
۲- استاد گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
۳- استاد گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز
* پست الکترونیک: malekzadeh.elham@gmail.com

مقدمه

آلودگی خاک ها به فلزات سنگین امروزه به یکی از مهم‌ترین معضلات زیست محیطی تبدیل شده است که از پیامدهای افزایش فعالیت های صنعتی، کشاورزی و معدن کاوی به‌ویژه در هزاره سوم تمدن بشری می‌باشد. فلزات سنگین به دلیل عدم تجزیه و اثرات فیزیولوژیکی که بر موجودات زنده در غلظت های کم دارند، اهمیتی چشمگیر دارند (Kabata-Pendias, 2011). کادمیوم، کروم، مس، جیوه، سرب و نیکل، فراوان ترین فلزات سنگین شناخته شده‌اند. کادمیوم به دلیل فراوانی و اثرات سرطان‌زایی، جهش‌زایی و سمیت سلولی نه تنها برای گیاهان بلکه برای سلامت انسان و جانوران نیز مخاطره‌آمیز است (Shevyakova *et al*., 2008). با توجه به خطر تغلیظ و تجمع زیستی در زنجیره غذایی و توانایی بالقوه فلزات سمی در به مخاطره انداختن سلامت انسان‌ها، جانوران و گیاهان، لزوم پرداختن به راه کارهای مناسب جهت پالایش ضرورتی انکارناپذیر است. در دهه‌های اخیر راه‌کارهای پالایش خاک های آلوده به فلزات سنگین به سمت روش‌های سازگار با محیط زیست با حداقل تخریب و تغییر ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی خاک پیش رفته است (Mulligan *et al*., 2001). زیست‌پالایی با سیستم گیاه-میکروارگانیسم (گیاه‌پالایی غیرمستقیم) به دلیل هزینه کم و پیامدهای جانبی کمتر به واسطه حفاظت از زنجیره غذایی می‌تواند در فرآیند پالایش به‌وسیله افزایش زیتوده گیاهی موثر و سودمند باشد (Soleimani *et al*., 2011). پژوهش‌هایی پرشمار کاربرد قارچ های میکوریز آربوسکولار (AM) را در افزایش کارایی گیاه‌پالایی در خاک های آلوده به فلز به اثبات رسانده‌اند (Bressano *et al*., 2010). در تنش فلزات سنگین، دو راهبرد در گیاهان وجود دارد که فلزات سنگین را به داخل بافت‌های هوایی انتقال داده و ذخیره می کنند (استخراج گیاهی) یا فلزات سنگین را در خاک تثبیت می کنند (تثبیت گیاهی) (Gohre & Paszkowski, 2006). قارچ های AM از طریق اندوزش فلزات به شکل غیرسمی در ریشه های گیاه و میسلیوم های برون‌ریشه‌ای به تثبیت فلز کمک می‌کنند. گیاهان میکوریزی از راه ترشحات قارچی در ریزوسفر، رسوب در گرانول‌های پلی فسفات و واکوئل‌ها و وزیکول ها، جذب سطحی روی دیواره سلولی اندام های قارچی به واسطه کیتین، ملانین، گلوکان و منان و غیره، و کی لیت کردن در اندام های قارچی شامل هیف‌های درون و برون سلولی و اسپورهای قارچی به واسطه حضور گلیکوپروتئین گلومالین در تثبیت فلزات سنگین در ریشه های میکوریزی نقشی موثر دارند (Gaur & Adholeya, 2004; Gohre & Paszkowski, 2006; Gonzalez-Chavez *et al*., 2004). گلومالین ترکیب مهم و موثر دیواره اسپور و هیف قارچ های AM می باشد که توسط رایت و همکاران (Wright *et al*., 1996) بر روی هیف های قارچ AM با استفاده از روش ایمونوفلورسنس غیرمستقیم با به کارگیری آنتی بادی مونوکلونال کشف شد. گلومالین گلیکوپروتئین اختصاصی قارچ‌های شاخه گلومرومایکوتا، ترکیبی پایدار، نامحلول در آب و مقاوم به دما می‌باشد که به نظر می‌رسد در غیرپویایی فلزات سنگین نقش دارد (Gonzalez-Chavez *et al*., 2004). گونزالز-چاوز و همکاران (Gonzalez-Chavez *et al*., 2004) بیش از ۴/۳ میلی گرم مس، ۰/۰۸ میلی‌گرم کادمیوم و ۱/۱۲ میلی‌گرم سرب سکوستره به ازای گرم گلومالین استخراج‌شده از خاک آلوده به فلزات سنگین اندازه گیری کردند. آن ها همچنین گلومالین تولیدی توسط قارچ *Gigaspora rosea* را پس از استخراج در شرایط درون‌شیشه‌ای با محلول حاوی مس تیمار کردند، نتایج نشان داد، ۲۸ میلی‌گرم مس به ازای میلی گرم گلومالین سکوستره گردید. همچنین شواهدی وجود دارد که تولید گلومالین تحت شرایط تنش افزایش پیدا می کند (Gadkar & Rillig, 2006; Hammer & Rillig, 2011). دو روش جهت اندازه گیری گلومالین وجود دارد؛ سنجش پروتئین کل واکنش پذیر بردفورد[1] که روش عمومی برای اندازه‌گیری کل پروتئین‌ها می‌باشد (Bradford, 1976) و روش اختصاصی و دقیقِ ایمنی سنجی آنزیمی-غیرمستقیم (الایزا) [2] توسط آنتی بادی مونوکلونال

1- Bradford reactive total protein
2- Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

32B11 کـه برای اولین بـار توســط رایت و همکاران (Wright *et al*., 1996) بر علیه اســپورهای تازه خرد شـده *Glomus intraradices* تهیه شـده اسـت. روش بردفورد برای سـنجش گلومالین اختصاصی نیست، و با توجـه به واکنش متقاطع با پروتئین های غیرگلومالین موجود در عصـاره اسـتخراجی از روش الایزا در شرایط کنترل شده به واسطه حذف ماده آلی و گلومالین بستر کشـت، از طریق شـسـتشـو و اتوکلاو اسـتفاده شـد. بنـابراین، بـا توجه به نقش مهم و کلیدی گلومالین در غیرپویایی فلزات سـنگین، مطالعه‌ای به منظور بررسی اثر همزیســتی قـارچ *Rhizophagus irregularis* در تثبیت ریشــه‌ای کادمیوم توسـط گیاه شـبدر سـفید (*Trifolium repens* L.) و تولید گلومالین در ســطوح مختلف کادمیوم و نقش آن در ســکوســتره ســازی کادمیوم در شرایط گلدانی طراحی گردید.

مواد و روش‌ها

تهیه زادمایه قارچ

قارچ *R. irregularis* همزیسـت با ریشـه‌های تراریخت گیاه هویج از دپارتمان بیولوژی دانشگاه لوند سوئد اخذ گردید. برای تهیه زادمایه قارچی، تحت شرایط استریل زیر هود لامینـار شـش پلیـت حـاوی کشـت درون شـیشـه‌ای ریشـه‌های تراریخت گیاه هویج میکوریزی شـده بـا این قارچ پس از برش به قطعات حدودا یک سـانتی‌متری با شـن اسـتریل-عاری از گلومالین و عبوریـافتـه از الـک ۰/۵ میلی‌متری کـاملا مخلوط گردیدند.

کشت گلدانی

جهت تهیه بسـتر محیط کشـت گلدانی از شـن عبور یافته از الک دو میلی متری استفاده گردید، شستشو با آب تا جایی ادامه یافت که ذرات سـیلت و رس حذف گردید. سـپس، جهت حذف مواد آلی و نیز گلومالین احتمالی موجود در سـطح ذرات شن، ابتدا استخراج با بافرسـیترات سـدیم ۵۰ میلی مولار (pH=۸، اتوکلاو به مدت یک ساعت در دمای ^{0}C ۱۲۱ و فشار ۱/۱ اتمسفر) انجام گرفت (Gonzalez-Chavez *et al*., 2004). سپس، شن هوا خشک شده و به مدت یک ساعت در دمای ^{0}C ۱۲۱ اتوکلاو گردید. شن استریل عاری از گلومالین در گلدان های ۱۵۰۰ گرم به قطر دهانه ۱۵سانتی متر قرار گرفـت. از بذرهای گیاه شـبدر سـفید (*Trifolium repens* L.)، تهیه شـده از بانک ژن موسـسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، به عنوان گیاه میزبان همزیست بـا قـارچ *R. irregularis* اسـتفـاده گردید. به منظور زدودن آلودگی های سـطحی بذرها بعد از چندین بار شستشو با آب مقطر استریل و غوطه ورسازی در اتانول ۷۰٪ (حجمی/حجمی) بـه مـدت دو دقیقـه، بـه داخل محلول هیپوکلریت ۰/۵ درصـد انتقال یافتند و بعد از ده دقیقـه، حـدود ده بـار با آب مقطر اسـتریل کاملا شـستشو گردیدند (Malekzadeh *et al*., 2016). تعداد ۳۰ عدد بذر گیاه شـبدر سفید کشت گردید به طوری که ۱۰ گرم از زادمایه قارچ *R. irregularis* (تهیه شده مطابق فوق) به صـورت لایه نازک در یک سانتی متری زیر بـذور بـه طور یکنواخـت پخش گردیـد. بعـد از جوانه زنی و اسـتقرار گیاهچه، تعداد آن ها به ۲۰ عدد کاهش یافت. گیاهان در اتاقک رشـد به مدت ۱۶ هفته در شـرایط دوره نوری ۱۶ سـاعت روشنایی (^{0}C ۲۵) و ۸ سـاعت تاریکی (^{0}C ۲۰) نگهداری شـدند و از هفته دوم بعد از جوانه زنی یک روز در میان با محلول غذایی هوگلند (Millner & Kitt, 1992) حاوی سطوح مختلف ۰، ۱۵، ۳۰ و ۴۵ میکرومولار کـادمیوم از منبع نیترات کـادمیوم و حـاوی بـافر MES ۰/۵ میلی مولار برای حفظ pH= ۶/۱ آبیاری شـدند. برای یکسـان‌سـازی اثر نیترات در سایر تیمارها نسبت به تیمار ۴۵ میکرومولار سـرب، نیتروژن به صـورت نیترات سـدیم در مقادیر مسـاوی با نیتروژن اضافه شده به بالاترین سطح سرب، افزوده شـد (Janouskova *et al*., 2005). گیاهان به مدت چهار هفته با محلول غذایی هوگلند حاوی نصـف غلظت فسفر و بعد از آن با محلول غذایی کامل آبیاری شـدند. بعد از سـپری شـدن دوره رشـد، بخش هوایی گیاهان برداشت گردید. بعد از تهیه نمونه از ریشه های تر جهـت اسـتخراج گلومـالین و تعیین درصـد کلنیزاسیون ریشه، باقی مانده ریشه ها و اندام هوایی در دمـای ^{0}C ۷۰ به مدت ۲۴ سـاعت خشـک گردید. رنگ‌آمیزی و تعیین درصـد کلنیزاسـیون میکوریزی با اسـتفـاده از روش تغییر یافته کورمانیک و مک گراو

(Kormanik & McGraw, 1982) انجام شد. جهت هضم نمونه‌های گیاهی از روش تغییر یافته ویلینگ و همکاران (Waling *et al.*, 1989) استفاده گردید، سپس غلظت فسفر به روش رنگ‌سنجی وانادات-مولیبدات (Cottenie, 1980) و غلظت کادمیوم اندام هوایی و ریشه توسط دستگاه جذب اتمی قرائت گردید. برای تعیین کارایی جذب (رابطه ۱)، استخراج (رابطه ۲) و انتقال گیاهی (رابطه ۳) کادمیوم از روابط زیر استفاده شد (Wang *et al.*, 2007):

$$\text{کارآیی جذب گیاهی } (\mu g/g) = \frac{\text{مقدار عنصر جذب‌شده در گیاه}}{\text{وزن خشک ریشه}} \quad (۱)$$

$$\text{کارآیی استخراج گیاهی } (\mu g/g) = \frac{\text{مقدار عنصر جذب‌شده در اندام هوایی}}{\text{وزن خشک ریشه}} \quad (۲)$$

$$\text{کارآیی انتقال گیاهی} = \frac{\text{مقدار عنصر جذب‌شده در اندام هوایی}}{\text{مقدار عنصر جذب‌شده در ریشه}} \quad (۳)$$

سنجش گلومالین و کادمیوم سکوستره شده توسط گلومالین

جهت استخراج گلومالین، نمونه های ریشه در لوله های حاوی سیترات سدیم ۵۰ میلی‌مولار (pH=۸) به مدت یک ساعت در دمای ^{0}C ۱۲۱ و طی سه سیکل متوالی داخل اتوکلاو قرار گرفتند. عصاره رویی حاصل از هر سیکل اتوکلاو بعد از سانتریفوژ به مدت ۱۰ دقیقه در g ×۱۰۰۰۰، با هم ترکیب شدند (Rosier *et al.*, 2006). مقدار گلومالین در یک میلی‌لیتر از عصاره استخراجی با استفاده از روش اصلاح شده هامر و ریلیگ (Hammer & Rillig, 2011) و به وسیله آنتی‌بادی مونوکلونال MAb32B11 اندازه‌گیری شد. سلول هیبریدوما تولید کننده آنتی بادی MAb32B11 از شرکت ATCC (American Type Culture Collection) تهیه گردید. بعد از استخراج گلومالین، ریشه‌ها در دمای^{o}C ۷۰ خشک شده و توزین گشتند و مقدار گلومالین در واحد وزن ریشه خشک محاسبه گردید. بعد از کنار گذاشتن یک میلی لیتر از عصاره استخراجی جهت سنجش گلومالین، باقی مانده عصاره با افزودن آهسته اسید کلریدریک ۱ نرمال در محدوده pH =۲-۲/۵ و سپس با قرار گرفتن روی یخ به مدت ۴۵ دقیقه و سانتریفوژ رسوب پیدا کرد (Nichols & Wright, 2005). بعد از رسوب گلومالین، مقدار فلز سرب متصل شده پس از هضم با اسید نیتریک غلیظ (۶۵٪، Merck) به مدت ۶ ساعت در دمای ۸۰ با استفاده از دستگاه جذب اتمی (SHIMADZU- AA 6300) قرائت گردید.

طرح آزمایشی و تجزیه آماری

کشت گلدانی به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک کامل تصادفی در پنج تکرار اجرا شد. آزمون نرمال بودن توزیع داده‌ها و سپس تجزیه واریانس و مقایسه میانگین داده ها بوسیله آزمون چند دامنه دانکن در سطح معنی داری ۵ درصد، با استفاده از نرم افزار آماری IBM SPSS 22 انجام شد. نمودارها با استفاده از نرم افزار Microsoft Excel رسم شدند.

نتایج و بحث

وزن خشک اندام هوایی و ریشه

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که وزن خشک اندام هوایی و ریشه تحت تاثیر اثرات اصلی قارچ و سطوح مختلف کادمیوم قرار گرفت ولی اثرات متقابل آن ها معنی دار نگردید (جدول ۱). با افزایش سطح کادمیوم وزن خشک اندام هوایی و ریشه به طور معنی دار کاهش یافت و در تمام سطوح کادمیوم کاهش وزن خشک اندام هوایی و ریشه در گیاهان غیرمیکوریزی بیشتر از گیاهان میکوریزی بود. بیشترین و کمترین وزن خشک اندام هوایی در تیمارهای میکوریزی سطح صفر و ۴۵ میکرومولار

کادمیوم، افزایش ۲۸/۴ و ۳۰/۵ درصدی را نسبت به تیمار غیرمیکوریزی در همان سطوح نشان دادند. همچنین، بیشترین و کمترین وزن خشک ریشه در تیمارهای میکوریزی سطح صفر و ۴۵ میکرومولار کادمیوم، افزایش ۲۶ و ۲۶/۹ درصدی را نسبت به تیمارهای غیرمیکوریزی در همان سطوح داشتند (جدول ۲). بنابراین کلنیزاسیون ریشه های گیاه توسط قارچ *R. irregularis* اثر مثبت تغذیه‌ای بر وضعیت رشد گیاه شبدر سفید داشته است. به نظر می‌رسد بهبود تغذیه و تقویت رشد گیاهان میکوریزی در مقایسه با گیاهان غیرمیکوریزی به دلیل انتشار میسلیوم قارچ‌های AM و تشکیل سیستم جذب اضافی و مکمل سیستم ریشه گیاه و احتمالا تولید هورمون‌های رشد گیاه نظیر اکسین و سیتوکینین باشد (Jansa *et al.*, 2011; Feddermann *et al.*, 2010). همچنین افزایش محتوای کلروفیل، افزایش بیان آنزیم‌های فتوسنتزی و در پی آن تولید فرآورده های فتوسنتزی (Wang *et al.*, 2013) و نیز توان بالای جذب و انتقال فسفر به کمک هیف های خارجی قارچ (Liang *et al.*, 2009) می تواند از دیگر دلایل احتمالی افزایش زیتوده در گیاهان میزبان میکوریزی در شرایط آلوده به فلزات سنگین باشد.

جذب فسفر در اندام هوایی و ریشه

با توجه به نتایج جدول تجزیه واریانس داده‌ها، اثر قارچ بر جذب فسفر اندام هوایی و ریشه معنی‌دار گردید (جدول ۱). به طوری که جذب فسفر اندام هوایی و ریشه در گیاهان میکوریزی بیشتر از غیرمیکوریزی بود (جدول ۲). اثر سطوح کادمیوم بر جذب فسفر اندام هوایی معنی‌دار نگردید، در مقابل، اثر سطوح کادمیوم بر جذب فسفر ریشه معنی‌دار بود (جدول ۱). مطابق جدول ۲، مقایسه میانگین مقدار فسفر جذب شده در اندام هوایی گیاهان میکوریزی و غیرمیکوریزی در سطوح مختلف کادمیوم تفاوت معنی‌دار آماری نشان نداد. اثر متقابل قارچ و سطوح کادمیوم نیز بر جذب فسفر اندام هوایی و ریشه معنی دار نگردید (جدول ۱). با افزایش غلظت کادمیوم جذب فسفر در اندام هوایی گیاهان میکوریزی به ترتیب ۳۳/۶، ۲۹/۲، ۳۴/۴ و ۳۴/۸ درصد بیشتر از گیاهان غیرمیکوریزی بود. همچنین مقدار فسفر ریشه گیاهان میکوریزی به ترتیب ۲۹/۶، ۳۳/۶، ۴۱/۲ و ۲۹/۸ درصد بیشتر از گیاهان غیرمیکوریزی بود (جدول ۲). جذب فسفر اندام هوایی با افزایش غلظت کادمیوم تفاوت معنی دار آماری نشان نداد که به احتمال قوی می تواند بیانگر ساز وکار سمیت زدایی کادمیوم از طریق بهبود تغذیه فسفری گیاه باشد که این ساز و کار در گیاهان میکوریزی به واسطه حضور هیف‌های خارج سلولی و افزایش حجم خاک قابل دسترس و نیز ثابت مایکلیس-منتن (k_m) پایین هیف ها بسیار مشهود است. به نظر می‌رسد قارچ میکوریز به طور غیرمستقیم با افزایش جذب فسفر از یک سو و افزایش رشد گیاه از سوی دیگر منجر به کاهش پیامدهای زیانبار فلزات سنگین در گیاه میزبان می‌شود (Gaur & Adholeya, 2004). با توجه به کاهش جذب فسفر ریشه با افزایش غلظت کادمیوم به‌ویژه در سطح ۴۵ میکرومولار کادمیوم، و نیز ببیشترین جذب کادمیوم ریشه در این سطح، به‌نظر می‌رسد ساز وکاری غیر از کمپلکس شدن با فسفات در بخش ریشه‌ای در سمیت‌زدایی کادمیوم نقش داشته باشد.

جذب کادمیوم در اندام هوایی و ریشه

بر اساس جدول تجزیه واریانس داده‌ها، اثر اصلی قارچ و سطوح کادمیوم و اثر متقابل آن‌ها بر جذب کادمیوم اندام هوایی و ریشه معنی‌دار گردید (جدول ۱). کادمیوم جذب شده به اندام هوایی و ریشه در سطوح مختلف کادمیوم و در گیاهان میکوریزی به طور معنی‌داری بیشتر از گیاهان غیرمیکوریزی بود. بیشترین مقدار جذب کادمیوم به اندام هوایی در تیمار میکوریزی سطح ۱۵ میکرومولار کادمیوم بود که اختلاف معنی‌دار آماری با سطح ۴۵ میکرومولار نداشت و به ترتیب افزایش ۴۰/۳ و ۳۳/۴ درصدی نسبت به تیمار غیرمیکوریزی در این سطوح داشتند. بیشترین مقدار جذب کادمیوم به ریشه در تیمار میکوریزی سطح ۴۵ میکرومولار کادمیوم بود که اختلاف معنی‌داری با تیمارهای میکوریزی سطوح دیگر و همچنین تیماهای غیرمیکوریزی در سطوح مختلف کادمیوم نشان داد.

جدول ۱ - تجزیه واریانس اثرات قارچ *R. irregularis* و کادمیوم و اثرات متقابل آن‌ها بر وزن خشک، جذب فسفر و کادمیوم اندام هوایی و ریشه، کارآیی جذب، استخراج و انتقال کادمیوم در شبدر سفید

Table 1- Analysis of variance for *R. irregularis*, Cd and their interactive effects on shoot and root dry weights, P and shoot and root Cd uptakes, and uptake, extraction and translocation efficiency of Cd by white clover

منابع تغییرات (Source of variation)	درجه آزادی (Degree of freedom)	میانگین مربعات (Mean Square)								
		وزن خشک (Dry weight)		جذب فسفر (P uptake)		جذب کادمیوم (Cd uptake)			کادمیوم (Cd)	
		اندام هوایی (Shoot)	ریشه (Root)	اندام هوایی (Shoot)	ریشه (Root)	اندام هوایی (Shoot)	ریشه (Root)	کارآیی جذب (Uptake efficiency)	کارآیی استخراج (Extraction efficiency)	کارآیی انتقال (Translocation efficiency)
بلوک (Block)	4	0.018^{ns}	0.042^{*}	5.25^{ns}	2.66^{*}	269.51^{ns}	2742.26^{ns}	1350.44^{*}	0.657^{ns}	0.172^{ns}
قارچ (F)	1	1.72^{***}	0.747^{***}	465.27^{***}	60^{***}	22182.92^{***}	96172.1^{***}	7211.99^{**}	0.782^{ns}	2^{ns}
کادمیوم (Cd)	3	0.28^{***}	0.251^{***}	9.50^{ns}	11.23^{***}	41142.71^{***}	113715.81^{***}	10724.09^{***}	114.93^{***}	15.87^{***}
قارچ×کادمیوم (F×Cd)	3	0.001^{ns}	0.009^{ns}	0.813^{ns}	1.02^{ns}	2174.79^{**}	11346.8^{5***}	1967.86^{*}	0.361^{ns}	2.88^{*}
خطا (Error)	28	0.031	0.011	6.47	0.783	408.67	1160.18	486.03	0.460	0.950

^{ns}، *، ** و *** به ترتیب غیر معنی‌دار و معنی داری در سطح احتمال ۵، ۱ و ۰/۱ درصد

ns: not significant, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001

جدول ۲- وزن خشک اندام هوایی و ریشه، جذب فسفر و کادمیوم اندام هوایی و ریشه و کارآیی جذب، استخراج و انتقال گیاهی کادمیوم در گیاه شبدر سفید همزیست با قارچ *R. irregularis* در سطوح مختلف کادمیوم.

and root dry weights, P and Cd uptakes and uptake, extraction and translocation Table 2- Shoot efficiency of Cd by white clover colonized by *R. irregularis* at different levels of Cd.

غلظت کادمیوم (میکرومولار) Cd concentration (µM)								
قارچ میکوریزی Mycorhizal Fungus				شاهد (بدون قارچ میکوریزی) Blank (Non-mycorhizal Fungus)				
45	30	15	0	45	30	15	0	
5.61^{cd}	6.54^{bc}	7.14^{ab}	7.73^{a}	3.91^{e}	4.55^{de}	5.11^{d}	5.54^{cd}	وزن خشک اندام هوایی (گرم/ گلدان) Shoot dry weight (g pot^{-1})
1.67^{d}	2.43^{ab}	2.66^{a}	2.84^{a}	1.22^{e}	1.51^{de}	1.87^{cd}	2.09^{bc}	وزن خشک ریشه (گرم/ گلدان) Root dry weight (g pot^{-1})
19.16^{a}	21.32^{a}	20.83^{a}	21.45^{a}	12.49^{b}	13.99^{b}	14.76^{b}	14.25^{b}	جذب فسفر اندام هوایی (میلی‌گرم/گلدان) Shoot P uptake (mg pot^{-1})
5.36^{bc}	7.52^{a}	8.08^{a}	8.07^{a}	3.76^{d}	4.42^{cd}	5.37^{bc}	5.68^{b}	جذب فسفر ریشه (میلی‌گرم/گلدان) Root P uptake (mg pot^{-1})
164.18^{ab}	154.58^{b}	185.64^{a}	13.1^{d}	109.37^{c}	101.12^{c}	110.86^{c}	7.76^{d}	جذب کادمیوم اندام هوایی (میکروگرم/گلدان) Shoot Cd uptake (μg pot^{-1})
311.90^{a}	261.79^{b}	259.66^{b}	2.47^{d}	162.58^{c}	126.95^{c}	151.90^{c}	2.11^{d}	جذب کادمیوم ریشه (میکروگرم/گلدان) Root Cd uptake (μg pot^{-1})
288.61^{a}	171.62^{c}	168.22^{c}	5.57^{d}	222^{b}	153.57^{c}	146.24^{c}	4.79^{d}	کارآیی جذب کادمیوم (میکروگرم/گرم وزن خشک) Cd uptake efficiency (μg g^{-1} DW)
101.07^{a}	63.64^{b}	69.49^{b}	4.85^{c}	89.62^{a}	67.96^{b}	61.57^{b}	3.7^{c}	کارآیی استخراج کادمیوم (میکروگرم/گرم وزن خشک) Cd extraction efficiency (μg g^{-1} DW)
0.538^{c}	0.626^{c}	0.714^{c}	23.43^{a}	0.688^{c}	0.886^{c}	0.756^{c}	6.51^{b}	کارایی انتقال کادمیوم Cd translocation efficiency

میانگین‌های دارای حداقل یک حرف لاتین مشترک در هر ردیف، فاقد اختلاف معنی‌دار به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد.

Means followed by the same superscript letters at each row are not significantly different according to Duncan's multiple range test at the level $p < 0.05$

به طوری که افزایش ۴۷/۹ درصدی نسبت به گیاهان غیرمیکوریزی سطح ۴۵ میکرومولار کادمیوم داشت (جدول ۲). بنابراین به طور میانگین افزایش ۲ برابری جذب کادمیوم در ریشه‌های کلنیزه شده در مقایسه با ریشه های غیرمیکوریزی رخ داده است. پیش‌بینی می‌گردد سهم جذب بیشتر کادمیوم در ریشه‌های میکوریزی نسبت به غیرمیکوریزی در اندام های قارچی روی داده است. به نظر می‌رسد با توجه به کارآیی جذب گیاهی بیشتر در گیاهان میکوریزی نسبت به غیرمیکوریز، با افزایش غلظت کادمیوم، جذب فعال نیز افزایش می‌یابد و سکوستره‌سازی کادمیوم بیشتر در ریشه‌ها قابلیت دسترسی فلز و انتقال آن به اندام هوایی را می‌کاهد. بنابراین محتمل است که هر دو فرآیند جذب فعال و سکوستره سازی به طور همزمان یا مستقل از هم روی داده باشد (Lombi *et al.*, 2001). تفاوت بارز گیاهان میکوریزی و غیرمیکوریزی در رشد، جذب و تحمل کادمیوم در سطوح مشابه کادمیوم، بیانگر نقش موثر کلنیزاسیون میکوریزی در افزایش بردباری گیاه میزبان و بهبود رشد و در پی آن جذب گیاهی کادمیوم بیشتر در مقایسه با گیاهان

غیرمیکوریزی بود. به نظر می‌رسد قارچ *R. irregularis* آستانه تحمل گیاه به سمیت کادمیوم را افزایش داده استاین موضوع می تواند در ارتباط با واکنش های فیزیولوژیک در سطح تماس گیاه-قارچ، بیان ژن های خاص یا کاهش بیان آن ها، تغییر الگوی توزیع فلزات سنگین در اندام‌های گیاه، ساز و کارهای غیرمستقیم شامل جذب بیشتر عناصر فسفر و آهن، افزایش عملکرد گیاه و یا ساز وکارهای مستقیم، شامل جذب فلز در سطح یا درون اندام های قارچی، کلاته شدن فلز در سیتوپلاسم به وسیله متالوتیونین‌ها، سکوستره شدن فلزات در گرانول های پلی فسفات داخل واکوئل هاست (Gohre & Paszkowski, 2006). همچنین توانایی پروتئین های دیواره سلولی قارچ میکوریزی نظیر گلومالین در کمپلکس کردن فلزات سنگین از جمله این ساز و کارها می‌باشد (Gonzalez-Chavez *et al*., 2004).

کارایی جذب، استخراج و انتقال گیاهی کادمیوم

اثر اصلی قارچ و سطوح کادمیوم و نیز اثر متقابل آن ها بر کارآیی جذب گیاهی کادمیوم معنی دار گردید (جدول ۱). به طوری که با افزایش سطح کادمیوم، کارآیی جذب گیاهی کادمیوم نیز به طور معنی داری افزایش یافت. افزایش به ترتیب ۱۳/۱، ۱۰/۵ و ۲۳/۱ درصدی کارآیی جذب گیاهی در گیاهان میکوریزی نسبت به گیاهان غیرمیکوریزی همراه با افزایش غلظت کادمیوم (بویژه در سطح ۴۵ میکرومولار کادمیوم)، بیانگر تحمل بیشتر گیاهان میکوریزی نسبت به غیرمیکوریزی بود (جدول ۲).

اثر قارچ و اثر متقابل قارچ و کادمیوم بر کارآیی استخراج گیاهی معنی‌دار نبود (جدول ۱). اثر سطوح کادمیوم بر این صفت معنی دار گردید (جدول ۱). به طوری که با افزایش سطح کادمیوم کارآیی استخراج گیاهی افزایش یافت. در سطوح مختلف کادمیوم، عدم تفاوت معنی‌دار بین گیاهان میکوریزی و غیرمیکوریزی در استخراج گیاهی کادمیوم با در نظر گرفتن کارآیی جذب گیاهی بیشتر در گیاهان میکوریزی نسبت به غیرمیکوریزی بیانگر تجمع کادمیوم بیشتر در ریشه گیاهان میکوریزی نسبت به گیاهان غیرمیکوریزی می باشد. نتایج مربوط به داده های جذب کادمیوم در ریشه نیز موید این مطلب می‌باشند (جدول ۲).

اثر اصلی قارچ بر کارآیی انتقال گیاهی کادمیوم معنی دار نبود. ولی اثر اصلی سطوح کادمیوم و اثر متقابل قارچ و کادمیوم بر این صفت معنی دار گردید (جدول ۱). بیشترین کارآیی انتقال گیاهی کادمیوم در سطح صفر کادمیوم و در گیاه میکوریزی بود و با افزایش غلظت کادمیوم از میزان آن به طور معنی دار کاسته شد (جدول ۲). کاهش کارآیی انتقال گیاهی کادمیوم از ریشه به اندام هوایی در سطوح آلودگی کادمیوم در مقایسه با سطح شاهد نشان می دهد که گیاه ساز وکار تجمع کادمیوم بیشتر در ریشه را در مقابل انتقال آن به اندام هوایی برگزیده است. بنابراین با توجه به جذب کادمیوم بیشتر در ریشه گیاهان میکوریزی و نیز کارآیی جذب گیاهی بیشتر در آن ها نسبت به گیاهان غیرمیکوریزی، می توان اظهار داشت گیاهان میکوریزی کادمیوم بیشتری را در مقایسه با گیاهان غیرمیکوریزی در ریشه می‌اندوزند.

درصد کلنیزاسیون ریشه

بر اساس نتایج جدول تجزیه واریانس داده ها، اثر سطوح کادمیوم بر درصد کلنیزاسیون ریشه معنی دار گردید (جدول ۳). درصد کلنیزاسیون ریشه با افزایش غلظت کادمیوم تا سطح ۳۰ میکرومولار کادمیوم به طور معنی دار افزایش یافت و سپس در سطح ۴۵ میکرومولار کاهش یافت. کمترین درصد کلنیزاسیون ریشه (۶۰/۶۹ ٪) در تیمار شاهد مشاهده گردید (شکل A-۱). به نظر می‌رسد افزایش درصد کلنیزاسیون ریشه همراه با افزایش غلظت کادمیوم نشان دهنده افزایش ترجیح گیاه جهت برقراری همزیستی در شرایط تنش فلزی باشد (Audet & Charest, 2006)، از سوی دیگر کاهش این پارامتر در بالاترین غلظت کادمیوم احتمالا ناشی از افزایش سمیت کادمیوم باشد (Pawlowska & Charvat, 2004).

جدول ۳- تجزیه واریانس اثر سطوح کادمیوم بر درصد کلنیزاسیون ریشه، تولید گلومالین و کادمیوم سکوستره شده توسط گلومالین در همزیستی گیاه شبدر سفید با قارچ *R. irregularis*

Table 3- Analysis of variance for effect of Cd levels on root colonization, glomalin production and Cd-sequestrated by glomalin in white clover colonized by *R. irregularis*

منابع تغییرات (Source of variation)	درجه آزادی (Degree of freedom)	میانگین مربعات (Mean Square)		
		کلنیزاسیون ریشه (Root colonization)	گلومالین واکنش‌پذیر با آنتی‌بادی (Immunoreactive glomalin)	کادمیوم سکوسترهشده با گلومالین (Cd-sequestrated by glomalin)
بلوک (Block)	4	0.064 ns	0.013 ns	67.38 ns
کادمیوم (Cd)	3	3.77***	1.73***	3479.79***
خطا (Error)	12	0.027	0.011	38.44

ns، *، ** و *** به ترتیب غیر معنی دار و معنی داری در سطح احتمال ۵، ۱ و ۰/۱ درصد

ns: not significant, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001

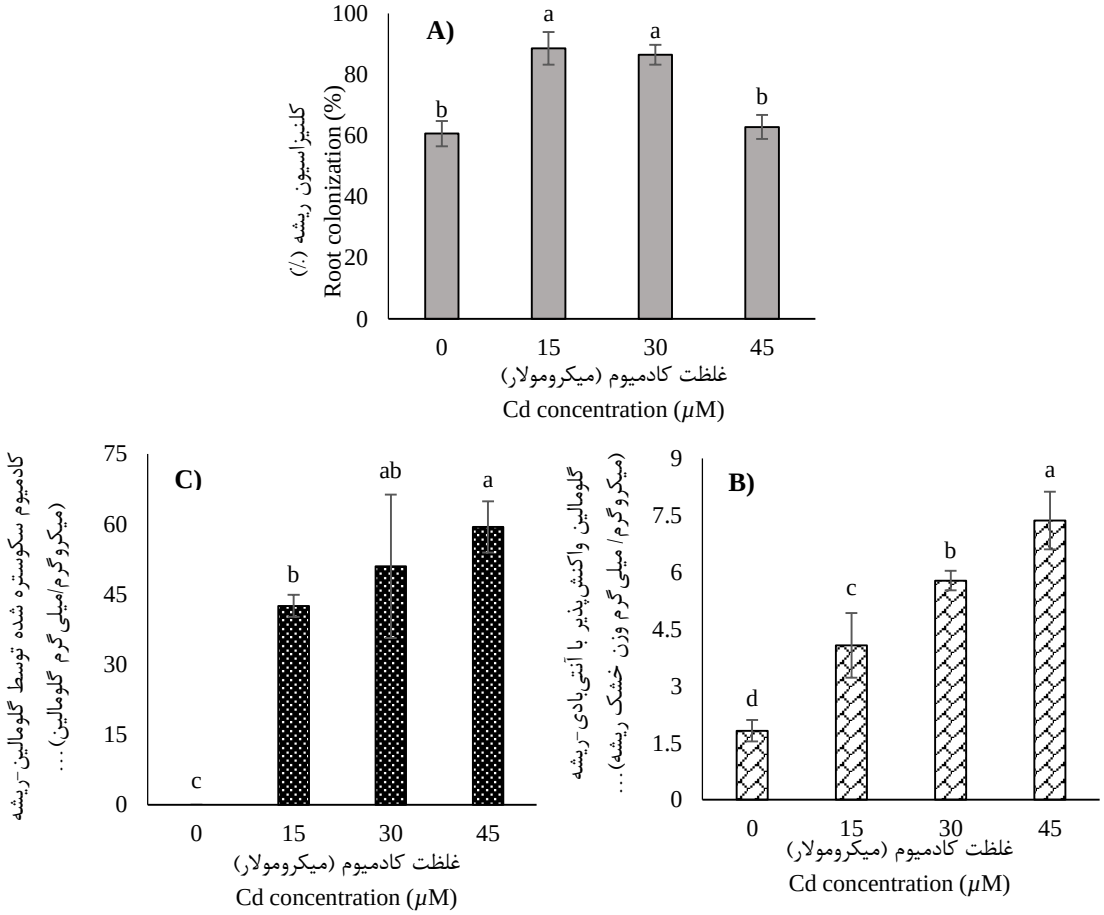
تولید گلومالین واکنش‌پذیر با آنتی‌بادی

اثر سطوح مختلف کادمیوم بر تولید گلومالین کل واکنش‌پذیر با آنتی‌بادی-ریشه معنی‌دار گردید (جدول ۳). به طوری که با افزایش غلظت کادمیوم، گلومالین کل واکنش‌پذیر با آنتی‌بادی به طور مشخصی افزایش یافت. بیشترین مقدار در سطح ۴۵ میکرومولار کادمیوم (۷/۳۷ میکروگرم/گرم وزن خشک ریشه) بود که با دیگر سطوح کادمیوم اختلاف معنی‌دار داشت. کمترین تولید گلومالین واکنش پذیر با آنتی بادی در تیمار شاهد (۱/۸۲ میکروگرم/میلی گرم وزن خشک ریشه) مشاهده گردید (شکل B-۱). افزایش تولید گلومالین توسط قارچ همزیست در ریشه های کلنیزه شده با افزایش غلظت کادمیوم (به ترتیب افزایش ۵۵/۳، ۶۸/۵ و ۷۵/۳ درصدی نسبت به سطح صفر) می‌تواند بیانگر نقش اولیه و اصلی آن در حیات قارچ و گیاه همزیست به‌ویژه تحت شرایط تنش باشد. زیرا بیشتر مطالعات انجام یافته روی گلومالین در زمینه اثرات آن در خاک، به عنوان منبع ذخیره کربن و نیتروژن و نقش آن در پایداری خاکدانه ها می باشد (Vaidya *et al*., 2011; Wright *et al*., 1996). در معدود مطالعات پیشین گلومالین به عنوان پروتئین القایی تنش پیشنهاد شده بود که وظیفه حفاظتی برای قارچ‌های AM ایفا می‌کند (Gadkar & Rillig, 2006)، نتایج مطالعه حاضر نیز گواهی بر این مطلب می باشد. گاکار و ریلیگ (Gadkar, & Rillig, 2006) گلومالین را به عنوان همولوگ پروتئین شوک حرارتی ۶۰ معرفی کردند. از جمله ساز وکار های دفاعی گیاه تحت شرایط تنش تولید پروتئین‌های شوک حرارتی می‌باشد. این پروتئین‌ها معمولا دارای چند کارکرد می‌باشند و بیان آن ها تحت شرایط تنش فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی افزایش می یابد. یکی از کارکردهای مهم آن‌ها فعالیت چاپرونی [1] می‌باشد به طوری که از تغییر شکل پروتئین‌های ضروری و مهم مسیرهای متابولیکی حیاتی ممانعت به عمل می آورند (Ferreira *et al*., 2005). بنابراین گلومالین به عنوان مشابه پروتئین‌های شوک حرارتی ۶۰، با بیشترین بیان در میسلیوم های قارچ AM می‌تواند به عنوان ساز وکار حفاظتی جهت افزایش تحمل و بقا گیاهان میکوریزی تحت شرایط تنش کادمیوم در غلظت ۴ تا ۶/۵ برابری کادمیوم ریشه در مقایسه با اندام هوایی باشد. پورین و ریلیگ (Purin & Rillig, 2007) استدلال کردند که گلومالین توسط قارچ های AM در جهت حفاظت آن ها تولید می گردد و نقش های کارکردی گلومالین در خاک به عنوان نقش ثانویه بوده و به طور ضمنی روی می‌دهد. قابل تصور است که گلومالین نقش حفاظتی در حیات قارچ ایفا کند، چون که قارچ AM بسیاری از منابع (به طور عمده کربن و نیتروژن) را به تولید گلومالین اختصاص می‌دهد (Rillig & Steinberg, 2002).

1 -Chaperone activity

مقدار کادمیوم سکوستره شده با گلومالین

اثر سطوح کادمیوم بر سکوستره شدن توسط گلومالین-ریشه معنی دار بود (جدول ۳). با افزایش غلظت کادمیوم، مقدار کادمیوم سکوستره شده با گلومالین-ریشه به طور معنی دار افزایش یافت. بیشترین کادمیوم سکوستره شده توسط گلومالین-ریشه با مقدار ۵۹/۳۶ (میکروگرم/میلی گرم گلومالین) در تیمار ۴۵ میکرومولار کادمیوم بود که به جزء سطح ۳۰ میکرومولار با دیگر سطوح تفاوت معنی‌دار داشت (شکل C-۱). با توجه به افزایش مقدار کادمیوم سکوستره شده توسط گلومالین با افزایش غلظت کادمیوم می توان انتظار داشت ظرفیت گلومالین در سکوستره سازی کادمیوم بیش از مقادیر گزارش شده باشد. گونزالز-چاوز و همکاران (Gonzalez-Chavez *et al.*, 2004) اظهار داشتند گلومالین تولیدی توسط ریشه های میکوریزی سورگوم همزیست با *G. mosseae* در کاهش قابلیت دسترسی زیستی و سمیت مس نقش فعالی دارد. آن ها همچنین مشاهده کردند که با افزایش سمیت ناشی از فلزات سنگین، تولید گلومالین توسط قارچ AM افزایش پیدا می کند. بنابراین گلومالین به واسطه حضور در دیواره هیف و اسپور قارچ های AM، ریشه‌های کلنیزه شده و نیز محیط رشد آن در سکوستره سازی کادمیوم نقش ایفا می کند و می‌تواند به عنوان مولکول موثر در غیرپویایی و سمیت‌زدایی کادمیوم در ریشه گیاهان میکوریزی باشد.



شکل ۱- کلنیزاسیون ریشه (A)، مقدار گلومالین تولیدی (B) و کادمیوم سکوستره شده توسط گلومالین (C) در کشت گلدانی گیاه شبدر سفید همزیست با قارچ *R. irregularis* در سطوح مختلف کادمیوم. میانگین‌های دارای حداقل یک حرف لاتین مشترک، فاقد اختلاف معنی‌دار به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد.

Figure 1- Root colonization (A), glomalin production (B) and Cd-sequestrated by glomalin (C) in pot culture of white clover colonized by *R. irregularis* at different levels of Cd. Means followed by the same superscript letters are not significantly different according to Duncan's multiple range test at the level $p < 0.05$

نتیجه‌گیری کلی

شبدر سفید در شرایط آلوده به کادمیوم در تثبیت ریشه‌ای کادمیوم موثرتر می‌باشد. اما سهم تثبیت ریشه‌ای کادمیوم در گیاهان همزیست با قارچ *R. irregularis* بیشتر از گیاهان غیرمیکوریزی بود. هیف‌های خارج سلولی با افزایش جذب کادمیوم به داخل ریشه و سکوسترەسازی آن در اندام های قارچی، انتقال آن به اندام هوایی را می‌کاهند. همچنین از طریق بهبود تغذیه فسفری و رشد گیاه باعث کاهش اثرات منفی آن بر رشد گیاه می‌گردند. افزایش جذب فلزات ضروری و غیر ضروری توسط گیاهان میکوریزی را به وسیله ساز و کارهایی نظیر افزایش سطح جذب ریشه، حجم خاک قابل دسترس و کارآیی انتقال هیفی می‌توان توضیح داد. افزایش تحمل گیاهان میکوریزی علی رغم کارآیی جذب گیاهی بیشتر در مقایسه با گیاهان غیرمیکوریزی که سهم بیشتر جذب کادمیوم نیز به ریشه اختصاص دارد، می تواند به دلیل سکوسترەسازی توسط ترکیبات دیواره سلولی اندام‌های قارچی باشد. تولید گلومالین به عنوان ترکیب مهم و موثر دیواره اسپورها و هیف‌های قارچ AM به عنوان پروتئین شوک القایی تنش با افزایش غلظت کادمیوم افزایش یافت. بنابراین تولید گلومالین به عنوان ساز و کار محافظتی گیاه هم از طریق عمل در نقش پروتئین شوک حرارتی باعث کاهش آسیب‌های سیتوزولی ناشی از کادمیوم از طریق ممانعت در تغییر شکل پروتئین ها می‌گردد، همچنین با کمپلکس کردن آن باعث کاهش قابلیت دسترسی زیستی و خطر سمیت آن برای گیاه میزبان در غلظت‌های بالا می‌گردد. بنابراین، گلومالین نقش کلیدی و مهمی را در تثبیت ریشه‌ای کادمیوم توسط گیاهان میکوریزی ایفا می‌کند.

References

Audet P., and Charest C. 2006. Effects of AM colonization on ‘wild tobacco’ grown in zinc contaminated soil. *Mycorrhiza*, 16: 277-283.

Bradford M.M. 1976. A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.

Bressano M., Curetti M., Giachero L., Gil S.V., Cabello M., March G., Ducasse D.A., and Luna C.M. 2010. Mycorrhizal fungi symbiosis as a strategy against oxidative stress in soybean plants. *Journal of Plant Physiology*, 167(18): 1622- 1626.

Cottenie A. 1980. Methods of Plant Analysis. In: Soil and Plant Testing. *FAO Soils Bulletin*, NO 38/2, pp. 94-100.

Feddermann N., Roger F., Boller T., and Elfstrand M. 2010. Functional diversity in arbuscular mycorrhiza – the role of gene expression, phosphorous nutrition and symbiotic efficiency. *Fungal Ecology*, 3: 1-8.

Ferreira A.S., Totola M.R., Kasuya M.C.M., Araujo E.F., and Borges A.C. 2005. Small heat shock proteins in the development of thermotolerance in *Pisolithu* ssp. *Journal of Thermal Biology*, 30: 595–602.

Gadkar V., and Rillig M.C. 2006. The arbuscular mycorrhizal fungal protein glomalin is a putative homolog of heat shock protein 60. *FEMS Microbiology Letters*, 263: 93-101.

Gaur A., and Adholeya A. 2004. Prospects of arbuscular mycorrhizal fungi in phytoremediation of heavy metal contaminated soils. *Current Science*, 86: 528-534.

Gohre V., and Paszkowski U. 2006. Contribution of the arbuscular mycorrhizal symbiosis to heavy metal phytoremediation. *Planta*, 223: 1115–1122.

Gonzalez-Chavez M.C., Carrillo-Gonzalez R., Wright S.F., and Nichols K.A. 2004. The role of glomalin, a protein produced by arbuscular mycorrhizal fungi, in sequestering potentially toxic elements. *Environmental Pollution*, 130: 317-323.

Hammer E.C., and Rillig M.C. 2011. The Influence of different stresses on glomalin levels in an arbuscular mycorrhizal fungus- salinity increases glomalin content. *PLoS One*, 6(12): 1-5.

Janouskova M., Pavlikova D., Macek T., and Vosatka M. 2005. Arbuscular mycorrhiza decreases cadmium phytoextraction by transgenic tobacco with inserted metallothionein. *Plant and Soil*, 272: 29–40.

Jansa J. Finlay R., Wallander H., Smith F., and Smith E. 2011. Role of mycorrhizal symbioses in phosphorus cycling. *Soil Biology*, 100: 137-168.

Kabata-Pendias A. 2011. Trace Elements in Soils and Plants, 4td edition. CRC Press/Taylor and Francis, Boca Raton, USA, 548p.

Kormanik P.P., and McGraw A.C. 1982. Quantification of vesicular-arbuscular mycorrhizae in plant roots. In: Schenck, N.C. (Eds.), Methods and Principles of Mycorrhizal Research. *American Phytopathological Society*, Saint Paul, MN, pp. 37-45.

Liang C., Li T., Xiao Y., and Liu M. 2009. Effects of inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi on maize grown in multi-metal contaminated soils. *International Journal of Phytoremediation*, 11: 692-703.

Lombi E., Wenzel W.W., Gobran G.R., and Adriano D.C. 2001. Dependency of metals on indigenous and induced rhizosphere processes: A review. In: Gobran G.R., Wenzel W.W., and Lombi E. (Eds.), Trace Elements in the Rhizopshere. *CRC Press*, Boca Raton, Florida, pp, 3-24.

Malekzadeh E., Aliasgharzad N., Majidi J., Abdolalizadeh J., and Aghebati-Maleki L. 2016. Contribution of glomalin to Pb sequestration by arbuscular mycorrhizal fungus in a sand culture system with clover plant. *European Journal of Soil Biology*, 74: 45-51.

Millner P.D., and Kitt D.G. 1992. The Beltsville method for soilless production of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*, 2: 9-15.

Mulligan C.N., Yong R.N., and Gibbs B.F. 2001. Remediation technologies for metal-contaminated soils and groundwater: an evaluation. *Engineering Geology*, 60: 193–207.

Nichols K.A., and Wright S.F. 2005. Comparison of glomalin and humic acid in eight native United State soils. *Soil Science*, 170: 985-997.

Pawlowska T.E., and Charvat I. 2004. Heavy-metal stress and developmental patterns of arbuscular mycorrhizal fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 6643-6649.

Purin S., and Rillig M.C. 2007. The arbuscular mycorrhizal fungal protein glomalin: Limitations, progress, and a new hypothesis for its function. *Pedobiologia*, 51: 123-130.

Rillig M.C., and Steinberg P.D. 2002. Glomalin production by an arbuscular mycorrhizal fungus, a mechanism of habitat modification? *Soil Biology and Biochemistry*, 34: 1371-1374.

Rosier C.L., Hoye A.T., and Rillig M.C. 2006. Glomalin-related soil protein: Assessment of current detection and qualification tools. *Soil Biology and Biochemistry*, 38: 2205-2211.

Shevyakova N.I., Il'ina E.N., and Kuznetsov V.V. 2008. Polyamines increase plant potential for phytoremediation of soils polluted with heavy metals. *Doklady Biological Sciences*, 423: 457–460.

Soleimani M., Akbar S., and Hajabbasi M.A. 2011. Enhancing Phytoremediation Efficiency in Response to Environmetal Pollution Stress. In: Vasanthaiah, H.K.N., and Kambiranda, D.M. (Eds.), Plants and Environment. *In Tech-Open Access Publisher*, pp, 1-14.

Vaidya G.S., Rillig M.C and Wallander H. 2011. The role of glomalin in soil erosion. *Scientific World*, 9(9): 82-85.

Waling I., Vark W.V., Houba V.J.G., and Vanderlee J.J. 1989. Soil and plant analysis, a series of syllabi: Part 7- Plant Analysis Procedures. Wageningen Agricultural University, Netherlands.

Wang F.Y., Lin X.G., and Yin R. 2007. Inoculation with arbuscular mycorrhizal fungus *Acaulospora mellea* decrease Cu phytoextraction by maize from Cu-contaminated soil. *Pedobiologia*, 51: 99-109.

Wang Z.H., Yuan K., and Yang L. 2013. Response of maize leaf proteins induced/modulated by AM mycorrhizal inoculation and (or) arsenic stress. *China Agriculture Science*, 46(18): 3758-3767.

Wright S.F., Franke-Snyder M., Morton J.B., and Upadhyaya A. 1996. Time-course study and partial characterization of a protein on hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi during active colonization of roots. *Plant and Soil*, 181: 193-203.

Contribution of Glomalin Produced by *Rhizophagus irregularis* to Root Stabilization of Cd by White Clover (*Trifolium repens* L.)

Elham Malekzadeh[1*], Nasser Aliasgharzad[2], Jafar Majidi[3]

(Received: April 2016 Accepted: September 2016)

Abstract

Root stabilization of heavy metals (HMs) by glomalin is one of the protective mechanisms of mycorrhizal fungi in response to metal stress. Considering this hypothesize, the contribution of *Rhizophagus irregularis* in symbiosis with white clover (*Trifolium repens* L.) to root stabilization of Cd, glomalin production by the fungus, and Cd sequestration was investigated. A pot culture experiment was conducted as completely randomized block design by two factors including arbuscular mycorrhizal fungus (inoculated with *R. irregularis* and non-inoculated) and four levels of Cd^{+2} (0, 15, 30 and 45 µM) with five replications. The results showed that the root colonization by *R. irregularis* improved phosphorus nutrition, shoot and root dry weights compared to the non-mycorrhizal plants. With increasing of Cd concentration, plant uptake and extraction efficiency of Cd increased but Cd translocation efficiency decreased. Uptake efficiency of Cd in mycorrhizal plants was higher than non-mycorrhizal ones. Translocation efficiency of Cd in mycorrhizal plants was lower than non-mycorrhizal ones, although this factor showed no significant difference between mycorrhizal and non-mycorrhizal plants. Moreover, Cd uptake by roots was higher than shoots and this portion in mycorrhizal plants was higher than non-mycorrhizal ones. Therefore, mycorrhizal clover plants had higher contribution to root stabilization of Cd. Glomalin production and its Cd sequestration capacity was significantly increased as Cd concentration increased. As a result, higher contribution of mycorrhizal roots to Cd uptake can be due to sequestration of Cd in fungal structures inside the roots. Consequently, glomalin could be considered as an induced-stress protein as well as a vital and effective component of spore and hyphal cell wall of the fungus. Glomalin as a heat shock protein, has important role in Cd root stabilization via protection of host plant from toxic effects of Cd and reduction of the Cd bioavailability.

Keywords: Arbuscular mycorrhizal fungi, Cadmium, ELISA, Glomalin, Phytoremediation

1-PhD Graduate of Soil Biology and Biotechnology, Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz
2-Professor of Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz
3-Professor of Department of Immunology, Faculty of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences
[*] Corresponding author E-mail: malekzadeh.elham@gmail.com