



بررسی تأثیر گломالین در تثبیت ریشه‌های سرب در گیاه شبدر همزیست با قارچ رایزوفگوس ایرگولاریز

*الهام ملک‌زاده^۱ و ناصر علی‌اصغرزاد^۲

^۱دانش‌آموخته دکتری دانشگاه تبریز و استادیار گروه علوم خاک، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان،

^۲استاد گروه علوم خاک، دانشگاه تبریز

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۰/۱۰؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۱/۱۳

چکیده

سابقه و هدف: تثبیت فلزهای سمی در ریشه گیاهان میکوریزی از جمله سازوکارهای حفاظتی قارچ میکوریزا همزیست در پاسخ به تنش فلزی است. نقش گломالین به‌عنوان گلیکوپروتئین اختصاصی دیواره هیف و اسپور قارچ‌های آربوسکولار میکوریزا (Arbuscular Mycorrhizal Fungi) در ناپویایی فلزهای سمی و کاهش پیامدهای تنش بر گیاه میزبان می‌تواند قابل‌ملاحظه باشد. با این پیش‌فرض هدف این مطالعه بررسی نقش گломالین تولیدی توسط قارچ رایزوفگوس ایرگولاریز همزیست با گیاه شبدر در تثبیت ریشه‌های سرب بود.

مواد و روش‌ها: آزمایشی گلدانی در آرایش فاکتوریل در قالب طرح بلوک کامل تصادفی شاکل دو فاکتور قارچ (با و بدون قارچ *Rhizophagus irregularis*) و سطوح سرب (۰، ۱۵۰، ۳۰۰ و ۴۵۰ میکرومولار Pb^{+2}) در پنج تکرار طراحی گردید. جهت استخراج گломالین، نمونه‌های ریشه با بافر سترات سدیم ۵۰ میلی‌مولار (pH=۸) به مدت یک ساعت در دمای $121^{\circ}C$ و طی سه چرخه پی در پی اتوکلاو شدند. غلظت گломالین در عصاره استخراجی با استفاده از روش الیزا توسط آنتی‌بادی مونوکلونال ۳۲B۱۱ تعیین گردید. بعد از رسوب گломالین، مقدار سرب کمپلکس شده پس از هضم با اسید نیتریک غلیظ اندازه‌گیری شد. وزن خشک اندام‌هوایی و ریشه، درصد کلنیزاسیون ریشه، مقدار فسفر و سرب اندام‌هوایی و ریشه و کارایی جذب، استخراج و انتقال سرب مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: با افزایش سطح سرب، وزن خشک اندام‌هوایی و ریشه گیاهان میکوریزی و غیرمیکوریزی کاهش یافت. وزن خشک اندام‌هوایی و ریشه در سطوح ۱۵۰، ۳۰۰ و ۴۵۰ میکرومولار سرب، به ترتیب کاهش ۱۱/۲، ۱۲/۹، ۱۸/۳ و ۷/۵، ۱۸/۱ و ۳۶/۷ درصدی نسبت به سطح صفر سرب داشتند. وزن خشک اندام‌هوایی و ریشه در گیاهان میکوریزی به ترتیب ۲۴/۹ و ۳۴/۲ درصد بیش‌تر از گیاهان غیرمیکوریزی بود. اثر قارچ بر جذب فسفر اندام‌هوایی و ریشه معنی‌دار گردید، جذب فسفر اندام‌هوایی و ریشه در گیاهان میکوریزی به ترتیب ۳۲/۲ و ۴۵/۸ درصد بیش‌تر از گیاهان غیرمیکوریزی بود. سرب جذب شده در اندام‌هوایی و ریشه در سطوح مختلف سرب و در گیاهان میکوریزی به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از گیاهان غیرمیکوریزی بود. بیش‌ترین مقدار جذب سرب در اندام‌هوایی و ریشه، در تیمار میکوریزی سطح ۴۵۰ میکرومولار سرب بود که افزایش ۶/۵٪ و ۸۰/۷ درصدی نسبت به تیمار غیرمیکوریزی در این

* مسئول مکاتبه: malekzadeh.elham@gmail.com

سطح داشتند. در سطوح ۱۵۰، ۳۰۰ و ۴۵۰ میکرومولار سرب، کارایی جذب گیاهی سرب در گیاهان مایکوریزی افزایش ۸/۰۰، ۱۴/۵ و ۴۹/۲ درصدی نسبت به گیاهان غیرمایکوریزی داشت. اثر سطوح مختلف سرب بر کارایی استخراج و انتقال گیاهی سرب معنی دار شد. با افزایش سطح سرب کارایی استخراج گیاهی افزایش یافت، به طوری که سطح ۴۵۰ میکرومولار نسبت به سطح ۱۵۰ و ۳۰۰ میکرومولار افزایش ۶۹/۳ و ۲۷/۸ درصدی داشت. با افزایش غلظت سرب، از کارایی انتقال گیاهی سرب از ریشه به اندام هوایی کاسته شد. درصد کلینزاسیون ریشه با افزایش غلظت سرب تا سطح ۳۰۰ میکرومولار سرب افزایش و سپس در سطح ۴۵۰ میکرومولار کمی کاهش یافت، اما از نظر آماری تفاوت معنی دار بین سطوح ۱۵۰، ۳۰۰ و ۴۵۰ میکرومولار سرب وجود نداشت. با افزایش غلظت سرب، تولید گلومالین ریشه و مقدار سرب تثبیت شده توسط آن نیز به طور معنی داری افزایش یافت.

نتیجه گیری: کلینزاسیون ریشه گیاه شبدر با قارچ رازوفانگوس ایرگولاریز منجر به بهبود رشد و تغذیه فسفوری گیاهان مایکوریزی نسبت به گیاهان غیرمایکوریزی در شرایط تنش سرب شد. جذب سرب در ریشه گیاه شبدر بیش تر از اندام هوایی بود، بنابراین، گیاه شبدر در تثبیت ریشه های سرب نقش مؤثرتری داشت. هم چنین مقدار سرب ریشه در گیاهان مایکوریزی بیش تر از گیاهان غیرمایکوریزی بود که می تواند به دلیل تثبیت سرب در ساختارهای قارچی ریشه باشد. افزایش تولید گلومالین در ریشه های مایکوریزی به عنوان ترکیب اصلی و مؤثر دیواره اسپور و هیف قارچ نقش مهم و کلیدی در تثبیت ریشه های سرب در گیاهان مایکوریزی ایفا می کند. گلومالین از طریق تشکیل کمپلکس با سرب منجر به کاهش زیست فرآهمی و سمیت آن شده و گیاه را از غلظت های بالای سرب محافظت می کند.

واژه های کلیدی: الایزا، تثبیت زیستی، زیست پالایی، فلز سمی، قارچ AM

مقدمه

در دهه های اخیر، راه کارهای کنترل و پالایش خاک های آلوده به فلزهای سمی به دلیل پیامدهای تخریبی روش های فیزیکوشیمیایی بر ویژگی های فیزیکی، شیمیایی و زیستی خاک به سمت روش های سازگار با محیط زیست سوق پیدا کرده اند. زیست پالایی با همیاری ریزجاندارها^۱ به دلیل هزینه کم، پیامدهای جانبی کم تر و افزایش زیتوده گیاهی می تواند در این زمینه اثربخش و کارآمد باشد (۴۷). رابطه همزیستی مسالمت آمیز قارچ های آربوسکولار مایکوریزا (AM^۲) با بیش از ۸۰٪ گیاهان آوندی، میلیون ها سال پیشینه دارد (۴۶). قارچ های AM از راه تأمین آب و عناصر غذایی به ویژه فسفر و عناصر کم تحرکی مانند روی و مس به استقرار گیاه در خاک کمک کرده و نیز شرکای

از پیامدهای افزایش فعالیت های صنعتی، کشاورزی و معدن کاوی در دنیای کنونی، معضل زیست محیطی آلودگی خاک ها به فلزهای سنگین می باشد. آگاهی از پیامدهای فلزهای سنگین بر محیط زیست و موجودات زنده و ارائه راه کارهای مناسب جهت کنترل و پالایش آلودگی ضرورتی انکارناپذیر است. سرب یکی از منابع عمده و مهم آلودگی زیست محیطی است (۲۷). بسیاری از پژوهش ها، توقف فرآیندهای متابولیکی گیاه از جمله جذب سلولی نیتروژن، فتوسنتز، تنفس، جذب آب و رونویسی ژن ها را در اثر سمیت سرب گزارش کردند (۲۰، ۳۲ و ۴۴). علاوه بر گیاهان، سرب سلامت انسان و جانوران را به دلیل اثر سمیت یونی، جهش زایی و سرطان زایی با مخاطره روبرو می کند (۱۹).

1- Plant-microbe assisted bioremediation
2- Arbuscular mycorrhiza

اندام‌های قارچی به‌واسطه حضور کیتین، ملانین، گلوکان و مانان^۵ و/یا کی‌لیت کردن^۶ در اندام‌های قارچی توسط حضور گلیکوپروتئین گلومالین می‌باشند (۱۰). تثبیت فلزی در ریشه‌های مایکوریزی و اندوزش ترجیحی بیش‌تر آن‌ها در ساختارهای قارچی هیف‌های درون‌ریشه‌ای نسبت به یاخته‌های ریشه در پژوهش‌های مکان‌یابی فلزها در ریشه‌های گیاهان مایکوریزی توسط روش‌های اسپکتروسکوپی تأیید شده است (۵۹).

گلومالین ترکیب مهم و کلیدی دیواره اسپور و هیف قارچ‌های AM می‌باشد که به روش ایمونوفلورسنس غیرمستقیم^۷ با به‌کارگیری آنتی‌بادی مونوکلونال^۸ شناسایی شد (۵۶). گلومالین، گلیکوپروتئینی پایدار، نامحلول در آب و مقاوم به تجزیه میکروبی و دمایی می‌باشد که ساختار بیوشیمیایی آن هنوز کاملاً شناخته نشده است (۵۶ و ۵۷). پژوهش‌ها نشان داده است، تولید گلومالین در ریشه گیاهان مایکوریزی در شرایط تنش افزایش پیدا می‌کند (۱۱ و ۲۱)، هم‌چنین به‌نظر می‌رسد با توجه به ماهیت پروتئینی گلومالین، در ناپویایی فلزهای سمی مؤثر باشد (۱۵). اندوزش فلزهای سمی در دیواره یاخته‌ای هیف و اسپورهای قارچ AM با استفاده از طیف‌سنجی پراش انرژی پرتو ایکس متصل به میکروسکوپ الکترونی عبوری^۹ تأیید شده است (۱۸ و ۳۴). گونزالز-چاوز و همکاران (۲۰۰۴)، گلومالین تولیدی توسط قارچ جیگاسپورا روزا^{۱۰} را پس از استخراج در شرایط درون‌شیشه‌ای با محلول حاوی مس تیمار کردند، نتایج نشان داد ۲۸ میلی‌گرم مس به‌ازای هر میلی‌گرم گلومالین تثبیت

زیستی خود را از انواع تنش‌های زیستی و غیرزیستی با سازوکارهای گوناگون محافظت می‌کنند (۱۰). پژوهش‌های پرشماری کاربرد قارچ‌های AM را در افزایش کارایی گیاه‌پالایی در خاک‌های آلوده به فلزهای سمی گزارش کرده‌اند (۷، ۴۵ و ۵۹). گیاهان در روبروشدن با فلزهای سمی دو راهبرد دارند؛ انتقال و ذخیره فلز در بافت‌های هوایی (استخراج گیاهی^۱) و تثبیت فلز در خاک و ریشه (تثبیت گیاهی^۲). شبدر سفید^۳ یکی از گیاهان علوفه‌ای مهم چندساله با زیتوده بالا و ریشه‌های دائمی طویل است که از قابلیت جذب سرب بالایی در ریشه‌های خود برخوردار است (۴ و ۵۸). در ایران در دامنه‌های البرز و زاگرس و در استان‌های اردبیل، آذربایجان، چهارمحال و بختیاری، گیلان، لرستان، مازندران، تهران و سمنان تا ارتفاع ۲۳۰۰ متر پراکنش دارد. شبدر سفید در انواع خاک‌ها و آب و هوای مختلف از جمله در چمنزارها، باغ‌ها و کنار جاده‌ها و به‌صورت علف‌هرز در مزارع و باغ‌ها می‌روید و نسبت به شبدر قرمز توقع کم‌تری نسبت به شرایط مورد نیاز دارد و به‌طور وسیعی در سراسر جهان به‌صورت خودرو یا کشت علوفه‌ای وجود دارد (۳۹). قارچ‌های AM با کلینزاسیون گونه‌های علوفه‌ای دارای زیتوده بالا، غلظت بیش‌تری از فلزهای سمی را در مقایسه با گیاهان غیرمایکوریزی می‌اندوزند (۴، ۱۴ و ۲۳).

قارچ‌های AM با اندوزش فلزهای سمی در هیف‌های درون و برون‌ریشه‌ای^۴ می‌توانند سمیت آن‌ها را تعدیل کنند. این سازوکارها شامل تثبیت فلزهای سمی توسط تراوش‌های قارچی در رایزوسفر، رسوب در گرانول‌های پلی‌فسفات، واکوئل‌ها و وزیکول‌ها، جذب سطحی روی دیواره یاخته‌ای

5- Chitin, melanin, glucan and mannan

6- Chelating

7- Indirect immunofluorescent

8- Monoclonal antibodies

9- Transmission electron microscope connected to an energy dispersive X-ray spectrometer

10- *Gigaspora rosea*

1- Phytoextraction

2- Phytostabilisation

3- *Trifolium repens*

4- Intracellular and extracellular hyphae

بذرهای گیاه شبدر سفید (*Trifolium repens* L.) تهیه شده از بانک ژن مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، به‌عنوان گیاه میزبان همزیست با قارچ رازیوفագوس ایرگولاریز (*R. irregularis*) استفاده گردید. به‌منظور زدودن آلودگی‌های سطحی بذرها بعد از چندین بار شستشو با آب مقطر استریل و غوطه‌ورسازی در اتانول (۷۰٪ حجمی/حجمی) به مدت دو دقیقه، به داخل محلول هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد انتقال یافتند و بعد از ده دقیقه، حدود ده بار با آب مقطر استریل کاملاً شستشو گردیدند (۴ و ۲۴). تعداد ۳۰ عدد بذر گیاه شبدر سفید کشت گردید به طوری که ۱۰ گرم از زادمایه قارچ رازیوفագوس ایرگولاریز (۱۰ اسپور در گرم) به صورت لایه نازک در یک سانتی‌متری زیر بذور به‌طور یکنواخت پخش گردید. پس از جوانه‌زنی و استقرار گیاهچه، تعداد آن‌ها به ۲۰ عدد کاهش یافت. گیاهان در اتاقک رشد به مدت ۱۶ هفته در شرایط دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی (۲۵ °C) و ۸ ساعت تاریکی (۲۰ °C) نگهداری شدند و از هفته دوم بعد از جوانه‌زنی یک روز در میان با محلول غذایی هوگلند (۳۳) حاوی سطوح مختلف ۰، ۱۵۰، ۳۰۰، ۴۵۰ میکرومولار سرب از منبع نترات سرب و حاوی بافر MES ۰/۵ میلی‌مولار برای حفظ pH=۶/۱ (۱۷) آبیاری شدند. برای یکسان‌سازی اثر نترات در سایر تیمارها نسبت به تیمار ۴۵۰ میکرومولار سرب، نیتروژن به‌صورت نترات سدیم در مقادیر مساوی با نیتروژن اضافه شده به بالاترین سطح سرب، افزوده شد (۲۵). گیاهان به مدت چهار هفته با محلول غذایی هوگلند حاوی نصف غلظت فسفر و بعد از آن با محلول غذایی کامل آبیاری شدند. پس از سپری شدن دوره رشد، بخش هوایی گیاهان برداشت گردید. پس از تهیه نمونه از

شده است (۱۷). بنابراین با توجه به این‌که گلومالین ترکیب اصلی دیواره اسپور و هیف‌های قارچ AM را تشکیل می‌دهد و اندوزش فلزهای سمی در این اندام‌ها تأیید شده است، این پژوهش در راستای بررسی پاسخ گیاه شبدر سفید (*Trifolium repens* L.) مایکوریزی شده با قارچ رازیوفագوس ایرگولاریز به تولید گلومالین در تنش سرب و سهم گلومالین در ناپویایی سرب توسط ریشه‌های گیاه، در شرایط گلدانی طراحی گردید.

مواد و روش‌ها

تهیه زادمایه قارچ: برای تهیه زادمایه قارچی، در شرایط استریل زیر هود لامینار شش پلیت دارای کشت درون شیشه‌ای ریشه‌های تراریخت هویج (*Ri T-DNA Daucus carota* L.) مایکوریزی شده با قارچ رازیوفագوس ایرگولاریز (اخذ شده از دپارتمان بیولوژی دانشگاه لوند سوئد) پس از برش به قطعات حدوداً یک سانتی‌متری با شن استریل - بدون گلومالین و عبور یافته از الک ۰/۵ میلی‌متری کاملاً مخلوط گردیدند.

کشت گلدانی: جهت تهیه بستر محیط کشت گلدانی از شن عبور یافته از الک دو میلی‌متری استفاده گردید، شستشو با آب تا جایی ادامه یافت که ذرات سیلت و رس حذف گردید. سپس، جهت حذف مواد آلی و نیز گلومالین احتمالی موجود در سطح ذرات شن، ابتدا استخراج با بافرسیترات سدیم ۵۰ میلی‌مولار (pH=۸)، اتوکلاو به مدت یک ساعت در دمای (۱۲۱ °C) انجام گرفت (۱۷ و ۵۷). در ادامه، شن هوا خشک شده و به مدت یک ساعت در دمای ۱۲۱ °C اتوکلاو گردید. شن استریل عاری از گلومالین در گلدان‌های ۱۵۰۰ گرم به قطر دهانه ۱۵ سانتی‌متر قرار گرفت. از

مولیبیدات در طول موج ۴۳۰ نانومتر (۵) توسط اسپکتروفتومتر (Hack DR/2000) و غلظت سرب اندام‌هوایی و ریشه توسط دستگاه جذب اتمی (AA-6300 SHIMADZU) قرائت گردید. برای تعیین کارایی جذب (رابطه ۱)، استخراج (رابطه ۲) و انتقال گیاهی (رابطه ۳) سرب از رابطه‌های زیر استفاده شد (۵۴):

$$\text{مقدار عنصر جذب شده در گیاه} \\ \text{وزن خشک ریشه} = \frac{\text{مقدار عنصر جذب شده در گیاه}}{\text{وزن خشک ریشه}} = \text{کارایی جذب گیاهی} \quad (۱)$$

$$\text{مقدار عنصر جذب شده در اندام هوایی} \\ \text{وزن خشک ریشه} = \frac{\text{مقدار عنصر جذب شده در اندام هوایی}}{\text{وزن خشک ریشه}} = \text{کارایی استخراج گیاهی} \quad (۲)$$

$$\text{مقدار عنصر جذب شده در اندام هوایی} \\ \text{مقدار عنصر جذب شده در ریشه} = \frac{\text{مقدار عنصر جذب شده در اندام هوایی}}{\text{مقدار عنصر جذب شده در ریشه}} = \text{کارایی انتقال گیاهی} \quad (۳)$$

دمای °C ۷۰ خشک شده و توزین گشتند و مقدار گلومالین در واحد وزن ریشه خشک محاسبه و به‌عنوان گلومالین واکنش‌پذیر با آنتی‌بادی (IRG^۲) گزارش گردید. پس از کنار گذاشتن یک میلی‌لیتر از عصاره استخراجی جهت سنجش گلومالین، باقی‌مانده عصاره با افزودن آهسته اسید کلریدریک ۱ نرمال در محدوده pH = ۲-۲/۵ و سپس با قرار گرفتن روی یخ به‌مدت ۴۵ دقیقه و سانتریفوژ رسوب پیدا کرد (۳۵). پس از رسوب گلومالین، مقدار فلز سرب متصل شده پس از هضم با اسید نیتریک غلیظ (۶۵٪، Merck) به‌مدت ۶ ساعت در دمای °C ۸۰ با استفاده از دستگاه جذب اتمی (AA-6300 SHIMADZU) قرائت گردید (۱۷).

ریشه‌های تر جهت استخراج گلومالین و تعیین درصد کلنیزاسیون ریشه، باقی‌مانده ریشه‌ها و اندام‌هوایی در دمای °C ۷۰ به‌مدت ۴۸ ساعت خشک گردید. رنگ‌آمیزی و تعیین درصد کلنیزاسیون مایکوریزی با استفاده از روش تغییر یافته کورمانیک و مک‌گراو (۲۸) انجام شد. جهت هضم نمونه‌های گیاهی از روش تغییر یافته ویلینگ و همکاران (۵۲) استفاده گردید، سپس غلظت فسفر به روش رنگ‌سنجی وانادات-

سنجش گلومالین و سرب تثبیت شده توسط آن: نمونه‌های ریشه در لوله‌های حاوی سیترات سدیم ۵۰ میلی‌مولار (pH=۸) به‌مدت یک ساعت در دمای °C ۱۲۱ داخل اتوکلاو قرار گرفته و گلومالین با سه چرخه پی در پی استخراج گردید. عصاره رویی حاصل از هر چرخه اتوکلاو پس از سانتریفوژ به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ ×g، با هم ترکیب شدند (۴۳). مقدار گلومالین در یک میلی‌لیتر از عصاره استخراجی با استفاده از روش اصلاح شده هامر و ریلیگ (۲۱) و با روش ایمنی‌سنجی آنزیمی (الایزا)^۱ به‌وسیله آنتی‌بادی مونوکلونال MAb32B11 اندازه‌گیری شد. سلول هیبریدوما تولیدکننده آنتی‌بادی MAb32B11 از شرکت (American Type Culture Collection) ATCC تهیه گردید. پس از استخراج گلومالین، ریشه‌ها در

2- Immunoreactive glomalin

1- Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Elsholtzia splendens در خاک آلوده به سرب، روی، مس و کادمیوم (۵۳) منجر به افزایش وزن خشک گیاه گردید. بنابراین کلنیزاسیون ریشه‌های گیاه توسط قارچ رایزوفագوس ایرگولاریز اثر مثبت بر وضعیت رشد گیاه شبردر سفید داشته است. به‌نظر می‌رسد بهبود رشد گیاهان میکوریزی در مقایسه با گیاهان غیرمیکوریزی به‌دلیل انتشار مایسلیم قارچ‌های AM و تشکیل سیستم جذب اضافی و مکمل سیستم ریشه گیاه و احتمالاً تولید هورمون‌های رشد گیاه مانند اکسین و سیتوکینین باشد (۸ و ۲۶). افزایش غلظت آهن و روی در دانه نخود (۳۸) و ذرت (۴۸) در اثر میکوریزی شدن گزارش شده است. همچنین افزایش محتوای کلروفیل، افزایش بیان آنزیم‌های فتوسنتزی و در پی آن تولید فرآورده‌های فتوسنتزی (۵۵) از طریق بهبود جذب عناصری مانند آهن و منیزیم و نیز توان بالای جذب و انتقال فسفر به کمک هیف‌های خارجی قارچ (۲۹) می‌تواند از دیگر دلایل احتمالی افزایش زیتوده در گیاهان میزبان قارچ میکوریزی در شرایط آلوده به سرب باشد. البته با توجه به اثر سمی بر متابولیسم گیاه از طریق اختلال در فتوسنتز، عملکرد آنزیم‌ها، ایجاد تنش اکسیداتیو و اختلال در جذب عناصر کم‌مصرف (۱۰)، کاهش زیتوده گیاه با افزایش سمیت سرب دور از انتظار نبود.

طرح آزمایشی و تجزیه آماری: کشت گلدانی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک کامل تصادفی در پنج تکرار اجرا شد. آزمون نرمال بودن توزیع داده‌ها و سپس تجزیه واریانس و مقایسه میانگین داده‌ها به‌وسیله آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح معنی‌داری ۵ درصد، با استفاده از نرم‌افزار آماری IBM SPSS 22 انجام شد. نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Microsoft Excel رسم شدند.

نتایج و بحث

وزن خشک اندام‌هوایی و ریشه: نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که وزن خشک اندام‌هوایی و ریشه تحت‌تأثیر اثرات اصلی قارچ و سطوح مختلف سرب قرار گرفت (جدول ۱). وزن خشک اندام‌هوایی و ریشه در گیاهان میکوریزی به‌ترتیب ۲۴/۹ و ۳۴/۲ درصد بیش‌تر از گیاهان غیرمیکوریزی بود (جدول ۲). با افزایش سطح سرب وزن خشک اندام‌هوایی و ریشه به‌طور معنی‌دار کاهش یافت. وزن خشک اندام‌هوایی و ریشه در سطوح ۱۵۰، ۳۰۰ و ۴۵۰ میکرومولار سرب، به‌ترتیب کاهش ۱۱/۲، ۱۲/۹، ۱۸/۳ و ۷/۵، ۱۸/۱ و ۳۶/۷ درصدی نسبت به سطح صفر سرب داشتند (جدول ۲). اگرچه اثر متقابل قارچ و سطوح سرب بر وزن خشک اندام‌هوایی و ریشه معنی‌دار نگردید (جدول ۱) ولی میانگین داده‌ها نشان داد که در تمام سطوح سرب کاهش وزن خشک اندام‌هوایی و ریشه در گیاهان غیرمیکوریزی بیش‌تر از گیاهان میکوریزی بود (جدول ۲). همزیستی چند جدایه قارچ گلوموس *اینترا‌رادیسز*^۱ با گیاه ذرت در خاک آلوده به سرب (۴۹) و چهار گونه قارچ گلوموس با گیاه

1- *Glomus intraradices*

جدول ۱- تجزیه واریانس اثرهای فاکتورهای قارچ رازوفاکتوس ایرگولاریز و سرب و اثرهای متقابل آنها بر وزن خشک، جذب فسفر و سرب اندام‌هوایی و ریشه، کارایی جذب، استخراج و انتقال سرب در گیاه شبدر سفید.

Table 1. Variance analysis of significance of *R. irregularis*, Pb and their interactions on shoot and root dry weights, P and Pb shoot and root uptakes and extraction and translocation efficiency of Pb by white clover plant.

		میانگین مربعات Mean Square						درجه آزادی Degree of freedom	منابع تغییرات Source of variation	
کارایی انتقال Translocation efficiency	سرب Pb	کارایی استخراج Extraction efficiency	کارایی جذب Uptake efficiency	ریشه Root	جذب سرب Pb uptake	ریشه Root	جذب فسفر P uptake	وزن خشک Dry weight	اندام‌هوایی Shoot	
0.118 ^{ns}	16.5 ^{ns}	136872 ^{ns}	8.16 ^{ns}	164479 ^{ns}	3.15 ^{ns}	24.4 [*]	0.34 ^{ns}	2.35 [*]	4	بلوک Block
0.113 ^{ns}	11.7 ^{ns}	1397414 ^{***}	1204 ^{***}	3489330 ^{***}	57.2 ^{***}	349 ^{***}	4.41 ^{***}	26.5 ^{***}	1	قارچ F
2.31 ^{***}	1452 ^{***}	13436488 ^{***}	5109 ^{***}	9462286 ^{***}	2.74 ^{ns}	6.13 ^{ns}	0.899 ^{**}	2.79 [*]	3	سرب Pb
0.007 ^{ns}	27.2 ^{ns}	624224 ^{***}	131 ^{**}	509241 ^{**}	0.922 ^{ns}	0.669 ^{ns}	0.141 ^{ns}	0.025 ^{ns}	3	F×Pb
0.056	9.25	61043	18.6	87566	1.41	8.41	0.149	0.673	28	خطا Error

^{ns} not significant, * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001. و *** و ** به ترتیب غیر معنی دار و معنی داری در سطح احتمال ۰.۰۵، ۰.۰۱ و ۰.۰۰۱ درصد.

جدول ۲- اثرهای اصلی و متقابل قارچ و سطوح سرب بر وزن خشک اندام‌هوایی و ریشه گیاه شبدر سفید همزیست با قارچ رایزوفانگوس ایرگولاریز.

Table 2. The main and interaction effects of fungus and Pb levels on shoot and root dry weights of white clover colonized by *R. irregularis*.

		اثر متقابل Interaction effect					
		با قارچ مایکوریزی Mycorrhizal fungus	بدون قارچ مایکوریزی Non-mycorrhizal fungus				
اثر اصلی سرب Pb-main effect	8.06 ^a	8.87 ^a	7.25 ^{bc}	0			
	7.25 ^b	8.08 ^{ab}	6.43 ^{cd}	150	غلظت سرب	وزن خشک اندام‌هوایی	
	7.14 ^b	8.02 ^{ab}	6.27 ^{cd}	300	(میکرومولار)	(گرم / گلدان)	
	6.81 ^b	7.57 ^b	6.06 ^d	450	Pb (μM)	Shoot DW (g/pot)	
		8.13 ^a	6.51 ^b	اثر اصلی قارچ Fungus-main effect			
اثر اصلی سرب Pb-main effect	2.61 ^a	3.01 ^a	2.21 ^{bc}	0			
	2.43 ^{ab}	2.81 ^a	2.04 ^c	150	غلظت سرب	وزن خشک ریشه	
	2.21 ^{bc}	2.61 ^{ab}	1.82 ^c	300	(میکرومولار)	(گرم / گلدان)	
	1.91 ^c	2.07 ^c	1.76 ^c	450	Pb (μM)	Root DW (g/pot)	
		2.63 ^a	1.96 ^b	اثر اصلی قارچ Fungus-main effect			

میانگین‌های دارای حداقل یک حرف لاتین مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار به روش آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد هستند. Means followed by the same superscript letters are not significantly different according to Duncan's multiple range test (P<0.05).

مایکلیس - متن (km) پایین هیف‌ها بسیار مشهود است (۶۰). اما توضیح دیگری نیز برای بهبود جذب فسفر توسط ریشه‌های مایکوریزی وجود دارد، باربر (۱۹۸۴) بیان کرد که شیب غلظتی خیلی ملایم در پیرامون هیف‌ها (منطقه تخلیه حداقل^۱) وجود دارد، و از آنجایی که انشعاب‌های هیفی بسیار ریزتر از ریشه‌ها و حتی ریشه‌های موئین (۰/۰۰۵ میلی‌متر در برابر ۰/۱۵ میلی‌متر) هستند. پس، غلظت فسفر در محلول خاک پیرامون هیف‌های قارچ مایکوریز همواره بیش‌تر از ناحیه تخلیه فسفر پیرامون ریشه‌های غیرمایکوریزی است و هیف‌ها می‌توانند فسفر بیش‌تری از خاک‌های دارای فسفر کم را حتی بدون داشتن تمایل جذب^۲ بالاتر به فسفر، جذب کنند (۳). از دلایل احتمالی

جذب فسفر در اندام‌هوایی و ریشه: با توجه به نتایج جدول تجزیه واریانس داده‌ها، اثر قارچ بر جذب فسفر اندام‌هوایی و ریشه معنی‌دار گردید (جدول ۱). به‌طوری‌که جذب فسفر اندام‌هوایی و ریشه در گیاهان مایکوریزی به ترتیب ۳۲/۲ و ۴۵/۸ درصد بیش‌تر از گیاهان غیرمایکوریزی بود (جدول ۳). اثر سطوح سرب و اثر متقابل قارچ و سطوح سرب بر جذب فسفر اندام‌هوایی و ریشه معنی‌دار نگردید. (جدول ۱). جذب فسفر اندام‌هوایی با افزایش غلظت سرب تفاوت معنی‌دار آماری نشان نداد که به احتمال قوی می‌تواند بیانگر سازوکار سمیت‌زدایی سرب از طریق بهبود تغذیه فسفوری گیاه باشد که این سازوکار در گیاهان مایکوریزی به واسطه حضور هیف‌های خارج سلولی و افزایش حجم خاک قابل‌دسترس و نیز ثابت

1- Minimum depletion zone
2- Affinity

سازوکارهای گیاه میکوریزی در سمیت‌زدایی سرب به‌واسطه بهبود تغذیه فسفوری باشد (۴۱). با وجود، نبود تفاوت معنی‌دار در جذب فسفر ریشه در سطوح مختلف سرب، مقایسه میانگین داده‌ها کاهش جذب فسفر ریشه را با افزایش غلظت سرب به‌ویژه در سطح ۴۵۰ میکرومولار سرب نشان می‌دهد (جدول ۳). از سوی دیگر بیش‌ترین جذب سرب ریشه در سطح ۴۵۰ میکرومولار سرب (شکل ۱) اندازه‌گیری شد، پس به‌نظر می‌رسد سازوکاری غیر از کمپلکس شدن با فسفات در بخش ریشه‌ای در سمیت‌زدایی سرب نقش داشته باشد.

تغذیه مناسب فسفوری گیاه شبدر در شرایط تنش سرب، کشت در بستر شنی و تغذیه گیاه با محلول غذایی هوگلند با pH تنظیم‌شده برابر با ۶/۱ (دارای بافر MES، ۰/۵ میلی‌مولار) می‌تواند باشد که فسفر به شکل قابل‌جذب در اختیار گیاهان میکوریزی و غیرمیکوریزی قرار می‌گیرد. به‌نظر می‌رسد قارچ میکوریز به‌طور غیرمستقیم با افزایش جذب فسفر از یک‌سو و افزایش رشد گیاه از سوی دیگر منجر به کاهش پیامدهای زیانبار سرب در گیاه میزبان می‌شود (۱۳). در گیاهان میکوریزی رسوب فسفر به شکل ترکیبات فسفاتی و یا جذب توسط گرانول‌های پلی‌فسفات و فیتات‌ها در اندام‌های قارچی می‌تواند از

جدول ۳- اثرهای اصلی و متقابل قارچ و سطوح سرب بر جذب فسفر اندام‌هوایی و ریشه گیاه شبدر سفید همزیست با قارچ رایزوفاکوس ایرگولاریز.

Table 3. The main and interaction effects of fungus and Pb levels on shoot and root P uptake of white clover colonized by *R. irregularis*.

		اثر متقابل Interaction effect					
		با قارچ میکوریزی Mycorrhizal fungus	بدون قارچ میکوریزی Non-mycorrhizal fungus				
اثر اصلی سرب Pb-main effect	22.6 ^a	25.3 ^a	19.8 ^b	0	جذب فسفر اندام‌هوایی (میلی‌گرم/گلدان) Shoot P uptake (mg/pot)	غلظت سرب (میکرومولار) Pb (μM)	150
	20.7 ^a	23.7 ^a	17.7 ^b	150			
	21.8 ^a	25.1 ^a	18.5 ^b	300			
	21.3 ^a	24.1 ^a	18.6 ^b	450			
		24.6 ^a	18.6 ^b	اثر اصلی قارچ Fungus-main effect			
اثر اصلی سرب Pb-main effect	6.66 ^{ab}	7.79 ^{ab}	5.53 ^c	0	جذب فسفر ریشه (میلی‌گرم/گلدان) Root P uptake (mg/pot)	غلظت سرب (میکرومولار) Pb (μM)	150
	6.91 ^a	8.34 ^a	5.49 ^c	150			
	6.46 ^{ab}	7.90 ^{ab}	5.02 ^c	300			
	5.70 ^b	6.49 ^{bc}	4.91 ^c	450			
		7.64 ^a	5.24 ^b	اثر اصلی قارچ Fungus-main effect			

میانگین‌های دارای حداقل یک حرف لاتین مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار به روش آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد هستند. Means followed by the same superscript letters are not significantly different according to Duncan's multiple range test (P<0.05).

انتشار سرب به داخل ریشه‌های گیاه به محض کلنیزاسیون مایکوریزی مشاهده شده است و تثبیت آن با افزایش تعداد وزیکول‌های قارچی همبستگی داشته است (۴). در این پژوهش نیز در سرتاسر ریشه‌های مایکوریزی حضور تعداد زیاد وزیکول‌ها قابل توجه بود که ممکن است در سمیت‌زدایی سرب نقش داشته باشد. به نظر می‌رسد با توجه به کارایی جذب گیاهی بیش‌تر در گیاهان مایکوریزی نسبت به غیرمایکوریزی با افزایش غلظت سرب (جدول ۴)، جذب فعال سرب افزایش می‌یابد ولی به دلیل جذب حدود ۱/۵ برابری سرب در ریشه نسبت به اندام‌هوایی (شکل B-۱)، بخش اعظم سرب در ریشه‌ها تثبیت شده است. بنابراین محتمل است که هر دو فرآیند جذب فعال و تثبیت به‌طور هم‌زمان و یا مستقل از هم روی داده باشد (۳۱).

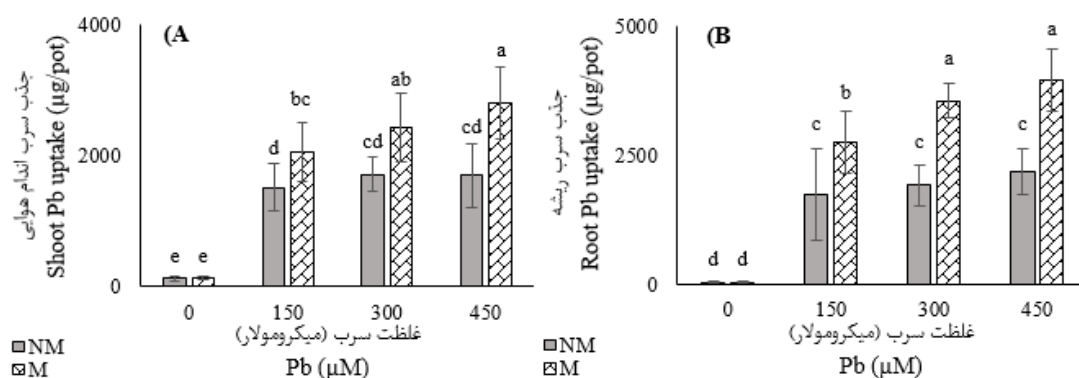
تفاوت بارز گیاهان مایکوریزی و غیرمایکوریزی در رشد، جذب و تحمل سرب در سطوح مشابه سرب، بیانگر نقش مؤثر کلنیزاسیون مایکوریزی در افزایش مقاومت گیاه میزبان و بهبود رشد و در پی آن جذب گیاهی سرب بیش‌تر در مقایسه با گیاهان غیرمایکوریزی می‌باشد. به نظر می‌رسد قارچ ریزوفگوس ایرگولاریز آستانه تحمل گیاه به سمیت سرب را افزایش داده است. این موضوع می‌تواند در ارتباط با واکنش‌های فیزیولوژیک در سطح تماس گیاه-قارچ، بیان ژن‌های خاص یا کاهش بیان آن‌ها، تغییر الگوی توزیع فلز در اندام‌های گیاه، سازوکارهای غیرمستقیم شامل جذب بیش‌تر عناصر فسفر و آهن، افزایش عملکرد گیاه و یا سازوکارهای مستقیم، شامل جذب فلز در سطح و یا درون اندام‌های قارچی، کلاته شدن فلز در سیتوپلاسم به‌وسیله متالوتیونین‌ها، سکوستره شدن فلزها در گرانول‌های پلی‌فسفات داخل واکوئل‌ها

جذب سرب در اندام‌هوایی و ریشه: بر اساس جدول تجزیه واریانس داده‌ها، اثر اصلی قارچ و سطوح سرب و اثر متقابل آن‌ها بر جذب سرب اندام‌هوایی و ریشه معنی‌دار گردید (جدول ۱). سرب جذب شده در اندام‌هوایی و ریشه در سطوح مختلف سرب و در گیاهان مایکوریزی به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از گیاهان غیرمایکوریزی بود. بیش‌ترین مقدار جذب سرب در اندام‌هوایی در تیمار مایکوریزی سطح ۴۵۰ میکرومولار سرب بود که اختلاف معنی‌دار آماری با سطح ۳۰۰ میکرومولار نداشت و به‌ترتیب افزایش ۶/۵٪ و ۱/۵٪ درصدی نسبت به تیمار غیرمایکوریزی در این سطوح داشتند (شکل A-۱). بیش‌ترین مقدار جذب سرب در ریشه در تیمار مایکوریزی سطح ۴۵۰ میکرومولار سرب بود که اختلاف معنی‌داری با تیمارهای مایکوریزی سطح ۳۰۰ میکرومولار نداشت و به‌ترتیب افزایش ۷/۸۰٪ و ۶/۸۴٪ درصدی نسبت به گیاهان غیرمایکوریزی در این سطوح داشتند (شکل B-۱).

افزایش جذب فلزهای سمی در گیاهان مایکوریزی در مقایسه با غیرمایکوریزی گزارش شده است (۶، ۷ و ۳۰) و در بیش‌تر موارد، کاهش اثر بالقوه سمی فلز در غلظت‌های بالای به‌دلیل بهبود تغذیه فسفری و رشد گیاهان مایکوریزی گزارش شده است (۱، ۴۱ و ۴۹). نتایج نشان می‌دهد که به‌طور میانگین افزایش بیش از ۱/۵ برابری جذب سرب در ریشه‌های کلنیزه شده در مقایسه با ریشه‌های غیرمایکوریزی رخ داده است (شکل B-۱). پیش‌بینی می‌شود که جذب سرب بیش‌تر در ریشه‌های مایکوریزی نسبت به غیرمایکوریزی در اندام‌های قارچی روی داده است. اندوزش ترجیحی فلزهای سمی سرب و کادمیوم در ریشه بیش‌تر نیز گزارش شده است (۴ و ۲۳). افزایش

یاخته‌ای آن‌ها به‌واسطه حضور گلومالین در تثبیت و سمیت‌زدایی سرب بیش از پیش مورد توجه قرار می‌گیرد.

باشد (۱۶). با توجه به اندزوش بیش‌تر سرب در ریشه گیاهان مایکوریزی نسبت به غیرمایکوریزی نقش اسپور و مایسلیم‌های قارچی و ترکیب اصلی دیواره



شکل ۱- جذب سرب اندام‌هوایی (A) و ریشه (B) گیاه شبدر سفید همزیست با قارچ رایزوفآگوس ایرگولاریز در سطوح مختلف سرب. NM و M عبارتند از گیاهان مایه‌زنی‌شده با قارچ رایزوفآگوس ایرگولاریز و گیاهان بدون مایه‌زنی با قارچ. میانگین‌های دارای حداقل یک حرف لاتین مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار به روش آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد هستند.

Figure 1. Shoot and root Pb uptake of white clover colonized by *R. irregularis* at different levels of Pb. M and NM are representing *R. irregularis* inoculated and non-inoculated plants. Means followed by the same superscript letters are not significantly different according to Duncan's multiple range test ($P < 0.05$).

با زیتوده بالا در خاک‌های آلوده به فلزهای سمی مورد نیاز باشد.

اثر قارچ و اثر متقابل قارچ و سرب بر کارایی استخراج گیاهی معنی‌دار نبود، با این وجود، اثر سطوح سرب بر این صفت معنی‌دار شد (جدول ۱). با افزایش سطح سرب کارایی استخراج گیاهی افزایش یافت، به‌طوری‌که سطح ۴۵۰ میکرومولار نسبت به سطح ۱۵۰ و ۳۰۰ میکرومولار افزایش ۶۹/۳ و ۲۷/۸ درصدی داشت (جدول ۴). به‌استثنای سطح ۴۵۰ سرب، نبود تفاوت معنی‌دار بین گیاهان مایکوریزی و غیرمایکوریزی در استخراج گیاهی سرب با در نظر گرفتن کارایی جذب گیاهی بیشتر در گیاهان مایکوریزی نسبت به غیرمایکوریزی بیانگر تجمع سرب بیشتر در ریشه گیاهان مایکوریزی نسبت به

کارایی جذب، استخراج و انتقال گیاهی سرب: اثر اصلی قارچ و سطوح سرب و نیز اثر متقابل آن‌ها بر کارایی جذب گیاهی سرب معنی‌دار گردید (جدول ۱). با افزایش سطح سرب، کارایی جذب گیاهی سرب به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. در سطوح مختلف سرب (به‌ویژه در سطح ۴۵۰ میکرومولار) کارایی جذب گیاهی در گیاهان مایکوریزی افزایش ۸/۰۰، ۱۴/۵ و ۴۹/۲ درصدی نسبت به گیاهان غیرمایکوریزی داشت که بیانگر تحمل بیشتر گیاهان مایکوریزی نسبت به غیرمایکوریزی بود (جدول ۴). نتایج پژوهش‌های پیش‌تر نیز نشان می‌دهد که همزیستی قارچ‌های AM، منجر به افزایش تحمل گیاه نسبت به فلزهای سمی می‌گردد (۱۲ و ۲۲). این قابلیت زمانی اهمیت می‌یابد که استقرار پوشش گیاهی

جذب شده در ریشه گیاهان میکوریزی نسبت به غیرمیکوریزی به وسیله ناپویایی در هیفها و اندامهای قارچی سمیتزدایی شده است (۵۳ و ۵۴). داده‌های کارایی جذب، استخراج و انتقال گیاهی نشان دادند، گرچه گیاهان میکوریزی سرب بیشتری را نسبت به گیاهان غیرمیکوریزی انباشت می‌کنند، سهم ریشه گیاهان، به‌ویژه گیاهان میکوریزی در تثبیت سرب بیشتر از اندام‌هوایی است. هم‌چنین کارایی انتقال گیاهی کمتر از یک در گیاهان نشان می‌دهد، گیاه شبدر سفید، سرب بیشتری را در ریشه انباشت می‌کند (جدول ۴). سوڈوا و وساكا (۲۰۰۷) در بررسی تأثیر قارچ AM بر اندوزش و انتقال سرب از خاک آلوده به ریشه و اندام‌هوایی گیاه ذرت دریافتند که غلظت سرب در ریشه‌های میکوریزی نسبت به اندام‌هوایی افزایش می‌یابد و پیشنهاد کردند که سرب داخل مایسلیم‌های قارچی ناپویا می‌شود (۴۹). گونه‌ها و ارقام گیاهی مناسب برای استخراج گیاهی باید دارای کارایی انتقال بیش از ۱ باشند (۳۷)، به‌عبارت دیگر باید مقدار سرب جذب شده در اندام‌هوایی بیش از مقدار جذب آن در ریشه گیاه باشد. با توجه به این‌که، حدود ۵۴ (گیاهان غیرمیکوریزی) تا ۶۰ (گیاهان میکوریزی) درصد از کل سرب جذب شده توسط شبدر در ریشه‌های آن اندوزش می‌شود و فاکتور انتقال در گیاهان میکوریزی و غیرمیکوریزی به‌ترتیب ۰/۶۶ و ۰/۵۴ است، گیاه شبدر از کارایی بیشتری در تثبیت ریشه‌ای سرب برخوردار است.

گیاهان غیرمیکوریزی می‌باشد (جدول ۴). نتایج مربوط به داده‌های جذب سرب در ریشه نیز بیانگر این مطلب می‌باشند (شکل B-۱). بنابراین می‌توان گفت، گیاه شبدر در شرایط تنش سرب در اندوزش سرب در ریشه نسبت به اندوزش آن در اندام‌هوایی نقش مؤثرتری دارد. چن و همکاران (۲۰۰۵) و وُو و همکاران (۲۰۰۵) نیز نسبت بالاتر سرب ریشه به سرب اندام‌هوایی را در گیاه شبدر میکوریزی گزارش کردند (۴ و ۵۸).

اثر اصلی قارچ و اثر متقابل قارچ و سرب بر کارایی انتقال گیاهی سرب معنی‌دار نبود. ولی اثر اصلی سطوح سرب بر این صفت معنی‌دار گردید (جدول ۱). به‌طوری‌که با افزایش غلظت سرب، از کارایی انتقال گیاهی سرب از ریشه به اندام‌هوایی کاسته شد (جدول ۴). کاهش کارایی انتقال گیاهی سرب از ریشه به اندام‌هوایی در سطوح آلودگی سرب در مقایسه با سطح صفر سرب و کارایی انتقال کمتر از یک در تمام سطوح (جدول ۴) نشان می‌دهد که گیاه سازوکار تجمع سرب بیشتر در ریشه را در مقابل انتقال آن به اندام‌هوایی برگزیده است. بنابراین با توجه به جذب سرب بیشتر در ریشه گیاهان میکوریزی، کارایی جذب گیاهی بیشتر و کارایی انتقال گیاهی کمتر (۰/۵۴) در آن‌ها نسبت به گیاهان غیرمیکوریزی (۰/۶۶)، می‌توان بیان نمود گیاهان میکوریزی سرب بیشتری را در مقایسه با گیاهان غیرمیکوریزی در ریشه اندوزش می‌کنند. این نتایج می‌تواند شواهدی باشند بر این‌که سرب بیشتر

جدول ۴- اثرهای اصلی و متقابل قارچ و سطوح سرب بر کارایی جذب، استخراج و انتقال گیاهی سرب در گیاه شبدر سفید همزیست با قارچ رایزوفانگوس ایرگولاریز.

Table 4. The main and interaction effects of fungus and Pb levels on uptake, extraction and translocation efficiency of Pb by white clover colonized by *R. irregularis*.

		اثر متقابل Interaction effect					
		با قارچ مایکوریزی Mycorrhizal fungus	بدون قارچ مایکوریزی Non-mycorrhizal fungus				
اثر اصلی سرب Pb-main effect	0 ^d	0 ^e	0 ^e	0			
	1595 ^{ac}	1669 ^{cd}	1521 ^d	150	غلظت سرب (میکرومولار)	کارایی جذب سرب Pb uptake efficiency (µg/g DW)	
	2080 ^b	2237 ^b	1924 ^{bc}	300	Pb (µM)		
	2714 ^a	3274 ^a	2154 ^b	450			
		1795 ^a	1399 ^b	اثر اصلی قارچ Fungus-main effect			
اثر اصلی سرب Pb-main effect	0 ^d	0 ^e	0 ^e	0			
	694 ^c	697 ^b	691 ^b	150	غلظت سرب (میکرومولار)	کارایی استخراج سرب Pb extraction efficiency (µg/g DW)	
	919 ^b	888 ^b	949 ^b	300	Pb (µM)		
	1175 ^a	1362 ^a	988 ^b	450			
		737 ^a	657 ^a	اثر اصلی قارچ Fungus-main effect			
اثر اصلی سرب Pb-main effect	0.000 ^b	0.000 ^b	0.000 ^b	0			
	0.865 ^a	0.762 ^a	0.966 ^a	150	غلظت سرب (میکرومولار)	کارایی انتقال سرب Pb translocation efficiency	
	0.797 ^a	0.689 ^a	0.905 ^a	300	Pb (µM)		
	0.757 ^a	0.723 ^a	0.790 ^a	450			
		0.545 ^a	0.665 ^a	اثر اصلی قارچ Fungus-main effect			

میانگین‌های دارای حداقل یک حرف لاتین مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار به روش آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد هستند. Means followed by the same superscript letters are not significantly different according to Duncan's multiple range test (P<0.05).

مشاهده گردید (شکل ۲). به‌نظر می‌رسد افزایش درصد کلنیزاسیون ریشه همراه با افزایش غلظت سرب نشان‌دهنده افزایش ترجیح گیاه جهت برقراری همزیستی در شرایط تنش فلزی باشد (۲)، از سوی دیگر کاهش این پارامتر در بالاترین غلظت سرب احتمالاً ناشی از افزایش سمیت سرب است (۳۶). کاهش کلنیزاسیون با افزایش تنش در گیاه مایکوریزی گزارش شده است (۱ و ۵۱).

درصد کلنیزاسیون ریشه: بر اساس نتایج جدول تجزیه واریانس داده‌ها، اثر سطوح سرب بر درصد کلنیزاسیون ریشه معنی‌دار گردید (جدول ۵). درصد کلنیزاسیون ریشه با افزایش غلظت سرب تا سطح ۳۰۰ میکرومولار سرب افزایش و سپس در سطح ۴۵۰ میکرومولار کمی کاهش یافت، اما از نظر آماری تفاوت معنی‌دار بین سطوح ۱۵۰، ۳۰۰ و ۴۵۰ میکرومولار سرب وجود نداشت. کم‌ترین درصد کلنیزاسیون ریشه (۵۵/۴٪) در تیمار سطح صفر سرب

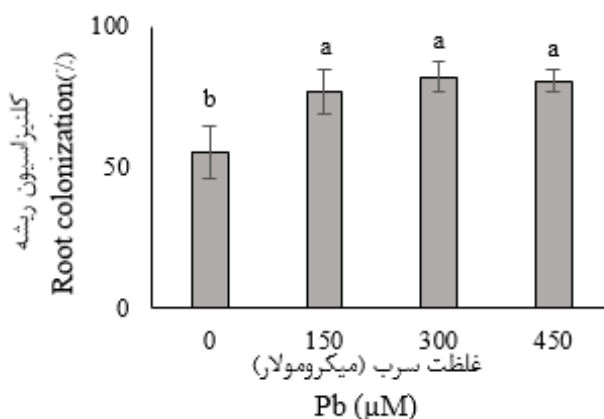
جدول ۵- تجزیه واریانس اثر سطوح سرب بر درصد کلنیزاسیون ریشه، تولید گلومالین و سرب تثبیت شده توسط آن در همزیستی گیاه شبدر سفید با قارچ رایزوفانگوس ایرگولاریز.

Table 5. Analysis of variance for effect of Pb levels on root colonization, glomalin production and Pb-sequestered by glomalin in white clover colonized by *R. irregularis*.

میانگین مربعات Mean Square			درجه آزادی Degree of freedom	منابع تغییرات Source of variation
سرب تثبیت با گلومالین Pb-sequestered by glomalin	تولید گلومالین Glomalin production	کلنیزاسیون ریشه Root colonization		
163 ^{ns}	0.169 ^{ns}	13 ^{ns}	4	بلوک Block
50681 ^{***}	0.936 ^{***}	766 ^{***}	3	سرب Pb
337	0.044	36.1	12	خطا Error

^{ns}، *، ** و *** به ترتیب غیرمعنی 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.



شکل ۲- درصد کلنیزاسیون ریشه گیاه شبدر سفید همزیست با قارچ رایزوفانگوس ایرگولاریز در سطوح مختلف سرب. میانگین‌های دارای حداقل یک حرف لاتین مشترک فاقد اختلاف معنی دار به روش آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد هستند.

Figure 2. Root colonization of white clover colonized by *R. irregularis* at different Levels of Pb. Means followed by the same superscript letters are not significantly different according to Duncan's multiple range test (P<0.05).

شد که با سایر سطوح سرب اختلاف معنی دار داشت. کم‌ترین تولید گلومالین در تیمار شاهد (۳ میکروگرم در میلی‌گرم وزن خشک ریشه) مشاهده گردید (شکل ۳-A). افزایش تولید گلومالین توسط قارچ همزیست در ریشه‌های کلنیزه شده با افزایش غلظت سرب (به ترتیب افزایش ۱/۵۸، ۱/۸۴ و ۲/۶ برابر نسبت به سطح صفر) این فرضیه را که نقش اولیه و اصلی

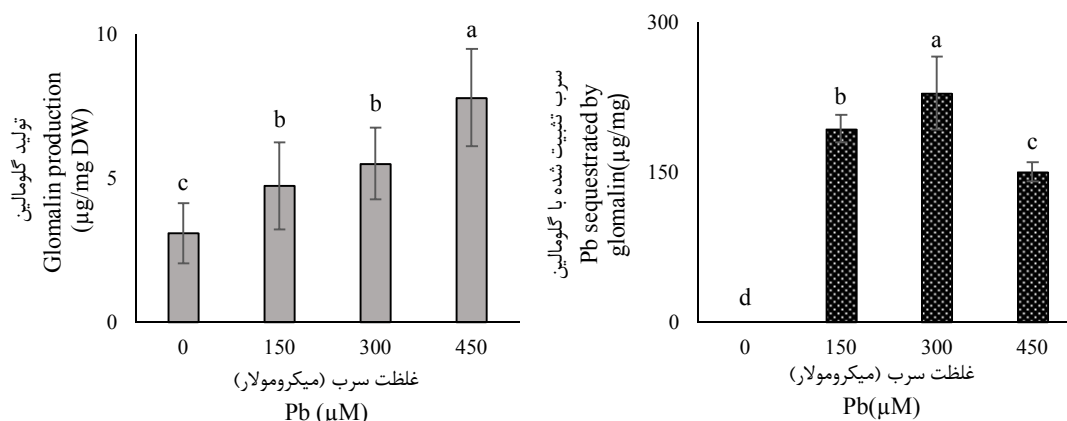
تولید گلومالین واکنش‌پذیر با آنتی‌بادی: اثر سطوح مختلف سرب بر تولید گلومالین واکنش‌پذیر با آنتی‌بادی معنی دار گردید (جدول ۵). به طوری که با افزایش غلظت سرب، گلومالین واکنش‌پذیر با آنتی‌بادی به طور مشخصی افزایش یافت. بیش‌ترین مقدار تولید گلومالین در سطح ۴۵۰ میکرومولار سرب (۷/۸ میکروگرم در گرم وزن خشک ریشه) حاصل

ثانویه بوده و به‌طور ضمنی روی می‌دهد (۴۰). قابل‌تصور است که گلومالین نقش حفاظتی در زندگی قارچ ایفا کند، چون که قارچ AM بسیاری از منابع (به‌طور عمده کربن و نیتروژن) را به تولید گلومالین اختصاص می‌دهد (۴۲).

مقدار سرب تثبیت‌شده با گلومالین: اثر سطوح سرب بر تثبیت توسط گلومالین ریشه معنی‌دار بود (جدول ۵). با افزایش غلظت سرب، مقدار سرب تثبیت‌شده با گلومالین ریشه افزایش یافت. بیش‌ترین سرب تثبیت شده توسط گلومالین ریشه با مقدار ۲۲۹ (میکروگرم در میلی‌گرم گلومالین) در تیمار ۳۰۰ میکرومولار سرب حاصل شد که با سایر سطوح تفاوت معنی‌دار داشت (شکل B-۳). کاهش مقدار سرب تثبیت‌شده توسط گلومالین در سطح ۴۵۰ میکرومولار با توجه به بیش‌ترین مقدار گلومالین تولیدی در این سطح، احتمالاً می‌تواند به‌دلیل اشباع نشدن گلومالین از سرب باشد. بنابراین احتمال می‌رود ظرفیت گلومالین برای تثبیت سرب بیش از مقادیر گزارش شده باشد. گونزالز-چاوز و همکاران (۱۷) بیان نمودند گلومالین تولیدی توسط ریشه‌های مایکوریزی سورگوم همزیست با گلوموس موسه^۱ در کاهش قابلیت دسترسی زیستی و سمیت مس نقش فعالی دارد. آن‌ها همچنین دریافتند که با افزایش سمیت ناشی از فلزهای سنگین، تولید گلومالین توسط قارچ AM افزایش پیدا می‌کند. بنابراین گلومالین به واسطه حضور در دیواره هیف و اسپور قارچ‌های AM، ریشه‌های کلنیزه شده و نیز محیط رشد آن در تثبیت سرب نقش ایفا می‌کند و می‌تواند به‌عنوان مولکول مؤثر در ناپویایی و سمیت‌زدایی سرب در ریشه گیاهان مایکوریزی باشد.

گلومالین حفاظت از قارچ و گیاه همزیست در شرایط تنش می‌باشد، را تقویت می‌کند. بنابراین نقش گلومالین در پایداری خاکدانه‌ها و بهبود ساختمان خاک و جایگاه آن به‌عنوان منبع ذخیره کربن و نیتروژن دارای اهمیت ثانویه خواهد بود (۵۰ و ۵۶). در شمار کمی از پژوهش‌های پیشین گلومالین به‌عنوان همولوگ پروتئین شوک حرارتی ۶۰ شناخته شده است که نوعی پروتئین القایی تنش می‌باشد، بنابراین پیشنهاد شده است که گلومالین در شرایط تنش وظیفه حفاظتی برای قارچ‌های AM ایفا می‌کند (۱۱). نتایج مطالعه حاضر نیز می‌تواند گواهی بر این مطلب می‌باشد، زیرا با افزایش تنش سرب مقدار گلومالین واکنش‌پذیر با آنتی‌بادی افزایش پیدا کرد. پروتئین‌های شوک حرارتی به‌واسطه فعالیت چاپرونی از تغییر شکل پروتئین‌های ضروری و مهم مسیرهای متابولیکی حیاتی با افزایش بیان در تنش‌های بیوفیزیکوشیمیایی جلوگیری می‌کند (۹). بنابراین احتمال می‌رود گلومالین نیز به‌عنوان همولوگ پروتئین شوک حرارتی، سازوکار حفاظتی جهت افزایش بردباری و زنده‌مانی گیاهان مایکوریزی در شرایط تنش سرب در غلظت چهار تا پنج برابری سرب ریشه در مقایسه با اندام‌هوایی باشد. نتایج گاکار و ریلیگ (۲۰۰۶) نیز تأیید می‌کند که مایسلیم‌های قارچ مایکوریزی محل اصلی بیان گلومالین می‌باشند (۱۱). هم‌چنین پورین و ریلیگ (۲۰۰۸) با استفاده از میکروسکوپی پراش الکترون، موقعیت سلولی گلومالین را در نمونه‌های تیمار شده با آنتی‌بادی منوکلونال ۳۲B۱۱ مورد بررسی قرار دادند، آن‌ها واکنش‌پذیری با آنتی‌بادی بیش‌تری در دیواره هیف و اسپورها در مقایسه با سیتوپلاسم مشاهده کردند. بنابراین آن‌ها استدلال کردند که گلومالین توسط قارچ‌های AM در جهت حفاظت آن‌ها تولید می‌گردد و نقش‌های کارکردی گلومالین در خاک به‌عنوان نقش

1- *Glomus mosseae*



شکل ۳- تولید گلومالین (A) و سرب تثبیت شده توسط گلومالین در ریشه (B) گیاه شبدر سفید همزیست با قارچ رایزوفیگوس ایرگولاریز در سطوح مختلف سرب. میانگین‌های دارای حداقل یک حرف لاتین مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار به روش آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد هستند.

Figure 3. Glomalin production (A) and Pb-sequestrated by root-glomalin (B) of white clover colonized by *R. irregularis* at different Levels of Pb. Means followed by the same superscript letters are not significantly different according to Duncan's multiple range test ($P < 0.05$).

افزایش تثبیت و ناپویایی سرب در خاک‌های آلوده به‌کارگیری روش‌هایی است که منجر به تقویت همزیستی AM در گیاهان شود. نکته قابل‌توجه در اهمیت گلومالین به‌عنوان محصول اختصاصی قارچ‌های AM در تثبیت فلزهای سمی در خاک‌های آلوده، تجزیه آهسته این گلیکوپروتئین پایدار از نظر زیست‌محیطی می‌باشد. این ویژگی، لزوم پژوهش‌های بیشتر درباره گلومالین و شفاف‌سازی نقش آن در سمیت‌زدایی فلزهای سمی را بیش از پیش مشخص می‌کند.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این پژوهش نشان داد، با توجه به آلودزش بیش‌تر سرب در ریشه گیاه شبدر نسبت به اندام‌هوایی، این گیاه در تثبیت ریشه‌ای سرب کارآمدتر است. هم‌چنین، می‌توان پیشنهاد داد که افزایش تحمل گیاهان مایکوریزی با وجود کارایی جذب گیاهی بیش‌تر در مقایسه با گیاهان غیرمایکوریزی به‌همراه سهم بیش‌تر جذب سرب در ریشه، می‌تواند به‌دلیل تثبیت سرب توسط ترکیبات اصلی دیواره یاخته‌ای اندام‌های قارچی از جمله گلومالین باشد. بنابراین، یکی از راه‌کارهای عملی و دوست‌دار محیط‌زیست برای

منابع

1. Andrade, S.A.L., Abreu, C.A., de Abreu, M.F., and Silveira, A.P.D. 2004. Influence of lead addition on arbuscular mycorrhiza and *Rhizobium* symbioses under soybean plants. *Applied Soil Ecology*. 26: 2. 123-131.
2. Audet, P., and Charest, C. 2006. Effects of AM colonization on 'wild tobacco' grown in zinc contaminated soil. *Mycorrhiza*. 16: 4. 277-283.
3. Barber, S.A. 1984. *Soil Nutrient Bioavailability. A Mechanistic Approach*. John Wiley and Sons, New York, USA. 398p.
4. Chen, X., Wu, C., Tang, J., and Hu, S. 2005. Arbuscular mycorrhizae enhance metal lead uptake and growth of host plants under a sand culture experiment. *Chemosphere*. 60: 5. 665-671.

5. Cottenie, A. 1980. Methods of Plant Analysis. In: Soil and Plant Testing. FAO Soils Bulletin, NO 38/2, Pp: 94-100.
6. de Andrade, S.A.L., da Silveira, A.P.D., Jorge, R.A., and de Abreu, M.F. 2008. Cadmium accumulation in sunflower plants influenced by arbuscular mycorrhiza. *Inter. J. Phytoremed.* 10: 1-13.
7. de Souza, L.A., de Andrade, S.A.L., de Souza, S.C.R., and Schiavinato, M.A. 2012. Arbuscular mycorrhiza confers Pb tolerance in *Calopogonium mucunoides*. *Acta Physiologiae Plantarum.* 34: 2. 523-531.
8. 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.
9. 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. *J. Thermal Biol.* 30: 8. 595-602.
10. Ferrol, N., Tamayo, E., and Vargas, P. 2016. The heavy metal paradox in arbuscular mycorrhizas: from mechanisms to biotechnological applications. *J. Exp. Bot.* 67: 22. 6253-6265.
11. 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.
12. Garg, N., Singh, S., and Kashyap, L. 2017. Arbuscular mycorrhizal fungi and heavy metal tolerance in plants: An insight into physiological and molecular mechanisms. P 75-97, In: Varma, A., R. Prasad and N. Tuteja (eds.), *Mycorrhiza-Nutrient Uptake, Biocontrol, Ecorestoration.* Springer, Cham, Switzerland.
13. Gaur, A., and Adholeya, A. 2004. Prospects of arbuscular mycorrhizal fungi in phytoremediation of heavy metal contaminated soils. *Current Science.* 86: 528-534.
14. Giasson, P., Jaouich, A., Gagné, S., and Moutoglis, P. 2005. Phytoremediation of zinc and cadmium: A study of arbuscular mycorrhizal hyphae. *Remediation.* 15: 113-122.
15. Gil-Cardesa, M.L., Ferri, A., Cornejo, P., and Gomez, E. 2014. Distribution of chromium species in a Cr-polluted soil: presence of Cr(III) in glomalin related protein fraction. *Science of the Total Environment.* 493: 828-833.
16. Gohre, V., and Paszkowski, U. 2006. Contribution of the arbuscular mycorrhizal symbiosis to heavy metal phytoremediation. *Planta.* 223: 6. 1115-1122.
17. 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: 3. 317-323.
18. González-Guerrero, M., Melville, L.H., Ferrol, N., Lott, J.N.A., Azcón-Aguilar, C., and Peterson, R.L. 2008. Ultrastructural localization of heavy metals in the extraradical mycelium and spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Can. J. Microbiol.* 54: 2. 103-10.
19. Gupta, D.K., Nicolosa, F.T., Schetinger, M.R.C., Rossato, L.V., Pereira, L.B., Castro, G.Y., Srivastava, S., and Tripathi, R.D. 2009. Antioxidant defense mechanism in hydroponically grown *Zea mays* seedlings under moderate lead stress. *J. Hazard. Mater.* 172: 479-484.
20. Hall, J.L. 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J. Exp. Bot.* 53: 366. 1-11.
21. 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.
22. Hildebrandt, U., Regvar, M., and Bothe, H. 2007. Arbuscular mycorrhiza and heavy metal tolerance. *Phytochemistry.* 68: 1. 139-146.
23. Hutchinson, J.J., Young, S.D., Black, C.R., and West, H.M. 2004. Determining uptake of radio-labile soil cadmium by arbuscular mycorrhizal hyphae using isotopic dilution in a compartmented-pot system. *New Phytologist.* 164: 3. 477-484.

24. Jankong, P., and Visoottiviseth, P. 2008. Effects of arbuscular mycorrhizal inoculation on plants growing on arsenic contaminated soil. *Chemosphere*. 72: 7. 1092-1097.
25. 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.
26. Jansa, J., Finlay, R., Wallander, H., Smith, F.A., and Smith, S.E., 2011. Role of mycorrhizal symbioses in phosphorus cycling. In: *Phosphorus in action*. Soil Biology. Springer, Berlin, Heidelberg, Pp: 137-168.
27. Kabata-Pendias, A. 2011. Trace Elements in Soils and Plants, 4th ed. CRC Press/Taylor and Francis, Boca Raton, USA. 548p.
28. Kormanik, P.P., and McGraw, A.C. 1982. Quantification of vesicular-arbuscular mycorrhizae in plant roots. P 37-45, In: N.C. Schenck, (ed.), *Methods and Principles of Mycorrhizal Research*, American Phytopathological Society, Saint Paul, MN.
29. Liang, C., Li, T., Xiao, Y., Liu, M.L., Zhang, H.B. and Zhao, Z.W. 2009. Effects of inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi on maize grown in multi-metal contaminated soils. *Inter. J. Phytoremed.* 11: 8. 692-703.
30. Lingua, G., Franchin, C., Todeschini, V., Castiglione, S., Biondi, S., Burlando, B., Parravicini, V., Torrigiani, P., and Berta, G. 2008. Arbuscular mycorrhizal fungi differentially affect the response to high zinc concentrations of two registered poplar clones. *Environmental Pollution*. 153: 137-147.
31. Lombi, E., Wenzel, W.W., Gobran, G.R., and Adriano, D.C. 2001. Dependency of metals on indigenous and induced rhizosphere processes: A review. P 3-24, In: G.R. Gobran, W.W. Wenzel and E. Lombi (eds.), *Trace Elements in the Rhizosphere*. CRC Press, Boca Raton, Florida.
32. Lopez, M.L., Peralta-Videa, J.R., Castillo-Michel, H., Martinez-Martinez, A., Duarte-Gardea, M., and Gardea-Torresdey, J.L. 2007. Lead toxicity in alfalfa plants exposed to phytohormones and ethylene diamine tetra acetic acid monitored by peroxidase, catalase and amylase activities. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 26: 12. 2717-2723.
33. Millner, P.D., and Kitt, D.G. 1992. The Beltsville method for soilless production of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*. 2: 9-15.
34. Nayuki, K., Chen, B., Ohtomo, R., and Kuga, Y. 2014. Cellular imaging of cadmium in resin sections of arbuscular mycorrhizas using synchrotron micro X-ray fluorescence. *Microbes and Environments*. 29: 60-66.
35. Nichols, K.A., and Wright, S.F. 2005. Comparison of glomalin and humic acid in eight native United State soils. *Soil Science*. 170: 12. 985-997.
36. Pawlowska, T.E., and Charvat, I. 2004. Heavy-metal stress and developmental patterns of arbuscular mycorrhizal fungi. *Applied and Environmental Microbiology*. 70: 11. 6643-6649.
37. Peer, W., Baxter, I., Richards, E., Freeman, J., and Murphy, A. 2005. Phytoremediation and hyperaccumulator plants. 14: P 299-340, In: M. Tamas and E. Martinoia (eds.), *Topics in Current Genetics, Molecular Biology of Metal Homeostasis and Detoxification*. Springer, Berlin.
38. Pellegrino, E., and Bedini, S. 2014. Enhancing ecosystem services in sustainable agriculture: biofertilization and biofortification of chickpea (*Cicer arietinum* L.) by arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biology and Biochemistry*. 68: 429-439.
39. Pourmoradi, S., and Jafari, A.A. 2011. Evaluation of forage yield and quality traits in seven varieties of white clover grown in rangelands of Mazandaran province, Iran. *Iran. J. Range Des. Res.* 17: 4. 615-623. (In Persian)
40. Purin, S., and Rillig, M.C. 2008. Immunocytochemical localization of glomalin in the mycelium of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Soil Biology and Biochemistry*. 40: 4. 1000-1003.

41. Rabie, G.H. 2005. Contribution of AM fungus to red kidney and wheat plants tolerance grown in heavy metal-polluted soil. *Afric. J. Biotechnol.* 4: 4. 332-345.
42. 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: 9. 1371-1374.
43. Rosier, C.L., Hoyer, A.T., and Rillig, M.C. 2006. Glomalin-related soil protein: Assessment of current detection and qualification tools. *Soil Biology and Biochemistry.* 38: 8. 2205-2211.
44. Seregin, I.V., and Ivanov, V.B. 2001. Physiological aspects of cadmium and lead toxic effects on higher plants. *Russ. J. Plant Physiol.* 48: 4. 523-544.
45. Sheikh-Assadi, M., Khandan-Mirkohi, A., Alemardan, A., and Moreno-Jiménez, E. 2015. Mycorrhizal *Limonium sinuatum* (L.) mill. Enhances accumulation of lead and cadmium. *Inter. J. Phytoremed.* 17: 6. 556-562.
46. Smith, S.E., and Read, D.J. 1997. Mycorrhizal symbiosis, 2nd ed. Academic Press, San Diego, California. 605p.
47. Soleimani, M., Akbar, S., and Hajabbasi, M.A. 2011. Enhancing Phytoremediation Efficiency in Response to Environmental Pollution Stress. P 1-14, In: H.K.N., Vasanthaiah, and D.M. Kambiranda (eds.), *Plants and Environment*, In Tech-Open Access Publisher.
48. Subramanian, K.S., Balakrishnan, N., and Senthil, N. 2013. Mycorrhizal symbiosis to increase the grain micronutrient content in maize. *Austr. J. Crop Sci.* 7: 7. 900-910.
49. Sudova, R., and Vosatka, M. 2007. Differences in the effects of three arbuscular mycorrhizal fungal strains on P and Pb accumulation by maize plants. *Plant and Soil.* 296: 77-83.
50. Vaidya, G.S., Rillig, M.C., and Wallander, H. 2011. The role of glomalin in soil erosion. *Scientific World.* 9: 9. 82-85.
51. Vogel-Mikuš, K., Drobne, D., and Regvar, M. 2005. Zn, Cd and Pb accumulation and arbuscular mycorrhizal colonization of pennycress *Thlaspi praecox* Wulf. (*Brassicaceae*) from the vicinity of a lead mine and smelter in Slovenia. *Environmental Pollution.* 133: 2. 233-242.
52. 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.
53. Wang, F., Li, X., and Yin, R. 2005. Heavy metal uptake by arbuscular mycorrhizas of *Elsholtzia splendens* and the potential for phytoremediation of contaminated soil. *Plant and Soil.* 269: 225-232.
54. 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.* 51:2. 99-109.
55. 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.
56. 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: 2. 193-203.
57. Wright, S.F., and Upadhyaya, A. 1996. Extraction of an abundant and unusual protein from soil and comparison with hyphal protein from arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Science.* 161: 575-586.
58. Wu, C., Chen, X., and Tang, J. 2005. Lead accumulation in weed communities with various species. *Communications in Soil Science and Plant Analysis.* 36: 13-14. 1891-1902.

59. Wu, S., Zhang, X., Chen, B., Wu, Z., Li, T., Hu, Y., Sun, Y., and Wang, Y. 2016. Chromium immobilization by extraradical mycelium of arbuscular mycorrhiza contributes to plant chromium tolerance. *Environmental and Experimental Botany*. 122: 10-18.
60. Zhu, J., Zhang, C., and Lynch, J.P. 2010. The utility of phenotypic plasticity for root hair length for phosphorus acquisition. *Functional Plant Biology*. 37: 313-322.



The effect of glomalin on root stabilization of lead in clover plant inoculated with *Rhizophagus irregularis* fungus

*E. Malekzadeh¹ and N. Aliasgharzad²

¹Ph.D. Graduate of University of Tabriz and Assistant Prof., Dept. of Soil Science, Gorgan University of Agricultural Science and Natural Resources, ²Professor, Dept. of Soil Science, University of Tabriz

Received: 12.31.2018; Accepted: 02.02.2019

Abstract

Background and Objectives: Root stabilization of toxic metals by mycorrhizal plants is one of the protective mechanisms of symbiotic arbuscular mycorrhizal (AM) fungi in response to metal stress. Role of the glomalin as a specific glycoprotein of spore and hyphal cell wall of AM fungi can be remarkable in sequestration of toxic metals and reduction of stress effects on host plant. Considering this hypothesize, the study was conducted to investigate the role of glomalin produced by *Rhizophagus irregularis* fungus symbiosis of clover plant in root stabilization of Pb.

Materials and Methods: A pot culture experiment was performed as completely randomized block design by two factors including AM fungus (inoculated with *R. irregularis* and non-inoculated) and four levels of Pb⁺² (0, 150, 300 and 450 μM) with five replications. For glomalin extraction, root samples were autoclaved at 121 °C with 50 mM sodium citrate buffer for 1 hr in three cycles. Glomalin concentration in the extracted samples were determined by ELISA method using monoclonal antibody 32B11. After precipitation of the glomalin and its digestion in concentrated nitric acid, Pb-sequestered by the glomalin were measured. Shoot and root dry weights, root colonization percentage, shoot and root P and Pb contents, and plant uptake, extraction and translocation efficiency of Pb were assessed.

Results: Shoot and root dry weights of mycorrhizal (M) and non-mycorrhizal (NM) plants were decreased by increasing of Pb levels. At the levels of 150, 300 and 450 μM Pb, shoot and root dry weights were decreased by 11.2%, 12.9%, 18.3% and 7.5%, 18.1%, 36.7% compared to the control (0 μM Pb), respectively. Shoot and root dry weights of M plants were increased by 24.9% and 43.2% compared to the NM ones. P contents of shoot and root were affected by AM fungus, so that the shoot and root P contents of M plants were increased by 32.2% and 45.8% compared to the NM ones. At different levels of Pb, shoot and root Pb contents in M plants significantly were higher than NM ones. Maximum contents of Pb of shoot and root were recorded at level of 450 μM Pb in M plants which were increased by 46.5% and 80.7% compared to the NM ones at the same level. At the levels of 150, 300 and 450 μM Pb, the uptake efficiency of Pb in M plants was increased by 8%, 14.5% and 80.7% compared to the NM ones at the same levels. Based on ANOVA results, Pb-extraction and translocation efficiency were affected by Pb treatments. Pb-extraction efficiency of plants was increased as Pb concentration increased, so that the content of Pb-extraction efficiency at 450 μM of Pb was increased by 69.3% and 27.8% compared to the 150 and 300 μM of Pb, respectively. Plant Pb-translocation efficiency from root to shoot was decreased as Pb concentration increased. The percentage of root colonization was increased as the Pb concentration increased up to 300 μM Pb and then was slightly decreased as the level of Pb rose from 300 to 450 μM, but there was no significant difference between the levels of 150, 300 and 450 μM Pb. Glomalin production in root and Pb sequestered by glomalin was significantly increased as Pb concentration increased.

* Corresponding Author; Email: malekzadeh.elham@gmail.com

Conclusion: Root colonization of clover plant by *R. irregularis* led to improved growth and phosphorus nutrition of M plants compared to the NM ones, under Pb stress condition. Pb uptake was greater in roots than in shoots, therefore the clover plants played a more effective role in root stabilisation of Pb. Also, root Pb content in M plants was higher than that in NM ones, which it can be due to sequestration of Pb in fungal structures inside the roots. Induced glomalin production in mycorrhizal roots as a critical and effective component of fungus spores and hyphal cell wall, played an important role in Pb root stabilization of M plants. Glomalin through complex formation with Pb reduces its availability and toxicity and protects plants from toxic concentration of Pb.

Keywords: AM fungus, Bioremediation, Biostabilisation, ELISA, Toxic metal