تولید گلومالین توسط *رایزوفاگوس ایرگولاریز* در شرایط درون شیشه‌ای و کشت گلدانی شبدر سفید و نقش آن در غیرپویایی سرب

الهام ملک زاده[1]، ناصر علی‌اصغرزاد و جعفر مجیدی

دانشجوی دکتری بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز؛ **malekzadeh.elham@gmail.com**

استاد گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز؛ **n-aliasghar@tabrizu.ac.ir**

استاد گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز؛ **jmajidiz@yahoo.com**

دریافت: **94/4/23** و پذیرش: **94/11/6**

چکیده

گلومالین، به عنوان گلیکوپروتئین تولید شده توسط قارچ‌های میکوریزی در غیرپویایی فلزات سنگین در خاک اهمیت دارد و با توجه به این پیش فرض که تنش ناشی از فلز سنگین می‌تواند میزان تولید گلومالین و در پی آن فلز کمپلکس شده توسط آن را افزایش دهد، پژوهشی به صورت گلدانی و درون شیشه‌ای طراحی گردید. مقدار گلومالین کل واکنش‌پذیر بردفورد استخراجی از بخش هیفی و مقدار سرب کمپلکس شده توسط آن در کشت گلدانی و درون شیشه‌ای مورد بررسی قرار گرفتند. آزمون گلدانی در بستر شنی به همراه گیاه شبدر سفید میکوریزی‌شده با قارچ *رایزوفاگوس ایرگولاریز* و تیمار شده با چهار سطح 0، 150، 300 و 450 میکرومولار سرب انجام گرفت. آزمون درون شیشه‌ای در ظروف پتری دو بخشی حاوی ریشه‌های تراریخت هویج میکوریزی‌شده با همان قارچ و تیمار شده با چهار سطح 0، 0/01، 0/1 و 1 میلی‌مولار سرب از منبع نیترات سرب مورد بررسی قرار گرفت. همبستگی مشخصی بین شاخص‌های میکوریزی شامل وزن خشک هیف‌های خارج سلولی قارچ و درصد فراوانی هیف به ترتیب با میزان گلومالین تولیدی در بخش هیفی کشت گلدانی و درون شیشه‌ای مشاهده نگردید. همچنین با افزایش غلظت سرب، مقدار گلومالین استخراجی از بخش هیفی کشت گلدانی و درون شیشه‌ای به طور معنی‌داری نسبت به شاهد (فاقد تیمار سرب) افزایش یافت. مقدار سرب کمپلکس شده توسط گلومالین با افزایش سطح سرب و نیز افزایش تولید گلومالین به طور معنی‌داری افزایش یافت که بیانگر همبستگی مثبت و معنی‌دار بین گلومالین هیفی واکنش‌پذیر بردفورد با مقدار سرب کمپلکس‌شده توسط گلومالین می‌باشد. نتایج این مطالعه نقش گلومالین را در غیرپویایی سرب و اهمیت آن در استفاده از فناوری تثبیت گیاهی در خاک‌های آلوده به سرب نشان می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: تثبیت گیاهی، فلز سنگین، قارچ‌های میکوریز آربوسکولار و گلومالین

[1] نویسنده مسوول، آدرس: تبریز، دانشگاه تبریز، دانشکده کشاورزی، گروه علوم و مهندسی خاک

مقدمه

گلومالین گلیکوپروتئین حاصل از قارچ‌های راسته گلومرال و رده گلومرومایکوتا می‌باشد که به عنوان ترکیبی از دیواره هیف و اسپورهای قارچ‌های AM[1] شناخته شده است (درایور و همکاران، 2005؛ رایت و همکاران، 1996). ساختار بیوشیمیایی گلومالین هنوز کاملاً شناخته نشده است، اما گلیکوپروتئینی پایدار، نامحلول در آب و مقاوم به تجزیه حرارتی می‌باشد که از 3-5 % نیتروژن، 49-59% کربن، 4-6% هیدروژن، 33-49% اکسیژن، 0/1-0/03 % فسفر و 8/8-0/8 % آهن تشکیل شده است (شنلر و همکاران، 2007؛ لاولوک و همکاران، 2004a؛ ریلیگ و همکاران، 2001؛ رایت و آپادایا، 1998؛ رایت و همکاران، 1996).

عوامل متعددی بر میزان تولید گلومالین تأثیرگذار است که برای روشن شدن نحوه اثرپذیری گلومالین از آن‌ها بایستی مطالعات بیشتری صورت گیرد (رایت و همکاران، 2007؛ پورین و ریلیگ، 2007؛ ریلیگ و همکاران، 2003؛ ریلیگ و استینبرگ، 2002؛ رایت و همکاران، 1999)، نکته قابل توجه این است که بین شاخص‌های میکوریزی با میزان تولید گلومالین همواره همبستگی مشاهده نشده است (بای و همکاران، 2009؛ تایسیدیر و ترنر، 2007؛ لوتگن و همکاران، 2003). بنابراین پاسخ قارچ‌های AM بر میزان گلومالین تولیدی بر اساس گونه قارچ، نوع گیاه میزبان و شرایط محیطی متفاوت می‌باشد (بدینی و همکاران، 2009؛ نیکولز و رایت، 2004؛ لاولوک و همکاران 2004b). گلومالین در پایداری خاکدانه‌ها و ذخیره کربنی و نیتروژنی خاک نقش دارد (استینبرگ و ریلیگ، 2003؛ ریلیگ و همکاران، 2001؛ رایت و آپادایا، 1996)، در سال‌های اخیرا نیز مطالعات محدودی نقش گلومالین را در غیرپویایی فلزات سنگین و فرآیند تثبیت گیاهی گزارش کردند (کورنخو و همکاران، 2008؛ گونزالز-چاوز و همکاران، 2004).

در تثبیت گیاهی، فلزات سنگین در خاک یا ریشه گیاه غیرپویا شده و از انتقال آن‌ها به اندام‌هوایی ممانعت می‌گردد (گورا و پازکووسکی، 2006). گونزالز-چاوز و همکاران (2004) اظهار داشتند گلومالین در کاهش قابلیت دسترسی زیستی و سمیت فلزات سمی نظیر کادمیوم و سرب نقش فعالی دارد. همچنین کورنخو و همکاران (2008) نیز گزارش کردند که حدود 28 % مس و 6 % روی توسط گلومالین وابسته به پروتئین خاک[2] (GRSP) در خاک هایی با آلودگی بالا به فلزات سنگین غیرپویا می‌گردد. آن‌ها همچنین مشاهده کردند که با افزایش سمیت ناشی از فلزات سنگین، تولید گلومالین توسط قارچ‌های AM افزایش می‌یابد. شواهد دیگری نیز مبنی بر افزایش تولید گلومالین با افزایش تنش‌های محیطی گزارش شده است (هامر و ریلیگ، 2011؛ پورین و ریلیگ، 2007). گاکار و ریلیگ (2006) با استفاده از کروماتوگرافی مایع- اسپکترومتری جرمی پشت سرهم[3] نشان دادند که گلومالین نوعی پروتئین شوک حرارتی[4] (60) می‌باشد که این مطلب توسط مطالعات دیگر نیز تأیید شده است (پورین و ریلیگ، 2007؛ گاکار و ریلیگ، 2006؛ درایور و همکاران، 2005؛ ریلیگ و استینبرگ، 2002)، که گلومالین به عنوان یک پروتئین القایی تحت تنش ممکن است وظیفه حفاظتی از قارچ‌های AM را بر عهده داشته باشد.

مطرح شدن گلومالین به عنوان پروتئین شوک حرارتی مشخص می‌کند که چطور ممکن است تنش ناشی از فلزات سنگین به سرعت تولید گلومالین توسط قارچ‌های AM را در خاک‌های آلوده افزایش دهد (کورنخو و همکاران، 2008). سنجش پروتئین واکنش‌پذیر بردفورد روش عمومی برای اندازه‌گیری پروتئین می‌باشد (بردفورد، 1976) و گرچه روش بردفورد[5] برای گلومالین اختصاصی نیست، معمولاً همبستگی مثبت و معنی‌داری بین مقادیر روش الایزا[6] و بردفورد مشاهده شده است (هارنز و همکاران، 2004؛ رایت و آپادایا، 1999، 1998، 1996). همچنین، سنجش بردفورد، ممکن است دقیق‌تر از الایزا باشد به دلیل اینکه روش بردفورد به مراحل پیپت کردن کمتری نیاز دارد (روزیر و همکاران، 2008). از سوی دیگر، سنجش بردفورد سریع‌تر و آسان‌تر بوده و زحمت و کار فنی کمتری در مقایسه با روش الایزا می‌طلبد.

در نتیجه، روش بردفورد، روش معمول‌تر برای اندازه‌گیری گلومالین می‌باشد. ریلیگ و همکاران (2003)، بدینی و همکاران (2009) و کولیر و همکاران (2009a،b) در میان سایر محققان، برای اندازه‌گیری GRSP فقط از روش بردفورد استفاده کردند. با اینکه روش بردفورد روش کمتر اختصاصی برای گلومالین می‌باشد اما این محققان اذعان داشتند که تحت شرایط کنترل شده آزمایشگاهی با حذف ماده آلی و منابع واکنش‌پذیر بردفورد، این روش می‌تواند در اندازه‌گیری گلومالین مفید

---

1. Arbuscular mycorrhizal fungi
2. Glomalin related soil protein
3. Tandem liquid chromatography-mass spectrometry
4. Heat shock protein
5. Bradford
6. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

باشد (روزیر و همکاران، 2006؛ لاولوک و همکاران، 2004a؛ رایت و آپادایا، 1999). بنابراین با توجه به نقش مهم و کلیدی گلومالین در غیرپویایی فلزات سنگین، مطالعه‌ای به منظور بررسی اثر فلز سنگین سرب بر میزان گلومالین هیفی واکنش‌پذیر بردفورد و سرب کمپلکس‌شده توسط گلومالین در شرایط کشت گلخانه‌ای و درون شیشه‌ای مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

کشت درون شیشه‌ای

برای این منظور، از ظروف پتری دو بخشی[1] استفاده گردید. بخش ریشه‌ای (15 میلی‌لیتر) حاوی محیط MSR، فاقد بافر MES (pH=6) و بخش هیفی (15 میلی‌لیتر) فاقد قند و تیمار شده با غلظت‌های مختلف سرب و حاوی بافر MES 10 میلی‌مولار (pH=6) بود. پس از اتوکلاو، سرب در غلظت‌های 0، 0/01، 0/1 و 1 میلی‌مولار از منبع نیترات سرب پس از استریل با فیلتر به بخش هیفی اضافه شد. جهت یکسان‌سازی اثر نیترات در تمامی تیمارها، نیتروژن به صورت نیترات سدیم ($NaNO_3$) در مقادیر مساوی با نیتروژن اضافی در بالاترین سطح سرب، به سایر تیمارها اضافه گردید. برای مایه‌زنی بخش ریشه‌ای ظروف پتری، قطعه‌ای از محیط کشت MSR حاوی ریشه‌های تراریخت Ri T-DNA گیاه هویج (*Daucus carota* L.) از پیش میکوریزی‌شده با قارچ *رایزوفاگوس ایرگولاریز* که حاوی 10 اسپور بود، مورد استفاده قرار گرفت. ظروف پتری به مدت 20 هفته در تاریکی و در دمای ^0C 2±30 داخل انکوباتور قرار گرفتند (پاولوسکا و چاروات 2004). جهت استخراج بخش هیفی، از بافر 10 میلی‌مولار سیترات سدیم (^0C 30، pH=6) استفاده گردید. برای تعیین درصد فراوانی هیف و اسپور در بخش هیفی از روش تغییر یافته آنوود و همکاران (1996) استفاده گردید.

تهیه زادمایه قارچ

قارچ *رایزوفاگوس ایرگولاریز* همزیست با ریشه‌های تراریخت گیاه هویج از دپارتمان بیولوژی دانشگاه لوند سوئد اخذ گردید. برای تهیه زادمایه قارچی، تحت شرایط استریل زیر هود لامینار شش پلیت حاوی کشت درون شیشه‌ای ریشه‌های تراریخت گیاه هویج میکوریزی شده با *رایزوفاگوس ایرگولاریز* پس از برش به قطعات حدودا یک سانتی‌متری با شن استریل-عاری از گلومالین و عبوریافته از الک 0/5 میلی‌متری کاملا مخلوط گردیدند.

کشت گلدانی

برای تهیه بستر کشت گلدانی از شن عبور یافته از الک دو میلی‌متری استفاده گردید، شستشو با آب تا جایی ادامه یافت که تمام ذرات سیلت و رس حذف گردید. سپس، جهت حذف مواد آلی و نیز گلومالین احتمالی موجود در سطح ذرات شن، ابتدا شستشو با اسید کلریدریک 3 نرمال و سپس استخراج با بافرسیترات سدیم 50 میلی‌مولار (pH=8، اتوکلاو به مدت یک ساعت در دمای ^0C 121 و فشار 1/1 اتمسفر) انجام گرفت (گونزالز-چاوز و همکاران، 2004). پس از استخراج با بافر، شن هوا خشک و سپس به مدت یک ساعت در دمای ^0C 121 اتوکلاو گردید. شن استریل عاری از گلومالین در گلدان‌های 1500 گرمی به قطر دهانه 15سانتی‌متر توزیع گردید، به این ترتیب که گلدان‌ها با استفاده غشاء نایلونی با قطر منافذ 37 میکرون (NBC Meshtec Inc.) به دو بخش ریشه‌ای (800 گرم) و هیفی (700 گرم) تقسیم گردیدند. از بذرهای گیاه شبدر سفید (*Trifolium repens* L.)، تهیه شده از بانک ژن موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، به عنوان گیاه میزبان همزیست با قارچ *رایزوفاگوس ایرگولاریز* استفاده گردید.

به منظور حذف آلودگی‌های سطحی بذرها بعد از چندین بار شستشو با آب مقطر استریل و غوطه‌ورسازی در اتانول 70% (حجمی/حجمی) به مدت دو دقیقه، به داخل محلول هیپوکلریت 0/5% انتقال یافتند و بعد از ده دقیقه، حدود ده بار با آب مقطر استریل کاملاً شستشو گردیدند. 30 عدد بذر گیاه در بخش ریشه‌ای گلدان کشت گردید به طوری که 10 گرم از زادمایه قارچ *رایزوفاگوس ایرگولاریز* (تهیه شده مطابق فوق) به صورت لایه نازک در یک سانتی‌متری زیر بذور به طور یکنواخت پخش گردید. بعد از جوانه‌زنی و استقرار گیاهچه، تعداد آن‌ها به 20 عدد کاهش یافت. گیاهان در اتاقک رشد به مدت 16 هفته در شرایط دوره نوری 16 ساعت روشنایی (^0C 25) و 8 ساعت تاریکی (^0C 20) نگهداری شدند و از هفته دوم بعد از جوانه زنی یک روز در میان با محلول غذایی هوگلند (کیت و میلنر، 1992) حاوی سطوح مختلف 0، 150، 300 و 450 میکرومولار سرب از منبع نیترات سرب و حاوی بافر MES 0/5 میلی‌مولار برای حفظ pH= 6/1 آبیاری شدند. جهت یکسان‌سازی اثر نیترات در سایر تیمارها نسبت به تیمار 450 میکرومولار سرب، نیتروژن به صورت نیترات سدیم در مقادیر مساوی با نیتروژن اضافی در بالاترین سطح سرب، اضافه گردید (جانوسکووا و همکاران، 2005).

---

[1] Two compartment

گیاهان به مدت چهار هفته با محلول غذایی هوگلند حاوی نصف غلظت فسفر و بعد از آن با محلول غذایی کامل آبیاری شدند. بعد از سپری شدن دوره رشد، بخش هوایی گیاهان برداشت گردید و بخش هیفی از بخش ریشه‌ای جدا شده و بخش هیفی جهت استخراج گلومالین مورد استفاده قرار گرفت. جهت تعیین طول هیف قارچ در واحد وزن بستر شنی از روش تغییر یافته سیلویا (1988) برای استخراج ورنگ آمیزی هیف و از روش تقاطع خطوط شبکه برای تعیین طول هیف قارچ استفاده شد (نیومن، 1966).

سنجش گلومالین و سرب کمپلکس شده توسط گلومالین

جهت استخراج گلومالین، نمونه‌های هیفی در لوله‌های حاوی سیترات سدیم 50 میلی‌مولار (pH=8) به مدت یک ساعت در دمای ^0C 121 و طی سه سیکل متوالی داخل اتوکلاو قرار گرفتند. عصاره رویی حاصل از هر سیکل اتوکلاو بعد از سانتریفوژ به مدت 10 دقیقه در g 10000، با هم ترکیب شدند (روزیر و همکاران، 2006). بعد از استخراج گلومالین، هیف‌ها در دمای ^0C 70 خشک شده و توزین گشتند. بعد از کنار گذاشتن یک میلی‌لیتر از عصاره استخراجی جهت سنجش گلومالین، باقی مانده عصاره با افزودن آهسته اسید کلریدریک 1 نرمال در محدوده pH =2/5-2 و سپس با قرار گرفتن روی یخ به مدت 45 دقیقه و سانتریفوژ رسوب پیدا می‌کند. بعد از رسوب گلومالین، مقدار فلز سرب متصل شده پس از هضم با اسید نیتریک غلیظ (65%، Merck) به مدت 6 ساعت در دمای 80 با استفاده از دستگاه جذب اتمی (AA-6300 SHIMADZU) قرائت گردید. روش اصلاح شده سنجش پروتئین بردفورد برای اندازه‌گیری پروتئین کل واکنش‌پذیر بردفورد مورد استفاده قرار گرفت. برای این منظور، 200 میکرولیتر از عصاره استخراجی با 5 میلی‌لیتر از معرف رنگی کوماسی برلیانت بلو G-250 واکنش داده شد و پس از 5 دقیقه، جذب در طول موج 595 نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر (Hack DR/2000) قرائت گردید. غلظت پروتئین با استفاده از منحنی استاندارد تهیه شده توسط سرم آلبومین گاوی (BSA) در محدوده غلظت 10-0 میکروگرم تعیین گردید.

تجزیه و تحلیل آماری نتایج

کشت گلدانی و درون شیشه‌ای به ترتیب به صورت طرح بلوک کامل تصادفی در پنج تکرار و طرح کامل تصادفی در هشت تکرار اجرا شدند. آزمون نرمال بودن توزیع داده‌ها و سپس تجزیه واریانس و مقایسه میانگین داده‌ها به وسیله آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح معنی‌داری 5%، با استفاده از نرم افزار آماری IBM SPSS 22 انجام شد. تجزیه رگرسیون و ضریب همبستگی برای تشریح رابطه بین متغیرها مورد استفاده قرار گرفت. نمودارها با استفاده از نرم افزار Microsoft Excel رسم شدند.

نتایج

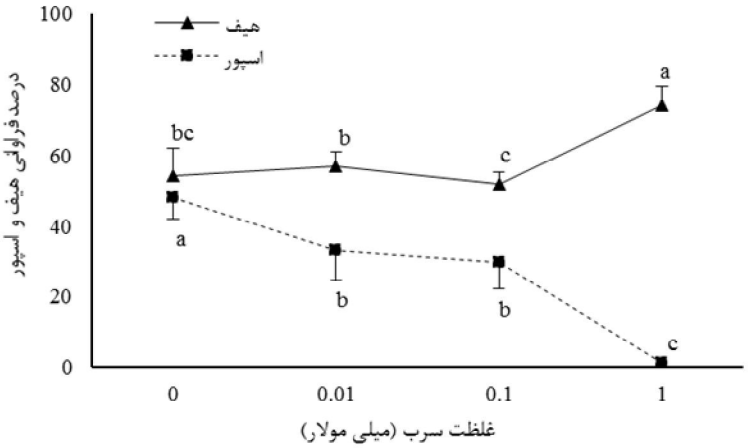
درصد فراوانی هیف و اسپور در کشت درون شیشه‌ای

بر اساس نتایج تجزیه واریانس داده‌ها، اثر سطوح مختلف سرب بر درصد فراوانی اسپور و هیف در سطح % 0/1 معنی‌دار گردید (جدول 1). با افزایش سطح سرب، درصد فراوانی هیف و اسپور در بخش هیفی کشت درون شیشه‌ای به ترتیب افزایش و کاهش یافت (سطح معنی‌داری 5%). بیشترین درصد فراوانی هیف (73/98) و کمترین درصد فراوانی اسپور (1/19) در سطح 1 میلی‌مولار سرب مشاهده گردید. به طوری که با افزایش سطح سرب از میزان اسپورزایی کاسته شد و توسعه قارچی در بخش هیفی به صورت گسترش هیف بود (شکل 1).

جدول 1- تجزیه واریانس اثر سطوح سرب بر شاخص‌های میکوریزی، گلومالین کل واکنش‌پذیر بردفورد و سرب کمپلکس‌شده با گلومالین بخش هیفی در کشت درون شیشه‌ای ریشه‌های تراریخت هویج میکوریزی‌شده با قارچ *رایزوفاگوس ایرگولاریز*

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات				
		وزن خشک هیف‌های خارج سلولی	درصد فراوانی هیف	درصد فراوانی اسپور	گلومالین	سرب کمپلکس‌شده با گلومالین
سرب	3	8/01***	3/2***	52/84***	19/93***	52617/62***
خطا	28	0/065	0/057	0/152	0/041	359/25

ns، *، ** و *** به ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌داری در سطح احتمال 5، 1 و 0/1 درصد



شکل 1- مقایسه میانگین درصد فراوانی هیف و اسپور قارچ *رایزوفاگوس ایرگولاریز* در بخش هیفی کشت درون شیشه‌ای در سطوح مختلف سرب. میانگین‌های دارای حداقل یک حرف لاتین مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد

طول هیف در کشت گلدانی

بر اساس نتایج تجزیه واریانس، اثر غلظت‌های مختلف سرب بر طول هیف درسطح 1% معنی‌دار گردید (جدول 2). با افزایش سطح سرب طول هیف در کشت گلدانی به طور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش یافت به طوری که بیشترین طول هیفی (83/34 سانتی‌متر در گرم شن بسترکشت) در تیمار 300 میکرومولار سرب بود و علی‌رغم کاهش ناچیز 3/7 درصدی در سطح 450 نسبت به سطح 300 میکرومولار سرب، اختلاف معنی‌دار آماری در سطح 5% بین سه سطح 150، 300 و 450 میکرومولار سرب مشاهده نگردید (شکل 2).

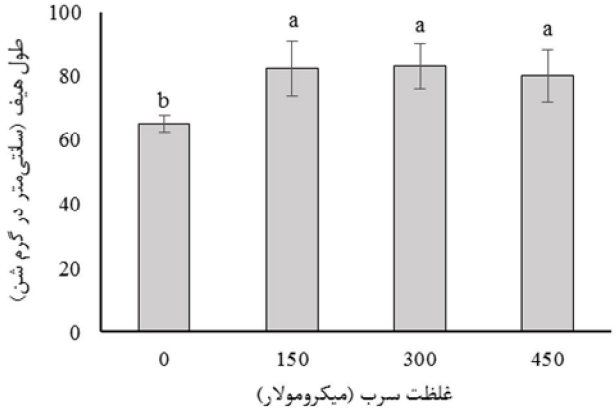
وزن خشک هیف‌های خارج سلولی

نتایج تجزیه واریانس نشان داد، سطوح مختلف سرب بر وزن خشک هیف‌های خارج سلولی قارچ در کشت گلدانی و درون شیشه‌ای به ترتیب در سطوح 5% و 0/1% معنی‌دار گردید (جدول 1و 2). در بخش هیفی گلدان با افزایش سطح سرب تا 300 میکرومولار، وزن خشک هیف‌های خارج سلولی افزایش یافت و سپس در سطح 450 میکرومولار سرب به کمترین مقدار خود (124/2 میلی‌گرم وزن خشک در بخش هیفی گلدان) رسید (شکل 3A). در حالی که در بخش هیفی کشت درون شیشه‌ای با افزایش سطح سرب میزان وزن خشک هیف‌های خارج سلولی به طور معنی‌داری کاهش یافت. به طوری که بیشترین مقدار وزن خشک هیف‌های خارج سلولی در تیمار شاهد مشاهده گردید (5/21 میلی‌گرم وزن خشک در بخش هیفی کشت درون شیشه‌ای (چهار پلیت به ازای هر تکرار)) که افزایش 46/26 درصدی را نسبت به سطح 1 میلی‌مولار سرب با کمترین مقدار وزن خشک هیف‌های خارج سلولی (2/8 میلی‌گرم وزن خشک در بخش هیفی درون شیشه‌ای) نشان داد (شکل 3B).

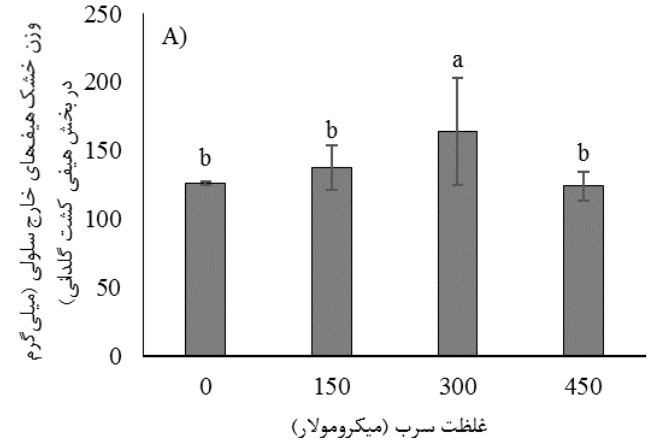
جدول 2- تجزیه واریانس اثر سطوح سرب بر شاخص‌های میکوریزی، گلومالین کل واکنش‌پذیر بردفورد و سرب کمپلکس‌شده با گلومالین بخش هیفی در کشت گلدانی گیاه شبدر سفید میکوریزی‌شده با قارچ *رایزوفاگوس ایرگولاریز*

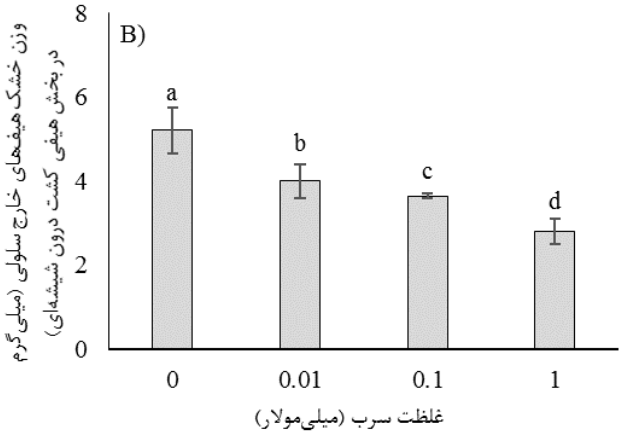
منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		وزن خشک هیف‌های خارج سلولی	طول هیف	گلومالین	سرب کمپلکس‌شده با گلومالین
بلوک	4	230/12^{ns}	11/47 ^{ns}	9/57^{ns}	2711/71^{ns}
سرب	3	1676/55*	365/82**	161/11***	455585/11***
خطا	12	282/37	37/14	8/69	8311/36

^{ns}، *، ** و *** به ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌داری در سطح احتمال 5، 1 و 0/1 درصد



شکل 2- مقایسه میانگین طول هیف قارچ *رایزوفاگوس ایرگولاریز* در بخش هیفی کشت گلدانی در سطوح مختلف سرب. میانگین‌های دارای حداقل یک حرف لاتین مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد

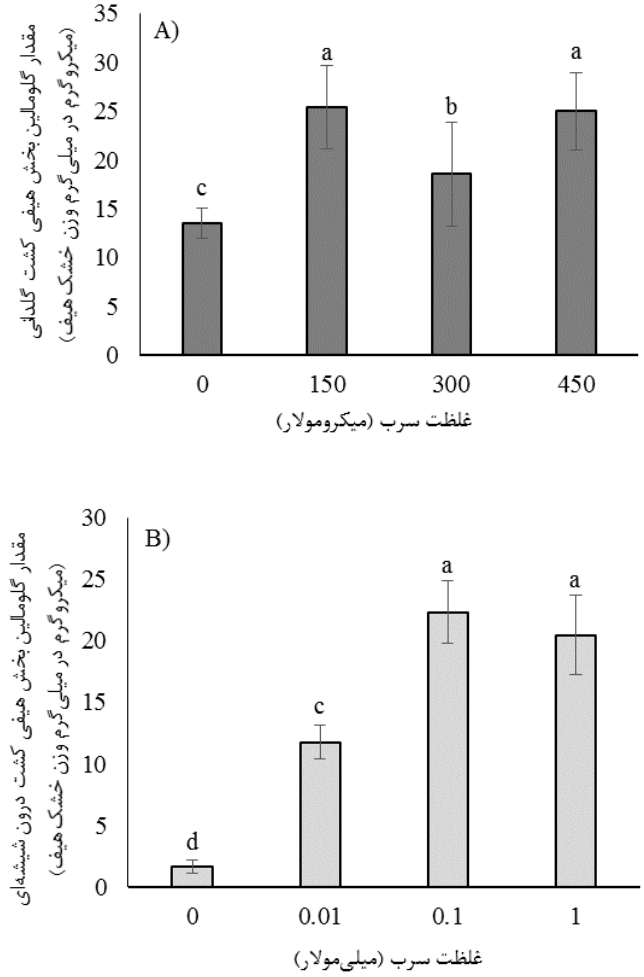




شکل 3- مقایسه میانگین وزن خشک هیف‌های خارج سلولی قارچ *رایزوفاگوس ایرگولاریز* در بخش هیفی کشت گلدانی (A) و درون شیشه‌ای (B) در سطوح مختلف سرب. غلظت سرب در کشت گلدانی و درون شیشه‌ای به ترتیب میکرومولار و میلی‌مولار Pb^{+2} می‌باشد. میانگین‌های دارای حداقل یک حرف لاتین مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد

گلومالین تولیدی در بخش هیفی کشت گلدانی و درون شیشه‌ای

افزایش سطح سرب تأثیر معنی‌داری بر مقدار گلومالین تولیدی بخش هیفی کشت گلدانی و بخش هیفی کشت درون شیشه‌ای در سطح 0/1% داشت (جدول 1 و 2). بیشترین مقدار گلومالین بخش هیفی گلدان، در سطح 150 میکرومولار سرب مشاهده گردید که تفاوت معنی‌دار آماری با سطح 450 میکرومولار سرب نداشت (سطح معنی‌داری 5%، به ترتیب 25/40 و 24/99 میکروگرم گلومالین در میلی‌گرم وزن خشک هیف). سطح 450 میکرومولار سرب افزایش 45/89 درصدی در مقدار گلومالین تولیدی بخش هیفی گلدان نسبت به شاهد داشت (شکل 4A). در بخش هیفی کشت درون شیشه‌ای، با افزایش غلظت سرب تا سطح 0/1 میلی‌مولار سرب مقدار گلومالین تولیدی به طور معنی‌داری (سطح معنی‌داری 5%) افزایش یافت، به طوری که بیشترین مقدار گلومالین تولیدی در این سطح مشاهده گردید (22/32 میکروگرم گلومالین در میلی‌گرم وزن خشک هیف). با افزایش سطح سرب از 0/1 میلی‌مولار به 1 میلی‌مولار، مقدار گلومالین تولیدی کاهش 8/24 درصدی نشان داد (شکل 4B).



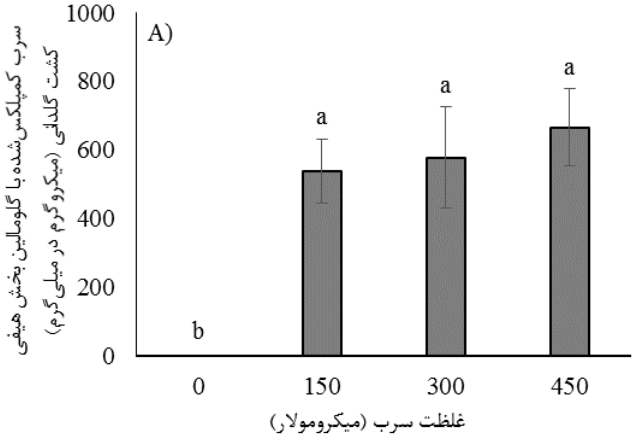
شکل 4- مقایسه میانگین میکروگرم گلومالین تولیدی به ازای میلی‌گرم وزن خشک هیف قارچ *رایزوفاگوس ایرگولاریز* در کشت گلدانی (A) و درون شیشه‌ای (B) در سطوح مختلف سرب. غلظت سرب در کشت گلدانی و درون شیشه‌ای به ترتیب میکرومولار و میلی‌مولار Pb^{+2} می‌باشد. میانگین‌های دارای حداقل یک حرف لاتین مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد

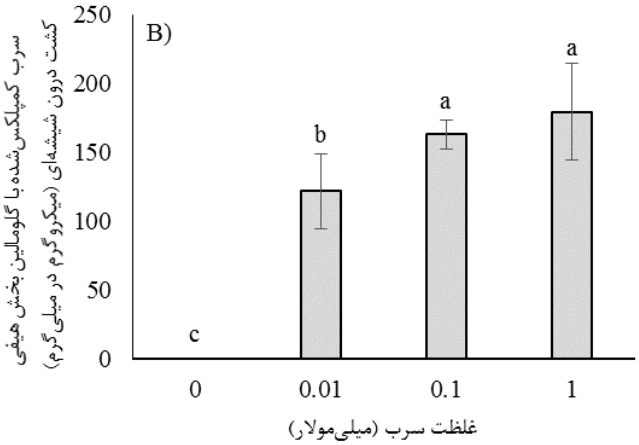
مقدار سرب کمپلکس‌شده با گلومالین استخراجی از بخش هیفی کشت گلدانی و درون شیشه‌ای

سطوح مختلف سرب تأثیر معنی‌داری بر مقدار سرب کمپلکس‌شده توسط گلومالین استخراجی از بخش هیفی کشت گلدانی و درون شیشه‌ای در سطح 0/1% داشت (جدول 1و 2). با افزایش سطح سرب مقدار سرب کمپلکس‌شده با گلومالین بخش هیفی گلدان به طور معنی‌داری افزایش یافت. بیشترین مقدار سرب کمپلکس‌شده توسط گلومالین بخش هیفی گلدان در سطح 450 میکرومولار سرب، 665/72 میکروگرم سرب در میلی‌گرم گلومالین هیف، بود که تفاوت معنی‌دار آماری در سطح 5% با سطوح 300 و 150 میکرومولار سرب نداشت (به ترتیب 578/76 و 538/38 میکروگرم سرب در میلی‌گرم گلومالین هیف) (شکل 5A). رابطه مثبت و معنی‌داری بین مقدار سرب کمپلکس‌شده توسط گلومالین تولیدی در بخش هیفی گلدان با مقدار گلومالین تولیدی (در سطح % 0/1، R^2=0/667) مشاهده گردید (شکل 6). با افزایش سطح سرب، مقدار سرب کمپلکس‌شده با گلومالین تولیدی توسط بخش هیفی کشت درون شیشه‌ای به طور معنی‌داری افزایش یافت (در سطح % 0/1). بیشترین مقدار سرب کمپلکس‌شده توسط گلومالین بخش هیفی کشت درون شیشه‌ای 179/44 میکروگرم در میلی‌گرم گلومالین هیف در سطح 1 میلی‌مولار سرب بود که تفاوت معنی‌دار آماری در سطح 5% با غلظت 0/1 میلی‌مولار سرب (163/09 میکروگرم سرب در میلی‌گرم گلومالین هیف) نداشت (شکل 5B). رابطه مثبت و معنی‌داری بین مقدار سرب کمپلکس‌شده توسط گلومالین تولیدی در بخش هیفی کشت درون شیشه‌ای با مقدار گلومالین تولیدی (شکل 7)، با افزایش سطح سرب مشاهده گردید (سطح 0/1%، R^2=0/920).

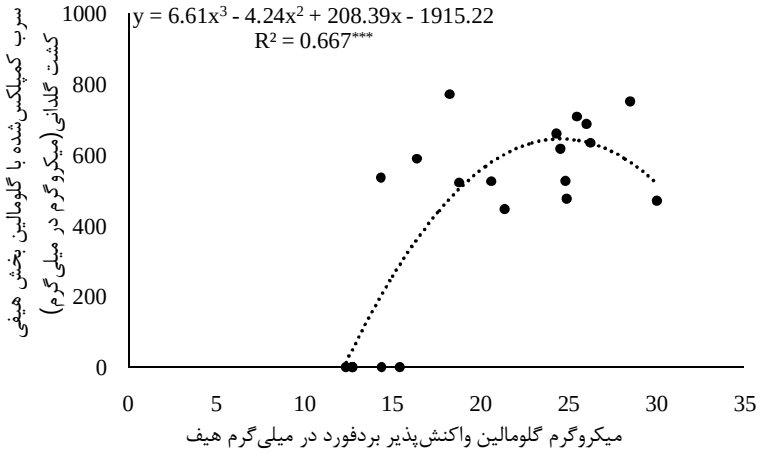
همبستگی بین مقدار گلومالین و سرب کمپلکس‌شده توسط آن با شاخص‌های میکوریزی

بر اساس جدول همبستگی (جدول 3)، همبستگی مثبت و معنی‌داری بین طول هیف در بخش هیفی کشت گلدانی با مقدار گلومالین تولیدی و سرب کمپلکس‌شده توسط گلومالین وجود داشت، در حالی که مقدار گلومالین و سرب کمپلکس‌شده توسط آن به وزن خشک هیف‌های خارج سلولی قارچ حساس نبود. در کشت درون شیشه‌ای فقط بین مقدار گلومالین تولیدی در بخش هیفی با درصد فراوانی هیف همبستگی وجود نداشت.





شکل 5- مقایسه میانگین میکروگرم سرب کمپلکس‌شده توسط میلی‌گرم گلومالین واکنش‌پذیر بردفورد در کشت گلدانی (A) و درون شیشه‌ای (B) در سطوح مختلف سرب. غلظت سرب در کشت گلدانی و درون شیشه‌ای به ترتیب میکرومولار و میلی‌مولار Pb^{+2} می‌باشد. میانگین‌های دارای حداقل یک حرف لاتین مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد

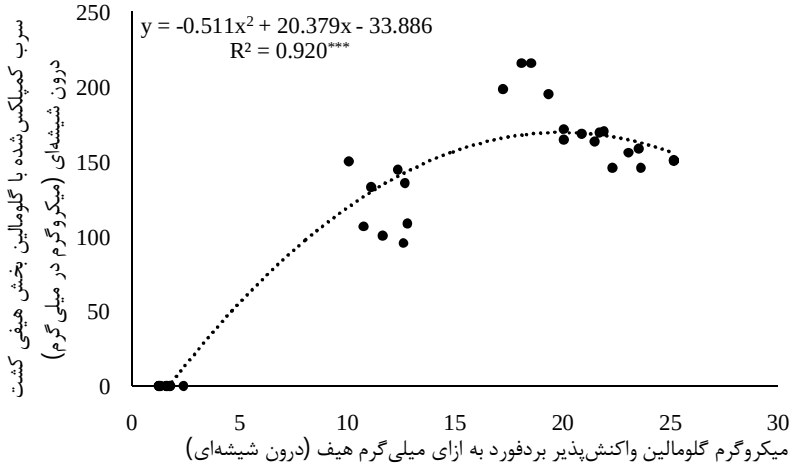


شکل 6- رابطه (در سطح احتمال 0/1%) بین سرب کمپلکس‌شده توسط گلومالین واکنش‌پذیر بردفورد با مقدار گلومالین تولیدی توسط *رایزوفاگوس ایرگولاریز* حاصل از بخش هیفی کشت گلدانی

جدول 3- همبستگی بین مقدار گلومالین و سرب کمپلکس‌شده توسط آن با شاخص‌های میکوریزی

کشت گلدانی						کشت درون شیشه‌ای					
	گلومالین	سرب کمپلکس‌شده با گلومالین	طول هیف	وزن خشک هیف‌های خارج سلولی		گلومالین	سرب کمپلکس‌شده با گلومالین	درصد فراوانی هیف	درصد فراوانی اسپور	وزن خشک هیف‌های خارج سلولی
گلومالین	1				گلومالین	1				
سرب کمپلکس‌شده با گلومالین	0/721**	1			سرب کمپلکس‌شده با گلومالین	0/886**	1			
طول هیف	0/471*	0/757**	1		درصد فراوانی هیف	0/306ns	0/463**	1		
وزن خشک هیف‌های خارج سلولی	-0/240ns	0/255ns	0/458*	1	درصد فراوانی اسپور	-0/721**	-0/781**	-0/833**	1	
					وزن خشک هیف‌های خارج سلولی	-0/839**	-0/931**	-0/683**	0/903**	1

، * به ترتیب معنی‌داری در سطح احتمال 1% و 5% و ns غیرمعنی‌دار



شکل 7- رابطه (در سطح احتمال 0/1%) بین سرب کمپلکس شده توسط گلومالین واکنش‌پذیر بردفورد با مقدار گلومالین تولیدی توسط *رایزوفاگوس ایرگولاریز* حاصل از بخش هیفی کشت درون شیشه‌ای

بحث

نتایج وزن خشک هیف‌های خارج سلولی قارچی در شرایط کشت گلدانی و درون شیشه‌ای در سطوح مختلف سرب متفاوت بود. در کشت درون شیشه‌ای با افزایش سطح سرب میزان وزن خشک هیف‌های خارج سلولی قارچی در مقایسه با شاهد (فاقد تیمار سرب) کاهش معنی‌داری نشان داد در حالی که در شرایط کشت گلدانی تا سطح 300 میکرومولار سرب، افزایش وزن خشک هیف‌های خارج سلولی قارچی در مقایسه با شاهد مشاهده گردید و سپس در سطح 450 میکرومولار سرب، میزان وزن خشک هیف‌های خارج سلولی قارچی کاهش یافت که از نظر آماری تفاوت معنی‌داری با شاهد نداشت. این اختلاف مشاهده شده در مطالعه گلدانی و درون شیشه‌ای می‌تواند به دلیل شرایط متفاوت حاکم بر گونه قارچی باشد، زیرا در کشت درون شیشه‌ای قارچ *رایزوفاگوس ایرگولاریز* در همزیستی با ریشه‌های تراریخت هویج در محیط کشت مصنوعی و بدون حضور بخش هوایی گیاه می‌باشد و بی‌تردید تفاوت‌هایی در مکانیسم عملکردی گیاه در شرایط کشت گلدانی در مقایسه با کشت درون شیشه‌ای حاکم هست. نتایج مربوط به درصد فراوانی هیف و اسپور در کشت درون شیشه‌ای موید نتایج مربوط به وزن خشک هیف‌های خارج سلولی قارچی می‌باشد، به طوری که مجموع درصد فراوانی هیف و اسپور با افزایش غلظت سرب، نسبت به شاهد کاهش معنی‌داری نشان داد. در تیمار شاهد، به طور میانگین 100 درصد بخش هیفی در کشت درون شیشه‌ای توسط هیف و اسپور قارچ میکوریزی پوشیده شده بود در حالی که با افزایش غلظت سرب، از میزان اسپورزایی کاسته شد و وزن خشک هیف‌های خارج سلولی قارچی را فقط توسعه هیف تشکیل می‌داد. همچنین با افزایش سطح سرب به دلیل کاهش اسپورزایی، اسپورهای مشاهده شده بسیار ریز، شفاف و جوان بودند در حالی که در تیمار شاهد، اسپورهای متکامل قابل مشاهده بود. همچنین نتایج مطالعه ما نشان داد که در بخش گلدانی میزان تولید گلومالین به وزن خشک هیف‌های خارج سلولی قارچی حساس نمی‌باشد ($r= -0/24^{ns}$) ولی همبستگی مثبت و معنی‌داری بین میزان تولید گلومالین با طول هیف در بخش هیفی کشت گلدانی وجود داشت ($r=0/471^{*}$).

در حالیکه همبستگی منفی و معنی‌داری بین میزان تولید گلومالین با وزن خشک هیف‌های خارج سلولی قارچی در کشت درون شیشه‌ای مشاهده گردید ($r= -0/839^{**}$)، از سوی دیگر در کشت درون شیشه‌ای همبستگی بین درصد فراوانی هیف با میزان تولید گلومالین وجود نداشت ($r= 0/31^{ns}$). بنابراین نتایج مربوط به رابطه شاخص‌های میکوریزی با مقدار گلومالین تولیدی در شرایط کشت گلدانی و درون شیشه‌ای متفاوت می‌باشد. گزارش مطالعات دیگر نیز نتایج متفاوتی را در این رابطه نشان می‌دهد. لوتگن و همکاران (2003) و بای و همکاران (2009) همبستگی بین غلظت های پروتئین کل (BRSP) و ساده قابل استخراج خاکِ واکنش‌پذیر بردفورد (EE-BRSP) با شاخص‌های میکوریزی شامل

درصد کلنیزاسیون آربوسکول و وزیکول، کلنیزاسیون کلی قارچ AM، طول ریشه‌های کلنیزه شده و طول هیفی مشاهده نکردند. این محققان، این یافته‌ها را به شکاف بین تجزیه هیف و گلومالین مرتبط می‌دانند زیرا زمان بقای قارچ‌های AM در خاک‌ها به طور معنی‌داری متفاوت می‌باشد (ریلیگ و همکاران، 2003؛ استینبرگ و ریلیگ، 2003). از سوی دیگر، تحت شرایط نامساعد، قارچ های AM، ممکن است مقادیر قابل ملاحظه ای از کربن مورد نیاز برای رشد هیف را به تولید گلومالین اختصاص دهند (ریلیگ و استینبرگ، 2002). بنابراین، طول هیفی ممکن است رابطه‌ای عکسی با تولید گلومالین داشته باشد.

در ضمن، فقدان همبستگی بین گلومالین و متغییرهای قارچ‌های AM نمی تواند جامعیت داشته باشد و استثناهایی هم وجود دارد. تأثیر قارچ‌های AM بر میزان گلومالین تولیدی بر اساس گونه قارچ و نوع گیاه میزبان متفاوت می‌باشد (بدینی و همکاران، 2009؛ نیکولز و رایت، 2004؛ لاولوک و همکاران، 2004b). به طور خلاصه، غلظت GRSP به میزان گلومالین تولید شده توسط قارچ AM و میزان تجزیه GRSP بستگی دارد (تایسیدیر و ترنر، 2007؛ ریلیگ 2004b). پس هر فاکتوری که تولید گلومالین و تجزیه GRSP را تحت تأثیر قرار می‌دهد می‌تواند مقدار GRSP اندازه‌گیری شده در آن زمان و مکان را تحت تأثیر قرار دهد. درایور و همکاران (2005) گلومالین را به عنوان جزئی از دیواره هیف و اسپور گزارش کردند، به طوری که بیش از 80 درصد گلومالین تولیدی با پیوندهای قوی به دیواره هیفی متصل می‌باشند. در حالی که تایسیدیر و ترنر (2007) دریافتند که طول هیف با تولید گلومالین همبستگی ندارد، از سوی دیگر لاولوک و همکاران (2004b) ثابت کردند که مقدار گلومالین تولیدی با قطر هیف ارتباط دارد به طوری که غلظت گلومالین در هیف‌های ریز در مقایسه با هیف‌های درشت کمتر است و دلیل احتمالی این امر را در سهم بیشتر سیتوپلاسم در مقایسه با حجم دیواره هیف، در هیف‌های ریز دانستند (استینبرگ و ریلیگ، 2003).

بنابراین بر اساس شواهد مطالعه حاضر و نتایج مطالعات دیگر، الگوی حضور گلومالین در دیواره هیف و اسپورها بر اساس گونه قارچ، نوع گیاه میزبان و تحت شرایط تنشی مختلف، می‌تواند متفاوت باشد. همچنین نتایج نشان داد افزایش سطح سرب منجربه افزایش معنی‌داری در تولید گلومالین بخش هیفی کشت گلدانی و درون شیشه‌ای نسبت به تیمار شاهد گردید. این امر می‌تواند به دلیل افزایش بیان گلومالین ناشی از تنش باشد (لاولوک و همکاران، 2004b؛ ریلیگ و استینبرگ، 2002)، زیرا گلومالین به عنوان یک پروتئین شوک حرارتی شناخته شده است (گاکار و ریلیگ، 2006). پروتئین‌های شوک حرارتی معمولاً دارای کارکردهای متنوع می‌باشند و بیان این پروتئین‌ها در شرایط تنش فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی افزایش می‌یابد. از مهم‌ترین عملکردهای آن‌ها فعالیت چاپرونی می‌باشد که از تغییر شکل پروتئین‌های ضروری و مهم مسیرهای متابولیکی حیاتی ممانعت به عمل می‌آورند (اشلسینجر، 1990). تحت سایر تنش‌های محیطی نیز افزایش تولید گلومالین گزارش گردیده است. هامر و ریلیگ (2011) افزایش قابل ملاحظه‌ای در مقدار گلومالین تولیدی توسط *گلوموس اینترارادیسز* در شرایط تنش نمک کلرید سدیم مشاهده کردند.

همچنین، نتایج مطالعه ریش سفید (1391) بر روی گیاه ذرت (سینگل کراس 704) میکوریزی شده با سه گونه قارچ *گلوموس ورسیفورم*، *گلوموس اینترارادیسز* و *گلوموس اتونیکاتوم* در شرایط تنش رطوبتی، نشان داد که کلنیزاسیون میکوریزی ریشه و تولید گلومالین با افزایش تنش، افزایش می‌یابد. شعبانی و همکاران (2013) اثر سطوح مختلف فلزات سنگین سرب (0، 500 و 1000 میلی‌گرم در کیلوگرم خاک) و روی (0، 250 و 500 میلی‌گرم در کیلوگرم خاک) را بر کلنیزاسیون میکوریزی و تولید گلومالین در گیاه ذرت (*Zea mays* L.) میکوریزی شده با دو گونه قارچ *گلوموس موسه* و *گلوموس اینترارادیسز* بررسی کردند، نتایج نشان داد که مایه‌زنی گیاهان با قارچ‌های AM سبب افزایش معنی‌داری در مقدار گلومالین تولیدی می‌گردد، به طوری که قارچ *گلوموس اینترارادیسز* از نظر تولید گلومالین کاراتر از *گلوموس موسه* می‌باشد، گرچه با افزایش غلظت فلزات سنگین مقدار تولید گلومالین در تیمارهای میکوریزی و غیرمیکوریزی کاهش می‌یابد که به نظر می‌رسد به دلیل اثر منفی ناشی از غلظت بالای فلزات و کاهش کلنیزاسیون میکوریزی و توسعه قارچ‌های AM باشد که در نتیجه منجربه کاهش تولید گلومالین می‌گردد.

بنابراین به دلیل اثرات سمی سرب و تنش ناشی از آن، قارچ میکوریز آربوسکولار مکانیسم حفاظتی تولید گلومالین را برای کاهش آسیب‌های سیتوزولی و تغییرشکل پروتئین‌ها در برابر فلز سنگین سرب به کار می‌برد. زیرا به دلیل شباهت بیوشیمیایی سرب به کاتیون‌های دو ظرفیتی، سرب می‌تواند به واسطه انتقال فعال از کانال‌های انتقال یونی جذب گیاه گردد و در فعالیت‌های آنزیمی و عملکرد ماکرومولکول‌هایی نظیر پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک تداخل ایجاد کند (پوروت و همکاران، 2011). نتایج مطالعات ما نیز نشان داد که

سرب کمپلکس شده توسط گلومالین بخش هیفی کشت گلدانی و درون شیشه‌ای با افزایش غلظت سرب به طور مشخصی افزایش می‌یابد. نتایج مشابهی در مطالعات دیگر نیز مشاهده شده است (کورنخو و همکاران، 2008؛ وادینگ و همکاران، 2008؛ گونزالز-چاوز و همکاران، 2004)، که بیانگر این مطلب است که کمپلکس شدن فلزات سنگین توسط گلومالین ممکن است مکانیسم مقابله قارچ‌های میکوریزی تحت شرایط تنش فلزسنگین و کمک به بهبود رشد و توسعه گیاه تحت تنش‌های محیطی باشد. نکته جالب و قابل توجه این است که با افزایش غلظت سرب در کشت گلدانی و درون شیشه‌ای، میزان سرب کمپلکس شده توسط گلومالین افزایش می‌یابد، بنابراین ظرفیت کمپلکس سازی سرب توسط گلومالین حتی می‌تواند بیشتر از مقادیر گزارش شده در این مطالعه باشد. البته عملکرد گلومالین در کمپلکس‌سازی سرب در غلظت‌های مختلف آن احتمالاً با غلظت سرب، نحوه پاسخ گیاه دلیل حضور دیگر پروتئین‌های شوک حرارتی و نیز ساختار بیوشیمیایی گلومالین مرتبط باشد.

نتیجه‌گیری

بر اساس یافته‌های مطالعه حاضر، با افزایش غلظت سرب تولید گلومالین هیفی و سرب کمپلکس‌شده توسط آن در آزمون گلدانی و درون شیشه‌ای افزایش یافت که از فرضیه طرح گلومالین به عنوان همولوگ پروتئین شوک حرارتی حمایت می‌کند. گرچه مکانیسم کمپلکس سرب توسط گلومالین هنوز ناشناخته است، بر اساس نتایج این مطالعه به نظر می‌رسد که هیف‌های خارج سلولی قارچ *رایزوفاگوس ایرگولاریز* نقش مهمی در غیرپویایی سرب داشته باشند، زیرا وجود گلومالین به عنوان مولکول مهم و مؤثر دیواره هیف‌ها و اسپورها و نقش آن در غیرپویایی قلزات سنگین در مطالعات معدود در این زمینه گزارش شده است (گونزالز-چاوز و همکاران، 2004، 2002). بنابراین، با توجه به پایداری درازمدت گلومالین در خاک (استینبرگ و ریلیگ، 2003) و نقش مهم و جالب توجه آن در غیرپویایی و کمپلکس سازی فلزات سنگین و کاهش خطرات سمی آن‌ها برای سایر میکروارگانیسم‌ها و گیاهان پیشنهاد می‌گردد مطالعات بیشتری در این زمینه صورت گیرد.

سپاس‌گزاری

بدین وسیله از امور پژوهشی دانشگاه تبریز به خاطر تأمین امکانات مالی تحقیق و نیز همکاران گروه علوم خاک به خاطر تهیه مواد و تجهیزات آزمایشگاهی تشکر و قدردانی می‌شود.

فهرست منابع:

1. ریش سفید، م. 1391. تأثیر کم آبی بر ترشح گلومالین توسط قارچ های گلومرال همزیست با گیاه ذرت. پایان نامه کارشناسی ارشد علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز.

2. Arnaud, St., Hamel, M.C., Vimard, B., Caron, M. and Fortin, J.A. 1996. Enhanced hyphal growth and spore production of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* in an in vitro system in absence of host roots. Mycological Research. 100: 328–332.
3. Bai, C., He, X., Tang, H., Shan, B. and Zhao, L. 2009. Spatial distribution of arbuscular mycorrhizal fungi, glomalin and soil enzymes under the canopy of *Astragalus adsurgens* Pall. in the Mu Us sand land, China. Soil Biology and Biochemistry. 41: 941-947.
4. Bedini, S., Pellegrino, E., Avio, L., Pellegrini, S., Bazzoffi, P., Argese, E. and Giovannetti, M. 2009. Changes in soil aggregation and glomalin-related soil protein content as affected by the arbuscular mycorrhizal fungal species *Glomus mosseae* and *Glomus intraradices*. Soil Biology and Biochemistry. 41: 1491-1496.
5. Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. 72: 248-254.
6. Cornejo, P., Meier, S., Borie, G., Rillig, M.C. and Borie, F. 2008. Glomalin-related soil protein in a Mediterranean ecosystem affected by a copper smelter and its contribution to Cu and Zn sequestration. Science of the Total Environment. 406: 154-160.
7. Driver, J.D., Holben, W.E. and Rillig, M.C. 2005. Characterization of glomalin as a hyphal wall component of arbuscular mycorrhizal fungi. Soil Biology and Biochemistry. 37: 101-106.

8. Gadkar, V. and Rillig, M. 2006. The arbuscular mycorrhizal fungal protein glomalin is a putative homolog of heat shock protein 60. FEMS Microbiology Letters. 263: 93–101.
9. Gohre, V. and Paszkowski, U. 2006. Contribution of the arbuscular mycorrhizal symbiosis to heavy metal phytoremediation. Planta. 223: 1115–1122.
10. González-Chávez, C., D'Haen, J., Vangronsveld, J. and Dodd, J.C. 2002. Copper sorption and accumulation by the extraradical mycelium of different *Glomus* spp. (arbuscular mycorrhizal fungi) isolated from the same polluted soil. Plant and Soil. 240: 287-297.
11. González-Chávez, M.C., Carrillo-González, 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.
12. 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. Public Library of Science, Open-access. 6(21): e28426. doi:10.1371/journal.pone.0028426.
13. Harner, M.J., Ramsey, P.W. and Rillig, M.C. 2004. Protein accumulation and distribution in floodplain soils and river foam. Ecology Letters. 7: 829-836.
14. 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.
15. Kohler, J., Caravaca, F., del Mar Alguacil, M. and Roldán, A. 2009a. Elevated CO_2 increases the effect of an arbuscular mycorrhizal fungus and a plant-growth promoting rhizobacterium on structural stability of a semiarid agricultural soil under drought conditions. Soil Biology and Biochemistry. 41: 1710-1716.
16. Kohler, J., Caravaca, F. and Roldán, A. 2009b. Effect of drought on the stability of rhizosphere soil aggregates of *Lactuca sativa* grown in a degraded soil inoculated with PGPR and AM fungi. Applied Soil Ecology. 42: 160-165.
17. Lovelock, C.E., Wright, S.F., Clark, D.A. and Ruess, R.W. 2004a. Soil stocks of glomalin produced by arbuscular mycorrhizal fungi across a tropical rain forest landscape. Journal of Ecology. 92:2 78-287.
18. Lovelock, C.E., Wright, S.F. and Nichols, K.A. 2004b. Using glomalin as an indicator for arbuscular mycorrhizal hyphal growth: an example from a tropical rainforest soil. Soil Biology and Biochemistry. 36: 1009-1012.
19. Lutgen, E.R., Muir-Clairmont, D., Graham, J. and Rillig, M.C. 2003. Seasonality of arbuscular mycorrhizal hyphae and glomalin in a western Montana grassland. Plant and Soil. 257: 71-83.
20. Millner, P.D. and Kitt, D.G. 1992. The Beltsville method for soilless production of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi. Mycorrhiza. 2: 9-15.
21. Nichols, K.A. and Wright, S.F. 2004. Contributions of fungi to soil organic matter in agroecosystems. p.179-198. In: Magdoff, F. and Weil, R.R. (eds) Soil Organic Matter in Sustainable Agriculture, CRC Press, Florida.
22. Newman, E.I. 1966. A method for estimating the total length of root in a sample. Journal of Applied Ecology. 3: 139-145.
23. Pawlowska, T.E. and Charvat, I. 2004. Heavy-metal stress and developmental patterns of arbuscular mycorrhizal fungi. Applied and Environmental Microbiology. 70: 6643-6649.
24. Pourrut, B., Shahid, M., Dumat, C., Winterton, P. and Pinelli, E. 2011. Lead Uptake, Toxicity, and Detoxification in Plants. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. 213: 113-136.
25. 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.
26. Rillig, M.C. 2004b. Arbuscular mycorrhizae, glomalin, and soil aggregation. Canadian Journal of Soil Science. 84: 355-363.

27. Rillig, M.C., Ramsey, P.W., Morris, S. and Paul, E.A. 2003. Glomalin, an arbuscular mycorrhizal fungal soil protein, responds to land-use change. Plant and Soil. 253: 293-299.
28. Rillig, M.C. and Steinberg, P.D. 2002. Glomalin production by an arbuscular mycorrhizal fungu: a mechanism of habitat modification? Soil Biology and Biochemistry. 34: 1371-1374.
29. Rillig, M.C., Wright, S.F., Nichols, K.A., Schmidt, W.F. and Torn, M.S. 2001. Large contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to soil carbon pools in tropical forest soils. Plant and Soil. 233: 167-177.
30. Rosier, C.L., Hoye, A.T. and Rillig, M.C. 2006. Glomalin-related soil protein: assessment of current detection and quantification tools. Soil Biology and Biochemistry. 38: 2205-2211.
31. Rosier, C.L., Piotrowski, J.S., Hoye, A.T. and Rillig, M.C. 2008. intraradical protein and glomalin as a tool for quantifying arbuscular mycorrhizal root colonization. Pedobiologia. 52: 41-50.
32. Schindler, F.V., Mercer, E.R. and Rice, J.A. 2007. Chemical characteristics of glomalin related soil protein (GRSP) extracted from soils of varying organic matter content. Soil Biology and Biochemistry. 39: 320-329.
33. Schlesinger, M.J. 1990. Heat-shock proteins. Journal of Biological Chemistry. 265: 12111–12114.
34. Shaabani Zenoozagh, V., Aliasgharzad, N. and Oustan, Sh. 2013. Glomalin production by two glomeral fungi in symbiosis with corn plant under different Pb levels. International Journal of Agriculture: Research and Review. 3 (4): 854-863.
35. Steinberg, P.D. and Rillig, M.C. 2003. Differential decomposition of arbuscular mycorrhizal fungal hyphae and glomalin. Soil Biology and Biochemistry. 35: 191-194.
36. Sylvia, D.M. 1988. Activity of external hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. Soil Biology and Biochemistry. 20: 39-43.
37. Treseder, K.K. and Turner, K.M. 2007. Glomalin in ecosystems. Soil Science Society of America Journal. 71: -1266.
38. Vodnik, D., Grčman, H., Maček, I., van Elteren, J.T. and Kovačevič, M. 2008. The contribution of glomalin-related soil protein to Pb and Zn sequestration in polluted soil. Science of the Total Environment. 392: 130-136.
39. Wright, S.F., Franke-Synder, 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.
40. Wright, S.F., Green, V.S. and Cavigelli, M.A. 2007. Glomalin in aggregate size classes from three different farming systems. Soil and Tillage Research. 94: 546-549.
41. Wright SF, Starr, J.L. and Paltineanu, I.C. 1999. Changes in aggregate stability and concentration of glomalin during tillage management transition. Soil Science Society of America Journal. 63: 1825-1829.
42. Wright, S.F. and Upadhyaya, A. 1999. Quantification of arbuscular mycorrhizal activity by the glomalin concentration on hyphae. Mycorrhiza. 8: 283-285.
43. Wright, S.F. and Upadhyaya, A. 1998. A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. Plant and Soil. 198: 97-107.
44. 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.