نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۲، شماره ۲، خرداد – تیر ۱۳۹۷، ص. ۴۱۳-۳۹۹

Journal of Water and Soil
Vol. 32, No. 2, May.-Jan. 2018, p. 399-413

تأثیر ریزوبیوم بر تولید گلومالین توسط *Rhizophagus irregularis* در همزیستی با گیاه شبدر تحت سطوح نیتروژن

وحیده شعبانی زنوزق[1*]- ناصر علی‌اصغرزاد[2]- جعفر مجیدی[3]- رقیه حاجی بلند[4]- بهزاد برادران[5] - لیلی عاقبتی مالکی[6]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۲/۰۷
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۲/۰۳

چکیده

گلومالین یک ترکیب گلیکوپروتئینی ویژه است که توسط قارچ‌های راسته گلومرال از رده گلومرومایکوتا تولید می‌شود و نقش کلیدی در ذخیره کربن آلی و نیتروژن خاک دارد. همچنین در تشکیل خاکدانه‌های پایدار و استقرار جوامع غنی میکروبی در خاک نقش بسزایی دارد. آزمایشی در قالب طرح فاکتوریل در پایه بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار طراحی شد و گیاه شبدر (*Trifolium repense* L.) با قارچ *Rhizophagus irregularis* و باکتری *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii* تلقیح شد. چهار سطح نیتروژن (۰، ۲، ۶ و ۱۰ میلی‌مولار به فرم نیترات) بوسیله محلول غذایی نیومن و رومهلد ایجاد شد. گلدان‌ها با محلول غذایی آبیاری شدند. گیاهان شبدر پس از ۱۲ هفته برداشت شد. گلومالین در بستر شن (SG) و گلومالین ریشه‌ای (RG) پس از استخراج از خاک، به روش بردفورد اندازه‌گیری شد. با افزایش سطوح نیتروژن میزان SG به طور معنی‌داری کاهش یافت (۰/۰۱ >p)؛ به طوری‌که در سطح دو میلی‌مولار ۶۳/۰۵ درصد کاهش در مقدار SG نسبت به تیمار شاهد بدون نیتروژن مشاهده گردید. در حضور باکتری ریزوبیوم تولید گلومالین SG توسط قارچ‌های آربوسکولار به طور معنی‌داری افزایش یافت (p<۰/۰۱). بیشترین مقدار گلومالین در بستر شنی در حضور باکتری ریزوبیوم و قارچ AM و در سطح بدون نیتروژن بود. مقدار RG با افزایش غلظت نیتروژن افزایش پیدا کرد. در سطح ۱۰ میلی‌مولار نیتروژن، RG نسبت به سطح صفر، ۲ و ۶ میلی‌مولار سرب به ترتیب افزایش ۱۲/۹۲، ۱۱/۹۱ و ۱/۴۴ درصدی داشت.

واژه‌های کلیدی: آربوسکولار، باکتری ریزوبیوم، بردفورد، قارچ میکوریز گلومالین، نیتروژن

مقدمه

گلومالین فراوان‌ترین گلیکوپروتئین خاک است که توسط قارچ‌های راسته گلومرال از رده گلومرومایکوتا تولید می‌شود. این گلیکوپروتئین توسط رایت و همکاران (۴۹) بر روی هیف‌های قارچ میکوریز (۴۶ و ۲۵) کشف شد. در بررسی واکنش آنتی‌بادی مونوکلونال با گلومالین شواهدی بدست آمد که نشان داد گلومالین توسط قارچ‌های آربوسکولار (AM[7]) و نه ریشه‌های گیاه تولید می‌شود (۴). این گلیکوپروتئین دارای رنگ قهوه‌ای متمایل به قرمز بوده (۴۷). گلومالین گلیکوپروتئینی با زنجیره کربنی نیتروژن‌دار می‌باشد که از ۵-۳ درصد نیتروژن، ۵۹-۳۶ درصد کربن، ۶-۴ درصد هیدروژن، ۴۹-۳۳ درصد اکسیژن و ۰/۱-۰/۰۳ درصد فسفر تشکیل یافته است (۳۳). گلومالین، همچنین حاوی ۸/۸-۰/۸ درصد آهن می‌باشد (۳۲).

وظایف و نقش‌های متعددی برای گلومالین پیشنهاد شده است. تعدادی از مطالعات نقش گلومالین را در غیرمتحرک‌سازی فلزات سنگین و گیاه‌پالایی گزارش کردند (۱۲ و ۸). از سویی دیگر، اثر دراز مدت قارچ‌های AM روی پایداری خاکدانه‌ها ممکن است مرتبط با گلومالین تولید شده توسط قارچ باشد (۳۱). گلومالین می‌تواند نقش مهمی در تهویه و زهکشی، جذب عناصر غذایی توسط گیاه و باروری خاک ایفا می‌کند (۲۵). به دلیل نقش گلومالین در پایداری خاکدانه، ذخیره کربنی را تسهیل می‌کند (۵۳). ریلیگ و همکاران (۳۲) دریافتند که گلومالین ۴-۵ درصد از کل کربن و نیتروژن را در خاک‌های هاوایی به خود اختصاص می‌دهد. همچنین آنها گزارش کردند سهم گلیکوپروتئین در کربن کل، بسیار بیشتر از کربن بیوماس میکروبی

۱ و ۲- دانشجوی دکتری و استاد گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
(*- نویسنده مسئول: Email: vahideh_shabani@yahoo.com)
۳- استاد گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز
۴- استاد گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز
۵ و ۶- دانشیار و استادیار مرکز تحقیقات ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز
DOI: 10.22067/jsw.v32i2.70981
7- Arbuscular Mycorrhizal Fungi

است. این مشاهدات ممکن است به دلیل تجزیه آهسته گلومالین و پایداری آن و تجمع در خاک باشد (۳۰). ویلسون و همکاران (۴۹) کاهش در محتوای کربن و نیتروژنی خاک را به دلیل ممانعت از رشد قارچ‌های AM مشاهده کردند و آن را به کاهش معنی‌داری در هیف قارچ‌های AM و غلظت گلومالین مرتبط دانستند. آنها معتقد بودند که کاهش هیف‌های قارچ AM و غلظت گلومالین منجر به هدررفت نیتروژن و کربن حفاظت شده در خاکدانه‌های بزرگ به دلیل کاهش پایداری خاکدانه‌ها می‌گردند. گلومالین بصورت فوق‌العاده‌ای می‌تواند به کاهش انتشار N_2O کمک کند (۲۶).

از آنجایی که قارچ AM گلومالین را تولید می‌کند، بنابراین هر عاملی که بر روی قارچ تأثیر بگذارد، به طور غیرمستقیم تولید گلومالین را نیز تحت تأثیر قرار می‌دهد. برای مثال نوع پوشش گیاهی، تغییر کاربری زمین، مواد غذایی موجود در خاک، همزیستی متقابل با سایر میکروارگانیسم‌ها و غیره بر قارچ‌های میکوریز آربوسکولار مؤثر هستند. ویولی و همکاران (۴۱) گزارش کردند میزان رشد و وضعیت عناصر غذایی گیاه اثرات مثبت و معنی‌داری بر تولید گلومالین دارد. گرچه کمبود عناصر غذایی باعث افزایش همزیستی با قارچ AM می‌گردد (۶)، محتوای بالای عناصر غذایی خاک، می‌تواند میزان گلومالین خاک را به واسطه از بین رفتن قارچ و تجزیه اندام‌های آن، افزایش دهد (۲۱).

برخی جانداران خاک میکوریزی شدن را افزایش می‌دهند که ممکن است منجر به افزایش تولید گلومالین شوند. در نتیجه باکتری‌هایی که به عنوان باکتری‌های همیار میکوریز شناخته می‌شوند (۱۰) به طور مستقیم از طریق تحریک تندش اسپور، رشد هیف و استقرار قارچ‌های AM یا بطور غیرمستقیم با اثرات مثبت بر رشد گیاه میزبان قادر به افزایش تولید گلومالین می‌باشند (۲۲). البته برخی باکتری‌ها هم اثر بازدارنده بر همزیستی میکوریزی دارند (۴۲). برخی از میکروارگانیسم‌ها ممکن است آزادسازی گلومالین به محیط خاک را به واسطه القا تنش بر قارچ AM (۲۹) یا از طریق تخریب هیف‌های قارچی تسهیل کنند (۳۱).

قارچ‌های AM و ریزوبیوم‌ها می‌توانند با گیاهان لگوم روابط زیستی مشترکی برقرار کنند که همزیستی دوجانبه نامیده می‌شود. قارچ‌های AM کورتکس ریشه را کلونیزه می‌کنند و تلقیح لگوم‌ها با این باکتری‌ها منجر به تشکیل گره می‌شود. فواید این همزیستی شامل افزایش رشد و عملکرد، بهبود تغذیه و برقراری تعادل عناصر غذایی در گیاه می‌باشد. به همین دلیل اثرات این همزیستی نیز بیشتر بصورت غیرمستقیم و براساس وضعیت تغذیه‌ای گیاه، مورد مطالعه قرار گرفته است. در عین حال اثرات مستقیم میکروسیمبیونت‌ها بر یکدیگر شامل اثرات سویه‌های ریزوبیومی بر توسعه قارچ‌های میکوریزی و کلنیزاسیون ریشه و همچنین اثرات گونه‌های قارچی بر فعالیت و کارایی سویه‌های ریزوبیومی نیز حائز اهمیت هستند. در بیشتر مطالعات افزایش کلنیزاسیون ریشه بوسیله قارچ AM و باکتری ریزوبیوم وقتی به طور همزمان مایه‌زنی شده‌اند گزارش شده است (۵۱). بنابراین باکتری ریزوبیوم می‌تواند به طور غیرمستقیم از طریق تأثیر بر رشد گیاه لگوم و قارچ همزیست آن بر تولید گلومالین مؤثر باشد و مقدار آن را افزایش یا کاهش دهد.

تثبیت بیولوژیک نیتروژن احتمالاً به دلیل تقاضای بالای انرژی، راه مناسبی برای کسب نیتروژن نمی‌باشد. وقتی غلظت نیتروژن (نیترات یا آمونیوم) در خاک بالا باشد، گیاهان لگوم منبع نیتروژن سهل‌الوصول را به تثبیت بیولوژیک نیتروژن و تشکیل همزیستی ترجیح می‌دهند (۴۳). تأثیر منابع مختلف نیتروژن خارجی (مخصوصاً به فرم نیترات) بر روی سیستم همزیستی بطور کامل بررسی شده است (۳۶). به طور واضح نشان داده شده است که نیترات در تمامی مراحل تشکیل همزیستی اختلال ایجاد می‌کند.

بنابراین باکتری‌های ریزوبیوم از طریق تأثیر بر رشد گیاه، و سطوح نیتروژن به طور مستقیم از طریق تأثیر بر کلنیزاسیون ریشه توسط قارچ میکوریز و به طور غیرمستقیم از طریق تأثیر بر همزیستی ریزوبیوم و تثبیت نیتروژن می‌تواند بر تولید گلومالین مؤثر باشد. برای مثال کاهش مصرف کود شیمیایی و آلی نیتروژن، تأثیر مثبتی بر همزیستی میکوریزی و تولید گلومالین و نقش بسیار مهم آنها دارد (۴۰). قابلیت دسترسی به نیتروژن و فسفر در خاک باید اثر معکوس بر غلظت گلومالین داشته باشد. چرا که گیاهان در صورت حاصلخیزی بالای خاک، نیاز به تأمین عناصر غذایی توسط قارچ AM ندارند (۳۴). بنابراین بسیار مهم است که ما دانش خود را نسبت به تأثیر عوامل مختلف از جمله باکتری ریزوبیوم و سطوح نیتروژن بر تولید گلومالین، افزایش دهیم. چرا که هنوز یافته‌ها، مسلم و قطعی نیستند. براساس یافته‌های قبلی و نقش گلومالین در خاک هدف از این پژوهش بررسی تأثیر باکتری *R.trifoli* و سطوح مختلف نیتروژن بر تولید گلومالین توسط قارچ AM می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه زادمایه باکتری

سویه باکتری *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii* از ریشه‌های گیاه شبدر جداسازی و خالص‌سازی شد (۳۷). پس از ضدعفونی، گره‌ها به لوله آزمایش حاوی یک میلی‌لیتر آب استریل منتقل شده و با میله شیشه‌ای استریل له شد. یک دهم میلی‌لیتر از سوسپانسیون گره بر روی محیط کشت YMA[1] حاوی کنگورد در پتری‌دیش منتقل و با کمک لوپ استریل پخش شد. پتری‌دیش‌ها در دمای ۲۵ تا ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد و با مشاهده رشد

1- Yeast-Manitol-Agar

کلنی‌های شیری و لزج، به منظور نگهداری باکتری اسلنت تهیه شد. دو هفته قبل از کشت اصلی، زادمایه باکتری از کشت اسلنت باکتری در محیط کشت مایع YEMB[1] مایه‌زنی شده و در شیکر انکوباتور افقی در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد منتقل و تا حصول جمعیت باکتری 10^9/ml تکثیر شد.

تهیه زادمایه قارچ‌های AM

قارچ *Rhizophagus irregularis* از دپارتمان بیولوژی دانشگاه لوند سوئد اخذ گردید. برای تهیه زادمایه قارچی، تحت شرایط استریل، زادمایه قارچی داخل گلدان‌های ۲ کیلوئی حاوی بستر ورمیکولایت و کوکوپیت (نسبت اختلاط حجمی ۱:۱) استریل اضافه شد و با گیاه ذرت و در شرایط گلخانه به مدت چهار ماه نگه‌داری شدند. در پایان این دوره، قسمت هوایی گیاه ذرت از سطح خاک قطع شده و محتویات داخل گلدان، شامل هیف‌ها، اسپور و ریشه‌های میکوریزی به عنوان زادمایه در آزمایش اصلی استفاده شد. درصد کلنیزاسیون قارچی ریشه‌ها در زادمایه‌ها تعیین شدند (۲).

کشت گلدانی

جهت تهیه بستر کشت گلدانی از شن درشت استریل عبور یافته از الک دو میلی‌متری، عاری از گلومالین و استفاده شد. برای این منظور ابتدا شستشو با اسیدکلریدریک ۳ نرمال و سپس استخراج با بافر سیترات سدیم ۵۰ میلی‌مولار (pH = ۸)، اتوکلاو به مدت یک ساعت در دمای ۱۲۱ °C و فشار ۱/۱ اتمسفر) انجام گرفت. از بذرهای گیاه شبدر سفید (*Trifolium repens* L.)، تهیه شده از مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، به عنوان گیاه میزبان قارچ *Rhizophagus irregularis* استفاده گردید. به منظور حذف آلودگی‌های سطحی بذرها بعد از چندین بار شستشو با آب مقطر استریل و غوطه‌ورسازی در اتانول ۷۰ درصد (حجمی/حجمی) به مدت ۳۰ ثانیه، به داخل محلول هیپوکلریت ۰/۵ درصد انتقال یافتند و بعد از ده دقیقه حدود ده بار با آب مقطر استریل کاملاً شستشو گردیدند. ۳۰ عدد بذر بعد از جوانه‌زنی، در گلدان کشت گردید و ۱۰ گرم زادمایه قارچ *Rhizophagus irregularis* به صورت لایه نازک در یک سانتی‌متری زیر بذرها پخش شد. جهت یکسان‌سازی تیمارها، ۱۰ گرم از بستر کشت استریل فاقد قارچ در شاهد اضافه شد. بعد از جوانه‌زنی و استقرار گیاهچه‌ها، سوسپانسیون باکتری تهیه شده بوسیله سرنگ استریل در پای ریشه تزریق گردید. در تیمارهای بدون باکتری، از محیط کشت مایع استریل بدون باکتری بوسیله سرنگ به پای ریشه‌ها تزریق شد. گیاهان به مدت ۳ ماه ، یک روز در میان با محلول غذایی (۲۴) حاوی چهار سطح نیتروژن (۰, ۲, ۶ و ۱۰ میلی‌مولار) (۱۴) آبیاری و در شرایط گلخانه با نور طبیعی و میانگین دمای روزانه ۲۸ درجه سانتی‌گراد و شبانه ۱۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. بعد از سپری شدن دوره رشد سه ماهه، بخش هوایی گیاهان برداشت گردید و یک گرم از ریشه‌ها و مقداری از بستر کشت جهت استخراج گلومالین مورد استفاده قرار گرفت. جهت تعیین درصد کلنیزاسیون، رنگ‌آمیزی ریشه‌ها با استفاده از روش تغییر یافته کورمانیک مک‌گراو (۱۸) انجام شد. جهت تعیین درصد کلنیزاسیون ریشه‌ها از روش تقاطع خطوط شبکه (GIM[2]) استفاده شد (۲۷). غلظت نیتروژن بخش هوایی و ریشه به روش کجلدال تعیین شد.

سنجش گلومالین

جهت استخراج گلومالین، یک گرم از نمونه‌های ریشه و شن در لوله‌های حاوی ۸ میلی‌لیتر بافر سیترات ۵۰ میلی‌مولار (pH= ۸) به مدت یک ساعت در دمای ۱۲۱ °C و طی سه دوره متوالی داخل اتوکلاو قرار گرفتند. عصاره رویی حاصل از هر دوره بعد از سانتریفوژ به مدت ۱۰ دقیقه در g ۱۰۰۰۰، با هم مخلوط شدند (۷). بعد از استخراج گلومالین، نمونه‌های ریشه و شن در دمای ۷۰ °C خشک شده و توزین گشتند. برای اندازه‌گیری گلومالین از روش اصلاح شده سنجش پروتئین کل بردفورد (۵۰) استفاده شد.

طرح آزمایشی و تجزیه آماری

این آزمایش در قالب طرح فاکتوریل در پایه طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار انجام شد. فاکتورهای مورد استفاده عبارتند بودند از: چهار سطح نیتروژن (۰, ۲, ۶ و ۱۰ میلی‌مولار به فرم نیترات)، دو سطح قارچ *Rhizophagus irregularis* و شاهد بدون قارچ)، دو سطح باکتری (باکتری *R.trifoli* و شاهد بدون باکتری). آزمون نرمال بودن توزیع داده‌ها و سپس تجزیه واریانس (ANOVA) و مقایسه میانگین داده‌ها و گروه‌بندی آنها با استفاده از نرم‌افزار IBM SPSS 16.0 انجام شد. نمودارها با نرم‌افزار Microsoft Excel رسم شد.

نتایج و بحث

گلومالین در بستر شن (SG)

تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که افزایش مقدار نیتروژن تأثیر معنی‌داری بر مقدار SG در سطح ۰/۰۱ درصد داشت. بیشترین مقدار SG در سطح صفر میلی‌مولار نیتروژن مشاهده گردید که تفاوت معنی‌داری با سطوح بالاتر داشت. با افزایش سطوح نیتروژن میزان SG به طور معنی‌داری کاهش یافت؛ به طوری‌که در سطح ۲

1- Yeast extract-Manitol Broth

2- Gridline Intersect Method

میلی‌مولار نیتروژن، ۶۳/۰۵ درصد کاهش در مقدار SG نسبت به تیمار شاهد بدون نیتروژن مشاهده گردید. اثر متقابل نیتروژن و قارچ تأثیر معنی‌داری بر روی تولید گلومالین داشت ($P<0.01$). به طوری که با افزایش سطح نیتروژن از صفر به ۱۰ میلی‌مولار در تیمارهای دارای قارچ و بدون قارچ مقدار گلومالین بستر شن کاهش یافت (شکل ۱). بیشترین مقدار گلومالین (۱۴۰/۴ میکروگرم به ازای یک گرم شن) در سطح بدون نیتروژن و دارای قارچ بود و اختلاف معنی‌داری با سایر غلظت‌های نیتروژن داشت. از آنجایی که گلومالین، پروتئین قارچی است، بنابراین تیمارهای قارچی دارای گلومالین بیشتری در مقایسه با تیمارهای بدون قارچ بودند. بیش از ۸۰ درصد محتوای گلومالین خاک به واسطه‌ی هیف‌های قارچ‌های آربوسکولار وارد خاک می‌شوند. بنابراین هر عاملی که این قارچ‌ها را تحت تأثیر قرار دهد، می‌تواند بر تولید گلومالین نیز مؤثر باشد. احتمالاً به نظر می‌رسد که با افزایش نیتروژن در ریشه، اسکلت‌های کربنه که از قسمت هوایی به ریشه می رسند در متابولیسم نیتروژن (ترکیب نیتروژن معدنی و تولید نیتروژن آلی) مصرف می‌شوند و در نتیجه مواد کربنه کمتری از ریشه به هیف‌های خارج سلولی مستقر در بستر شن اختصاص می‌یابد، لذا تولید گلومالین از هیف‌های مستقر در بستر شن با افزایش سطح نیتروژن کاهش می‌یابد. مطالعات نشان می‌دهد که در آزمایشات مزرعه‌ای بلند مدت، کاربرد کودهای آلی و شیمیایی به ترتیب سبب افزایش و کاهش توسعه میسلیوم‌های خارجی قارچ‌های آربوسکولار می‌شود (۱۳). کاربرد کودهای آلی سبب افزایش معنی‌دار تراکم کل و زنده‌مانی هیف‌ها در خاک‌های رسی می‌شود (۱۷). مطالعات اندکی در رابطه با تأثیر کودهای شیمیایی نیتروژن بر تولید گلومالین انجام شده است (۱) و رابطه ثابت و استواری بین دو تیمار ارائه نکرده‌اند. برخی از داده‌های منتشر شده نشان می‌دهند که کوددهی نیتروژن سبب افزایش هیف‌های قارچی، افزایش گلومالین و افزایش پایداری خاکدانه‌های درشت می‌شود (۴۵). بنابراین پس از کاربرد کود، بخصوص کودهای آلی هیف قارچ‌های آربوسکولار به مقدار مشخصی افزایش می‌یابد. مقدار گلومالین پس از فعال‌سازی هیف‌های قارچی، افزایش می‌یابد (۱۶). در نتیجه هر گونه تغییر در هیف‌های قارچی ناشی از رژیم‌های کوددهی بر مقدار گلومالین مؤثر است. گلومالین در بستر شن، گلومالین آزاد شده از طریق هیف‌های قارچی می‌باشد. نتایج این آزمایش نشان داد که با افزایش سطوح نیتروژن تا ۶ میلی‌مولار علی‌رغم افزایش گلومالین ریشه‌ای، گلومالین آزاد شده در بستر شن کاهش یافته است. میانگین زمان پایداری هیف قارچی بسیار کوتاه‌تر (روز تا ماه) از گلومالین (۴۲-۷ سال) می‌باشد، و از طرف دیگر هیف‌های داخل سلولی، آربوسکول و وزیکول اغلب داخل ریشه حضور دارند و هنگامی‌که هیف قارچ تجزیه می‌شود، گلومالین در خاک آزاد می‌گردد (۳۹). بنابراین میزان هیف‌های پایدار، مقادیر گلومالین در هیف و سرعت تجزیه هیف تعیین کننده میزان گلومالین آزاد شده در خاک خواهد بود. با توجه به مدت زمان تغییر و تبدیل گلومالین، ممکن است برای مشاهده تغییرات گلومالین در خاک، مدت زمان بیشتری کوددهی نیتروژن نیاز باشد (۱۱).

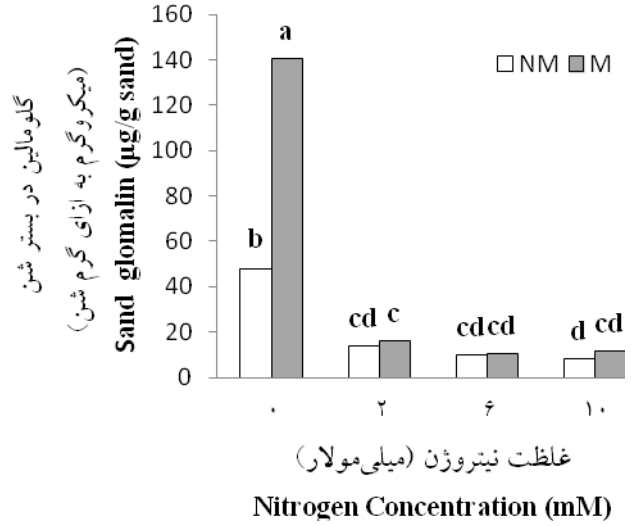
اثرات متقابل باکتری و قارچ نیز بر تولید گلومالین بستر شن معنی‌دار بود. به گونه‌ای که در حضور باکتری ریزوبیوم تولید گلومالین توسط قارچ‌های AM به طور معنی‌داری افزایش یافت (شکل ۲). حضور باکتری در تیمارهای بدون قارچ تأثیر معنی‌داری در افزایش مقدار گلومالین نداشت. البته از آنجایی که گلومالین، پروتئین قارچی هست، لذا این امر طبیعی است. ولی در تیمارهای قارچی، حضور باکتری باعث افزایش ۲۵/۷۱ درصدی در مقدار گلومالین شد. تأثیر باکتری‌های ریزوبیوم بر روی تولید گلومالین بررسی نشده است. اما باکتری‌ها ممکن است تولید گلومالین را به طور مستقیم از طریق افزایش همزیستی میکوریزی (۳) یا بطور غیرمستقیم از طریق تأثیرات مفید این باکتری‌ها بر گیاه میزبان (۲۲) افزایش دهند. بَهت و همکاران (۵) گزارش کردند، ریزوبیوم‌ها می‌توانند از طریق پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی به هیف‌های قارچ بچسبند و از آن‌ها به عنوان وسیله‌ای برای کلنیزاسیون روی ریشه گیاه استفاده کنند. همچنین ریزوبیوم استقرار میکوریز را به وسیله تولید پلی‌ساکاریدها افزایش می‌دهد که منجر به سنتز آنزیم پلی‌گالاکتروناز در محل آلودگی شده و بدین‌ترتیب سبب تسهیل نفوذپذیری قارچ به سلول‌های ریشه می‌شود (۳۸).

تجزیه واریانس اثرات متقابل سه گانه معنی‌دار بود که نشان می‌دهد بیشترین مقدار گلومالین در بستر شن (۱۵۹/۲ میکروگرم به ازای گرم شن) مربوط به تیمار قارچ *Rhizophagus irregularis*، در حضور باکتری ریزوبیوم و عدم کاربرد کود نیتروژن می‌باشد (جدول ۲).

گلومالین ریشه‌ای (RG)

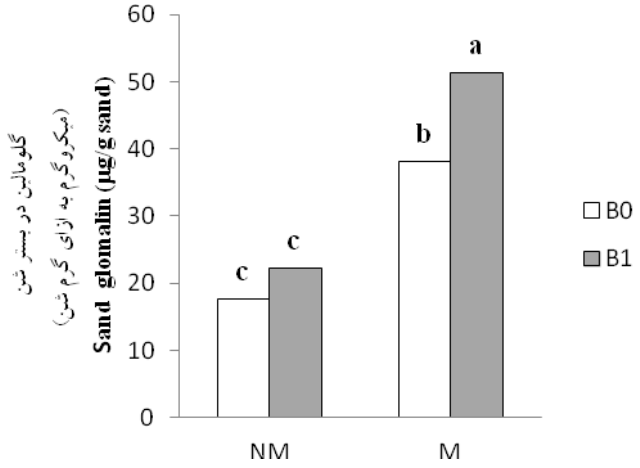
اثر نیتروژن بر RG معنی‌دار گردید. مقدار RG با افزایش سطوح نیتروژن افزایش پیدا کرد. بیشترین مقدار گلومالین در سطح ۱۰ میلی‌مولار نیتروژن (۱۶/۶۳ میلی‌گرم به ازای میلی‌گرم وزن خشک ریشه) مشاهده گردید. در سطح ۱۰ میلی‌مولار نیتروژن، گلومالین نسبت به سطح صفر، ۲ و ۶ میلی‌مولار سرب به ترتیب افزایش ۱۲/۹۲، ۱۱/۹۱ و ۱/۴۴ درصدی داشت (شکل ۳)، که اختلاف معنی‌داری بین سطوح ۶ و ۱۰ میلی‌مولار وجود نداشت. افزایش مقدار گلومالین تحت سطوح نیتروژن در مطالعات دیگر نیز گزارش شده است. علی‌اصغرزاد و همکاران (۱) گزارش کردند که با افزایش سطح نیتروژن، مقدار گلومالین ساده استخراج و گلومالین کل خاک به طور معنی‌داری در تیمارهای میکوریزی و غیرمیکوریزی افزایش یافت. دو احتمال زیر ممکن است افزایش گلومالین تحت سطوح نیتروژن را

توضیح دهد. اولین احتمال این است که افزایش گلومالین کل ممکن است اثر تجمعی افزایش N به طور مداوم باشد. محصولات فتوسنتزی گیاهی از طریق ریشه‌ها به اندام‌های قارچی انتقال می‌یابند و عمدتا برای سنتز گلومالین در دیواره سلولهای هیف و اسپور استفاده می‌شوند. در طی این فرآیند، نیتروژن نقش مهمی در تشکیل گلیکوپروتئین دارد (۱۱).



شکل ۱- اثر برهمکنش سطوح نیتروژن (۰، ۲، ٦ و ۱۰ میلی‌مولار) و قارچ AM (NM و M به ترتیب غیرمیکوریزی و میکوریزی) بر تولید گلومالین در بستر شن (میکروگرم به ازای گرم شن). میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار به روش آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال یک درصد هستند

Figure 1- Interaction of Nitrogen levels (0, 2, 6 and 10 mM) and AM fungi on sand glomalin production (µg/g sand). Means followed by the same letters are not significantly different according to Duncan's multiple range test at the level p< 0.01

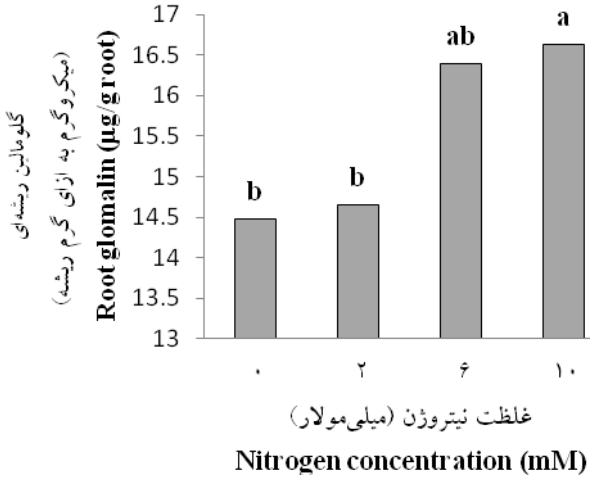


شکل ۲- اثر برهمکنش باکتری ریزوبیوم (B0 و B1 به ترتیب شاهد بدون باکتری و تلقیح با باکتری ریزوبیوم) و قارچ AM (NM و M به ترتیب غیرمیکوریزی و میکوریزی) بر تولید گلومالین در بستر شن (میکروگرم به ازای گرم شن). میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار به روش آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال یک درصد هستند

Figure 2- Interaction of rhizobium bacterium and AM fungi on sand glomalin production (µg/g sand). Means followed by the same letters are not significantly different according to Duncan's multiple range test at the level p< 0.01

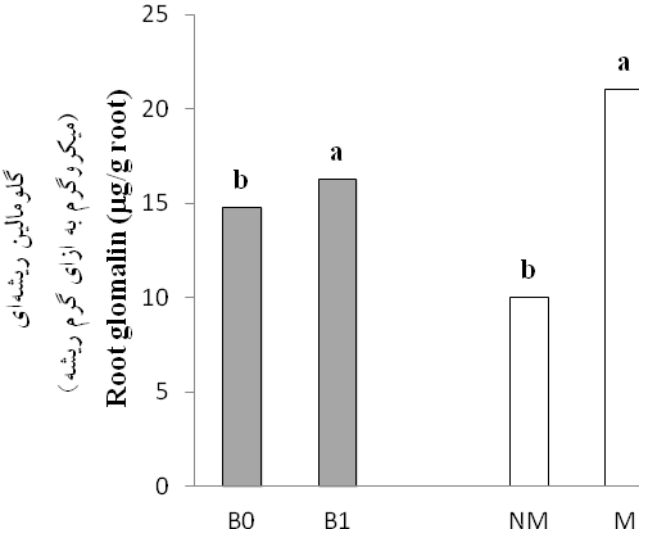
از طرف دیگر در این مطالعه از روش برادفورد برای تعیین گلومالین استفاده شد. با اینکه عصاره‌گیر سیترات سدیم بکار رفته تا حدودی اختصاصی است، با این حال این روش برای گلومالین اختصاصی نیست، بنابراین دیگر پروتئین‌های مرتبط با گلومالین و گلیکوپروتئین‌ها نیز اندازه‌گیری می‌شود (۸). به این ترتیب، پروتئین های دیگر که توسط کوددهی N افزایش می‌یابد، در روش اندازه‌گیری

برادفورد وارد می‌شوند. مطالعات در جنگل‌های شمالی آلاسکا (۴۰) و جنگل‌های دوک در کارولینای شمالی، ایالات متحده آمریکا (۱۱) نشان داد که افزایش کوددهی نیتروژن با افزایش قابل توجهی در کلنیزاسیون قارچ میکوریز همراه است. بنابراین افزایش گلومالین به علت اضافه شدن N ممکن است به عنوان یک اثر خالص از افزودن نیتروژن مداوم باشد. اثر اصلی باکتری و قارچ نیز بر تولید RG در سطح یک درصد معنی‌دار بود (شکل ۴).



شکل ۳- تولید گلومالین ریشه‌ای گیاه شبدر سفید میکوریزی در سطوح مختلف نیتروژن (۰، ۲، ٦ و ۱۰ میلی مولار). میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار به روش آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال یک درصد هستند

Figure 3- The Production of root glomalin (µg/g root) in different levels of nitrogen (0, 2, 6 and 10 mM). Means followed by the same letters are not significantly different according to Duncan's multiple range test at the level p< 0.01



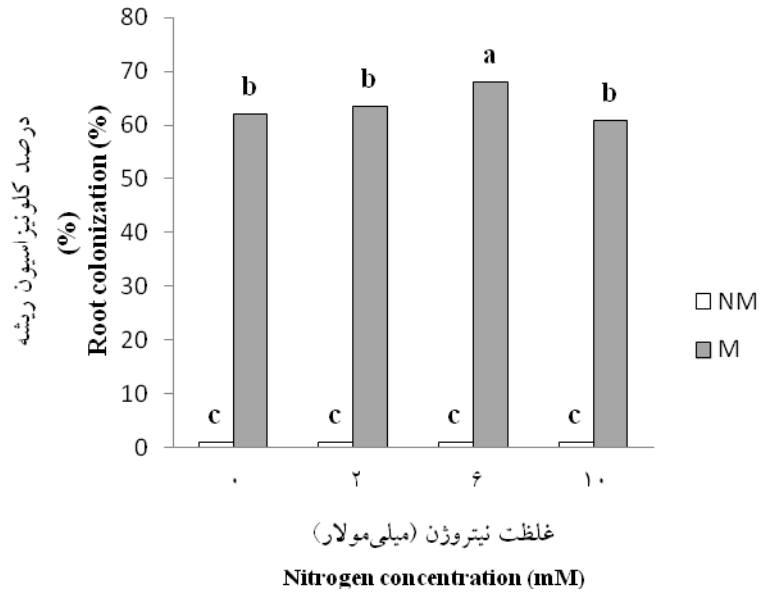
شکل ٤- اثر اصلی باکتری ریزوبیوم (B0 و B1 به ترتیب شاهد بدون باکتری و تلقیح با باکتری ریزوبیوم) و اثر قارچ AM (NM، M به ترتیب غیر میکوریزی و میکوریزی) بر مقدار گلومالین ریشه‌ای (میکروگرم به ازای گرم ریشه). میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار به روش آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال یک درصد هستند

Figure 4- The main effect of rhizobium bacterium and AM fungi on root glomalin content (µg/g root). Means followed by the same letters are not significantly different according to Duncan's multiple range test at the level p< 0.01

درصد کلنیزاسیون ریشه

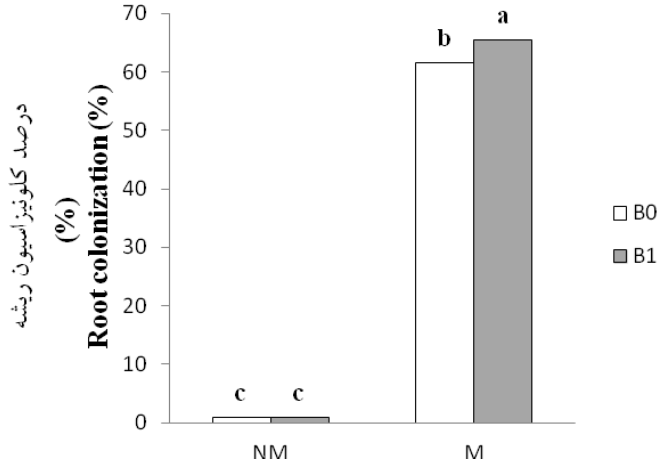
بر اساس نتایج تجزیه واریانس، اثر سطوح مختلف N بر درصد کلنیزاسیون ریشه در سطح ۵ درصد معنی‌دار گردید. با افزایش سطوح نیتروژن درصد کلنیزاسیون ریشه نسبت به شاهد افزایش یافت، به طوری که بیشترین درصد کلنیزاسیون (۳۴/۰۱ ٪) در تیمار ۶ میلی‌مولار نیتروژن بود که علی‌رغم کاهش ۱۲/۲ درصدی در سطح ۱۰ میلی‌مولار نسبت به سطح ۶ میلی مولار نیتروژن، اختلاف آماری معنی‌داری ($P< ۰/۰۱$) بین سطح ۱۰ میلی‌مولار نیتروژن (۳۰/۳۶ درصد) با سطوح ۲ میلی‌مولار (۳۱/۷۳) و شاهد (۳۰/۹۹) مشاهده نگردید. به عبارت بهتر، افزایش سطوح نیتروژن نه تنها تأثیر منفی بر میکوریزی شدن ریشه توسط قارچ *Rhizophagus irregularis* نداشت؛ بلکه نسبت به شاهد منجر به افزایش کلنیزاسیون ریشه گردید. اثر متقابل سطوح نیتروژن و قارچ نیز بر درصد کلنیزاسیون ریشه معنی‌دار شد ($p< ۰/۰۵$). بیشترین درصد کلنیزاسیون (۶۸/۰۲ درصد) مربوط به تیمارهای دارای قارچ و غلظت ۶ میلی‌مولار نیتروژن بود (شکل ۵). حضور مقداری نیتروژن در خاک و جذب آن توسط گیاه برای شروع فتوسنتز و ایجاد جریان کربن به سمت ریشه‌ها و آزادسازی آن به صورت ترکیبات قندی به محیط اطراف ریشه جهت جذب قارچ‌های آربوسکولار و همزیستی با آنها لازم و ضروری است. بنابراین در سطح بدون نیتروژن با توجه به کمبود نیتروژن در بستر شنی سرعت فتوسنتز و جریان کربن به سمت ریشه‌ها ناچیز بوده و درصد کلنیزاسیون کم است. لیو و همکاران (۲۰) بیان کردند که سطوح متوسط کود نیتروژن موجب افزایش رشد گیاه و رقیق شدن غلظت فسفر گیاه می‌شود. بنابراین گیاه با تولید کربوهیدارت‌ها، موجب تحریک کلنیزاسیون برای افزایش جذب فسفر و دیگر عناصر می‌شود.

با توجه به تجزیه واریانس داده‌ها، اثرت متقابل باکتری و قارچ بر درصد کلنیزاسیون ریشه ($p< ۰/۰۵$) معنی‌دار گردید. حضور باکتری باعث افزایش معنی‌داری در درصد کلنیزاسیون ریشه گردید. بیشترین درصد کلنیزاسیون در حضور باکتری و قارچ (۶۵/۵۰ درصد) بود (شکل ۶). در بیشتر مطالعات، افزایش کلنیزاسیون ریشه به وسیله قارچ‌های میکوریزی و باکتری ریزوبیوم وقتی به طور همزمان مایه‌زنی شده‌اند گزارش شده است. وقتی گیاهان سویا به طور همزمان با قارچ میکوریز و سویه‌های موتانت ریزوبیومی Nod^- (فاقد توانایی تشکیل گره) و Nod^+ (دارای توانایی تشکیل گره) مایه‌زنی شدند، گونه ریزوبیومی Nod^+ به طور مشخصی اثر تحریک کنندگی بر کلنیزاسیون میکوریزی داشت، در حالی که سویه‌های ریزوبیومی Nod^- هیچ تاثیری نداشتند. براساس آزمایشات به عمل آمده تنها با فاکتورهای Nod که میزان ترشح فلاوونوئیدها از ریشه را افزایش می‌دهند، اثر تحریک کنندگی بر روی کلنیزاسیون قارچ میکوریز ریشه نشان می‌دهند (۵۱).



شکل ۵- اثر برهمکنش سطوح نیتروژن (۰، ۲، ٦ و ۱۰ میلی‌مولار) و قارچ AM (NM و M به ترتیب غیرمیکوریزی و میکوریزی) بر درصد کلنیزاسیون ریشه. میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار به روش آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال یک درصد هستند

Figure 5- Interaction of Nitrogen levels (0, 2, 6 and 10 mM) and AM fungi on root colonization (%). Means followed by the same letters are not significantly different according to Duncan's multiple range test at the level p< 0.01



شکل ٦- اثر برهمکنش باکتری ریزوبیوم (B0 و B1 به ترتیب بدون باکتری و تلقیح با باکتری ریزوبیوم) و قارچ AM (NM و M به ترتیب غیرمیکوریزی و میکوریزی) بر درصد کلنیزاسیون ریشه. میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار به روش آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال یک درصد هستند

Figure 6- Interaction of rhizobium bacterium and AM fungi on root colonization (%). Means followed by the same letters are not significantly different according to Duncan's multiple range test at the level p< 0.01

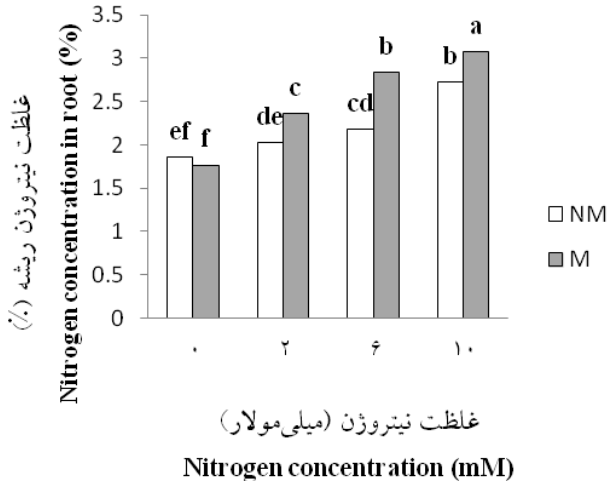
غلظت نیتروژن اندام هوایی و ریشه

اثر اصلی قارچ بر غلظت نیتروژن اندام هوایی و ریشه معنی‌دار (p<0.01) گردید. غلظت نیتروژن اندام هوایی و ریشه در گیاهان میکوریزی (به ترتیب ۲/۱۴۹ و ۲/۵۱۰ درصد) بیشتر از گیاهان غیر میکوریزی (به ترتیب ۱/۹۷۵ و ۲/۲۰ درصد) بود. اثرات متقابل سطوح نیتروژن و قارچ نیز بر غلظت نیتروژن بخش ریشه معنی‌دار بود (P<0.01) ولی بر غلظت نیتروژن اندام هوایی معنی‌دار نشد. با افزایش سطح نیتروژن، در تیمارهای دارای قارچ غلظت نیتروژن بخش ریشه به طور معنی‌داری افزایش یافت. کمترین غلظت نیتروژن ریشه (۱/۷۶۸ درصد) در سطح فاقد نیتروژن و در غیاب قارچ میکوریز و بیشترین غلظت نیتروژن ریشه (۳/۰۷۵ درصد) در سطح ۱۰ میلی مولار نیتروژن و حضور قارچ میکوریز مشاهده شد (شکل ۷). افزایش غلظت نیتروژن محلول خاک، و حرکت آن با جریان توده‌ای به سمت ریشه گیاه موجب جریان این عنصر به درون گیاه و افزایش رشد آن می‌شود، با افزایش رشد و رقیق شدن غلظت این عنصر، جذب ادامه می‌یابد. استفاده از قارچ‌های آربوسکولار با افزایش سطح جذب ریشه‌ها از طریق هیف‌های خارجی موجب هدایت نیتروژن، فسفر و بسیاری از عناصر دیگر به درون گیاه و افزایش رشد می‌شوند. قارچ‌های آربوسکولار به دو طریق مستقیم (جذب و انتقال نیتروژن محلول) و غیرمستقیم (ترشح ترکیبات آلی و تبدیل نیتروژن نامحلول خاک به محلول و سپس انتقال آن) موجب افزایش جذب نیتروژن می‌شوند (۲۳). همچنین فعالیت گلوتامین سنتتاز که تبدیل کننده آمونیوم به فرم آلی نیتروژن می‌باشد، در ریشه‌های میکوریزی بیشتر از غیر میکوریزی است (۱۹).

اثر اصلی عامل باکتری بر غلظت نیتروژن اندام هوایی و ریشه معنی‌دار گردید. حضور باکتری به طور معنی‌داری در اندام هوایی و ریشه به ترتیب سبب افزایش ۹/۶۵ و ۳/۵ درصدی در غلظت نیتروژن نسبت به تیمار شاهد بدون باکتری گردید. اثر متقابل باکتری و سطوح نیتروژن بر روی غلظت نیتروژن بخش هوایی و ریشه معنی دار بود (p< ۰/۰۱). با افزایش سطوح نیتروژن از صفر تا ۲ میلی‌مولار، تلقیح گیاه با باکتری ریزوبیوم، سبب افزایش معنی‌دار غلظت نیتروژن اندام هوایی نسبت به تیمارهای بدون باکتری شد، به طوری که این افزایش در سطح صفر و ۲ میلی‌مولار به ترتیب ۳۱/۷۸ و ۳۱/۹۹ درصد نسبت به تیمارهای بدون باکتری بود. در بخش ریشه حضور باکتری در سطح صفر و ۶ میلی‌مولار تأثیر معنی‌داری در غلظت نیتروژن نداشت، ولی در سطح نیتروژن ۲ و ۱۰ میلی‌مولار سبب افزایش معنی‌دار نسبت به تیمار بدون باکتری شد (شکل ۸). مقدار کم نیتروژن به عنوان شروع کننده و افزایش دهنده رشد می‌باشد، در حالی که مقدار زیاد آن به عنوان بازدارنده تثبیت نیتروژن توسط باکتری‌های ریزوبیوم عمل می‌کند (۱۵). دلایل و مکانیسم‌های چگونگی بازدارندگی از مدت‌ها پیش مورد مطالعه قرار گرفته است و بنا به اظهار ویلسون (۴۴) عدم تشکیل گره در ریشه در اثر نرسیدن محصول فتوسنتز به گره‌ها می‌باشد، زیرا کربوهیدرات حاصل بهمراه نیتروژن معدنی قبل از بکار رفتن در تشکیل گره به مصرف رشد گیاه می‌رسد. پیکس و همکاران (۲۸) نشان می‌دهد که مایه‌زنی نخود با سویه‌های مناسب علاوه بر افزایش تثبیت بیولوژیک نیتروژن، به دلیل تولید هورمون رشد (اکسین) و همچنین مواد حل کننده فسفات‌های نامحلول توسط این سویه‌ها، ممکن است با روش‌های دیگری غیر از

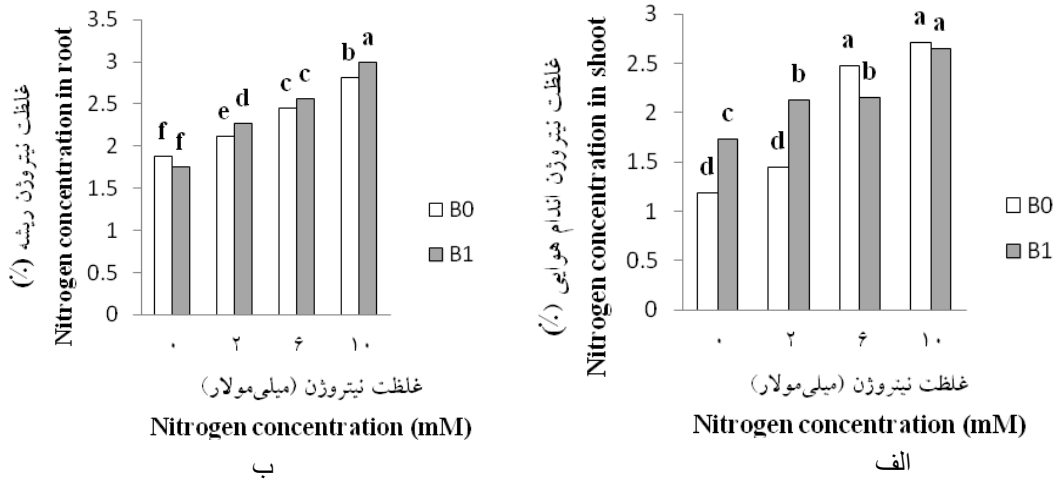
تثبیت نیز سبب افزایش محصول نخود شوند.

اثر متقابل قارچ و باکتری نیز بر غلظت نیتروژن اندام هوایی و ریشه معنی‌دار گردید ($P<0.01$). مایه‌زنی گیاه با باکتری ریزوبیوم در عدم حضور قارچ، باعث افزایش معنی‌دار غلظت نیتروژن اندام هوایی و ریشه شد، ولی وقتی گیاه با قارچ میکوریز تلقیح شد، حضور توأم باکتری و قارچ باعث کاهش معنی‌دار نیتروژن اندام هوایی و ریشه شد (شکل ۹)، و چون روند تغییرات مقدار نیتروژن مشابه غلظت نیتروژن بود، این کاهش نمی‌تواند بدلیل اثر رقت باشد. فررا–سراتو و ویلربوس (۹) گزارش کردند که مقدار نیتروژن در گیاهان مایه‌زنی شده با گونه‌های قارچ AM و ریزوبیوم افزایش بیشتری یافت تا آنهائی‌که فقط با ریزوبیوم مایه‌زنی شده بودند. بیشترین مقدار نیتروژن مربوط به تیمارهایی بود که همزمان با قارچ میکوریز و ریزوبیوم مایه‌زنی شده بودند.



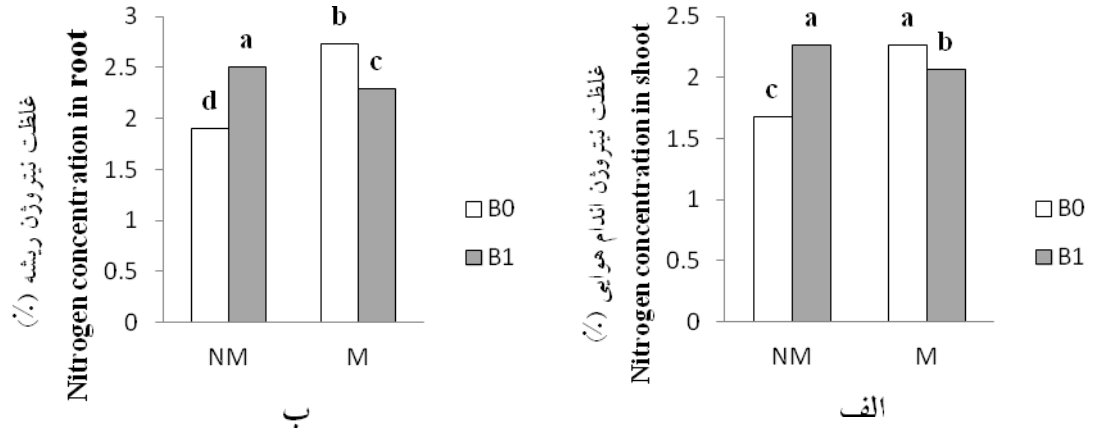
شکل ۷- اثر برهمکنش سطوح نیتروژن (۰، ۲، ٦ و ۱۰ میلی‌مولار) و قارچ AM (NM و M به ترتیب غیرمیکوریزی و میکوریزی) بر غلظت نیتروژن ریشه (درصد). میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار به روش آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال یک درصد هستند

Figure 7- Interaction of nitrogen levels (0, 2, 6 and 10 mM) and AM fungi on nitrogen concentration in root (%). Means followed by the same letters are not significantly different according to Duncan's multiple range test at the level p< 0.01



شکل ۸- اثر برهمکنش سطوح نیتروژن (۰، ۲، ٦ و ۱۰ میلی‌مولار) و باکتری ریزوبیوم (B0 و B1 به ترتیب بدون باکتری و تلقیح با باکتری ریزوبیوم) بر الف) غلظت نیتروژن اندام هوایی(درصد) و ب) ریشه (درصد). میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار به روش آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال یک درصد هستند

Figure 8- Interaction of nitrogen levels (0, 2, 6 and 10 mM) and rhizobium bacterium on nitrogen concentration (%) in a) shoot and b) root. Means followed by the same letters are not significantly different according to Duncan's multiple range test at the level p< 0.01



شکل ۹- اثر برهمکنش سطوح نیتروژن (۰، ۲، ٦ و ۱۰ میلی‌مولار) و قارچ AM (NM و M به ترتیب غیرمیکوریزی و میکوریزی) بر الف) غلظت نیتروژن اندام هوایی (درصد) و ب) ریشه (درصد). میانگین‌های دارای حداقل یک حرف لاتین مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار به روش آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال یک درصد

Figure 9- Interaction of nitrogen levels (0, 2, 6 and 10 mM) and AM fungi on nitrogen concentration (%) in a) shoot and b) root. Means followed by the same letters are not significantly different according to Duncan's multiple range test at the level p< 0.01

جدول 1- اثر سطوح نیتروژن (N0، N1، N2 و N3 به ترتیب۰، ۲، ٦ و ۱۰ میلی‌مولار) و قارچ AM (NM و M به ترتیب غیرمیکوریزی و میکوریزی) و باکتری (B0 و B1 به ترتیب بدون باکتری و تلقیح با باکتری ریزوبیوم) بر تولید گلومالین بستر شن (میکروگرم به ازای گرم شن)، غلظت نیتروژن اندام هوایی (درصد) و غلظت نیتروژن ریشه (درصد)

Table 2- Effect of nitrogen levels (0, 2, 6 and 10 mM), AM fungi and hizobium bacterium on sand glomalin production (µg/g sand), nitrogen concentration in shoot (%) and nitrogen concentration inroot (%)

تیمارها Treatments			گلومالین بستر شن Sand glomalin (µgPr/gDW)	غلظت نیتروژن اندام هوایی N concentration in shoot (%)	غلظت نیتروژن ریشه N concentration in root (%)
N0	B0	NM	46.97c	0.84i	1.570ij
		M	121.16b	1.530h	2.183efg
	B1	NM	48.82c	1.867fg	2.157fg
		M	159.2a	1.607gh	1.353j
N1	B0	NM	10.86de	0.9967i	1.747hi
		M	12.39 de	1.903 fg	2.483 de
	B1	NM	16.66 de	2.277 cde	2.303 ef
		M	20.06 d	1.987 ef	2.247 efg
N2	B0	NM	6.77 e	2.337 bcd	2.960 gh
		M	9.173 de	2.613 ab	2.940 bc
	B1	NM	12.66 de	2.230 de	2.407 ef
		M	11.29 de	2.063 dfe	2.727 cd
N3	B0	NM	5.713 e	2.560 abc	2.317 ef
		M	9.063 de	2.867 a	3.303 a
	B1	NM	11.09 de	2.697 a	3.137 ab
		M	14.34 de	2.597 ab	2.847 c

اعداد با حروف مشترک در هر ستون دارای اختلاف معنی‌دار ($p<0.01$) نمی باشند

Means in each column followed by same letter are not significantly different at $p<0.01$

نتیجه‌گیری

ترسیب کربن در خاک با استفاده از گلومالین سنتز شده توسط قارچ‌های AM یک مسیر مهم برای به دام انداختن CO_2 اتمسفر می‌باشد. مدیریت صحیح کشاورزی می‌تواند به توسعه قارچ‌های AM در اکوسیستم‌های خاک کمک کند و در نتیجه منجر به افزایش تولید گلومالین گردد (۳۰). بر اساس نتایج ما، تلقیح توأم گیاه با قارچ

میکوریز و باکتری ریزوبیوم منجر به افزایش تولید گلومالین شد. از طرف دیگر با افزایش غلظت نیتروژن در محلول غذایی، گلومالین در بستر شن به طور معنی‌داری کاهش یافت و بیشترین مقدار گلومالین در بستر شنی در حضور باکتری ریزوبیوم و قارچ AM و در سطح بدون نیتروژن بود. در حالی‌که تأثیر نیتروژن بر سنتز گلومالین ریشه‌ای توسط قارچ کاملاً مثبت بود و بیشترین مقدار گلومالین ریشه‌ای در غلظت نیتروژن ۱۰ میلی‌مولار و در حضور باکتری ریزوبیوم و قارچ میکوریز بود. هنگامی که محصولات فتوسنتزی گیاه به سمت قارچ‌ها حرکت می‌کند، اگر منابع کافی نیتروژن در دسترس باشند، آنها می‌توانند به منابع نیتروژن آلی تبدیل شوند. به این ترتیب مقدار قابل توجهی از کربن فتوسنتزی در اندام‌های قارچی جذب می‌شوند. همچنین حضور باکتری ریزوبیوم از طریق تثبیت بیولوژیک نیتروژن می‌تواند نیاز گیاه به نیتروژن را تأمین کند. بنابراین می‌توان از این طریق، از استفاده بیش از حد کودهای شیمیایی و تبعات آن در محیط زیست جلوگیری کرد. افزایش تولید گلومالین و هدایت نیتروژن و کربن خاک به سمت تولید گلومالین بیشتر در خاک به عنوان یک منبع مهم کربن و نیتروژن در خاک از منظر زیست محیطی بسیار حائز اهمیت است.

منابع

1- Aliasgharzad N., Afshari Z., and Najafi N. 2016. Carbon Sequestration by Glomeral Fungi in Soil Is Influenced by Phosphorus and Nitrogen Fertilization. International Journal on Advanced Science Engineering Information Technology, 6:2088-5334.

2- Aliasgharzadeh N., Saleh Rastin N., Towfighi H., and Alizadeh A. 2001. Occurrence of arbuscular mycorrhizal fungal in salin soils of Tabriz plain of Iran in relation to some physical and chemical properties of soil. Mycorrhiza, 11:119-122.

3- Barea J.M., Pozo M.J., Azcòn R., and Azcon-Aguilar C. 2005. Microbial co-operation in the rhizosphere. Journal of Experimental Botany, 56:1761-1778.

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 affect by the arbuscular mycorrhizal fungi species *Glomus mosseae* and *Glomus intraradices*. Soil Biology and Biochemistry, 41: 1491-1496.

5- Bhat M.I., Bangroo S.A., Tahir A., Yadav S.R.S., and Aziz M.A. 2011. Combined Effects of *Rhizobium* and Vesicular Arbuscular fungi on green gram (*Vigna radiata* L. Wilczek) under temperate conditions. Journal of Agriculture Science, 2: 17-20.

6- Bohrer G., Kagan-Zur V., Roth-Bejerano N., and Ward D. 2001. Effects of environmental variables on vesicular-arbuscular mycorrhizal abundance in wild populations of *Vangueria infausta*. Journal of Vegetation Science, 12: 279-288.

7- 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.

8- 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.

9- Ferrera-Cerrato R., and Villerias S.J. 1985. The VA endomycorrhiza and its effect of the development of three arboreous legumes. In Proceeding of the Sixth North American Conference on Mycorrhizae held at ben, Oregon, USA, pp. 328.

10- Garbaye J. 1994. Helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis. New Phytologist. 128:197-210.

11- Garcia O.M., Ovasapyan T., Greas M., and Treseder K.K. 2008. Mycorrhizal dynamics under elevated CO2 and nitrogen fertilization in a warm temperate forest. Plant Soil, 303: 301-303.

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

13- Gryndler M., Larsen J., Hrselová H., Rezácová V., Gryndlerová H. et al. 2006. Organic and mineral fertilization, respectively, increase and decrease the development of external mycelium of arbuscular mycorrhizal fungi in a long-term field experiment. Mycorrhiza, 16:159–166.

14- Hajiboland R., Rahmat S., Aliasgharzad N., and Hartikainen H. 2015. Selenium-induced enhancement in carbohydrate metabolism in nodulated alfalfa (*Medicago sativa* L.) as related to the glutathione redox state. Soil Science and Plant Nutrition, 61:676-687.

15- Harper J.E., and Gibson A.H. 1984. Differential nodulation tolerance to nitrate among legume species. Crop Science, 24: 497-801.

16- Huo L., Wu T.Y., Lin H.M., Cao S.Y., and Tang W.X. 2008. Effects of long-term fertilization on water-stable aggregates in calcic kastanozem of Loess Plateau. Chinese Journal of Applied Ecology, 19: 545–550.

17- Kabir Z., O'Halloran I.P., Fyles J.W., and Hamel C. 1997. Seasonal changes of arbuscular mycorrhizal fungi as affected by tillage practices and fertilization: Hyphal density and mycorrhizal root colonization. Plant Soil,

192:285–293
18- Kormanic P.P., and M.c. Graw. 1982.Quantification of VA mycorrhizae in plant roots. In Schenck NC (eds). Methods and Principles of Mycorrhizal Research . American Phytopathological Society. Saint Paul Minnesota, Pp: 37-45.
19- Li M., Liu R., Christie P., and Li X. 2005. Influence of three arbuscular mycorrhizal fungi and phosphorus on growth and nutrient status of Taro. Communication on Soil Science and Plant Analysis, 36: 2383-2396.
20- Liu R., Li M., and Meng X. 2000. Effects of AM fungi on endogenous hormones in corn and cotton plants. Mycosystem, 19: 91-96.
21- Lovelock C.E., Wright S.F., Clark D.A., and Ruess R.W. 2004. Soil stocks of glomalin produced by arbuscular mycorrhizal fungi across a tropical rain forest landscape. Journal of Ecology, 92: 278-287.
22- Lucy M., Reed E., and Glick B.R. 2004. Application of free living plant growth promoting rhizobacteria. Antonie van Leeuwenhoek Journal of Microbiology, 86:1-25.
23- Miller M.H. 2000. Arbuscular mycorrhiza and phosohorus nutrition of maize; a review of Guelph studies. Canadian Journal of Plant Science, 80: 47-52.
24- Newman G., and Romheld. 1999. Root excertion of carboxylic acids and protons in phosphorus-deficient plants. Plant and Soil, 211: 121-130.
25- Nichols K.A., and Wright S.F. 2004. Contributions of soil fungi to organic matter in agricultural soils. In Magdoff F, Weil R (eds) Functions and management of soil organic matter in agroecosystems. CRC Press, Boca Raton, FL, Pp: 179–198.
26- Nichols K.A., and Wright S.F. 2006. Carbon and nitrogen in operationally defined soil organic matter pool. Biology and Fertility of Soils, 43: 215-220.
27- Norrif I.R., Read D.J., and Varma A.K. 1992. Methods in Microbiology Techniques for Study of Mycorrhiza. Academic press, London.
28- Peix B., Mazurier S., Lemanceau P., Siblot S., Berta G., Mougel C., and Van Tuinen D. 2007. Medicago species affect the community composition of arbuscular mycorrhizal fungi associated with roots. Ney Phytologist, 176: 197-210.
29- 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.
30- 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.
31- Rillig M.C., and Mummey D.L. 2006. Mycorrhizas and soil structure. New Phytologist, 171: 41-53.
32- 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.
33- 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.
34- Singh P.K. 2012. Role of glomalin related soil protein produced by arbuscular mycorrhizal fungi: a review. Agriculture Science Research Journal, 2: 119–125.
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- Streeter J. 1988. Inhibition of legume nodule formation and N_2 fixation by nitrate. CRC Critical Reviews in Plant Sciences, 7 : 1-24.
37- Swift M., and Bignell D. 2001. Standard methods for assessment of soil biodioversity and land use practice. International centre for research in Agroforestry (ICRAF) Southeast Asia. Available at: http://www.icraf.cgiar.org/sea. 2001 (visited 31 January 2018).
38- Talaat N.B., and Abdallah M.A. 2008. Response of faba bean (*Vicia faba* L.) to dual inoculation with *Rhizobium* and VA mycorrhiza under different levels of N and P fertilization. Journal of Applied Science Research, 4:1092 - 1102.
39- Treseder K.K., and Allen M.F. 2000. Mycorrhizal fungi have a potential role in soil carbon storage under elevated CO_2 and nitrogen deposition. New Phytologist, 147:189–200.
40- Treseder K.K., Turner K.M., and Mack M.C. 2007. Mycorrhizal responses to nitrogen fertilization in boreal ecosystems: potential consequences for soil carbon storage. Global Change Biology, 13: 78–88.
41- Violi H.A., Treseder K.K., Menge J.A., Wright S.F., and Lovatt, C.J. 2007. Density dependence and interspecific interactions between arbuscular mycorrhizal fungi mediated plant growth, glomalin production, and sporulation. Canadian Journal of Botany, 85: 63-75.
42- Walley F.L., and Germida J.J. 1997. Response of spring wheat (*Triticum aestivum*) to interactions between Pseudomonas species and *Glomus clarum* NT4. Biology and Fertility of Soils, 24: 365-371.
43- Wery J., Ture O., and Salsae L. 1986. Relationship between growth, nitrogen fixation and assimilation in a legume (*Medicago sativa* L.). Plant and Soil, 96:17-29.
44- Wilson P.W. 1940. The biochemistry of symbiotic nitrogen fixation. The University of Wisconsin Press, Madison,

Wis.
45- Wilson G.W.T., Rice C.W., Rillig M.C., Springer A., and Hartnett D.C. 2009. Soil aggregation and carbon sequestration are tightly correlated with the abundance of arbuscular mycorrhizal fungi: Results from long-term field experiments. Ecology Letters, 12:452–461.
46- Wright S.F. 2000. A fluorescent antibody assay for hyphae and glomalin from arbuscular mycorrhizal fungi. Plant and Soil, 226:171–177.
47- Wright S.F., and Upadhyaya A. 1996. Extraction of an abundant and unusual protein from soil and comparison with hyphal protein of arbuscular mycorrhizal fungi. Soil Science, 161: 575-586.
48- 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.
49- Wright S.F., Franke-Snyder M., Morton J.B., and Upadhyaya A. 1996. Time-course study and partial characterization of a protein on hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi during active colonization of roots. Plant and Soil, 181: 193-203.
50- Wright S.F., Franke-Snyder M., Morton J.B., and Upadhyaya A. 1996. Time-course study and partial characterization of a protein on hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi during active colonization of roots. Plant and Soil, 181: 193-203.
51- Xie Z-P., Staehelin C., Vierheilig H., Wiemken A., Jabbouri S., Broughton W.J., Vögeli-Lange R., and Boller T. 1995. Rhizobial nodulation factors stimulate mycorrhizal colonization of nodulating and nonnodulating soybeans. Plant Physiology, 108:1519–1525.
52- Zhu Y., and Miller R.M. 2003. Carbon cycling by arbuscular mycorrhizal fungi in soil-plant systems. Trends in Plant Science, 8:407-409.

Journal of Water and Soil
Vol. 32, No. 2, May.-Jan. 2018, p. 399-413

نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۲، شماره ۲، خرداد – تیر ۱۳۹۷، ص. ۴۱۳-۳۹۹

The Effect of Rhizobium on Glomalin Production by *Rhizophagus irregularis* in Symbiosis with Clover Plant under Different Levels of Nitrogen

V. Shaabani Zenoozagh[*1]- N. Aliasgharzad[2]- J. Majidi[3]- R. Hajiboland[4]- B. Baradaran[5]- L. Aghebati-Maleki[6]

Received: 26-02-2018
Accepted: 23-04-2018

Introduction: Glomalin is a specific glycoprotein produced by the fungi belonging to phylum Glomeromycota and plays a key role in soil carbon and nitrogen storage. This also has a significant role in the stable aggregates formation and establishment of microbial communities in soil. Assimilated plant C which is allocated to the mycorrhizal fungus, appears as a recalcitrant glycoprotein (glomalin) in cell walls of hyphae and spores. Considering global warming due to increasing greenhouse gases, this phenomenon cab be important in carbon sequestration and reducing CO_2 in atmosphere. Chemical fertilizers can affect symbiotic relations of these fungi, which in turn affect glomalin production.

Materials and Methods: In a factorial completely randomized design with three replication, clover plants (*Trifolium repense* L.) were included with *Rhizophagus irregularis* and/or *Rhizobium leguminosarum bv. Trifolii*. Four levels of nitrogen (0, 2, 6 and 10 mM as nitrate) in Newman & Romheld nutrient solution were applied to the pots containing 1.5 kg sterile sand. The pots were daily irrigated with nutrient solution containing the above-mentioned levels of nitrogen. Clover plants were excised after 12 weeks of growth. Fine roots were cleaned with %10 KOH and then stained using lactoglycerol trypan blue. Root colonization percentage was determined by grid line intersections method (GLM) described by Norrif et al (1992). For glomalin extraction, hyphal or root samples were autoclaved at 121 ^{0}C with 50 mM sodium citrate buffer for 60 min in three cycles. Sand glomalin (SG) and root glomalin (RG) were measured by Bradford method after extraction. Nitrogen concentration in shoot and root was measured according to the standard method.

Results and Discussion: By increasing nitrogen level, the SG significantly decreased ($p < 0.01$), and at 2 mM, a 63.5 % decrease in SG was observed with relative to the nitrogen-free control. In the rhizobial treated pots, SG production increased by fungal inoculation ($p < 0.01$). The interaction between bacteria and AM was also significant in production of SG. At the presence of rhizobium bacteria, glomalin production by AM fungi increased significantly. The changes of glomalin content were not impacted by the presence of bacteria in the uninoculated pots with fungi. The highest amount of SG was recorded in the co-inoculated plants with nitrogen-free level. The amount of RG enhanced by increasing nitrogen concentration in nutrient solution. At 10 mM, RG increased by 12.90 %, 11.91 % and 1.44 % compared to the levels of 0, 2 and 6 mM, respectively. As the nitrogen level increased, the percentage of root colonization increased with respect to the control. Nitrogen concentration in shoot and root was enhanced by N increment to 10mM.

Conclusion: Carbon sequestration via glomali synthase by AM fungi is an important pathway for capturing CO_2 from atmosphere. Field management measures help AM development of glomalin production. Based on our results, co-inoculated plants with AM and rhizobuim seem to positively affect the production of this glycoprotein. On the other hand, SG decreased significantly by increasing nitrogen concentrations in the nutrient solution. RG, however, increased significantly as a result of increased nitrogen in both fungal inoculations. The highest amount of RG was recorded in the co-inoculated plants with 10mM level. Glomalin synthesis by the fungi is positively affected by the soil nitrogen availability. Nitrogen is the main constituent of this glycoprotein. Plant photosynthates are translocated to the fungal organs via roots and mainly utilized for glomalin synthesis in

1 and 2- Ph.D. Student and Professor of Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Uuniversity of Tabriz, Tabriz, Iran
(*- Corresponding Author Email: vahideh_shabani@yahoo.com)
3- Professor of Department of Immunology, Faculty of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
4- Professor of Department of Plant Science, Faculty of Natural Science, University of Tabriz, Tabriz, Iran
5 and 6 -Associate Professor and Assistant Professor of Immunology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

hyphal and spore cell walls. During this process, nitrogen plays an important role as a constituent of the glycoprotein. The Bradford method was used for glomalin determination in this study. The method is not specific for glomalin and can also measure other glomalin related proteins and glycoproteins. Other proteins increased by N fertilization can hence be measured based on Bradford method. Once plant assimilates are translocated to the fungi, they may be transformed to the nitrogenous compounds if sufficient nitrogen sources are available. Accordingly, a considerable amount of fixed carbon is assimilated in fungal organs and soil particles. It can be concluded that carbon sequestration by arbuscular mycorrhizal symbiosis in terrestrial ecosystems can be improved by N fertilization at optimum level. In addition, the presence of rhizobium bacteria can meet the nitrogen requirement of plants through biological stabilization of nitrogen.

Keywords: Arbuscular mycorrhizal fungi, Bradford, Glomalin, Nitrogen, Rhizobium