نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۶، شماره ۴، مهر – آبان ۱۳۹۱، ص. ۸۷۲-۸۶۴

Journal of Water and Soil
Vol. 26, No.4, Sept.-Oct. 2012, p. 864-872

تاثیر کادمیم، روی و فسفر بر گلومالین تولید شده توسط قارچ‌های میکوریزای آربسکولار همزیست با شبدر سفید

آیدا معدنی[1*]- امیر لکزیان[2]- غلامحسین حق نیا[3]- رضا خراسانی [4]

تاریخ دریافت:۹۰/۳/۱
تاریخ پذیرش:۹۰/۱۰/۲۵

چکیده

غلظت‌های بالای عناصر سنگین و وجود فسفر زیاد در خاک موجب کاهش رشد و فعالیت قارچ‌های میکوریزای آربسکولار و در نتیجه کاهش تولید اسپور توسط این قارچ‌ها می‌گردد. به منظور ارزیابی اثر عناصر سنگین روی و کادمیم و عنصر فسفر بر میزان فعالیت قارچ‌های میکوریزای آربسکولار از طریق اندازه‌گیری گلومالین تولید شده توسط این قارچ‌ها، آزمایشی به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملا تصادفی اجرا گردید. فاکتورهای آزمایش شامل دو گونه مختلف قارچ میکوریزای آربسکولار *G. mosseae* و*G. intraradices* و بدون میکوریزا (NM)، و ۶ ترکیب فلزی (روی ۴۰۰ ، کادمیم ۲۵، روی و کادمیم به ترتیب ۴۰۰ و ۲۵، فسفر ۵۰، فسفر، روی و کادمیم به ترتیب ۵۰، ۴۰۰ و ۲۵ میلی‌گرم در کیلوگرم نمونه خاک و بدون فلز) در سه تکرار بودند. نتایج نشان داد که تیمارهای تلقیح شده با قارچ میکوریزای آربسکولار، گلومالین بیشتری را در مقایسه با تیمارهای بدون میکوریزا تولید کردند. اعمال عناصر مختلف کادمیم، روی و فسفر موجب کاهش تولید گلومالین در هر دو گونه قارچ میکوریزا شدند. به‌طوریکه بیشترین کاهش گلومالین در گونه *G. intraradices* در تیمار کادمیم و در گونه *G. mosseae* در تیمار روی مشاهده شد. نتایج همچنین وجود یک رابطه همبستگی مثبت بین گلومالین اندازه‌گیری شده به روش برادفورد و روش اندازه‌گیری درصد کلونیزه شدن ریشه را مشخص کرد. طبق نتایج به‌دست آمده از این مطالعه، مقدار گلومالین در خاک می‌تواند به عنوان شاخصی از فعالیت قارچ میکوریزا و سلامت خاک مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: عناصر سنگین، *G. mosseae*، *G. intraradices*، گلومالین

مقدمه

در سال‌های اخیر، آلودگی خاک به عناصر سنگین به عنوان یکی از مهم‌ترین آلودگی‌های زیست محیطی مطرح بوده است (۳۰). عوامل زیادی در ایجاد آلودگی خاک به عناصر سنگین نقش دارند (۸ و ۲۳). از جمله این عوامل که در دو قرن گذشته موجب افزایش قابل توجه عناصر سنگین در خاک شده است، می‌توان به استخراج معادن و صنایع ذوب فلزات اشاره کرد (۵). تا به امروز تلاش‌های زیادی در جهت کنترل این فعالیت‌ها انجام گرفته است. اما همواره عوامل دیگری از جمله کاربرد کودهای معدنی، آفت کش‌ها و پسماند فاضلاب موجب تجمع روز افزون فلزات سنگین در خاک شده‌اند (۱۴). تاثیر عمده تجمع فلزات سنگین ایجاد سمیت برای جانداران و ریزجانداران موجود در خاک است (۶). تغییر شرایط فیزیکی و شیمیایی محیط خاک از جمله کاهش اسیدیته، تغییر پتانسیل اکسایش و کاهش و افزایش تجزیه مواد آلی سبب فعال شدن یون‌های فلزی شده و در نتیجه جانداران خاک در معرض آسیب جدی قرار می‌گیرند (۱۳ و ۱۵). در بین جانداران و ریز جانداران موجود در خاک، قارچ‌های میکوریزای آربسکولار یکی از مهم‌ترین ریزجانداران خاک هستند و از تنوع بالایی در خاک‌های مناطق مختلف برخوردارند (۲). با توجه به وظایف مهمی که قارچ‌های میکوریزا در خاک ایفا می کنند، شناخت دقیق از میزان حضور و فراوانی آن‌ها به خصوص در شرایطی که خاک آلوده به عناصر سنگین می‌باشد، حائز اهمیت است (۱۴ و ۲۱).

طی سال‌های گذشته محققان برای تعیین حضور یا عدم حضور و میزان فراوانی قارچ‌های میکوریزا از روش‌های مختلف استفاده کرده‌اند که هرکدام از این روش‌ها با دشواری‌های زیادی همراه بوده است (۷). یکی از معمول‌ترین این روش‌ها مشاهده میکروسکوپی ساختارهای قارچی به کمک رنگ آمیزی با رنگ‌های بیولوژیکی مانند تریپن بلو

۱،۲،۳و۴- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشیار، استاد و استادیار گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*- نویسنده مسئول: Email: madani.aida@yahoo.com)

بوده است (۱۲). در این تکنیک بعد از مرحله رنگ آمیزی اندازه گیری درصد کلونیزه شدن ریشه از راه‌های مختلف از قبیل شبکه مربعی (۱۰)، روش تقاطع بزرگنمایی شده (۲۰) و روش شدت کلونیزه شدن ریشه (۲۶) صورت می‌گیرد. در این روش شناسایی میکروسکوپی قارچ‌های میکوریزا و انجام مراحل رنگ آمیزی ریشه‌ها کاربسیار زمان‌بری خواهدبود، ضمن این‌که مواد رنگ آمیزی مورد نیاز در این روش سمی می‌باشند (۹). با توجه به وقت‌گیر بودن این روش، لزوم به‌کارگیری تکنیک‌های سریع محققان را به استفاده از شاخص های بیوشیمیایی در جهت شناسایی قارچ‌های میکوریزا سوق داد. در این رابطه تا کنون مطالعات زیادی صورت گرفته است و همبستگی شاخص‌های بیوشیمیایی مختلف با درصد کلونیزه شدن ریشه بررسی شده است. به عنوان مثال، در تحقیقی مشخص شد ریشه‌های حاوی میکوریزا درگیاه پیاز قادر به تولید ماده زرد رنگی هستند که اندازه گیری این ماده با درصد کلونیزه شدن ریشه‌ها همبستگی مثبت نشان داد (۳). در مطالعه‌ای دیگر با استفاده از کروماتوگرافی و اندازه گیری کیتین استخراج شده از ریشه‌های میکوریزایی درصد کلونیزه شدن ریشه‌ها را بررسی کردند (۱۶). اما در سال‌های بعد محققان دریافتند که هیچ‌یک ازاین شاخص‌ها نمی‌تواند لزوما خاص حضور قارچ میکوریزا در خاک باشد بلکه این مواد توسط ریزجانداران دیگر نیز تولید می‌شوند (۳۱). همان‌طور که برخی محققان وجود ارگسترول را در خاک شاخصی از حضور قارچ میکوریزا دانستند ولی بعدا اثبات شد که قارچ‌های میکوریزا امکان تولید چنین ماده ای را ندارند (۲۴).

با توجه به محدودیت‌های زیادی که هریک از این روش‌ها با آن مواجه بود، دانشمندان در این سال‌ها همواره به دنبال روشی دقیق و قابل اعتماد بوده‌اند. به طوری‌که در چند سال اخیر موفق به کشف گلیکوپروتئینی شده‌اند که از دیواره هیف و اسپور قارچ‌های میکوریزای آربسکولار تراویده می‌شود (۲۲). این گلیکوپروتئین که از گونه‌های گلوموس تراویده می‌شود، گلومالین نامگذاری شده‌است (۳۲). تاکنون وظایف زیادی برای گلومالین مطرح شده‌است که از جمله آن‌ها می‌توان کمک به پایداری خاکدانه‌ها، کمک به ترسیب کربن خاک و کاهش فراهمی عناصر سنگین از طریق تثبیت آن‌ها اشاره کرد (۱۱). هم‌چنین در برخی تحقیقات همبستگی این ماده با رشد هیف قارچ و درصد کلونیزه شدن ریشه درسطح مزرعه و در شرایط گلخانه بررسی شده‌است (۲۸).

بنابراین با توجه به وجود همبستگی بین غلظت گلومالین و حضور قارچ میکوریزا در تحقیقات انجام شده، لزوم مطالعات بیشتر در مورد به کارگیری گلومالین به عنوان شاخصی از رشد قارچ میکوریزا در خاک احساس می‌شود. در این تحقیق سعی شده با مطالعه مستقیم قارچ‌های میکوریزا ابتدا مقایسه‌ای بین گلومالین تولید شده توسط دو گونه قارچ میکوریزا انجام شود و سپس تاثیر غلظت‌های بالای عناصر روی، کادمیم و فسفر از طریق اندازه‌گیری گلومالین تولید شده در دو گونه قارچ میکوریزا بررسی شود. در پایان جهت تشخیص کارابودن این روش، وجود همبستگی بین غلظت گلومالین اندازه گیری شده و درصد کلونیزه شدن ریشه مورد مطالعه قرار می‌گیرد.

مواد و روش‌ها

آزمایش در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد، به صورت فاکتوریل با آرایش طرح کاملا تصادفی در سه تکرار انجام شد. فاکتورهای آزمایش شامل دو گونه مختلف قارچ میکوریزای آربسکولار *G. mosseae* و *G. intraradices* و بدون میکوریزا (NM)، و ۶ ترکیب فلزی (روی ۴۰۰ ، کادمیم ۲۵، روی و کادمیم به ترتیب ۴۰۰ و ۲۵، فسفر ۵۰، فسفر، روی و کادمیم به ترتیب ۵۰، ۴۰۰ و ۲۵ میلی‌گرم درکیلوگرم نمونه خاک و بدون فلز) بودند. برای آماده‌سازی سیستم کشت در این آزمایش، گلدان‌هایی در ابعاد ۱۰×۱۵×۱۵ طراحی شدند. در فاصله ۵ سانتی‌متری از لبه گلدان غشایی با اندازه منافذ ۳۰ میکرومتر نصب شد. خاصیت این غشا به گونه‌ای است که ریشه‌های گیاه شبدر سفید با توجه به قطری که دارند قادر به عبور از غشا نیستند در حالی‌که هیف‌های قارچ از این غشا عبور می‌کنند. به این ترتیب با بهره‌گیری از غشای نایلونی گلدان‌ها به دو بخش هیفی و بخش ریشه ای تقسیم شدند. در واقع جداسازی این دو محیط باعث می‌شود که ریشه گیاه در مراحل اولیه کلونیزه شدن توسط قارچ میکریزا از اثرات مستقیم عناصر کادمیم، روی و فسفر دور باشد و کلونیزه شدن گیاه به نوعی ایده‌آل انجام شود. در این صورت با رشد هیف‌ها به بخش هیفی اندازه گیری گلومالین و در اصل فعالیت قارچ میکوریزا در مواجه با غلظت‌های بالای عناصر سنگین و فسفر می‌تواند دقیق تر باشد. (شکل ۱).

شکل ۱- سیستم کشت دو بخشی (بخش هیفی و بخش ریشه‌ای)

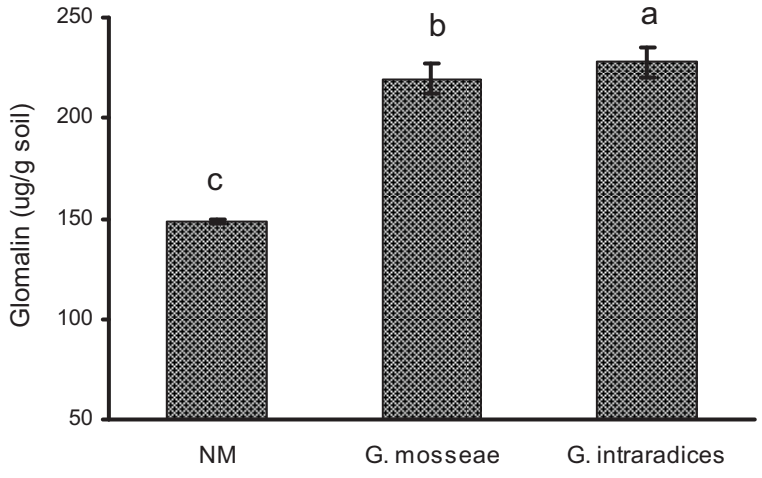
خاک مورد استفاده در این آزمایش یک خاک لوم شنی بود که از عمق ۳۰-۰ سانتی متری مزرعه تحقیقاتی دانشگاه فردوسی مشهد در استان خراسان رضوی تهیه شد. اسیدیته خاک ۷/۳، کربن آلی ۰/۲۳ درصد، نیتروژن کل ۰/۰۱۷ درصد، فسفر قابل دسترس ۵/۲ میلیگرم

بر کیلوگرم خاک و پتاسیم قابل دسترس ۷۰ میلیگرم بر کیلوگرم خاک اندازه‌گیری شد. سترون کردن نمونه‌های خاک در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ دقیقه در دو مرحله و با فاصله ۲۴ ساعت، به کمک دستگاه اتوکلاو انجام شد. عناصر روی و کادمیم به شکل نمک سولفاتی و فسفر به شکل محلول (CaH_2PO_4) بر اساس تیمارهای آزمایشی به خاک بخش هیفی هر گلدان اعمال شدند. در بخش ریشه‌ای گلدان، نمونه‌های خاک با مواد تلقیحی دو گونه قارچ میکوریزای آربسکولار *G. mosseae* و *G. intraradice* مخلوط شدند و ماده تلقیحی سترون شده به شاهد اضافه شد. شبدر سفید (*Trifolium repens*) به عنوان گیاه میزبان در این تحقیق انتخاب شد. به منظور رفع هرگونه آلودگی، بذرهای شبدر قبل از کاشت به مدت ۱۰ دقیقه در محلول ۳ درصد هیپوکلریت سدیم ضدعفونی شدند. سپس تعداد ۲۰ بذر جوانه‌زده شبدر در بخش ریشه ای گلدان که مربوط به گیاه میزبان بود، کشت شدند. در طول دوره آزمایش رطوبت خاک در حد ۷۰ درصد ظرفیت مزرعه‌ای با آب مقطر تنظیم شد. بعد از ۱۲ هفته از تاریخ کشت، گلومالین از نمونه های بخش هیفی گلدان‌ها بر اساس دستورالعمل سدیم پیروفسفات عصاره گیری شد (۳۲). به منظور عصاره‌گیری گلومالین از ۲ گرم خاک در بخش هیفی گلدان نمونه‌گیری شد. سپس ۸ میلی لیتر سدیم پیروفسفات ۱۰۰ میلی مولار با اسیدیته برابر ۹ به نمونه خاک اضافه شد و نمونه‌ها در دستگاه اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد به مدت ۶۰ دقیقه اتوکلاو شدند. بعد از انجام اتوکلاو نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در دور ۵۰۰۰ در دستگاه سانتریفوژ قرار گرفتند. بعد از جداسازی، محلول رویی تا زمان اندازه‌گیری در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد (۳۲). در پایان آزمایش جهت کمی‌کردن گلومالین استخراج شده، از اندازه‌گیری پروتئین به روش برادفورد استفاده شد (۲۷). محلول استاندارد این روش سرم آلبومین گاوی بود. در پایان جهت تعیین درصد کلونیزه شدن ریشه‌ها از روش ماسه (۱۰) استفاده شد. رنگ آمیزی ریشه های حاوی میکوریزا به روش کرومانیک و مک‌گرو (۱۷) انجام شد. سپس برای تعیین درصد کلونیزه شدن، ریشه‌های رنگ آمیزی شده به طور تصادفی درون ظروف پتری پخش و زیر بینوکولر مشاهده شدند. با شمارش مکان های تلاقی ریشه و مکان های تلاقی اندام‌های میکوریزایی ریشه‌ها با شبکه درون پتری دیش درصد کلونیزاسیون به دست آمد. تجزیه آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار MSTATC و مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد انجام شد.

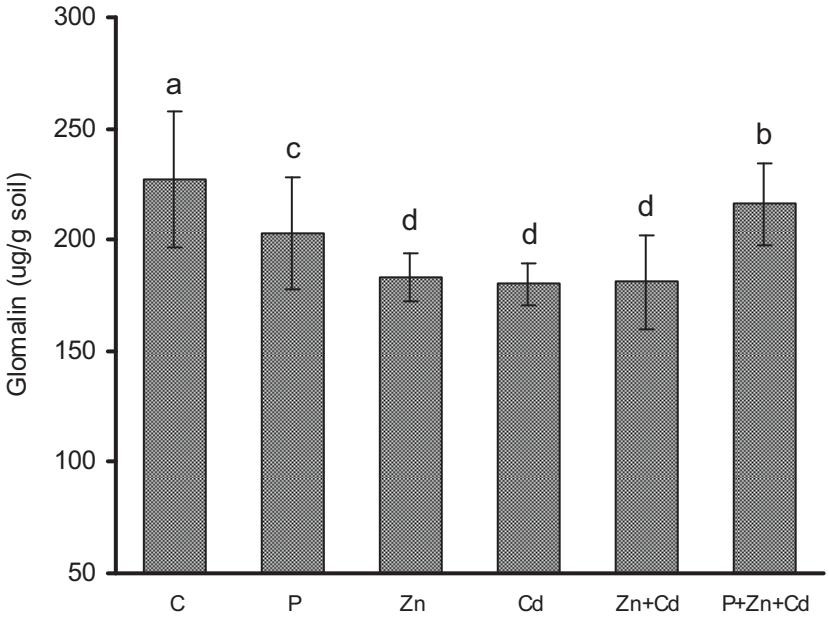
نتایج و بحث

نتایج به دست آمده از این آزمایش در شکل ۲ نشان داد که محتوی گلومالین در بخش هیفی گلدان در تیمارهای تلقیح شده با *G. mosseae* و *G. intraradices* در مقایسه با تیمارهای غیر میکوریزایی به طور معنی دار افزایش یافت که این نشاندهنده توانایی قارچ‌ها در تولید گلومالین می باشد. همچنین با توجه به شکل ۲ مشخص شد که بین دو گونه قارچ از نظر تولید گلومالین تفاوت نسبتا معنی‌داری وجود دارد و به نظر می رسد گونه *G. intraradices* در این آزمایش توانایی بیشتری در تولید گلومالین داشت.

شکل ۳ روند تغییرات غلظت گلومالین را در نتیجه اعمال غلظت‌های عناصر سنگین و همچنین فسفر نشان می‌دهد. همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود غلظت گلومالین در تیمارهای حاوی عناصر روی و کادمیم و روی به همراه کادمیم به طور معنی‌داری نسبت به کنترل کاهش نشان داد.



شکل ۲ تغییرات غلظت گلومالین (میکروگرم بر گرم خاک) در تیمارهای میکوریزایی و غیر میکوریزایی (n=۱۸)



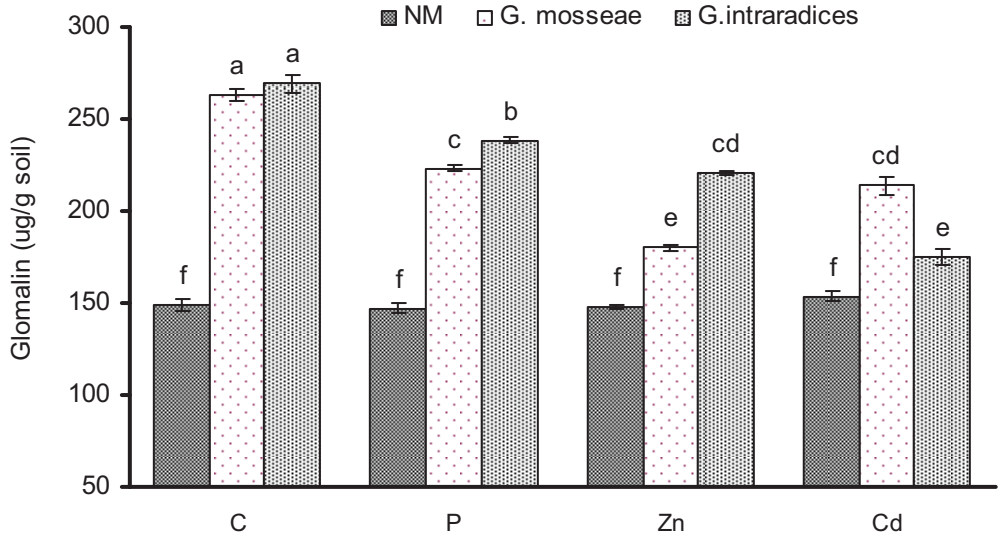
شکل ۳- تغییرات غلظت گلومالین (میکروگرم بر گرم خاک) زیر تاثیر عناصر فسفر، روی و کادمیم (n=۹)

این کاهش در مورد فسفر نیز مشاهده شد و در تیمارهایی که اثر عناصر سنگین به اضافه فسفر مطالعه شد این کاهش در غلظت گلومالین به مراتب کمتر بود. احتمالا این موضوع به اثرات متقابل بین عناصر سنگین و فسفر بر می‌گردد (۱۸).

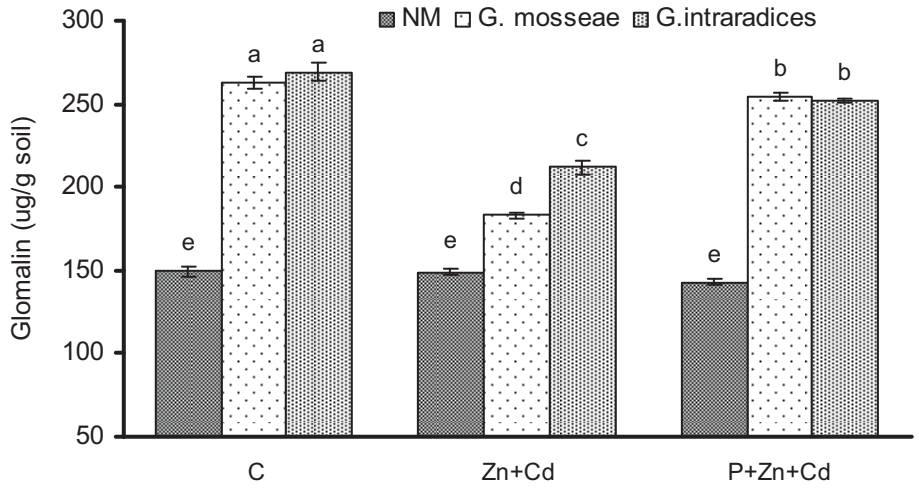
بررسی اثرات متقابل در شکل ۴ نشان داد که محتوی گلومالین در تیمارهای غیرمیکوریزایی تفاوت معنی‌داری نداشت. بنابراین می‌توان نتیجه‌گیری کرد که هیچگونه هیف قارچ در بخش هیفی گلدان‌های غیرمیکوریزایی نفوذ نکرده و مقدار اندازه گیری شده مربوط به غلظت اولیه گلومالین در خاک است. در مقایسه غلظت گلومالین در بخش هیفی تیمارهای میکوریزایی زیر تاثیر عناصر روی، کادمیم و فسفر قرار گرفت (شکل ۴). به طوری که بیشترین گلومالین تولید شده توسط دو گونه قارچ میکوریزا در تیمارهای کنترل بود. حضور عناصر سنگین و فسفر غلظت گلومالین را در بخش هیفی تیمارها به طور معنی‌دار در هر دو گونه قارچ میکوریزا در مقایسه با تیمارهای کنترل کاهش داد. به علاوه تاثیر عناصر سنگین نسبت به فسفر به طور معنی‌داری قابل توجه بود. این نتیجه فرضیه اول ما را مبنی بر کاهش رشد قارچ میکوریزا با افزایش عناصر سنگین و فسفر در خاک تایید می‌کند. اسمیت و همکاران (۲۹) نیز نتایج مشابهی گرفتند و نشان دادند که بین اندازه جمعیت قارچ و محتوی فسفر خاک همبستگی منفی وجود دارد. نتایج به‌دست آمده در مورد عناصر سنگین نیز با چندین مطالعه انجام شده در این زمینه موافق بود (۴، ۶ و ۱۹). پائولوسکا و همکاران (۲۵) نیز اثر منفی عناصر سنگین را روی تنوع جمعیت میکروبی و فعالیت قارچها نشان دادند. بر طبق نتایج به دست آمده در شکل ۴ همچنین مشخص شد کم‌ترین گلومالین تولید شده توسط *G. intraradices* تحت تیمار کادمیم بود، هر چند غلظت گلومالین در *G. mosseae* بیشتر زیر تاثیر روی کاهش نشان داد. در واقع غلظت گلومالین اندازه‌گیری شده در تیمارهای مختلف گویای میزان رشد هریک از گونه‌های قارچ میکوریزا زیر تاثیر عناصر مختلف می‌باشد.

در بررسی اثرات متقابل هر سه عنصر کادمیم، روی و فسفر در شکل ۵ مشخص شد که مصرف عنصر فسفر به بخش هیفی تیمارها اثرات سوء کادمیم به همراه روی بر تولید گلومالین را تا حدودی تعدیل کرد. احتمالا این موضوع به اثرات آنتاگونیستی بین عنصر فسفر و عناصر سنگین مانند کادمیم و روی مربوط می‌شود. در برخی مطالعات نیز نشان داده شده که با افزایش سطح فسفر خاک، تاثیر سمیت برخی عناصر در خاک کاهش می‌یابد (۱۸). با توجه به این نتیجه می توان گفت، کاربرد فسفر در خاک‌های آلوده به عناصر سنگین شاید بتواند تاثیر سمیت این عناصر برفعالیت قارچ را تا حدودی کنترل کند. همچنین مشاهده شد که مصرف هر دو عنصر روی و کادمیم به تیمارها غلظت گلومالین را در هر دو گونه قارچ به طور معنی‌داری کاهش داد. این کاهش در مورد *G. mosseae* نسبت به *G. intraradices* واضح تر بود (شکل ۵).

در ادامه نتایج به دست آمده از شکل ۶ (الف و ب) نشان داد رابطه همبستگی بالایی بین غلظت گلومالین اندازه گیری شده به روش برادفورد و درصد کلونیزه شدن ریشه وجود دارد. این همبستگی در مورد هر دو گونه میکوریزا میزان قابل توجهی به دست آمد.



شکل٤- بر همکنش میکوریزای آربسکولار و عناصر فسفر، کادمیم و روی بر غلظت گلومالین (میکروگرم بر گرم خاک)

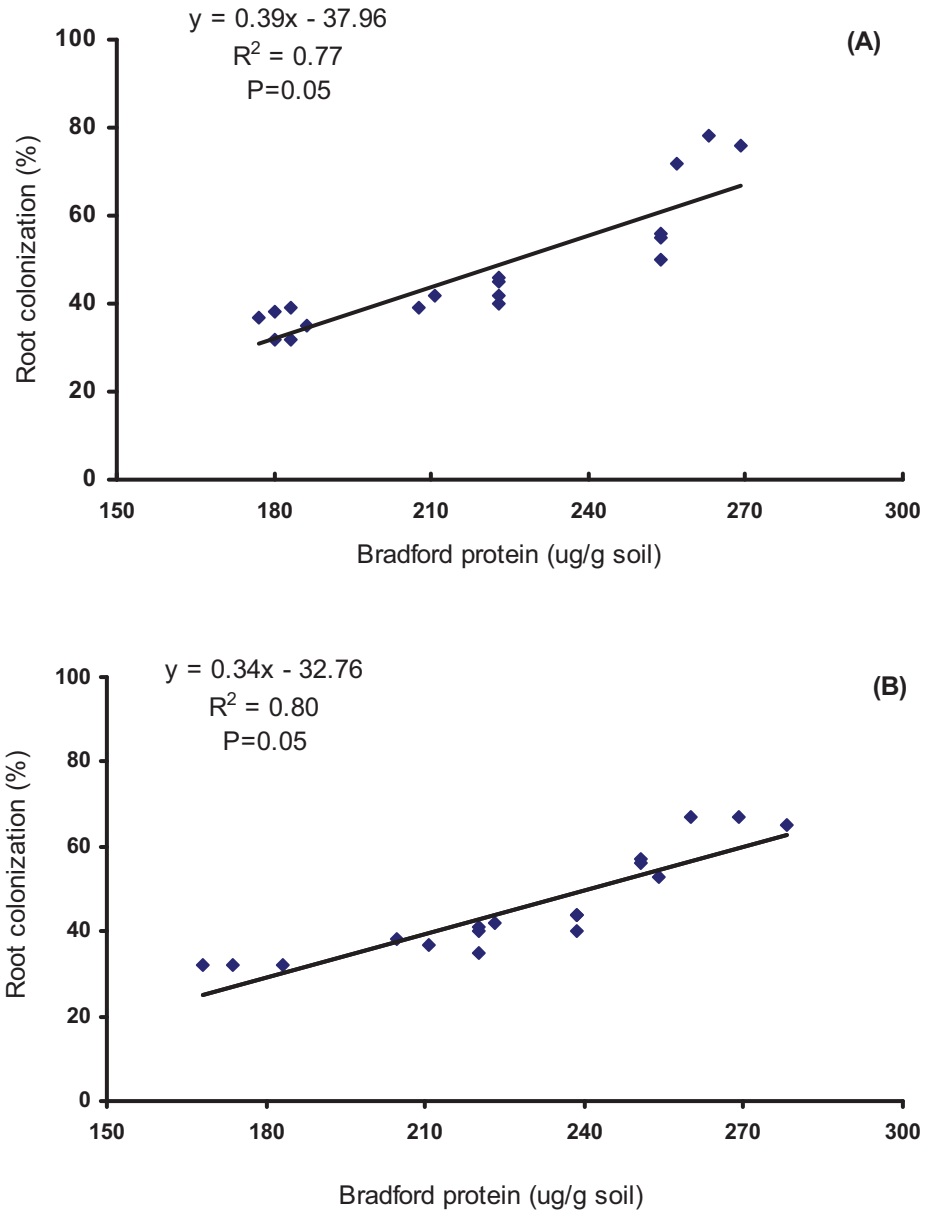


شکل ٥- برهمکنش میکوریزای آربسکولار و عناصرروی + کادمیم، فسفر+ روی+ کادمیم بر غلظت گلومالین (میکروگرم بر گرم خاک)

این نتیجه مشخص می‌کند که اندازه گیری گلومالین تولید شده توسط قارچ میکوریزا با روش برادفورد دست کم اطلاعاتی از حضور و عدم حضور میکوریزا در مقیاس‌های کوچک و یا بزرگ در حد مزرعه فراهم می‌کند. در ضمن کارایی و سرعت این روش نسبت به اندازه گیری درصد کلونیزه شدن ریشه‌ها تا حدودی به اثبات رسید (۲۷).

نتیجه‌گیری

نتایج به دست آمده از این آزمایش نشان داد که تولید گلومالین با اعمال عناصر سنگین و عنصر فسفر کاهش یافت. با اعمال سه عنصر کادمیم، روی و فسفر، کاهش گلومالین در گونه *G. mosseae* بیشتر زیر تاثیر عنصر روی بود و در گونه *G. intraradices* بیشتر زیر تاثیر عنصر کادمیم بود. نتایج همچنین ثابت کرد که سنجش پروتئین به روش برادفورد برای اندازه‌گیری غلظت گلومالین روش سریع و کارآمدی است. به کارگیری این روش در مطالعاتی که جنبه مقایسه‌ای داشته و در شرایط سترون و محیط گلخانه انجام می‌گیرد، توصیه می‌شود. البته باید در نظر داشت دقت این روش بستگی به میزان ماده آلی موجود در خاک دارد، که به دلیل برهم کنش‌های زیاد، در خاک‌های با ماده آلی بالا استفاده از این روش پیشنهاد نمی‌شود. در این طرح با توجه به تاثیر متفاوت عناصر سنگین بر رشد دو گونه قارچ پیشنهاد می‌شود که در طرح‌های آتی از گونه‌های دیگر قارچ میکوریزا به خصوص گونه‌های مقاوم به عناصر سنگین استفاده شود.



شکل ٦- ارتباط گلومالین تولیده شده و درصد کلونیزه شدن ریشه توسط *G. mosseae* (A) و *G. intraradices* (B)

به‌علاوه به کارگیری گونه‌های مختلف گیاهی از جمله سورگوم با داشتن سیستم ریشه‌ای توسعه یافته و پتانسیل بالای تحریک کنندگی قارچ در تولید ساختارهای قارچی (هیف و اسپور) مورد مطالعه قرار گیرند.

منابع

1- Adeleke A.B. 2010. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth-promoting rhizobacteria on glomalin production. M.Sc. thesis, University of Saskatchewan, Saskatoon, Saskatchewan, Canada.
2- Barea J.M., and Jeffries P. 1995. Arbuscular Mycorrhizas in Sustainable Soil Plant Systems, Mycorrhiza Structure, Function, Molecular Biology and Biotechnology. p. 521-559. In B. Hock et al (ed). Springer-Verlag, Heidelberg, Germany.
3- Becker W.N., and Gerdemann J.W. 1977. Colorimetric quantification of vesicular–arbuscular mycorrhizal infection

in onion. New Phytologist, 78:289-295.
4- Brooks P.C., Heijnen C., McGrath S.P., and Vance E.D. 1986. Soil microbial biomass estimates in soils contaminated with metals. Soil Biology & Biochemistry, 18:345-353.
5- Candelone J.P., Hong S., Pellone C., and Boutron C.F. 1995. Post-industrial revolution changes in large-scale atmospheric pollution of the northern hemisphere by heavy metals as documented in central Greenland snow and ice. Journal of Geophysical Research, 100:16605-16616.
6- Chaudri A.M., McGrath S.P., Giller K.E., Rietz E., and Sauerbeck D. 1993. Enumeration of indigenous *Rhizobium leguminossarum* biovar trifolii in soils previously treated with metal sewaged sludge. Soil Biology & Biochemistry, 25:301-309.
7- Chen B., Christie P., and Li x. 2001. A modified glass bead compartment cultivation system for studies on nutrient and trace metal uptake by arbuscular mycorrhiza. Chemosphere, 42:185-192.
8- Chen H.M., Zheng C.R., Tu C., and Zhu Y.G. 1999. Heavy metal pollution in soils in China: status and countermeasures. Ambio, 28:130-134.
9- Coombes R.D., and Haveland-Smith R.B. 1982. A review of the genotoxicity of food, drug, and cosmetic colours and other azo, triphenylmethane and xanthene dyes. Mutation Research, 98:101-248.
10- Giovannetti M., and Mosse B. 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular–arbuscular mycorrhizal infection in roots. New Phytologist, 84:489-500.
11- González-Chávez 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- Grace C., and Stribley D.P. 1991. A safer procedure for routine staining of vesicular–arbuscular mycorrhizal fungi. Mycological Research, 95:1160-1162.
13- Gupta S.K. 1992. Mobilizable Metal in Anthropogenic Contaminated Soils and Its Ecological Significance, Impact of Heavy Metals on the Environment. p. 299-310. In J.P. Vernet (ed). Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
14- Harland B.J., Taylor D., and Wither K. 2000. The distribution of mercury and other trace metals in the sediments of the Mersey Estuary over 25 years 1974–1998. The Science of The Total Environment, 253:45-62.
15- Hattori H. 1996. Decomposition of organic matter with previous cadmium adsorption in soils. Soil Science and Plant Nutrition, 42:745-752.
16- Hepper C. 1976. A colorimetric method for estimating vesicular–arbuscular mycorrhizal infection in roots. Soil Biology & Biochemistry, 9:15-18.
17- Kormanik P.P., Bryan W.C., and Schultz R.C. 1979. Procedures and equipment for staining large numbers of plant root samples for mycorrhizal assay. Canadian Journal of Microbiology, 26:537-538.
18- Liu A., Hamel C., Hamilton R.I., and Ma B.L. 2000. Acquisition of Cu, Zn, Mn and Fe by mycorrhizal maize (*Zea mays* L.) grown in soil at different P and micronutrient levels. Mycorrhiza, 9:331-336.
19- McGrath S.P., Chaudri A.M., and Giller K.E. 1995. Long-term effects of metals in sewage sludge on soils, microorganisms and plants. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 14:94-104.
20- McGonigle T.P., Miller M.H., Evans D.G., Fairchild G.L., and Swan J.A. 1990. A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular arbuscular mycorrhizal fungi. New Phytologist, 115:495-501.
21- Miller M.R., and Jastrow J.D. 1992. The Application of VA Mycorrhizae to Ecosystem Restoration and Reclamation, Mycorrhizal Functioning. p. 488-517. In M.J. Allen (ed). Chapman and Hall, New York, N.Y.
22- Nichols K. Characterization of glomalin-a glycoprotein produced by arbuscular mycorrhizal fungi. PhD dissertation, University of Maryland, College Park, Maryland.
23- Nriagu J.O., and Pacyna J.M. 1988. Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. Nature, 333:134-139.
24- Olsson P.A., Larsson L., Bago B., Wallander H., and Van Aarle I.M. 2003. Ergosterol and fatty acids for biomass estimates of mycorrhizal fungi. New Phytologist, 159:7-10.
25- Pawloska T.E., Blaszkowski J., and Ru¨hling A. 1996. The mycorrhizal status of plants colonizing a calamine spoil mound in southern Poland. Mycorrhiza, 6:499-505.
26- Rillig M.C., Allen M.F., Klironomos J.N., and Field C.B. Arbuscular mycorrhizal percent root infection and infection intensity of *Bromus hordeaceus* grown in elevated atmospheric CO_2. Mycologia, 90:199-205.
27- Rosier C.L., Piotrowski C., Jeffrey. J., Hoyea S., and Rillig M.C. 2008. Intraradical protein and glomalin as a tool for quantifying arbuscular mycorrhizal root colonization Pedobiologia, 52:41-50.
28- Rosier C.L., Hoye A.T., and Rillig M.C. 2006. Glomalin-related soil protein: assessment of current detection and quantification tools. Soil Biology & Biochemistry, 38:2205-2211.
29- Smith S.E., and Read D.J. 1997. Mycorrhizal Symbiosis. Academic Press, London, England.
30- Steinnes E., and Njåstad O. 1995. Enrichment of metals in the organic surface layer of natural soil: Identification of contributions from different sources. Analyst, 120:1479-1483.
31- Wright S.F., Morton J.B., and Sworobuk J.E. 1987. Identification of a vesicular–arbuscular mycorrhizal fungus by

using monoclonal antibodies in an enzyme-linked immunosorbent assay. Applied and Environmental Microbiology, 53:2222-2225.

32- 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.

Journal of Water and Soil
Vol. 26, No.4, Sept.-Oct. 2012, p. 864-872

نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۶، شماره ۴، مهر – آبان ۱۳۹۱، ص. ۸۷۲-۸۶۴

The Effect of Cadmium, Zinc and Phosphorus on Glomalin Produced by Arbuscular Mycorrhizal (AM) Fungi in Symbiosis with White Clover

A. Maadani[1*]- A. Lakzian[2]- Gh. Haghnia[3]- R. Khorasani[4]

Received:22-5-2011
Accepted:15-1-2012

Abstract

High concentration, of heavy metals and the presence of phosphorus in soils may cause a reduction in the growth and activity of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi and consequently, the spore production of these fungi would decrease. In order to evaluate the effect of zinc and cadmium as heavy metals and phosphorus on arbuscular mycorrhizal fungi activity through measuring glomalin produced by these fungi a factorial experiment arranged as completely randomized design was carried out. Experimental factors included two fungal species *G. mosseae* and *G. intraradices* and non mycorrhiza (NM), six combinations of metals (400 mg of Zn, 25 mg of Cd, 400 mg of Zn + 25 mg of Cd, 50 mg P, 50 mg of P+ 400 mg of Zn + 25 mg of Cd, and no metal kg^{-1} soil sample) in three replications. The results showed that inoculated treatments produced more glomalin compared to non mycorrhizal treatments. The application of Cd, Zn and P caused a significant reduction in produced glomalin by both fungi species. The most reduction of glomalin in *G. intraradices* was detected in Cd treatment and in *G. mosseae* was in Zn treatment. The result also showed a positive correlation between the measured glomalin by Bradford assay and the percent of root colonization. According to the results of this study, glomalin in soil could be an indicator to monitor arbuscular mycorrhizal fungi activity and soil health.

Keywords: Heavy metals, *G. mosseae, G. intraradices,* Glomalin

1,2,3,4- MSc Student, Associate Professor, Professor and Assistant Professor, Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Respectively
(*- Corresponding Author Email: madani.aida@yahoo.com)