

اثر سرب بر مقدار گلومالین هیفی و ریشه‌ای واکنش پذیر با آنتی بادی مونوکلونال و بردفورد در شرایط کشت درون شیشه‌ای و گلدانی

الهام ملک زاده^{1*} - جعفر مجیدی² - ناصر علی اصغرزاد³ - جلال عبدالعلی زاده⁴

تاریخ دریافت: 1394/06/16

تاریخ پذیرش: 1394/09/02

چکیده

گلومالین به عنوان گلیکوپروتئین شناخته شده در قارچ‌های میکوریزی شاخه گلوومومایکوتا و راسته گلوومرال با دو روش بردفورد و آنتی-بادی مونوکلونال اندازه‌گیری می‌شود. با این پیش فرض که تنش ناشی از فلز سمی منجر به افزایش بیان و تولید گلومالین به عنوان پروتئین شوک حرارتی می‌گردد، پژوهشی جهت مطالعه و مقایسه مقدار گلومالین تولیدی در شرایط کشت گلدانی در همزیستی قارچ رایزوفاکوس ایرگولاریز با گیاه شبدر سفید (*Trifolium repens* L.) و کشت درون شیشه‌ای در همزیستی ریشه‌های تراریخت هویج (*Daucus carota* L.) با همان قارچ تحت تنش سرب طراحی گردید. در کشت درون شیشه‌ای با افزایش غلظت سرب (0، 0/01، 0/1 و 1 میلی‌مولار Pb^{+2}) مجموع درصد فراوانی هیف و اسپور کاهش یافت در حالی که پروتئین واکنش‌پذیر بردفورد و پروتئین واکنش‌پذیر با آنتی‌بادی در بخش هیفی افزایش یافت. در کشت گلدانی با افزایش غلظت سرب (0، 150، 300 و 450 میکرومولار Pb^{+2}) درصد طول ریشه کلنی شده نسبت به شاهد افزایش نشان داد. به طور کلی با افزایش غلظت سرب، پروتئین واکنش‌پذیر بردفورد و پروتئین واکنش‌پذیر با آنتی‌بادی در بخش هیفی و ریشه‌های کشت گلدانی افزایش یافت. آنتی-بادی مونوکلونال واکنش متقاطع ناجیزی با پروتئین‌های ریشه‌های غیرمیکوریزی نشان داد. بنابراین تولید گلومالین از طریق ممانعت از تغییر شکل پروتئین‌های مهم و حیاتی گیاه به عنوان پروتئین شوک حرارتی، ساز و کار حفاظتی قارچ‌های میکوریز آربوسکولار در همزیستی با گیاه برای کاهش تنش ناشی از سرب می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: الایزا، بردفورد، قارچ میکوریز آربوسکولار، گلومالین

مقدمه

دهه‌های اخیر راه‌کارهای پالایش خاک‌های آلوده به فلزات سنگین به سمت روش‌های سازگار با محیط زیست با حداقل تخریب و تغییر خصوصیات فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی خاک پیش رفته است. زیست پالایی با سیستم گیاه-میکروارگانیزم (گیاه پالایی غیرمستقیم)² به دلیل روشی با هزینه کم و کارایی بالا، سازگار با محیط زیست و ماندگار³ در خاک‌های آلوده به فلز بسیار مورد توجه قرار گرفته است (2، 10 و 29). تحقیقات متعددی کاربرد قارچ‌های میکوریز آربوسکولار (AM) را جهت افزایش کارایی گیاه پالایی در خاک‌های آلوده به فلز به اثبات رسانده است (8 و 21). از جمله ساز و کارهای قارچ‌های AM، تثبیت فلزات سمی در اندام‌های قارچی شامل هیف‌های درون و برون سلولی و اسپورهای قارچی بواسطه حضور گلیکوپروتئین گلومالین (14 و 15) می‌باشد. گلومالین، که در خاک به

آلودگی خاک به فلزات سنگین به دلیل عدم تجزیه و اثرات سوء آن‌ها بر موجودات زنده و خطر تجمع زیستی در زنجیره‌های غذایی در دهه‌های اخیر حائز اهمیت شناخته شده است، بنابراین مطالعه در مورد آلاینده‌های خاک و ارائه راهکارهای مناسب جهت پالایش ضرورتی انکارناپذیر است. عناصر بالقوه سمی¹ (PTE) نظیر آرسنیک، مس، کادمیوم، کروم، سرب و روی از جمله فراوانترین آلاینده‌های مناطق صنعتی می‌باشند (29). طبق گزارش آژانس حفاظت محیط زیست آمریکا (45) سرب فراوان‌ترین فلز سنگین در مناطق آلوده می‌باشد. در

1 و 3- دانشجوی سابق دکتری و استاد گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

(*- نویسنده مسئول: Email: malekzadeh.elham@gmail.com)

2- استاد گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

4- استادیار مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

5- Potentially toxic elements

6- Plant-microbe assisted bioremediation / Indirect Phytoremediation
7- Long-lasting

MES بود. بخش هیفی 15 میلی لیتر، فاقد ساکارز، حاوی بافر MES 10 میلی مولار و تیمار شده با غلظت‌های 0، 0/01، 0/1 و 1 میلی - مولار از منبع نیترات سرب بود که بعد از فیلتر استریل به بخش هیفی اضافه شدند. pH محیط کشت بخش ریشه‌ای و هیفی قبل از اتوکلاو بر 6 تنظیم شد. جهت یکسان‌سازی اثر نیترات در تمامی تیمارها، نیتروژن به صورت نیترات سدیم در مقادیر مساوی با نیتروژن اضافه در بالاترین سطح سرب به سایر تیمارها اضافه گردید. برای مایه‌زنی بخش ریشه‌ای، قطعه‌ای از محیط کشت MSR حاوی ریشه‌های تراریخت هویج از پیش میکوریزی شده با قارچ که شامل 10 اسپور بود مورد استفاده قرار گرفت. ظروف پتری به مدت 20 هفته در تاریکی و در دمای $30 \pm 2^\circ\text{C}$ داخل انکوباتور قرار گرفتند. جهت استخراج بخش هیفی، از بافر 10 میلی مولار سیترات سدیم (30°C ، pH=6) استفاده گردید. برای تعیین درصد فراوانی هیف و اسپور در بخش هیفی از روش تغییر یافته آنوود و همکاران (3) استفاده گردید.

تهیه زادمایه قارچ

قارچ *رایزوفگوس 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، پس از برش محیط کشت MSR صد در صد پوشیده شده با ریشه‌های تراریخت هویج میکوریزی شده با *رایزوفگوس ایرگولاریز* به قطعات حدوداً یک سانتی متری با شن الک زده 0/5 میلی متری، استریل و عاری از گلوامالین کاملاً مخلوط شدند.

کشت گلدانی

جهت تهیه بستر محیط کشت گلدانی از شن درشت عبور یافته از الک دو میلی متری، عاری از گلوامالین و استریل استفاده شد. برای این منظور ابتدا شستشو با اسید کلریدریک 3 نرمال و سپس استخراج با بافر سیترات سدیم 50 میلی مولار (pH=8)، اتوکلاو به مدت یک ساعت در دمای 121°C و فشار 1/1 اتمسفر انجام گرفت. گلدان‌های 1500 گرمی به قطر دهانه 15 سانتی متر با استفاده از غشاء نالیونی با قطر منافذ 37 میکرون (NBC Meshtec Inc.) با دو بخش ریشه‌ای (800 گرم) و هیفی (700 گرم) تهیه گردید. 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 *رایزوفگوس 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

طور صحیح‌تر به عنوان گلوامالین وابسته به پروتئین خاک¹ (GRSP) تعریف می‌گردد، ترکیبی از دیواره هیف‌ها و اسپورهای قارچ‌های AM می‌باشد و در پایداری خاکدانه‌ها و نیز غیر پویایی فلزات سمی نقش دارد (1، 9، 15، 46 و 52). بنابراین، قارچ‌های AM ممکن است فرآیند تثبیت گیاهی (تثبیت ریشه-قارچ²) را بواسطه تولید گلوامالین افزایش دهند (21 و 30). همچنین شواهدی وجود دارد که تولید گلوامالین تحت شرایط تنش افزایش پیدا می‌کند (12 و 16). گلوامالین معمولاً بوسیله دو روش پروتئین کل و واکنش‌پذیر بردفورد و الیزا³ (ELISA) اندازه‌گیری می‌شود. مطالعات نشان می‌دهد، روش بردفورد واکنش متقاطع با پروتئین‌های غیر میکوریزی یا دیگر مواد موجود در عصاره گلوامالین استخراجی از خاک داشته است (38 و 48)، بنابراین این روش می‌تواند باعث بیش برآورد مقدار GRSP گردد. برای اولین بار راییت و همکاران (50) روش اختصاصی‌تر الیزا را جهت اندازه‌گیری گلوامالین در نمونه‌های خاک و ریشه با استفاده از آنتی‌بادی مونوکلونال 32B11 (تهیه شده بر علیه اسپورهای خرد شده قارچ *رایزوفگوس ایرگولاریز*، که پیش‌تر به عنوان گلواموس *ایتترادیسز* شناخته می‌شد) به کار بردند. بر اساس پژوهش‌های انجام شده، روش بردفورد و الیزا زمانی در اندازه‌گیری گلوامالین مفید واقع می‌شوند که مقدار ماده آلی، بواسطه شستشو و اتوکلاو خاک یا دیگر شرایط کنترل شده آزمایشی، کم باشد (26، 39 و 53). بر اساس یافته‌های قبلی و نقش‌های متعدد گلوامالین در اکوسیستم خاک، و پاسخ به این سوال که آیا مقدار گلوامالین با افزایش غلظت فلز سنگین افزایش پیدا می‌کند؟ و نیز مطالعه رابطه و همبستگی بین مقدار گلوامالین کل و واکنش‌پذیر بردفورد⁴ (BRG) و مقدار گلوامالین واکنش‌پذیر با آنتی‌بادی (IRG⁵) در بخش ریشه‌ای و هیفی کشت گلدانی و درون شیشه‌ای پژوهش حاضر طراحی گردید.

مواد و روش‌ها

کشت درون شیشه‌ای

کشت درون شیشه‌ای ریشه‌های تراریخت هویج (Ri T-DNA) *Daucus carota* L. میکوریزی شده با قارچ *رایزوفگوس ایرگولاریز* در ظروف پتری دو بخشی شامل بخش ریشه‌ای و بخش هیفی صورت گرفت. محیط کشت مورد استفاده در ظروف پتری محیط MSR⁶ بود. بخش ریشه‌ای 15 میلی لیتر و بدون تیمار سرب و بافر

- 1- Glomalin related soil protein
- 2- Mycorrhizostabilization
- 3- Enzyme-linked immunosorbent assay
- 4- Bradford-reactive glomalin
- 5- Immunoreactive glomalin
- 6- Modified Strullu-Romand

طرح آزمایشی و تجزیه آماری

کشت‌گلدانی به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک کامل تصادفی در پنج تکرار و کشت شیشه‌ای به صورت طرح کامل تصادفی در هشت تکرار اجرا شدند. آزمون نرمال بودن توزیع داده‌ها و سپس تجزیه واریانس و مقایسه میانگین داده‌ها بوسیله آزمون چند دامنه دانکن در سطح معنی داری 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 و بحث

درصد فراوانی هیف و اسپور در کشت درون شیشه‌ای

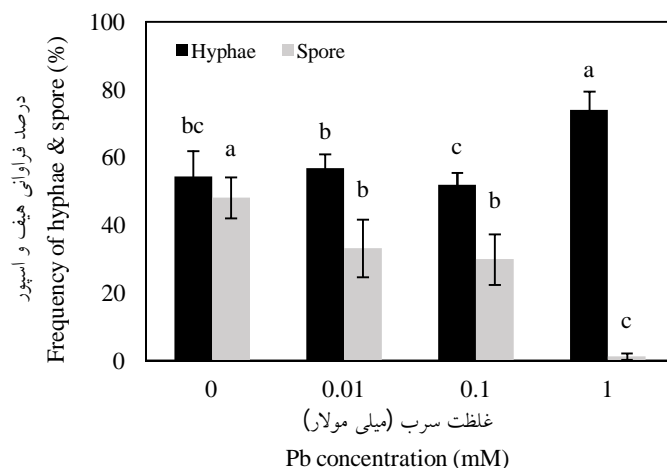
بر اساس نتایج تجزیه واریانس داده‌ها، اثر سطوح مختلف سرب بر درصد فراوانی هیف و اسپور در سطح 0/1% معنی دار گردید. با افزایش سطح سرب، در بخش هیفی کشت درون شیشه‌ای درصد فراوانی هیف افزایش و درصد فراوانی اسپور کاهش یافت (سطح احتمال 5%). بیشترین درصد فراوانی هیف (73/98) و کمترین درصد فراوانی اسپور (1/19) در سطح یک میلی‌مولار سرب مشاهده گردید (شکل 1). به طور میانگین 100 درصد بخش هیفی تیمار شاهد 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 زیتوده قارچی را بیشتر توسعه هیفی 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. مطالعه اودت و چارست (4) نشان داد که با افزایش غلظت روی از 0 تا 1 میلی‌مولار در کشت درون شیشه‌ای ریشه‌های هویج میکوریزی شده با قارچ گوموس *اینتراادیسز* (DAOM 181602)، کاهش بیش از 50 برابری در اسپورزایی بخش هیفی مشاهده گردید. همچنین نتایج برخی مطالعات دیگر نیز نشان می‌دهد که تکثیر قارچ با افزایش غلظت فلز شدت کاهش می‌یابد (20 و 34). شواهد مشابه در مطالعه ما نیز مشاهده گردید به طوری که مجموع درصد فراوانی هیف و اسپور با افزایش غلظت سرب به طور معنی‌داری کاهش یافت. بین مقدار پروتئین واکنش‌پذیر بردفورد با درصد فراوانی هیف رابطه معنی‌دار مشاهده نشد ($r=0.306ns$)، در حالی که رابطه مثبت و معنی‌دار بین مقدار پروتئین واکنش‌پذیر با آنتی‌بادی با درصد فراوانی هیف ($r=0.412^*$) وجود داشت (جدول 1).

ریلیگ و استینبرگ (37) اظهار داشتند، تحت شرایط نامساعد قارچ‌های AM، ممکن است مقادیر قابل ملاحظه‌ای از کربن مورد نیاز برای رشد هیف را به تولید گلوالمین اختصاص دهند.

عدد بذر گیاه در بخش ریشه‌ای گلدان کشت گردید به طوری که 10 گرم از زادمایه قارچ *رایزوفلگوس/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 فتوپریودیک 16 ساعت روشنایی (25 °C) و 8 ساعت تاریکی (0 °C) (20) نگهداری شدند و از هفته دوم بعد از جوانه زنی یک روز در میان با محلول غذایی هوگلدن (31) حاوی سطوح مختلف 0، 150، 300 و 450 میکرومولار سرب از منبع نیترات سرب و حاوی بافر MES 0/5 میلی مولار برای حفظ pH= 6/1 آبیاری شدند. جهت یکسان سازی اثر نیترات در سایر تیمارها نسبت به تیمار 450 میکرومولار سرب، نیترژن به صورت نیترات سدیم در مقادیر مساوی با نیترژن اضافه شده به بالاترین سطح سرب، اضافه گردید (19). گیاهان به مدت چهار هفته با محلول غذایی هوگلدن نصف قدرت 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 گلوالمین مورد استفاده قرار گرفت. جهت تعیین درصد طول ریشه کلنی‌شده، رنگ‌آمیزی ریشه‌ها با استفاده از روش تغییر یافته کورمانیک و مک گراو (24) انجام شد. سپس 60 قطعه یک سانتی متری از ریشه‌ها روی لام به صورت تصادفی قرار گرفت و زیر میکروسکوپ جهت ثبت حضور یا عدم حضور کلنیزاسیون در طول ریشه‌ها بررسی گردید. درصد طول ریشه کلنی‌شده در واحد کل طول قطعات ریشه بیان شد (13).

سنجش گلوالمین

جهت استخراج گلوالمین از نمونه‌های ریشه و هیف، نمونه‌های استخراجی از بخش ریشه‌ای و هیفی کشت‌گلدانی و درون شیشه‌ای در لوله‌های حاوی بافر سترات سدیم 50 میلی‌مولار (pH=8) به مدت یک ساعت در دمای 121 °C و طی سه سیکل متوالی داخل اتوکلاو قرار گرفتند. عصاره روایی حاصل از هر سیکل اتوکلاو بعد از سانتریفوژ به مدت 10 دقیقه در 10000g، با هم ترکیب شدند (39). بعد از استخراج گلوالمین، نمونه‌های ریشه و هیف در دمای 70 °C خشک شده و توزین گشتند. برای اندازه‌گیری پروتئین کل واکنش‌پذیر بردفورد از روش اصلاح شده سنجش پروتئین کل بردفورد (50) استفاده شد. همچنین مقدار گلوالمین نمونه‌ها با استفاده از روش الایزا (16) و بوسیله آنتی‌بادی مونوکلونال MAb32B11 تولید شده بر علیه اسپورهای قارچ گوموس *اینتراادیسز* اندازه‌گیری شد (50). سلول هیبریدوما تولید کننده آنتی‌بادی MAb32B11 از شرکت ATCC (American Type Culture Collection) تهیه گردید.



شکل 1- درصد فراوانی هیف و اسپور قارچ رایزوفیگوس ایرگولاریزدر بخش هیفی کشت درون شیشه‌ای در سطوح مختلف سرب (میلی مولار). میانگین‌های دارای حداقل یک حرف لاتین مشترک فاقد اختلاف معنی‌داری به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد
Figure 1- Percentage of hyphae and spore frequency in pot and in vitro cultures at different levels of Pb (mM). Means followed by the same letters are not significantly different according to Duncan's multiple range test at the level $p < 0.05$

جدول 1- همبستگی بین پارامترهای اندازه‌گیری شده در کشت گلدانی و درون شیشه‌ای
Table 1- The correlation between measured parameters in pot and in vitro cultures

	کشت گلدانی Pot culture				کل طول ریشه کلنی شده Total mycorrhizal root length (%)	کشت درون شیشه‌ای In vitro culture			
	BRHP ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	IRHP ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	BRRP ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	IRRP ($\mu\text{g}/\text{mg}$)		BRHP ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	IRHP ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	فراوانی هیف Frequency of Hyphae (%)	فراوانی اسپور Frequency of Spore (%)
کشت گلدانی Pot culture	BRHP ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	1							
	IRHP ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	0.845**	1						
	BRRP ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	-0.688**	0.790**	1					
	IRRP ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	0.570**	-0.762**	0.706**	1				
	کل طول ریشه کلنی شده Total mycorrhizal root length (%)	0.051 ^{ns}	-0.002 ^{ns}	0.144 ^{ns}	-0.149 ^{ns}	1			
کشت درون شیشه‌ای In vitro culture	BRHP ($\mu\text{g}/\text{mg}$)					1			
	IRHP ($\mu\text{g}/\text{mg}$)					0.941**	1		
	فراوانی هیف Frequency of Hyphae (%)					0.306 ^{ns}	0.412*	1	
	فراوانی اسپور Frequency of Spore (%)					-0.721**	-0.769**	-0.833**	1

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

می‌یابد (18 و 47)، زیرا گیاهان در این شرایط همزیستی میکوریزی را بیشتر ترجیح می‌دهند (4). همچنین، نتایج همبستگی بین متغیرها نشان داد که مقدار گلومالین واکنش‌پذیر بردفورد و گلومالین واکنش‌پذیر با آنتی‌بادی در بخش هیفی و ریشه‌ای کشت گلدانی به طول ریشه کلنی‌شده حساس نمی‌باشد (جدول 1). لوتگن و همکاران (28) و بای و همکاران (5) همبستگی بین غلظت‌های پروتئین کل (BRSP) و ساده قابل استخراج خاک واکنش‌پذیر بردفورد (EE-BRSP) با پارامترهای میکوریزی شامل درصد کلنیزاسیون آریسکول و وزیکول، کلنیزاسیون کلی قارچ AM، طول ریشه‌های کلنی‌شده 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 (36 و 43). به طور خلاصه براساس گزارش‌ها، غلظت GRSP به میزان گلومالین تولید شده توسط قارچ AM و میزان تجزیه GRSP بستگی دارد (35 و 44). پس هر فاکتوری که تولید گلومالین و تجزیه GRSP را تحت تاثیر قرار می‌دهد می‌تواند مقدار GRSP اندازه‌گیری شده در آن زمان و مکان را تحت تاثیر قرار دهد.

پروتئین کل واکنش‌پذیر بردفورد در بخش هیفی (BRHP)

کشت گلدانی و درون شیشه‌ای

تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد، افزایش سطح سرب تاثیر معنی‌داری بر مقدار BRHP کشت گلدانی و درون شیشه‌ای در سطح 0/1% داشت. بیشترین مقدار BRHP کشت گلدانی، در سطح 150 میکرومولار سرب مشاهده گردید که تفاوت معنی‌دار آماری با سطح 450 میکرومولار سرب نداشت (سطح احتمال 5%، به ترتیب 25/40 و 24/99 میکروگرم BRHP به ازای میلی‌گرم وزن خشک هیف). سطح 450 میکرومولار سرب افزایش 45/89 درصدی در مقدار BRHP کشت گلدانی نسبت به شاهد داشت (شکل 3). رابطه عکس و معنی‌داری بین مقدار پروتئین کل واکنش‌پذیر بردفورد هیفی با پروتئین کل واکنش‌پذیر بردفورد ریشه در کشت گلدانی (-) $r = 0.688^{**}$ وجود داشت (جدول 1). بر این اساس می‌توان گفت، در کشت گلدانی، اگر رابطه همزیستی گیاه-قارچ به گونه‌ای باشد که با افزایش تنش توسعه بخش هیفی گسترش پیدا کند، که در مطالعه ما شواهد موید این مطلب می‌باشد، بخش بیشتری از سهم کربنی قارچ به هیف‌ها اختصاص یافته و تولید گلومالین افزایش می‌یابد و در نتیجه با افزایش مقدار گلومالین هیفی از مقدار گلومالین ریشه‌های میکوریزی کاسته می‌شود. در بخش هیفی کشت درون شیشه‌ای، با

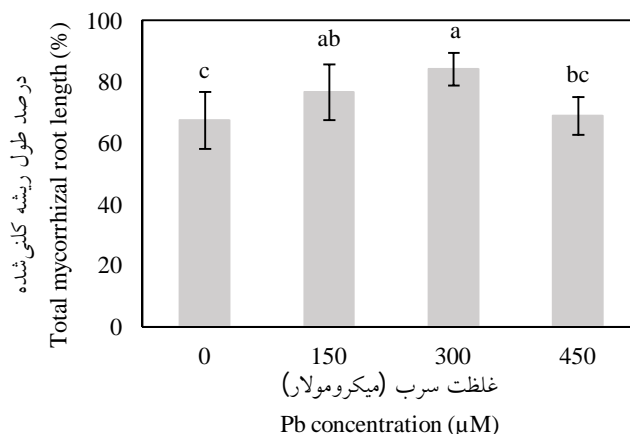
بنابراین، طول هیفی ممکن است رابطه‌ای عکسی با تولید گلومالین داشته باشد. در ضمن، فقدان همبستگی بین گلومالین و متغیرهای قارچ‌های AM نمی‌تواند جامعیت داشته باشد و استثناهایی هم وجود دارد. تاثیر قارچ‌های AM بر میزان گلومالین تولیدی بر اساس نوع گونه قارچ و گیاه میزبان متفاوت می‌باشد (6، 27 و 33) از سوی دیگر همبستگی منفی و معنی‌داری بین درصد فراوانی اسپور با مقدار پروتئین واکنش‌پذیر بردفورد ($r = -0.721^{**}$) و پروتئین واکنش‌پذیر با آنتی‌بادی ($r = -0.769^{**}$) مشاهده گردید (جدول 1). البته باید به این نکته توجه داشت که گلومالین استخراجی از مجموع هیف و اسپور صورت می‌گیرد و نتایج رگرسیونی رابطه خطی عکس بین مجموع درصد فراوانی هیف و اسپور با مقادیر BRHP و IRHP نشان داد (به ترتیب $R^2 = 0.761$; $y = -5.93x + 101.12$; $R^2 = 0.761$; $y = -1.16x + 103.57$). درایور و همکاران (11) 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 تائیسیدیر و ترنر (44) دریافتند که طول هیف با تولید گلومالین همبستگی ندارد، از سوی دیگر لاولوک و همکاران (27) 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 (43). بنابراین بر اساس شواهد مطالعه حاضر و نتایج مطالعات دیگر، الگوی حضور گلومالین در دیواره هیف و اسپورها بر اساس نوع گونه قارچ، گیاه میزبان و تحت شرایط تنشی مختلف، می‌تواند متفاوت باشد.

درصد طول ریشه کلنی‌شده در کشت گلدانی

بر اساس نتایج تجزیه واریانس، اثر سطوح مختلف سرب بر درصد طول ریشه کلنی‌شده در سطح 1% معنی‌دار گردید. با افزایش سطح سرب، درصد طول ریشه کلنی‌شده نسبت به شاهد افزایش یافت به طوری که بیشترین درصد طول ریشه کلنی‌شده (84/24) در تیمار 300 میکرومولار سرب بود که علی‌رغم کاهش 18/14 درصدی در سطح 450 نسبت به سطح 300 میکرومولار سرب، اختلاف معنی‌داری آماری در سطح احتمال 5% بین تیمار 450 میکرومولار سرب (68/96) با تیمارهای 150 میکرومولار سرب (76/7) و شاهد (67/52) مشاهده نگردید (شکل 2). به عبارت بهتر، تنش ناشی از سرب نه تنها تاثیر منفی بر میکوریزی شدن ریشه‌های گیاه توسط قارچ ریزوفاکوس/ایرگولاریز نداشت، بلکه نسبت به شاهد منجر به افزایش کلنیزاسیون نیز گردید. برخی مطالعات نشان می‌دهد که با افزایش غلظت فلز سنگین، کلنیزاسیون میکوریزی ریشه افزایش

گردید (22/32) میکروگرم BRHP به ازای میلی گرم وزن خشک هیف). با افزایش سطح سرب از 0/1 میلی مولار به 1 میلی مولار، مقدار BRHP کاهش 8/24 درصدی نشان داد (شکل 3).

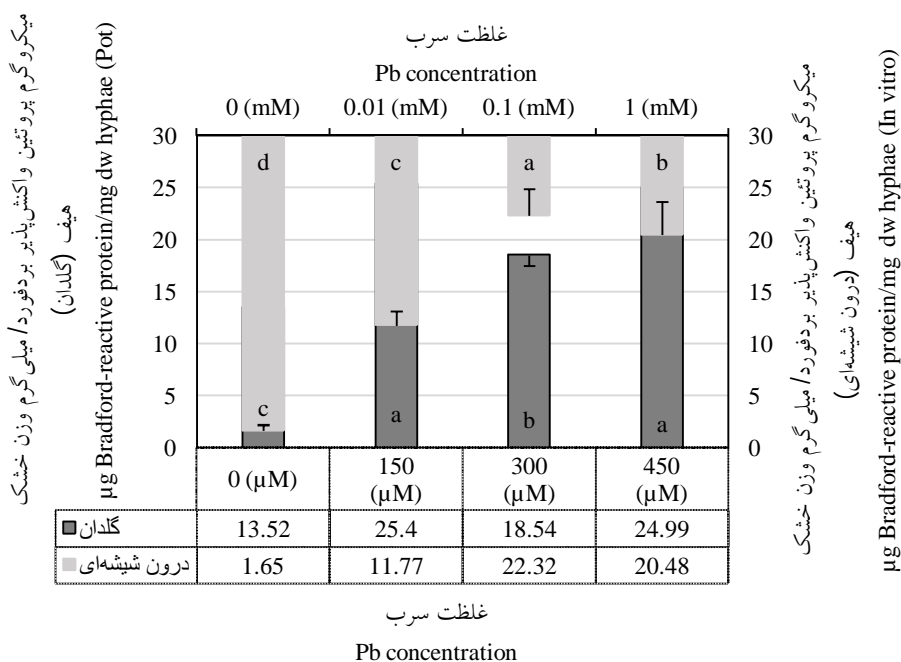
افزایش غلظت سرب تا سطح 0/1 میلی مولار سرب مقدار BRHP به طور معنی داری (سطح احتمال 5%) افزایش یافت، به طوری که بیشترین مقدار BRHP کشت درون شیشه‌ای در این سطح مشاهده



شکل 2- درصد طول ریشه کلنی شده با قارچ رایزوفگوس ایرگولاریز در بخش ریشه‌ای کشت گلدانی در سطوح مختلف سرب (میکرومولار).

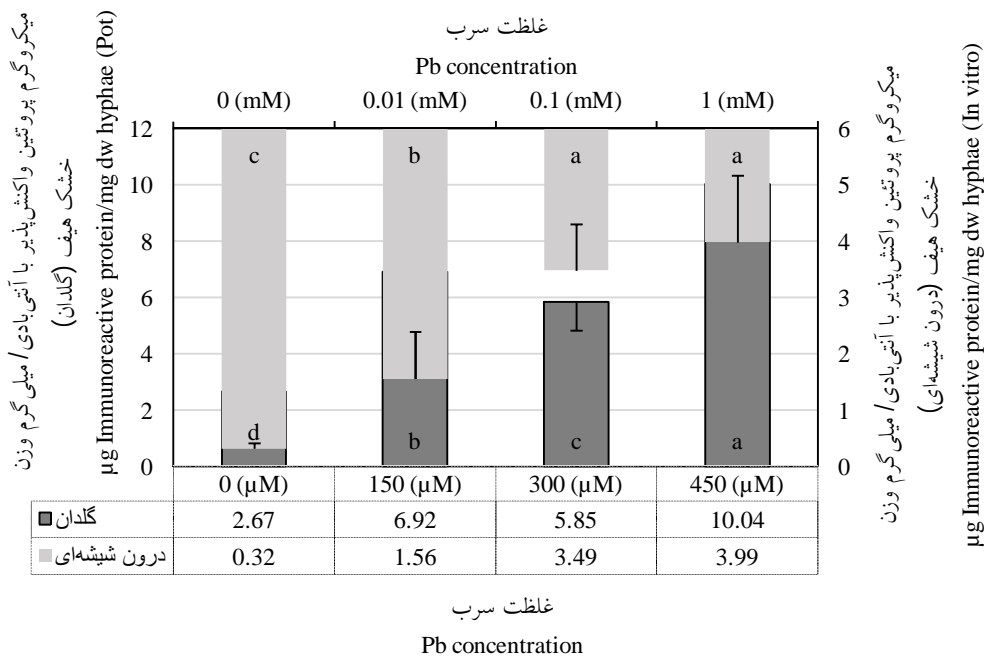
میانگین‌های دارای حداقل یک حرف لاتین مشترک فاقد اختلاف معنی داری به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد

Figure 2- Percentage of the total root length mycorrhized by *R. irregularis* in pot culture at different levels of Pb (μM). Means followed by the same letters are not significantly different according to Duncan's multiple range test at the level $p < 0.05$



شکل 3- میکروگرم پروتئین واکنش پذیر بردفورد به ازای میلی گرم وزن خشک هیف قارچ رایزوفگوس ایرگولاریز در کشت گلدانی و درون شیشه‌ای در سطوح مختلف سرب. غلظت سرب در کشت گلدانی و درون شیشه‌ای به ترتیب میکرومولار و میلی مولار Pb^{+2} می باشد. میانگین‌های دارای حداقل یک حرف لاتین مشترک فاقد اختلاف معنی داری به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد

Figure 3- Bradford reactive protein (μg) production per mg of hyphal dry weight in *R. irregularis* fungus, as a response to rising Pb levels in pot and in vitro cultures. Pb concentration is μM and mM of Pb^{+2} in pot and in vitro cultures, respectively. Means followed by the same letters are not significantly different according to Duncan's multiple range test at the level $p < 0.05$



شکل 4- میکروگرم پروتئین واکنش‌پذیر با آنتی‌بادی به ازای میلی گرم وزن خشک هیف قارچ *R. irregularis* در کشت گلدانی و درون شیشه‌ای در سطوح مختلف سرب. غلظت سرب در کشت گلدانی و درون شیشه‌ای به ترتیب میکرومولار و میلی مولار Pb^{+2} می‌باشد. میانگین‌های دارای یک حرف لاتین مشترک فاقد اختلاف معنی‌داری به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد

Figure 4- Immunoreactive protein (µg) production per mg of hyphal dry weight in *R. irregularis* fungus, as a response to rising Pb levels in pot and in vitro cultures. Pb concentration is µM and mM of Pb^{+2} in pot and in vitro cultures, respectively. Means followed by the same letters are not significantly different according to Duncan's multiple range test at the level $p < 0.05$

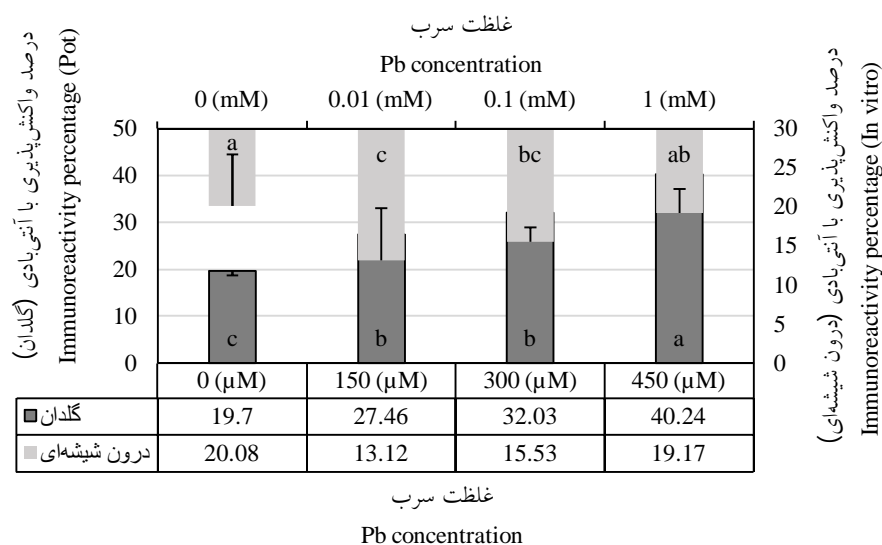
معنی‌دار (سطح احتمال 5%) داشت. در بالاترین سطح سرب، مقدار IRHP کشت درون شیشه‌ای افزایش 91/96% نسبت به شاهد (فاقد تیمار سرب) داشت (شکل 4). درصد واکنش‌پذیری با آنتی‌بادی در بالاترین سطح سرب اختلاف معنی‌دار با تیمار شاهد نداشت (سطح احتمال 5%، به ترتیب 20/1 و 19/2) ولی با افزایش سرب از 0/01 تا 1 میلی‌مولار، درصد واکنش‌پذیری با آنتی‌بادی افزایش پیدا کرد (شکل 5). همچنین، مقدار IRHP با مقدار BRHP کشت درون شیشه‌ای همبستگی مثبت و معنی‌دار ($r = 0.941^{**}$) قابل ملاحظه‌ای نشان داد (جدول 1). سنجش پروتئین واکنش‌پذیر بردفورد روش عمومی برای اندازه‌گیری پروتئین می‌باشد (7) و گرچه روش بردفورد برای گلومالین اختصاصی نیست، در مطالعات متعددی همبستگی مثبت و معنی‌داری بین مقادیر روش الیزا و بردفورد مشاهده شده است (17، 51، 52 و 53). ریلیگ و همکاران (36)، بدینی و همکاران (6) و کولیر و همکاران (22 و 23) 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 باشد (26، 39 و 53).

پروتئین واکنش‌پذیر با آنتی‌بادی در بخش هیفی (IRHP¹)

کشت گلدانی و درون شیشه‌ای

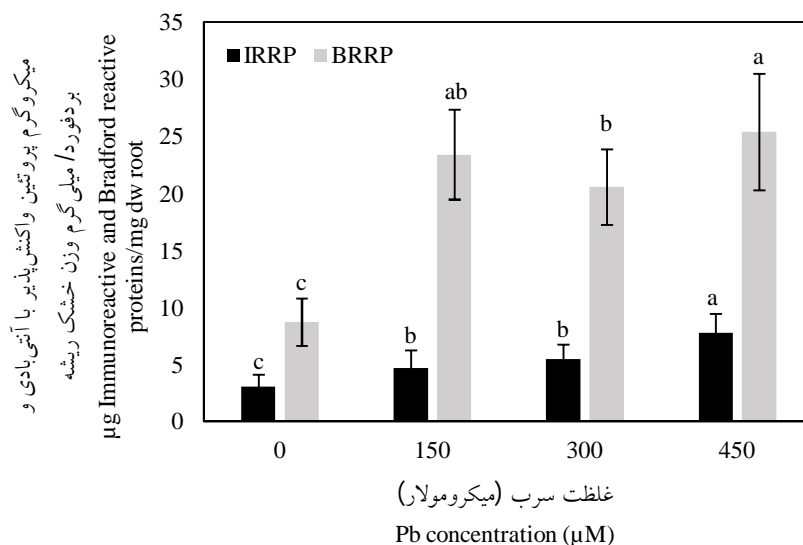
بر اساس نتایج تجزیه واریانس، اثر سطوح مختلف سرب بر مقدار پروتئین واکنش‌پذیر با آنتی‌بادی در بخش هیفی کشت گلدانی و درون شیشه‌ای در سطح 0/1% معنی‌دار گردید. بیشترین مقدار IRHP کشت گلدانی (10/04) میکروگرم IRHP به ازای میلی‌گرم وزن خشک هیف) در غلظت 450 میکرومولار سرب بود که اختلاف معنی‌دار (سطح احتمال 5%) با دیگر غلظت‌های سرب داشت. در بالاترین سطح سرب، مقدار IRHP کشت گلدانی افزایش 73/4% نسبت به شاهد (فاقد تیمار سرب) داشت (شکل 4). همچنین، در بالاترین سطح سرب، درصد واکنش‌پذیری با آنتی‌بادی (IR%)، 40/24% بود در حالی که در تیمار شاهد 19/7% بود که نشان دهنده افزایش بخش ایمونواکتیو با افزایش غلظت سرب می‌باشد (شکل 5). واکنش‌پذیری با آنتی‌بادی نشان‌دهنده شکل مولکولی مشابه شکل مولکولی گلومالین روی سطح هیف‌ها می‌باشد (49 و 50). بیشترین مقدار IRHP کشت درون شیشه‌ای (3/98) میکروگرم IRHP به ازای میلی‌گرم وزن خشک هیف) در غلظت یک میلی‌مولار سرب مشاهده شد که به جز سطح 0/1 میلی‌مولار سرب با بقیه سطوح اختلاف

1- Immunoreactive hyphal protein



شکل 5- درصد واکنش پذیری با آنتی بادی در کشت گلدانی و درون شیشه‌ای به ترتیب میکرومولار و میلی مولار Pb^{+2} می باشد. میانگین‌های دارای حداقل یک حرف لاتین مشترک فاقد اختلاف معنی داری به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد

Figure 5- Immunoreactivity percentage, as a response to rising Pb levels in pot and in vitro cultures. Pb concentration is μM and mM of Pb^{+2} in pot and in vitro cultures, respectively. Means followed by the same letters are not significantly different according to Duncan's multiple range test at the level $p < 0.05$



شکل 6- میکروگرم پروتئین واکنش پذیر با آنتی بادی و بردفورد به ازای میلی گرم وزن خشک ریشه شبدر سفید میکوریزی شده با رایزوفاکوس ایرگولاریزدر کشت گلدانی در سطوح مختلف سرب. میانگین‌های دارای حداقل یک حرف لاتین مشترک فاقد اختلاف معنی داری به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد

Figure 6- Immunoreactive and Bradford protein (μg) production per mg of root dry weight of white clover mycorrhizal by *R. irregularis* fungus, as a response to rising Pb levels in pot culture. Means followed by the same letters are not significantly different according to Duncan's multiple range test at the level $p < 0.05$

کردن فلزات سمی دارد و می‌تواند در کاهش آسیب‌های سیتوزولی نقش موثری را ایفا کند. به عبارت بهتر تثبیت فلزات سنگین توسط گلومالین ممکن است ساز و کار دیگر قارچ‌های AM در تعدیل شرایط تنش جهت ادامه فعالیت گیاه باشد (9، 15 و 46). مقدار پروتئین کل واکنش‌پذیر بردفورد در ریشه‌های غیرمیکوریزی 2/08-2/53 میکروگرم به ازای میلی‌گرم وزن خشک ریشه بود. بر اساس نتایج، مقدار پروتئین کل واکنش‌پذیر بردفورد تولیدی توسط ریشه‌های گیاه میکوریزی بسیار بیشتر از ریشه‌های غیرمیکوریزی می‌باشد، که می‌تواند به دلیل جذب و ذخیره‌ی اسید آمینه آرژنین در هیف‌های داخل سلولی قارچ AM باشد (40) زیرا روش بردفورد نسبت به آرژنین موجود در سطوح پروتئین حساس می‌باشد. روزیر و همکاران (40) افزایش 20 برابری پروتئین واکنش‌پذیر بردفورد را در ریشه‌های میکوریزی شده در مقایسه با ریشه‌های غیرمیکوریزی نشان دادند. جهت آگاهی از واکنش متقاطع آنتی‌بادی مونوکلونال 32B11 با دیگر منابع پروتئینی ریشه، مقدار پروتئین واکنش‌پذیر با آنتی‌بادی در ریشه‌های غیرمیکوریزی در سطوح مختلف سرب اندازه‌گیری شد، که 0/16-0/27 میکروگرم به ازای میلی‌گرم وزن خشک ریشه بود. روزیر و همکاران (40) در ریشه‌های غیرمیکوریزی 0/04 میلی‌گرم پروتئین واکنش‌پذیر با آنتی‌بادی را به ازای گرم ریشه در مقایسه با 1 میلی‌گرم پروتئین واکنش‌پذیر با آنتی‌بادی به ازای گرم ریشه‌های میکوریزی گزارش کردند. که این شواهد بیانگر واکنش متقاطع اندک آنتی‌بادی مونوکلونال 32B11 با ترکیبات گیاهی (32)، پروتئین‌های گونه‌های قارچ غیرمیکوریزی (50) و پروتئین‌های غیر هدف موجود در غلظت‌های بالا نظیر آلبومین سرم گاوی (BSA) می‌باشد (39).

به‌طور کلی نتایج مطالعه حاضر نشان داد، تحت شرایط تنش فلز سرب مقدار گلومالین در بخش هیفی و بخش ریشه‌های گیاه میکوریزی افزایش می‌یابد و از این فرضیه که گلومالین به عنوان همولوگ پروتئین شوک حرارتی مطرح می‌باشد حمایت می‌کند، زیرا با افزایش غلظت سرب، اثرات منفی و تنش ناشی از آن تولید گلومالین افزایش یافت. بنابراین گلومالین می‌تواند به عنوان یک پروتئین شوک حرارتی از طریق ممانعت در تغییر شکل پروتئین‌ها و نیز آرایش مجدد آن‌ها بواسطه‌ی تسریع تشکیل پیوندهای دی سولفید و از سوی دیگر کمپلکس کردن فلزات سنگین باعث کاهش قابلیت دسترسی زیستی فلزات سمی و کاهش خطر سمیت آن‌ها برای سایر میکروارگانیسم‌ها و نیز رشد و توسعه گیاهان میکوریزی در مناطق آلوده به فلزات سنگین شود.

پروتئین کل واکنش‌پذیر بردفورد (BRRP¹) و پروتئین واکنش‌پذیر با آنتی‌بادی (IRR²) در بخش ریشه‌های کشت گلدانی

بر اساس نتایج تجزیه واریانس، افزایش غلظت سرب بر مقدار پروتئین کل واکنش‌پذیر بردفورد و پروتئین واکنش‌پذیر با آنتی‌بادی در سطح 0/1% معنی‌دار گردید. بیشترین مقدار IRRP در سطح 450 میکرومولار سرب (7/79 میکروگرم به ازای میلی‌گرم وزن خشک ریشه) بود که تفاوت معنی‌داری با دیگر سطوح سرب داشت (سطح احتمال 5%). در حالی که بیشترین مقدار BRRP (25/38 میکروگرم به ازای میلی‌گرم وزن خشک ریشه) در سطح 450 میکرومولار تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال 5% با سطح 150 میکرومولار سرب (23/41 میکروگرم ازای میلی‌گرم وزن خشک ریشه) نداشت. در بالاترین غلظت سرب، مقادیر IRRP و BRRP به ترتیب افزایش 60/5 و 65/7 درصدی نسبت به شاهد داشتند (شکل 6). مطابق نتایج بخش هیفی کشت گلدانی، بین مقدار IRRP و BRRP نیز همبستگی مثبت و معنی‌دار ($r = 0.706^{**}$) مشاهده گردید (جدول 1). بر اساس نتایج مطالعه حاضر، با افزایش تنش سرب، مقدار گلومالین در بخش ریشه‌های هیفی و در هر دو آزمایش کشت گلدانی و درون شیشه‌های افزایش یافت. افزایش تولید گلومالین تحت تنش فلزات سنگین در مطالعات دیگر نیز گزارش شده است (9، 15، 42 و 46). این امر می‌تواند به دلیل افزایش بیان گلومالین تحت شرایط تنش باشد (27 و 37)، زیرا گلومالین به عنوان یک پروتئین شوک حرارتی شناخته شده است (12) و می‌تواند در کاهش آسیب‌های سیتوزولی و تغییر شکل پروتئین‌ها تحت تنش سرب نقش داشته باشد. سرب به عنوان فلزی غیر ضروری و سمی برای گیاه که هیچ نقش فیزیولوژیکی برای آن شناخته نشده است، می‌تواند بواسطه سمیت یونی یا رقابت با دیگر یون‌های ضروری و مهم برای مسیرهای متابولیکی حیاتی گیاه، پاسخ‌های دفاعی متفاوتی را در گیاه القاء کند. همچنین طی مطالعات متعددی ثابت شده است که قارچ‌های AM قادرند با ساز و کارهای مختلفی تحت شرایط تنش بویژه تنش فلزات سنگین منجر به افزایش تحمل گیاه گردند (21 و 25). یکی از این ساز و کارهای دفاعی در گیاهان میکوریزی تولید پروتئین‌های شوک حرارتی می‌باشد. این پروتئین‌ها معمولاً دارای چند کارکرد می‌باشند و بیان آن‌ها تحت شرایط تنش فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی افزایش می‌یابد. یکی از کارکردهای مهم آن‌ها فعالیت چاپرونی می‌باشد به طوری که از تغییر شکل پروتئین‌های ضروری و مهم مسیرهای متابولیکی حیاتی ممانعت بعمل می‌آورند (41). از سوی دیگر مطالعات متعددی نشان داده‌اند که گلومالین پتانسیل مناسبی برای کمپلکس

1- Bradford-reactive root protein
2- Immunoreactive root protein

منابع

- 1- Aguilera P., Borie F., Seguel A., and Cornejo P. 2011. Fluorescence detection of aluminum in arbuscular mycorrhizal fungal structures and glomalin by using confocal laser scanning microscopy. *Soil Biology and Biochemistry*, 43: 2417–31.
- 2- Ali H., Khan E., and Sajad M.A. 2013. Phytoremediation of heavy metals—concepts and applications. *Chemosphere*, 91: 869–81.
- 3- 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.
- 4- Audet P., and Charest C. 2009. Contribution of arbuscular mycorrhizal symbiosis to in vitro root metal uptake: From trace to toxic metal conditions. *Botany*, 87(10), 913-921.
- 5- 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.
- 6- Bedini S., Pellegrino E., Avio L., Pellegrin, 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.
- 7- 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.
- 8- Bressano M., Curetti M., Giachero L., Gil S.V., Cabello M., March G., Ducasse D.A., and Luna C.M. 2010. Mycorrhizal fungi symbiosis as a strategy against oxidative stress in soybean plants. *Journal of Plant Physiology*, 167(18): 1622- 1626.
- 9- 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.
- 10- Dhala B., Thatoib H.N., Dasc N.N., and Pandeya B.D. 2013. Chemical and microbial remediation of hexavalent chromium from contaminated soil and mining/metallurgical solid waste: a review. *Journal of Hazardous Material*, 250–251: 272–91.
- 11- 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.
- 12- Gadkar V., and Rillig M.C. 2006. The arbuscular mycorrhizal fungal protein glomalin is a putative homolog of heat shock protein60. *FEMS Microbiology Letters*, 263: 93-101.
- 13- Giovannetti M., and Mosse B. 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular infection in roots. *New Phytologist*, 84: 489-500.
- 14- Gohre V., and Paszkowski U. 2006. Contribution of the arbuscular mycorrhizal symbiosis to heavy metal phytoremediation. *Planta*, 223: 1115–1122.
- 15- 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.
- 16- 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): 1-5 (e28426). www.plosone.org.
- 17- 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.
- 18- Hildebrandt U., Kaldorf M. and Bothe H. 1999. The zinc violet and its colonization by arbuscular mycorrhizal fungi. *Journal of Plant Physiology*, 154: 709–717.
- 19- 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.
- 20- Janoušková M., and Vosatka M. 2005. Response to cadmium of *Daucus carota* hairy roots dual cultures with *Glomus intraradices* or *Gigaspora margarita*. *Mycorrhiza*, 15: 217-224.
- 21- Khan A.G. 2006. Mycorrhizoremediation—an enhanced form of phytoremediation. *Journal of Zhejiang University Science B*, 7(7): 503–14.
- 22- Kohler J., Caravaca F., del Mar Alguacil M., and Roldán A. 2009a. Elevated CO₂ increases the effect of an arbuscular mycorrhizal fungus and a plant-growthpromoting rhizobacterium on structural stability of a semiarid agricultural soil under drought conditions. *Soil Biology and Biochemistry*, 41:1710-1716.
- 23- 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.
- 24- Kormanik P.P., and McGraw A.C. 1982. Quantification of vesicular-arbuscular mycorrhizae in plant roots. p. 37-45. In N.C. Schenck (ed.) Methods and principles of mycorrhizal research. American Phytopathological Society, St. Paul.
 - 25- Leung H., Ye Z., and Wong M. 2007. Survival strategies of plants associated with arbuscular mycorrhizal fungi on toxic mine tailings. Chemosphere, 66: 905-915.
 - 26- 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, 92:278-287.
 - 27- 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.
 - 28- 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.
 - 29- Meier S., Borie F., Bolan N., and Cornejo P. 2012a. Phytoremediation of metal-polluted soils by Arbuscular Mycorrhizal Fungi. Crest, 42: 744-75.
 - 30- Meier S., Borie F., Curaqueo G., Bolan N., and Cornejo P. 2012b. Effects of arbuscular mycorrhizal inoculation on metallophyte and agricultural plants growing at increasing copper levels. Applied Soil Ecology, 61: 280-7.
 - 31- Millner P.D., and Kitt D.G. 1992. The Beltsville method for soilless production of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi. Mycorrhiza, 2: 9-15.
 - 32- Nichols K.A. 1999. Role of iron in the accumulation of glomalin, an arbuscular mycorrhizal fungal glycoprotein. Master's Thesis, West Virginia University.
 - 33- Nichols K.A., and Wright S.F. 2004. Contributions of fungi to soil organic matter in agroecosystems. P. 179-198. In F. Magdoff and R.R. Weil (eds.) Soil Organic Matter in Sustainable Agriculture, CRC Press, Florida.
 - 34- Pawlowska T.E., and Charvat I. 2004. Heavy-metal stress and developmental patterns of arbuscular mycorrhizal fungi. Applied and Environmental Microbiology, 70: 6643-6649.
 - 35- Rillig M.C. 2004. Arbuscular mycorrhizae, glomalin, and soil quality. Canadian Journal of Soil Science, 84:355-363.
 - 36- 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.
 - 37- Rillig M.C., and Steinberg P.D. 2002. Glomalin production by an arbuscular mycorrhizal fungus: a mechanism of habitat modification? Soil Biology and Biochemistry, 34: 1371-1374.
 - 38- Roberts P., and Jones D.L. 2008. Critical evaluation of methods for determining total protein in soil solution. Soil Biology and Biochemistry, 40:1485-1495.
 - 39- Rosier C.L., Hoyer 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.
 - 40- Rosier C.L., Piotrowski J.S., Hoyer A.T., and Rillig M.C. 2008. Intraradical protein and glomalin as a tool for quantifying arbuscular mycorrhizal root colonization. Pedobiologia, 52: 41-50.
 - 41- Schlesinger M.J. 1990. Heat-shock proteins. Journal of Biological Chemistry, 265: 12111-12114.
 - 42- Shaabani Zenoozagh V., Aliasgharzad N., and Oustan Sh. 2013. Glomalin production by two glomerular fungi in symbiosis with corn plant under different Pb levels. International Journal of Agriculture: Research and Review, 3 (4): 854-863.
 - 43- Steinberg P.D., and Rillig M.C. 2003. Differential decomposition of arbuscular mycorrhizal fungal hyphae and glomalin. Soil Biology and Biochemistry, 35:191-194.
 - 44- Treseder K.K., and Turner K.M. 2007. Glomalin in ecosystems. Soil Science Society of America Journal, 71: 1257-1266.
 - 45- USEPA. 1996. Report: recent Developments for In Situ Treatment of Metals contaminated Soils, U.S. Environmental Protection Agency, Office of Solid Waste and Emergency Response.
 - 46- Vodnik D., Grčman H., Maček I., van Elteren J.T., and Kovačević 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.
 - 47- Weissenhorn I., Leyval C., and Berthelin J. 1995b. Bioavailability of heavy metals and abundance of arbuscular mycorrhiza in a soil polluted by atmospheric deposition from a smelter. Biology and Fertility of Soils, 19: 22-28.
 - 48- Whiffen L.K., Midgley D.J., and McGee P.A. 2007. Polyphenolic compounds interfere with quantification of protein in soil extracts using the Bradford method. Soil Biology and Biochemistry, 39:691-694.
 - 49- Wright S.F. 2000. A fluorescent antibody assay for hyphae and glomalin from arbuscular mycorrhizal fungi. Plant and Soil, 226: 171-177.
 - 50- 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.
 - 51- 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: 575-585.
- 52- 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.
- 53- Wright S.F., and Upadhyaya A. 1999. Quantification of arbuscular mycorrhizal fungi activity by the glomalin concentration on hyphal traps. *Mycorrhiza*, 8: 283-285.

The Effect of Lead on the Glomalin Content of Hypha and Root Reactive with Monoclonal Antibody and Bradford in both in Vitro and Pot Culture Conditions

E. Malekzadeh^{*1}- J. Majidi²- N. Aliasgharzad³- J. Abdolalizadeh⁴

Received: 07-09-2015

Accepted: 23-11-2015

Introduction: Glomalin is known as a specific fungal glycoprotein belonging to the order Glomerales in phylum Glomeromycota and has been introduced as a heat shock protein. We hypothesised that increasing the level of Pb would lead to increase in glomalin production. Glomalin is usually determined by two methods, the Bradford protein dye-binding assay and the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Since many laboratories are not equipped to carry out the ELISA assay, many studies have measured glomalin-related soil protein using the Bradford colorimetric total protein assay. While, the ELISA method specifically measures glomalin by using monoclonal antibody MAb32B11.

Materials and Methods: The pot experiment was conducted in the sterile free-glomalin sand with *Trifolium repens* L. mycorrhized by *Rhizophagus irregularis* fungus and treated with the Pb levels of 0, 150, 300 and 450 μ M. Thus, in vitro experiment was performed in two-compartments plates containing of the transformed carrot roots (*Daucus carota* L.) mycorrhized with the same fungus in root compartment and hyphal compartment treated with the Pb levels of 0, 0.01, 0.1 and 1 mM as $Pb(NO_3)_2$. For glomalin extraction, hyphal or root samples were autoclaved at 121 °C with 50 mM sodium citrate buffer for 60 min in three cycles. Protein concentrations in the extracted samples were determined using a modified Bradford protein assay. Also, glomalin content in the samples were determined by indirect ELISA using monoclonal antibody MAb32B11. The percentages of the total root length were colonised by mycorrhizal fungi in pot culture and both hyphal and spore densities in the metal-containing hyphal compartment were determined.

Results and Discussion: In the in vitro culture the percentage of total hyphae and spore frequency decreased, while Bradford reactive total hyphal protein (BRHP) and Immunoreactive hyphal protein (IRHP) in hyphal compartment increased as the concentrations of Pb increased. Also, there was positive and significant correlation between immunoreactive hyphal protein (IRHP) and Bradford reactive total hyphal protein (BRHP) in hyphal compartment of in vitro culture ($r= 0.941^{**}$). In the pot culture, the percentage of the total mycorrhized root length in all the treatments increased compared to the unleaded control as the concentrations of Pb raised. In general, Bradford reactive total protein and Immunoreactive protein in both the hyphal and root compartments of pot culture increased with increasing the Pb levels. Also, there were positive and significant correlations between immunoreactive hyphal protein (IRHP) with Bradford reactive total hyphal protein (BRHP) ($r= 0.845^{**}$) and immunoreactive root protein (IRRP) with Bradford reactive total root protein (BRRP) ($r= 0.706^{**}$) in pot experiment. Some previously researches had reported correlation between ELISA with Bradford contents, whether, Bradford and ELISA values were nearly the same, this means that the extraction process mostly separates glomalin. The results of non-mycorrhizal roots indicated that a small proportion of root protein is cross-reactive with the MAb32B11 antibody. There are some evidences that MAb32B11 is slightly cross-reactive with plant compounds, non-AMF species, and non-target proteins present in large concentration, such as BSA. Additionally, we found the increasing of BRRP contents of AMF-colonized root compared to the non-mycorrhizal roots. This may be as a result of uptake and storage of arginine within AMF intraradical hyphae. Considering IRHP to BRHP ratio indicates that immunoreactivity percentage enhances by rising Pb levels. Immunoreactivity indicates a molecular configuration similar to the configuration of glomalin on hyphae. Our findings are in agreement with previous observations confirming that the toxicity-induced stress by metals may be enhancing glomalin production by AMF. The sequence of the glomalin gene revealed that is likely a 60-KDa heat-shock protein (Hsp) homolog. Glomalin relation with the heat shock proteins clarifies how stress is imposed

1 and 3- Ph.D. Graduated and Professor of Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz
(*- Corresponding Author Email: malekzadeh.elham@gmail.com)

2- Professor of Department of Immunology, Faculty of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz

4- Assistant Professor of Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz

by heavy metals may rapidly increase glomalin production by AMF and its concentrations in polluted soils.

Conclusion: The high contents of glomalin along with the increasing of Pb concentrations may be explained by the overexpression of this protein. This suggests that under Pb-induced stress and the toxic effect of Pb, the fungus exerts a protective mechanism against toxicant. Therefore, glomalin as a heat shock protein can involve in the reduction of possible cytosolic damages and the transfiguration of proteins under Pb toxicity. We can conclude that glomalin may reduce toxic elements availability via their stabilization and decrease their toxicity risk to other microorganisms and plants in heavy metal polluted sites.

Keywords: Arbuscular Mycorrhizal Fungi, Bradford, ELISA, Glomalin