نشریه دانش آب و خاک / جلد24 شماره1 صفحه‌های 1 تا 15/ سال 1393

تأثیر مس بر تولید گلومالین توسط دو گونه قارچ گلومرال همزیست با ذرت

وحیده شعبانی زنوزق[*1]، ناصر علی‌اصغرزاد[2]و شاهین اوستان [3]

تاریخ دریافت: 92/02/09 تاریخ پذیرش: 92/02/25

[1-] دانشجوی سابق کارشناسی ارشد علوم خاک، دانشگاه تبریز

[2-] استاد گروه علوم خاک، دانشگاه تبریز

[3-] دانشیار گروه علوم خاک، دانشگاه تبریز

[*] مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Vahideh_shabani@yahoo.com

چکیده

گلومالین یک ترکیب گلیکوپروتئینی ویژه است که توسط قارچ‌های راسته گلومرال از رده گلومرومایکوتا تولید می‌شود. با توجه به همزیستی گسترده این قارچ‌ها با تعداد زیادی از گیاهان، سالانه مقادیر قابل توجهی از گلومالین توسط این قارچ‌ها وارد اکوسیستم خاک می‌شود. گلومالین علاوه بر بالا بردن پایداری خاکدانه‌ها، سبب کاهش فراهمی عناصر سنگین از طریق تثبیت آن‌ها می‌شود. فلزات سنگین می‌توانند با تأثیر بر رابطه همزیستی این قارچ‌ها با ریشه گیاهان، تولید گلومالین را تحت تأثیر قرار دهند. در این تحقیق تأثیر سطوح مس بر تولید گلومالین، رشد، جذب مس و برخی عناصر غذایی توسط گیاه ذرت (*Zea mays* L.) و میزان استقرار همزیستی میکوریزی در ریشه با دو گونه قارچ *Glomus mosseae* و *G. intraradices* بررسی شد. تیمارها شامل مس (در سه سطح صفر، 250 و 500 میلی‌گرم در کیلوگرم) از منبع سولفات مس و($CuSO_4.5H_2O$) دو گونه قارچ میکوریز آربوسکولار و شاهد بدون قارچ در سه تکرار بود. گلومالین ساده استخراج (EEG) و گلومالین کل (TG) پس از استخراج از خاک، به روش بردفورد اندازه‌گیری شد. با افزایش غلظت مس خاک، وزن تر و خشک اندام هوایی و ریشه، غلظت فسفر و پتاسیم اندام هوایی و ریشه، درصد کلونیزاسیون ریشه، EEG و TG کاهش و غلظت پرولین برگ، غلظت مس اندام هوایی و ریشه افزایش یافت. نتایج نشان داد که تیمارهای قارچی، میزان گلومالین را در مقایسه با شاهد بدون قارچ به طور معنی‌داری افزایش می‌دهند. همچنین یک رابطه همبستگی مثبت معنی‌دار بین گلومالین اندازه‌گیری شده به روش بردفورد و درصد کلونیزاسیون ریشه را مشاهده شد.

واژه‌های کلیدی: ذرت، کربن خاک، گلومالین، گلومرال، مس

Effect of Copper on Glomalin Production by Two Glomeral Species in Symbiosis with Corn

V Shaabani Zenoozagh[1*], N Aliasgharzad[2]and Sh Oustan[3]

Received: 29 April 2013 Accepted: 5 May 2013
[1-]Former M.Sc. Student, Dept. of Soil Sci., Univ. of Tabriz, Iran
[2-]Prof., Dept. of Soil Sci., Faculty of Agric., Univ. of Tabriz, Iran
[3-]Assoc. Prof., Dept. of Soil Sci., Faculty of Agric., Univ. of Tabriz, Iran
* Corresponding Author Email: Vahideh_shabani@yahoo.com

Abstract

Glomalin is a specific glycoprotein that is produced by a fungi belonging to the order Glomerales in phylum Glomeromycota. Noting the widespread symbiotic relation of these fungi with a large number of plants, considerable amounts of glomalin are entered into the soil ecosystems, annually. Heavy metals can influence the both symbionts physiology and hence glomalin production by the fungi. In this study, the effects of Cu levels were investigated on mycorrhizal establishment in corn plants inoculated by either *Glomus mosseae* or *G. intraradices* as well as glomalin production by the system. Copper levels of 0, 250 and 500 mg Cu. kg^{-1} soil (as $CuSO_4.5H_2O$) were applied to the pots before plant culture. Non-mycorrhizal treatment was left un-inoculated as control. Easily extractable glomalin (EEG) and total glomalin (TG) were determined by the Bradford method after extraction from soil. With increasing Cu concentration in soil, shoot and root fresh and dry weights, P and K concentrations in shoot and root, root colonization, EEG and TG decreased and proline concentration in leaves, Cu concentration in shoot and root increased. The results showed that, glomalin levels in fungal treatments significantly increased compared to the non-mycorrhizal control. The results also showed a positive correlation between the measured glomalin and the percent of root colonization.

Keywords: Copper, Corn, Glomalin, Glomeral, Soil Carbon

مقدمه

ذخایر کربن آلی در خاک (SOC[1]) نقش مهمی در پویایی اکوسیستم خاک داشته و شامل بخش قابل توجهی از منبع کربن خاک‌های جهان می‌باشد (هایل-ماریام و همکاران 2007). چرخه این ذخایر بین خاک و اتمسفر می‌تواند تأثیر مهمی بر ترکیب گازی اتمسفر و دمای اتمسفر داشته باشد (بای و همکاران 2009).

قارچ‌های میکوریز آربوسکولار از راسته گلومرال با 70 درصد گیاهان همزیستی تشکیل می‌دهند. قارچ‌های گلومرال بخش قابل ملاحظه‌ای از بیوماس خاک را به خود اختصاص می‌دهند (اُلسون و همکاران 2010). رشد میسلیوم‌های قارچ گلومرال در خاک به ترکیب کربن گیاه میزبان بستگی دارد و ممکن است در جریان

[1] Soil organic carbon

انرژی در شبکه غذایی خاک مشارکت داشته باشد (کلیرونوموس و کندریچ 1996). این قارچ‌ها، گلیکوپروتئینی که گلومالین نامیده می‌شود در داخل دیواره هیفی تولید می‌کنند (رایت و آپادیا 1996). وقتی که ساختار هیف پوسیده و متلاشی می‌شود، این پروتئین‌ها داخل خاک آزاد شده و پیوند قوی با ذرات خاک تشکیل می‌دهند. گلومالین علاوه بر بالا بردن پایداری خاکدانه‌ها، سبب کاهش فراهمی عناصر سنگین از طریق تثبیت آن‌ها می‌شود (گنزالز چاوز و همکاران 2004). ترکیبات دیواره سلولی قارچ‌ها حاوی گروه‌های آمین آزاد، هیدروکسیل، کربوکسیل و سایر گروه‌ها هستند که می‌توانند مکان اتصال برای یون‌های Cu^{2+} باشند (کاپور و ویرارقاوان 1995). گنزالز – چاوز و همکاران (2002) نشان دادند که قارچ‌های میکوریز آربوسکولار (AM[1]) توانایی جذب Cu را دارند. مقدار گزارش شده برای این قارچ‌ها 14-3 میلی‌گرم مس در هر گرم هیف قارچی می‌باشد که یکی از دلایل آن تولید گلومالین توسط این قارچ‌ها است.

گیاهان طی چرخه زندگی خود معمولاً در معرض انواع وسیعی از تنش‌های محیطی قرار می‌گیرند، که از جمله آنها می‌توان به تنش فلزات سنگین اشاره نمود. دشواری اصلی گیاه در محیط محتوی فلزات سنگین مانند مس این است که اقدام به انباشتگی یون مس و کاهش غلظت کاتیون‌های ضروری مانند آهن، پتاسیم و منگنز می‌کنند.

گیلدون و تینکر (1983) مشاهده کردند که میزان کلونیزاسیون پیاز توسط قارچ AM با افزایش غلظت فلزات سنگین سرب، روی، مس و کادمیوم کاهش می‌یابد و از طرف دیگر مقاومت قارچ AM بومی خاک آلوده نسبت به گونه مشابه جداسازی شده از خاک غیر آلوده، در مقابل سمیت فلزات سنگین، بیشتر بود. هدف از این تحقیق بررسی تأثیر سطوح مختلف مس بر فعالیت قارچ‌های گلومرال و تولید گلومالین، روابط بین تولید گلومالین و شاخص‌همزیستی (درصد کلونیزاسیون) بود. همچنین اثر دو گونه قارچی بر میزان تولید گلومالین بررسی شد. در تحقیق حاضر با اندازه‌گیری میزان گلومالین در سطوح مختلف مس، میزان تأثیر آلودگی خاک به این فلز بر روی گلومالین بصورت کمّی بررسی شد.

مواد و روش‌ها

خاک مورد استفاده از عمق 20-0 سانتی‌متری از ایستگاه تحقیقاتی خلعت پوشان دانشگاه تبریز نمونه‌برداری شد. بافت خاک لوم شنی به روش هیدرومتر (گی و بادر 1986)، pH خاک 7/81 (مکلین 1982)، کربن آلی به روش والکلی-بلک (نلسون و سومرز 1982) 0/221 درصد، فسفر قابل دسترس (اولسن و سومرز 1982) 4/4 میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک و پتاسیم قابل دسترس (گوپتا 2000) 182/6 میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک بود. سترون کردن نمونه‌های خاک در دمای 121 درجه سلسیوس به مدت 2 ساعت در دستگاه اتوکلاو انجام شد. برای تهیه زادمایه، گونه‌های قارچ *Glomus mosseae* (Gm) و *G. intraradices* (Gi) با بستر خاک استریل و با گیاه ذرت تلقیح شده 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 کلونیزاسیون قارچی ریشه‌ها در زادمایه‌ها تعیین شدند (علی‌اصغرزاده و همکاران 2001).

سطوح مس (از منبع $CuSO_4.5H_2O$) شامل صفر، 250 و 500 میلی‌گرم درکیلوگرم (به ترتیب Cu_0، Cu_1 و Cu_2) در خاک استریل ایجاد شد (مولایی 1388، شیرزاده 1390 و ایپولیتو و همکاران 2010). بدین ترتیب که حدود 54 کیلوگرم خاک استریل شده به سه قسمت تقسیم شده و به جز تیمار بدون مس، در هر

[1] Arbuscular mycorrhiza

تیمار حدود 18 کیلوگرم خاک بر روی صفحات پلاستیکی ضدعفونی شده، پخش و مقدار نمک سولفات مس لازم را در حجم آب لازم برای رسیدن به رطوبت FC 0/8 حل کرده و به خاک اسپری شد و ضمن اسپری به طور مرتب با بیلچه استریل به هم زده شد و برای رسیدن به حالت تعادل بین فاز جامد و مایع به مدت 15 روز در همین حال (با حفظ رطوبت FC 0/8) نگهداری شد.

پس از دو هفته، 70 گرم زادمایه قارچی بصورت یک لایه نازک در عمق 5 سانتیمتری از سطح خاک قرار داده شد. بذور ذرت (*Zea mays* L.) رقم سینگل کراس 704 ضدعفونی شده به تعداد چهار بذر در هر گلدان کشت گردید. در طول دوره کشت، رطوبت خاک از طریق توزین، در 80 درصد ظرفیت مزرعه با آب مقطر تنظیم شد. در پایان مرحلهٔ رشد رویشی گیاه (دو روز قبل از برداشت گیاهان) مقدار پرولین اندازه‌گیری شد. اندازه‌گیری پرولین به روش ایریگوئن و همکاران (1992) صورت گرفت. برای این منظور، 0/5 گرم از برگ تازه به همراه 5 میلی لیتر اتانول 95 درصد در داخل هاون چینی سابیده و له شد. محلول رویی را جدا کرده و رسوبات آن دوباره با 5 میلی لیتر اتانول 70 درصد شستشو داده شده و فاز بالایی آن به قسمت رویی قبلی اضافه شد. محلول به دست آمده در سانتریفوژ به مدت 10 دقیقه درسرعت 3500دور در دقیقه قرار گرفت. برای تعیین غلظت پرولین، یک میلی لیتر از عصارهٔ الکلی فوق الذکر را با 5 میلی لیتر آب مقطر رقیق نموده و 2/5 میلی لیتر معرف نین هیدرین به آن اضافه شد. سپس، 2/5 میلی لیتر اسید استیک گلاسیال به آن افزوده شده و مخلوط حاصله پس از به هم زدن، به مدت 45 دقیقه در حمام آب جوش قرار داده شد. پس از بیرون آوردن نمونه ها از حمام آب جوش و خنک شدن آنها 5 میلی لیتر تولوئن به هر کدام از نمونه-ها افزوده شده و به شدت تکان داده شد تا کمپلکس پرولین و نین هیدرین وارد فاز تولوئن شود. نمونه‌ها به مدت 30 دقیقه به حال سکون رها شدند. استانداردهایی از پرولین (0 تا 0/1 میکرومول بر میلی لیتر) تهیه گردید. در نهایت میزان جذب محلولهای استاندارد و نمونه‌ها در طول موج 515 نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر (Hack DR/2000) اندازه‌گیری شد و منحنی کالیبراسیون با استفاده از محلولهای استاندارد تهیه گردید. در نهایت مقدار پرولین بر حسب میکرومول پرولین در هر گرم وزن تر برگ محاسبه گردید.

بعد از پایان دوره کشت سه ماهه، بخش هوایی و ریشه گیاهان به طور جداگانه در هر گلدان برداشت و وزن تر بخش هوایی و ریشه بطور جداگانه اندازه‌گیری و بعد از خشک کردن در دمای 50°C در آون فن‌دار، وزن خشک آنها نیز تعیین شد. بخشی از ریشه‌های ریز، پس از شستشوی کامل با آب، در الکل اتیلیک 50 درصد تثبیت شده و سپس به روش کورمانیک و مک‌گراو (1982) رنگ‌آمیزی شدند. درصد کلونیزاسیون ریشه به روش تقاطع خطوط شبکه (GIM[1]) تعیین گردید (نوریف و همکاران 1992). بدین صورت که ریشه‌های رنگ‌آمیزی شده درون ظروف پتری پخش و زیر بینوکلر مشاهده شدند. با شمارش نقاط تلاقی ریشه و اندام‌های میکوریزی ریشه‌ها با شبکه درون ظرف پتری، درصد کلونیزاسیون ریشه‌ها تعیین شد. غلظت مس در اندام هوایی و ریشه به روش خشک‌سوزانی با اسید کلریدریک یک نرمال و با دستگاه جذب اتمی (Shimadzu, AA-6300) و نیز غلظت فسفر اندام هوایی و ریشه به روش نیترو وانادو مولیبدات (کاتنیه 1980) با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Hack DR/2000) و غلظت پتاسیم اندام هوایی و ریشه، با دستگاه فلیم فتومتر (Corning, Flame Photometer 410) اندازه‌گیری شدند. گلومالین ساده استخراج[2] و کل[3] عصاره‌گیری شدند. به منظور عصاره‌گیری EEG یک گرم خاک (عبور داده شده از غربال 2 میلیمتری) را داخل لوله سانتریفوژ

[1] Gridline intersect method
[2] Easily extractable glomalin (EEG)
[3] Total lomalin (TG)

(قابل اتوکلاو) قرار داده و 8 میلی لیتر محلول سیترات سدیم 20 میلی مولار اضافه کرده و 30 ثانیه ورتکس شد. سپس به مدت 60 دقیقه در دمای 121 درجه سلسیوس اتوکلاو شد. سپس با RPM 5000 به مدت 15 دقیقه سانتریفوژ شد. محلول صاف روئی در لوله تمیز ریخته شد. جهت استخراج TG، 8 میلی‌لیتر از محلول سیترات سدیم 50 میلی‌مولار بر روی همان نمونه خاک (از مرحله قبل) اضافه شده و 30 ثانیه ورتکس شد. بقیه مراحل مشابه استخراج EEG بود (رایت و آپادایا 1996). محلول صاف روئی جمع‌آوری شده و تا زمان اندازه-گیری در یخچال $^{\circ}C$ 4 نگه‌داری شد. مقدار گلومالین موجود در عصاره صاف با استفاده از روش بردفورد (بردفورد 1976) و استانداردهای آلبومین سرم گاوی در طول موج 595 نانومتر اندازه‌گیری شد. این آزمایش بصورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی و در سه تکرار انجام شد. فاکتورهای مورد استفاده عبارت بودند: سه سطح مس (صفر، 250 و 500 میلی‌گرم در کیلوگرم خاک به ترتیب Cu_0، Cu_1 و Cu_2) و سه سطح قارچ (دو گونه قارچ *G. mosseae* و *G. intraradices* و شاهد بدون قارچ NM). برای آنالیز آماری داده‌ها از نرم افزار MSTATC و برای رسم نمودارها از نرم افزار Excel استفاده شد.

نتایج و بحث

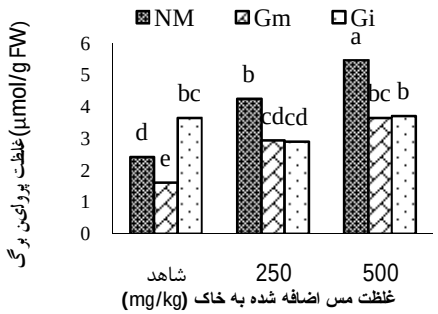
مقدار پرولین برگ

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها (جدول1) نشان داد که اثرات متقابل مس و گونه‌های قارچی بر مقدار پرولین برگ در سطح یک درصد معنی‌دار بود. مقایسه میانگین اثرات متقابل نشان داد که صرف نظر از اثر میکوریز، افزایش غلظت مس خاک سبب افزایش مقدار پرولین در برگ گیاه شد (شکل1). طبق نظر کوزنتسو و شِویاکوا (1997)، افزایش پرولین در گیاهان به هنگام تنش یک نوع مکانیسم دفاعی است. پرولین با چندین مکانیسم مانند جاروب کردن رادیکال‌های هیدروکسیل، تنظیم اسمزی، جلوگیری از طبع برگشته شدن[1] آنزیم‌ها و حفظ و سنتز پروتئین، مقاومت گیاه را در برابر تنش‌ها بالا می برد. نظر این دانشمندان با نتایج تحقیق حاضر همسو است. در گونه‌های مختلف گیاهی در هنگام تنش ایجاد شده توسط فلزات سنگین، دما، خشکی و شوری یکی از پاسخ‌های سازشی، تجمع پرولین است. افزایش غلظت پرولین تحت تأثیر غلظت‌های شدید مس در گندم (لسکو و همکاران 2002) نیز گزارش شده است. در کلیه سطوح مس، تأثیر قارچ میکوریز بر کاهش محتوای پرولین برگ‌ها معنی‌دار بود. در سطح Cu_0 بین دو گونه قارچ Gi و Gm تفاوت معنی‌داری وجود داشت، اما در دو سطح دیگر بین این دو گونه تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. این یافته‌ها با نتایج عبدالطیف (2011)، مطابقت دارد. کاهش پرولین در حضور قارچ میکوریز نشان‌دهنده کاهش میزان تنش در گیاه است. این کاهش تنش ممکن است با بهبود شرایط تغذیه‌ای گیاه در ارتباط باشد (کانترل و لیندرمن 2001). مس سرعت پراکسیداسیون لیپیدی را افزایش می‌دهد و فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز را کاهش می‌دهد، ولی همزیستی میکوریزی فعالیت این آنزیم‌ها را افزایش داده و آسیب اکسیداتیو لیپید را کاهش می‌دهد. در نتیجه پرولین که برای محافظت سلول در برابر تنش‌های اکسیداتیو تولید می-شود، کاهش می‌یابد (عبدالطیف 2011).

[1] Denaturation

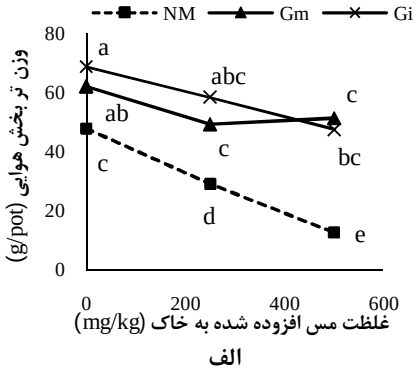
وزن تر و خشک بخش هوایی و ریشه

با توجه به نتایج به دست آمده، اثر متقابل مس و گونه‌های قارچی بر وزن تر و خشک اندام هوایی و ریشه معنی‌دار بود (شکل2 و جدول1). مقایسه میانگین اثرات متقابل نشان داد که افزایش غلظت مس در خاک سبب کاهش معنی‌داری در وزن تر و خشک بخش هوایی و ریشه گردید، ولی کاهش آن در گیاهان غیرمیکوریزی شدیدتر بود (شکل2). در گزارش‌های متعددی بیان شده است که غلظت زیاد مس در خاک و محلول غذایی، موجب کاهش وزن تر و خشک ریشه و اندام هوایی ذرت (چافای و همکاران 2005) شده است. سمیت مس موجب بازدارندگی تعداد زیادی از آنزیم‌ها شده و در فرآیندهای حیاتی گیاه از جمله فتوسنتز، ساخت رنگیزه‌ها و حفظ یکپارچگی غشا مداخله می‌کند (مارشنر 1995). در این تحقیق، هر چند که در گیاهان میکوریزی نیز اعمال سطوح مس، وزن تر و خشک اندام هوایی ذرت را کاهش داد، ولی در کل گیاهان میکوریزی وزن تر و خشک بیشتری در تمام سطوح مس نسبت به گیاهان غیرمیکوریزی دارا بودند، ولی بین دو گونه قارچ اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید (شکل2). بالا بودن وزن تر و خشک گیاهان میکوریزی در مقایسه با گیاهان غیرمیکوریزی، عمدتاً به دلیل انتشار میسلیوم قارچ‌های AM و تشکیل یک سیستم جذب اضافی به صورت مکمل سیستم ریشه‌ای گیاه و تولید هورمون-های محرک رشد گیاه مانند اکسین و سیتوکینین می-

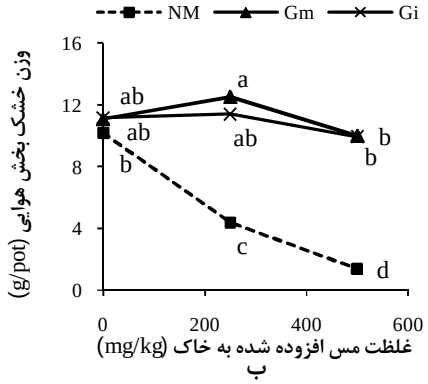


شکل 1- اثر برهمکنش سطوح مس افزوده شده به خاک (mg/kg) و گونه‌های قارچی (شاهد غیرمیکوریزی (NM)، گلوموس موسه (Gm) و گلوموس اینترارادیسیز (Gi)) بر غلظت پرولین برگ.

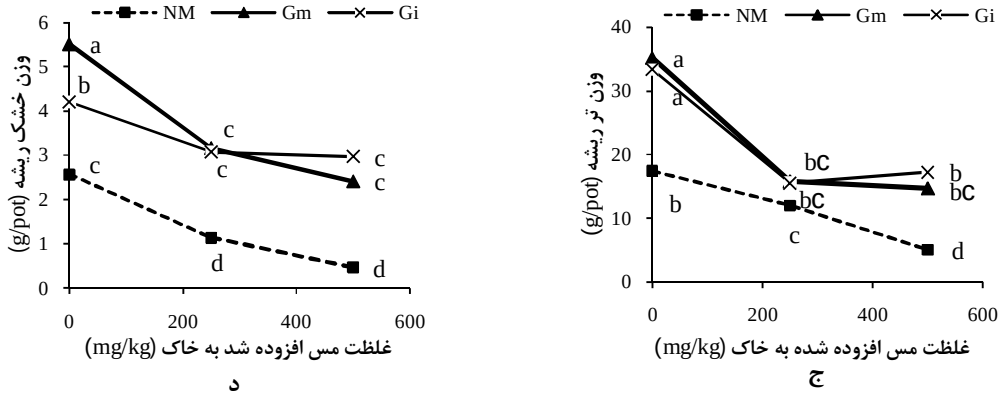
باشد و همین امر سبب بهبود تغذیه و تقویت رشد گیاهان میکوریزی می‌گردد. تغذیه بهتر فسفر به عنوان یک عامل مهم، سبب رشد بهتر گیاهان میکوریزی می-گردد و به طور کلی به نظر می‌رسد گیاهان میکوریزی شانس بیشتری برای بقا و رشد در خاک‌های آلوده به فلز سنگین داشته باشند (آندراد و همکاران 2004). رایت و همکاران (1996) نشان دادند که وزن خشک گیاه شبدر میکوریزی در یک دوره رشد 80 روزه دارای افزایش معنی‌دار نسبت به گیاهان شاهد غیرمیکوریزی بود.



الف



ب



شکل 2- اثر برهمکنش مس افزوده شده به خاک (mg/kg) و گونه‌های قارچی (شاهد غیرمیکوریزی (NM)، گلوموس موسه (Gm) و گلوموس اینترارادیسیز (Gi)) بر (الف)- وزن تر بخش هوایی (ب)- وزن خشک بخش هوایی (ج)-وزن تر ریشه و (د)- وزن خشک ریشه.

گلومالین ساده استخراج

بررسی اثرات متقابل سطوح مس و گونه‌های قارچی نشان داد که با افزایش غلظت مس در خاک آلوده شده، غلظت EEG کاهش یافت. به طوری که بیشترین EEG تولید شده توسط دو گونه قارچ در سطح شاهد بدون مس بود. در تیمارهای غیرمیکوریزی با افزایش سطوح مس از Cu_0 به Cu_1 و Cu_2 به ترتیب 2/63 و 24/69 درصد کاهش در غلظت EEG مشاهده شد. EEG اندازه‌گیری شده در خاک تیمارهای غیر میکوریزی، مربوط به غلظت اولیه گلومالین در خاک است. همچنین مشاهده شد که افزایش مس خاک، غلظت گلومالین در هر دو گونه قارچ را به طور معنی‌داری کاهش می‌دهد. این کاهش در مورد Gm نسبت به Gi بیشتر بود. در خاک تیمارهای تلقیح یافته با قارچ Gm با افزایش مس از Cu_1 به Cu_2 در مقایسه با Cu_0 به ترتیب 12/16 و 25/63 درصد و در قارچ Gi 8/65 و 16/60 درصد کاهش در غلظت EEG مشاهده شد (شکل3-الف). این نتیجه، فرضیه اول ما را مبنی بر کاهش رشد قارچ میکوریز با افزایش غلظت عناصر سنگین در خاک تائید می‌کند، البته در مطالعات دیگری نیز تأثیر منفی فلزات سنگین بر رشد قارچ‌های میکوریز نشان داده شده است (مک‌گراس و همکاران 1995). در واقع غلظت گلومالین اندازه‌گیری شده در سطوح مختلف مس گویای میزان رشد هر یک از گونه‌های قارچ میکوریز تحت تأثیر این سطوح می‌باشد. تأثیر فلزات سنگین بر تولید گلومالین متفاوت گزارش شده است. تولید گلومالین می‌تواند رابطه منفی با جذب فلزات سنگین در گیاهان داشته باشد. در این حالت ممکن است فلزات در دیواره هیفی بوسیله گلومالین تثبیت شوند، از این رو مانع ورود اضافی گلومالین در سیستم خاک شوند. متعاقباً آلودگی خاک به فلزات سنگین ممکن است سبب افزایش تولید گلومالین شود. برای مثال لیوال و همکاران (1997) نشان دادند که فلزات بوسیله لیگاندهای داخل سلولی سنتز شده توسط قارچ‌های میکوریزی نظیر متالوتیونین‌ها و پلی‌فسفات‌ها کلیت شده در داخل واکوئل‌ها تجمع می‌یابند. یکی از این مواد کلیت کننده می‌تواند گلومالین باشد، که این امر می‌تواند به نفع تولید فراوان گلومالین توسط گونه‌های قارچ‌های میکوریز جهت افزایش کارایی این قارچ‌ها در استخراج فلزات سنگین از خاک شود. درمطالعه انجام شده توسط کُرنجو و همکاران (2008) نیز مشاهده شد که با افزایش غلظت مس در خاک مقدار گلومالین نیز افزایش می‌یابد.

در کلیه سطوح مس، خاک تیمارهای میکوریزی، EEG بیشتری در مقایسه با تیمارهای غیرمیکوریزی

داشتند ($p<0/05$). بین دو گونه قارچی نیز تفاوت معنی-داری مشاهده شد و گونه قارچ Gi در این آزمایش توانایی بیشتری در تولید گلومالین داشت (شکل3-الف). مطالعات نشان می‌دهند که گونه‌های قارچ‌های میکوریز آربوسکولار که در خاک‌ها حضور دارند مهم‌ترین فاکتور در کنترل غلظت پروتئین‌های خاک مرتبط با گلومالین (GRSP[1]) می‌باشند (نیکولز و رایت 2004).

در یک مطالعه برای توصیف گلومالین تولید شده بوسیله هیف قارچ‌های میکوریز آربوسکولار در طول کلونیزاسیون فعال ریشه، رایت و همکاران (1996) مشاهده کردند که مقادیر پروتئین استخراج شده در واحد وزن هیف‌ها در بین گونه‌های *Gigaspora gigantea*، *G. etunicatum* و *G. intraradices* متفاوت است.

با توجه به نتایج بدست آمده مشخص شد که همبستگی بالایی بین غلظت EEG اندازه‌گیری شده به روش بردفورد و درصد کلونیزاسیون ریشه‌ها وجود دارد، که این رابطه از نوع خطی بوده و ضریب تبیین آن در 0/885 می‌باشد. با افزایش درصد کلونیزاسیون ریشه‌ها، EEG نیز افزایش یافته است (شکل4). وجود همبستگی مثبت بین مقدار گلومالین و درصد کلونیزاسیون ریشه‌ها، نشان می‌دهد که اندازه‌گیری گلومالین تولید شده بوسیله قارچ‌های AM به روش بردفورد، دست کم اطلاعاتی را در رابطه با حضور و عدم حضور و همچنین جمعیت این قارچ‌ها در خاک فراهم می‌کند (روزیر و همکاران 2008). در مطالعه انجام شده توسط وو و همکاران (2012) مشاهده شد که کلونیزاسیون ریشه‌های گیاهان میکوریزی همبستگی مثبت و معنی‌داری با EEG و TG دارد. در یک آزمایش انجام گرفته توسط مورتون (1990) از طریق ایمنوفلوروسنس، به طور دقیق نشان داده شد که گلومالین تنها در سطح ریشه‌هایی حضور دارد که بوسیله قارچ میکوریز آربوسکولار کلونیزه شده باشند.

گلومالین کل

تأثیر سطوح مس و گونه‌های قارچی بر تولید TG معنی‌دار بود (جدول1). در خاکِ تیمارهای قارچی در مقایسه با شاهد بدون قارچ، با افزایش سطوح مس، TG کاهش یافت. در خاک تیمارهای غیرمیکوریزی با افزایش غلظت مس در خاک از Cu_0 به Cu_1 و Cu_2 به ترتیب 3/89 و 32/42 درصد کاهش در غلظت TG مشاهده شد. این کاهش در خاک تیمارهای میکوریزی تلقیح شده با قارچ Gm به ترتیب 12/8 و 27/62 درصد و قارچ Gi به ترتیب 15/63 و 34/4 درصد بود. همچنین نتایج نشان داد که تلقیح با گونه‌های قارچی Gm و Gi سبب افزایش تولید TG شد ($p<0/05$) و بین دو گونه قارچی نیز تفاوت معنی‌داری مشاهده شد. در این تحقیق قارچ Gi از نظر تولید TG کاراتر از قارچ Gm بود (شکل3-ب). همچنین نتایج همبستگی بالایی بین TG و درصد کلونیزاسیون ریشه‌ها نشان داد. ضریب تبیین این رابطه خطی 0/959 بود. با افزایش درصد کلونیزاسیون ریشه‌ها، TG افزایش یافته و شیب این افزایش نسبت به EEG بیشتر بوده است (شکل4).

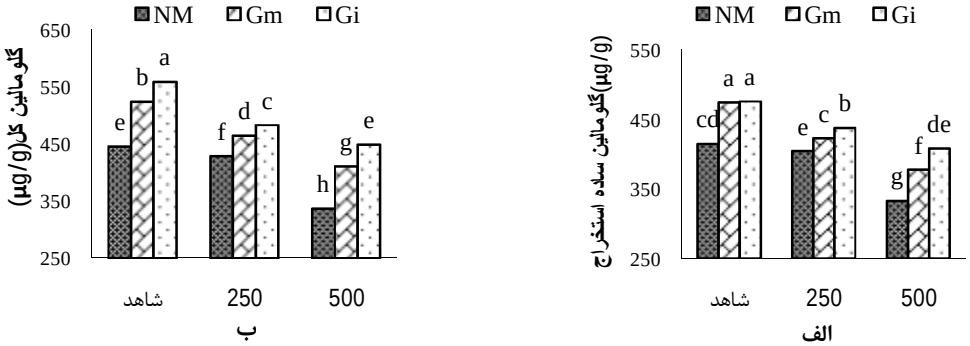
تغییر مقدار EEG و TG به ازای واحد درصد کلونیزاسیون ریشه

با افزایش سطح مس از Cu_0 به Cu_1 مقدار EEG و TG به ازا واحد درصد کلونیزاسیون ریشه کاهش یافت، ولی در سطح Cu_2 تولید مقدار EEG و TG به ازای واحد درصد کلونیزاسیون ریشه افزایش یافت (شکل5). گلومالین یک گلیکوپروتئین مشابه با پروتئین‌های شوک حرارتی 60 (hsp_s60[2]) است. محققان بر این باورند که ممکن است گلومالین به عنوان یک پروتئین تولید شده تحت شرایط تنش، وظیفه حمایت از قارچ‌های AM را داشته باشد (ریلیگ و استین‌برگ 2002). مطالعه آنها برای اولین بار نشان داد که شرایط رشدی نامناسب ممکن است تولید گلومالین را افزایش دهد. چون قارچ-های AM بخش اعظم ذخایر کربن و نیتروژن خود را

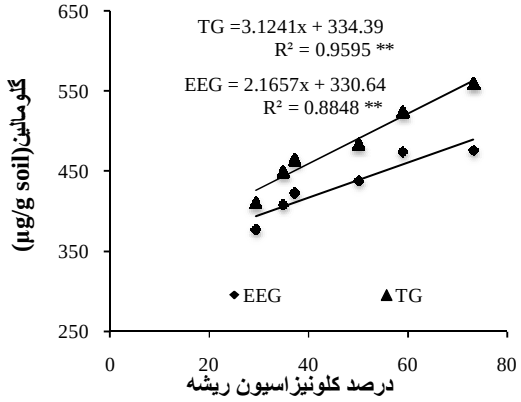
[1] Glomalin related soil protein

[2] Heat shock proteins 60

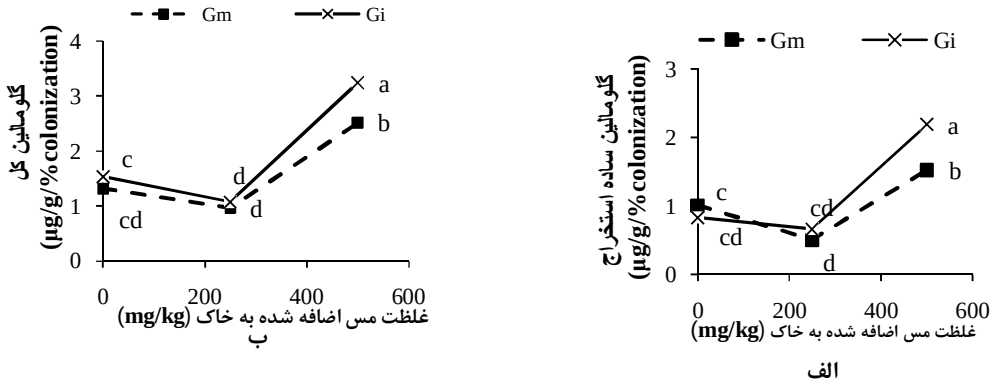
به تولید گلومالین اختصاص می‌دهد، لذا تصـور مـی‌رود وظیفه اصلی گلومالین حمایت از این قارچ‌ها باشد.



شکل3- اثر برهمکنش سطوح مس افزوده شده به خاک (mg/kg) و گونه‌های قارچی (شاهد غیرمیکوریزی (NM)، گلوموس موسه (Gm) و گلوموس اینترارادیسیز (Gi)) بر: الف- گلومالین ساده استخراج (EEG)، ب- گلومالین کل (TG)



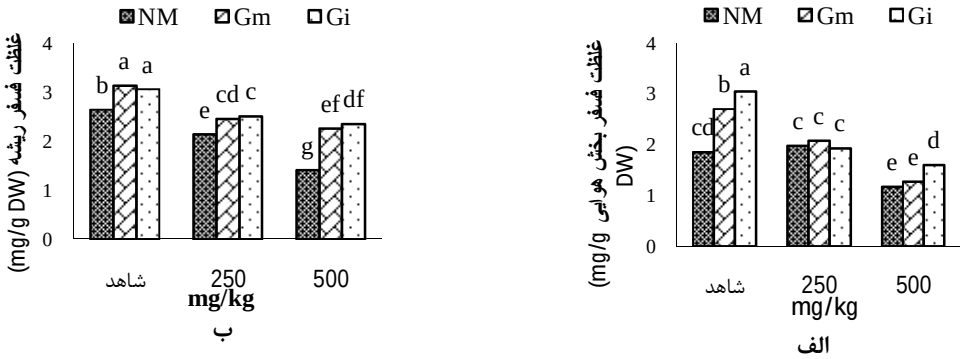
شکل4- رابطه گلومالین ساده استخراج (EEG) و گلومالین کل (TG) با درصد کلونیزاسیون ریشه.



شکل5: تغییر مقدار الف- EEG، ب- TG به ازای واحد درصد کلونیزاسیون ریشه تحت تأثیر سطوح مس افزوده شده به خاک (mg/kg) و گونه‌های قارچی (شاهد غیرمیکوریزی (NM)، گلوموس موسه (Gm) و گلوموس اینترارادیسیز (Gi)).

غلظت فسفر بخش هوایی و ریشه

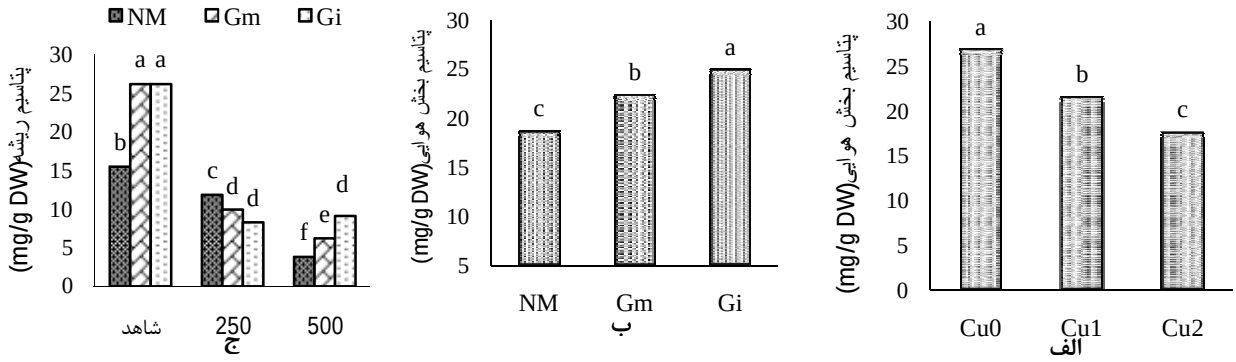
با افزایش غلظت مس خاک، غلظت فسفر بخش هوایی و ریشه در گیاهان میکوریزی و غیرمیکوریزی کاهش یافت ($p<0/05$). در سطح Cu_1 غلظت فسفر بخش هوایی گیاهان میکوریزی و غیرمیکوریزی تفاوت معنی‌داری نشان نداد (شکل6). برهمکنش‌های مشابه توسط آلام (1983) نیز گزارش شده است. با افزایش مس در خاک دسترسی فسفر کاهش می‌یابد که به علت واکنش‌های شیمیایی بین فسفر و مس می‌باشد که منجر به تشکیل فسفات‌های مس کم محلول در خاک می‌شود (شاه و همکاران 1982). در این تحقیق در کلیه سطوح مس، غلظت فسفر بخش هوایی و ریشه گیاهان میکوریزی به طور معنی‌داری بیش از غلظت آن در گیاهان غیرمیکوریزی بود. نتایج نشان داد که با افزایش سطح مس، گیاهان میکوریزی شده با Gi توانایی بیشتری در افزایش غلظت فسفر اندام هوایی برخوردارند (شکل6). گیاهان میکوریزی بواسطه هیف-های خارج ریشه‌ای سطح تماس بیشتری با خاک دارند. از طرف دیگر پایین بودن ثابت مایکلیس منتن (Km) در خاک منجر به جذب بهتر فسفر توسط قارچ می‌گردد، بدین معنی که در غلظت‌های پایین از یک یون، سرعت جذب توسط قارچ‌ها نسبت به ریشه بیشتر است.



شکل6- اثر برهمکنش سطوح مس افزوده شده به خاک (mg/kg) و گونه‌های قارچی (شاهد غیرمیکوریزی (NM)، گلوموس موسه (Gm) و گلوموس اینترارادیسیز (Gi)) بر: (الف)- غلظت فسفر بخش هوایی و (ب)- ریشه.

غلظت پتاسیم بخش هوایی و ریشه

با توجه به نتایج بدست آمده مشخص شد که اثر اصلی سطوح مس و اثر اصلی گونه‌های قارچی بر غلظت پتاسیم بخش هوایی معنی‌دار بوده ولی اثر متقابل مس و گونه‌های قارچی غیرمعنی‌دار نبود (جدول2). با افزایش غلظت مس در خاک از Cu_0 به Cu_1 و Cu_2 غلظت پتاسیم بخش هوایی به ترتیب 24/77 و 53/45 درصد کاهش یافت ($p<0/05$) (شکل7-الف). تلقیح گیاهان با دو گونه قارچ Gm و Gi نسبت به شاهد غیرمیکوریزی به ترتیب سبب افزایش 20 و 34/05 درصد در غلظت پتاسیم هوایی شد (شکل 7-ب). اثر متقابل سطوح مس و گونه‌های قارچی بر غلظت پتاسیم ریشه معنی‌دار بود مقایسه میانگین اثرات متقابل نشان داد که با افزایش غلظت مس خاک، غلظت پتاسیم ریشه در گیاهان میکوریزی و غیرمیکوریزی کاهش یافت. ولی حضور قارچ سبب افزایش غلظت پتاسیم در مقایسه با گیاهان غیرمیکوریزی گردید، ولی بین دو گونه قارچ تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (شکل7- ج). رابطه همزیستی بین قارچ میکوریز و ریشه‌های گیاهان به میزان قابل توجهی رشد و جذب عناصر غذایی را افزایش می‌دهد (آگه 2001). زاقلوئل و همکاران (1996) نشان دادند که همزیستی گندم با قارچ میکوریز سبب افزایش غلظت پتاسیم گیاه گردید.



شکل7- اثر اصلی (الف)- سطوح مس افزوده شده به خاک (mg/kg) و (ب)- گونه‌های قارچی (شاهد غیرمیکوریزی (NM)، گلوموس موسه (Gm) و گلوموس اینترارادیسیز (Gi)) بر غلظت پتاسیم بخش هوایی. (ج)- اثر برهمکنش سطوح مس و گونه-های قارچی (شاهد غیرمیکوریزی (NM)، گلوموس موسه (Gm) و گلوموس اینترارادیسیز (Gi)) بر غلظت پتاسیم ریشه.

غلظت مس بخش هوایی و ریشه

اثر متقابل سطوح مس و قارچ میکوریز بر غلظت مس بخش هوایی و ریشه معنی‌دار بود (جدول2). کلونیزاسیون با هر دو گونه قارچی در سطوح Cu_1 و Cu_2 سبب کاهش غلظت مس بخش هوایی گردید و تفاوت معنی‌داری بین گیاهان میکوریزی و غیرمیکوریزی و همچنین بین دو گونه قارچ مشاهده شد. ولی در سطح Cu_0 تفاوت معنی‌داری بین دو گونه قارچ مشاهده نشد (شکل8). گنزالز-چاوز و همکاران (2002) مشاهده کردند که میسلیوم‌های خارج ریشه‌ای قارچ‌های AM قادر به جذب و تجمع مس هستند. آنها دلایل را این گونه مطرح کردند: 1- میسلیوم‌های خارج ریشه‌ای قارچ‌های AM خاک‌های آلوده به مس، مس را در مواد موسیلاژی دیواره خارجی هیف‌ها و همچنین در سیتوپلاسم هیف انباشته می‌کنند. 2- تجمع مس اساساً با آهن موجود در مواد موسیلاژی دیواره خارجی هیف‌ها در ارتباط است. یک نظریه دیگر در کاهش غلظت فلزات سنگین در گیاهان میکوریزی این است که گلومالین موجود بر روی هیف‌های قارچ‌های میکوریز نقش مهمی در ایموبیلیزه کردن[1] فلزات سنگین در فضای بین خاک-هیف یعنی قبل از ورود فلز سنگین در سیستم قارچ-گیاه بازی می‌کنند، (خان 2006). در این تحقیق قارچ Gi به طور معنی‌داری کارایی بیشتری از قارچ Gm در کاهش غلظت مس بخش هوایی و ریشه‌های گیاه ذرت در کلیه سطوح مس داشت. درصد کلونیزاسیون قارچ Gi هم به مراتب بیش از قارچ Gm بود، که نشان‌دهنده میزان موفقیت این قارچ در برقراری همزیستی در آلودگی مس می‌باشد.

درصد کلونیزاسیون ریشه

با توجه به نتایج، اثر متقابل مس و گونه‌های قارچی بر درصد کلونیزاسیون ریشه معنی‌دار بود (جدول2). مقایسه میانگین اثرات متقابل نشان داد که افزایش غلظت مس در خاک سبب کاهش درصد کلونیزاسیون ریشه گردید ($p<0/05$) (شکل9). کاهش کلونیزاسیون ممکن است یک مکانیسم برای محدود کردن جذب برخی از فلزات سنگین باشد (اوده و همکاران 2002). بعضی محققین کاهش کلونیزاسیون ریشه را، در نتیجه آثار سمی فلزات سنگین بر روی اندام‌های قارچ میکوریز آربوسکولار بیان نموده‌اند (یثربی و همکاران 1994). در این تحقیق، در کلیه سطوح مس، قارچ Gi بالاترین درصد کلونیزاسیون را داشت، که نشان‌دهنده کارایی این قارچ در خاک آلوده به مس است.

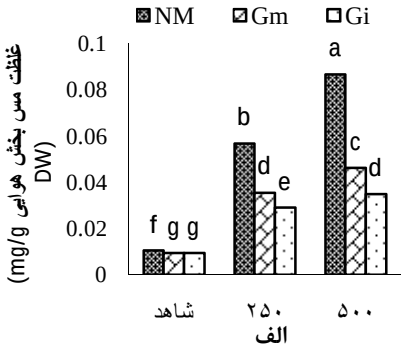
جدول1-تجزیه واریانس اثر سطوح مس و گونه‌های قارچی بر غلظت پرولین، وزن ترو خشک بخش هوایی و ریشه، گلومالین ساده استخراج (EEG) و کل (TG)

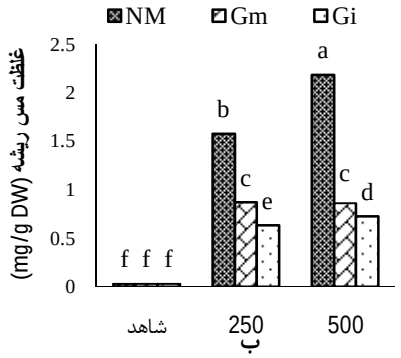
		میانگین مربعات						
منابع تغییر	درجه آزادی	غلظت پرولین	وزن تر بخش هوایی	وزن خشک بخش هوایی	وزن تر ریشه	وزن خشک ریشه	EEG	TG
مس	2	6/591 **	1150/790 **	31/593 **	708/531 **	11/354 **	15416/018 **	27676/021 **
قارچ	2	3/885 **	2128/589 **	97/904 **	329/052 **	14/170 **	7403/174 **	20250/858 **
مس×قارچ	4	2/123 **	130/143 *	17/496 **	47/257 **	0/696 **	549/803 **	904/630 **
خطا	18	0/164	41/839	0/621	5/22	0/105	23/084	30/347
ضریب تغییرات (%)		11/94	13/68	8/64	12/37	11/44	1/15	1/21

جدول2- تجزیه واریانس اثر سطوح مس و گونه‌های قارچی بر غلظت فسفر بخش هوایی و ریشه، غلظت پتاسیم بخش هوایی و ریشه، غلظت مس هوایی و ریشه و درصد کلونیزاسیون ریشه

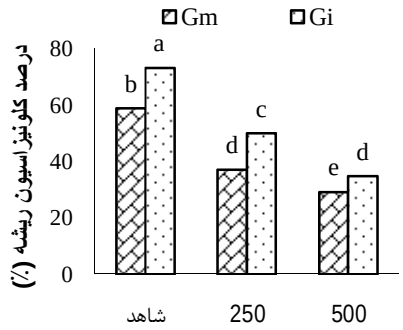
		میانگین مربعات						
منابع تغییر	درجه آزادی	غلظت فسفر هوایی	غلظت فسفر ریشه	غلظت پتاسیم هوایی	غلظت پتاسیم ریشه	غلظت مس بخش هوایی	غلظت مس ریشه	درصد کلونیزاسیون
مس	2	3/201 **	2/025**	195/321**	657/744 **	0/005 **	3/844 **	1192/687 **
قارچ	2	0/643 **	0/962**	90/679 **	45/981 **	0/002 **	1/655 **	6971/141 **
مس×قارچ	4	0/33 **	0/092**	11/679 ns	45/519 **	0/001 **	0/498 **	341/691 **
خطا	18	0/027	0/006	5/401	1/082	0/0001	0/002	6/728
ضریب تغییرات (%)		8/4	3/17	10/64	8/01	4/06	5/62	8/23

ns، * و ** به ترتیب غیرمعنی‌دار، معنی‌دار در سطح 1٪ و 5٪





شکل 8- اثر برهمکنش سطوح مس و گونه‌های قارچی (شاهد غیرمیکوریزی (NM)، گلوموس موسه (Gm) و گلوموس اینترارادیسیز (Gi)) بر غلظت مس (الف)- بخش هوایی و (ب)- ریشه.



شکل 9- اثر برهمکنش سطوح مس و گونه‌های قارچی (شاهد غیرمیکوریزی (NM)، گلوموس موسه (Gm) و گلوموس اینترارادیسیز (Gi)) بر درصد کلونیزاسیون ریشه ذرت.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج بدست آمده از این آزمایش نشان داد که غلظت مس بر میزان تولید گلومالین هر دو گونه قارچ *G. mosseae* و *G. intraradices* اثر منفی دارد، البته تأثیر آن در قارچ *G. mosseae* به مراتب بیشتر بود. به نظر می‌رسد که تولید گلومالین توسط قارچ‌های میکوریز، نوعی استراتژی در جهت بقای این میکروارگانیسم‌ها در خاک‌های حاوی فلزات سنگین می‌باشد. گلومالین گاهی به تنهایی یک سوم از کل کربن آلی خاک را به خود اختصاص می‌دهد. بنابراین نقش کلیدی در ذخیره کربن آلی خاک خواهد داشت. اگرچه این ترکیب یک مخزن مهم جهانی از نیتروژن و کربن را تشکیل می‌دهد، تاثیر آلودگی‌های زیست محیطی بر روی تولید گلومالین بخوبی بررسی نشده است. تحقیقات از این قبیل می‌تواند وظایف اکوفیزیولوژیکی گلومالین را در قارچ‌های گلومرال روشن کرده و منجر به پیش بینی ذخایر گلومالین در اکوسیستم‌های تحت تغییر جهانی شود. با توجه به وجود همبستگی بین غلظت گلومالین و حضور قارچ میکوریز در تحقیقات انجام شده، لزوم مطالعات بیشتر در مورد بکارگیری گلومالین به عنوان شاخصی از رشد قارچ میکوریزی در خاک احساس می‌شود. نتایج همچنین ثابت کرد که سنجش پروتئین به روش بردفورد، برای اندازه‌گیری گلومالین روش سریع و نسبتاً کارآمدی است. به کارگیری این روش در مطالعاتی که جنبه مقایسه‌ای داشته و در شرایط گلخانه و استریل انجام می‌شود کارایی داشته ولی در خاک‌های حاوی مواد آلی زیاد توصیه نمی‌شود. در این پژوهش استفاده از هر دو گونه *G. mosseae* و *G. intraradices* نسبت به شاهد بدون میکوریز، از لحاظ تأثیر بر شاخص‌های اندازه‌گیری شده مثبت ارزیابی شد، هر چند که *G. intraradices* از لحاظ افزایش تولید گلومالین شاخص‌های رشدی و کاهش غلظت پرولین از کارایی بهتری برخوردار بود، البته با توجه به تأثیر متفاوت سطوح

مس بر رشد دو گونه قارچ، پیشنهاد می‌شود در مطالعات بعدی از سایر گونه‌های قارچی مخصوصاً گونه‌های مقاوم به فلزات سنگین استفاده شود.

منابع مورد استفاده

شیرزاده ن، 1390. تغییرات فعالیت آنزیمی و برخی شاخص‌های اکوفیزیولوژیک ریزجانداران خاک پس از انکوباسیون با سطوح مختلف سرب. پایاننامه کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز.

مولایی ع، 1388. بررسی تحمل القایی ناشی از آلودگی در جمعیت میکروبی در انکوباسیون خاک با سطوح مختلف سرب. پایاننامه کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز.

Abdel Latef AH, 2011. Influence of arbuscular mycorrhizal fungi and copper on growth, accumulation of osmolyte, mineral nutrition and antioxidant enzyme activity of pepper (*Capsicum annuum* L.). Mycorrhiza 21:495–503.

Alam SM, Iqbal Z and Latif A, 1999. Fodder yield and composition of berseem (*Trifolium alexandrium* L.) as influenced by phosphorus and zinc application. Pakistan. Journal of Soil Science 17:83-88.

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

Andrade SAL, Abreu CA, Abreu MF and Silveria APD, 2004. Influence of lead addition on arbuscular mycorrhiza and *Rhizobium* symbiosis under soybean plants. Applied Soil Ecology 26:123-131.

Auge RM, 2001.Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. Mycorrhiza 11: 3-42.

Bai C, He X, Tang H and Shan B, 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.

Bradford MM, 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.

Cantrell IC and Linderman RG, 2001. Preinoculation of lettuce and onion with mycorrhizal fungi reduces deleterious effects of soil salinity. Plant and Soil 233:269-281.

Chaffai R, Tekitek A and El-Ferjani E, 2005. Comparative Effects of copper and cadmium on growth and Lipd content in maize seedlings (*Zea mays* L.). Pakistan Journal of Biological Sciences 8: 649-655.

Cottenie A, 1980. Soil and Plant Testing. FAO Soils Bulletin, No. 38/2, 94-100.

Gee GW and Bauder JW, 1986. Particle-size analysis, In: Dane JH and GC Topp (eds). Methods of Soil Analysis. Part 4, Physical Methods. Soil Science Society of America, Madison, Visconsin, USA.

Gildon A and Tinker PB, 1983. Interactions of vesicular-arbuscular infection and heavy metals in plants, The effect of heavy metals on the development of vesicular-arbuscular mycorrhizas. New Phytologist 95:247-261.

Gonzalez-Chavez MC, Carillo-Gonzelez R, Wright SF and Nichols KA, 2004. The role of glomalin, a protein produced by arbuscular mycorrhizal fungi, in sequestering potentially toxic elements. Environmental Pollution 130:317–323.

Gonzalez-Chavez MC, Haen JD, Vangronsveld J and Dodd LC, 2002. Copper sorption and accumulation by the extraradical mycelium of different *Glomus* spp. (arbuscular mycorrhizal fungi) isolated from the same polluted soil. Plant and Soil 240:287–297.

Gupta PK, 2000. Soil, Plant, Water and Fertilizer Analysis. Agrobios, New Delhi, India.

Hail-mariam S, Collins HP, Wright S and Paul EA, 2007. Fractionation and long-term laboratory incubation to measure soil organic matter dynamics. Soil Science Society of America Journal 72:370-378.

Ippolito JA, Ducey T and Tarkalson D, 2010. Copper impacts on corn, soil extractability, and the soil bacterial community. Soil Science 175:586-592.

Irigoyen JJ, Emerich DW and Sanchez-Diaz M, 1992. Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa (*Medicago sativa* L.) plants. Physiologia Plantarum 84: 55-60.

Kapoor A and Viraraghavan T, 1995. Fungal biosorption an alternative treatment option for heavy metal bearing wastewater. Bioresource Technology 55:195-206.

Khan AG, 2006. Mycorrhizoremediation – an enhanced form of phytoremediation. Journal of Zhejiang University 7:503-514.

Klironomos, JN and Kendrick, WB 1996.Palatability of micro fungi to soil arthropods in relation to the functioning of arbuscular mycorrhizae. Biology and Fertility of Soils 21:43-52.

Kormanic PP and Mc Graw, 1982. Quantification of VA mycorrhizae in plant roots. In: Schenck, N.C. (ed.) Methods and Principles of Mycorrhizal Research. Saint Paul Minnesota. 37-45. American Phytopathological Society.

Lesko K , Stefanovits Bonyai I and Simon Sarkadi LJ, 2002. Plant effect of cadmium and magnesium on free amino acids, polyamines and peroxidase enzyme activity in wheat seedlings. Nutrition 30:103- 110.

Leyval C, Turnau K. and Haselwandter K, 1997. Effect of heavy metal pollution on mycorrhizal colonization and function: physiological, ecological and applied aspects. Plant and soil 7:139-153.

Marschner H, 1995. Mineral Nutrition of Higher Plants. Academic press, London.

McGrath SP, Chaudri AM and Giller KE, 1995. Long-term effects of metals in sewage sludge on soils, microorganisms and plants. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 14:94-104.

Mclean EO, 1982. Soil pH and lime requirement. Pp.199-224. *In*: Page A L, et al. (eds). Methods of Soil Analysis. Part 2, Chemical and Microbiological Properties, 2nd edition. Agron, Monogr. 9. American Society of Agronomy and Soil Science Society of America, Madison,USA.

Morton JB, 1990. Species and clones of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales, Zygomycetes): Their role in macro- and microevolutionary processes. Mycotaxon 37: 493-515.

Nelson DW and Sommers LE, 1982. Total carbon, organic carbon and organic matter. *In*: Page AL, Miller RH, Keeney DR (eds). Methods of Soil Analysis, part 2. American Society of Agronomy , Soil Science Society of America., Madison, Wisconsin. Pp:539-579.

Nichols KA and Wright SF, 2004. Contributions of soil fungi to organic matter in agricultural soils. Pp. 179–198. *In:* Weil, R Magdoff F(eds). Functions and Management of Soil Organic Matter in Agroecosystems. and CRC, Washington, DC.

Norrif IR, Read DJ and Varma AK, 1992. Methods in Microbiology Techniques for Study of Mycorrhiza. Academic press, London.

Olsen SR and Sommers LE, 1982. Phsphorus. Pp.403-430. *In*: Page AL, Miller RH, Keeney DR (eds). Methods of Soil Analysis, part 2. American Society of Agronomy , Soil Science Society of America., Madison, Wisconsin.

Olsson PA, Rahm J and Aliasgharzad N, 2010. Carbon dynamics in mycorrhizal symbioses is linked to carbon costs and phosphorus benefits. FEMS Microbiology Ecology 72:123-131.

Oudeh M, Khan M and Scullion J, 2002. Plant accumulation of potentially toxic elements in sewage sludge as affected by soil organic matter level and mycorrhizal fungi. Environmental Pollution 116:293-300.

Rillig MC and Steinberg PD, 2002. Glomalin production by an arbuscular mycorrhizal fungus: a mechanism of habitat modification? Soil Biology and Biochemistry 34:1371–1374.

Rosier CL, Piotrowski C, Jeffrey J, Hoyea S and Rillig MC, 2008. Intraradical protein and glomalin as a tool for quantifying arbuscular mycorrhizal root colonization. Pedobiologia 52:41-50.

Shah Sm, Khan NH and Iqbal MM, 1982. Phosphorus-copper intraction studies in maize under field condition. Sarhad Journal of Agricultural 5:311-313.

Wright SF 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.

Wright SF, Franke-Snyder M, Morton JB 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.

Wu QS, He XH, Zou YN, He KP, Sun YH and Cao MQ, 2012. Spatial distribution of glomalin-related soil protein and its relationships with root mycorrhization, soil aggregates, carbohydrates, activity of protease and b-glucosidase in the rhizosphere of *Citrus unshiu*. Soil Biology and Biochemistry 45: 181-183.

Yasrebi J, Karimian N, Maftoun M, Abtahi A and Sameni AM, 1994. Distribution of zinc forms in highly calcareous soils as influenced by soil physical and chemical properties and application of zinc sulfate. Communications in Soil Science and Plant Analysis. 25: 2133-2145.

Zaghloul RA, Mostafa MH and Amer AA, 1996. Influence of wheat inoculation with mycorrhizal fungi, phosphate solubizing bacteria and Azosprillium on its growth and soil fertility. Annals of Agricultural Science, Moshtohor 34:611-625.