

بررسی بیان ژن‌های *abc* ترانسپورتر و متالوتیونین در گیاهچه‌های *Festuca arundinacea* تلقیح‌شده با قارچ *Funneliformis intraradices* در تنش سمیت نیکل

لیلا شبانی * و معصومه رفیعی دمنه

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

چکیده

در گیاهان، شبکه پیچیده‌ای از فرایندهای انتقال وجود دارد که در حفظ غلظت یون‌های فلزی ضروری در کده‌های سلولی مختلف عمل می‌کنند و بنابراین آسیب ایجادشده از طریق ورود عناصر به درون سیتوسول را کاهش می‌دهند. قارچ‌های میکوریز در شرایط مقادیر بالای فلزات به کاهش سمیت فلز در گیاهان قادر هستند. در این پژوهش، تأثیر قارچ میکوریز آربسکول‌دار *Funneliformis intraradices* بر رشد، تحمل و بیان ژن‌های *abc* ترانسپورتر (*ABC*) و متالوتیونین (*met*) در برگ‌ها و ریشه‌های گیاهچه‌های فستوکای کشت‌شده در خاک آلوده به نیکل بررسی شد. گیاهچه‌های فستوکای تلقیح‌شده با قارچ (*M+*) و بدون آن (*M-*) در خاک آلوده با غلظت‌های مختلف نیکل (۰، ۳۰، ۹۰ و ۱۸۰ پی‌پی‌ام) به مدت سه ماه کشت داده شد. نتایج بررسی حاضر، تأثیر مثبت کلونیزاسیون قارچی را بر افزایش رشد (۱۷ و ۱۵ درصد افزایش در وزن تر و طول ریشه)، کاهش جذب (در تیمارهای ۹۰ و ۱۸۰ پی‌پی‌ام نیکل) و کاهش عامل انتقال نیکل از ریشه به اندام هوایی (در تمام سطوح تیمار نیکل) گیاهچه‌های فستوکا در تنش نیکل نشان داد. نتایج نشان‌دهنده تأثیر نیکل بر افزایش بیان هر دو ژن *abc* و *met* در ریشه گیاهان *M+* و *M-* بود. گیاهچه‌های تلقیح‌شده با قارچ میکوریز بیان کمتری از ژن‌های *abc* و *met* را در مقایسه با گیاهچه‌های *M-* نشان دادند. نتایج این تحقیق، اهمیت کلونیزاسیون قارچ میکوریز *F. intraradices* را در کاهش انتقال نیکل از ریشه به ساقه در گیاهچه‌های فستوکا و کاهش اثرات تنش نیکل نشان می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: متالوتیونین، میکوریز، نیکل، *ABC* ترانسپورتر، *Funneliformis intraradices*، *Festuca arundinacea*

مقدمه

یون‌های فلزات سنگین نظیر آهن، مس، روی، کبالت یا نیکل ریزمغذی‌های ضروری هستند که در فعالیت‌های عملکردی تعداد زیادی از پروتئین‌های مسئول در حفظ رشد و نمو موجودات زنده درگیر هستند. با این حال، این یون‌های فلزی در غلظت‌های اضافی، برای موجودات زنده زیان‌آور هستند. علاوه بر این، موجودات زنده در معرض غلظت‌های بسیار سمی کادمیوم، سرب، جیوه و سایر فلزات که عموماً غیر ضروری هستند، قرار می‌گیرند. در گیاهان، شبکه پیچیده‌ای از فرایندهای انتقال موجود است که در حفظ غلظت یون‌های فلزی ضروری در کده‌های سلولی مختلف عمل می‌کنند و بنابراین آسیب ایجاد شده از طریق ورود عناصر فلزی غیر ضروری به درون سیتوسول را کاهش می‌دهند (Clemens, 2001). (Halloran and Cullota, 2000).

در سطح سلولی، گیاهان طیف وسیعی از مکانیسم‌های بالقوه دارند که احتمالاً در سم‌زدایی مشارکت دارند و تحمل گیاه در تنش فلزات سنگین را موجب می‌شوند. اجزای مهم سیستم‌های هومئوستازی و سم‌زدایی فلزات سنگین مشتمل بر انتقال‌دهنده‌های غشا (Williams et al., 2000) و چاپرون‌های فلزی درون غشایی هستند که جایگاه مهمی در تنظیم غلظت فلزات درون سلول‌ها و اندامک‌های مختلف دارند (Cobbett and Goldsbrough, 2002). (ATP binding) ABC (cassette) ترانسپورترها گروه بزرگ و متنوعی از پروتئین‌های غشایی هستند که به جذب مولکول‌های کوچک مثل پپتیدها، لیپیدها، قندها و فلزات سنگین، تمایل بالایی دارند (Martinoia et al., 2002).

پژوهش‌های مختلف نقش ABC ترانسپورترها در انتقال واکوئلی ترکیبات و سم‌زدایی آن‌ها نشان داده شده است (Rea et al., 1998; Theodoulou, 2000). متالوتیونین‌ها پروتئین‌های دربردارنده تیول و متصل به فلز هستند و در گیاهان در پاسخ به سمیت فلزات ساخته می‌شوند. متالوتیونین‌ها از طریق اتصال فلزات سمی به گروه‌های تیول، آن‌ها را به صورت ناکارآمد و غیر سمی تبدیل می‌کنند (Khan et al., 2000). در پژوهش‌ها بیان شده است که فلزات سنگین از جمله Cu و Cd فعالیت ژن متالوتیونین را در گیاهچه‌های *Festuca rubra* و *Arabidopsis* القا کرده‌اند (Ma et al., 2003).

قارچ‌های میکوریز آربسکولار (AM) بیوتروف‌های اجباری گیاهان عالی و تشکیل‌دهنده وسیع‌ترین گروه از میکروارگانیسم‌های خاک هستند (Barea, 1991). قارچ‌های میکوریز آربسکولار می‌توانند علاوه بر دسترسی آسان به آب موجود در خلل و فرج بسیاری از خاک که دور از دسترس ریشه‌ها هستند و گسترش شبکه ریشه‌ای گیاه با افزایش رشد ریشه و افزایش سطح جذب گیاه با هیف‌های خود، افزایش جذب آب و عناصر غذایی در گیاه همزیست را موجب شوند. در شرایط مقادیر بالای فلزات، قارچ‌های میکوریز به کاهش سمیت فلز در گیاهان قادر هستند (Leyval et al., 2002).

گیاه فستوکا (*Festuca arundinacea* Schreb) در گروه گیاهانی که وزیکول‌های میکوریز آربسکولار دارند، فهرست شده است (Gibson and Newman, 2001). این گیاه یکی از گراس‌های چندساله و سردسیری است که به سبب ویژگی‌هایی مانند توان

خاک‌های آلوده به غلظت‌های مختلف فلز سنگین نیکل.

مواد و روش‌ها

کشت بذر و اعمال تیمار نیکل

برای جوانه‌زنی، بذرهاى ضد عفونی شده گیاه *Festuca arundinacea* به ظروف پتری منتقل شدند. پس از مرحله جوانه‌زنی، دانه‌رست‌های همسن در گلدان‌های پلاستیکی (۲ کیلویی) خاک و شن استریل شده به نسبت ۳ به ۱ و آلوده به ۴ سطح ۰، ۳۰، ۹۰ و ۱۸۰ پی‌پی‌ام نیکل کشت داده شدند و از مایه تلقیح قارچ *Funneliformis intraradices* (تهیه شده از شرکت زیست فناور توران، سمنان) برای تلقیح استفاده شد. انتخاب غلظت‌های کنترل، ۳۰، ۹۰ و ۱۸۰ میلی گرم بر کیلوگرم نیکل با توجه به غلظت‌های معمول و ایجاد کننده سمیت این فلز در گیاهان مشابه انجام شد. برای تهیه این غلظت‌ها مقدار مورد نیاز از ماده $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ در هر کیلوگرم خاک (متناسب با وزن گلدان) محاسبه شد و سپس مقدار به دست آمده در آب مقطر حل شد. محلول به دست آمده روی خاک اسپری و پس از خشک شدن خاک، برای کشت گیاهان استفاده شد. خاک استفاده شده در این بررسی ویژگی‌هایی به این شرح داشت: $\text{pH}=8/08$ ، dS m^{-1} ، $\text{ECe } 0/37$ ، $\text{CEC } 9/7 \text{ cmol (+) Kg}^{-1}$ ، نیتروژن کل $0/071$ درصد، کربن آلی $0/28$ درصد، میزان فسفر، پتاسیم و نیکل به ترتیب $5/2$ ، 162 و 13 پی‌پی‌ام. برای انجام تلقیح قارچی میزان ۲۰ گرم (در هر کیلو خاک) از مایه تلقیح به گلدان‌ها اضافه شد. گلدان‌ها به مدت سه ماه در شرایط کنترل شده در گلخانه (دمای ۲۵ درجه

سازگاری با شرایط مختلف محیطی و تولید بالا، اهمیت ویژه‌ای دارد (Sleper, 1985). از آنجا که این گیاه توانایی بالایی برای تولید علوفه به صورت زراعی و مرتعی دارد، در سال‌های گذشته اهمیت بسیاری یافته است (Khayyam-Nekouei, 2001). با وجود جایگاه مهم قارچ‌های میکوریز در روابط گیاه با فلزات خاک، پیشرفت‌های اندکی در زمینه مکانیسم‌های سلولی و مولکولی کنترل غلظت فلزات سنگین و اجتناب از سمیت آن‌ها در گیاهان میکوریزی ایجاد شده است. قارچ‌های میکوریز بر برخی مکانیسم‌های فیزیولوژیک گیاه مانند اجتناب از جذب یا افزایش توان جذب عناصر فلزی تأثیر دارند (Perotto and Martino, 2001). شواهدی وجود دارد که افزایش بیان ژن‌های انتقال دهنده‌گان عناصر فلزی و همبند کننده‌ها را در گیاهان میکوریزی رشد یافته در خاک‌های آلوده به فلزات سنگین تأیید می‌کند (Gohre and Rivera-Becerril et al., 2005; Paszkowski, 2006; Hildebrandt et al., 2007). در سال‌های گذشته آلودگی نیکل یکی از مهم‌ترین مسائل زیست محیطی در ایران بوده است؛ زیرا در بخش وسیعی از خاک‌های سرپتینی مناطق غربی کشور، میزان نیکل بالا است. بنابراین پژوهش حاضر با هدف بررسی این موارد انجام شده است: اهمیت قارچ‌های میکوریز آربسکولار در کاهش غلظت فلزات سنگین، تأثیر همزیستی قارچ میکوریز آربسکولار *Funneliformis intraradices* بر جذب و عامل انتقال نیکل از ریشه به اندام هوایی، افزایش مقاومت به نیکل، بیان ژن‌های *abc* ترانسپورتر و متالوتیونین در گیاهچه‌های فستوکای تلقیح شده با قارچ و گیاهچه‌های فستوکای بدون قارچ کشت شده در

استخراج RNA و تحلیل Real-time PCR

برای بررسی بیان ژن‌های *abc* و *met* در ریشه‌ها و اندام هوایی گیاهچه‌های باقارچ و بدون قارچ، دو هفته پس از تیمار با غلظت‌های مختلف نیکل از روش Real Time PCR استفاده شد. از آنجا که RNA مولکول ناپایداری است، در این روش ابتدا mRNA استخراج شده از سلول‌ها با استفاده از آنزیم کپی‌برداری معکوس به cDNA تبدیل می‌شود. RNA کل با استفاده از بافر (QIAGEN) QIAzolLysis Reagent از بافت‌های برگ و ریشه استخراج شد. سپس برای اطمینان از حذف کامل DNA ژنومی، نمونه‌های RNA با آنزیم DNaseI تیمار شدند. نمونه‌های استخراج شده RNA که غلظت‌های مختلف داشتند، قبل از استفاده در واکنش سنتز cDNA، همه با آب بدون RNase به یک غلظت استاندارد (۷۸ نانوگرم در میکرولیتر) رقیق شدند. ژن اکتین (با شماره دستیابی AY194227) به عنوان ژن خانه‌دار و ژن‌های هدف *abc* ترانسپورتر (با شماره دستیابی CA820687.1) و متالوتونین (با شماره دستیابی CA820683) با مرور منابع، انتخاب شدند و توالی آن‌ها با جست‌وجو در بانک‌های اطلاعاتی یافت شد (جدول ۱). واکنش سنتز cDNA از RNA‌ها با استفاده از کیت QuantiTect Reverse Transcription انجام شد. الگوی بیان ژن‌ها با استفاده از PCR زمان واقعی (iCycler iQ real-time PCR, Bio-Rad) بررسی شد. میزان بیان ژن با روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه شد (Livak and Schmittgen, 2001). در این روش، میزان بیان ژن‌های هدف بر پایه ژن استاندارد با بیان ثابت نرمال شد، سپس میزان تغییرات بیان ژن در همه تیمارها نسبت به نمونه‌های شاهد سنجیده شد.

سانتیگراد، شدت روشنایی ۳۵۰۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه، دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی، ۸ ساعت تاریکی و رطوبت نسبی حدود ۵۰ درصد، با آبیاری هفته‌ای دوبار) نگهداری شد. قبل از نمونه‌برداری و برای اطمینان از آلودگی قارچی و محاسبه درصد کلونیزاسیون از ریشه‌های تازه، نمونه‌گیری شد و پس از آن برای انجام آزمایش‌های این پژوهش نمونه‌برداری از اندام هوایی و ریشه گیاهچه‌ها انجام شد. ابتدا نمونه‌ها شسته شدند و رطوبت اضافی آن با کاغذ صافی گرفته شد و وزن تر و خشک گیاهچه‌ها بر حسب گرم اندازه‌گیری شد.

سنجش جذب نیکل و عامل انتقال

یک گرم از ریشه و بخش‌های هوایی خشک شده (در آون ۷۰ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت) از هر نمونه وزن شد و به مدت ۵ ساعت در کوره الکتریکی و در دمای ۴۸۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد. خاکستر حاصل، پس از سرد شدن در ۱۰ میلی‌لیتر نیتریک اسید ۱۰ درصد حل شد. پس از صاف کردن، محلول‌ها درون لوله‌های پلاستیکی مخصوص ریخته شد و مقدار جذب نیکل در ریشه و اندام هوایی و عامل انتقال (توانایی گیاه در انتقال نیکل از ریشه به ساقه) آن با دستگاه طیف‌سنج جذب اتمی (مدل GBC 932 plus Australia) تحلیل شد (Reeves et al., 1996). میزان جذب نیکل و عامل انتقال نیکل از روابط ذیل به دست آمد.

رابطه ۱:

وزن خشک بافت × غلظت نیکل = جذب نیکل (ppm)

رابطه ۲:

غلظت نیکل ریشه/غلظت نیکل ساقه = عامل انتقال نیکل

جدول ۱- توالی پرایمرهای استفاده شده در این پژوهش

ژن	توالی پرایمر
<i>Actin</i>	F 5'-CGCCATCCAGGCTGTGCTTTC-3' R 5'-GATGGTGTTCAGCCATACCGTG-3'
<i>abc</i>	F 5'-ACCAGAGAGAATGCGAAAGG-3' R 5'-ACTGGAGGAATCCTCAATAC-3'
<i>met</i>	F 5'-ACATTCCCAAGTCTCACACA-3' R 5'-CTTCAAGATAATTTACAGGGGT-3'

تجزیه و تحلیل آماری

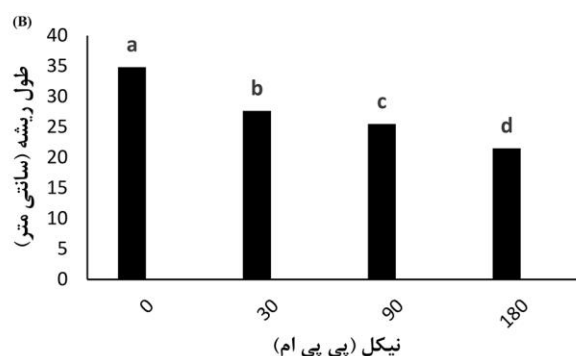
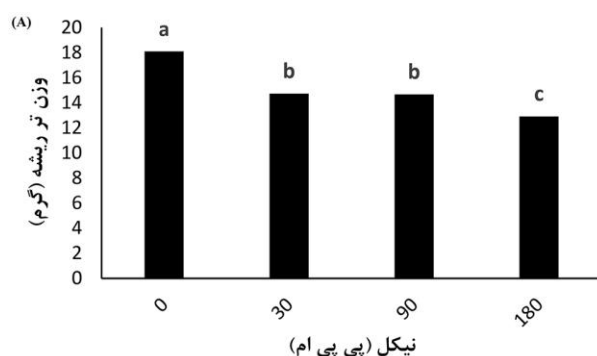
این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در ۳ تکرار اجرا شد. در این حالت، ۴ غلظت نیکل (شاهد، ۳۰، ۹۰ و ۱۸۰ پی پی ام) و دو تیمار قارچ (بامیکوریز و بدون میکوریز) برای عامل‌ها در نظر گرفته شد. تجزیه و تحلیل آماری با نرم‌افزار SAS و MSTATC انجام شد و مقایسه میانگین‌ها با آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) ($P < 0.05$) مشخص شد.

نتایج

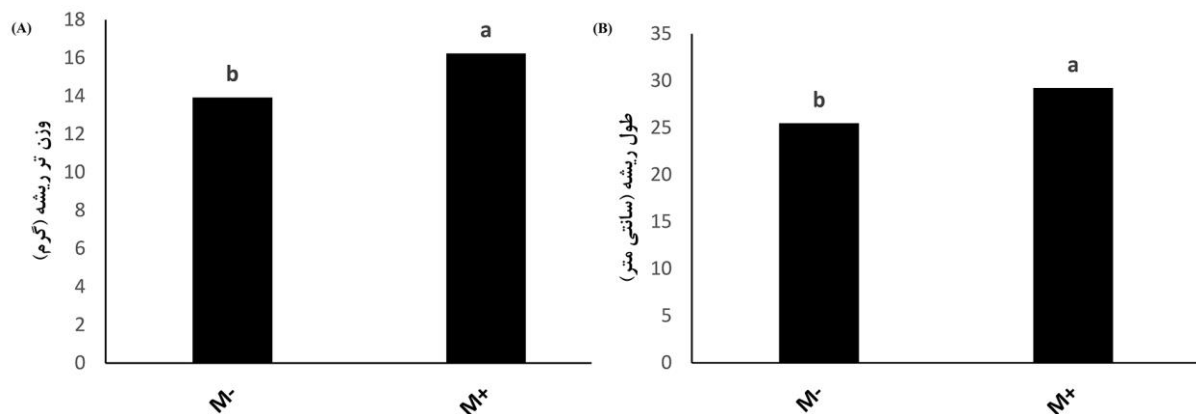
تأثیر نیکل و قارچ بر شاخص‌های رشد گیاه

با افزایش غلظت نیکل در خاک، کاهش معنی‌داری در وزن تر ریشه مشاهده شد و این کاهش برابر ۲۸

درصد بود. کمترین وزن تر ریشه در بالاترین غلظت نیکل (۱۸۰ پی پی ام) مشاهده شد (شکل A-۱). تأثیر قارچ نیز بر وزن تر ریشه معنی‌دار بود. گیاهچه‌های تلقیح شده با قارچ (M+)، ۱۶/۵ درصد افزایش وزن تر نسبت به گیاهچه‌های بدون تلقیح با قارچ (M-) نشان دادند (شکل A-۲). طول ریشه گیاهچه‌های فستوکا در غلظت‌های متفاوت نیکل، تفاوت معنی‌داری نشان داد. افزایش غلظت نیکل در گیاهچه‌های آزمایش شده به کاهش ۳۸ درصدی در طول ریشه منجر شد (شکل B-۱). طول ریشه در گیاهچه‌های تلقیح شده با قارچ، ۱۴/۷ درصد نسبت به گیاهچه‌های بدون تلقیح با قارچ، افزایش نشان داد (شکل B-۲).



شکل ۱- وزن تر (A) و طول (B) ریشه در سطوح مختلف تیمار نیکل در گیاهچه‌های فستوکا. مقادیر میانگین ۳ تکرار $\pm SE$ است. حروف یکسان بیان‌کننده نبودن اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است.



شکل ۲- وزن تر (A) و طول (B) ریشه در سطوح مختلف تیمار نیکل در گیاهچه‌های فستوکا که به صورت میانگین دو سطح با قارچ (M+) و بدون قارچ (M-) ارائه شده است. مقادیر میانگین ۶ تکرار $\pm SE$ است. حروف یکسان نشان‌دهنده نبودن اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است.

M- در تیمار ۹۰ پی‌پی‌ام و ۱۸۰ پی‌پی‌ام نیکل کاهش نشان داد و در تیمار ۳۰ پی‌پی‌ام و شاهد، اختلاف معنی‌داری بین گیاهان M+ و M- مشاهده نشد. با افزایش سطح نیکل خاک، عامل انتقال در گیاهان M- و M+ در مقایسه با شاهد، کاهش نشان داد. همزیستی قارچ با گیاهچه‌های فستوکا در تمام سطوح تیمار نیکل، عامل انتقال را نسبت به گیاهان بدون قارچ کاهش داد (جدول ۲).

تأثیر نیکل و قارچ بر جذب نیکل و عامل انتقال

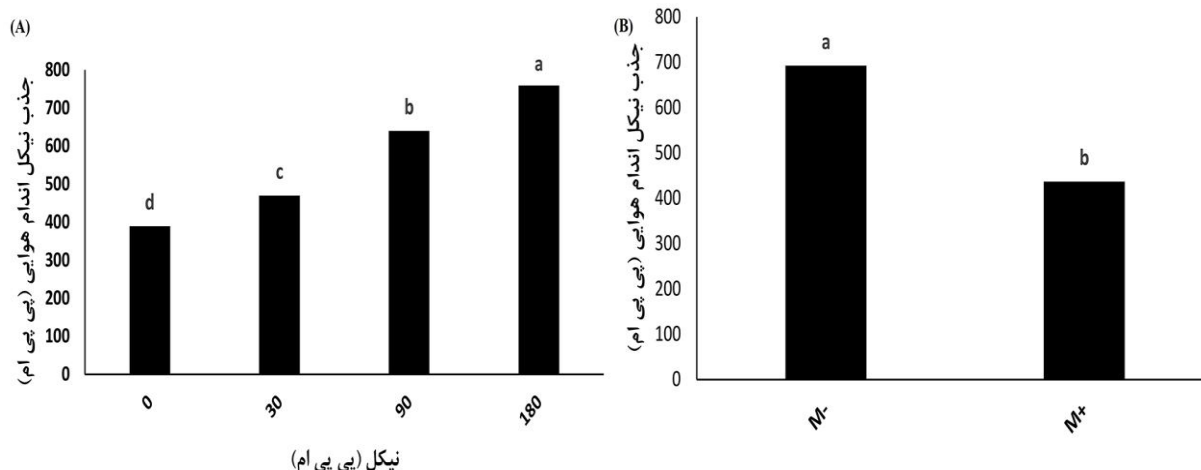
تأثیر متقابل نیکل و قارچ بر جذب نیکل ریشه و عامل انتقال، معنی‌دار بود. جذب نیکل ریشه در گیاهان M+ و M- با افزایش غلظت نیکل خاک، روند افزایشی معنی‌داری نشان داد؛ به طوری که در گیاهان M+ و M- جذب نیکل ریشه در تیمار ۱۸۰ پی‌پی‌ام به ترتیب ۲/۶ و ۵/۷ برابر نسبت به شاهد، افزایش نشان داد. جذب نیکل ریشه در گیاهان M+ نسبت به گیاهان

جدول ۲- اثر متقابل نیکل و قارچ بر جذب نیکل ریشه و عامل انتقال در فستوکا. حروف متفاوت، اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ را نشان می‌دهد.

عامل انتقال		جذب نیکل ریشه (ppm)		قارچ نیکل
M-	M+	M-	M+	
۱/۸۳ ^a	۰/۷۹ ^c	۵۳۶/۴۴ ^e	۵۸۴/۶۲ ^e	۰
۰/۸۷ ^b	۰/۷۳ ^c	۱۲۲۷/۱۸ ^d	۱۰۴۳/۱ ^d	۳۰
۰/۷۳ ^c	۰/۶۱ ^d	۲۴۱۵/۵۳ ^b	۱۲۰۹/۶ ^d	۹۰
۰/۶۲ ^d	۰/۵ ^e	۳۰۵۷/۷۵ ^a	۱۵۷۷/۹ ^c	۱۸۰

هوایی، ۲ برابر نسبت به شاهد افزایش نشان داد. میزان جذب نیکل اندام هوایی در گیاهچه‌های تلقیح شده با قارچ *F. intraradices* نسبت به گیاهچه‌های تلقیح نشده، ۳۷ درصد کاهش نشان داد (شکل ۳، A و B).

تأثیر متقابل نیکل و قارچ بر جذب نیکل اندام هوایی معنی دار نبود. میزان جذب نیکل اندام هوایی با افزایش غلظت نیکل خاک، روند افزایشی معنی داری نشان داد؛ به طوری که در بالاترین غلظت نیکل خاک (۱۸۰ ppm) میزان جذب نیکل اندام

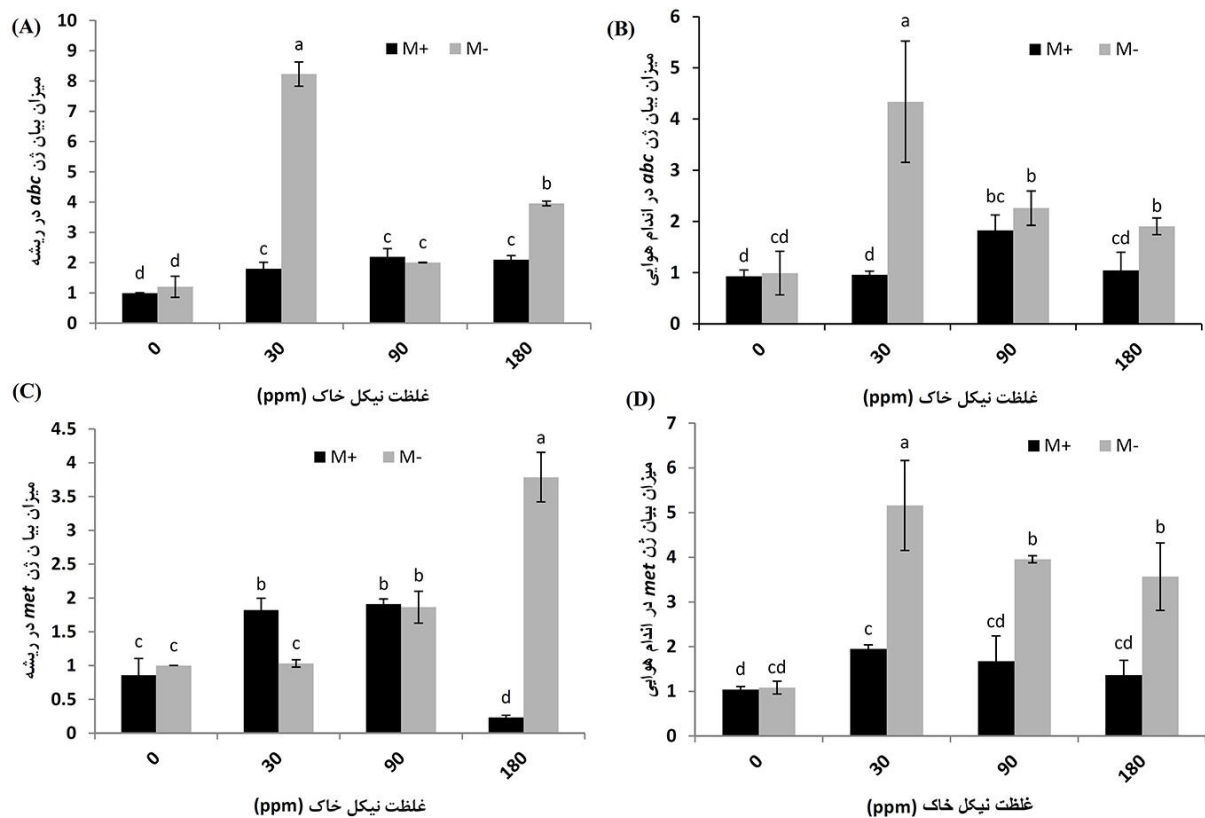


شکل ۳- تأثیر نیکل (A) و قارچ *F. intraradices* که به صورت میانگین در سطوح مختلف نیکل ارائه شده است (B) بر غلظت نیکل اندام هوایی در فستوکا. مقادیر به ترتیب میانگین ۶ و ۱۲ تکرار \pm SE است. حروف یکسان نشان دهنده نبودن اختلاف معنی دار در سطح ۰/۰۵ است.

میزان بیان ژن *met* در ریشه گیاهچه‌های فستوکای بلند بدون قارچ *F. intraradices* فقط در تیمارهای ۹۰ و ۱۸۰ پی پی ام، نسبت به شاهد، افزایش نشان داد. میزان بیان ژن *met* در ریشه گیاهچه‌های فستوکا تلقیح شده با قارچ در تیمار ۹۰ پی پی ام نیکل افزایش و در تیمار ۱۸۰ ppm در مقایسه با شاهد، کاهش نشان داد. میزان بیان این ژن در اندام هوایی گیاهچه‌های فستوکای بدون قارچ نیز افزایش معنی داری با شاهد نشان داد. در گیاهچه‌های تلقیح شده با قارچ، میزان بیان ژن *met* در اندام هوایی تفاوت معنی داری با شاهد، نشان نداد (شکل D و C-۴).

تأثیر نیکل و قارچ بر بیان ژن‌های *abc* و *met*

در ریشه گیاهچه‌های M- افزایش معنی داری در بیان ژن *abc* در غلظت‌های مختلف نیکل در مقایسه با گیاهچه‌های شاهد مشاهده شد. در گیاهچه‌های M+، میزان بیان ژن *abc* ریشه در تمام تیمارهای نیکل نسبت به شاهد، افزایش نشان داد، ولی بیان ژن *abc* در اندام هوایی گیاهچه‌های M+ در غلظت‌های مختلف نیکل در مقایسه با شاهد، اختلاف معنی داری نشان نداد. در اندام هوایی گیاهچه‌های M- نیز در تنش نیکل، بیان ژن *abc* تفاوت معنی با گیاهچه‌های شاهد نشان داد (شکل B و A-۴)



شکل ۴- بیان نسبی ژن‌های *abc* (A, B) و *met* (C, D) در ریشه و اندام هوایی گیاهچه‌های تلقیح‌نشده با قارچ (M-) و تلقیح‌شده با قارچ (M+) فستوکای تیمار شده با غلظت‌های مختلف نیکل. مقادیر میانگین ۳ تکرار \pm SE است. حروف یکسان، نشان‌دهنده نبودن اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است.

مقاومت گیاه به تنش فلزات سنگین است (Gohre and Paszkowski, 2006). Latef (۲۰۱۱) بیان کرده است که تلقیح قارچی، افزایش زیست توده گیاهان فلفل میکوریزی را در تنش مس در مقایسه با گیاهان غیر میکوریزی باعث شده است. کلونیزاسیون قارچی (۵۷ درصد) موفقیت آمیزی در گیاهچه‌های فستوکای تلقیح‌شده با قارچ مشاهده شد. همزیستی قارچ با گیاهچه‌های فستوکا در تمام سطوح تیمار نیکل، وزن تر و طول ریشه را نسبت به گیاهان بدون قارچ افزایش داد که تأییدی بر برقراری کلونیزاسیون قارچی و کارایی قارچ میکوریز استفاده‌شده در این پژوهش است.

بحث

در مطالعات قبلی، کاهش رشد گیاهان در اثر فلزات سنگین و به‌ویژه نیکل گزارش شده است (Doubkova and Sudova, 2014; Amir et al., 2013; Tavakoli et al., 2011). با افزایش غلظت نیکل در خاک، وزن تر و طول ریشه گیاهچه‌های فستوکا کاهش معنی‌داری نشان دادند. غلظت‌های سمی نیکل از طریق تغییر در ساختار غشای سلول‌های ریشه و کاهش سطوح جذب‌کننده آب به کاهش پتانسیل آب گیاه منجر شد و با تأثیر منفی که بر فرایندهای فیزیولوژیک گیاه دارد، کاهش رشد گیاه را به دنبال داشت (Fuentes et al., 2007). مشخص شده است که همزیستی میکوریزی، عامل اصلی در

محدود می‌شود. آن‌ها بیان کردند که قارچ‌های میکوریزی از طریق تجمع فلزات در میسلیم‌های خود، آن‌ها را جدا می‌کنند. با وجود این پژوهشگران دیگر نتایج متناقضی از تأثیر مثبت قارچ میکوریز بر جذب و انتقال نیکل گزارش کرده‌اند (Lagrange *et al.*, 2011; Turnau and Mesjasz-Przybylowicz, 2003).

یکی از مکانیسم‌های سم‌زدایی فلزات سنگین در گیاهان و ارگانسیم‌های دیگر به کاربردن ترکیبات کلات‌کننده (همیندکننده) نظیر متالوتیونین و فیتوکلاتین‌ها و ناقلین فلزات سنگین از جمله ABC ترانسپورترها است (Song *et al.*, 2004). Kim و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند که بیان *AtPDR8* در ریشه‌های آراییدوپسیس، مقاومت گیاه در برابر تنش کادمیوم را باعث می‌شود. Clemens (۲۰۰۱) نشان داد بیان بیش از حد ژن‌های *MT1* و *MT2*، افزایش تحمل گیاهان به کادمیوم را موجب می‌شود. القای بیان ژن *met* توسط مس در دو گیاه آراییدوپسیس (Murphy and Taiz, 1995) و *Silene vulgaris* (VanHoof *et al.*, 2001) نشان داده شده است. در این بررسی، بیان ژن‌های *abc* ترانسپورتر و متالوتیونین در ریشه‌ها در غلظت‌های مختلف نیکل افزایش یافت. به طور مشابه در اندام هوایی نیز بیان رونوشت‌های هر دو ژن، تغییر معنی‌داری را در مقایسه با شاهد نشان دادند. نتایج این پژوهش نشان داد که بیان هر دو ژن *abc* و *met* در ریشه گیاهان M+ در مقایسه با گیاهچه‌های شاهد، افزایش داشته است، ولی میزان بیان هر دو ژن در ریشه و همچنین اندام هوایی در مقایسه با گیاهان M- کمتر است. علت کاهش بیان ژن *met* در بالاترین غلظت

یکی از معیارهای ارزیابی میزان استخراج عناصر از خاک، جذب فلزات توسط گیاه است که میزان این شاخص از حاصل ضرب غلظت عنصر در میزان ماده خشک گیاه به دست می‌آید. از جمله دلایل بیشتر بودن جذب نیکل در ریشه گیاهان در مقایسه با اندام هوایی این است که ریشه به صورت سدّی در برابر فلزات سنگین عمل می‌کند و از انتقال فلزات سنگین به اندام هوایی گیاه جلوگیری می‌کند (Bonnet *et al.*, 2000). نتایج پژوهش حاضر نشان داد که با افزایش سطح نیکل خاک، جذب نیکل موجود در ریشه و اندام هوایی گیاهان M+ و M- افزایش یافت. Soleimani و همکاران (۲۰۰۹) نشان دادند هنگامی که محتوای نیکل خاک از ۵۰ تا ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم افزایش می‌یابد، انباشت نیکل در ریشه‌های فسکیوی بلند نیز افزایش می‌یابد و این نشان‌دهنده ظرفیت بالای این گیاه برای انباشت نیکل در ریشه‌ها است. همچنین آنها بیان کردند که جذب نیکل ساقه در گیاهان *Cynodon dactylon* و *F. arundinacea* با افزایش غلظت نیکل خاک افزایش می‌یابد.

پژوهش‌های قبلی نشان دادند که تلقیح قارچی می‌تواند تحمل گیاه به تنش نیکل را از طریق کاهش انباشتگی فلز و انتقال به اندام هوایی افزایش دهد (Amir *et al.*, 2013; Vivas *et al.*, 2006). در پژوهش حاضر از انتقال نیکل از ریشه‌ها به اندام هوایی با قارچ *F. intraradices* جلوگیری شد و این شاخص در تمام غلظت‌های نیکل، کاهش نشان داد. Hildebrandt و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند که گیاهان میکوریزی، فلزات سمّی را در ریشه‌های خود نگهداری می‌کنند؛ در نتیجه انتقال فلز به اندام هوایی

ورود نیکل به ریشه‌ها و انتقال نیکل به ریشه‌ها با قارچ میکوریز ممانعت شده است؛ بنابراین با کاهش عامل انتقال نیکل به اندام هوایی، میزان بیان ژن‌ها در اندام هوایی گیاهچه‌های فستوکا در اثر ناکافی بودن سطح نیکل تغییری پیدا نکرده است. به نظر می‌رسد که کاهش در انتقال نیکل از ریشه‌ها به اندام هوایی در گیاهچه‌های میکوریزی به سبب فعال‌سازی مکانیسم‌های جذب نیکل در ریشه نظیر کلاته کردن و مصادره (sequestration) آن در واکوئل باشد.

نتایج پژوهش حاضر، اهمیت کلونیزاسیون قارچ میکوریز *F. intraradices* را در کاهش انتقال نیکل از ریشه به ساقه در گیاهچه‌های فستوکا و کاهش اثرات تنش نیکل را نشان می‌دهد.

سپاسگزاری

این پروژه با حمایت معاونت پژوهشی دانشگاه شهرکرد انجام شده است که در این جا از ایشان سپاس‌گزاری می‌شود. همچنین نویسندگان مقاله از قطب تنش‌های گیاهی دانشگاه اصفهان سپاس‌گزاری می‌کنند.

نیکل ممکن است به افزایش فعالیت آنزیم‌های ریونوکلئاز در پاسخ به انباشتگی فلزات سنگین مربوط باشد (Gopal and Rizvi, 2008). با توجه به تأثیر حضور قارچ در ریشه‌های گیاهان M+ بر کاهش تجمع نیکل در ریشه‌ها و اندام هوایی، بیان کمتر ژن‌های ذکر شده دخالت کمتر آنها را در سم‌زدایی نیکل در این گیاهچه‌ها در مقایسه با انواع M- را نشان می‌دهد. کلونیزاسیون گیاه با قارچ‌های میکوریز آربسکولار، تنش تحریک شده با فلزات سنگین را کاهش می‌دهد. کلونیزاسیون با این قارچ‌ها روی بیان چند ژن گیاه که شاید در تحمل یا سم‌زدایی فلزات سنگین دخالت دارند، تأثیر زیادی دارد. Cicatelli و همکاران (۲۰۱۰) نشان دادند در گیاهان *Populus alba* تلقیح شده با قارچ‌های میکوریز آربسکولار، بیان متالوتیونین حدود ۲ تا ۴ برابر در مقایسه با گیاهان غیر میکوریزی افزایش یافته است. Rivera-Becerril (۲۰۰۵) نشان داد رونوشت‌های PsMTA در ریشه‌های کلونیزه شده گیاه *Pisum sativum* با قارچ *F. intraradices* در حضور کادمیوم به مقدار زیادی افزایش یافت. بنابراین به نظر می‌رسد که گیاهان تلقیح شده با قارچ، مکانیسم‌های مولکولی متفاوتی برای سازگاری با تنش فلزات سنگین دارند. با توجه به نتایج این پژوهش، مشخص شد که از

منابع

- Amir, H., Lagrange, A., Hassaine, N. and Cavaloc, Y. (2013) Arbuscular mycorrhizal fungi from New Caledonian ultramafic soils improve tolerance to nickel of endemic plant species. *Mycorrhiza* 23: 585-595.
- Barea, J. M. (1991) Vesicular-arbuscular mycorrhizae as modifiers of soil fertility. In: *Advances in soil science* (Ed. Stewart, B. A.) 1-40 Springer, New York.
- Bonnet, M., Camares, O. and Veisseir, P. (2000) Effects of zinc and influence of *Acremonium lolii* on growth parameters, chlorophyll a fluorescence and antioxidant enzyme activities of ryegrass (*Lolium perenne* L. cv Apollo). *Journal of Experimental Botany* 51: 945-953.

- Cicatelli, A., Lingua, G., Todeschini, V., Biondi, S., Torrigiani, P. and Castiglione, S. (2010) Arbuscular mycorrhizal fungi restore normal growth in a white poplar clone grown on heavy metal-contaminated soil, and this is associated with upregulation of foliar metallothionein and polyamine biosynthetic gene expression. *Annals of Botany* 106: 791-802.
- Clemens, S. (2001) Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta* 212: 475-486.
- Cobbett, C. S. and Goldsbrough, P. (2002) Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annual Review of Plant Biology* 53: 159-182.
- Doubkova, P. and Sudova, R. (2014) Nickel tolerance of serpentine and non-serpentine *Knautia arvensis* plants as affected by arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza* 24: 209-217.
- Fuentes, D., Disante, K. B., Valdecantos, A., Cortina, J. and Ramón Vallejo, V. (2007) Response of *Pinus halepensis* Mill. Seedlings to biosolids enriched with Cu, Ni and Zn in three Mediterranean forest soils. *Environmental Pollution* 145: 316-323.
- Gibson, D. J. and Newman J. A. (2001) *Festuca arundinacea* Schreber (*F. elatior* L. SPP. *arundinacea*) Schreber (Hackel). *Journal of Ecology* 89: 304-324.
- Gohre, V. and Paszkowski, U. (2006) Contribution of the arbuscular mycorrhizal symbiosis to heavy metal phytoremediation. *Planta* 223: 1115-1122.
- Gopal, R. and Rizvi, A. H. (2008) Excess lead alters growth, metabolism and translocation of certain nutrients in radish. *Chemosphere* 70:1539-1544.
- Halloran, T. V. and Cullota, V. C. (2000) Metallochaperones, an intracellular shuttle service for metal ions. *Journal of Biological Chemistry* 275: 25057-25060.
- Hildebrandt, U., Regvar, M. and Bothe, H. (2007) Arbuscular mycorrhiza and heavy metal tolerance. *Phytochemistry* 68:139-146.
- Khan, A., Kuek, C., Chaudhry, T., Khoo, C. and Hayes, W. (2000) Role of plants, mycorrhizae and phytochelators in heavy metal contaminated land remediation. *Chemosphere* 41: 197-207.
- Khayyam-Nekouei, M. (2001) Germplasm collection and molecular detection of endophytic fungi in iranian tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb). Ph. D. thesis, University of Putra, Malaysia.
- Kim, D. Y., Bovet, L., Maeshima, M., Martinoia, E. and Lee, Y. (2007) The ABC transporter *AtPDR8* is a cadmium extrusion pump conferring heavy metal resistance. *Plant Journal* 2: 207-218.
- Lagrange, A., Ducouso, M., Jourand, P., Majorel, C. and Amir, H. (2011) New insights into the mycorrhizal status of Cyperaceae from ultramafic soils in New Caledonia. *Canadian Journal of Microbiology* 57: 21-28.
- Latef, A. A. H. A. (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
- Leyval, C., Joner, E. J. and Val, C. (2002) Potential of arbuscular mycorrhizal fungi for bioremediation. In: *Mycorrhizal technology in agriculture* (Eds. Gianinazzi, S., Schuepp, H., Barea, J. M., Haselwandter, K.) 175-186. Birkhauser, Basel.
- Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 25: 402-408.

- Ma, M., Lau, P. S., Jia, Y. T., Tsang, W. K., Lam, S. K., Tam, N. F. and Wong, Y. S. (2003) The isolation and characterization of Type 1 metallothionein (MT) cDNA from a heavy-metal-tolerant plant, *Festuca rubra* cv, Merlin. *Plant Science* 164: 51-60.
- Martinoia, E., Klein, M., Geisler, M., Bovet, L., Forestier, C., Kolukisaoglu, C., Muller-rober, B. and Schuls, B. (2002) Multifunctionality of plant ABC transporters more than just detoxifiers. *Planta* 214: 345-355.
- Murphy, A. and Taiz, L. (1995) Comparison of metallothionein gene expression and nonprotein thiols in ten *Arabidopsis* ecotypes (correlation with copper tolerance). *Plant Physiology* 109: 945-954.
- Perotto, S. and Martino, E. (2001) Molecular and cellular mechanisms of heavy metal tolerance in mycorrhizal fungi: what perspectives for bioremediation? *Minerva Biotechnology* 13: 55-63.
- Rea, P. A., Li, Z. S., Lu, Y. P., Drozdowicz, Y. M. and Martinoia, E. (1998) From vacuolar GS-X pumps to multi specific ABC transporters. *Annual Review of Plant Biology* 49: 727-760.
- Reeves, R., Baker, A., Bgrhidi, A. and Berazain, R. (1996) Nickel-accumulating plants from the ancient serpentine soils of Cuba. *New Phytologist* 133: 217-224.
- Rivera-Becerril, F., van Tuinen, D., Martin-Laurent, F., Metwally, A., Dietz, K. J., Gianinazzi, S. and Gianinazzi-Pearson, V. (2005) Molecular changes in *Pisum sativum* L. roots during arbuscular mycorrhiza buffering of cadmium stress. *Mycorrhiza* 16: 51-60.
- Sleper, D. A. (1985) Breeding tall fescue. *Plant breed* 3: 313-342.
- Soleimani, M., Hajabbasi, M., Afyuni, M., Charkhabi, A. and Shariatmadari, H. (2009) Bioaccumulation of nickel and lead by Bermuda grass (*Cynodon dactylon*) and tall fescue (*Festuca arundinacea*) from two contaminated soils. *Caspian Journal of Applied Sciences Research* 7: 59-70.
- Song, J., Zhao, F. J., Luo, Y. M., Mcgrath, S. P. and Zhang, H. (2004) Copper uptake by *Elsholtzia splendens* and *Silene vulgaris* and assessment of copper phytoavailability in contaminated soils. *Environmental Pollution* 128: 307-315.
- Tavakoli, M., Chehregani rad, A., Lari Yazdi, H. and Pakdel, A. (2011) Study on the effects of different concentrations of Pb and salicylic acid on some growth factors in eggplant (*Solanum melongena* L.). *Iranian Journal of Plant Biology* 3(7): 29-40. (in Persian)
- Theodoulou, F. L. (2000) Plant ABC transporters. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes* 1465: 79-103.
- Turnau, K. and Mesjasz-Przybylowicz, J. (2003) Arbuscular mycorrhiza of *Berkheya codii* and other Ni-hyperaccumulating members of Asteraceae from ultramafic soils in South Africa. *Mycorrhiza* 13: 185-190.
- Van Hoof, N., Hassinen, V. H., Hakvoort, H. W. J., Ballintijn, K. F., Schat, H., Verkleij, J. A. C., Ernst, W. H. O., Karenlampi, S. O. and Tervahauta, A. I. (2001) Enhanced copper tolerance in *Silene vulgaris* (Moench) Garcke populations from copper mines is associated with increased transcript levels of a 2b-type metallothionein gene. *Plant Physiology* 126: 1519-1526.
- Vivas, A., Biró, B., Németh, T., Barea, J. M. and Azcón, R. (2006) Nickel-tolerant *Brevibacillus brevis* and arbuscular mycorrhizal fungus can reduce metal acquisition and nickel toxicity effects in plant growing in nickel supplemented soil. *Soil Biology and Biochemistry* 38: 2694-2704.
- Williams, L. E., Pittman, J. K. and Hall, J. L. (2000) Emerging mechanisms for heavy metal transport in plants. *Biochimica et Biophysica Acta* 1465: 104-126.

Survey of ABC transporter and metallothionein genes expressions in tall fescue inoculated with *Funneliformis intraradices* under Nickel toxicity

Leila Shabani * and Massomeh Rafiei-Demneh

Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

Abstract

In plants, there are complex network of transport, chelation, and sequestration processes that functions in maintaining concentrations of essential metal ions in different cellular compartments, thus minimizing the damage caused by entry of non-essential metal ions into the cytosol. In the presence of toxic ones, arbuscular mycorrhizal (AM) fungi are able to alleviate metal toxicity in the plant. In this study the effect of an arbuscular mycorrhizal fungi *Funneliformis intraradices* on growth, Nickel tolerance, and ABC transporter and metallothionein expression in leaves and roots of tall fescue (*Festuca arundinacea*) plants cultivated in Ni polluted soil were evaluated. The fungi infected (M+) and uninfected (M-) fescue plants were cultivated in soil under different Ni concentrations (0, 30, 90 and 180 ppm) for 3 months. Results demonstrated the positive effect of fungi colonization on the increase in growth and reduction in Ni uptake (90 and 180 ppm) and Ni translocation from roots to shoot of tall fescue under Ni stress. The results also demonstrated that the level of ABC transporter and metallothionein transcripts accumulation in roots was considerably higher for both M- and M+ plants compared to the control. Also, M+ plants showed less ABC and MET expression compared to the M- plants. These results demonstrated the importance of mycorrhizal colonization of *F. intraradices* in reduction of Ni transport from root to shoot of tall fescue which alleviates Ni-induced stress.

Key words: ABC transporter, *Festuca arundinacea*, *Funneliformis intraradices*, Metallothionein, Mycorrhiza, Nickel.

* shabani-l@sci.sku.ac.ir