زیست‌شناسی گیاهی ایران، سال هشتم، شماره بیست و نهم، پاییز ۱۳۹۵، صفحه ۶۵-۷۶
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۴/۱۰/۳۰
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۵/۰۲/۰۴
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۵/۰۳/۲۹
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۵/۰۶/۰۹
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۵/۰۶/۱۴

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، دانشکدهٔ علوم، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

چکیده

در گیاهان، شبکهٔ پیچیده‌ای از فرایندهای انتقال وجود دارد که در حفظ غلظت یون‌های فلزی ضروری در کده‌های سلولی مختلف عمل می کنند و بنابراین آسیب ایجادشده از طریق ورود عناصر به درون سیتوسول را کاهش می‌دهند. قارچ های 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، تحمّل 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 مدّت 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) گیاهچه های فستوکا در تنش نیکل نشان داد. نتایج نشان‌دهندهٔ تأثیر نیکل بر افزایش بیان هر دو ژن *abc* و *met* در ریشهٔ 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، اهمّیت 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*.

* نگارنده مسؤول: نشانی پست الکترونیک: shabani-l@sci.sku.ac.ir، شماره تماس: ۰۳۸۱۳۲۳۲۴۴۰۵

Copyright©2016, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

مقدمه

یون‌های فلزات سنگین نظیر آهن، مس، روی، کبالت یا نیکل ریزمغذی‌های ضروری هستند که در فعّالیت‌های 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 بسیارسمی کادمیوم، سرب، جیوه و سایر فلزات که عموماً غیرضروری هستند، قرار می‌گیرند. در گیاهان، شبکهٔ پیچیده‌ای از فرایندهای انتقال موجود است که در حفظ غلظت یون‌های فلزی ضروری در کده‌های سلولی مختلف عمل می‌کنند و بنابراین آسیب ایجادشده 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 تحمّل 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 مهمّی در تنظیم غلظت فلزات درون سلول‌ها و اندامک‌های مختلف دارند (Cobbett and Goldsbrough, 2002). ABC (ATP binding cassette) ترانسپورترها گروه بزرگ و متنوّعی از پروتئین‌های غشایی هستند که به جذب مولکول‌های کوچک مثل پپتیدها، لیپیدها، قندها و فلزات سنگین، تمایل بالایی دارند (Martinoia *et al*., 2002). در پژوهش‌های مختلف نقش ABC ترانسپورترها در انتقال واکوئلی ترکیبات و سم‌زدایی آن‌ها نشان داده شده است (Rea *et al*., 1998؛Theodoulou, 2000). متالوتیونین‌ها پروتئین‌های دربردارندهٔ تیول و متّصل به فلز هستند و در گیاهان در پاسخ به سمیت فلزات ساخته می‌شوند. متالوتیونین‌ها از طریق اتّصال فلزات سمی به گروه‌های تیول، آن‌ها را به صورت ناکارامد و غیر سمّی تبدیل می‌کنند (Khan *et al*., 2000). در پژوهش‌ها بیان شده است که فلزات سنگین از جمله Cu و Cd فعّالیت ژن متالوتیونین را در گیاهچه‌های *Festuca rubra* و *Arabidopsis* القا کرده‌اند (Ma *et al*., 2003).

قارچ‌های میکوریز آربسکولار (AM) بیوتروف‌های اجباری گیاهان عالی و تشکیل‌دهندهٔ وسیعترین گروه از میکروارگانیسم‌های خاک هستند (Barea, 1991). قارچ‌های میکوریز آربسکولار می‌توانند علاوه بر دسترسی آسان به آب موجود در خلل و فرج بسیارریز خاک که دور از دسترس ریشه‌ها هستند و گسترش شبکهٔ 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

سازگاری با شرایط مختلف محیطی و تولید بالا، اهمّیت ویژه‌ای دارد (Sleper, 1985). از آن‌جا که این گیاه توانایی بالایی برای تولید علوفه به صورت زراعی و مرتعی دارد، در سال‌های گذشته اهمّیت بسیاری یافته است (Khayyam-Nekouei, 2001). با وجود جایگاه مهم قارچ‌های میکوریز در روابط گیاه با فلزات خاک، پیشرفت‌های اندکی در زمینهٔ 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 انتقال‌دهندگان عناصر فلزی و همبندکننده‌ها را در گیاهان میکوریزی رشدیافته 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 زیست‌محیطی در ایران بوده است؛ زیرا در بخش وسیعی از خاک‌های سرپنتینی مناطق غربی کشور، میزان نیکل بالا است. بنابراین پژوهش حاضر با هدف بررسی این موارد انجام شده است: اهمّیت 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 تلقیح‌شده با قارچ و گیاهچه‌های فستوکای بدون قارچ کشت‌شده در خاک‌های آلوده به غلظت‌های مختلف فلز سنگین نیکل.

مواد و روش‌ها

کشت بذر و اعمال تیمار نیکل

برای جوانه‌زنی، بذرهای ضدّعفونی‌شدهٔ گیاه *Festuca arundinacea* به ظروف پتری منتقل شدند. پس از مرحلهٔ جوانه‌زنی، دانه‌رست‌های همسن در گلدان‌های پلاستیکی (۲ کیلویی) خاک و شن استریل‌شده به نسبت ۳ به ۱ و آلوده به ۴ سطح ۰، ۳۰، ۹۰ و ۱۸۰ پی‌پی‌ام نیکل کشت داده شدند و از مایهٔ تلقیح قارچ *Funneliformis intraradices* (تهیّه‌شده از شرکت زیست فناور توران، سمنان) برای تلقیح استفاده شد. انتخاب غلظت‌های کنترل، ۳۰، ۹۰ و ۱۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نیکل با توجّه به غلظت‌های معمول و ایجادکنندهٔ سمیت این فلز در گیاهان مشابه انجام شد. برای تهیّه این غلظت‌ها مقدار مورد نیاز از مادهٔ $NiCl_2$- 6H2O در هر کیلوگرم خاک (متناسب با وزن گلدان) محاسبه شد و سپس مقدار به‌دست‌آمده در آب مقطر حل شد. محلول به‌دست‌آمده روی خاک اسپری و پس از خشک‌شدن خاک، برای کشت گیاهان استفاده شد. خاک استفاده‌شده در این بررسی ویژگی‌هایی به این شرح داشت: pH=۸/۰۸، $dS\ m^{-1}$ ECe ۰/۳۷، CEC ۹/۷ cmol (+) Kg^{-1}، نیتروژن کل ۰/۰۷۱ درصد، کربن آلی ۰/۲۸ درصد، میزان فسفر، پتاسیم و نیکل به‌ترتیب ۵/۲، ۱۶۲ و ۱۳ پی‌پی‌ام. برای انجام تلقیح قارچی میزان ۲۰ گرم (در هر کیلو خاک) از مایهٔ تلقیح به گلدان‌ها اضافه شد. گلدان‌ها به مدّت سه ماه در شرایط کنترل‌شده در گلخانه (دمای ۲۵ درجهٔ

سانتیگراد، شدّت روشنایی ۳۵۰۰ میکرومول فوتون بر متر مربّع بر ثانیه، دورهٔ 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 محاسبهٔ درصد کلونیزاسیون از ریشه‌های تازه، نمونه‌گیری شد و پس از آن برای انجام آزمایش‌های این پژوهش نمونه‌برداری از اندام هوایی و ریشهٔ 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 اندازه گیری شد.

سنجش جذب نیکل و عامل انتقال

یک گرم از ریشه و بخش‌های هوایی خشک‌شده (در آون ۷۰ درجهٔ سانتیگراد به مدّت ۴۸ ساعت) از هر نمونه وزن شد و به مدّت ۵ ساعت در کورهٔ الکتریکی و در دمای ۴۸۰ درجهٔ سانتیگراد قرار داده شد. خاکستر حاصل، پس از سردشدن در ۱۰ میلی‌لیتر نیتریک اسید ۱۰ درصد حل شد. پس از صاف‌کردن، 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.

رابطهٔ ۱:

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

رابطهٔ ۲:

غلظت نیکل ریشه/غلظت نیکل ساقه = عامل انتقال نیکل

استخراج RNA و تحلیل Real-tim 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 استخراج‌شده از سلول‌ها با استفاده از آنزیم کپی‌برداری معکوس به cDNA تبدیل می‌شود. RNA کل با استفاده از بافر QIAzolLysis Reagent (QIAGEN) از بافت‌های برگ و ریشه استخراج شد. سپس برای اطمینان از حذف کامل DNA ژنومی، نمونه‌های RNA با آنزیم DNaseI تیمار شدند. نمونه‌های استخراج‌شدهٔ 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 شمارهٔ دستیابی AY194227) به عنوان ژن خانه‌دار و ژن‌های هدف *abc* ترانسپورتر (با شمارهٔ دستیابی CA820687.1) و متالوتیونین (با شمارهٔ دستیابی CA820683) با مرور منابع، انتخاب شدند و توالی آن‌ها با جست‌وجو در بانک‌های اطّلاعاتی یافت شد (جدول ۱). واکنش سنتز cDNA از RNA ها 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 پایهٔ ژن استاندارد با بیان ثابت نرمال شد، سپس میزان تغییرات بیان ژن در همهٔ تیمارها نسبت به نمونه‌های شاهد سنجیده شد.

جدول ۱- توالی پرایمرهای استفاده‌شده در این پژوهش

ژن	توالی پرایمر
Actin	F 5'-CGCCATCCAGGCTGTGCTTTC-3'
	R 5'-GATGGTGTCAGCCATACCGTG-3'
abc	F 5'-ACCAGAGAGAATGCGAAAGG-3'
	R 5'-ACTGGAGGAATCCTCAATAC-3'
met	F 5'-ACATTCCCAAGTCTCACACA-3'
	R 5'-CTTCAAGATAATTTACAGGGGT-3'

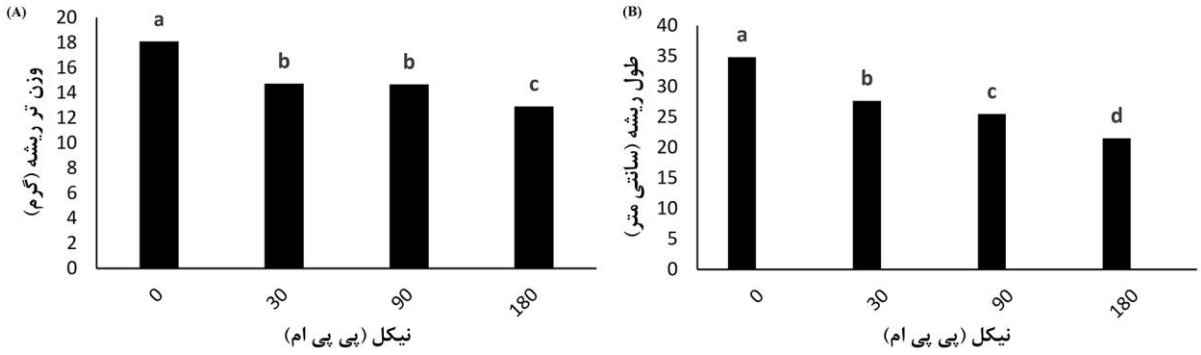
تجزیه و تحلیل آماری

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 پی‌پی‌ام) 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 مقایسهٔ میانگین‌ها با آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) (P<۰/۰۵) مشخّص شد.

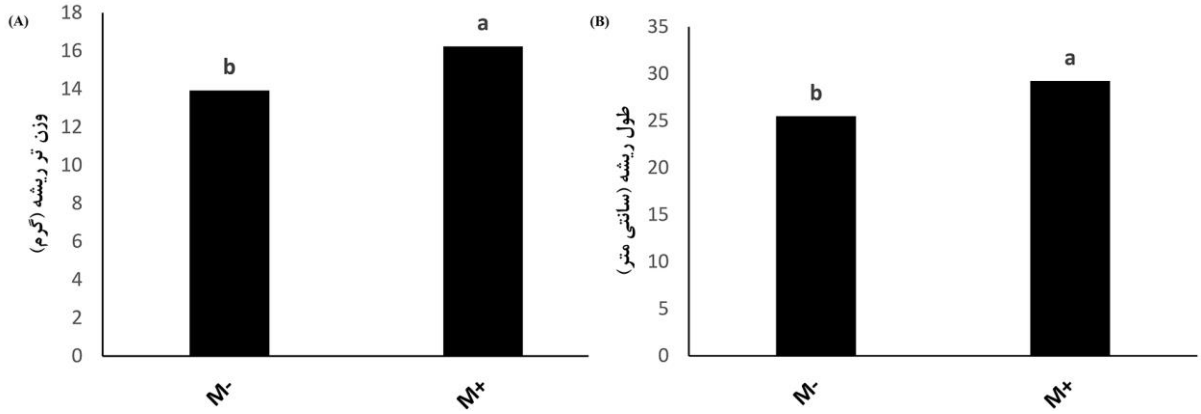
نتایج

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 پی‌پی‌ام) مشاهده شد (شکل A-۱). تأثیر قارچ نیز بر وزن تر ریشه معنی‌دار بود. گیاهچه‌های تلقیح‌شده با قارچ (+M)، ۱۶/۵ درصد افزایش وزن تر نسبت به گیاهچه‌های بدون تلقیح با قارچ (-M) نشان دادند (شکل A-۲). طول ریشهٔ گیاهچه‌های فستوکا در غلظت‌های متفاوت نیکل، تفاوت معنی‌داری نشان داد. افزایش غلظت نیکل در گیاهچه‌های آزمایش‌شده به کاهش ۳۸ درصدی در طول ریشه منجر شد (شکل B-۱). طول ریشه در گیاهچه‌های تلقیح‌شده 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 ±SE است. حروف یکسان بیان‌کنندهٔ 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 ± SE است. حروف یکسان نشان‌دهندهٔ نبودن اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است.

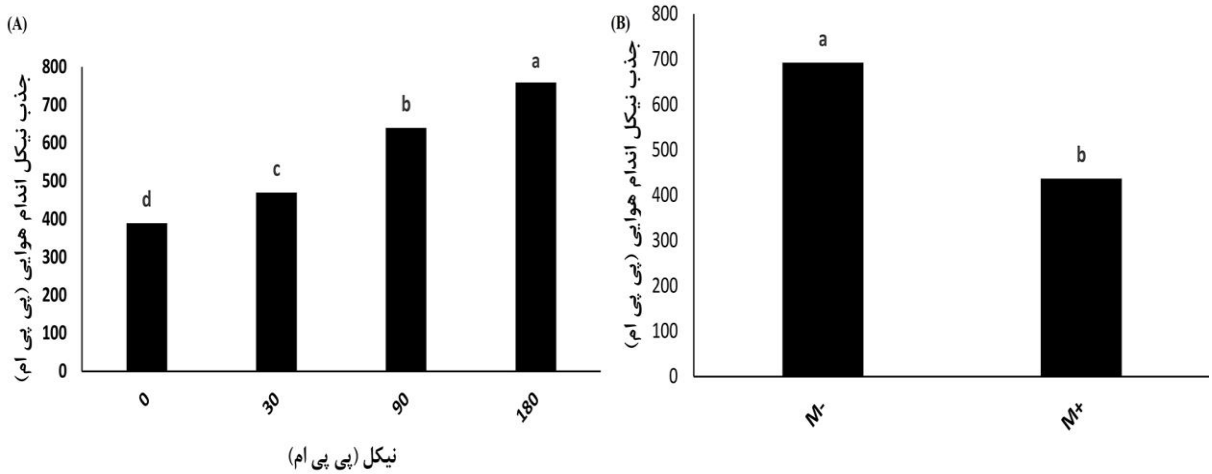
تأثیر نیکل و قارچ بر جذب نیکل و عامل انتقال

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؛ به‌طوری که در گیاهان +M و -M جذب نیکل ریشه در تیمار ۱۸۰ پی‌پی‌ام به‌ترتیب ۲/۶ و ۵/۷ برابر نسبت به شاهد، افزایش نشان داد. جذب نیکل ریشه در گیاهان +M نسبت به گیاهان -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).

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.

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

تأثیر متقابل نیکل و قارچ بر جذب نیکل اندام هوایی معنی‌دار نبود. میزان جذب نیکل اندام هوایی با افزایش غلظت نیکل خاک، روند افزایشی معنی‌داری نشان داد؛ به طوری که در بالاترین غلظت نیکل خاک (۱۸۰ppm) میزان جذب نیکل اندام هوایی، ۲ برابر نسبت به شاهد افزایش نشان داد. میزان جذب نیکل اندام هوایی در گیاهچه‌های تلقیح‌شده با قارچ *F. intraradices* نسبت به گیاهچه‌های تلقیح‌نشده، ۳۷ درصد کاهش نشان داد (شکل ۳، A و B).

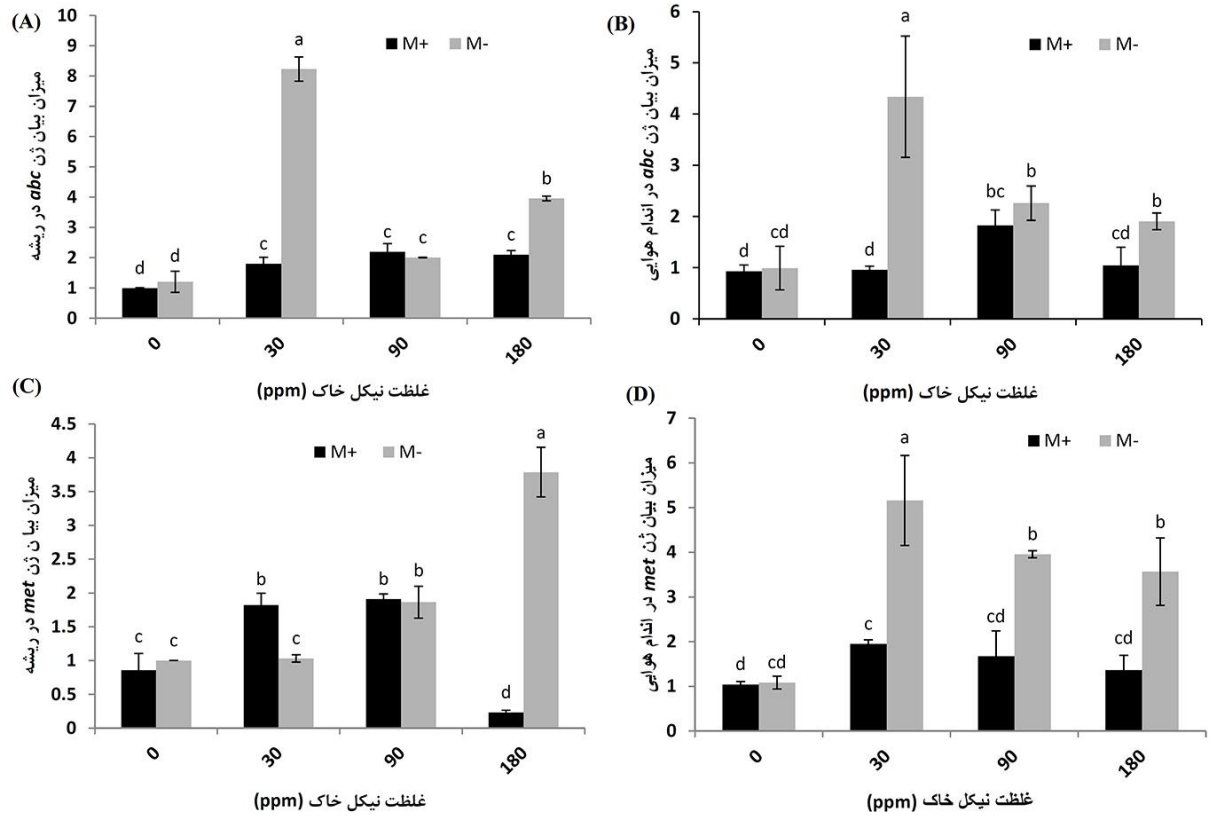


شکل ۳- تأثیر نیکل (A) و قارچ *F. intraradices* که به صورت میانگین در سطوح مختلف نیکل ارائه شده است (B) بر غلظت نیکل اندام هوایی در فستوکا. مقادیر به‌ترتیب میانگین ۶ و ۱۲ تکرار ± SE است. حروف یکسان نشان‌دهندهٔ نبودن اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است.

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

در ریشهٔ گیاهچه‌های -M افزایش معنی‌داری 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 معنی‌داری 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).

میزان بیان ژن *met* در ریشهٔ گیاهچه‌های فستوکای بلند بدون قارچ *F. intraradices* فقط در تیمارهای ۹۰ و ۱۸۰ پی‌پی‌ام، نسبت به شاهد، افزایش نشان داد. میزان بیان ژن *met* در ریشهٔ گیاهچه‌های فستوکا تلقیح‌شده با قارچ در تیمار ۹۰ پی‌پی‌ام نیکل افزایش و در تیمار ۱۸۰ppm در مقایسه با شاهد، کاهش نشان داد. میزان بیان این ژن در اندام هوایی گیاهچه‌های فستوکای بدون قارچ نیز افزایش معنی‌داری با شاهد نشان داد. در گیاهچه‌های تلقیح‌شده با قارچ، میزان بیان ژن *met* در اندام هوایی تفاوت معنی‌داری با شاهد، نشان نداد (شکل D و C-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 تیمارشده با غلظت‌های مختلف نیکل. مقادیر میانگین ۳ تکرار ±SE است. حروف یکسان، نشان‌دهندهٔ نبودن اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ 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 ریشهٔ گیاهچه‌های فستوکا کاهش معنی‌داری نشان دادند. غلظت‌های سمّی نیکل از طریق تغییر در ساختار غشای سلول‌های ریشه و کاهش سطوح جذب‌کنندهٔ 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). مشخّص شده است که همزیستی میکوریزی، عامل اصلی در مقاومت گیاه به تنش فلزات سنگین است (Gohre and Paszkowski, 2006). Latef (۲۰۱۱) بیان کرده است که تلقیح قارچی، افزایش زیست تودهٔ گیاهان فلفل میکوریزی را در تنش مس در مقایسه با گیاهان غیرمیکوریزی باعث شده است. کلونیزاسیون قارچی (۵۷ درصد) موفّقیت‌آمیزی 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.

یکی از معیارهای ارزیابی میزان استخراج عناصر از خاک، جذب فلزات توسّط گیاه است که میزان این شاخص از حاصل‌ضرب غلظت عنصر در میزان مادهٔ خشک گیاه به دست می‌آید. از جمله دلایل بیشتربودن جذب نیکل در ریشهٔ 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 هنگامی‌که محتوای نیکل خاک از ۵۰ تا ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم افزایش می‌یابد، انباشت نیکل در ریشه‌های فسکیوی بلند نیز افزایش می‌یابد و این نشان‌دهندهٔ 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 تحمّل گیاه به تنش نیکل را از طریق کاهش انباشتگی فلز و انتقال به اندام هوایی افزایش دهد (Vivas *et al*., 2006؛ Amir *et al*., 2013). 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 می کنند؛ در نتیجه انتقال فلز به اندام هوایی محدود می‌شود. آن‌ها بیان کردند که قارچ‌های میکوریزی از طریق تجمّع فلزات در میسلیوم‌های 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 ارگانیسم‌های دیگر به‌کاربردن ترکیبات کلات‌کننده (همبندکننده) 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 آرابیدوپسیس، مقاومت گیاه در برابر تنش کادمیوم را باعث می‌شود. Clemens (۲۰۰۱) نشان داد بیان بیش از حدّ ژن‌های *MT*1 و *MT*2، افزایش تحمّل گیاهان به کادمیوم را موجب می‌شود. القای بیان ژن *met* توسّط مس در دو گیاه آرابیدوپسیس (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 ریشهٔ 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. علّت کاهش بیان ژن *met* در بالاترین غلظت

نیکل ممکن است به افزایش فعّالیت آنزیم‌های ریبونوکلئاز در پاسخ به انباشتگی فلزات سنگین مربوط باشد (Gopal and Rizvi, 2008). با توجّه به تأثیر حضور قارچ در ریشه‌های گیاهان +M بر کاهش تجمّع نیکل در ریشه‌ها و اندام هوایی، بیان کمتر ژن‌های ذکرشده 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 تحریک‌شده با فلزات سنگین را کاهش می‌دهد. کلونیزاسیون با این قارچ‌ها روی بیان چند ژن گیاه که شاید در تحمّل یا سم‌زدایی فلزات سنگین دخالت دارند، تأثیر زیادی دارد. Cicatelli و همکاران (۲۰۱۰) نشان دادند در گیاهان *Populus alba* تلقیح‌شده 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 کلونیزه‌شدهٔ گیاه *Pisum sativum* با قارچ *F. intraradices* در حضور کادمیوم به مقدار زیادی افزایش یافت. بنابراین به نظر می‌رسد که گیاهان تلقیح‌شده با قارچ، مکانیسم‌های مولکولی متفاوتی برای سازگاری با تنش فلزات سنگین دارند. با توجّه به نتایج این پژوهش، مشخّص شد که از 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 ناکافی‌بودن سطح نیکل تغییری پیدا نکرده است. به نظر می‌رسد که کاهش در انتقال نیکل از ریشه‌ها به اندام هوایی در گیاهچه‌های میکوریزی به سبب فعّال‌سازی مکانیسم‌های جذب نیکل در ریشه نظیر کلاته‌کردن و مصادرهٔ (sequestration) آن در واکوئل باشد.

نتایج پژوهش حاضر، اهمّیت 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.

منابع

Amir, H., Lagrange, A., Hassaïne, 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 arondinacea* Schreber (F .*elatior* L. SPP . *arondinacea*) Schreber (Hackel). Journal of Ecology 89: 304-324.

Gohre, V. and Paszkowski, U. (2006) Contribution of the arbuscular mycorrhizal symbiosis to heavy metal phytoremedialion. 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., Ducousso, 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, AI. (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

Copyright©2016, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.