تکثیر درون شیشه‌ای قارچ‌های میکوریز آربوسکولار با به‌کارگیری گیاه کامل

In vitro propagation of arbuscular mycorrhizal fungi using whole plant

ناصر علی اصغرزاد[1*] و حسن رضائی بیرامی[2]

چکیده

جدید ترین تکنیک برای تکثیر قارچ‌های میکوریز آربوسکولار (AM)، استفاده از ریشه‌های تراریخته با T-DNA در کشت بافت درون شیشه‌ای به‌عنوان میزبان و بستر تکثیر قارچ می‌باشد. علی‌رغم توسعه فراوان این روش در سال‌های اخیر، فقدان بخش فتوسنتز کننده در گیاه میزبان سوال‌هایی را در مورد طبیعی بودن این رابطه مطرح ساخته است. بدین‌منظور، طرح پژوهشی حاضر با هدف به‌کار گیری گیاه کامل دارای بخش سبز به جای ریشه تراریخته در کشت درون شیشه‌ای قارچ‌های AM به اجرا در آمد. از گیاهان تره فرنگی، شبدر قرمز و یونجه به‌عنوان میزبان و قارچ AM گونه *Glomus intraradices* استفاده شد. محیط کشت MSR فاقد ساکارز و ویتامین‌ها به‌عنوان بستر کشت مورد استفاده قرار گرفت. اسپورها و ریسه‌های به‌دست آمده از کشت درون شیشه‌ای با ریشه‌های تراریخته به‌عنوان مایه قارچی استفاده شد. نتایج نشان‌داد که رشد و توسعه ریشه و استقرار هم‌زیستی میکوریزی در حضور گیاهان شبدر قرمز و یونجه و در این سیستم بهتر بوده و توانست منجر به تولید و تکثیر قارچ شود. هرچند در این روش تعداد اسپور به‌وجود آمده و مقدار ریسه تولیدی کمتر از روش ریشه تراریخته بود ولی اسپورها در شرایط طبیعی تشکیل شده بودند. استقرار موفقیت آمیز قارچ‌های میکوریزی در ریشه گیاه کامل (دارای بخش سبز) در شرایط درون شیشه‌ای، از دیگر یافته‌های ارزشمند این پژوهش است.

واژه‌های کلیدی: قارچ‌های آربوسکولار، کشت درون شیشه‌ای، تعادل هورمونی، ریشه تراریخته، زاد مایه

1 و 2. به‌ترتیب استاد و فارغ التحصیل کارشناسی ارشد، گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز
*: نویسنده مسئول

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

قارچ‌های میکوریز آربو سکولار، هم‌زیست اجباری هستند در نتیجه، تکثیر آن‌ها در جوار ریشه زنده صورت می-گیرد (Cox *et al*. 1975; Smith 1980; Powell & Bagyaraj 1986) گرچه تحقیقات مهندسی ژنتیک ممکن است در آینده امکان تکثیر این قارچ‌ها را در محیط‌های مصنوعی و بدون حضور گیاه فراهم سازد ولی در حال حاضر این عمل طبق روش‌های مرسوم در حضور گیاه زنده صورت می‌گیرد. این حقیقت که قارچ‌های میکوریز آربوسکولار بایستی در حضور ریشه زنده تکثیر یابند شاید یکی از معایب این قارچ‌ها به‌حساب آید اما در چنین شرایطی قارچ همواره توانایی همزیستی خود را حفظ میکند (Abbott & Robson 1981) در صورتی‌که برخی از باکتری‌های هم‌زیست از جمله ریزوبیوم‌ها، موقعی که چندین بار متوالی در محیط‌های مصنوعی کشت شوند توانایی هم‌زیستی و یا تثبیت نیتروژن خود را از دست می‌دهند (Varma & Hock 1999).

کشت درون شیشه‌ای قارچ‌های میکوریزآربسکولار همراه با ریشه تراریخته با T-DNA (از Ti پلاسمید *آگروباکتریوم*) بیشترین موفقیت را در تکثیر این قارچ‌ها در پی داشته است. بررسی‌های اقتصادی صورت گرفته نیز نشان می‌دهد این روش از لحاظ تامین امکانات و تجهیزات پایه و هم‌چنین هزینه لازم از لحاظ حجم زاد مایه تولیدی از مزیت قابل توجهی برخوردار می‌باشد (Declerck *et al*. 1998). ازطرف دیگر، پتانسیل بسیار خوب این روش برای تکثیر اسپورهای عاری از آلودگی، پژوهش‌گران را بر آن داشته تا از این تکنیک به‌صورت وسیع در تحقیقات مدرن در زمینه‌های مختلف مربوط به قارچ‌های میکوریز آربوسکولار استفاده نمایند (Fortin *et al*. 2002; Gianninazi *et al*. 200). در حال حاضر این روش توسعه زیادی یافته و به‌طور وسیع در تحقیقات بیوشیمیائی، مولکولی مرتبط با قارچ‌های میکوریز آربوسکولار جهت تامین قارچ خالص به‌کار گرفته می‌شود (Daniels & Menge 1981) حتی در پژوهش‌های گلدانی نیز استفاده مایه‌های قارچی به‌دست آمده از کشت درون شیشه-ای، رایج شده است. برخی شرکت‌های تولید کننده کودهای بیولوژیک در سرتاسر جهان اقدام به تکثیر گونه‌های خاصی از این قارچ‌ها با استفاده از ریشه‌های تراریخته نموده و زادمایه-های فراوان حاصله را با مواد حامل و نگهدارنده مخلوط کرده، به‌صورت پودر یا قرص بسته بندی می‌کنند. این فرآورده‌ها می‌توانند در محصولات گلخانه‌ای و خزانه‌ها مورد استفاده قرار گیرند (Daniels & Menge 1981).

علی‌رغم توسعه فراوان این روش که مورد استقبال محققان این عرصه نیز قرار گرفته است، برخی نکات قابل تعمل در این روش وجود دارند که در زیر به آن‌ها اشاره می-شود:

در این روش فقط ریشه تراریخته در محیط کشت بافت تکثیر شده و قارچ هم‌زیست نیز به همراه ریشه‌های ریز و فراوان حاصله تکثیر می‌یابد و در واقع بخش سبز گیاه وجود ندارد، روابط ناقص داد و ستد بین قارچ و میزبان و هم-چنین بین ریشه و بخش هوایی حاکم است، وجود ساکارز در محیط کشت و فقدان تعادل هورمونی که می‌توانند روابط هم‌زیستی قارچ- گیاه را تحت تاثیر قرار دهند، انتقال T-DNA از *آگروباکتریوم* به ریشه ممکن است ژنوم گیاه را تحت تاثیر قرار دهد و رفتار هم‌زیستی تغییر یابد، اسپورهای حاصل در این روش گرچه قدرت تندش دارند ولی کاملا مشابه با اسپورهای طبیعی نیستند و معلوم نیست آیا در خاک‌های طبیعی سازگاری خواهند داشت یا نه؟ و نهایتاً این-که آیا پس از کشت‌های متوالی، اسپورهای حاصله پتانسیل اولیه خود را از نظر ایجاد هم‌زیستی با گیاه طبیعی، جذب عناصر و سایر خصوصیات مفید حفظ خواهند کرد؟ با توجه به این مطالب، برخی پژوهش‌گران پیشنهاد نموده اند که در کشت درون شیشه‌ای به جای استفاده از ریشه‌های تراریخته، از گیاهچه کامل استفاده شود که دارای بخش فتوسنتز کننده باشد. هدف پژوهش حاضر، بررسی مواردی که به دنبال می-آید، بوده است: حذف ساکارز و ویتامین‌ها از محیط کشت بافت MSR چه تاثیری بر رشد گیاهچه و تکثیر قارچ هم-زیست خواهد داشت، میزان گسترش هم‌زیستی و اسپورزایی در محیط کشت معدنی با حضور گیاه کامل چگونه خواهد بود و مایه قارچی حاصل از محیط کشت کامل و محیط فاقد قند و ویتامین‌ها چه اثری بر میزان هم‌زیستی در گیاه کامل دارد.

مواد و روشها

برای انجام آزمایش، شبدر قرمز (*Trifolium pratenes* L.)، یونجه (*Medicago sativa* L.) و تره فرنگی (*Allium porrum* L.) به‌عنوان میزبان گیاهی و قارچ میکوریز آربوسکولار گونه *Glomus intraradices* Schenck and Smith به‌عنوان قارچ هم‌زیست انتخاب شدند .

آماده سازی قارچ میکوریز

قارچ *G. intraradices* به‌صورت کشت درون شیشه-ای به همراه ریشه‌های تراریخته هویج با T-DNA (از Ti

Archive of SID

www.SID.ir

پلاسمید *آگروباکتریوم*)، از دپارتمان اکولوژی میکروبی دانشگاه Lund سوئد دریافت شد. برای تکثیر قارچ از محیط کشت MSR اصلاح شده استفاده گردید (Fortin *et al*. 2002).

پس از آماده سازی محیط کشت، قطعاتی به اندازه یک سانتی‌متر مربع از محیط کشت حاوی قارچ میکوریزی و ریشه تراریخته را بریده و در قسمت وسط تشتک‌های پتری پلاستیکی 10 سانتی‌متری قرار داده شد. (قطعات برداشته شده حاوی اسپور فراوان به همراه ریشه‌های فعال بودند). بعد از گذشت 90 روز، تشتک‌های پتری حاوی مقادیر زیادی از ریشه و ریسه قارچ میکوریز بودند. برای افزایش اسپورزایی قارچ جهت تلقیح با ریشه گیاه کامل مراحل زیر روی تشتک-های پتری حاوی قارچ میکوریز انجام گرفت:

ابتدا محیط کشت MSR معدنی (بدون ویتامین و قند) تهیه گردید (Declerck *et al*. 1998). درب تشتک‌های پتری را با رعایت شرایط سترون برداشته آن‌گاه به‌وسیله تیغ سترون قسمت‌هایی از محیط کشت به ابعاد 2 ×2 سانتی‌متر را برداشته و به جای آن محیط MSR معدنی سرد شده (در حال ژله‌ای شدن)، ریخته شد. تشتک‌های پتری دوباره به مدت یک ماه در داخل انکوباتور در 26 درجه سلسیوس و تاریکی نگهداری شدند. پس از مدت یک ماه ریسه قارچ وارد مناطق دارای MSR معدنی شده و به شدت اسپورزایی کرده بودند.

تکثیر قارچ میکوریز با ریشه گیاه کامل

کشت گیاهان به منظور تکثیر قارچ میکوریز به سه صورت به شرح زیر انجام گرفت:

1.کشت درظروف شیشه‌ای(جار)، 2.کشت در تشتک پتری به همراه لوله محافظ گیاه، 3. کشت در تشتک پتری بدون لوله محافظ.

کشت در ظروف شیشه‌ای(جار)

برای این منظور از ظروف شیشه مربای یک لیتری استفاده گردید. ابتدا بذور سه گیاه شبدر، یونجه و تره فرنگی پس از ضد عفونی با هیپوکلریت سدیم یک درصد، در سطح محیط آب آگار (0/8 گرم آگار در 100 میلی‌لیتر آب مقطر) سترون در دمای 18 درجه سلسیوس جوانه دار شده و در داخل شیشه‌های فوق به شرح زیر کشت و تلقیح شدند.

ابتدا در روی درب ظروف شیشه‌ای سه سوراخ به قطر یک سانتی‌متر ایجاد گردید وسوراخ‌ها با پنبه پوشانیده شدند. در ته هر ظرف ماسه شسته شده به ارتفاع سه سانتی‌متر ریخته شده و با محلول غذایی MSR معدنی اشباع گردید. سپس درب ظروف بسته شد و در داخل اتو کلاو با فشار یک بار و 121 درجه سلسیوس به مدت 15 دقیقه سترون شدند. برای هر گیاه چهار ظرف و در داخل هر ظرف دو گیاه کشت شد. برای تلقیح با قارچ میکوریز در هنگام کشت گیاهان ابتدا حفره‌هایی به ارتفاع دو سانتی‌متر و قطر یک سانتی‌متر در داخل ماسه به وجود آمده سپس قطعات ژل معدنی حاوی اسپور فراوان (به قطر یک سانتی‌متر) آماده شده در قسمت قبلی را در داخل حفره قرار داده آن‌گاه روی تکه فوق بذور جوانه دار قرار داده و مابقی با ماسه به ضخامت یک سانتی متر پوشانده شد. ظروف در اتاقک رشد در 25 درجه سلسیوس و طول روشنایی 12 ساعت به مدت چهار ماه نگهداری شده و در پایان قسمت ریشه از ماسه جدا سازی شده شاخص‌های مقدار تولید ریسه، اسپور و وزیکول مورد آزمایش و مقایسه قرار گرفتند. در طول مدت رشد گیاهان رطوبت محیط‌ها از طریق توزین کنترل شده و با محلول MSR مایع آبیاری می‌شدند.

کشت در تشتک پتری همراه لوله محافظ گیاه

در این روش سه نوع گیاه شبدر ،یونجه وتره فرنگی مورد استفاده قرار گرفتند. برای هر گیاه 10 تشتک پتری و در هر تشتک دو گیاه مورد استفاده قرار گرفت و برای قرارگیری گیاه از لوله فالکون شفاف 50 میلی‌لیتری استفاده گردید. برای آماده سازی هر تشتک پتری ابتدا سوراخی به قطر یک سانتی‌متر در گوشه تشتک پلاستیکی ایجاد گردید و یک لوله فالکون شفاف 50 میلی‌لیتری بر روی آن تعبیه شد. به این ترتیب که ابتدا ته لوله بصورت مورب با زاویه 45 درجه بریده شده و در درپوش پلاستیکی لوله فالکن سوراخی به قطر یک سانتی‌متر ایجاد شده و به‌وسیله پنبه بسته شد. لوله فالکون به‌وسیله چسب حرارتی از قسمت بریده شده به-طور مورب بر روی سوراخ تشتک چسبانده شد. مجموعه حاصله به مدت 24 ساعت در داخل ظرف در بسته در معرض گاز فرمالین قرار گرفت تا سترون شود (شکل1).

بذور گیاهان مورد نظر پس از ضد عفونی با هیپوکلریت سدیم یک درصد بر روی محیط آب آگار (0/8 گرم آگار در 100 میلی‌لیتر آب مقطر) سترون در 18 درجه سلسیوس جوانه دار شدند. از قسمت‌های معدنی تشتک‌های پتری زاد مایه قارچی قطعاتی به ابعاد 1×1 سانتی متر جدا و در داخل تشتک‌های پتری آماده شده در قسمت زیر سوراخ و کمی متمایل به مرکز تشتک قرار گرفتند بقیه فضای تشتک

Archive of SID

www.SID.ir

با محیط کشت MSR معدنی سترون شده حاوی آگار در حال بستن (40 درجه سلسیوس) پر گردید.

شکل 1: کشت در تشتک پتری به همراه لوله محافظ گیاه.
Fig 1: Propagation in plate attached to the holder tube.

بذور جوانه زده را به آرامی از مخلوط آب آگار جدا نموده و در زیر سوراخ تشتک طوری‌که ریشه آن در مسیر رشد با ژل حاوی اسپور و ریسه قارچ برخورد کند، قرار داده و بخش هوایی گیاه به داخل لوله فالکون هدایت گردید. پس از پوشاندن اطراف تشتک‌ها با پارافیلم به جهت حفاظت ریشه از نور، رویه تشتک‌ها با فویل آلومینیومی پوشانیده شدند. تشتک‌ها در اتاقک رشد در 25 درجه سلسیوس و طول روشنایی 14 ساعت با نور فلورسنت سفید به مدت سه ماه نگه‌داری شده و در پایان مقدار ایجاد هم‌زیستی میکوریزی در ریشه و تولید ریسه، اسپور و وزیکول مورد آزمایش و مقایسه قرار گرفتند. در طول مدت رشد گیاهان هر دو هفته یک‌بار میزان رشد ریشه و ریسه در زیر بینوکلر بررسی و رطوبت تشتک پتری به‌وسیله وزنی کنترل شده و در صورت کاهش با محلول MSR معدنی جبران می‌شد.

کشت در تشتک پتری بدون لوله محافظ

بذور گیاهان مورد نظر پس از ضد عفونی به شرح فوق بر روی محیط آب آگار (0/8 گرم آگار در 100 میلی‌لیتر آب مقطر) سترون در 18 درجه سلسیوس جوانه دار شدند.

از قسمت‌های معدنی پتری‌های مایه تلقیح قارچی قطعاتی به ابعاد 1×1 سانتی‌متر جدا و در داخل تشتک‌های آماده شده در قسمت زیر سوراخ و کمی متمایل به مرکز تشتک قرار گرفتند بقیه فضای تشتک با محیط کشت MSR معدنی سترون حاوی آگار در حال بستن (40 درجه سلسیوس) پر شد. البته لازم به توضیح است که به‌کار بردن محیط کشت MSR معدنی در تمام حجم تشتک پتری امکان پذیر نیست زیرا بافت ریشه کشت داده شده فاقد بخش فتوسنتز کننده بوده و برای رشد و توسعه نیازمند قندها و ویتامین‌ها می‌باشد. به این منظور مقداری از محیط MSR کامل (حاوی قند و ویتامین‌ها) را بایستی در مرکز یا گوشه‌ای از تشتک قرار داد. این قسمت کوچک می‌تواند رشد و توسعه ریسه در بخش معدنی را حمایت کند.

در یک گوشه از درب تشتک در نزدیکی قسمت ژل گذاری شده سوراخی به قطر یک سانتی‌متر ایجاد گردیده و جوانه‌ها را طوری در داخل ژل قرار می‌دهیم که قسمت هوایی گیاه بیرون از سوراخ تشتک پتری قرار گیرد. اطراف سوراخ به‌منظور جلوگیری از آلودگی و خشک شدگی با پنبه سترون پوشانیده شد (شکل 2).

شکل 2: کشت در تشتک پتری بدون لوله محافظ
Fig 2: Propagation in plate without holder tube.

پس از پوشاندن اطراف تشتک‌ها با پارافیلم به جهت حفاظت ریشه از نور، رویه تشتک‌ها با فویل آلومینیومی پوشانیده شدند. گیاهان کشت شده در اتاقک رشد در 25 درجه سلسیوس و طول روشنایی 14 ساعت با نور فلورسنت سفید به مدت سه ماه نگهداری شده و در پایان مقدار توسعه هم‌زیستی میکوریزی در ریشه و تولید ریسه، اسپور و وزیکول مورد آزمایش و مقایسه قرار گرفتند. در طول مدت رشد گیاهان هر دو هفته یکبار میزان رشد ریشه و ریسه در زیر بینوکلر بررسی و رطوبت تشتک به‌وسیله وزنی کنترل شده و در صورت کاهش با محلول MSR معدنی جبران می‌شد.

نتایج و بحث

کشت در ظروف شیشه‌ای (جار)

به‌نظر می‌رسد ضخامت زیاد بستر کشت به همراه محیط MSR تهویه ریشه را با مشکل مواجه ساخته و رشد

Archive of SID

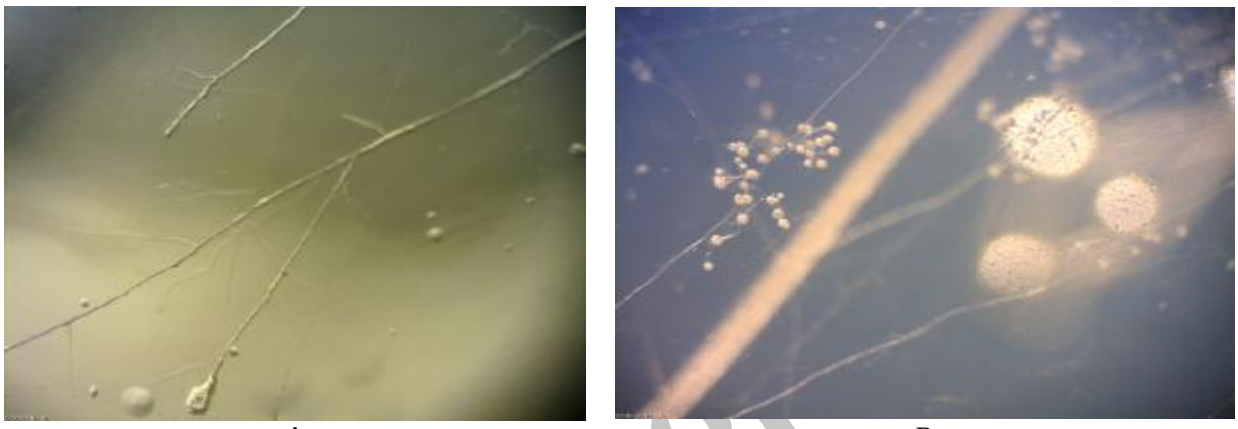
www.SID.ir

ریشه متوقف می‌شود. ضمنا به‌علت وجود ماسه امکان مشاهده و پی‌گیری روند توسعه ریشه و استقرار قارچ وجود ندارد. لذا این روش ادامه داده نشد.

کشت درون شیشه‌ای با ریشه‌های تراریخته

کشت درون شیشه‌ای قارچ *G.intraradices* با ریشه-های تراریخته هویج در محیط کشت MSR کامل در مدت دو الی سه ماه منجر به تولید ریشه‌های ریز فراوان و تکثیر قارچ گردید. در پایان کشت، تعداد زیادی اسپور قارچ به همراه مقادیر زیادی از ریسه و ریشه‌های میکوریزی حاصل شد. اسپورهای به‌وجود آمده دارای تعداد زیادی از قطرات چربی بوده که حاکی از فعال بودن آن‌ها می‌باشد (Aliasgharzadeh *et al*. 2001; Mukerji & Chamola 2003) شکل 3 (A, B).

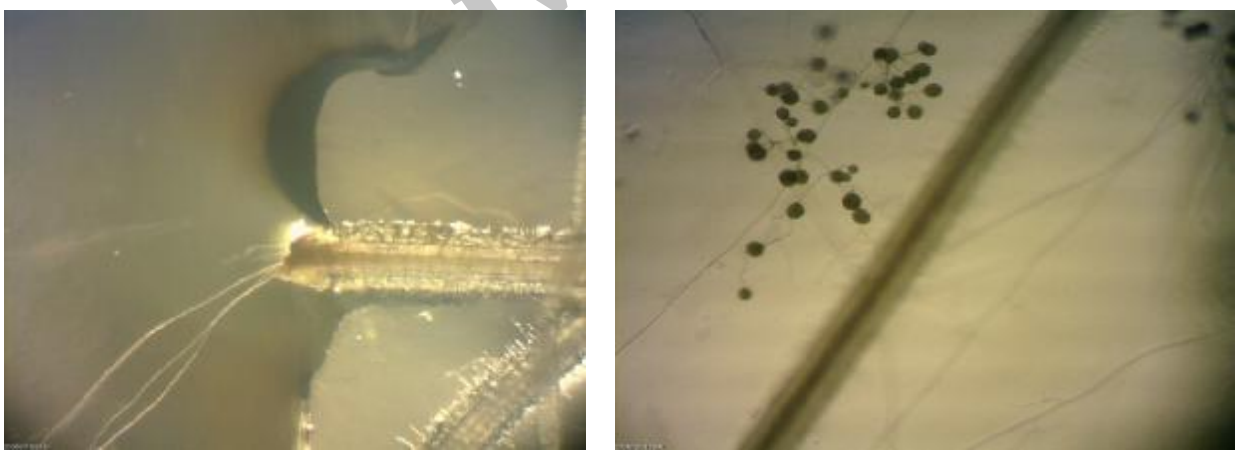
قرار دادن محیط کشت MSR فاقد قند و ویتامین‌ها (محیط معدنی) در اطراف محیط MSR کامل، سبب توسعه ریسه از انتهای ریشه‌ها به فضای محیط معدنی شده و به-شدت اسپورزایی کردند. شکل 4 (A, B).



A B

شکل 3: توسعه ریسه (A) و اسپورزایی در کشت درون شیشه‌ای (B)، بزرگ‌نمایی ×50

Fig 3: Hyphal development (A) and sporulation in *in vitro* culture (×50)



A B

شکل 4: توسعه ریسه از انتهای ریشه به بخش معدنی (A)، تولید اسپور فراوان در بخش معدنی(B) ، بزرگ‌نمایی ×50

Fig 4: Hyphal growth from root cutting toward mineral compartment (A), high spore production in mineral compartment (B), (×50)

به‌نظر میرسد فقدان ساکارز و ویتامین‌ها در محیط کشت معدنی سبب تحریک قارچ به اسپورزایی می‌شود (Lewis 1973). هم‌چنین تولید ریسه‌های باریک و منشعب فراوان در بخش معدنی محیط کشت حاکی از فقدان قندها و ویتامین‌ها می‌باشد (شکل5). ضمنا رشد و تکثیر آلودگی‌های احتمالی (قارچ‌های ساپروفیت و باکتری‌ها) در بخش معدنی

www.SID.ir

به حداقل می‌رسد. ظهور و توسعه میکروارگانیسم‌های ناخواسته در کشت‌های درون شیشه‌ای قارچ‌های میکوریز آربوسکولار یکی از معضلات این روش می‌باشد.

با ارایه تکنیک فوق‌الذکر که از یافته‌های این پژوهش است، می‌توان با به‌کارگیری محیط MSR معدنی در اطراف MSR کامل، مایه قارچی فراوان و عاری آلودگی به‌دست آورد. از دیگر مزیت‌های این روش می‌توان به کاربرد مایه حاصله در کشت درون شیشه‌ای قارچ AM با گیاه کامل اشاره نمود که امکان آلودگی کاهش یافته و توسعه هم‌زیستی تسریع می‌شود و در قسمت بعدی توضیح داده خواهد شد. البته لازم به توضیح است که به‌کار بردن محیط کشت MSR معدنی در تمام حجم تشتک پتری امکان پذیر نیست زیرا بافت ریشه کشت داده شده فاقد بخش فتوسنتز کننده بوده و برای رشد و توسعه نیازمند قندها و ویتامین‌ها می‌باشد. به این منظور مقداری از محیط MSR کامل را بایستی در مرکز یا گوشه‌ای از تشتک قرار داد. این قسمت کوچک می‌تواند رشد و توسعه ریسه در بخش معدنی را حمایت کند.

شکل 5: گسترش ریسه‌های باریک و منشعب در بخش معدنی محیط MSR، بزرگ‌نمایی ×50

Fig 5: Development of narrow and branched hyphae in mineral portion of MSR medium, (×50)

کشت درون شیشه‌ای با گیاه کامل (با لوله محافظ)

نتایج این روش نشان داد که از بین گیاهان انتخاب شده، شبدر قرمز و یونجه توانایی خوبی برای رشد در شرایط درون شیشه‌ای داشته و کلنیزاسیون مطلوبی را ایجاد می کنند. گیاه تره فرنگی گرچه دارای سازگاری زیادی برای هم‌زیستی با قارچ‌های AM است ولی توانایی خوبی برای استقرار در شرایط درون شیشه‌ای ندارد. از این گیاه می‌توان در کشت‌های تله گلدانی با موفقیت استفاده کرد. این گیاه در شرایط درون شیشه‌ای، ریشه‌های ضخیم ، ترد و آب‌دار تولید می‌کند که برای جلب قارچ و ایجاد هم‌زیستی مناسب نمی‌باشند (Mosse & Hepper 1975).

با توجه به این‌که در این روش به‌طور کامل از محیط معدنی MSR استفاده شد (به علت وجود بخش سبز گیاه)، رشد و توسعه ریسه قارچ و اسپورزایی آن به اندازه روش کشت درون شیشه‌ای با ریشه‌های تراریخته نبود شکل 6 (A, B) و ایجاد هم‌زیستی با اندکی تاخیر صورت گرفت ولی نظر به این‌که ریشه‌های طبیعی و بخش سبز گیاه حضور داشته و محیط فاقد ساکارز و ویتامین بوده است، اسپورهای حاصله کاملا شرایط طبیعی داشته و به نظر می‌رسد این زاد مایه را می‌توان به راحتی در اکوسیستم‌های طبیعی به‌کار برد، اگرچه این موضوع هنوز به بررسی بیشتر نیاز دارد.

کشت در تشتک پتری بدون لوله محافظ

در این روش با توجه به این‌که بخش هوایی گیاه در هوای آزاد قرار داشت، رشد گیاه در ابتدا بهتر بوده ولی به علت رطوبت نسبی پایین در هوا، شدت تعرق زیاد بود و محیط کشت در مدت کوتاهی خشک می‌شد و نیاز به افزودن آب به‌طور مکرر بود. این عمل سبب گردید که محیط کشت حالت ژله‌ای خود را از دست دهد. هم‌چنین در خلال افزودن آب امکان آلودگی محیط بالا می‌رود. در نتیجه، توسعه ریشه گیاه در محیط کشت و استقرار قارچ و تکثیر آن که مستلزم حداقل دو ماه زمان می باشد، در این روش مقدور نشد و ریشه گیاهان پس از یک ماه غیر فعال شدند شکل 7.

تصور می‌رود که اگر در این روش، تشتک‌های پتری در اتاقک رشد با کنترل رطوبت نسبی قرار گیرند، تبخیر و تعرق کم شده و نیاز به افزودن مکرر آب نباشد. در این صورت احتمالا گیاه می‌تواند مدت زیادی به رشد خود ادامه دهد و رشد و تکثیر قارچ هم‌زیست به خوبی صورت گیرد. مزیت این روش این است که فضای رشدگیاه محدود نیست و گیاه با هوای آزاد و نور مستقیم در ارتباط است. در روش تشتک با لوله محافظ، گیاه درون لوله محبوس بوده و تنها از طریق پنبه موجود در درب لوله تبادل گاز انجام می‌دهد و هم‌چنین نور از دیواره لوله عبور کرده و احتمالاً کمیت و کیفیت آن تغییر پیدا می‌کند به هر حال این روش‌ها نیازمند بررسی بیشتر و احتمالا اصلاحاتی در طراحی سیستم می‌باشند.

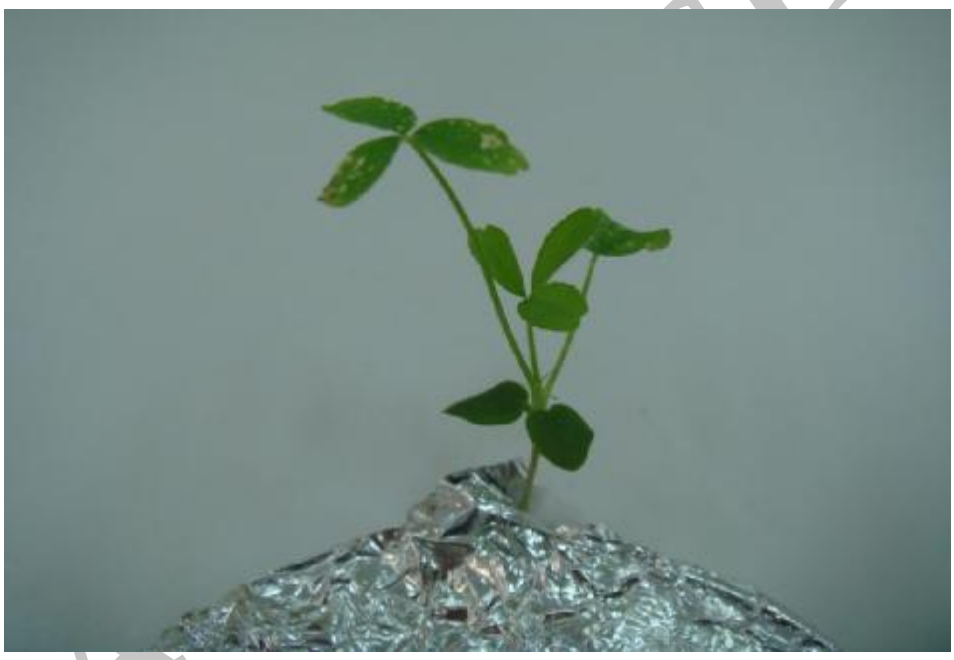
Archive of SID

www.SID.ir

A B

شکل6: تصویر رشد و توسعه ریشه و قارچ میکوریز در کشت درون شیشه‌ای با گیاه کامل (A) (تصویر از زیر تشتک پتری گرفته شده است) و ریسه و اسپورهای تولید شده (B)، بزرگ‌نمایی ×50

Fig 6: Growth and development of root and mycorrhizal fungi in *in vitro* culture using whole plant (A; the photo has been taken from plate bottom), and produced hyphae and spores (B), (×50)



شکل 7 : مرگ تدریجی گیاه در کشت درون تشتک پتری بدون لوله محافظ.

Fig.7: Gradual death of plant in plate culture lacking holder tube.

به‌طور کلی نتایج این پژوهش نشان داد که به‌کارگیری گیاه کامل در تکثیر درون شیشه‌ای قارچ‌های AM می‌تواند امیدوار کننده باشد و در آینده می‌توان با انتخاب سایر گونه‌های گیاهی به‌عنوان میزبان و هم‌چنین آزمایش بر روی سایر گونه‌های قارچ میکوریز آربوسکولار، این تکنیک را توسعه داد. مسلم است که این روش نیازمند تحقیقات همه جانبه بیشتری می‌باشد.

در روش تکثیر درون شیشه‌ای با ریشه‌های تراریخته با T-DNA، به دلیل وجود ژن سایتوکینین در این قطعه از DNA، ریشه‌ها به شدت منشعب شده و تعداد فراوان از ریشه‌های ریز بوجود می‌آید که کاملا مناسب برای استقرار قارچ بوده و سبب تکثیر شدید قارچ و تولید اسپور می‌شود (Fortin *et al*. 2002).لکن همان‌طوری‌که قبلا گفته شد، به دلیل فقدان بخش سبز گیاه و عدم تعادل هورمونی و حضور ساکارز و برخی ویتامین‌ها در محیط کشت، امکان تشکیل اسپورهای غیر طبیعی وجود دارد. هم‌چنین احتمال می‌رود که اسپورهای حاصله پس از چندین بار تکثیر پی در پی در این سیستم، توان استقرار در خاک طبیعی و رقابت با قارچ‌های بومی خاک و سایر میکروارگانیسم‌ها را از دست بدهند. از طرف دیگر، زاد مایه به‌دست آمده، دارای ریشه‌های

www.SID.ir

تراریخته می‌باشد که استفاده از آن‌ها در شرایط طبیعی ممکن مسئله ساز بوده و موانع قانونی از نظر ایمنی زیستی داشته باشد.

سپاسگزاری

این مقاله مستخرج از طرح تحقیقاتی مصوب امور پژوهشی دانشگاه تبریز می‌باشد و بدین‌وسیله از حمایت مالی مدیریت محترم امور پژوهشی دانشگاه در اجرای این طرح تقدیر و تشکر می‌شود.

منابع:

جهت ملاحظه منابع به صفحه‌های 5-6 متن انگلیسی مراجعه شود.

Archive of SID

www.SID.ir