بررسی امکان کشت درون شیشه‌ای سه گونه قارچ میکوریز آربسکولار

فرهاد رجالی[1]، اشرف اسمعیلی زاد و علی محمدی ترکاشوند

دانشیار موسسه تحقیقات خاک و آب کشور؛ **frejali@yahoo.com**

کارشناس ارشد موسسه تحقیقات خاک و آب کشور؛ **Noblesse55@gmail.com**

استادیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت؛ **m.torkashvand@yahoo.com**

دریافت: **90/10/17** و پذیرش: **93/5/22**

چکیده

مهمترین محدودیت برای بکارگیری وسیع همزیستی میکوریزی در اراضی زراعی و باغی، طبیعت همزیست اجباری بودن این قارچ‌ها می‌باشد که تولید صنعتی مایه تلقیح این قارچ‌ها را تاکنون با مشکل مواجه نموده است. برای فائق آمدن بر این مشکل روش‌های مختلفی از جمله هیدروپونیک، آئروپونیک و کشت همزمان ریشه و قارچ ارائه گردیده است. هریک از این روش‌ها،توانائی‌ها و محدودیت‌هایی برای تکثیر این نوع قارچ‌ها را دارا می‌باشد. هدف از انجام این تحقیق بررسی کارایی روش کشت درون شیشه‌ای ریشه‌های القایی برای تکثیر گونه‌های مختلف قارچ‌های میکوریز آربسکولار است. بدین منظور در ابتدا با استفاده از سه سویه *Agrobacterium rhizogenes* و دیسک‌های استریل هویج، تلاش شد تا ریشه‌های القایی مورد نیاز برای تکثیر قارچ‌های میکوریزی تهیه گردد. نتایج اولیه نشان داد که ریشه‌های القایی در بافت گیاهی هویج تشکیل گردید. این ریشه‌ها برای انجام مرحله بعدی مورد استفاده قرار گرفتند. اسپورهای سه گونه از قارچ‌های میکوریزی به نام‌های *Glomus intraradices*، *Glomus etunicatum* و *Glomus mosseae* در مجاورت ریشه گیاه سورگم در طی یک دوره چهار ماهه تکثیر شده و پس از جداسازی از خاک با استفاده از آنتی بیوتیک‌های استرپتومایسین سولفات و جنتامایسین سولفات ضدعفونی سطحی و در شرایط کاملاً استریل در مجاورت راس ریشه‌های القایی حاصل از دیسک هویج بر روی محیط کشت M medium قرار داده شدند. پس از برقراری رابطه همزیستی بین دو ارگانیسم، برای تکثیر همزمان، ریشه‌های همزیست شده با قارچ به ظروف شیشه‌ای 250 میلی لیتری حاوی 100 میلی لیتر محیط کشت M medium منتقل گردیدند. پس از گذشت 8 هفته محتویات ظروف شیشه‌ای از محیط کشت جداسازی و تعداد اسپورهای تشکیل شده در آنها شمارش گردید. نتایج این تحقیق نشان داد که اولاً ریشه‌های القایی تشکیل شده به خوبی در محیط کشت سنتز شده رشد کرده و پایداری ژنتیکی خود را حفظ نمودند و همچنین مشخص گردید که روش کشت درون شیشه‌ای بر اساس مواد و روش‌های بکار گرفته شده در این پژوهش مناسب برای تکثیر دو قارچ *G. intraradices* و *G.etunicatum* می‌باشد، لیکن قارچ *G.mosseae* در این روش تکثیر اسپورزایی نکرد و برای تکثیر آن توصیه می‌شود یا تغییراتی در روش بکار گرفته شده اعمال گردد و یا از روش‌های دیگری مثل هیدروپونیک و آئروپونیک استفاده گردد.

واژه‌های کلیدی: ریشه‌های القایی، کشت درون شیشه‌ای و قارچ‌های میکوریز آربسکولار

[1]. نویسنده مسئول، آدرس: استان البرز، بعد از رزکان نو، بلوار امام خمینی، ابتدای مشکین دشت، موسسه تحقیقات خاک و آب

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

اساس روش کشت همزمان ریشه و قارچ به صورت درون شیشه‌ای *(in-vitro)* بر تهیه ریشه‌های الـقایی حـاصـل از تأثیر *Agrobacterium rhizogenes* بر بافت-های مناسب گیاهی، تلقیح این ریشه‌ها با اسپورهای ضد عفونی شده سطحی قارچ‌های میکوریز آربسکولار و در نـهایـت ایـجاد شـرایـط لازم بـرای رشد و تکثیر این ریشه‌ها استوار می‌باشد.

تاناکا و همکاران (1985) با تلقیح دیسک ریشه‌های غده‌ای شلغم و تربچه با *A. rhizogenes* سویه A4 بعد از 10 روز اولـین عـلائـم ظهور ریشه‌های القایی را گزارش دادند، ریشه‌های بوجود آمده دارای انشعابات زیاد، رشد سریع در محیط کشت فاقد هورمون‌های رشد و دارای زمین‌گرایی منفی بودند. نودا و همکاران (1987) دیسک-های برگی(به قطر 6 میلی‌متر) نوعی تربچه را با فرو بردن به مدت 10 دقیقه در سوسپانسیون *A. rhizogenes* سویه A4 تلقیح کرده و پس از گذشت 10 روز از زمان تلقیح ریشه‌های القایی در تاریکی بوجود آمدند. ریشه‌ها بدون حضور هورمون‌های رشد، سریعاً منشعب و در محیط پراکنده شدند. تریپستین (1991) تأثیر سویه‌های مختلف آگروباکتریوم بر گیاهچه *Echinacea purpura* به منظور تهیه ریشه القایی را بررسی کرده و نشان داد که سویه‌های LMG63 و LMG150 تنها باعث ایجاد بافت کالوس می‌شوند. لیکن سویه‌های 15834 و R1601 در محل تلقیح منجربه تشکیل ریشه‌های القایی شدند.

تلاش‌های صورت گرفته برای کشت هم زمان ریشه و قارچ تا سال 1985 همگی محدود به استفاده از کشت بافت ریشه‌های معمولی بوده است. اولین گزارش مبنی بر استفاده از ریشه‌های القایی حاصل از تلقیح *A. rhizogenes* و به منظور کشت ریشه و قارچ در سال 1987 انتشار یافت. موگنیر و موسه (1987) با موفقیت توانستند ریشه‌های القایی گیاه پیچک (*Convolvulus sepium*)را با اسپور قارچ *Glomus mosseae* و در محیط سنتز شده کلونیزه نمایند، لیکن کشت هم زمان ریشه و قارچ منجربه تشکیل اسپورهای جدید این قارچ نگردید.

اولین گزارش مبنی بر اسپورزایی قارچ‌های میکوریز آربسکولار در محیط کشت سنتز شده مربوط به سال 1988 می‌باشد. بکارد و فورتین (1988) با تغییر ترکیب شیمیایی محیط کشت ریشه و معرفی محیط کشت جدیدی به نام محیط حداقل یا محیط M[1] و استفاده از آن به جای محیط کشت White محدودیت ناشی از غلظت بالای عناصر معدنی برای اسپورزایی این قارچ‌ها بود، برطرف گردید و بدین صورت هم رشد ریشه متوقف نگردید و هم قارچ *Gigaspora margarita* در محیط سنتز شده اسپورزایی نمود.

در همان سال هوآنگ و سیلویا (1988) با استفاده از گیاه‌های*Paspalumnotatum* و *Ipomoea batatas* که با گونه‌های *G. deserticola*، *G. etunicatum* و *G. intraradices* تلقیح و به محیط کشت آئروپونیک منتقل شده بودند، اسپورزایی این گونه‌ها در محیط استریل مشاهده گردید.

استرولا و رومند (1986) پیشنهاد کردند به منظور نگهداری و تکثیر ریشه‌های القایی کلونیزه شده با قارچ-های میکوریز آربسکولار از کشت متوالی آنها در محیط‌های کشت جدید استفاده گردد و متعاقب این عمل ریشه به رشد خود ادامه داده و به همراه آن، اندام فعال قارچی نیز در محیط کشت جدید تکثیر می‌گردد. با تلقیح ریشه‌های القایی حاصل از دیسک هویج با تنها سه اسپور استریل سطحی شده *Gi.margarita* و برقراری شرایط مناسب در طول یک سال در پلیت های 9 سانتی متری بیش از 500 اسپور از این قارچ بوجود آمد. بکارد و پیچ (1992) با ممانعت از خشک شدن محیط کشت، توانستند اسپورهای تشکیل شده را تا یک سال بعد در همان پلیت ها نگهداری نموده و ضمن پایداری قدرت رویشی، تعداد آنها را به هزاران اسپور افزایش دهند. دکلرک و همکاران (1996) توانستند با استفاده از قطعات ریشه‌ای استریل و کلونیزه شده با *G. versiforme* به طول 5 میلی متر و قرار دادن آنها در مجاورت ریشه‌های القایی در محیط کشت MS[2] در طی یک دوره زمانی 5 ماهه، بیش از 9500 اسپور این قارچ را در هر پلیت 9 سانتی‌متری تولید نمایند.

ادهولیه و همکاران (1997) گزارش کردند که در همزیستی بوجود آمده بین ریشه‌های القایی هویج و قارچ میکوریزی *Gi.margarita* چنانچه به جای آگار خالص از فیتاژل استفاده شود تعداد نقاط ورودی هیف قارچ به داخل بافت ریشه و همچنین تعداد سلول‌های کمکی تولید شده در محیط کشت درون شیشه‌ای افزایش می‌یابد.

ویمارد و همکاران (1999) با انجام تحقیقی در ارتباط با مقایسه کارایی مایه تلقیح قارچ *G. intraradices* که به دو روش کشت درون شیشه‌ای و کشت گلدانی تهیه و برای کلونیزه کردن ریشه گیاه پیاز به کار رفت نشان داد که بین این دو مایه تلقیح تفاوت معنی‌داری وجود ندارد، با این توضیح که مایه تلقیح تهیه شده از روش کشت درون شیشه‌ای فاقد هر گونه آلودگی جانبی بوده ولی مایه

[1] Minimal Medium

[2] Murashige and Skoog

Archive of SID

www.SID.ir

تلقیح حاصل از کشت گلدانی حاوی آلودگی‌های قارچی و باکتریایی بوده است.

در تحقیق دیگری محققین موفق شدند از تکه‌های ریشه‌ای حاوی هیف قارچ‌های میکوریز آربسکولار و همچنین تک‌وزیکول‌های این قارچ‌ها و استفاده از ریشه‌های القایی هویج، کشت درون شیشه‌ای گونه‌های *Glomus versiforme*، *G. intraradices*، *G. fasciculatum* و *G.macrocarpum* را به انجام برسانند. طبق نتایج دکلرک و همکاران (1998) دو گونه اول به شدت در محیط اسپورزایی کردند، گونهٔ سوم به میزان کمتر و گونه چهارم تنها چند عدد اسپور در محیط کشت تولید کرد.

تلقیح ریشه‌های القایی هویج با اسپورهای قارچ *Gigaspora margarita* منجر به رشد و توسعه اندام این قارچ در محیط کشت شد. طبق گزارش گادکار و ادهولیه (2000) 10 الی 15 درصداز اسپورهای تولید شده این قارچ درون بافت ریشه‌های القایی بوجود آمده‌اند که بررسی‌های صورت گرفته نشان‌دهندهٔ شباهت کامل آنها با اسپورهای تولید شده در خارج از بافت ریشه می‌باشد. این اولین گزارش از تشکیل اسپور این قارچ درون بافت ریشه است.

دکلرک و همکاران (2001) با بررسی اسپورزایی گونه‌های *G.intraradices*، *G. proliferum* و *G. caledonium* به طریقه کشت درون شیشه‌ای، نشان دادند که تولید اسپور قارچ‌های میکوریز آربسکولار در محیط کشت از یک منحنی S شکل تبعیت می‌کند که دارای سه مرحله است. مرحله تأخیر که در آن اسپوری تولید نمی‌شود. مرحله دوم که در آن با گذشت زمان اسپورهای تولید شده افزایش می‌یابد و در نهایت مرحله سوم که در آن با گذشت زمان تعداد اسپورهای تولید شده ثابت می‌باشد.

جاج و همکاران (2002) در طی تحقیق صورت گرفته بر روی قارچ *G. intraradices* نشان دادند که چنان چه اسپورهای این قارچ قبل از کشت به طریقه دورن شیشه‌ای، حداقل به مدت 14روز در دمای $+4^{o}C$ قرار گیرند، جوانه‌زنی اسپور بیشتر شده، حرکت هیف قارچ به سمت ریشه‌های القایی سریعتر صورت گرفته و در نهایت کلنیزاسیون ریشه به نحو مؤثرتری انجام می‌پذیرد.

دالپه و دکلرک (2002) با انجام تغییراتی در ترکیب محیط کشت استفاده شده توانستند برای اولین بار تلقیح ریشه‌های القایی هویج را با استفاده از اسپورهای استریل شده گونه *Acaulosporarehmi* با موفقیت به انجام برسانند. اندام فعال قارچ پس از کلنیزاسیون ریشه در محیط کشت گسترده شده و قارچ توانسته است با تکمیل سیکل زندگی خود، اسپورزایی نماید.

هدف از انجام این تحقیق تلاش برای بومی سازی تکنیک کشت درون شیشه‌ای برای تکثیر قارچ‌های میکوریز آربسکولار می‌باشد. این کار در مرحله اول بر مبنی تهیه ریشه‌های القایی از دیسک ریشه‌ای هویج استوار بوده که به دلیل پایداری ژنتیکی هم اکنون به عنوان یک وسیله و روش آزمایشگاهی مناسب برای تحقیق پیرامون جنبه های مختلف رابطه همزیستی میکوریزی مورد توجه محققین این رشته علمی قرار گرفته و در مرحله دوم بررسی امکان استفاده از این روش برای تکثیر سه گونه قارچ میکوریز آربسکولار بومی و جداسازی شده از خاک‌های کشور است.

مواد و روش‌ها

سویه‌های باکتری

در این پژوهش سه سویه باکتری *Agrobacterium rhizogenes* شامل سویه‌های A4V,A4S (جداسازی شده از ریشه گیاه رز در کالیفرنیا) ارسالی از دانشگاه مک گیل کانادا و یک سویه منصوب به این باکتری تهیه شده از مرکز تحقیقات ملی ژنتیک و علوم زیستی مورد استفاده قرار گرفت.

تهیه بافت‌های گیاهی موردنیاز هویج

بر اساس روش ارائه شده توسط ریدر و همکاران (1985) غده‌های ریشه‌ای هویج تازه خریداری شد از بازار، بعد از شستشو با آب و مایع ظرفشویی به مدت 45-30 ثانیه، درون الکل 96 درجه فرو برده شدند. سپس هویج‌ها در محلول وایتکس صنعتی 20% به مدت 20- 15 دقیقه ضدعفونی سطحی شدند. بعد از این مرحله هویج‌ها 4-3 مرتبه با آب استریل آبکشی شدند و از این غده‌های ریشه‌ای استریل برای تلقیح با باکتری استفاده گردید.

تلقیح بافت‌گیاهی با باکتری

تهیه کشت باکتری

باکتری‌ها از روی محیط نگهداری اسلنت شده، بر روی محیط کشت YMA[1] جامد کشت داده و در دمای 25^{0C} در تاریکی انکوبه شدند. بعد از 48 ساعت انکوباسیون، بر اساس روش ارائه شده توسط کر (1992) و موگنیر (1988) از باکتری‌های رشد کرده بر روی این محیط برای تلقیح دیسک‌های هویج استفاده شد.

تلقیح دیسک‌های هویج با باکتری

بر اساس توصیه ریدر و همکاران (1985) دو

[1] Yeast Mannitol Agar

Archive of SID

www.SID.ir

سانتی‌متر از انتهای ریشه‌های غده‌ای استریل هویج قطع و ریشه‌های پوست کنده شده به صورت دیسک‌هایی با ضخامت 10-5 میلی‌متر بریده و سپس سطح رو به نوک ریشه دیسک‌ها (apical) در ناحیه کامبیوم با باکتری مورد نظر از روی محیط جامد تلقیح شدند. تعدادی از دیسک‌های تلقیح شده روی محیط آب- آگار (0/8%) و تعدادی هم بر روی محیط MS قرار داده و تحت نور ضعیف 350 لوکس در دمای 25^0C انکوبه شدند. تعدادی از دیسک‌های هویج بدون تلقیح به عنوان شاهد تحت همان شرایط نگه‌داری گردیدند.

آلودگی‌زدایی و پایداری ریشه‌ها

بعد از ظهور ریشه‌های القایی بر روی بافت‌های تلقیح شده (که از نظر مورفولوژی با ریشه‌های معمولی متفاوت بودند) و بعد از اینکه طول ریشه‌ها به 5-4 سانتی‌متر رسید، انتقال ریشه‌ها و حذف باکتری *A.rhizogenes* بر اساس روش گولد و همکاران (1991) انجام شد.

تهیه اسپور قارچهای میکوریز آربسکولار

اسپورهایسه گونه قارچ میکوریزی با نام *Glomus intraradices*، *Glomus etunicatum* و *Glomus mosseae* طبق روش ارائه شده توسط موکرجی و همکاران (2002) در طی یک دوره کشت چهار ماهه در مجاورت ریشه گیاه سورگوم در محیط متشکل از سه قسمت ماسه و یک قسمت خاک با بافت لوم که به همراه گلدان 4 کیلوگرمی حاوی آنها استریل شده بود درگلخانه با نور طبیعی و درجه حرارت 16^0C الی 28^0C و طول روز 14 ساعت روشنایی و 10 ساعت خاموشی تکثیر گردیدند.

کشت همزمان ریشه القایی و اسپور قارچها

بدین منظور از قرار دادن تکه‌های ریشه‌های القایی به طول 3 الی 4 سانتی‌متر بر روی محیط کشت M پیشنهادی توسط بکارد و فورتین (1988) استفاده گردید. برای کلنیزه کردن این ریشه‌ها، در هر پلیت تعداد 10 الی 12 اسپور ضدعفونی سطحی شده با روش بکارد و پیچ (1992) از سه گونه قارچ میکوریزی (در هر پلیت از یک گونه استفاده گردید و برای هر گونه قارچ 50 پلیت در نظر گرفته شد) را در مجاورت رأس ریشه‌های فرعی قرار داده و پس از مسدود کردن درب پلیت ها با پارافیلم، پلیت‌ها به صورت معکوس درون انکوباتور با دمای 28^0C و در تاریکی مطلق قرار داده شدند. پس از گذشت دو هفته الی یک ماه از اتمام این مرحله پلیت‌ها به صورت روزانه با استفاده از استریومیکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفته و با مشخص نمودن قطعات ریشه‌ای که با اسپور قارچ کلونیزه و در اطراف ریشه شبکه هیف قارچ گسترده شده بودند، برای تکثیر این گونه از قارچ‌های میکوریز آربسکولار با روش پیشنهادی فورتین و همکاران (2002) استفاده گردید.

تکثیر سه گونه قارچ میکوریزی به طریقه کشت درون شیشه‌ای

در مرحله تکثیر از بطری‌های شیشه‌ای درپیچ‌دار با حجم 250 میلی‌لیتر حاوی 100 میلی‌لیتر محیط کشت M استریل به همراه 0/3 درصد فیتاژل استفاده گردید. در شرایط کاملاً استریل درب پلیت‌ها باز شده و ریشه‌های کلنیزه شده با قارچ با بریدن محیط کشت اطراف آن به همراه تکه‌ای از محیط‌کشت به درون بطری‌های شیشه‌ای منتقل گردیدند. درب بطری‌های شیشه‌ای بسته و پس از مسدود کردن کامل آنها با پارافیلم، درون انکوباتور با دمای 28^0C به مدت 12 هفته نگهداری شدند (آدهولیا و همکاران، 1997).

جداسازی و شمارش اسپورهای تشکیل شده

برای جدا کردن اسپورهای تشکیل شده درون محیط کشت از بافر سیترات سدیم 10 میلی‌مولار استفاده گردید. بر اساس روش دکلرک و همکاران (2005) پس از باز شدن کامل ژل بافر سیترات سدیم و اسپورهای رها شده در ژل، اسپورها به الک 400 مش منتقل و با مقدار کافی آب تا حذف کامل بافر سیترات سدیم شستشو داده شدند. پس از اتمام شستشو، اسپورها به بشر حاوی آب مقطر منتقل گردیدند. برای شمارش تعداد اسپورهای تولیدی، حجم مشخص از بشر حاوی آب مقطر و اسپورها به کاغذ صافی شبکه‌بندی شده منتقل گردیده و با استفاده از دستگاه استریومیکروسکوپ، تعداد اسپورها شمارش گردید.

تعیین درصد کلنیزاسیون ریشه القایی با قارچ‌های میکوریزی

پس از گذشت 12 هفته از تهیه مایه تلقیح دو گونه قارچ میکوریزی به روش کشت درون شیشه‌ای، مقدار کافی از ریشه‌های تولید شده برداشت و با استفاده از ماده تریپان بلو در لاکتوگلیسیرول رنگ آمیزی گردیدند. برای اندازه‌گیری درصد کلنیزاسیون ریشه یک صد قطعه یک سانتی‌متری از ریشه‌های رنگ‌آمیزی شده را بر روی چهار لام میکروسکوپ قرار داده و با اضافه کردن چند قطره محلول لاکتوگلیسیرول، ریشه‌ها با لامل پوشانیده شدند. با بررسی‌های میکروسکوپی با بزرگنمایی 250X برای هر قطعه یک سانتی‌متری ریشه، درصد کلنیزاسیون تعیین و میانگین درصد کلنیزاسیون قطعات ریشه‌ای محاسبه گردید (موکرجی و همکاران 2002).

Archive of SID

www.SID.ir

نتایج

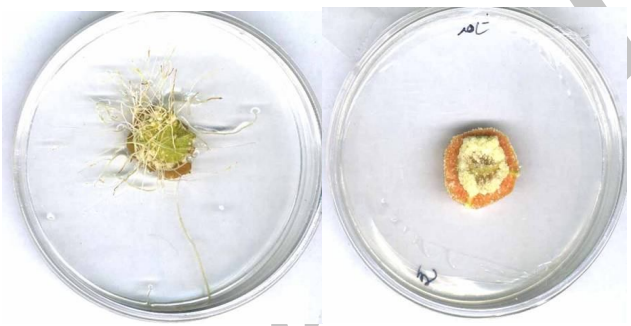
تولید ریشه‌های القایی

بر روی دیسک‌های هویج تلقیح شده با باکتری 1 تا 6 هفته بعد از انکوباسیون، بافت کالوس تشکیل گردید و 5-4 روز بعد، از محل بافت کالوس بوجود آمده، ریشه‌هایی موئی ظاهر گردیدند.

این نتایج در مورد دیسک‌های تلقیح شده‌ای می‌باشد که بعد از تلقیح بر روی محیط آب– آگار قرارگرفته بودند، اما در مورد دیسک‌هایی که بعد از تلقیح بر روی محیط MS قرار گرفتند، زمان ظهور ریشه کوتاه‌تر بود، لیکن آلودگی نمونه‌ها در این محیط بسیار بالا و به دلیل این آلودگی زیاد درصد دیسک‌هایی که موفق به تشکیل ریشه‌های القایی گشتند، بسیار ناچیز بود.

در دیسک‌های تلقیح شده با هر سه سویه باکتری، علاوه بر ریشه‌های القایی که در سطح رو به نوک ریشه یعنی apical تشکیل شده بود، ریشه‌های موئی با تراکم کمتر در سطح رو به بخش هوایی یعنی basal نیز تشکیل شدند.

درصد تشکیل ریشه‌های القایی در دیسک‌های هویج تلقیح شده با سه سویه باکتری که بر روی محیط آب – آگار قرار گرفته بودند، در جدول 1 آورده شده است. رشد ریشه‌های القایی به طور میانگین 4/1 میلی متر در روز اندازه‌گیری گردید. در نمونه‌های شاهد بعد از یک هفته کالوس‌هایی غیر از دیسک‌های تلقیح شده، ایجاد شد، اما از آن کالوس‌ها حتی بعد از گذشت 2 ماه نیز ریشه ای ظاهر نشد.



شکل 1- تصویر سمت چپ یک دیسک تلقیح شده را نشان می‌دهد که بعد از 6-5 هفته از محل کالوس‌های ایجاد شده، ریشه‌های باریک و انبوهی مشاهده گردید. تصویر سمت راست نشان دهنده دیسک هویجی است که بدون تلقیح با باکتری و به عنوان شاهد در نظر گرفته شده است.

جدول 1- اثر مختلف باکتری *A.rhizogenes* در تولید ریشه‌های القایی در دیسک‌های هویج

نوع سویه	تعداد دیسک تلفیح شده	تعداد دیسک ریشه‌دار شده	درصد تشکیل ریشه‌های القایی
A4V	25	9	36
A4S	25	12	48
منصوب به این باکتری	25	11	44
شاهد	25	0	0

آلودگی‌زدایی باکتری از ریشه‌های القایی

ریشه‌های القایی همان طور که گفته شد برای آلودگی‌زدایی باکتری *A.rhizogenes* بر روی محیط MS حاوی آنتی بیوتیک سفوتاکسیم قرار داده شدند. تصاویر زیر نشان دهنده ریشه‌های قرار داده شده بر روی این محیط می‌باشند.

Archive of SID

www.SID.ir

شکل 2- ریشه‌های القایی بر روی محیط MS حاوی آنتی بیوتیک سفوتاکسیم

ضد عفونی سطحی اسپور قارچ‌های میکوریزی

نتایج نشان داد که حدود 70 درصد از اسپورها پس از گذشت چندین هفته بر روی محیط کشت MS (بدون ایجاد لکه ناشی از رشد میکروبی در محیط پیرامون خود) هیچ گونه آلودگی سطحی نداشتند. معمولاً در روش‌های استریل سطحی، در مورد اسپورهای قارچ‌های میکوریز آربسکولار آنچه که از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است، حفظ قدرت جوانه زنی و رویش اسپور همراه با حذف آلودگی‌های سطحی می‌باشد. بنابراین حذف کامل آلودگی‌ها غیر ممکن بوده و در صورت امکان قدرت رویشی اسپور را نیز از بین می‌برد.

برقراری رابطه همزیستی بین ریشه‌های القایی هویج و اسپور سه گونه قارچ میکوریزی

نتایج نشان داد که در 40 پلیت از 50 پلیت که از گونه *G. intraradices* به عنوان قارچ همزیست استفاده شده بود، رابطه همزیستی برقرار شده و قارچ قسمت عمده‌ای از حجم پلیت را با گسترده کردن هیف‌های خود و تولید اسپور اشغال کرده بود.

در 15 پلیت از 50 پلیتی که از قارچ *G. etunicatum* به عنوان قارچ همزیست استفاده گردید، رابطه همزیستی میکوریزی برقرار و گسترده شدن شبکه میسلیومی قارچ در این پلیت‌ها مشاهده گردید.

در 5 پلیت از 50 پلیتی که از قارچ *G. mosseae* به عنوان قارچ همزیست استفاده شد، گسترده شدن هیف قارچ در پلیت مشاهده گردید، لیکن در هیچ یک از موارد تولید اسپور در پلیت مشاهده نگردید.

شکل 3- کشت همزمان ریشه‌های القایی و اسپور سه گونه قارچ میکوریزی

تکثیر سه گونه قارچ میکوریزی به طریقه کشت درون شیشه‌ای

نتایج کشت همزمان ریشه و سه گونه قارچ میکوریزی در بطری‌های درپیچ دار 250 میلی لیتری با گذشت زمان 12 هفته، نشان داد که در اکثر بطری‌های حاوی قارچ *G. intraradices* (بیش از 90 درصد) قارچ دوره رویشی و زایشی خود را تکمیل کرده و محیط 100 میلی لیتری درون بطری مملو از اسپور قارچ و شبکه گسترده هیف این قارچ شد. در بطری‌های حاوی قارچ *G. etunicatum* تنها در 10 درصد از موارد، قارچ سیکل زندگی خود را طی کرده و اسپورزایی قارچ مشاهده گردید. در بطری‌های حاوی قارچ *G.mosseae* اگرچه در مواردی گسترده شدن شبکه هیف قارچ مشاهده گردید، لیکن در هیچ مورد تکمیل شدن سیکل زندگی قارچ و تشکیل اسپورهای قارچ درون محیط کشت مشاهده نگردید.

جداسازی اسپورهای تشکیل شده از محیط کشت و شمارش آنها

میزان اسپور تولید شده در محیط کشت حاوی قارچ *G. intraradices* حدود 100 تا 110 هزار در 100 میلی لیتر از محیط کشت شمارش گردید. این میزان در مورد قارچ *G. etunicatum* حدود30 درصد مقدار ذکر شده یعنی 30 تا 35 هزار به ازاء هر 100 میلی لیتر از محیط کشت شمارش گردید. در مورد قارچ *G.mosseae* نیز هیچ اسپوری در محیط کشت تشکیل نشد.

Archive of SID

www.SID.ir

تعیین درصد کلنیزاسیون ریشه القایی با قارچ‌های میکوریزی

در مورد دو قارچ *G. etunicatum* و *G. intraradices* درصد کلنیزاسیون ریشه به ترتیب حدود 70 و 80 درصد اندازه‌گیری شد.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج به دست آمده در این پژوهش در ارتباط با سرعت تشکیل ریشه‌های القایی در دیسک‌های هویج بر روی محیط غنی MS در مقایسه با محیط ضعیف آب- گار، نشان داد که محیط‌های غنی مثل MS به تشکیل ریشه‌های موئی شکل کمک می‌کند. خروج قطعه T-DNA از پلاسمید Ri سلول باکتری و ورود آن به سلول گیاهی نتیجه فعالیت‌های ژن‌های ویرولانس قرار گرفته بر روی پلاسمید Ri می‌باشد. شرایط محیطی و از جمله غنی بودن محیط کشت استفاده شده کمک فراوانی به القاء ژن‌های ویرولانس و در نتیجه تشکیل ریشه‌های موئی می‌کند. تنها مشکلی که در استفاده از محیط MS با آن روبرو بودیم، رشد و تکثیر بیش از حد باکتری *A. rhizogenes* در این محیط بود که پس از چند روز، پوسیدگی دیسک‌های هویج را در پی داشت. بنابراین می‌توان توصیه نمود که در مورد دیسک‌های هویج به جای استفاده از محیط MS غنی، از محیط آب- اگار استفاده گردد. نتایجی که از تلقیح دیسک‌های هویج با سه سویه باکتری به دست آمد نشان داد که هر سه سویه باکتری قادر به القاء ریشه‌های موئی در هر دو قطب دیسک‌های هویج می‌باشند و بنابراین هر سه این سویه‌ها در گروه سویه‌های غیرقطبی قرار می‌گیرند. به عبارت دیگر هر سه سویه در قطعه T-DNA خود دارای ژن‌های سنتزکننده هورمون اکسین هستند و بنابراین بدون احتیاج به اکسین مکمل خارجی باعث تکثیر ریشه در دو طرف دیسک‌های هویج می‌شوند.

پایداری ریشه‌های القاء شده بوسیله باکتری *A.rhizogenes* نتیجه ادغام موفق T-DNA درون ژنوم گیاهی و بیان ژن‌های مستقر در آن می‌باشد. آنچه که از نظر این پژوهش اهمیت داشت، توانایی رشد این ریشه‌ها در محیط‌های سنتز شده آزمایشگاهی و امکان تکثیر قارچ‌های میکوریز آربسکولار توسط این ریشه‌ها بود که بخش دوم این پژوهش را تشکیل داد.

تکثیر قارچ *G.intraradices* به طریقه کشت درون شیشه‌ای و بررسی خصوصیات کمی و کیفی مایه تلقیح تهیه شده نشانگر پتانسیل بسیار بالای این روش برای تکثیر این گونه از قارچ‌های میکوریز آربسکولار می‌باشد. اضافه کردن حجم محیط کشت به 100 میلی لیتر و همچنین استفاده از بطری‌های شیشه‌ای درپیچ دار با حجم 250 میلی‌لیتر که فضای کافی برای گسترش ریشه‌های القایی کلنیزه شده با قارچ را دارا می‌باشند و همچنین استفاده از ماده ژل کننده فیتاژل به جای آگار که جمع‌آوری تمامی اسپورها و هیف‌های تشکیل شده درون محیط کشت را امکان‌پذیر می‌نماید، باعث تبدیل این روش از یک وسیله صرفاً تحقیقاتی به روشی مؤثر جهت تکثیر این قارچ‌ها گردیده است. میزان اسپور تولیدی در این روش به ازاء 100 میلی‌لیتر ازمحیط کشت و پس از گذشت 12 هفته بالغ بر 000، 100 عدد می‌باشد. با احتساب تکه‌های ریشه کلونیزه شده با قارچ که چیزی در حدود 50 الی 70 درصد از کل ریشه‌ها بوده و همچنین تکه‌های هیف این قارچ که دارای قدرت رویشی و در مجموع تعداد آنها سه برابر تعداد اسپور تولیدی می‌باشد، به عدد 000، 400 اندام فعال قارچی به ازاء هر 100 میلی‌لیتر از محیط کشت رسیدیم، لیکن در مورد قارچ *G. etunicatum* مشاهده گردید که این روش از کارایی کمتری برخوردار و میزان اسپور تولیدی نیز حدود 30 درصد گونه قبلی می‌باشد، ولی باز در مقایسه با روش‌های تولید مایه تلقیح این قارچ به روش سنتی، روش کشت درون شیشه‌ای از نظر کیفیت، کارایی، خلوص مایه تلقیح تولیدی و عاری بودن آن از آلودگی‌های جنبی قابل توصیه می‌باشد. میزان اسپور تولیدی توسط این دو قارچ تا حدودی شبیه به نتایج ارائه شده توسط سایر محققین می‌باشد (آدهولیا و همکاران، 1997; دالپه و دکلرک، 2002; دکلرک و همکاران 1996). اگرچه باید توجه داشت که گونه‌های مختلف قارچ‌های میکوریز آربسکولار توانایی متفاوتی در اسپورزایی در روش کشت درون شیشه‌ای از خود نشان می‌دهند. تاکنون بیشترین میزان اسپور تولیدی در کشت درون شیشه‌ای در قارچ *G.intraradices* شمارش گردیده است.

تکثیر قارچ *G.mosseae* به روش کشت درون شیشه‌ای با مواد و روش‌های استفاده شده در این تحقیق میسر نگردید. لذا توصیه می‌شود برای استفاده ازپتانسیل خوب این قارچ در اراضی زیر کشت گیاهان زراعی، روش کشت درون شیشه‌ای برای تکثیر این قارچ، اصلاح شده و یا اینکه از روش‌های پیشرفته دیگری مثل هیدروپونیک و آئروپونیک استفاده گردد.

Archive of SID

www.SID.ir

فهرست منابع:

1. Adholeya, A., Varma, A. and Bhatia, N. P. 1997. Influence of the media gelling agents on root biomass, and *in vitro* VA-mycorrhizal symbiosis of carrot, with *Gigaspora margarita*. Biotropia 10: 63-74.
2. Becard, G. and Fortin, Y. 1988. New aspects of the acquisition of biotrophic status by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*. New Phytologist 112: 77-83.
3. Becard, G. and Piche, Y. 1992. Establishment of vesicular-arbuscularmycorrhiza in root organ cultuer: review and proposed methodology. p. 89-108. In: Norris, J., Read, D. and Varma, A. (eds.) Techniques for the Study of Mycorrhiza. Academic Press, New York.
4. Dalpe, Y. and Declerck, S. 2002. Development of *Acaulosporarehmii*spore and hyphal swellings under root-organ culture. Mycologia 94(5): 850-855.
5. Declerck, S., Strula, D.G., Fortin, J.A. 2005. In Vitro Culture of Mycorrhiza. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
6. Declerck, S., Cranenbrouck, S. and Le-Boulenge, E. 2001. Modeling the sporulation dynamics of arbuscualr mycorrhizal fungi in monoxenic culture. Mycorrhiza 11: 225-230.
7. Declerck, S., Strullu, D.G. and Plenchette, C. 1998. Monoxenic culture of the intraradical forms of *Glomus* sp. isolated from a tropical ecosystem: a proposed methodology for germplasm collection. Mycologia 90: 579-585.
8. Declerck, S., Strullu, D.G. and Plenhette, C. 1996. *In vitro* mass production of the arbuscualr mycorrhizal fungus *Glomus versiforme* associated with Ri T-DNA transformed carrot roots. Mycological Research 100: 1237-1242.
9. Fortin, J. A., Becard, G., Declerck, S., Dalpe, Y. St-Arnaud, M., Coughlan, A.P. and Piche, Y. 2002. Arbuscularmycorrhiza on root-organ culture. Canadian. Journal of Botany 80: 1-20.
10. Gadkar, V. and Adholeya, A. 2000. Intraradical sporulation of AM *Gigaspora margarita* in long-term axenic cultivation in Ri T-DNA carrot root. Mycological Research 104(6): 716-721.
11. Gold, T., Lee, J., Husnain, J.Y. and Davey, M.R. 1991. Agrobacterium rhizogenes mediated transformation of the frag blegumesMedicago sativa and Onobrychisvisifolia. Journal of Experimental Botany 42:1147-1157.
12. Hung, L.L. and Sylvia, D.M. 1988. Production of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus inoculum in aeroponic culture. Applied and Environmental Microbiology 54(2): 353-357.
13. Juge, C., Samson, J., Bastien, C., Vierheilig, H., Coughlan, A. and Piche, Y. 2002. Breaking dormancy in spores of the arbuscualr mycorrhizal fungus *Glomus intraradices:* a critical cold-storage period. Mycorrhiza 12: 37-42.
14. Kerr, A. 1992. The genus *Agrobacterium.* p. 2214-2235. In: Balows, A., Truper, H., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K. H. (eds.) The procaryotes. A hand book on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications. Second edition, Volume III, Springer-Verlag Press.
15. Mugnier, J. 1988. Establishment of new axenic hairy root lines by inoculation with *Agrobacterium rhizogenes.* Plant Cell Report 7: 9-12.
16. Mugnier, J. and Mosse, B. 1987. Vesicular-arbuscular infections in Ri-T-DNA transformed roots grown axenically. Phytopathology 77: 1045-1050.
17. Mukerji, K.G., Manoharachary,C. and Chamola, B.P. 2002. Techniques in Mycorrhizal Studies. Kluwer Academic Publisher.

Archive of SID

www.SID.ir

18. Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for the rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiology of Plant 15: 473-479.
19. Noda, T., Tanaka, N., Mano, Y., Nabeshima, S., Okawa, H. and Matsui, C. 1987. Regeneration of horseradish hairy roots incited by *Agrobacterium rhizogenes.* Plant Cell Report 6: 283-286.
20. Ryder, M.H., Tate, M.E. and Keer, A. 1985. Virolance properties of strain of Agrobacterium on the apical and basal surface of Carrot root discs. Plant Physiology77:215-221.
21. Strullu, D.G. and Romand, C. 1986. Culture axenique de vesiculesisoleesa partir dendomycorhizes et re-association in vitro a des racines de tomate. C. R. Acad. Sci. Paris Ser, III. 305: 15-19.
22. Tanaka, N., Hayakawa, M., Mano, Y., Phkawa, H. and Matsui, C. 1985. Infection of turnip and radish storage roots with *Agrobacterium rhizogenes.* Plant Cell Report 4: 74-77.
23. Trypsteen, M., Lijsebettens, M.V., Severen, R.V. and Montagu, M.V. 1991. *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation of *Echinacea purpura*. Plant Cell Report 10: 85-89.
24. Vimard, B., St-Arnaud, M., Furlan, V. and Fortin, J. A. 1999. Colonization potential of *in vitro*-produced arbuscular mycorrhizal fungus spores compared with a root-segment inoculum from open pot culture. Mycorrhiza 8: 335-338.

Archive of SID

www.SID.ir