تعیین تاثیر جدایه‌های باکتری مزوریزوبیوم سیسری بر استقرار قارچهای میکوریز آربوسکولار در ریشه و گره نخود با استفاده از روش مولکولی

علیرضا توسلی[1]، ناصر علی اصغر زاد[2]، غلامرضا صالحی جوزانی[3]، احمد اصغر زاده[4] و محسن مردی[5]

1- عضو هیات علمی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی آذربایجان شرقی

2- استاد گروه خاکشناسی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز

3 و5- استادیار پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی کرج

4- استادیار موسسه تحقیقات خاک و آب تهران
ar.tavasolee@yahoo.ca

چکیده

در همزیستی سه‌جانبه گیاه لگوم، باکتری ریزوبیوم و قارچ میکوریز میزان برقراری هر یک از همزیست‌ها و توسعه میکروبیونت‌ها در ریشه گیاه می‌تواند تحت تأثیر متقابل باکتری و قارچ باشد. در این تحقیق 6 جدایه باکتری ***Mesorhizobium ciceri*** و دو گونه قارچ میکوریز آربوسکولار ***Glomus intraradices*** (GI) و ***G. mosseae*** (GM) با بذور نخود مایه‌زنی شدند. پس از 8 هفته رشد گیاه، با استفاده از روش مولکولی Quantitative real-time PCR نسبت و تراکم گونه‌های قارچی در ریشه و گره نخود تحت تاثیر جدایه‌های باکتری تعیین گردید. نتایج نشان داد تیمارهای مایه‌زنی باکتری تاثیر معنی‌داری بر تراکم دو گونه GI و GM در ریشه‌ها و گره‌های نخود داشتند.

کلمات کلیدی : **تراکم، جدایه‌های مزوریزوبیوم، گره، میکوریز، نسبت مولکولی**

مقدمه

ترکیب گونه‌های فعال از جمعیت‌های AM در داخل ریشه‌ها فقط بوسیله روشهای مولکولی می‌تواند مورد آنالیز قرار گیرد. بدین خاطر چندین روش ردیابی بر پایه PCR در چند ساله اخیر توسعه یافته است و برخی از آنها در نمونه‌های حاصل از مزرعه نیز مورد استفاده قرار گرفته‌اند (هلگاسون و همکاران، 1998). آلکان و همکاران (2004) یک روش سریع جهت تعیین میزان کمی قارچهای میکوریز آربوسکولار ***Glomus intraradices*** در گیاهان با استفاده از تکنیک واکنش qRT- PCR[1] ارائه دادند. تا آنجایی که دانش و بررسی منابع نشان می‌دهد تا به حال تعیین دقیقی از جدایه‌های AMF به صورت کمی در داخل گره‌های ریشه‌ای لگومها صورت نگرفته است. مطالعه حاضر کاربرد qRT – PCR را به عنوان یک سیستم تعیین کمی گونه‌های قارچی، جهت ارزیابی اثرات متقابل بین دو گونه از AMF در کلنیزاسیون ریشه و گره نخود تحت تاثیر جدایه‌های باکتری همزیست نخود مورد بررسی قرار می‌دهد.

مواد و روشها

در این آزمایش 6 جدایه باکتری همزیست نخود، 1 تیمار مخلوط 6 جدایه و 1 تیمار بدون باکتری، که در مجموع 8 تیمار باکتری را شامل شدند، در کشت مخلوط با دو گونه قارچ میکوریز ***G .intraradices*** (GI) و ***G. mosseae*** (GM) به گیاه نخود مایه‌زنی گردیدند. پس از گذشت 8 هفته گیاهان برداشت گردیده، ریشه و گره نخود تیمارها

[1] Quantitative real-time PCR

جدا شده و در داخل نیتروژن مایع فریز گردیده و در دمای 80- درجه سانتیگراد نگه‌داری شدند. برای تعیین مولکولی قارچ‌ها در ریشه با استفاده از منابع موجود و پایگاه اطلاعات داده‌های NCBI آغازگرهای مورد نیاز طراحی و تهیه گردید. برای تکثیر اختصاصی قارچ میکوریز گونه GI (کد شناسایی بانک ژن DQ028775) و گونه GM (کد شناسایی بانک ژن AY541918) استفاده به عمل آمد که این جفت آغازگرها قطعه‌ای در حدود 101 bp و 86 bp را تکثیر می-کنند (آلکان، 2006). برای تکثیر اختصاصی DNA گیاه نخود (*Cicer arietinum*) از جفت آغازگری که قطعه‌ای در حدود 126 bp در ناحیه ORF با کد شناسایی بانک ژن (AJ404642.1) را تکثیر می‌کند، استفاده به عمل آمد. استخراج DNA از ریشه و گره‌ها با استفاده از روش‌های ردکر (2000) و دلاپورتا و همکاران (2001) و با اعمال تغییراتی در پروتکل آنها انجام گردید.

سپس جهت تعیین نسبت و تراکم دو گونه قارچ مورد نظر در ریشه و گره از واکنش qRT-PCR استفاده به عمل آمد. این واکنش با دستگاه Bio-rad, MyiQTM Single Color Real Time PCR انجام شد. برای انجام qRT-PCR از کیت سایبرگرین iQTMSYBR®Green Supermix, 1.25 ml) Bio-RAD) استفاده گردید. انجام PCR با برنامه آلکان و همکاران (2006) انجام گردید و در یک سیکل آستانه مشخص (Ct=35) غلظت DNA برای هر نمونه مشخص و با استفاده از روابط زیر نسبت مولکولی و تراکم هر گونه قارچی در ریشه و گره گیاه تعیین گردید (آلکان، 2006).

[مقدار DNA گیاه به نانوگرم(Ct=35)/ مقدار DNA قارچ به نانوگرم(Ct=35)]= نسبت مولکولی گونه قارچی(Ct=35)

وزن خشک ریشه × نسبت مولکولی گونه قارچ در ریشه = تراکم نسبی گونه قارچ در ریشه

وزن تر گره × نسبت مولکولی گونه قارچ در گره = تراکم نسبی گونه قارچ در گره

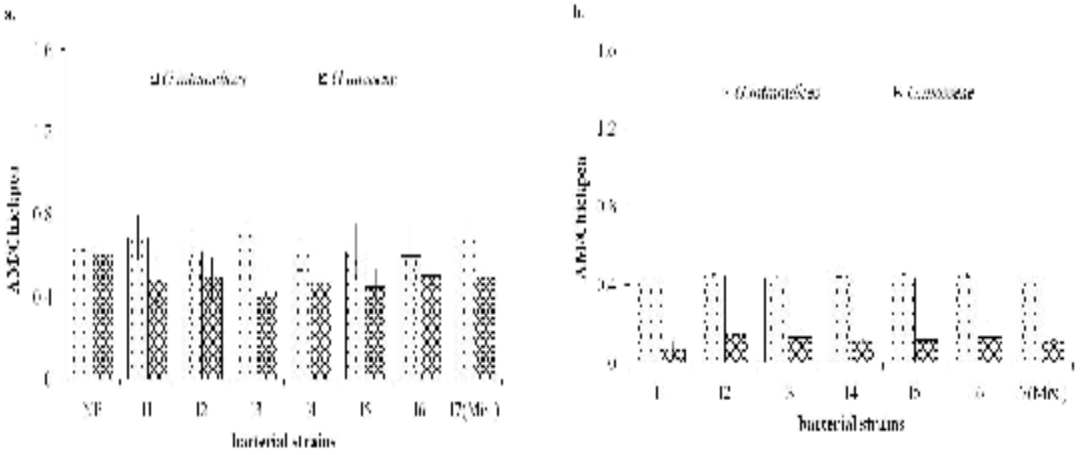
با مقایسه این نسبت‌ها برای هرگونه قارچی میزان استقرار آن گونه در ریشه و گره نخود در کشت مخلوط قارچ‌ها و تحت تاثیر جدایه‌های باکتری مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج و بحث

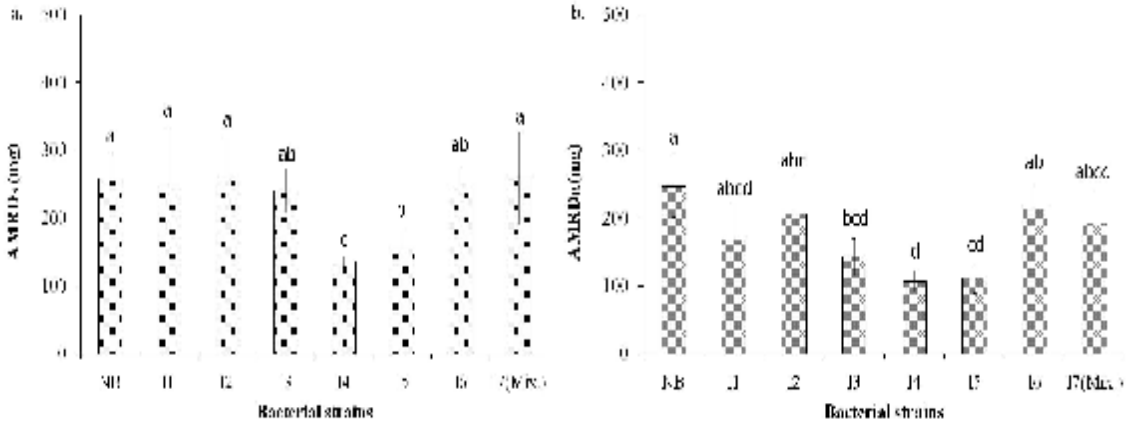
پس از استخراج DNA از ریشه و گره نخود، با استفاده از آغازگرهای اختصاصی سنتز شده برای گیاه نخود، GI و GM و با استفاده از روش PCR معمولی و و برنامه مربوطه نسبت به آزمایش صحت آغازگرها اقدام گردید. نتایج تجزیه واریانس اثر تیمارهای مایه‌زنی باکتری بر نسبت مولکولی دو گونه قارچ میکوریز نشان داد، تیمارهای باکتریایی تاثیر معنی‌داری بر نسبت مولکولی GI و GM در ریشه‌ها و گره‌های نخود نداشتند (شکل 1) ولی جدایه‌های باکتری *M. ciceri* تأثیر معنی‌داری بر تراکم گونه‌های قارچی GI و GM در ریشه‌ها و گره‌های نخود داشتند (شکل 2 و 3). جهت مقایسه تاثیر تیمارهای مختلف بر میزان تراکم مولکولی دو گونه قارچ میکوریز از آزمون مقایسه میانگین‌ها استفاده گردید. این مقایسات نشان می‌دهد، وقتی که گیاه با جدایه‌های 1، 2 و مخلوط جدایه‌ها مایه‌زنی گردید تراکم نسبی GI در ریشه‌ها افزایش یافت، و همچنین وقتی که گیاه با باکتری مایه‌زنی نشده بود، این تراکم بیشتر از سایر جدایه‌ها بود. همچنین تراکم قارچ میکوریز گونه GM وقتی که گیاهان با باکتری مایه‌زنی نشده بودند در ریشه‌ها بیشتر از زمانی بود که مایه‌زنی باکتریایی صورت گرفته بود. نتایج مقایسات میانگین تراکم گونه‌های قارچی در گره‌های نخود نشان می‌دهد، تراکم گونه GI در گره‌های نخود در حضور جدایه‌های 3، 4 و مخلوط جدایه‌ها نسبت به سایر جدایه‌ها افزایش پیدا کرد. همچنین این نتایج نشان می‌دهد تراکم نسبی GM در گره در حضور جدایه 3 نسبت به سایر جدایه‌ها افزایش پیدا کرد.

همانطور که نتایج نشان می‌دهد در اثر مایه‌زنی با باکتری تفاوت معنی‌داری بین تراکم نسبی دوگونه قارچ میکوریز GI و GM در ریشه و گره نخود مشاهده گردیده است. این نتایج نشان می‌دهد مایه‌زنی با باکتری *M. ciceri* بر استقرار و همچنین الگوی استقرار دو گونه قارچ در ریشه و گره نخود تاثیر گذار است. آلکان و همکاران (2006) با استفاده از تکنیک qRT – PCR و استفاده از آغازگرهای اختصاصی برای GI و GM نشان دادند، در کشت مخلوط این قارچ‌ها

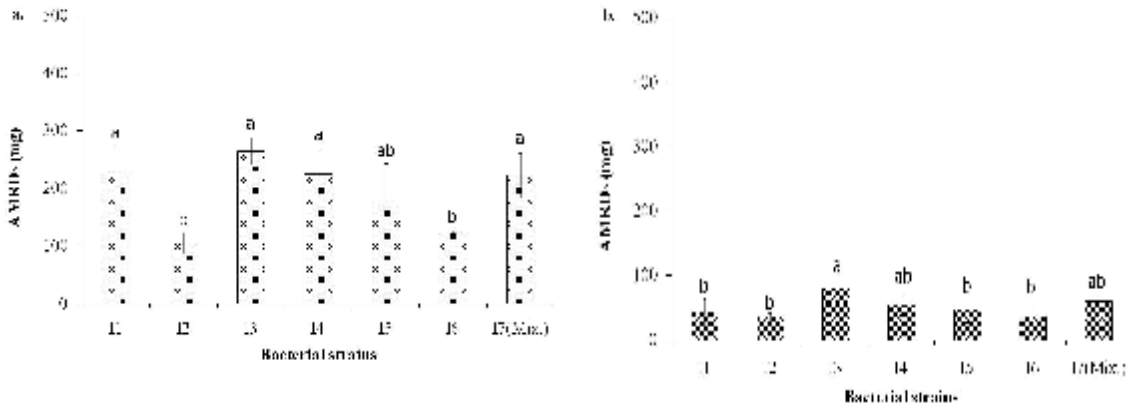
فراوانی گونه *G. intraradices* نسبت به گونه *G. mosseae* در ریشه بیشتر بوده، بنابراین قابلیت آن برای مقاومت به شوری برای گیاه تحت تأثیر تیمارهای شوری خیلی ممتازتر بوده است.



شکل 1- اثر جدایه‌های باکتری بر نسبت مولکولی دو گونه قارچ میکوریز در ریشه (a) و گره (b) نخود. بدون مایه‌زنی با باکتری (NB)، مایه‌زنی با شش جدایه باکتری *M. ciceri* (I6, I5, I4, I3, I2, I1) و مخلوط شش جدایه (I7). AM/Chickpea در محور Y نشان دهنده نسبت مولکولی DNA گونه قارچی به DNA گیاه می‌باشد.



شکل 2- تراکم نسبی بافت قارچی در ریشه نخود در کشت مخلوط قارچها و باکتری . $AMRD_R$ در محور Y مربوط به تراکم نسبی بافت قارچی می‌باشد. a. *G. intraradices* b. *G. mosseae* . بدون مایه‌زنی با باکتری (NB)، مایه‌زنی با شش جدایه باکتری *M. ciceri* (I6, I5, I4, I3, I2, I1) و مخلوط شش جدایه (I7).



شکل 3- تراکم نسبی بافت قارچی در گره نخود در کشت مخلوط قارچ‌ها و باکتری . $AMRD_N$ در محور Y مربوط به تراکم نسبی بافت قارچی می‌باشد. a. *G. mosseae* b. *G. intraradices* مایه‌زنی با شش جدایه باکتری *M. ciceri* (I6, I5, I4, I3, I2, I1) و مخلوط شش جدایه (I7).

جدایه‌های مختلف باکتری تأثیرات معنی‌دار و متفاوتی بر تراکم نسبی قارچ میکوریز در ریشه و گره نخود داشتند. مایه‌زنی با جدایه 2 موجب افزایش بیشتر تراکم نسبی قارچی در ریشه و گره نخود نسبت به سایر جدایه‌های باکتری گردید. همچنین این جدایه موجب افزایش کلنیزاسیون قارچی در کشت مخلوط قارچ‌ها در ریشه گردید. جدایه 3 موجب افزایش تراکم نسبی قارچ میکوریز GI و GM در گره‌ها گردید و همین جدایه موجب کاهش تراکم نسبی قارچ میکوریز GI و GM در ریشه شد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که جدایه 3 موجب افزایش بیشتر جلب قارچ میکوریز به سمت گره‌ها نسبت به بقیهٔ جدایه‌ها می‌گردد. ولی جدایه 2 به طور کلی موجب افزایش بیشتر جلب قارچ میکوریز به سمت ریشه و گره گیاه می‌شود.در حضور جدایه‌های 2 و 6 میزان تراکم نسبی قارچ‌های GI و GM در ریشه بیشتر بودند، ولی این تراکم نسبی در گره، کمتر از بقیه جدایه‌ها می‌باشد. از طرف دیگر میزان کلنیزاسیون قارچی این دو جدایه در ریشه (داده‌ها نشان داده نشده است) بیشتر از بقیه تیمارها بود. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که این دو جدایه تأثیر زیادی بر قارچ‌های میکوریز در کلنیزه‌کردن گره‌های نخود ندارند ولی به طور عمومی موجب افزایش کلنیزاسیون میکوریزی ریشه می‌شوند. مطالعات اخیر از جمله تحقیق حاضر نشان می‌دهد که یک ترجیح گیاهی نیز در استقرار قارچ‌های AM در ریشه دخیل بوده و مورد پذیرش می‌باشد. به نظر می‌رسد این خصوصیت فاکتور مهمی در تعیین ساختار جامعه گیاهی و عملکرد اکوسیستم باشد. تحقیق حاضر به خوبی نشان می‌دهد که جدایه‌های قارچی دارای ترجیح گیاهی در استقرارشان در ریشه و گره گیاه می‌باشند و در مواردی این ترجیح گیاهی تحت تأثیر فاکتور دیگر که باکتری همزیست باشد قرار می‌گیرد.

قدردانی

بدینوسیله از مسئولین و همکاران پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی کرج (ABRII) به خاطر همکاری و حمایت مالی این پژوهش تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

منابع

Alkan N, Gadkar V, Coburn J, Yarden O, Kapulnik Y, 2004. Quantification of the arbuscular mycorrhizal fungus Glomus intraradices in host tissue using real-time polymerase chain reaction. New Phytologist 161:877-885.

Alkan N, Gadkar, V, Yarden O, Kapulnik Y, 2006. Analysis of quantitative interaction between two species of arbuscular fungi, Glomus mosseae and G. intraradices, by real-time PCR. Applied and Environmental Microbiology 72(6):4192-419.

Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB, 1983. A plant DNA mini-preparation: version II. Plant Molecular Biology Reporter 1(14):19-21.

Redecker D, 2000. Specific PCR primers to identify arbuscular mycorrhizal fungi within colonized roots, Mycorrhiza 10: 73-80.

Helgason T, Daniell TJ, Husband R, Fitter AH, Young JPW, 1998. Ploughing up the wood-wide web? Nature 394-431.