تهیه مایه تلقیح قارچهای میکوریز آربسکولار به روش کشت درون شیشه ای

فرهاد رجالی [1]، اشرف اسمعیلی زاد[2]،احمد اصغرزاده[1]،ندا علیزاده[2]

1- عضو هیئت علمی موسسه تحقیقات خاک و آب

2- کارشناس آزمایشگاه بیولوژی موسسه تحقیقات خاک و آب

frejali@yahoo.com ایمیل

چکیده

هدف از انجام این پروژه تحقیقاتی تهیه مایه تلقیح این قارچها به طریقه کشت درون شیشه ای میباشدبا استفاده از سه سویه باکتری *Agrobacterium rhizogenes* و هفت نوع بافت گیاهی شامل دیسک‌های استریل هویج، برگچه‌ها و لپه‌های دانه رست لوبیا، ساقه گیاه کامل لوبیا، ساقه‌های میان گرهی حاصل از کشت بافت سیب‌زمینی، ریشه چه دانه رست استریل یونجه و ساقه‌های میان‌گرهی گیاه کامل یونجه تلاش شد تا ریشه های القایی مورد نیاز برای تکثیر قارچهای میکوریزی تهیه گرددبا توجه به پایداری ژنتیکی ریشه های القایی حاصل از دیسک هویج، این ریشه ها برای انجام مراحل بعدی پروژه مورد استفاده قرار گرفتنداسپورهای سه گونه از قارچهای میکوریزی به نامهای *Gloms etunicatum، Glomus intraradices* و *Gloms mossea* در مجاورت ریشه گیاه سورگم تکثیر شده و پس از جدا سازی از خاک و ضد عفونی سطحی با آنتی بیوتیک در شرایط کاملا استریل در مجاورت راس ریشه های القایی بر روی محیط کشت M medium قرار داده شدند. . نتایج نشان داد که روش کشت درون شیشه ای مناسب برای تکثیر دو قارچ *Glomus intraradices* و*Gloms etunicatum* میباشد.

کلمات کلیدی: ریشه های القایی، کشت درون شیشه ای و قارچهای میکوریز اربسکولار

مقدمه

علی‌رغم تأثیرات شگرفی که قارچهای میکوریز اربسکولار در همزیستی با گیاهان میزبان از خود بروز می‌دهند، ولی این میکروارگانیسم‌ها برخلاف سایر میکروارگانیسم‌های مفیدی که به صورت وسیع و با سهولت تولید و در اراضی کشاورزی مصرف می‌گردند، در محیط مصنوعی رشد نکرده و به دلیل طبیعت همزیست اجباری آنها با ریشه، تنها در مجاورت و حمایت ریشه قابل تکثیر می‌باشند. این مسئله محققین را بر آن داشته است تا با استفاده از تکنیک‌های ویژه (غیر از محیط‌های کشت مصنوعی) مایه تلقیح این قارچها را در مقیاس نیمه‌صنعتی و صنعتی تهیه نمایند. کشت درون شیشه‌ای قارچ و ریشه گیاه میزبان از لحاظ تأمین امکانات و تجهیزات پایه و همچنین هزینه لازم برای افزایش حجم مایه تلقیح از مزیت قابل توجهی برخوردار می‌باشد. (Varma and Adholeya, 1996). از طرف دیگر، پتانسیل بسیار

خوب این روش برای تکثیر اسپورهای عاری از آلودگیهای جنبی، محققین را برآن داشته تا از این تکنیک ویژه به صورت وسیع در تحقیقات مدرن در زمینه‌های مختلف مربوط به قارچهای میکوریز اربسکولار استفاده نمایند. (Fortin *et al*., 2002). اساس روش کشت همزمان ریشه و قارچ به صورت درون شیشه‌ای در مرحله اول بر تهیه ریشه‌های القایی حاصل از تأثیر *Agrobacterium rhizogenes* بر بافتهای مناسب گیاهی و در مرحلهٔ دوم بر مایه‌زنی این ریشه‌ها با اسپورهای ضد عفونی شده سطحی قارچهای میکوریز اربسکولار و در نهایت تهیه شرایط لازم برای رشد و تکثیر این ریشه‌ها استوار می‌باشد.ریشه‌های القایی دارای خصوصیات ویژه‌ای می‌باشند که عبارت است از 1) خیلی سریعتر از ریشه‌های معمولی در محیطهای سنتز شده آزمایشگاهی رشد و تکثیر یافته و بنابراین کشت توده‌ای آنها امکان‌پذیر می‌باشد 2) این ریشه‌ها از نظر رشد و تکثیر مستقل بوده و هیچگونه وابستگی به اندام هوایی گیاه ندارند 3) از نظر ژنتیکی ثابت و پایدار می‌باشند 4) از نظر شکل ظاهری به صورت شاخه شاخه و با انشعابات متعدد دیده می‌شوند 5) دارای زمین‌گرائی منفی می‌باشند (Mukundan *et al*., 1997.)

مواد و روشها

در این پژوهش سه سویه باکتری A rhizogenes شامل سویه های A4V,A4S 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. برای کشت سویه‌های خالص شده *A.rhizogenes* از محیط YMA (Yeast Manitol Agar) و رشد در دمای $25\pm2^{o}C$ و در تاریکی استفاده شد

تهیه بافت‌های گیاهی موردنیاز و تلقیح بافت‌های مختلف با باکتری

برای تهیه ریشه‌های القایی از هفت نوع بافت گیاهی استفاده گردید. نحوه آماده سازی هر نوع بافت گیاهی بر اساس روشهای پیشنهادی شامل دیسک‌های استریل هویج، (Ryder *et al*., 1985) ، ساقه‌های میان گرهی حاصل از کشت بافت سیب‌زمینی، (Dobigny *et al*., 1995.) ریشه چه دانه رست استریل یونجه (Boisson-Dernier 2001) و ساقه‌های میان‌گرهی گیاه کامل یونجه (Golds *et al*., 1991) و برای برگچه‌ها و لپه‌های دانه رست لوبیا و ساقه گیاه کامل لوبیا از روش زیر استفاده گردید.

بذرهای لوبیا مانند یونجه استریل و 3-4 روز انکوبه شده و لپه‌ها و برگچه‌های وسط دو لپه برای تلقیح با باکتری مورد استفاده قرار گرفت. لپه‌ها بصورت منفرد روی محیط MS قرار گرفتند و با استفاده از سوزن استریل آغشته به باکتری از روی محیط جامد، تلقیح در قسمت پشت لپه‌ها انجام شد. برای تهیه گیاهچه کامل لوبیا، بذرهای لوبیا به همان ترتیب استریل و بر روی محیط MS قرار داده شده و بعد از انتقال به دابل جارهای استریل،پس از 4-5 روز به صورت

جوانه کامل درآمده و برای تلقیح با باکتری آماده شد. تلقیح گیاهچه لوبیای کامل با استفاده از سوزن آغشته به باکتری در چند جای مختلف در محور زیر لپه و بالای لپه ساقه انجام شد.

بعد از ظهور ریشه‌های القایی بر روی بافت‌های مایه‌زنی شده انتقال ریشه‌ها و حذف باکتری *A.rhizogenes* صورت گرفت (Golds *et al* ., 1991) . همچنین برای تمامی بافت ها نمونه های شاهد (بدون تلقیح) نیز درنظر گرفته شد.

ضد عفونی اسپور قارچهای میکوریزی و کشت همزمان ریشه القایی حاصل از دیسک هویج و اسپور

اسپورهای سه گونه قارچ میکوریزی با نام *Glomus intraradices,Glomus mossea,Glomus etunicatum* پس از ضدعفونی سطحی (Becard and Piche, 1992) بطور جداگانه با ریشه های القایی حاصل از دیسک های هویج بطور همزمان بر روی محیط M پیشنهادی توسط(Becard and Fortin, 1988)کشت گردیدند. در هر پلیت تعداد 10 الی 12 اسپور ضد عفونی شده را در مجاورت رأس ریشه‌های فرعی قرار داده پس از گذشت دو هفته الی یک ماه با مشخص نمودن قطعات ریشه‌ای که با اسپور قارچ کلونیزه شده و در اطراف ریشه شبکه هیف قارچ گسترده شده بود برای تکثیر این گونه از قارچهای میکوریز اربسکولار استفاده گردید. در نهایت اسپورهای تشکیل شده از محیط کشت جداسازی و با آب درروی الک 400مش شستشو و شمارش گردید. همچنین تعیین درصد کلنیزاسیون ریشه القایی با قارچهای میکوریزی صورت گرفت. (Norris,*et al* , 1994)

نتایج وبحث

نتایج به دست آمده نشان داد که محیط‌های غنی مثل MS به تشکیل ریشه‌های موئی شکل کمک می‌کند(با کمک به القاء ژنهای ویرولانس در پلاسمید Ri). نتایج نشان داده که هر سه سویه باکتری قادر به القاء ریشه‌های موئی در هر دو قطب دیسک‌های هویج می‌باشند و بنابراین هر سه سویه در گروه سویه‌های غیرقطبی قرار می‌گیرند. در بعضی گیاهان مثل هویج و سیب‌زمینی در درصد بالایی از بافت‌های گیاهی استفاده شده، ریشه‌های القایی تشکیل شدند اما در ساقه‌های یونجه و ریشه چه یونجه ریشه‌های القایی تشکیل نشد. تلقیح لپه گیاه لوبیا با این سه سویه موفقیت‌آمیز نبود در حالی که تلقیح برگچه‌ها و ساقه‌های لوبیا با این سه سویه باکتری و گذشت 5 روز از تلقیح، ریشه‌های موئی به صورت ردیفی و پشت سر هم در بافت‌های تلقیح شده مشاهده گردیدند که این احتمالاً بدلیل پخش باکتری در قسمت آوندی ساقه بوده است. ریشه‌های القایی بدست آمده از تمام بافت‌های گیاهی در این پژوهش، بعد از پایداری،تماماً دارای انشعابات فراوان و زمین‌گرایی منفی بودند . همچنین آنچه که از نظر این پژوهش اهمیت دارد، توانایی رشد این ریشه‌ها در محیط‌های سنتز شده آزمایشگاهی و امکان تکثیر قارچ‌های میکوریزآربوسکولار توسط این ریشه‌ها است که بخش دوم این پژوهش را تشکیل داده است. 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 یعنی 000، 400 اندام فعال قارچی به ازاء هر 100 میلی‌لیتر از محیط کشت و تهیه مایه تلقیح این قارچ بدون کوچکترین آلودگی جانبی می‌باشد. لیکن در مورد قارچ *G etunicatum* مشاهده گردید که این روش از کارایی کمتری برخوردار می باشد و میزان اسپور تولیدی نیز حدود 30 در صد گونه قبلی میباشد و تهیه مایه تلقیح گونه *G mossea* به روش کشت درون شیشه ای میسر نگردید لذا توصیه می شود از روشهای پیشرفته دیگری مثل هیدروپونیک و ائروپونیک استفاده گردد.

منابع

1- 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.

2- Becard, G. and Piche, Y. 1992. Establishment of vesicular-arbuscular mycorrhiza in root organ cultuer: review and proposed methodology. *In:* Techniques for the Study of Mycorrhiza. J. Norris, D. Read and A. Varma. (eds). Academic Press, New York. PP. 89-108.

3- Boisson-Dernier, A., Chabaud, M., Garcia, F., Becard, G., Rosenberg, C. and Barker, D. G. 2001. *Agrobacterium rhizogenes* transformed roots of *Medicago truncatula* for the study of nitrogen-fixing and endomycorrhizal symbiotic associations. Molecular Plant-Microbe Interactions. 14(6): 695-700.

4- Dobigny, A., Ambroise, A., Haicour, R., David, C., Rossignol, L. and Sihachakr, D. 1995. Transformation of potato using mannopine and cucumopine strains of *Agrobacterium rhizogenes*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 40: 225-230.

5- Fortin, J. A., Becard, G., Declerck, S., Dalpe, Y. St-Arnaud, M., Coughlan, A. P. and Piche, Y. 2002. Arbuscular mycorrhiza on root-organ culture. Canadian. Journal of Botany. 80: 1-20.

6- Gold,T.,J., Lee,J.Y.,Husnain,t.,Davey,M.R.1991.Agrobacterium rhizogenes mediated transformation of the frag blegumes Medicago sativa and Onobrychis visifolia . Journal of Experimental Botany.42:1147-1157.

7- Mukundan, U., Dawda, H. G., and Ratnaparkhi, S. 1997. Hairy root culture and secondary metabolic production (*Agrobacterium rhizogenes* mediated transformed root culture). Agro Botanica Publication, New Delhi PP: 119.

8- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for the rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiol Plant. 15: 473-479. Norris J.R,.Read D.J and.Varma A.K,1994.Techniques for Mycorrhizal Research. Academic Press.PP 927

9- Norris J.R,.Read D.J and.Varma A.K,1994.Techniques for Mycorrhizal Research. Academic Press.PP 927

10- Ryder,M.H., Tate,M.E.,Keer,A.1985. Virolance properties of strain of Agrobacterium on the apical and basal surface of Carrot root discs. Plant Physiology.77:215-221.

11- Verma, A and Adholeya, A.1996. Cost – economics of existing methodologies for inoculum production of vesicular-arbuscular mucorrhizal fungi In Mukkerji (ed.), Concept in Mycorrhizal Research. Kluwer Academic Publisher. P 179-194