بررسی تنوع مولکولی قارچ های میکوریز آربوسکولار کلنیزه کننده ریشه های گیاهان بومی در منطقه معدن انگوران

مهدی زارعی*[۱]، ناهید صالح راستین[۲]، غلامرضا ثواقبی[۲]، غلامرضا صالحی جوزانی[۳]، سید مجتبی خیام نکویی[۳] و سپیده اکبری والا[۳]

[۱]بخش علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز،

[۲] گروه مهندسی علوم خاک، دانشکده مهندسی آب و خاک، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران،

[۳]بخش ریز سازواره ها و ایمنی زیستی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، ابتدای جاده ماهدشت، روبروی بانک کشاورزی،

مقدمه

معدن انگوران بزرگترین معدن تولید کننده روی و سرب در ایران و منبع عمده آلودگی خاک در منطقه انگوران می باشد. فلزات سنگین می توانند به عنوان یک عامل انتخابی قوی در توسعه میکروارگانیسم های سازش پذیر به تنش ایجاد شده، موثر باشند. در بین میکروارگانیسم های خاک، قارچ های میکوریز آربوسکولار به عنوان میکروسمبیونت عمده همزیست با اکثر گیاهان در خاک های آلوده، نقش مهمی در پالایش زیستی از طریق فعالیت های تثبیت و استخراج گیاهی دارند. موفقیت های پالایش گیاهی می تواند با آگاهی و دانش از تنوع قارچ های میکوریز آربوسکولار و تهیه مایه تلقیح (زادمایه) هایی با سویه های متحمل در مناطق آلوده مثل خاک اطراف یک معدن، افزایش و توسعه یابد. شناسایی مورفولوژی اسپورها به علت یکنواختی عوارض آنها، تغییرات خصوصیات مورفولوژی و عدم هماهنگی بین اسپور و کلنیزاسیون ریشه ها به تنهایی نمی تواند نشانگر تنوع زیستی این قارچ ها باشد. بنابراین اخیرا روش های مولکولی توسعه یافته اند که دانش فیلوژنتیک این قارچ ها را افزایش داده اند(۱و۲). برای مثال **Renker** و همکاران(۲۰۰۳) رهیافت **PCR** آشیانه ای با یک واکنش هضم برشی در بین دو مرحله **PCR** برای تکثیر منطقه **ITS-rDNA** قارچ های میکوریز آربوسکولاراستفاده کردند و توانستند ترکیب گونه ای این قارچ ها را در مزارع مختلف شناسایی کنند. در این تحقیق ساختار جامعه قارچ های میکوریز آربوسکولار اشغال کننده ریشه های گیاهان بومی از نقطه نظر مولکولی، با تکثیر منطقه **ITS-rDNA**، در خاک های آلوده و غیر آلوده مجاور در منطقه معدن انگوران بررسی شده است.

مواد و روشها

منطقه معدن روی و سرب انگوران در استان زنجان واقع شده است. بر اساس مطالعات مزرعه ای و آنالیزهای مقدماتی خاک، نمونه های مرکب ریشه و خاک ریزو سفری از گیاهان بومی غالب در سطوح مختلف آلودگی فلزات سنگین و همچنین منطقه ای به عنوان خاک غیر آلوده برداشت گردید. خصوصیات فیزیکو شیمیایی و بیولوژیک با استفاده از روش های استاندارد اندازه گیری شد. **DNA** با استفاده از **DNeasy plant mini kit** استخراج شد و رقت های ۱:۱،۱:۱۰ و۱:۱۰۰ آن به عنوان الگو در واکنش های زنجیره ای پلیمراز آشیانه ا ی بر اساس روش **Renker** و همکاران(۲۰۰۳) بکار رفت(۱). محصولات خالص شده **PCR** در هر سطح آلودگی، با کیت **pCR4-TOPOvector** همسانه و سپس به داخل باکتری مستعد شده **E. coli TOPO10** ترانسفورم گردیدند. در هر واکنش همسانه سازی حدود ۶۰ کلنی ترانسفورم شده حاوی قطعه مورد نظر با آنزیم برشی **Taq1** هضم شدند. یک یا چند نماینده از هر الگوی برشی انتخاب و توالی یابی شدند. توالی های میکوریزی بدست آمده و توالی های مرجع با نرم افزارهای موجود صف بندی شدند. درخت فیلوژنتیک با استفاده از روش فاصله ژنتیکی **K80** بر اساس توالی های مناطق**5.8S** و **ITS**

با روش **Nj** و نرم افزارهای موجود ترسیم و صحت آن با آزمون **bootstrap** ارزیابی گردید. توالی های بدست آمده در **NCBI** به صورت **FJ008589-FJ008666** وارد شد. تنوع گونه ای با کمک منحنی های قیاس آماری (**Rarefaction analysis curves**) و آنالیز تطبیق (رج بندی) (**Correspondence analyses**) ارزیابی گردید.

نتایج و بحث

۲۹ الگوی **RFLP** متفاوت به وسیله آنزیم برشی **Taq1** از مجموع ۲۴۰ پرگنه (۶۰ پرگنه از هر سطح آلودگی) بدست آمد که ۱ تا ۲ نماینده از هر الگوی آن برای هر یک از سطوح آلودگی توالی‌یابی گردید. در اولین مرحله با کمک جستجوگر **Blastn** ،۱۳/۸ درصدکل **RFLP**ها متعلق به قارچ‌های غیر میکوریز آربوسکولار بودند. تجزیه و تحلیل‌های فیلوژنی منطقه **DNA** ۵/۸**S** ریبوزومی، گروه‌های عمده قارچ‌های میکوریز آربوسکولار شامل گلوموس گروه **Ab**، **Aa** و **B** (خانواده گلومراسه)، گلوموس ورسیفورم (دایورسیسپوراسه) و آکولوسپورا (آکولوسپوراسه) را مشخص نمود. درخت فیلوژنی(فیلوگرام) هر یک از گروه‌های عمده قارچ‌های میکوریز آربوسکولار، بر اساس توالی‌های کل منطقه **ITS** با الگوریتم نزدیک‌ترین همسایه و مدل فاصله ژنتیکی **K80** ترسیم و نوع توالی‌ها یا گونه‌ها جدا گردید. بر این اساس گلوموس اینترارادیسز و گلوموس **sp.1-3** در گروه **Ab** گلوموس، گلوموس موسه‌ای در گروه **Aa** گلوموس، گلوموس کلارویدوم و گلوموس **sp.4** در گروه **B** گلوموس، گلوموس ورسیفورم در خانواده دایورسیسپوراسه و آکولوسپورا**sp.** در خانواده آکولوسپوراسه شناسایی گردیدند. بطور کلی ۸۶/۲ درصد **RFLP**ها متعلق به قارچ‌های میکوریز آربوسکولار بودند که گلوموس گروه **Ab** ۴۸ درصد، گلوموس گروه **Aa** ۲۰ درصد، گلوموس گروه **B** ۱۶ درصد، گلوموس ورسیفورم ۱۲ درصد و آکولوسپورا ۸ درصد از آن را تشکیل داده‌اند. منحنی‌های قیاس آماری بعد از یک افزایش نمایی وجود ۴، ۲، ۶ و ۸ نوع توالی قارچ میکوریز آربوسکولار را به ترتیب در سطوح آلودگی زیاد، متوسط، کم و بدون آلودگی نشان داده‌اند که می‌تواند بیانگر تنوع کامل مولکولی این قارچ‌ها در خاک‌های مورد مطالعه باشند. در ارتباط با توزیع گونه‌ها یا نوع توالی‌های قارچ میکوریز آربوسکولار در سطوح مختلف آلودگی، آنالیز رج‌بندی نشان داده است که با افزایش سطح آلودگی، تنوع گونه‌ای این قارچ‌ها کاهش پیدا کرده است. گلوموس **sp.**۳ فقط در سطح آلودگی زیاد و آکولوسپورا **sp.**تنها درسطح آلودگی کم و یا بدون آلودگی آشکار شده‌اند. توالی‌های گلوموس موسه‌ای در همه مناطق، گلوموس اینترارادیسز، گلوموس ورسیفورم و گلوموس **sp.**۱ در سطوح آلودگی متوسط، کم و بدون آلودگی و گلوموس ۲ **sp.** در نواحی بدون آلودگی یا با آلودگی کم و توالی‌های گروه **B** گلوموس فقط در خاک‌های غیر آلوده وجود داشته‌اند. نتایج مشابهی در ارتباط با گیاه ورونیکا ریچنجری رشد یافته در سطوح مختلف آلودگی در همین منطقه (۳) و بوسیله دیگر محققین گزارش شده است (۲).

منابع

[1] Renker, C., Heinrichs, J., M. Kaldorf and F. Buscot. 2003. Combining nested PCR and restriction digest of the internal transcribed spacer region to characterize arbuscular mycorrhizal fungi on roots from the field. Mycorrhiza 13:191-198.

[2] Vallino, M., Massa, N., Lumini, E., Bianciotto, V., G. Berta and P. Bonfante. 2006. Assessments of arbuscular mycorrhizal fungal diversity in roots of *Solidago gigantea* growing in a polluted soil in Northern Italy. Environ Microbiol. 8:971-983.

[3] Zarei, M., S., König, S., Hempel, M., Khayyam Nekouei, Gh. Savaghebi and Buscot F. 2008. Community structure of arbuscular mycorrhizal fungi associated to *Veronica rechingeri* at Anguran zinc and lead mining region. Environmental Pollution 156 , 1277–1283.