بررسی هم‌زیستی و ردیابی قارچ اندومیکوریز *Priformospora indica* در گیاه برنج

سید حسین موسوی*[1]، ولی‌اله بابایی‌زاد[2]، بهرام شریف‌نبی[1]، سید محمد علوی[3]، محمدعلی تاجیک‌قنبری[3] و امیر مساح[1]

۱. گروه گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

۲. گروه گیاه‌پزشکی دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

۳. پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

*Email: shm.musavi@gmail.com

چکیده

قارچ اندومیکوریز *Priformospora indica* از راسته Sebacinales، رده Hymenomycetes و شاخه بازیدیومیکوتا می‌باشد و روی ریشه تعدادی از گیاهان تیره Poaceae، Brassicaceae، Chenopodiaceae و Solanaceae گزارش شده است. بررسی‌های متعدد نشان داد که این قارچ موجب افزایش طول ریشه و اندام هوایی گیاه، افزایش جذب برخی عناصر غذایی، تحمل بیشتر گیاه به تنش‌های خشکی و شوری و القاء مقاومت سیستمیک علیه عوامل بیمارگر می‌شود. در این مطالعه ریشه گیاهچه‌های چهار روزه در سوسپانسیون 10^{6} کلامیدوسپور قارچ غوطه‌ور و به مدت پنج ساعت در دمای محیط با دور ۴۰ rpm تکان داده شد. گیاهچه‌ها در ظروف حاوی محیط آبی یوشیدا جهت رشد تا زمان نشاء قرار گرفتند. حضور قارچ در بافت کورتکس ریشه و برقراری همزیستی، با رنگ‌آمیزی ریشه و روش مولکولی بررسی شد. با رنگ‌آمیزی ریشه کلامیدوسپورهای قارچ در بافت کورتکس ریشه به صورت گرد تا گلابی‌شکل و زنجیره‌ای مشاهده شد. با استخراج DNA و انجام PCR با آغازگر اختصاصی Tef (accession no.AJ249911) باندی معادل ۱۶۰ جفت باز مربوط به *P. indica* مشاهده شد. نتایج این بررسی نشان داد که هر دو روش ردیابی قارچ در گیاهان تیمارشده کارایی داشته ولی استفاده از تکنیک مولکولی دقیق و مطمئن‌تر است.

واژه‌های کلیدی: اندومیکوریز، برنج، ردیابی، کلامیدوسپور، هم‌زیستی

مقدمه

برنج محصول عمدهٔ غذایی برای حدود نیمی از جمعیت دنیا می‌باشد که در بیش از ۱۱۰ کشور جهان کشت می‌گردد. این گیاه زراعی در ایران بعد از گندم در درجه دوم اهمیت قرار دارد (امانزاده و همکاران، ۱۳۸۵). این گیاه متعلق به جنس *Oryza* از رده گیاهان تک‌لپه‌ای و خانواده غلات است. تعدادی از میکروارگانیسم‌ها در ریشه برخی گیاهان به صورت اندوفیت موجب اثرات مفیدی در رشد و سلامتی گیاهان می‌شوند (کوژل و همکاران، ۲۰۰۶). قارچ‌های میکوریز از مهم‌ترین میکروارگانیسم‌های خاک محسوب می‌شوند که با ایجاد تغییرات ژنتیکی، فیزیولوژیکی و اکولوژیکی در گیاهان میزبان خود، عملکرد آن‌ها را در واحد سطح افزایش می‌دهند. قارچ میکوریزای *Priformospora indica* روی ریشه تعداد زیادی از گیاهان هم چون گیاهان تیره Poaceae، Brassicaceae، Chenopodiaceae و Solanaceae گزارش شده است (شفر و همکاران، ۲۰۰۷ و ورما و همکاران، ۱۹۹۹). قارچ اندومیکوریز *P.indica* متعلق به گروه قارچ‌های میکوریز در راسته سباسینالس، رده هیمنومیست و شاخه بازیدیومیکوتا می‌باشد (ورما و همکاران، ۱۹۹۹). این قارچ موجب افزایش طول ریشه جهت جذب بهتر آب در گیاهان بیابانی، جذب برخی از عناصر غذایی مانند فسفر، کمک به رشد رویشی گیاه، تحریک گیاه در تولید هورمون‌های رشدی، تحمل بیشتر گیاه به تنش‌های خشکی و شوری و حفاظت گیاه در برابر عوامل بیماریزای گیاهی می‌گردد و به عنوان یک اندوفیت محرک رشد معرفی شده است. این قارچ همچنین موجب تحریک مقاومت سیستمیک علیه عوامل بیماریزای ریشه، ساقه و برگ در گیاه شده که این حفاظت سیستمیک گیاه منجر به افزایش عملکرد می‌شود (شفر و همکاران، ۲۰۰۷ و کوژل و همکاران، ۲۰۰۶). بررسی‌ها نشان داد که در ریشه‌های جو کلونیزه به *P. indica* بیان ژن‌های درگیر در متابولیسم هورمون‌های گیاهی عمدتاً جیبرلین، اکسین و آبسیزیک اسید افزایش پیدا کرده است (شفر و همکاران، ۲۰۰۹). بنابراین، پژوهش حاضر با هدف بررسی همزیستی و ردیابی این قارچ در گیاه برنج با روش‌های رنگ‌آمیزی و مولکولی طراحی و اجرا شد.

مواد و روش‌ها

تهیه و تکثیر قارچ اندومیکوریز: در این بررسی جدایه قارچ *P. indica* (اهدایی پروفسور کوژل، رئیس مؤسسه بیماری‌شناسی و جانورشناسی کاربردی دانشگاه گیزن آلمان) در محیط کشت جامد اختصاصی Complex Medium (CM) به مدت یک ماه در دمای ۲۷°C انکوبه شد. برای تهیه مایه تلقیح از آب مقطر استریل به همراه Tween20 به میزان ۰/۰۵ درصد استفاده شد.

کشت گیاه بذر رقم طارم محلی از گروه اصلاح بذر مؤسسه تحقیقات برنج کشور معاونت مازندران (آمل) تهیه شد. با جوانه زدن بذور، گیاهچه‌ها به تشت‌های حاوی محیط آبی یوشیدا انتقال یافت تا کلونیزه شدن قارچ در ریشه برنج مورد ارزیابی قرار گیرد. همچنین تعدادی از گیاهچه‌ها در گلدان‌ها نشاء شدند تا در طول دوره رویشی و زایشی پایداری و حضور قارچ در ریشه در شرایط حاکی نیز مورد بررسی قرار گیرد.

کلونیزه کردن گیاه با قارچ اندومیکوریز: ریشه گیاهچه‌های چهار روزه در سوسپانسیون ml 10^6 کلامیدوسپور قارچ *P.indica* غوطه‌ور کرده و به مدت پنج ساعت روی شیکر در این حالت قرار گرفت. سپس گیاهچه‌ها به تشت‌هایی که حاوی محیط آبی یوشیدا بود انتقال یافت.

بررسی همزیستی ریشه: همزیستی قارچ با ریشه گیاه به دو صورت میکروسکوپی و مولکولی انجام گرفت. در بررسی میکروسکوپی ابتدا ریشه گیاهان تلقیح شده و شاهد رنگ‌آمیزی و سپس زیر میکروسکوپ مورد ارزیابی قرار گرفت. رنگ‌آمیزی ریشه گیاه بر اساس روش ویرهیلیگ و همکاران (۱۹۹۸) با اندک تغییر انجام شد. کلونیزه شدن قارچ در ریشه گیاه در سه مرحله رنگ‌آمیزی ریشه انجام پذیرفت. رنگ‌آمیزی اول از گیاهچه‌های موجود در محیط آبی یوشیدا پس از ۱۵ روز بعد از تلقیح میکوریز، رنگ‌آمیزی دوم بعد از دو هفته پس از نشاء گیاهچه‌ها و رنگ‌آمیزی سوم در پایان خوشه‌دهی انجام پذیرفت تا حضور کلامیدوسپور و هیف قارچ در ریشه مورد ارزیابی قرار گیرد.

در بررسی مولکولی پس از ضدعفونی سطحی ریشه‌های تیمار شده و شاهد، استخراج DNA به روش موریس و تامسون انجام شد. برای ردیابی قارچ میکوریز از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با آغازگر اختصاصی Tef (accession no.AJ249911) استفاده شد. برای بررسی کمیت و کیفیت محصول بدست آمده الکتروفورز با ژل آکارز ۱/۵ درصد انجام شد.

نتایج و بحث

وضعیت همزیستی ریشه: با رنگ‌آمیزی از ریشه به روش ویرهلیک و همکاران (۱۹۹۸) در هر سه مرحله کلامیدوسپورهای قارچ در بافت کورتکس ریشه گیاهان تلقیح شده به صورت گرد تا گلابی‌شکل و زنجیره‌ای مشاهده شد (شکل ۱). توده‌های هیف قارچ نیز در سطح ریشه قابل مشاهده بود در صورتی‌که در ریشه‌های شاهد کلامیدوسپورها و توده‌های هیف مشاهده نشد. همچنین در بررسی مولکولی با آغازگر اختصاصی Tef باندی معادل ۱۶۰ جفت باز مربوط به *P.indica* در نمونه‌های تلقیح شده مشاهده شد و در نمونه‌های شاهد باندی قابل رویت نبود (شکل ۲).

شکل۱: کلامیدوسپورهای قارچ میکوریز *P. indica* در داخل بافت ریشه برنج.

شکل ۲. ارزیابی محصول PCR با ژل آگارز ۱/۵ در صد. چاهک ۱ و ۸ Lader ، چاهک ۲ کنترل مثبت (استخراج مستقیم از قارچ)، چاهک ۳، ۴، ۵ و ۶ گیاهچه‌های تیمار شده با قارچ *P. indica* و چاهک ۷ کنترل منفی (گیاه شاهد).

نتایج بدست آمده از ردیابی قارچ در ریشه در طول دوره رشدی و پایان آن نشان می‌دهد که قارچ شبه‌میکوریز *P.indica* توانسته ریشه برنج را کلونیزه کرده و در بافت کورتکس ریشه تکثیر بالایی را داشته باشد. نتایج این بررسی نشان داد که هر دو روش ردیابی قارچ در گیاهان تیمارشده کارایی داشته ولی استفاده از تکنیک مولکولی دقیق و مطمئن‌تر است. همچنین مقایسه وزن خشک ریشه و ساقه گیاه تیمار شده در مقایسه با گیاه شاهد افزایش معنی‌داری داشت که این افزایش می‌تواند نمایانگر اثر هم‌زیستی قارچ با گیاه باشد.

ردیابی قارچ *P. indica* در ریشه برنج در این بررسی با نتایج بررسی کوگل و همکاران (۲۰۰۶) و والر و همکاران (۲۰۰۵) در گیاه جو، شاهولاری و همکاران (۲۰۰۵) در آرابیدوپسیس و وارما و همکاران (۱۹۹۹) در ذرت مطابقت داشت.

برخی از منابع مورد استفاده

امانزاده م، مومنی ع، اخوت م، جوان نیکخواه م و خسروی و. ۱۳۸۵. مطالعه مقاومت ژنوتیپ‌های برنج (*Oryza sativa* L.) به بیماری بلاست در مرحله گیاهچه و خوشه در مازندران. مجله علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی. ۴۲: ۲۱۹-۲۰۹.

Kogel K H, Franken P, HuckelhovenR, 2006. Endophyte or parasite-what decides?. Current Opinion in Plant Biology, 9 :358–363.

Schafer P, Khatabi B, Kogel K H, 2007. Root cell death and systemic effects of *Piriformospora indica*: a study on mutualism. FEMS MicrobiolLett. 275: 1-7.

Schafer P, Pfiffi S, VollL M, Zajic D, Chandler P M,Waller F, Scholz U, Kuhnemann J P, Sonnewald S, Sonnewald U, KogelK H. 2009. Manipulation of plant innate immunity and gibberellin as factor of compatibility in the mutualistic association of barley roots with *Piriformospora indica*, The Plant Journal, 59: 461–474.

Shahollari B, Varma A, Oelmuller R, 2005. Expression of a receptor kinase in Arabidopsis roots is stimulated by the basidiomycete *Piriformospora indica* and the protein accumulates in Triton X-100 insoluble plasma membrane microdomains. Journal. Plant Physiology, 162:945–958.

Varma A, Verma S, Sudha N, Butehorn B and Franken P, 1999. *Piriformospora indica*, a cultivable plant growth-promoting root endophyte, Applied and Environmental Microbiology, 65:2741-2744.

Vierheilig H, Coughlan A P, Wyss U and Piche Y, 1998. Ink and vinegar, a simple staining technique for arbuscular-mycorrhizal fungi, Applied and Environmental Microbiology. 64: 5004–5007.

Waller F, Achatz B, Baltruschat H, Fodor J, Becker K, Fischer M, Heier T,Ckelhoven R H, Neumann C, Wettstein D, Franken P, Kogel K H, 2005. The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. PNAS 102:13386–13391.