بررسی تاثیر قارچ اندومیکوریز *Piriformospora indica* بر تعدادی از شاخص‌های زراعی گیاه برنج (*Oryza sativa*)

سید حسین موسوی[۱]، ولی اله بابایی زاد[۲]، بهرام شریف نبی[۱]، سید محمد علوی[۲]، محمد علی تاجیک قنبری[۲] و امیر مساح[۱]
۱. گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان
۲. گروه گیاهپزشکی دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
shm.musavi@gmail.com

چکیده
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 اندومیکوریز *Piriformospora indica* از راسته Sebacinales، می‌باشد. بررسی‌های متعدد نشان داد که این قارچ موجب افزایش طول ریشه و اندام هوایی گیاه، افزایش جذب برخی عناصر غذایی و تحمل بیشتر گیاه به تنش‌های خشکی و شوری می‌شود. در این مطالعه ریشه گیاهچه‌های ۴ روزه در سوسپانسیون 10^{6} ml^{-1} کلامیدوسپور قارچ غوطه ور و به مدت ۵ ساعت در دمای محیط با دور ۴۰ rpm تکان داده شد. حضور قارچ در بافت کورتکس ریشه با رنگ آمیزی ریشه و روش مولکولی بررسی شد. پارامترهای زراعی اندازه گیری شده در این بررسی شامل وزن خشک و تر اندام هوایی، تعداد پنجه هاو تعداد خوشه‌ها می باشد. تعداد پنجه‌ها و خوشه‌ها و نیز میزان وزن تر گیاهان تلقیح شده در مقایسه با گیاهان شاهد افزایش معناداری داشته است که این افزایش معنادار پارامتر های زراعی و همچنین ردیابی قارچ در ریشه با رنگ آمیزی ریشه و آغازگر اختصاصی نشان دهنده همزیستی قارچ اندومیکوریز و ارتباط فیزیولوژیکی آن با گیاه برنج می‌باشد.

کلمات کلیدی: اندومیکوریز؛ برنج؛ پنجه زنی؛ کلامیدوسپور؛ *Piriformospora indica*

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 (Poaceae) است. تعدادی از میکروارگانیسم‌ها در ریشه برخی گیاهان به صورت اندوفیت موجب اثرات مفیدی در رشد و سلامتی گیاهان می‌شوند (کوژل و همکاران، ۲۰۰۶). قارچ های 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 *Piriformospora 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 *Piriformospora indica* متعلق به گروه قارچ‌های میکوریز در راسته Sebacinales، رده

Hymenomycetes 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 استرس‌های 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 گیاهان می شود (شفر و همکاران، ۲۰۰۷ و کوژل و همکاران، ۲۰۰۶). بررسی‌ها نشان دادکه در ریشه‌های جو کلونیزه به *P. indica* بیان ژن‌های در گیر در متابولیسم هورمون‌های گیاهی عمدتاً جیبرلین، اکسین و آبسیزیک اسید افزایش پیدا کرده است (شفر و همکاران، ۲۰۰۹). نتایج بدست آمده از بررسی تاثیر قارچ میکوریز *P. indica* بر بهبود رشد و افزایش مقاومت گیاه جو به تنش شوری نشان داد که قارچ دارای توان بالایی در اشغال ناحیه کورتکس ریشه گیاه میزبان می‌باشد. علاوه بر توان تحریک کنندگی رشد گیاه جو توسط قارچ *P. indica* نقش مؤثر در بهبود رشد و عملکرد گیاه تحت شرایط تنش شوری دارد (سپهری و همکاران، ۱۳۸۵).

مواد و روش‌ها

تهیه و تکثیر قارچ اندومیکوریز: در این بررسی جدایه قارچ *P. indica* (اهدایی پروفسور کوژل، رئیس موسسه بیماری شناسی و جانور شناسی کاربردی دانشگاه گیزن آلمان) در محیط کشت جامد اختصاصی Complex medium (CM) به مدت یک ماه در دمای ۲۷ ^{o}C انکوبه شد. برای تهیه مایه تلقیح از آب مقطر استریل به همراه Tween 20 به میزان ۰/۰۵ در صد استفاده شد.

کشت گیاه: بذور ارقام طارم محلی از گروه اصلاح بذر موسسه تحقیقات برنج کشور تهیه شد. با جوانه زدن بذور، گیاهچه‌ها در تشت‌های حاوی محیط آبی یوشیدا انتقال یافت. گیاهچه‌های تلقیح شده و شاهد پس از ۳ هفته در قالب طرح کاملا تصادفی در ۳ تکرار در گلدان‌های بزرگ نشاء شدند تا حضور قارچ در ریشه و همچنین صفات زراعی مورد نظر بررسی شود. فاصله بوته‌ها در هر تکرار ۲۰×۲۰ سانتی متر بوده است. تجزیه واریانس و مقایسه میانگین تیمارها با آزمون دانکن و تجزیه و تحلیل‌های آماری به کمک نرم افزار SAS انجام گرفت.

کلونیزه کردن گیاه با قارچ اندومیکوریز: ریشه گیاهچه‌های ۴ روزه در سوسپانسیون 10^{6} ml^{-1} کلامیدوسپور قارچ *P. indica* غوطه ور کرده و به مدت ۵ ساعت روی shacker در این حالت قرار گرفت.

بررسی همزیستی ریشه : به دو صورت میکروسکوپی و مولکولی انجام گرفت در بررسی میکروسکوپی ابتدا ریشه گیاهان تلقیح شده و شاهد رنگ آمیزی و سپس زیر میکروسکوب مورد ارزیابی قرار گرفت. رنگ آمیزی ریشه گیاه بر اساس روش ویرهیلیگ و همکاران با اندک تغییر استفاده شد (ویرهلیک و همکاران، ۱۹۹۸). 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 PCR با آغازگر اختصاصی Tef (accession no. AJ249911) استفاده شد. برای بررسی کمیت و کیفیت محصول بدست آمده الکتروفورز با ژل آکارز ۱/۵ در صد انجام شد.

اندازه‌گیری صفات زراعی در گیاه برنج: پنج هفته بعد از نشاء گیاهچه‌ها تعداد پنجه ها مورد شمارش قرار گرفت. وزن تر و خشک اندام هوایی نیز مورد ارزیابی قرار گرفت که برای اندازه گیری وزن خشک، نمونه‌ها به مدت ۳ روز در دمای ۷۰

درجه سانتی‌گراد در آون نگهداری و بعد از این مدت با ترازو وزن نمونه‌ها محاسبه شد. پس از کامل شدن دوره زایشی تعداد خوشه‌ها نیز شمارش شد.

نتایج

وضعیت همزیستی ریشه: با رنگ آمیزی از ریشه کلامیدوسپورهای قارچ در بافت کورتکس ریشه گیاهان تلقیح شده مشاهده شد. 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.

میزان پنجه زنی: بررسی مقایسه میانگین تعداد پنجه‌ها اختلاف معنی‌داری داشت به طوری که میزان پنجه‌زنی در گیاهان تلقیح شده نسبت به شاهد افزایش ۵۰ درصدی را نشان داد (شکل ۱).

شکل۱: تاثیر پنجه‌زنی اندومیکوریز *Piriformospora indica* روی گیاه برنج. گیاهان تیمار شده برنج (سمت چپ) در مقایسه با شاهد (سمت راست).

تعدادخوشه: بررسی مقایسه میانگین تعداد خوشه‌ها اختلاف معنی‌داری داشت به طوری که تعداد خوشه‌ها در گیاهان تلقیح شده نسبت به شاهد افزایش ۴۵ درصدی را نشان داد.

وزن تر و خشک اندام هوایی: میزان وزن تر و خشک در گیاهان تلقیح شده در مقایسه با گیاهان شاهد به ترتیب ۳۰ و ۲۳ درصد افزایش داشت.

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		وزن تر (اندام هوایی)	وزن خشک (اندام هوایی)	تعداد پنجه	تعداد خوشه
تیمار	۱	۲۲۳.۹۹ *	۶.۳۰ ns	۳۷.۵۰ *	۲۵.۳۳ *
تکرار	۲	۱۰۰.۷۴ ns	۹.۴۵ ns	۰.۱۶ ns	۱.۱۹ ns
خطا	۲	۱۱.۸۰	۱.۱۳	۱.۵۰	۰.۶۱
ضریب تغییرات		۵.۲۸	۷.۵۵	۱۰.۰۶	۷.۰۱

ns و * به ترتیب غیرمعنی دار و معنی دار در سطح احتمالی پنج درصد.

جدول ۲- نتایج مقایسه میانگین

تیمار	وزن تر (اندام هوایی)	وزن خشک (اندام هوایی)	تعداد پنجه	تعداد خوشه
تلقیحی	۵۲.۰۸ [a]	۱۰.۹۸ [a]	۱۴.۶۶ [a]	۱۳.۲۷ [a]
شاهد	۳۹.۸۶ [b]	۸.۹۳ [a]	۹.۶۶ [b]	۹.۱۶ [b]

نتایج بدست آمده نشان داد که تعداد پنجه-ها و خوشه‌ها و نیز میزان وزن تر گیاهان تلقیح شده در مقایسه با گیاهان شاهد افزایش معناداری داشته است که این افزایش معنادار صفات زراعی و همچنین ردیابی قارچ در ریشه با رنگ آمیزی ریشه و آغازگر اختصاصی نشان دهنده هم‌زیستی قارچ اندومیکوریز و ارتباط فیزیولوژیکی آن با گیاه برنج می-باشد.

منابع

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

سپهری م، صالح راستین ن، حسینی سالکده ق و خیام نکویی م، ۱۳۸۸. بررسی تأثیر قارچ اندوفیت *Piriformospora indica* بر بهبود رشد و افزایش مقاومت گیاه جو *Hordeum vulgare* L. به تنش شوری. مجله علمی پژوهشی مرتع، سال سوم، شماره سوم. صفحه های ۵۰۸ تا ۵۱۸.

Kogel K H, Franken P and Huckelhoven R, 2006. Endophyte or parasite-what decides?. Curr. Opin, Plant Biology, 9:358–363.

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

Schafer P, Pfiffi S, Voll L M, Zajic D, Chandler P M, Waller F, Scholz U, Kuhnemann J P,Sonnewald S, Sonnewald U and Kogel K 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.

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.