تکثیر *Glomus intraradices* و تهیه مایه تلقیح آن قارچ به روش کشت درون شیشه‌ای

فرهاد رجالی، عزیزالله علیزاده، محمدجعفر ملکوتی، ناهید صالح راستین، کاظم خاوازی و احمد اصغرزاده[1] *

چکیده

قارچهای میکوریز آربسکولار همزیست اجباری ریشه در بیش از 80 درصد خانواده‌های گیاهی می‌باشند. علی‌رغم تاثیرات مفید این قارچها، عدم رشد آنها در محیط‌های سنتز شده آزمایشگاهی که ناشی از طبیعت همزیست اجباری بودن آنهاست، بزرگترین محدودیت برای به کارگیری این میکروارگانیسم‌ها در اراضی کشاورزی می‌باشد. تاکنون سه روش هیدروپونیک، ائروپونیک و کشت همزمان ریشه و قارچ به صورت درون شیشه‌ای برای تکثیر صنعتی این قارچها به کار گرفته شده است. از بین روشهای ذکر شده روش اخیر هم از نظر جنبه‌های اقتصادی و هم از نظر خلوص مایه تلقیح تهیه شده، بیشترین موفقیت را در پی داشته است. این تحقیق بر مبنای ضرورت تهیه و توسعه روش کشت درون شیشه‌ای همزمان قارچ و ریشه میزبان و استفاده از این فرآورده به عنوان مایه تلقیح خالص به مورد اجرا گذاشته شده است. به این منظور از اسپورهای قارچ *Glomus intraradices* بومی خاکهای ایران استفاده گردید. اسپورهای جوان پس از جداسازی از محیط کشت گیاه و به منظور حذف آلودگی‌های سطحی در طی چند مرحله با آب مقطر و Tween 20 شسته شدند. برای استریل سطحی اسپورها ابتدا از محلول کلرامین‌تی دو درصد و سپس از محلولی حاوی استرپتومایسین سولفات با غلظت 200 میلی‌گرم در لیتر و جنتامایسین سولفات با غلظت 100 میلی‌گرم در لیتر استفاده گردید. به منظور بررسی آلودگی احتمالی، اسپورها به محیط حداقل منتقل و به مدت یک هفته در دمای 25 درجه سانتی‌گراد نگهداری گردیدند. با قرار دادن اسپورهای عاری از آلودگی سطحی در مجاورت راس ریشه‌های القاء شده موجود در سطح محیط کشت حداقل، رابطه همزیستی بین دو ارگانیسم برقرار گردید. برای تکثیر همزمان قارچ و ریشه از بطری‌های شیشه‌ای در پیچ‌دار حاوی 100 میلی‌لیتر محیط حداقل استفاده شد. رنگ‌آمیزی اسپور تولید شده با محلول MTT نشان داد که بیش از 95 درصد از اسپورهای تولید شده زنده و دارای قدرت رویش می‌باشند. همچنین کلنیزاسیون ریشه‌های القایی با قارچ بیش از 70 درصد بود. نتایج این تحقیق حاکی از این است که روش کشت درون شیشه‌ای به کار گرفته شده دارای کارایی بسیار خوبی برای تکثیر قارچ *Glomus intraradices* و احتمالاً سایر گونه‌های قارچهای میکوریز آربسکولار می‌باشد.

واژه های کلیدی: قارچهای میکوریز اربسکولار، کشت درون شیشه‌ای، مایه تلقیح.

مقدمه

همزیستی میکوریزی یکی از شناخته شده‌ترین، گسترده‌ترین و درعین حال مهمترین روابط همزیستی موجود در کره زمین است (Allen، 1991). از آنجائیکه قارچهای میکوریزی موجب افزایش توانایی گیاه میزبان در جذب فسفر و عناصر معدنی از خاک و بخصوص از منابع

1- به ترتیب عضو هیات علمی بخش تحقیقات بیولوژی خاک موسسه تحقیقات خاک و آب؛ استاد گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس؛ استاد گروه خاکشناسی دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس و سرپرست موسسه تحقیقات خاک و آب؛ استاد دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران، اعضای هیات علمی بخش تحقیقات بیولوژی خاک موسسه تحقیقات خاک و آب.

* وصول: 85/3/17 و تصویب: 85/9/1

غیر قابل دسترس آنها می‌شوند، لذا به این میکروارگانیسم‌های مفید لفظ Biofertilizer اطلاق شده و عقیده بر این است که قارچهای میکوریزی می‌توانند جایگزین خوبی برای قسمتی از کودهای شیمیایی مصرف شده در اکوسیستم‌های مختلف باشند (Mukerji و Chamola، 2003).

کشت درون شیشه‌ای قارچ‌های میکوریز اربسکولار و ریشه گیاه میزبان بیشترین موفقیت را برای تکثیر صنعتی این قارچها در پی داشته است. بررسیهای اقتصادی صورت گرفته نیز نشان می‌دهد این روش از لحاظ تأمین امکانات و تجهیزات پایه و همچنین هزینه لازم برای افزایش حجم مایه تلقیح تولیدی از مزیت قابل توجهی برخوردار می‌باشد (Douds و همکاران، 2000). 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 و همکاران، 2002؛ Gianninazi و همکاران، 2002).

برای اولین‌بار در سال1975با استفاده از کشت بافت ریشه گوجه‌فرنگی(*Lycopersicum esculentum*) و شبدر قرمز (*Trifolium pratense*) و همچنین اسپور قارچ *Glomus mosseae* محققین توانستند کشت هم زمان ریشه و قارچ را در محیط‌های کشت سنتز شده تهیه نمایند. طبق گزارش آنها گونه قارچ مزبور به خوبی توانسته است در چنین شرایطی ریشه این دو گیاه را کلنیزه نماید (Mosse وhepper، 1975). با تحقیقات بیشتر در این زمینه محققین موفق شدند با استفاده از کشت بافت ریشه گیاهان توت فرنگی، پیاز و گوجه فرنگی و قطعات کوچک ریشه‌ای کلونیزه شده با گونه‌های مختلف جنس *Glomus* و نه با اسپور این قارچها رابطه همزیستی میکوریزی را در محیط سنتز شده آزمایشگاهی بوجود آورند (Strulla وRomand، 1986).

تلاشهای صورت گرفته برای کشت هم زمان ریشه و قارچ تا این سالها همگی محدود به استفاده از کشت بافت ریشه‌های معمولی بوده است. اولین گزارش مبنی بر استفاده از ریشه‌های القایی حاصل از تلقیح *Agrobacterium rhizogenes* و به منظور کشت ریشه و قارچ در سال 1987 انتشار یافت. در این سال محققین با موفقیت توانستند ریشه‌های القایی گیاه پیچک (*Convolvulus sepium*) را با اسپور قارچ *Glomus mosseae* و در محیط سنتز شده کلونیزه نمایند لیکن کشت هم زمان ریشه و قارچ منجر به تشکیل اسپورهای جدید این قارچ نگردید. برای تأیید نتایج بدست آمده، از ریشه‌های القایی حاصل از بافت‌های غده‌ای هویج و سیب‌زمینی نیز استفاده شده است (Mugnier وMosse، 1987).

اولین گزارش مبنی بر اسپورزایی قارچهای میکوریز اربسکولار در محیط سنتز شده مربوط به سال 1988 می‌باشد در این تحقیق با تغییر ترکیب شیمیایی محیط کشت ریشه و معرفی محیط کشت جدیدی به نام محیط حداقل یا محیط M و استفاده از آن به جای محیط کشت White محدودیت ناشی از غلظت بالای عناصر معدنی که به عنوان عامل ممانعت کننده برای اسپور زایی این قارچها بود برطرف گردید و بدین صورت هم رشد ریشه متوقف نگردید و همچنین قارچ *Gigaspora margarita* در محیط سنتز شده اسپور زایی نمود (Becard و Fortin، 1988).

در تحقیقی دیگر اسپورهای تشکیل شده در کشت هم زمان ریشه و قارچ با موفقیت به منظور کلونیزه کردن ریشه‌های جدید مورد استفاده قرار گرفت با این توضیح که اسپورهای متعلق به جنس *Gigaspora* قبل از قرار گرفتن در مجاورت ریشه به یک دوره سرمای کوتاه مدت برای شکسته شدن خواب فیزیولوژیک اسپور نیاز داشتند همچنین از قطعات کوچکی از محیط کشت حاوی ریشه کلونیزه شده و میسلیوم قارچ برای کلونیزه کردن ریشه در محیط جدید استفاده گردید (Becard و Fortin، 1988).

با استفاده از غلظت دو درصد دی‌اکسید کربن و استفاده از flavonols با غلظت 10 میکرومول محققین موفق شدند رشد هیفهای رویشی اسپورهای متعلق به گونه *Gi.margarita* را در محیط کشت درون شیشه‌ای افزایش دهند. بطوریکه هر اسپور در طی 42 روز به طور متوسط 500 میلی‌متر هیف رویشی و 13 سلول کمکی ایجاد کرده است (Becard و همکاران، 1992). با قراردادن اسپورهای استریل سطحی شده گونه *G. intraradix* در مجاورت ریشه‌های القایی حاصل از دیسک هویج و با گذشت یک الی سه روز اولین تماس بین هیف قارچ و ریشه بوجود آمده است. اولین اسپورهای جدید تشکیل شده در محیط کشت بسیار ریز و پس از گذشت هفت روز از شروع آزمایش با میکروسکوپ قابل رؤیت بوده‌اند. پس از گذشت دو ماه از شروع آزمایش سطح پلیت تقریباً به طور کامل با ریشه و هیف قارچ پوشیده شده و صدها اسپور جدید در محیط کشت بوجود آمده‌اند (Chabot و همکاران، 1992).

با تلقیح ریشه‌های القایی حاصل از دیسک هویج با تنها سه اسپور استریل سطحی شده *Gi.margarita* و برقراری شرایط مناسب در طول یک سال در پتری به ابعاد (15mm× 90) بیش از 500 اسپور این قارچ بوجود آمده است بعلاوه با تلاش صورت گرفته جهت ممانعت از خشک شدن محیط کشت، اسپورهای تشکیل شده تا یکسال بعد در همان پتری نگهداری شده و ضمن پایداری قدرت رویشی، تعداد آنها به هزاران اسپور افزایش یافته است (Becard وPiche، 1992). با استفاده از قطعات ریشه‌ای استریل و کلونیزه شده به طول 5 میلی‌متر با *G. versiforme* و قرار دادن آنها در مجاورت ریشه‌های القایی در محیط کشت MS[1]، در طی یک دوره زمانی 5 ماهه، این قارچ بیش از 9500 اسپور در هر پلیت 9 سانتی‌متری تولیدکرده‌است (Declerck و همکاران، 1996).

با استفاده از پلیت‌های دو خانه یکی حاوی محیط کشت کامل (خانه اول) و دیگری محیط کشت فاقد ساکارز (خانه دوم) و قراردادن ریشه القایی کلونیزه شده با قارچ *G. intraradices* در خانه اول مشاهده گردید که پس از شش الی هشت هفته از شروع آزمایش هیفهای قارچ به خانه دوم رسیده و در این مکان به شدت اسپورزایی نموده‌اند میزان اسپور تولید شده در هر پلیت به طور متوسط 34000 عدد گزارش شده است (ST- Arnaud و همکاران، 1996). با استفاده از بافرهای MES و Tris با غلظت 10 میلی مولار از هر کدام و استفاده از Gellun Gum به جای Agar همزیستی بالاتر از 14 درصد بین اسپورهای گونه *Glomus mosseae* و ریشه‌های القایی حاصل از بافت هویج در پلیتهای تک خانه و با حذف پیت از محیط کشت، ایجاد گردید (Douds، 1997). با انتقال ریشه‌های معمولی سیب‌زمینی که با قارچ *G. intraradices* کلونیزه شده بود و قراردادن آنها در مجاورت ریشه‌های معمولی حاصل از کشت ریشه گوجه‌فرنگی، رابطه همزیستی میکوریزی در شرایط درون شیشه‌ای بین دو ارگانیسم بوجود آمده و قارچ با توسعه شبکه هیفی خود و تشکیل اسپور در محیط کشت سیکل زندگی‌خود را کامل کرده است (Bago و همکاران، 1998). در همزیستی بوجود آمده بین ریشه‌های القایی هویج و قارچ میکوریزی *Gi. margarita* مشاهده شده است که چنانچه به جای آگار خالص از فیتاژل استفاده شود تعداد نقاط ورودی هیف قارچ بداخل بافت ریشه و همچنین تعداد سلولهای کمکی تولید شده در محیط کشت درون شیشه‌ای افزایش می‌یابد (Adholeya و همکاران، 1997).

مقایسه کارایی مایه تلقیح قارچ *G. intraradices* که به دو روش کشت درون شیشه‌ای و کشت گلدانی تهیه و برای کلونیزه کردن ریشه گیاه پیاز بکار رفت نشان داد که بین این دو مایه تلقیح تفاوت معنی‌داری وجود ندارد با این توضیح که مایه تلقیح تهیه شده از روش اول فاقد هر گونه آلودگی جانبی بوده ولی مایه تلقیح دومی حاوی آلودگیهای قارچی و باکتریایی بوده است (Vimard وهمکاران،1999).

در تحقیق دیگری محققین موفق شدند از تکه‌های ریشه‌ای حاوی هیف قارچهای میکوریز اربسکولار و همچنین تک‌وزیکولهای این قارچها و استفاده از ریشه‌های القایی هویج، کشت درون شیشه‌ای گونه‌های *Glomus versiforme*، *G. intraradices*، *G. fasciculatum* و *G.macrocarpum* را به انجام برسانند. طبق نتایج آنها دو گونه اول به شدت در محیط اسپورزایی کرده‌اند، گونهٔ سوم به میزان کمتر و گونه چهارم تنها چند عدد اسپور در محیط کشت تولید کرده است (Declerck و همکاران، 1998).

با مایه‌زنی گونه تازه شناسایی شده *Glomus proliferum* به ریشه‌های القایی هویج، کشت درون شیشه‌ای این قارچ با موفقیت صورت گرفته است. این قارچ توانسته است در محیط کشت شبکه‌هایی حاوی صدها اسپور با اندازه کوچک، بدون رنگ و دارای چهار دیواره ساختمانی را ایجاد نماید. محققین با تکثیر قارچ با روش درون شیشه‌ای توانسته‌اند توالی نوکلئوتیدها در منطقه rDNA (SSU) اسپور را تعیین کرده همچنین پروفیل اسیدهای چرب موجود در اسپور این قارچ را که به شناسایی بهتر آن کمک می‌کند تهیه نمایند (Declerck و همکاران، 2000).

با اضافه کردن 10 میلی‌مول از بافر آلی MES به محیط کشت حداقل (M- medium) به منظور پایداری pH محیط در 6/5 و کاهش غلظت عناصر منگنز و روی در این محیط کشت، قارچ *Glomus caledonium* توانسته است به خوبی ریشه‌های القایی هویج را کلونیزه کرده و در محیط کشت اسپورزایی نماید. اکثر اسپورهای تولید شده دارای قدرت رویشی بوده‌اند (Karandashov و همکاران، 2000).

مایه‌زنی ریشه‌های القایی هویج با اسپورهای قارچ *Gi margarita*، منجر به رشد و توسعه اندام این قارچ در محیط کشت شده است. طبق گزارش محققین 10 الی 15 درصد از اسپورهای تولید شده این قارچ درون بافت ریشه‌های القایی بوجود آمده‌اند که بررسی‌های صورت گرفته نشان‌دهندهٔ شباهت کامل آنها با اسپورهای تولید شده در خارج از بافت ریشه می‌باشد. این اولین گزارش از تشکیل اسپور این قارچ درون بافت ریشه است (Gadkar وAdholeya، 2000). بررسی اسپورزایی گونه‌های

1- MS: (Murashige and Skoog)

G. intraradices، *G. proliferum*، *G. caledonium* به طریقه کشت درون شیشه‌ای، نشان داده است که تولید اسپور قارچهای میکوریز اربسکولار در محیط کشت از یک منحنی S شکل تبعیت می‌کند (Declerck و همکاران، 2001).

تحقیق صورت گرفته بر روی قارچ *G. intraradices* نشان داده است که چنانچه اسپورهای این قارچ قبل از کشت به طریقه دورن شیشه‌ای، حداقل به مدت 14 روز در دمای 4°C+ قرار گیرند، جوانه‌زنی اسپور بیشتر شده و حرکت هیف قارچ به سمت ریشه‌های القایی سریعتر صورت گرفته در نهایت کلنیزاسیون ریشه به نحو مؤثرتری انجام می‌پذیرد (Juge و همکاران، 2002). با استفاده از محیط کشت پیشنهادی توسط دکلرک (Declerck و همکاران، 1998) محققین توانسته‌اند برای اولین بار مایه‌زنی ریشه‌های القایی هویج را با استفاده از اسپورهای استریل شده گونه *Acaulospora rehmi* با موفقیت به انجام برسانند، اندام فعال قارچ پس از کلنیزاسیون ریشه در محیط کشت گسترده شده و قارچ توانسته است با تکمیل سیکل زندگی خود، اسپورزایی نماید (Dalpe و Declerck،2002). هدف از انجام این تحقیق دستیابی به دانش فنی تولید مایه تلقیح قارچهای میکوریز اربسکولار به طریقه کشت درون شیشه‌ای در کشور و استفاده از مایه تلقیح خالص و عاری از آلودگیهای جنبی برای انجام آزمونهای گلخانه‌ای و مزرعه‌ای و همچنین به کارگیری این روش پیشرفته برای مطالعه و بررسی های آتی در مورد سایر جنبه های همزیستی قارچهای میکوریزاربسکولار با گیاهان میزبان می‌باشد.

مواد و روشها

تکثیر اسپورهای قارچ *Glomus intraradices*

اسپورهای این قارچ، جداسازی شده از خاکهای استان آذربایجان شرقی در طی یک دوره کشت چهار ماهه در مجاورت ریشه گیاه سورگوم در محیط متشکل از سه قسمت ما سه و یک قسمت خاک با بافت لوم که به همراه گلدان 4 کیلوگرمی حاوی آنها استریل شده بود در گلخانه با نور طبیعی و درجه حرارت 16°C الی 28°C و طول روز 14 ساعت روشنایی و 10 ساعت خاموشی تکثیر گردید. درون گلدانها چهار بذر ضدعفونی سطحی شده و جوانه زده سورگوم کشت گردید برای تغذیه و آبیاری گیاهچه‌های سورگوم از محلول غذایی استریل هوگلند با 25% از غلظت فسفر به صورت هفتگی و از آب استریل دو بار در هفته استفاده شد. به منظور کاهش احتمال آلودگی، سطح گلدانها با سنگریزه‌های استریل و پارافینه شده به ضخامت 2 سانتی‌متر پوشانیده شد. گلدانها در زیر گلدانی قرار گرفتند. پس از گذشت 4 ماه از شروع کشت، گیاهچه‌های سورگوم از سطح خاک قطع شده و گلدانها به مدت دو هفته در گلخانه نگهداری شدند. برای جداکردن اسپورهای تشکیل شده قارچ، از تهیه سوسپانسیون محیط کشت گیاه با آب و عبور آن از الک‌های 60، 100 و 400 مش استفاده گردید. مواد جمع شده بر روی الک 400 مش به سطح ستونی از ساکارز 60 درصد منتقل شده و به مدت سه دقیقه با سرعت 2700 دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. سوسپانسیون بالائی سانتریفوژ را به الک 400 مش منتقل کرده و با مقدار کافی آب شستشو داده شد. قسمتی از مواد جمع شده بر سطح الک 400 مش را به پتریهای مربع شکل و شبکه‌بندی شده به ابعاد 9 ×9 سانتی‌متر منتقل کرده و با مشاهده نمونه زیر بینوکولر و استفاده از پی‌پت اپیندورف، اسپورهای موجود در هر شبکه از پتری مربع شکل که فاقد هیف رویشی بودند برداشته شده و به لوله آزمایش 6×1/5 سانتی‌متر حاوی 2 میلی‌لیتر آب مقطر منتقل گردیدند. لوله آزمایش مذکور در ظرف حاوی تکه‌های یخ قرار داده شد. برای شروع ضدعفونی سطحی، تعداد 2000 اسپور این قارچ جداسازی و جمع‌آوری گردید بطوریکه اجتماع آنها در ته لوله آزمایش با چشم غیرمسلح قابل رویت بود (شکل شماره 1).

ضدعفونی سطحی اسپورهای قارچ *Glomus intraradices*

برای حذف آلودگیهای سطحی چسبیده به دیواره اسپور از شستن آنها در طی دو الی سه مرتبه در پتریهای یک بار مصرف حاوی 15 میلی‌لیتر آب مقطر و دو قطره Tween 20 استفاده گردید. برای حذف کامل آلودگیهای چسبیده به دیواره اسپور در هر مرتبه پس از شستن با Tween 20 اسپورها به لوله آزمایش حاوی دو میلی‌لیتر آب مقطر منتقل شده و با استفاده از دستگاه بهم‌زن و با ملایمت آلودگیهای باقی‌مانده از سطح آنها جداسازی گردید. در نهایت اسپورها سه مرتبه با آب مقطر شسته شدند. سپس اسپورها با کمک پی‌پت اپیندورف به لوله آزمایش حاوی 0/5 میلی‌لیتر آب مقطر استریل منتقل شده و به لوله آزمایش 2/5 میلی‌لیتر محلول کلر آمین تی دو در صد استریل اضافه گردید. لوله آزمایش حاوی اسپورها و محلول کلر امین‌تی به مدت 10 دقیقه درون حمام یخ قرار داده شد. پس از طی شدن زمان لازم، اسپورها را از محلول کلر امین‌تی خارج کرده و سه الی چهار مرتبه با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. در مرحله آخر اسپورها به لوله آزمایش استریل حاوی 2 میلی‌لیتر از محلول دو نوع آنتی‌بیوتیک، یکی استرپتومایسین سولفات با غلظت 200 میلی‌گرم در لیتر و دیگری جنتامایسین سولفات با غلظت 100 میلی‌گرم در

لیتر منتقل شده لوله آزمایش حاوی آنها به مدت 10 دقیقه در حمام یخ نگهداری گردید. سپس محلول آنتی‌بیوتیک را خارج کرده و اسپورها حداقل سه الی چهار مرتبه با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. مرحله آخر یعنی اضافه کردن آنتی‌بیوتیک به مدت 10 دقیقه و سپس شستن با آب مقطر استریل سه مرتبه تکرار گردید (Becard و Piche، 1992).

بررسی مؤثر بودن روش استریل سطحی اسپور

پس از اتمام مراحل فوق اسپورها چندین مرتبه دیگر با آب مقطر استریل شسته شده و با کمک پی‌پت اپیندورف به پلیت حاوی محیط MS و 0/3 درصد فیتاژل منتقل گردیدند. پلیتها به صورت معکوس درون انکوباتور با دمای ^0C 28 و به مدت 48 ساعت به منظور بررسی احتمالی وجود آلودگی، قرار داده شدند.

کشت همزمان ریشه القایی و اسپور قارچ *Glomus intraradices*

بدین منظور از قرار دادن تکه‌های ریشه‌های القایی به طول 3 الی 4 سانتی‌متر بر روی محیط کشت M پیشنهادی توسط (Becard و Fortin، 1988) استفاده گردید. با این تفاوت که به جای استفاده از آگار، برای ژل‌کردن محیط کشت از فیتاژل به میزان 0/3 درصد استفاده شد. برای کلنیزه کردن این ریشه‌ها، در هر پلیت تعداد 10 الی 15 اسپور ضد عفونی سطحی شده قارچ *Glomus intraradices* را در مجاورت رأس ریشه‌های فرعی قرار داده پس از مسدود کردن درب پتری‌ها با پارافیلم آنها را به صورت معکوس درون انکوباتور با دمای ^{0C} 28 و در تاریکی مطلق قرار داده شدند. در این مرحله از اسپورهایی استفاده گردید که اولاً فاقد آلودگی جنبی بر روی محیط MS بودند و ثانیاً جوانه نزده و فاقد لوله تندشی بودند. پس از گذشت دو هفته الی یک ماه از اتمام این مرحله پلیتها به صورت روزانه با استفاده از استریومیکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفته و با مشخص نمودن قطعات ریشه‌ای که با اسپور قارچ کلونیزه شده بودند و در اطراف ریشه شبکه هیف قارچ گسترده شده بود برای تکثیر این گونه از قارچهای میکوریز اربسکولار استفاده گردید.

تکثیر قارچ *Glomus intraradices* به طریقه کشت درون شیشه‌ای

در مرحله تکثیر از بطریهای شیشه‌ای در پیچ‌دار با حجم 250 میلی‌لیتر حاوی 100 میلی‌لیتر محیط کشت M به همراه 0/3 درصد فیتاژل و استریل استفاده گردید. در شرایط کاملاً استریل درب پتریها باز شده و ریشه‌های کلنیزه شده با قارچ با بریدن محیط کشت اطراف آن به همراه تکه‌ای از محیط‌کشت به درون بطریهای شیشه‌ای منتقل گردیدند. درب بطریهای شیشه‌ای را بسته و پس از مسدود کردن کامل آنها با استفاده از پارافیلم، درون انکوباتور با دمای ^{0C}28 و تاریکی مطلق به مدت 12 هفته جهت رشد کامل ریشه و اسپورزایی قارچ نگهداری شدند. همچنین یک هفته پس از مایه زنی بطریهای شیشه‌ای 250 میلی لیتری حاوی محیط کشت M با ریشه‌های القایی کلونیزه شده با قارچ، محیط‌های کشت از لحاظ وجود و یا عدم وجود آلودگی مورد بررسی دقیق قرار گرفتند.

جداسازی اسپورهای تشکیل شده از محیط کشت و شمارش آنها

برای جدا کردن اسپورهای تشکیل شده درون محیط کشت هم حجم محیط کشت استفاده شده به بطریهای شیشه‌ای بافر سیترات سدیم 10 میلی‌مولار با pH معادل 6 اضافه کرده و برای تسریع در باز شدن ژل از دستگاه همزن استفاده گردید. پس از باز شدن کامل ژل بافر سیترات سدیم و اسپورهای رها شده در آن را به الک 400 مش منتقل کرده و با مقدار کافی آب تا حذف کامل بافر سیترات سدیم شستشو داده شدند. پس از اتمام شستشو، اسپورها به بشر حاوی آب مقطر منتقل گردیدند. برای شمارش تعداد اسپورهای تولیدی، حجم مشخص از بشر حاوی آب مقطر و اسپورها به کاغذ صافی شبکه‌بندی شده منتقل گردیده و با استفاده از استریومیکروسکوپ، تعداد اسپورها شمارش گردید (Adholeya و همکاران، 1997).

تعیین درصد اسپورها دارای فعالیت حیاتی

200 الی 250 اسپور را به تیوب‌های پلاستیکی درب‌دار با حجم یک میلی‌لیتر و حاوی 900 میکرولیتر آب مقطر منتقل نموده به آن 100 میکرولیتر از محلول 0/25 درصد MTT[1] اضافه گردید. تیوبهای پلاستیکی را به مدت 12 ساعت در تاریکی قرار داده و سپس با شمردن تعداد اسپورهایی که دارای رنگ قرمز بودند درصد اسپورهای دارای فعالیت حیاتی مشخص گردید (Mukerji و همکاران، 2002).

تعیین درصد کلنیزاسیون ریشه القایی با قارچ *Glomus intraradices*

پس از گذشت 12 هفته از تهیه مایه تلقیح این قارچ به روش کشت درون شیشه‌ای، مقدار کافی از ریشه‌های تولید شده در بطریهای شیشه‌ای را به لوله آزمایش منتقل کرده و چندین مرتبه با آب مقطر شستشو داده شدند. سپس به لوله‌های آزمایش محلول هیدروکسید پتاسیم 3% اضافه کرده و ریشه‌ها به مدت 4 الی 5 ساعت در این محلول نگهداری شدند. پس از اتمام این مرحله

1- MTT: 3-(4, 5-dimethyl –2- thiazolyl)- 2-5-diphenyl- 2H tetrazolium bromide.

محلول قلیایی را با ملایمت از لوله‌های آزمایش خارج کرده و ریشه‌ها 6 مرتبه با آب مقطر شسته شدند. برای اسیدی کردن بافت ریشه از محلول اسید کلریدریک 1% استفاده گردید. ریشه‌ها به مدت 5 الی 10 دقیقه در این محلول قرار داده شدند. سپس محلول اسیدی را خارج کرده برای رنگ‌آمیزی ریشه از محلول رنگی تریپان‌بلو 0/1 درصد در لاکتوگلیسیرول استفاده گردید. ریشه‌ها به مدت یک شب در این محلول قرار گرفته و سپس برای خارج کردن رنگ اضافی از محلول لاکتوگلیسیرول استفاده گردید.

برای اندازه‌گیری درصد کلنیزاسیون ریشه یک صد قطعه یک سانتی‌متری از ریشه‌های رنگ‌آمیزی شده را بر روی چهار لام میکروسکوپ قرار داده با اضافه کردن چند قطره محلول لاکتوگلیسیرول، ریشه‌ها با لامل پوشانده شدند. با بررسیهای میکروسکوپی با بزرگنمایی 250X برای هر قطعه یک سانتی‌متری ریشه درصد کلنیزاسیون تعیین و میانگین درصد کلنیزاسیون قطعات ریشه‌ای محاسبه گردید (Norris و همکاران، 1992).

نتایج و بحث

ضد عفونی سطحی اسپورهای قارچ *Glomus intraradices*

این مرحله دقیقاً براساس روش استاندارد استریل سطحی اسپورهای قارچ *G.intraradices* که در موسسه بین‌المللی TERI هندوستان مورد استفاده قرار می‌گیرد به انجام رسید. نتایج به کارگیری این روش رضایت بخش بود چرا که فقط در کمتر از 20 درصد اسپورها لکه‌های ناشی از آلودگی موجود در دیواره اسپور در سطح پلیت مشاهده گردید و قسمت عمده‌ای از اسپورها حتی با گذشت یک الی دو ماه نیز هیچگونه آلودگی بر روی محیط کشت غذایی نشان ندادند.

با توجه به اینکه مرحله ضدعفونی سطحی اسپورها حدود دو الی سه روز به طول انجامید و در طی این مدت اسپورها درون آب مقطر و در ظرف یخ قرار داده شده بودند. لذا تعدادی از آنها وارد مرحله خواب فیزیولوژیک شدند و این امر باعث شد تا جوانه زنی آنها به مدت دو الی سه ماه به تاخیر افتد. لیکن در طی این زمان هیچگونه آلودگی بر روی پلیتها مشاهده نگردید که نشان‌دهنده مناسب بودن روش ارائه شده برای استریل سطحی اسپور این گونه از قارچهای میکوریز ـ اربسکولار بود. بدیهی است برای استریل سطحی سایر گونه‌ها می‌بایستی اصلاحاتی در مراحل مختلف و زمانهای استفاده شده در این روش بوجود آید.

مایه زنی ریشه های القایی با اسپور قارچ *Glomus intraradices*

پس از گذشت سه الی چهار هفته از مایه‌زنی در تعدادی از ریشه‌های القایی رابطه همزیستی میکوریزی بین ریشه و قارچ بوجود آمد که نشانه آن گسترده شدن هیف قارچ در اطراف ریشه و داخل محیط کشت بود مشاهده برقراری رابطه همزیستی حداکثر در 20 درصد از پلیتها صورت گرفت.

تکثیر همزمان ریشه‌های القایی و قارچ *Glomus intraradeices*

نتایج این بررسی نشان داد که حدود 10 درصد از محیط‌های کشت در حین کار آلوده شده‌اند. آلودگی هم از نوع باکتریایی بود که منجر به کدر شدن محیط کشت گردید و هم از نوع قارچی که گسترده شدن هیفهای قارچ در سطح ریشه و محیط کشت پس از گذشت دو هفته کاملاً مشهود بود. محیط‌های کشت آلوده شده سریعاً از انکوباتور خارج گردیده و حذف شدند. در محیط‌های کشتی که آلوده نشده بودند، پس از گذشت یک هفته، تشکیل ریشه‌های جدید با اندازه بسیار کوچک با رنگ متمایل به سفید در محیط کشت دیده شدند. این ریشه‌ها عمدتاً به سمت داخل محیط کشت رشد کرده و در عمق چند میلی‌متری از سطح محیط کشت و به سمت داخل آن مجتمع گردیدند. پس از گذشت 10 روز با استفاده از بینوکولر، رشد هیف قارچ و هیفهای تازه تشکیل شده قابل مشاهده بودند.

هیفهای تازه تشکیل شده نازک تر درخشان تر و شبیه به تارهای موئی متمایل به سفید دیده می‌شدند. از این زمان تا هفته چهارم رشد ریشه و هیف قارچ به سرعت انجام گرفت بطوریکه پس از گذشت چهار هفته ریشه کاملاً سطح محیط کشت را پوشانید و رشد هیفها و گسترده شدن آنها درون محیط کشت با چشم غیر مسلح به خوبی قابل رویت بود. از پایان هفته چهارم تشکیل اسپورها بر روی هیف قارچ و در محیط کشت مشاهده گردید که با گذشت زمان به تدریج بر تعداد آنها افزوده شده و پس از گذشت 8 هفته اجتماع آنها در محیط کشت به صورت لکه‌هایی تیره رنگ قابل مشاهده بود. از پایان هفته هشتم تا پایان هفته دوازدهم تشکیل اسپورها درون محیط کشت با سرعت ادامه پیدا کرد. بطوریکه در پایان هفته دوازدهم هیف این قارچ و اسپورهای آن در تمام نقاط محیط کشت قابل مشاهده بودند. در طی این زمان ریشه رشد کرده و تقریباً فضای بالای محیط کشت را به طور کامل اشغال نمود گسترش هیف این قارچها نیز که از ریشه منشاء گرفته بودند بر روی دیواره داخلی بطری‌های شیشه‌ای مشاهده می‌گردید. با گذشت 12 هفته از زمان

مایه زنی رنگ ریشه‌ها به تدریج از سفید به زرد و پس از 16 هفته رنگ ریشه‌ها از زرد به قهوه‌ای متمایل گردید (شکل شماره 2).

شمارش اسپورهای تولید شده در محیط کشت

شمارش اسپور صورت گرفته نشان داد که تعداد اسپورهای تشکیل شده درون بطریهای در پیچ دار حاوی 100 میلی لیتر محیط کشت و پس از گذشت 12 هفته از مایه زنی بین 000، 95 تا 000، 105 اسپور متغیر می باشد که این عدد نشانگر پتانسیل بسیار خوب این روش برای تولید اسپورهای قارچ *G. intraradices* است. شمارش اسپور در بطریهای حاوی محیط کشت که به مدت 16 هفته نگهداری شده بودند. نشان داد که تعداد اسپورهای قارچ در آنها به حدود 000، 120 به ازاء هر 100 میلی لیتر از محیط کشت افزایش یافته لیکن وزن ریشه در آنها زیاد نشده است.

تعیین درصد اسپورهای دارای فعالیت حیاتی

پس از گذشت 24 ساعت از رنگ آمیزی اسپورها با ماده رنگی MTT بیش از 95 درصد از اسپورها دارای رنگ قرمز بوده و به عبارت دیگر دارای فعالیت حیاتی بودند و بطور متوسط تنها 5 درصد (5 اسپور از 100 اسپور مشاهده شده) دارای رنگ مشکی و فاقد فعالیت حیاتی بودند. اسپورهای تولیدی در بطریهایی که به مدت 16 هفته نگهداری شده بودند نیز دارای فعالیت حیاتی مشابه بودند (شکل شماره 3).

تعیین درصد کلنیزاسیون ریشه حاصل از کشت درون شیشه‌ای

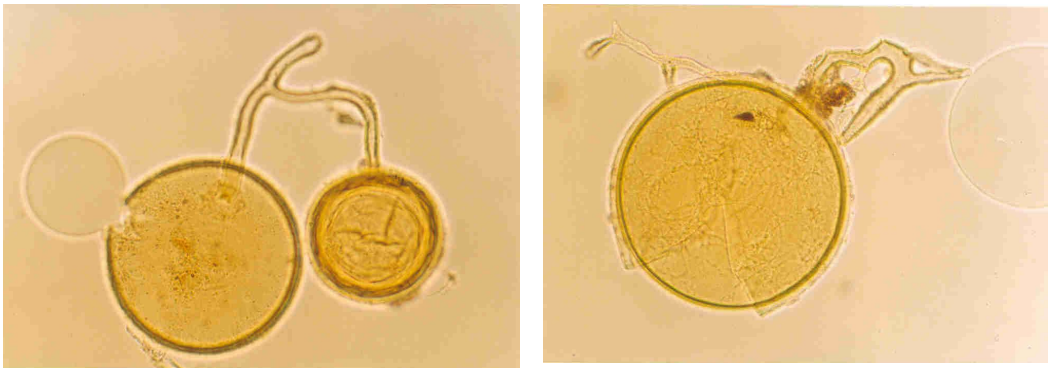
تعیین کلنیزاسیون ریشه در یک صد قطعه یک سانتی‌متری از ریشه‌های تولید شده نشان داد که این درصد برای ریشه های موجود بین 50 الی 70 درصد متغیر می‌باشد ادامه زمان نگهداری بطریها تا 16 هفته تأثیری در افزایش درصد کلنیزاسیون ریشه نداشت.

ضدعفونی سطحی اسپورهای قارچ *G.intraradices* نشان داد که اگر چه روش استفاده شده برای حذف آلودگیهای سطحی نتوانسته است تمام اسپورهای مورد استفاده را به طور کامل استریل سطحی نماید، لیکن تعداد زیادی از اسپورها پس از گذشت چندین هفته بر روی محیط کشت MS هیچگونه آلودگی سطحی را نشان ندادند. معمولاً در روشهای استریل سطحی اسپورهای قارچهای میکوریز اربسکولار آنچه که از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است، حفظ قدرت جوانه زنی و رویش اسپور همراه با حذف آلودگیهای سطحی می‌باشد. بنابراین حذف کامل آلودگیهای غیر ممکن بوده و در صورت امکان قدرت رویشی اسپور را نیز از بین می‌برد. از طرف دیگر وجود باکتریهای اپی فیت که گاها در لایه‌های داخلی اسپور این قارچها نفوذ می نمایند، مانع از استریل کامل اسپور می‌شوند. (Walley و Germida ، 1996).

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 قارچهای میکوریز اربسکولار و تهیه مایه تلقیح این قارچها بدون کوچکترین آلودگیهای جانبی می‌باشد. اضافه کردن حجم محیط کشت به 100 میلی لیتر و همچنین استفاده از بطری‌های شیشه‌ای در پیچ دار با حجم 250 میلی‌لیتر که فضای کافی برای گسترش ریشه‌های القایی کلنیزه شده با قارچ را دارا می‌باشند و همچنین استفاده از ماده ژل کننده فیتاژل به جای آگار که جمع‌آوری تمامی اسپورها و هیفهای تشکیل شده درون محیط کشت را امکان‌پذیر می‌نماید، باعث تبدیل این روش از یک وسیله صرفاً تحقیقاتی به روشی موثر جهت تهیه مایه تلقیح این قارچها گردیده است. میزان اسپور تولیدی در این روش به ازاء 100 میلی‌لیتر ازمحیط کشت و پس از گذشت 12 هفته بالغ بر 000، 100 عدد می‌باشد. با احتساب تکه های ریشه کلونیزه شده با قارچ که چیزی در حدود 50 الی 70 درصد از کل ریشه‌ها می‌باشد و همچنین تکه‌های هیف این قارچ که دارای قدرت رویشی می‌باشند و در مجموع تعداد آنها سه برابر تعداد اسپور تولیدی می‌باشد، به عدد 000، 400 اندام فعال قارچی به ازاء هر 100 میلی‌لیتر از محیط کشت می‌رسد. نتایج ده ساله کارشناسان موسسه بین المللی TERI هندوستان در اراضی زراعی نشان داده است که مقدار مناسب اندام فعال قارچی برای تلقیح اراضی زیر کشت گندم حدود ۰۰۰،۰۰۰، 2 به ازاء هر هکتار می باشد. بنابراین برای یک مزرعه یک هکتاری گندم میزان اندام فعال قارچی تولید شده در 5 عدد از این بطری‌های شیشه‌ای کفایت می‌نماید. لذا می‌توان نتیجه گرفت که تهیه مایه تلقیح این قارچها به روش کشت درون شیشه‌ای هم از لحاظ مسائل اقتصادی و هم به جهت کاهش در مصرف کودهای فسفره و ملاحظات زیست محیطی قابل توصیه می باشد. همچنین از آنجائیکه امکانات لازم برای توسعه این روش نیاز به صرف هزینه زیادی ندارد، لذا کارایی آن در تولید مایه تلقیح قارچهای میکوریزی مورد تأکید قرار گرفته است (Mukerji، 1996).

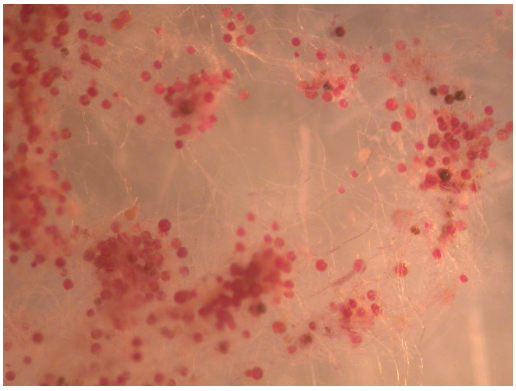
در سالهای اخیر از طریق تغییراتی که در محیط کشت استفاده شده در این روش تکثیر قارچها صورت گرفته است توانسته اند با موفقت مایه تلقیح قارچ *G.intraradices* را در حجم‌های بیش از چند صد لیتری درون بیوراکتورها تولید نمایند که این خود تاییدی بر

پتانسیل بالای این روش تکثیر و کاربرد عملی آن دارد (Jolicoeur و همکاران، 1999) بزرگترین محدودیت این روش تکثیر نیاز به اصلاحاتی است که می‌بایستی در روش استریل سطحی اسپور این قارچها و تغییراتی که احتمالا در محیط کشت‌های مورد استفاده برای تکثیر هرگونه خاصی می‌بایستی اعمال گردد (Fortin و همکاران، 2002). برای تکمیل این روش برای تولید مایه تلقیح موثر که در اراضی زراعی کاربرد داشته باشد، می‌بایستی در تحقیقات آتی به موارد زیر توجه گردد. به منظور اقتصادی کردن و بومی سازی فرآیند تولید مایه تلقیح‌های میکوریزی به روش کشت درون شیشه‌ای تلاش برای جایگزینی سایر مواد ژل‌کننده به جای فیتاژل مصرفی در محیط کشت صورت گیرد. با توجه به اینکه روش ضد عفونی سطحی اسپور قارچهای میکوریز اربسکولار به عنوان حساس‌ترین مرحله در کشت درون‌شیشه‌ای این قارچها مطرح می‌باشد، تلاش جهت یافتن روشهای مناسب برای استریل سطحی سایر گونه‌های این قارچها مد نظر قرار گیرد. با عنایت به کارایی بیشتر مایه تلقیح‌های حاوی بیش از یک گونه از این قارچها تلاش جهت تکثیر همزمان چند گونه متفاوت در محیط‌های کشت انجام شود.



شکل 1- اسپورهای قارچ *Glomus intraradices* استفاده شده در این تحقیق

شکل 2- تکثیر همزمان ریشه های القایی و قارچ *Glomus intraradices*



شکل 3- تعیین درصد اسپورهای دارای فعالیت حیاتی

فهرست منابع:

1. Adholeya, A., Varma, A. and Bhatia, N. P. 1997. Influence of the media gelling agents on root biomass, and *in vitro* VA-mycorrhizal symbiosis of carrot, with *Gigaspora margarita*. Biotropia. 10: 63-74.
2. Allen, M. F. 1991. The ecology of mycorrhizae. Cambridge University Press. P. 184.
3. Bago, B., Azcon-Aguilar, C. and Piche, Y. 1998. Architecture and developmental dynamics of the external mycelium of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* grown under monoxenic culture conditions. Mycologia, 90: 52-62.
4. Becard, G. and Fortin, J. A. 1988. Early events of vesicular arbuscular mycorrhiza formation on Ri-T-DNA transformed roots. New Phytologist. 108: 211-218.
5. 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.
6. Becard, G., Douds, D. D. and Pfeffer, P. E. 1992. Extensive *in vitro* hyphal growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in the presence of Co_2 and flavonols. Applied and Environmental Microbiology. 58: 821-825.
7. Chabot, S., Becard, G. and Piche, Y. 1992a. Life cycle of *Glomus intraradix* in root organ culture. Mycologia. 84: 315-321.
8. Dalpe, Y. and Declerck, S. 2002. Development of *Acaulospora rehmii* spore and hyphal swellings under root-organ culture. Mycologia. 94(5): 850-855.
9. Declerck, S., Strullu, D. G. and Plenhette, C. 1996. *In vitro* mass production of the arbuscualr mycorrhizal fungus *Glomus versiforme* associated with Ri T-DNA transformed carrot roots. Mycological Research, 100: 1237-1242.
10. Declerck, S., Strullu, D. G. and Plenchette, C. 1998. Monoxenic culture of the intraradical forms of *Glomus* sp. isolated from a tropical ecosystem: a proposed methodology for germplasm collection. Mycologia. 90(4): 579-585.
11. Declerck, S., Cranenbrouck, S., Dalpe, Y., Sequin, S., Grandmoungin-Ferjani, A., Fontaine, J. and Sancholle, M. 2000. *Glomus proliferum* sp. nov.: a description based on morphological, biochemical, molecular and monoxenic cultivation data. Mycologia 22(2): 1178-1187.
12. Declerck, S., Cranenbrouck, S. and Le-Boulenge, E. 2001. Modeling the sporulation dynamics of arbuscualr mycorrhizal fungi in monoxenic culture. Mycorrhiza 11: 225-230.
13. Declerck, S., Strullu, D. G. and Plenchette, C. 1998. Monoxenic culture of the intraradical forms of *Glomus* sp. isolated from a tropical ecosystem: a proposed methodology for germplasm collection. Mycologia. 90(4): 579-585.

14. Douds, D. D. 1997. A procedure for the establishment of *Glomus mosseae* in dual culture with Ri T-DNA-transformed carrot roots. Mycorrhiza 7: 57-61.
15. Douds, D. D. Gadkar, J. V. and Adholeya, A. 2000. Mass production of VAM fungus biofertilizer. In: Mycorrhizal Biology, edited by K. J. Mukerji. Kluwer Academic/Plenum Publishers.
16. 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.
17. Gadkar, V., and Adholeya, A. 2000. Intraradical sporulation of AM *Gigaspora margarita* in long-term axenic cultivation in Ri T-DNA carrot root. Mycological Research. 104(6): 716-721.
18. Gianinazi, S., Schuepp, H., Barea, J. M. and Haselwandter, K. (eds.). 2002. Mycorrhizal technology in agriculture, from genes to bioproducts. Birkhauser.
19. Jolicoeur, M., Williams, R. D. Chavarie, C. Fortin, J. A., and Archambault, J. 1999. Production of *Glomus intraradices* Propagules, and arbuscular mycorrhizal fungus, in and airlift bioreactor. Biotechnol Bioeng. 63: 224-232.
20. Juge, C., Samson, J., Bastien, C., Vierheilig, H., Coughlan, A. and Piche, Y. 2002. Breaking dormancy in spores of the arbuscualr mycorrhizal fungus *Glomus intraradices:* a critical cold-storage period. Mycorrhiza 12: 37-42.
21. Karandashov, V., Kuzovkina, I., Hawkins, H. J. and George, E. 2000. Growth and sporulation of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus caledonium* in dual culture with transformed carrot roots. Mycorrhiza. 10: 23-28.
22. Mosse, B. and Hepper, C. M. 1975. Vesicular-arbuscurlar infections in root-organ culture. Physiology and Plant Pathology. 5: 215-223.
23. Mugnier, J. and Mosse, B. 1987. Vesicular-arbuscular infections in Ri-T-DNA transformed roots grown axenically. Phytopathology. 77: 1045-1050.
24. Mukerji, K. C. 1996. Concepts in mycorrhizal research. Kluwer Academic Publisher, London, P. 373.
25. Mukerji, K. G., Manoharachary, C. and Chamola, B. P. (eds.). 2002. Techniques inmycorrhizal studies. Kluwer Academic Publisher.
26. Mukerji, K. G. and Chamola, B. P. 2003. Compendium of mycorrhizal research. A. P. H. Publisher. New Delhi. P. 310.
27. Norris, J., Read, D. and Varma, A. (eds). 1992. Techniques for the study of mycorrhiza. Academic Press, New York.
28. St-Arnaud, M., Hamel, C., Vimard, B., Caron, M. and Fortin, J. A. 1996. Enhanced hyphal growth and spore production of the arbuscualr mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* in an *in vitro* system in absence of host roots. Mycological Research. 100: 328-332.
29. Strullu, D. G. and Romand, C. 1986. Culture axenique de vesicules isolees a partir dendomycorhizes et re-association in vitro a des racines de tomate. C. R. Acad. Sci. Paris Ser, III, 305: 15-19.
30. Vimard, B., St-Arnaud, M., Furlan, V. and Fortin, J. A. 1999. Colonization potential of *in vitro*-produced arbuscular mycorrhizal fungus spores compared with a root-segment inoculum from open pot culture. Mycorrhiza. 8: 335-338.
31. Walley, F. L. and Germida, J. J. 1996. Failure to decontaminate *Glomus clarum* NT_4 spores is due to spore wall-associated bacteria. Mycorrhiza. 6: 43-49.