جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

معرفی باکتری همزیست داخلی در قارچ میکوریز آربوسکولار *Gigaspora margarita* در ایران*

Report of a symbiotic endobacterium associated with *Gigaspora margarita,* an arbuscular mycorrhizal fungus in Iran

یونس رضایی دانش**، **ابراهیم محمدی گل تپه، عزیزاله علیزاده، اریکا لومینی، والریا بیانچیوتو و پائولا بونفانته**

گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، گروه قارچ شناسی، دانشگاه تورینو، ایتالیا

دریافت ۸۶/۳/۳۰ پذیرش ۱۳۸۷/۴/۵

چکیده

در این تحقیق، وجود باکتری همزیست داخلی در برخی از تشتک های کشت درون شیشه ای قارچ *Gigaspora margarita* از طریق مورفولوژیکی و مولکولی مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور اقدام به جداسازی اندام‌های مختلف قارچ شامل اسپور، ریسه های رویشی، سلول های کمکی و ریشه‌های میکوریزایی شده قارچ در شرایط کشت درون شیشه ای گردید. جهت حذف آلودگی‌های سطحی از ساختارهای قارچی شامل هیف ها، اسپورها و سلول های کمکی، تمامی اندام های قارچی ضد عفونی سطحی شده و جهت اطمینان از عدم وجود آلودگی سطحی توسط کیت ارزیابی قوه نامیه باکتریایی مورد بررسی قرار گرفتند. اندام های قارچی خرد شده، سپس محتویات سیتوپلاسمی آن رنگ آمیزی گردید. باکتری های زنده زیر نور آبی میکروسکوپ فلورسنت به رنگ زرد تا سبز روشن و میله ای شکل و باکتری های مرده به رنگ قرمز مشاهده شدند. باکتری های همزیست داخلی در اندام های مختلف قارچ شامل اسپورها، لوله تندشی، هیف‌های خارج ریشه‌ای و سلول‌های کمکی مشاهده شد.

* بخشی از رساله دکتری نگارنده اول، ارائه شده به دانشگاه تربیت مدرس

** مسئول مکاتبه

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

همچنین سلول های باکتریایی در حال تقسیم در تمامی اندام های قارچی مورد بررسی به ویژه در اسپورهای در حال تندش قابل تشخیص بود. نتایج بررسی مولکولی با استفاده از مجموعه آغازگرهای اختصاصی نیز حاکی از وجود باکتری همزیست داخلی در اندام های مختلف قارچ در تعدادی از تشتک های کشت درون شیشه ای *G. margarita* شامل اسپورها، میسلیوم‌ها، سلول های کمکی و ریشه های میکوریزایی بود. در عین حال، در برخی دیگر از تشتک های قارچ، اثری از پیکره های باکتریایی همزیست به چشم نمی خورد که نشان دهنده تفاوت در بین نمونه های قارچی از نظر حضور یا عدم حضور باکتری همزیست بود.

واژه های کلیدی: باکتری همزیست داخلی، قارچ میکوریز آربوسکولار، *Gigaspora margarita*

مقدمه

علاوه بر ارتباط متقابل و بسیار شناخته شده بین گیاهان و قارچ های میکوریز، مشخص شده است که ریشه گیاهان به عنوان یک جایگاه اکولوژیکی مهم برای سایر عوامل میکروبی نیز به شمار می آید. بسیاری از باکتری ها چرخه زیستی خود را در داخل سلول موجودات زنده یوکاریوت تکمیل می کنند (Moran & Wernegreen 2000). این باکتری های مقیم ممکن است در داخل سلول های تخصص یافته (Bacteriocytes) در بدن حشرات و کرم ها در سلسله جانوری و یا در داخل اندام های تخصص یافته (گره‌ها) در تعداد معدودی از گونه های گیاهی با قابلیت همزیستی با عوامل پروکاریوت تثبیت کننده ازت مشاهده گردند. در این بین سلسله قارچ ها نیز از این قاعده مستثنی نمانده و تعدادی از این باکتری ها دارای رابطه همزیستی با قارچ ها می باشند. به عنوان مثال، قارچ *Geosiphon pyriforme*، که در سال های اخیر در شاخه Glomeromycota قرار داده شده است و دارای قرابت با قارچ های میکوریز آربوسکولار می باشد (Schuessler *et al.* 2001)، میزبان نوعی از سیانوباکتری هاست که در ناحیه نوک هیف این قارچ تجمع پیدا می کنند (Schuessler & Kluge 2001). در سال های اخیر باکتری های همزیست داخلی در برخی از گونه های قارچ های میکوریز آربوسکولار به ویژه اعضای خانواده Gigasporaceae گزارش شده اند و بنظر می رسد که این باکتری ها بعنوان یک جزء ثابت سیتوپلاسمی همراه با قارچ از یک نسل به نسلی دیگر منتقل می شوند. این نوع همزیستی بین قارچ های میکوریز آربوسکولار و باکتری ها در موارد زیادی مشاهده و گزارش

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

شده است (Mosse 1970; Scanneirini & Bonfante 1991; Bonfante *et al.* 1994). این ساختارهای سیتوپلاسمی ابتدا تحت عنوان موجودات مشابه باکتری[1] (BLOs) نامگذاری گردیدند که در گونه های مختلف قارچ های میکوریز آربوسکولار از جمله *Glomus caledonium*، *Acaulospora leavis* و *Gigaspora margarita* توسط میکروسکوپ الکترونی ردیابی شدند (Scanneirini & Bonfante 1991; Bonfante *et al.* 1994). با مطالعات تلفیقی مرفولوژیکی و مولکولی مشخص شد که این عوامل موجود در اسپور جدایه های *Gi. margarita* باکتری های حقیقی می باشند (Bianciotto *et al.* 1996). باکتری های همزیست با قارچ های میکوریز آربوسکولار در بسیاری از موارد چرخه زیستی خود را در درون ساختارهای قارچ تکمیل می کنند. جدایه BEG34 از گونه *G. margarita* شامل تعداد بسیار زیادی از این باکتری های همزیست بود که به سادگی با رنگ‌های فلورسنت که برای باکتری‌ها اختصاصی عمل می کنند قابل تشخیص هستند. بر اساس توالی های 16SrDNA از گونه های *G. margarita*، *Scutellospora persica*، *S. castanea* و *G. decipiens* یک گروه (Clade) با میزان تشابه بسیار بالا بدست آمده که همه حامل باکتری های همزیستی بودند که تاکنون در خانواده Gigasporaceae تعیین توالی شده اند. این گروه بسیار نزدیک به جنس *Burkholderia* بوده و از طرفی به جنس های *Ralstonia* و *Pandorea* نیز نزدیک می باشد. بر این اساس یک تاکسون جدید برای این گروه از باکتری ها با نام Candidatus Glomeribacter gigasporarum پیشنهاد گردیده است (Bianciotto *et al.* 2003). بررسی ها نشان داده است که این باکتری ها به عنوان یک جزء ثابت سیتوپلاسمی در اعضای خانواده Gigasporaceae دیده می شوند. از طرفی آزمایش های مقدماتی نشان داده که این باکتری ها همراه با قارچ از یک نسل به نسلی دیگر، بصورت عمودی[2] منتقل می شوند (Bianciotto *et al.* 2004). این تحقیق به منظور شناسایی این باکتری همزیست داخلی در برخی از جدایه های *G. margarita* در ایران و با استفاده از روش‌های مرفولوژیک و مولکولی صورت پذیرفت.

[1] Bacterium-like Organisms
[2] Vertical transmission

روش بررسی

این تحقیق در دو مرحله، مشتمل بر شناسایی مرفولوژیک و مولکولی انجام شد. در مطالعات مرفولوژیک، ساختارهای مختلف قارچی نظیر اسپورها، میسلیوم ها و سلول های کمکی از تشتک های کشت درون شیشه ای مختلف گونه *G. margarita* در زیر استریومیکروسکوپ و در شرایط سترون جدا شده و در داخل لوله های اپندروف سترون ۱/۵ میلی لیتری بطور جداگانه و داخل کمی آب مقطر سترون و فیلتر شده نگاهداری شدند. در مرحله بعد عمل شستشو توسط آب مقطر سترون فیلتر شده ۵ بار و هر بار به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت. سپس این ساختارهای قارچی توسط یک محلول ضد عفونی کننده سطحی شامل ٪٤

کلرآمین تی و ٪۰/۰٤ سولفات استرپتومایسین به مدت ۳۰ دقیقه تیمار شدند. سپس عمل سونیکاسیون[1] و شستشو توسط آب مقطر سترون فیلتر شده ۵ بار و هر بار به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. جهت حصول اطمینان از عدم وجود باکتری های آلوده کننده سطحی در سطوح خارجی اندام های قارچی به ویژه اسپورها، قبل از خرد کردن اندام های قارچی، رنگ آمیزی توسط کیت ارزیابی قوه نامیه باکتریایی (Live/Dead *Bac*-Light Molecular Probes Europe BV) و بر اساس روش *بیانچیوتو* و همکاران (Bianciotto *et al.* 1996) صورت گرفته و توسط میکروسکوپ فلورسنت با سیستم *کونفوکال*[2] (Nikon Optiphot-2, View Scan DVC-250, Bio-Rad, Hemel Hempstead,UK) مورد بررسی قرار گرفت. سپس اسپورها، سلول های کمکی و نیز هیف ها روی یک لام و در زیر لامل توسط فشار به آرامی خرد شدند تا محتویات سیتوپلاسمی از درون آن ها آزاد گردد. این ساختارها به مدت حداقل ۵ دقیقه در تاریکی نگاهداری شده و سپس رنگ آمیزی توسط همان کیت ارزیابی قوه نامیه باکتریایی صورت گرفته و توسط میکروسکوپ فلورسنت با سیستم کونفوکال بررسی گردیدند. در مطالعات مولکولی نیز نیاز به تهیه اسپور قارچ، میسلیوم و سلول های کمکی و نیز ریشه های کلنیزه شده توسط قارچ بود. بدین منظور در شرایط سترون و به کمک پنس های ظریف و زیر استریومیکروسکوپ اقدام به جداسازی اسپورهای قارچ شده و

[1] Sonication
[2] Confocal system

اسپورها پس از جمع آوری در داخل لوله اپندروف سترون چندین بار توسط آب مقطر سترون فیلتر شده شسته و توسط مخلوط کلرآمین تی(٤٪) و استرپتومایسین (٠/٠٣٪) به مدت ١٥ دقیقه ضد عفونی شدند. پس از ضد عفونی، اسپورها مجددا توسط آب مقطر سترون فیلتر شده ٥ بار و هر بار به مدت یک ساعت مانند روش بالا شسته شده و سپس در داخل لوله اپندروف در دمای ٢٠- درجه سانتیگراد نگاهداری شدند. از طرفی هیف ها و سلول های کمکی قارچ نیز بطور مشابه جدا شده و در لوله های اپندروف سترون حاوی ٣٠ میکرولیتر بافر PCR (1X) در دمای ٢٠- درجه سانتیگراد حفظ شدند. ریشه های موئین القایی کلنیزه شده توسط قارچ نیز در شرایط سترون از تشتک های کشت خارج و در قطعات کوچک به داخل لوله های اپندروف سترون منتقل و در دمای ٢٠- درجه سانتیگراد نگاهداری شدند. جهت استخراج DNA از اسپورها و مجموعه هیف ها و سلول های کمکی از روش لانفرانکو و همکاران (Lanfranco *et al.* 2001) استفاده شد. در این روش اسپورها، هیف ها و سلول های کمکی قارچ پس از جدا شدن، ٣-٤ مرتبه توسط آب مقطر سترون شسته شده و سپس توسط محلول کلرآمین تی (٤٪) و سولفات استرپتومایسین (٠/٠٠٤٪) به مدت ١٠ دقیقه ضد عفونی شده و ٤ بار در دستگاه اولتراسونیک و هر بار به مدت ١-٢ دقیقه تحت تیمار سونیکاسیون قرار گرفتند. سپس ٥-١٠ اسپور همراه با ٣٠ میکرولیتر از بافر PCR (1X) (شامل ١٠ میلی مولار تریس با pH=٨، ٥٠ میلی مولار KCl و ١/١ میلی مولار $MgCl_2$) مخلوط و بطور کامل داخل لوله اپندروف خرد شدند. مخلوط به مدت ١٥ دقیقه در دمای ٩٥ درجه سانتیگراد نگاهداری شده و سپس به مدت ٥ دقیقه با دور ١٠٠٠٠*g* سانتریفوژ و محلول رویی حامل DNA جدا و در دمای ٢٠- درجه سانتیگراد جهت مطالعات بعدی نگاهداری شد. استخراج DNA از ریشه های میکوریزایی به کمک کیت استخراج DNA (Dneasy Plant Mini Kit, Qiagen) انجام شد.

واکنش های تکثیری PCR در قالب سه آزمایش مستقل ولی مرتبط به هم انجام شد. در مرحله اول، جهت تائید حضور قارچ در نمونه های ساختارهای مختلف و نیز ریشه و امکان تکثیر قطعه DNA مورد نظر تصمیم به استفاده از آغازگر طراحی شده برای زیر واحد بزرگ ریبوزومی (٢٨S) در قارچ های میکوریز آربوسکولار (28G1/28G2) و انجام PCR گرفته شد. نمونه های مورد بررسی شامل نمونه های فاقد DNA (کنترل منفی)، نمونه استاندارد از گونه

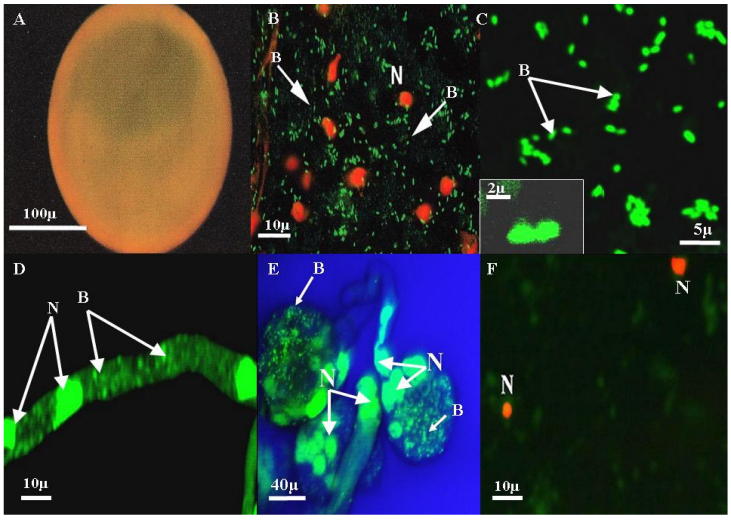
G. margarita BEG34 حاوی باکتری همزیست تهیه شده از بانک قارچ های میکوریز آربوسکولار، انگلستان، نمونه DNA استحصالی از اسپورهای قارچ مورد بررسی، نمونه DNA استحصالی از هیف ها و سلول های کمکی قارچ مورد بررسی، DNA استحصالی از ریشه های کلنیزه شده توسط قارچ مورد بررسی و DNA استحصالی از ریشه القایی کلنیزه نشده (فاقد قارچ) بودند. واکنش تکثیری در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۲/۵ میکرولیتر از بافر PCR با غلظت 10X، ۲/۵ میکرولیتر از dNTP ها، ۱/۲۵ میکرولیتر از هر یک از آغازگرها (28G1/28G2)، ۰/۷ میکرولیتر از آنزیم Red *Taq* polymerase، ۰/۳ میکرولیتر از BSA و ۳ میکرولیتر از نمونه DNA مورد بررسی و با شرایط زیر انجام شد: ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتیگراد و سپس ۳۵ چرخه شامل ٤٥ ثانیه در ٩٤ درجه سانتیگراد، ٤٥ ثانیه در ٥٥ درجه سانتیگراد و ٤٥ ثانیه در ٧٢ درجه سانتیگراد و در نهایت ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتیگراد برای گسترش نهایی. پس از اتمام واکنش PCR، نمونه های تکثیری از طریق الکتروفورز روی ژل آگاروز ٪۱/۲ و در بافر TAE (تریس–استات–EDTA) مورد بررسی قرار گرفتند. در مرحله بعد، پس از حصول اطمینان از امکان تکثیر قطعه DNA و حضور DNA قارچ در نمونه ها، اقدام به انجام واکنش PCR جهت تکثیر DNA ریبوزومی باکتری های همزیست با قارچ گردید. در این آزمایش، واکنش تکثیری PCR با استفاده از نمونه فاقد DNA (کنترل منفی)، نمونه استاندارد از گونه *G. margarita* BEG34 حاوی باکتری همزیست، نمونه DNA بدست آمده از اسپورهای قارچ مورد بررسی، نمونه DNA استحصالی از هیف ها و سلول های کمکی قارچ مورد بررسی و DNA بدست آمده از ریشه های کلنیزه شده توسط قارچ و توسط آغازگرهای BLOf با توالی 5'-CACAGGTTTGAAACACTGGGT-3' و BLOr با توالی 5'-GTCATCCACTCCGATTATTTA-3' (Bianciotto *et al.* 1996) صورت پذیرفت. این آغازگرها جهت تکثیر توالی هایی بطول ٤١١ جفت باز از زیر واحد کوچک ریبوزومی (١٦S) طراحی شده اند و بطور اختصاصی در شناسایی باکتری های همزیست داخلی در گونه قارچی *G. margarita* بکار می روند (Bianciotto *et al.* 1996). شرایط واکنش مشابه آزمایش اول بوده و تنها تفاوت، افزایش دمای مرحله اتصال آغازگر به ٦٠ درجه سانتیگراد بود. محصولات تکثیر پس از اتمام واکنش از طریق الکتروفورز روی ژل آگاروز ٪۲ در بافر TAE مورد ارزیابی قرار

گرفتند. در مرحله بعدی جهت اطمینان از وجود باکتری و تعیین گونه باکتری همزیست (Cabdidatus Glomeribacter gigasporarum)، نمونه های مورد بررسی (مشابه آزمایش دوم) توسط آغازگرهای جدید GlomGIGf با توالی '5'-GGGTCCATTGCGGATTACTTC-3 و نیز GlomGIGr با توالی '5'-GGGACCAGGACTTCCATCCC-3 (Bianciotto *et al.* 2004) تحت تاثیر واکنش PCR قرار داده شدند. این جفت آغازگر جهت تکثیر توالی هایی بطول ٥٦٥ جفت باز و از زیر واحد بزرگ ریبوزومی (٢٣S) طراحی شده و بعنوان آغازگرهای اختصاصی گونه باکتری همزیست در قارچ میکوریز *G. margarita* محسوب می‌شوند (Bianciotto *et al.* 2004). در این آزمایش نیز کلیه شرایط واکنش PCR مشابه آزمایش دوم بود. محصولات PCR پس از اتمام واکنش از طریق الکتروفورز روی ژل آگاروز ٪٢ در بافر TAE مورد بررسی قرار گرفتند.

نتیجه

در این مطالعه پس از ضد عفونی سطحی کامل اندام های قارچی و رنگ آمیزی آن ها و مشاهدات میکروسکوپی، هیچگونه آلودگی باکتریایی در سطح خارجی اندام های قارچی مشاهده نگردید (شکل ١). پس از خرد کردن اندام های قارچی و آزاد شدن محتویات سیتوپلاسمی و رنگ آمیزی و مشاهده این ساختارهای درون سلولی، باکتری‌های زنده در زیر نور آبی میکروسکوپ فلورسانت به رنگ زرد تا سبز روشن و میله‌ای شکل دیده شد. باکتری‌های مرده نیز به رنگ قرمز مشاهده شدند (شکل ١). این باکتری‌های همزیست داخلی در اندام‌های مختلف قارچ شامل اسپورها، هیف‌های تندش یافته از اسپور، هیف‌های خارج ریشه‌ای و سلول‌های کمکی مشاهده شد و نیز سلول‌های باکتریایی در حال تقسیم در تمامی اندام‌های قارچی مورد بررسی به ویژه در اسپورهای در حال تندش قابل تشخیص بود (شکل ١).

در بررسی های مولکولی در آزمایش اول در نمونه استاندارد (*G. margarita* BEG34) حاوی باکتری همزیست ، نمونه DNA استحصالی از اسپورهای قارچ، هیف ها و سلول های کمکی قارچ و DNA حاصل از ریشه های کلنیزه شده توسط قارچ، قطعه ای بطول ٦٠٠ جفت باز تکثیر و پس از الکتروفورز روی ژل قابل رویت بود (شکل ٢). مشاهده باند در



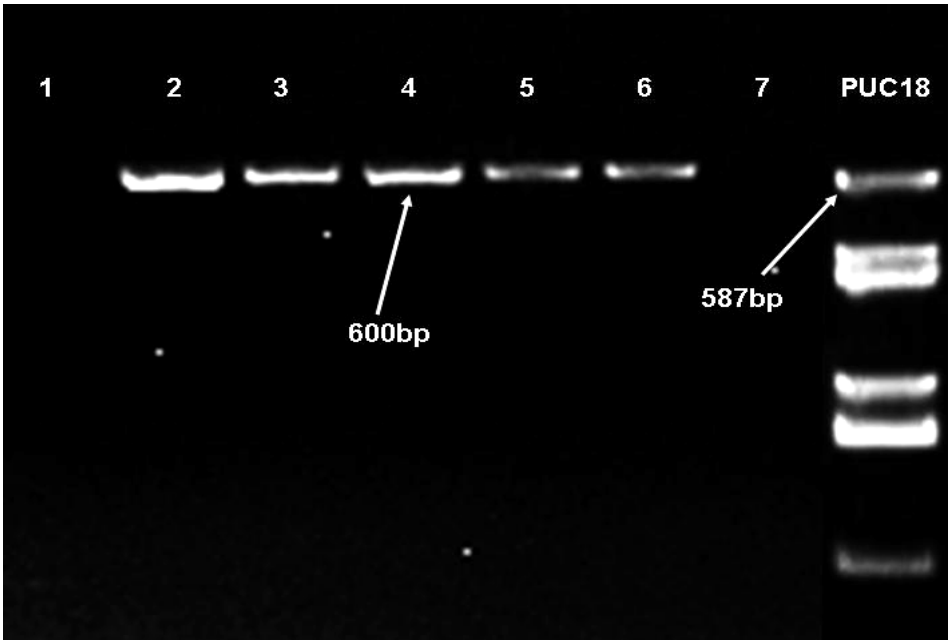
شکل ۱- وجود باکتری همزیست داخلی (Candidatus Glomeribacter gigasporarum) در اندام های مختلف برخی از جدایه های گونه قارچی *Gigaspora margarita* ؛ A: عدم آلودگی سطحی باکتریایی در سطح خارجی اسپورهای ضد عفونی شده گونه *G. margarita*، B: سیتوپلاسم اسپور قارچ شامل تعداد بسیار زیاد سلول های باکتری همزیست داخلی بصورت میله ای شکل و به رنگ سبز فلورسانت (B) و هسته قارچ (N)، C: سیتوپلاسم اسپورهای جوان قارچ حاوی تعداد زیادی سلول های باکتری (B) و نمای بزرگ شده از باکتری در حال تقسیم (تصویر داخلی)، D: میسلیوم های خارج ریشه ای حاوی هسته های قارچ (N) و سلول های باکتری همزیست (B)، E: سلول های کمکی قارچ حاوی هسته قارچ (N) و سلول های باکتری همزیست داخلی (B)، F: جدایه های قارچی فاقد باکتری همزیست داخلی و دارای هسته (N).

Fig. 1. Occurrence of symbiotic endobacterium (*Candidatus Glomeribacter gigasporarum*) in different fungal structures of some isolates of *Gigaspora margarita*. A: No bacterial contamination on external surface of sterilized spores of *G. margarita*. B: Cytoplasm of spore containing many living rod-shaped bacteria that fluoresce green (B) and fungal nuclei (N). C: Cytoplasm of young spores containing bacterial cells (B) and magnified view of dividing bacteria (insert picture). D: Extraradical mycelia containing fungal nuclei (N) and bacteria cells (B). E: Auxiliary cells containing fungal nuclei (N) and bacterial cells (B). F: Fungal isolates without symbiotic endobacteirum with nuclei (N).

نمونه های مذکور حاکی از موفقیت روش استخراج DNA و وجود DNA قارچی در نمونه های بدست آمده بود. همانگونه که انتظار می رفت در نمونه های DNA استحصالی از ریشه های القایی کلنیزه نشده و فاقد قارچ هیچگونه باندی قابل رویت نبود و این نشان دهنده اختصاصی بودن مجموعه آغازگرهای مورد استفاده جهت تکثیر توالی های مورد نظر تنها در DNA قارچی بود.

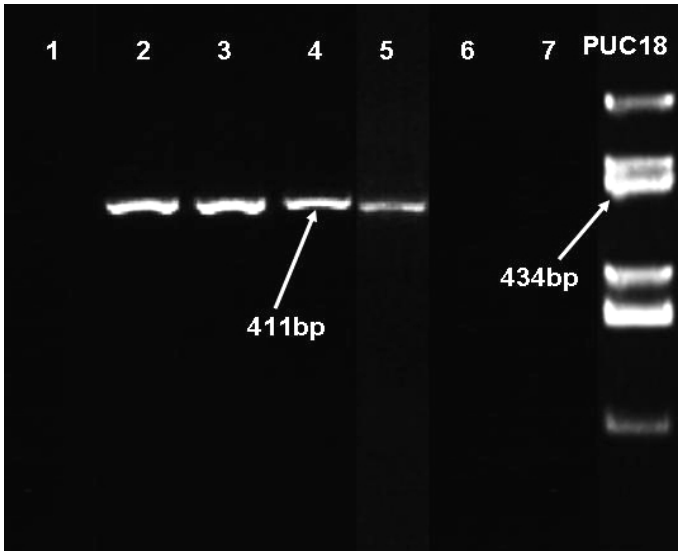
در آزمایش دوم پس از انجام واکنش تکثیری و بررسی محصولات PCR از طریق الکتروفورز، در نمونه های کنترل مثبت (*G. margarita* BEG34) حاوی باکتری همزیست و نیز DNA بدست آمده از اسپورها، هیف ها، سلول های کمکی و نیز ریشه های کلنیزه شده در برخی از تشتک های کشت درون شیشه ای، باندی مشخص قابل رویت بود که نشان دهنده حضور باکتری در مراحل مختلف چرخه زیستی قارچ اعم از مراحل اسپوری، سلول های کمکی و هیف های قارچ و نیز ریشه های کلنیزه شده توسط قارچ بود (شکل ۳). البته باند مشاهده شده در نمونه DNA بدست آمده از ریشه میکوریزایی در مقایسه با اسپور و سلول‌های کمکی قارچ با وضوح کمتری مشاهده می گردید زیرا میزان DNA باکتری در ریشه گیاه میزبان بسیار کمتر از DNA باکتری در اسپور قارچ و یا هیف ها و سلول های کمکی قارچ است که محل تجمع اصلی این باکتری ها می باشند. از طرفی در نمونه DNA بدست آمده از اسپورها و ریشه های کلنیزه شده در برخی دیگر از کشت های درون شیشه ای هیچگونه باندی قابل رویت نبود که نشان دهنده وجود اختلاف در بین پلیت های کشت شده قارچی از نظر حضور یا عدم حضور باکتری بود. در این بررسی طول قطعات تکثیر شده و قابل رویت در حدود ۴۱۱ جفت باز بود. مجموعه آغازگرهای بکار برده شده (BLOf/BLOr) براساس توالی های زیر واحد کوچک ریبوزومی در باکتری طراحی شده و بطور اختصاصی در شناسایی باکتری های همزیست داخلی در گونه *G. margarita* بکار می روند (Bianciotto *et al.* 1996).

در آزمایش سوم پس از انجام واکنش تکثیری و الکتروفورز محصولات PCR، در نمونه‌های شاهد مثبت (*G. margarita* BEG34) حاوی باکتری همزیست، DNA بدست آمده از اسپور، هیف‌ها، سلول‌های کمکی و نیز ریشه‌های کلنیزه شده در برخی از کشت‌های درون



شکل ۲- قطعه ۶۰۰ جفت بازی تکثیر شده از DNA استخراج شده از ریشه های القایی هویج و ساختارهای مختلف قارچ *Gigaspora margarita* با استفاده از آغازگرهای 28G1/28G2 و پس از الکتروفورز روی ژل آگاروز ۱/۲٪. 1: نمونه شاهد منفی آب مقطر؛ 2: نمونه شاهد مثبت حاوی DNA جدایه *G. margarita* BEG34 حاوی باکتری همزیست؛ 3: نمونه DNA استخراج شده از اسپورهای قارچ؛ 4: نمونه DNA استخراج شده از میسلیوم های قارچ؛ 5: نمونه DNA استخراج شده از سلول های کمکی قارچ؛ 6: نمونه DNA استخراج شده از ریشه های میکوریزایی شده؛ 7: نمونه DNA استخراج شده از ریشه های القایی غیر میکوریزایی و فاقد قارچ؛ PUC18: مارکر PUC18.

Fig. 2. Amplified fragment (600bp) of extracted DNA from carrot's transformed roots and different fungal structures of *Gigaspora margarita* using 28G1/28G2 primers after electrophoresis on Agarose gel (1.2%). 1: Negative control H_2O. 2: Positive control containing DNA of *G. margarita* BEG34 with symbiotic bacterium. 3: DNA extracted from fungal spores. 4: DNA extracted from fungal mycelia. 5: DNA extracted from fungal auxiliary cells. 6: DNA extracted from mycorrhized roots. 7: DNA extracted from transformed nonmycorrhized roots without fungus. PUC18: PUC18 as size marker.

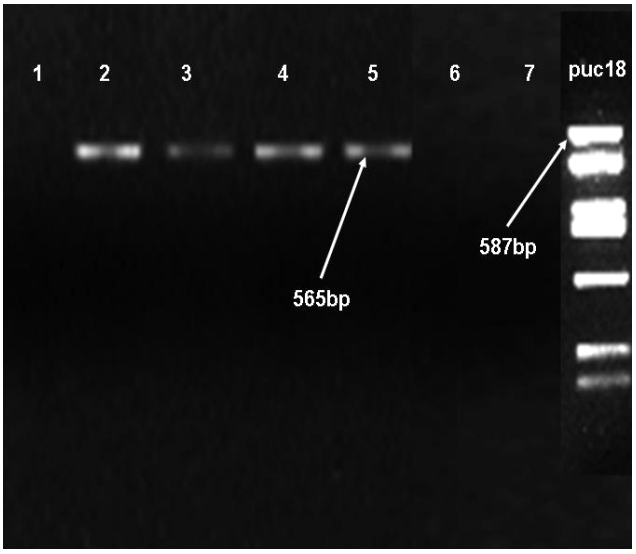


شکل ۳- قطعه ۴۱۱ جفت بازی تکثیر شده از DNA استخراج شده از ریشه های القایی هویج و ساختارهای مختلف قارچ *Gigaspora margarita* با استفاده از آغازگرهای BLOf/BLOr و پس از الکتروفورز روی ژل آگاروز ٪۲. 1: نمونه شاهد منفی آب مقطر؛ 2: نمونه شاهد مثبت حاوی DNA جدایه *G. margarita* BEG34 حاوی باکتری همزیست؛ 3: نمونه DNA استخراج شده از اسپورهای جدایه های حاوی باکتری؛ 4: نمونه DNA استخراج شده از سلول های کمکی و هیف های جدایه های حاوی باکتری؛ 5: نمونه DNA استخراج شده از ریشه های میکوریزایی شده توسط جدایه های حاوی باکتری؛ 6: نمونه DNA استخراج شده از اسپورهای جدایه های فاقد باکتری؛ 7: نمونه DNA استخراج شده از ریشه های میکوریزایی شده توسط جدایه های فاقد باکتری؛ PUC18: مارکر PUC18.

Fig. 3. Amplified fragment (411bp) of extracted DNA from carrot's transformed roots and different fungal structures of *Gigaspora margarita* using BLOf/BLOr primers after electrophoresis on Agarose gel (1.2%). 1: Negative control H_2O. 2: Positive control containing DNA of *G. margarita* BEG34 with symbiotic bacterium. 3: DNA extracted from fungal spores with bacterium. 4: DNA extracted from fungal auxiliary cells and mycelia with bacterium. 5: DNA extracted from mycorrhized roots with bacterium. 6: DNA extracted from fungal spores without bacterium. 7: DNA extracted from mycorrhized roots by fungal strains without bacterium. PUC18: PUC18 as size marker.

شیشه‌ای، باندی قابل رویت بود که نشان دهنده حضور گونه مورد نظر باکتری در مراحل مختلف چرخه زیستی قارچ اعم از اسپور، سلول های کمکی، هیف های قارچ و نیز ریشه های میکوریزایی شده توسط جدایه های قارچ بود (شکل ۴). در این حالت نیز در برخی از نمونه‌های DNA بدست آمده از تعداد دیگری از کشت های درون شیشه ای، هیچگونه باندی قابل رویت نبود که نشان دهنده وجود اختلاف در بین این تشتک های قارچی در وجود یا عدم وجود گونه باکتری همزیست بود.

تحقیقات نشان داده است که اسپورها و سلول های کمکی بخش هایی از اندام های رویشی قارچ می باشند که باکتری بیشتر ترجیح به حضور در این مکان ها را دارد. باکتری در هیف های تندشی و میسلیوم های درون ریشه ای نیز تکثیر می شود ولی در انشعابات ظریف آربوسکول ها بدلیل قطر و ضخامت کم این انشعابات هرگز مشاهده نشده است (Bonfante 2006؛ مکاتبات خصوصی). بر اساس مطالعه پیرامون توالی های زیر واحد 16S از DNA ریبوزومی در ابتدا مشخص گردید که باکتری های همزیست با این جدایه متعلق به جنس *Burkholderia* می باشند (Bianciotto *et al,* 1996). در مطالعه‌ای دیگر با استفاده از ۱۱ جدایه قارچی بدست آمده از مناطق جغرافیایی مختلف و متعلق به ٦ گونه متفاوت از خانواده Gigasporaceae شامل گونه های *G. margarita*، *G. rosea*، *G. gigantea*، *G. decipiens*، *Scutellospora persica* و *S. castanea* مشخص شد که به استثناء گونه *G. rosea*، در بقیه گونه ها این باکتری های همزیست وجود دارند (Bianciotto *et al.* 2000). از طرفی بر اساس توالی های 16SrDNA تکثیر شده با روش PCR از گونه های *G. margarita*، *S. persica*، *S. castanea* و *G. decipiens* یک گروه (Clade) با میزان حمایت بسیار بالا بدست آمد که شامل تمامی باکتری های همزیستی بود که تاکنون در خانواده Gigasporaceae تعیین توالی شده بودند. این کلاد شباهت بسیار بالایی به جنس *Burkholderia* نشان داد و از طرفی به جنس های *Ralstonia* و *Pandorea* نیز نزدیک بود. بر این اساس یک تاکسون جدید باکتریایی پیشنهاد گردید که آن را با نام *Candidatus Glomeribacter gigasporarum* معرفی نمودند (Bianciotto *et al.* 2003). نتایج حاکی از آن بود که این باکتری ها بعنوان یک جزء ثابت سیتوپلاسمی در اعضای خانواده Gigasporaceae دیده می شوند. از طرفی آزمایش های



شکل ۴- قطعه ۵۶۵ جفت بازی تکثیر شده از DNA استخراج شده از ریشه های القایی هویج و ساختارهای مختلف قارچ *Gigaspora margarita* با استفاده از آغازگرهای GlomGIGf/GlomGIGr و پس از الکتروفورز روی ژل آگاروز ٪۲. 1: نمونه شاهد منفی آب مقطر؛ 2: نمونه شاهد مثبت حاوی DNA جدایه *G. margarita* BEG34 حاوی باکتری همزیست؛ 3: نمونه DNA استخراج شده از ریشه های میکوریزایی شده توسط اسپورهای جدایه های حاوی باکتری؛ 4: نمونه DNA استخراج شده از سلول های کمکی و هیف های جدایه های حاوی باکتری؛ 5: نمونه DNA استخراج شده از اسپورهای جدایه های حاوی باکتری؛ 6: نمونه DNA استخراج شده از اسپورهای جدایه های فاقد باکتری؛ 7: نمونه DNA استخراج شده از ریشه های میکوریزایی شده توسط جدایه های فاقد باکتری؛ PUC18: مارکر PUC18.

Fig. 4. Amplified fragment (565bp) of extracted DNA from carrot's transformed roots and different fungal structures of *Gigaspora margarita* using GlomGIGf/GlomGIGr primers after electrophoresis on Agarose gel (1.2%). 1: Negative control H_2O. 2: Positive control containing DNA of *G. margarita* BEG34 with symbiotic bacterium. 3: DNA extracted from mycorrhized roots colonized by fungal strains with bacterium. 4: DNA extracted from fungal auxiliary cells and mycelia with bacterium. 5: DNA extracted from fungal spores with bacterium. 6: DNA extracted from fungal spores without bacterium. 7: DNA extracted from mycorrhized roots colonized by fungal strains without bacterium. PUC18: PUC18 marker as size marker.

مقدماتی نشان داد که این باکتری های همراه با قارچ از یک نسل به نسلی دیگر و بصورت عمودی نیز منتقل می شوند (Bianciotto *et al.* 2004). این باکتری ها، گرم منفی، میله ای شکل و به ابعاد ۲-۱/۵ × ۱/۲-۰/۸ میکرومتر بوده و بصورت انفرادی یا گروهی و احاطه شده در غشاهای واکوئلی مشاهده می شوند (Bianciotto *et al.* 2003). در تعدادی دیگر از تحقیقات مشخص شده است که این باکتری ها می توانند در داخل اسپورها و یا هیف های جنس *Glomus* نیز حضور داشته باشند و لذا به نظر می رسد که این باکتری ها تنها به اعضای خانواده Gigasporaceae محدود نمی شوند (Scanneirini & Bonfante 1991). این باکتری ها ممکن است از ترشحات هیف قارچی تغذیه نمایند و یا از میسلیوم قارچ به عنوان وسیله ای جهت کلنیزاسیون ریزوسفر استفاده کنند (Bianciotto *et al.* 1996). بر اساس نظر محققین، این باکتری ها در طول میسلیوم قارچ و از طریق جریانات شدید سیتوپلاسمی که سبب انتقال ذرات چربی و هسته ها در سراسر میسلیوم می شوند، منتقل می گردند (Bago *et al.* 1999, Uetake *et al.* 2002). بعلاوه تجمع بسیار زیاد این باکتری ها در داخل اسپورها ممکن است مربوط به فرآیند های متابولیکی قارچی باشد. *باگو* و همکاران (Bago *et al.* 2000) طی تحقیقات خود به وجود نوعی جریان مواد قندی از میسلیوم های درون ریشه ای به سمت میسلیوم های خارج ریشه ای پی بردند. هیف های درون ریشه‌ای، قندهای هگزوز را جذب کرده و بدین طریق از این قندها، لیپیدها و گلیکوژن را می سازند. این دو منبع اصلی کربن و انرژی بنظر می رسد که به سمت هیف های خارج ریشه ای حرکت کرده و در آن جا بعنوان منابع متابولیکی و ذخیره ای در اسپورهای تازه تشکیل شده مورد استفاده قرار می گیرند (Bago *et al.* 1999, 2002). بنابراین می توان گفت که این باکتری های همزیست داخلی بطور طبیعی به این مناطق رانده شده تا دسترسی کافی به منابع غذایی داشته باشند و شاید به همین علت هم اسپورها از مناطق عمده تجمع این باکتری ها محسوب می شوند (Bianciotto *et al.* 2004). اهمیت کاربردی این باکتری های همزیست هنوز چندان مشخص نیست. تلاش های بسیاری که جهت کشت این باکتری ها تاکنون صورت گرفته با شکست مواجه شده است. نتایجی از کتابخانه ژنومی ایجاد شده از اسپورهای گونه *G. margarita* که حاوی توالی های باکتریایی نیز بوده اند (van Buuren *et al.* 1999) در جهت شناخت برخی از

ژن های موجود در باکتری همزیست این قارچ استفاده شده و در این جهت اطلاعات ذیقیمتی بدست آمده است. در بین این ژن های باکتریایی شناخته شده تاکنون، ژن های مسئول در جذب عناصر غذایی (مانند اپرون فسفات ترانسپورتر)، ژن های مسئول در کلنیزاسیون توسط سلول های باکتری *(vac)* و ژن های مسئول فرآیند جذب شیمیایی (کموتاکیس) شناسایی و تعیین توالی شده اند (Ruiz-Lozano & Bonfante 1999, 2000, Minerdi *et al.* 2002).

سپاسگزاری

این تحقیق با حمایت مالی دانشگاه تربیت مدرس صورت پذیرفته است. از زحمات و راهنمائی های جناب آقایان دکتر ابراهیم محمدی گل تپه و دکتر عزیزاله علیزاده در جهت انجام مراحل تحقیق متشکرم. بدینوسیله از سرکار خانم پروفسور پائولا بونفانته، خانم دکتر والریا بیانچیوتو و خانم دکتر اریکا لومینا بخش قارچ شناسی، دانشگاه تورینو، ایتالیا جهت فراهم نمودن امکانات آزمایشگاهی جهت انجام این تحقیق و راهنمائی های ارزنده بسیار سپاسگزارم.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (150-147) متن انگلیسی مراجعه شود.

نشانی نگارندگان: دکتر یونس رضایی، گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه، دکتر ابراهیم محمدی گل تپه و دکتر عزیزاله علیزاده، گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس، صندوق پستی ۳۳۶-۱۴۱۱۵، تهران؛ دکتر اریکا لومینی، دکتر والریا بیانچیوتو و پروفسور پائولا بونفانته، گروه قارچ شناسی، دانشگاه تورینو، ایتالیا