مجله دانش گياهپزشكي ايران
دوره ۴۰، شماره ۱، ۱۳۸۸ (۲۳-۱۷)

شناسايي قارچ‌هاي ميكوريزآربسكولار در درختان نارنگي كينو (*Citrus nobilis* × *Citrus deliciosa*) پيوند شده برروي پايه رافلمون با استفاده ازتكنيک واكنش زنجيره‌اي پلي‌مراز

محمدحسين شمشيري[1]* و بوپيندارسينگ[2]
۱، استاديار، گروه علوم باغباني، دانشكده كشاورزي، دانشگاه ولي عصر"عج" رفسنجان
۲، دانشيارفيزيولوژي گياهي، لابراتوارتحقيقات هسته‌اي (NRL)،
انستيتوتحقيقات كشاورزي هند (I.A.R.I.)، دهلي نو، هند
(تاريخ دريافت: ۸۷/۶/۵ - تاريخ تصويب: ۸۸/۵/۷)

چكيده

درختان نارنگي كينو دوساله پيوندشده بروي پايه رافلمون با جدايه‌هاي مختلفي ازقارچ ميكوريزآربسكولار شامل ***Glomus manihotis*, *Gigaspora gigantean*, *Glomus mosseae*** بصورت جداگانه و مخلوط مايه‌كوبي گرديدند. پنج پرايمر اختصاصي جنس‌هاي **Glomus** و **Gigaspora** به نام‌هاي **VAGLO VANS1, NS21, NS61** و **VAGIGA** پس از ساخت و با استفاده از **DNA** استخراج شده از ريشه‌هاي آلوده به ميكوريزآربسكولار با استفاده از تكنيک واكنش زنجيره‌اي پلي‌مراز مورد آزمون قرار گرفتند. دراين مطالعه پرايمر **VAGLO** بعنوان پرايمر اختصاصي جنس **Glomus** به همراه پرايمر **VANS1** بعنوان پرايمر اختصاصي راسته گلومرال بصورت موفقيت‌آميزي قطعه‌اي با اندازه ۱۹۰ جفت باز از نمونه‌هاي ***G. mosseae*** و ***G. manihotis*** راتكثيرنمود. كاربرد اين پرايمرها بر روي نمونه‌هاي حاوي ***G. gigantean*** و همچين شاهد (گياهان مايه‌كوبي نشده) منجربه توليد اين قطعه نگرديد. استفاده ازجفت پرايمر **VANS1-NS61** براي تكثير قطعه نسبتاً كاملي از ژن‌هاي هسته‌اي با اندازه حدود ۱ كيلوباز كه زير واحد كوچكي از **rRNA** را كد مي‌نمايند موفقيت‌آميز بود و استفاده از اين قطعه بعنوان **DNA** الگو پس ازيک چرخه اضافي **PCR** (به منظورتكثيربيشتر) به همراه جفت پرايمرهاي **VANS1-VAGLO** و **VANS1-VAGIGA** منجر به توليد قطعه‌اي از **DNA** در اندازه مورد انتظاربراي جفت پرايمراول گرديد و در مورد جفت پرايمر دوم نتيجه‌اي در پي نداشت. اين تحقيق به وضوح نشان‌دهنده امكان استفاده از اين تكنيک بعنوان ابزاري دقيق و سريع براي نشان دادن و شناسايي قارچ ميكوريزآربسكولاردرون ريشه هاي نارنگي كينو مي‌باشد.

واژه‌هاي كليدي: ميكوريز، واكنش زنجيره‌اي پلي مراز، گلوموس، گيگاسپورا.

مقدمه

قارچ‌هاي ميكوريز آربسكولار (AMF) جزو قارچ‌هاي خاكزي هستند كه ريشه اكثر گياهان را آلوده مي‌سازند. آلودگي ريشه منجر به شكل‌گيري ميسليوم‌هاي دروني، ساختارمنشعبي بنام آربسكول و وسيكل مي‌گردد. برقراري رابطه همزيستي بين ريشه گياه و قارچ باعث رشد بهتر گياه مي‌گردد كه ناشي از افزايش جذب برخي عناصر كم تحرك در خاك از قبيل فسفر، روي، آهن و منگنز مي‌باشد. اثرات مفيد AMF تاكنون بر روي بسياري از درختان ميوه از قبيل مركبات (Usha *et al.*,

* نويسنده مسئول: محمدحسين شمشيري تلفن: ۰۹۱۳-۱۹۳۷۳۱۳ E-mail: shamshiri88@gmail.com

(2004، سیب (Fortuna *et al.*, 1996)، آووکادو (Menge *et al.*,1980)، پاپایا (Cruz *et al.*, 2000)، موز (Declerck *et al.*,1995) و انگور (Sonawane *et al.*, 1998) گزارش شده است. حضور AMF بر روي ريشه گياه ميزبان براحتي با استفاده از مشاهدات ميكروسكوپي قابل تشخيص است (Merryweather & Fitter, 1998) منتها درحال حاضر روش‌هاي ملكولي برتري قابل ملاحظه‌اي نسبت به روش‌هاي مرفولوژيكي و بيوشيميايي (Sakamoto *et al.*, 2004) براي مطالعات AMF درون ريشه گياه ميزبان يافته‌اند (Wyss & Bonfonte, 1993; Millner *et al.*,1998; Schubler *et al.*, 2001) كه بخشي ازآن ناشي ازاين واقعيت است كه در رده‌بندي AMF بويژه درسطوح پائين‌تر از خانواده اختلافات مرفولوژيكي ناچيزي وجود دارد و بعلاوه در برخي موارد گونه‌هاي خاصي قابليت رنگ‌آميزي درون ريشه گياه ميزبان را ندارند (Clapp *et al.*, 1995; Redecker *et al.*, 2003). يك روش ويژه براي تشخيص قارچ ميكوريز آربسكولار كه طي يك دهه اخير بتدريج مراحل تكميلي خود را طي مي‌نمايد، تكثير بخشي از ژن‌هاي هسته‌اي است كه زير واحد كوچكي از rRNA را كد مي‌نمايند. با استفاده از روش واكنش زنجيره‌اي پلي‌مراز (PCR) و پرايمرهاي ويژه مي‌توان ريشه‌هاي آلوده به AMF را از نظر گونه قارچ آلوده‌كننده مورد تجزيه و تحليل قرار داد (Redecker, 2000). از مزاياي اين روش امكان تشخيص مستقيم گونه قارچ آلوده‌كننده در ريشه گياهان مزرعه‌اي است بدون اينكه نيازي به جمع‌آوري اسپور و تكيه بر خصوصيات مرفولوژيك آن باشد.

Simon *et al.* (1992) براي نخستين بار پرايمرهاي ويژه‌اي طراحي كردند كه بر اساس آن توانستند حضور قارچ را درون ريشه گياه ميزبان تشخيص دهند. از آن زمان تاكنون گزارش‌هاي متعددي مبني بر استفاده از تكنيك‌هاي ملكولي براي تشخيص AMF درون ريشه گياه ميزبان منتشر شده است كه اكثراً مبتني بر استفاده از پرايمرهاي تخصصي همراه با PCR و به دنبال آن كاربرد تكنيك RFLP مي‌باشد (Redecker *et al.*, 1997; Vandenkoornhuyse *et al.*, 2002). نتايج اين مطالعات نشان مي‌دهد كه ريشه‌هاي جدا شده از گياهان مزرعه‌اي يا باغي اكثراً با بيشتر از دو گونه AMF آلوده مي‌باشند (Helgason *et al.*, 1999; Turnau *et al.*, 2001). آزمايشاتي كه با استفاده از مايه قارچ مخلوط (بيشتر از يك گونه) انجام شده نشان‌دهنده روابط سينرژيستي يا آنتاگونيستي مابين گونه‌هاي آلوده كننده بوده است (Lopez-Aguilion & Mosse, 1987; Di Bonito *et al.*, 1995; Van Tuinen *et al.*, 1998).

Di Bonito *et al.* (1995) براي نشان دادن قارچ *Glomus intraradices* درون ريشه گياهان كاهو، تره‌فرنگي، فلفل و آندیو از جفت پرايمرVANS1- NS21 به روش PCR استفاده نمودند. در روش آنها بدون نياز به استخراج و خالص سازي DNA قارچ ، مواد ژنتيكي لازم مستقيماً از ريشه گياه ميزبان بدست آمد.

Edwards *et al.* (1997) با استفاده از روش PCR موفق به ارزيابي كمي *Glomus mosseae* درون ريشه گياه ميزبان شدند. Oba *et al.* (2002) با استفاده از تكنيك PCR- RFLP موفق به تجزيه كمي آلودگي ريشه‌هاي پياز گرديدند كه با گونه‌هاي *Gigaspora margarita* و *Scutellospora cerradensis* به صورت جداگانه يا مخلوط مايه‌كوبي شده بود. دراين آزمايش قطعه‌اي به اندازه ۱/۲kbp از ژن 18sRNA با استفاده از پرايمر VANS1 كه پرايمر اختصاصي قارچ ميكوريز آربسكولار است و پرايمر غيرتخصصي NS1 از ريشه گياه ميزبان استخراج و تكثير گرديد.

آزمايش حاضر با هدف تشخيص سه گونه از AMF شامل *Glomus manihotis*، *Glomus mosseae* و *Gigaspora gigantean* بصورت جداگانه و مخلوط دردرختان نارنگي كينو پيوند شده برروي پايه رافلمون با استفاده از روش استخراج DNA قارچ به همراه كاربرد پرايمرهاي اختصاصي و تكنيک PCR طراحي و اجرا گرديد.

مواد و روش‌ها

اين آزمايش درباغ آزمايشي بخش باغباني انستيتو تحقيقات كشاورزي هند (I.A.R.I) واقع در دهلي‌نو اجرا گرديد. درختان ۲ ساله كينو كه بر روي پايه رافلمون پيوند شده و داراي شرايط مشابهي از نظر اندازه و قدرت رشد بودند انتخاب شده و با سه گونه از قارچ ميكوريز

آربسكولار به شرح زير مايه‌كوبي گرديدند:

T_0: كود حيواني به مقدار ۲۰ كيلوگرم به ازاء هر درخت (شاهد)

T_1: كود حيواني + *G. manihotis* به ميزان ۱۰۰ گرم به ازاء هر درخت

T_2: كود حيواني + *G. gigantean* به ميزان ۱۰۰ گرم به ازاء هر درخت

T_3: كود حيواني + *G. mosseae* به ميزان ۱۰۰ گرم به ازاء هر درخت

T_4: كود حيواني + $T_3+T_2+T_1$ به ميزان ۱۰۰ گرم به ازاء هر درخت

مايه قارچ كه مخلوطي بود از خاك ريزوسفر بعلاوه اسپور، ميسليوم خارجي و قطعات ريشه گياه ميزبان از بخش ميكروبيولوژي انستيتو تحقيقات كشاورزي هند تهيه گرديد. مايه كوبي درختان پيوندي كينو در بهمن ماه يعني زمانيكه ريشه‌هاي تغذيه‌كننده در حالت رشد فعال بودند انجام گرديد. براي اين منظور خاك اطراف ريشه درخت تا عمق ۱۵-۱۰ سانتيمتري كنار زده شد بطوريكه ريشه‌هاي جديد و فعال گياه ظاهر گرديدند سپس مايه قارچ به ميزان توزين‌شده به آرامي و بدون وارد آمدن هيچگونه صدمه‌اي به سيستم ريشه و پس از افزودن آب به آن به صورت يكنواخت بر روي ريشه‌ها و خاك اطراف آنها قرار گرفت و چاله حفر شده مجدداً با خاك پر گرديد. يك هفته قبل از مايه كوبي، نمونه‌هايي از ريشه درختان پيوندي كينو تهيه و آلوده نبودن آنها به AMF با استفاده از روش ميكروسكوپي مورد تاييد قرار گرفت. رنگ آميزي نمونه‌هاي ريشه با استفاده از مخلوط لاكتو فنل - تريپان بلو (Phillips & Hayman, 1970) وتعيين درصد آلودگي ريشه با استفاده از مشاهده ميكروسكوپي (Jalil & Domsch, 1975) مجدداً ۶۰ روز پس از مايه‌كوبي صورت گرفت. و در همين زمان نمونه‌هايي ازريشه كليه تيمارها به منظور استخراج DNA گرفته شد.

تشخيص **AMF** در ريشه درختان پيوندي كينو با استفاده از تكنيك **PCR**

براي استخراج DNA از ريشه و بدست آوردن بهترين كيفيت، روش‌هاي چندي همچون روش CTAB، كيت‌هاي جداسازي DNA و روش Di Bonito *et al.* (1995) مورد ارزيابي قرار گرفت. با توجه به اينكه روش CTAB بهترين نتيجه را به همراه داشت در ادامه توضيح داده مي‌شود.

استخراج **DNA**

نمونه‌هاي ريشه درختان كينو تيمار شده با AMF به همراه شاهد با آب كاملاً شسته و با كاغذ صافي خشك شده و سپس بوسيله يك بوته چيني از قبل سرد شده با نيتروژن مايع كاملاً كوبيده و بصورت پودر در آمد. نيم گرم از پودر حاصل به لوله‌هاي پلاستيكي استريل با حجم ۵۰ m1 منتقل و ۱۰m1 از بافر استخراج [CTAB 2% (۱ g)، NaCl 5M (14ml)، EDTA 0.5 M, pH 8.0 (5ml)، Tris-HCl 1M (5ml) و آب دو بار تقطير (26ml)] به آن افزوده شد و به مدت يك ساعت در حمام آب گرم در دماي ۶۰ درجه سانتيگراد قرار گرفت و لوله‌ها هر چند دقيقه يكبار به آرامي تكان داده شد سپس به هر لوله مخلوطي از فنل، كلروفرم و ايزوآميل الكل (به نسبت ۱: ۲۴ : ۲۵) اضافه گرديد و لوله‌ها به آرامي براي مدت ۱۰ دقيقه سر و ته گرديدند تا سوسپانسيون يكنواخت و شيري رنگي بدست آمد. محتويات لوله‌ها به مدت ۲۰ دقيقه در دماي اتاق (۲۰°C) و با سرعت ۱۰۰۰۰rpm سانتريفيوژ گرديد سپس فازمايع جدا شده و به لوله‌هاي جديد منتقل و برابر ۰/۶ حجم فاز مايع به آن پرويانول سرد و ۰/۱ حجم استات سديم اضافه گرديد و به مدت يک شب در دماي ۲۰°C- قرار داده شد. بعد از آن به مدت ۱۰ دقيقه در دماي ۴°C و با سرعت ۸۰۰۰ rpm سانتريفيوژ گرديد و رسوب DNA بدست آمده با اتانل ۷۰% و استات آمونيم ۱۰mM شسته شد. رسوب DNA پس از تخليه فاز مايع خشك و ۲۰۰µl TE به آن افزوده گرديد.

پرايمرهاي مورد استفاده در اين مطالعه

مجموعاً ۵ پرايمر به شرح مندرج در جدول ۱ و شكل ۲ به منظور يافتن تمايز بين دو جنس اصلي ميكوريزهاي دروني يعني *Glomus* و *Gigaspora* بر اساس آزمايشات قبلي (Simon *et al.*, 1993) مورد استفاده قرار گرفت.

شرایط واکنش زنجیره‌اي پلي‌مراز (**PCR**)

ترکیبات متفاوتي از جفت پرایمرها، نمونه‌هاي DNA و دماهاي اتصال (Annealing temperature) با استفاده از مخلوط واکنش (Reaction mixture) شامل مخلوط اصلي (Master mixture) (20mM Tris-HCl [pH 8.4]/100 mM KCl/3mM $MgCl_2$/0.02% gelatin/200 mM [each] nucleotide/1.25 U of *Taq* DNA polymerase و 50 پیکومول ازهرجفت پرایمر) و ۲µl از DNA الگو(Template DNA) که با آب دو بار تقطیر به حجم نهایي ۲۵µl رسیده بود توسط دستگاه PCR- CGI model RESEARCH-CORBETT (CR) مورد آزمون قرار گرفت. پروفیل دمایي بصورتي برنامه‌ریزي گردید که ٤٠ نوبت چرخه تقلیب (Denaturation) (۵ دقیقه دماي ۹۵°C و پس از آن ٤٥ ثانیه در دماي ۹۵°C)، اتصال (٤٥ ثانیه دماي٦٥-٤٠°C) و پلي مریزاسیون (۱ دقیقه دماي ۷۲°C) و در نهایت مرحله طویل شدن در دماي ۷۲ به مدت ۱۰ دقیقه انجام گیرد.

محصولات حاصل از PCR در ژل آگارز ۲% و با استفاده از بافر TAE الکتروفورز گردیدند. رنگ‌آمیزي ژل با استفاده از اتیدیوم بروماید به غلظت $0.1\ mgL^{-1}$ انجام و تصاویر توسط دستگاه ژل داکیومنت (Uvidoc model BTS-20.M) ثبت گردید.

نتایج

براساس مشاهدات میکروسکوپي میزان آلودگي ریشه درختان پیوندي کینو بین ۲۰ تا ۴۸ درصد متغیر بود (شکل‌هاي ۱ تا ۴). همانگونه که انتظار مي‌رفت بیشترین درصد آلودگي متعلق به تیمار مخلوط بود (۴۸ درصد) و پس از آن بیشترین آلودگي به ترتیب در *G. manihotis* (۳۹ درصد)، *G. mosseae* (۲۶ درصد) و *G. gigantean* (۲۰ درصد) مشاهده شد.

DNA الگوي استخراج شده با روش اصلاح شده CTAB نسبت به دو روش دیگر داراي بهترین کیفیت بود.

قابلیت جفت پرایمرهاي مورد استفاده در آزمون تشخیص با استفاده از DNA الگوي مستخرج از تیمارهاي مختلف (T_0 تا T_4) مورد ارزیابي قرار گرفت. نتیجه آزمایشات مختلف انجام شده در زیر توضیح داده مي‌شود:

در آزمایش نخست از جفت پرایمر VANS1- NS61 براي تکثیر قطعه نسبتاً کاملي از ژن‌هاي هسته‌اي که زیرواحد کوچکي از rRNA را در *Gigaspora* و *Glomus* کد مي‌نمایند (به اندازه تقریبي 1kb) استفاده شد همچنین از جفت پرایمر VANS1- NS21 براي تکثیر قطعه‌اي که با اندازه تقریبي 550 bp اختصاصي راسته Glomales مي‌باشد در طیفي از دماهاي اتصال (۵۵-۴۳°C) استفاده گردید. در نتیجه این بخش از آزمایش و پس از انجام PCR هیچگونه محصولي در اندازه‌هاي مورد انتظار مشاهده نگردید.

در آزمایش بعدي، جفت پرایمر VANS1-VAGLO که اختصاصي براي جنس Glomus مي‌باشد با استفاده از T_1 (*G. manihotis*) و در دماهاي مختلف اتصال مورد آزمون قرار گرفت. نتایج نشان داد که در دماهاي اتصال ۵۰ و ۵۳ درجه سانتیگراد، قطعه‌اي با اندازه تقریبي ۱۹۰bp تولید گردید (شکل ۶) که مطابق با نتایج قبلي مي‌باشد که با همین پرایمرها براي جنس Glomus قطعه‌اي با اندازه ۱۸۸bp را گزارش کرده بودند (Simon *et al.*,1993).

براي تائید اختصاصي بودن جفت پرایمر VANS1-VAGLO در آزمایش دیگري این پرایمرها به همراه DNA الگوي بر گرفته شده از تمامي تیمارها در دماي اتصال ۵۳°C که بر اساس نتایج قبلي انتخاب شده بود مورد استفاده قرار گرفتند. نتایج نشان داد که در مورد *G. mosseae* و با استفاده از این جفت پرایمر قطعه‌اي با اندازه حدود ۱۹۰ bp تولید گردید (شکل۷). به همین لحاظ مي‌توان این جفت پرایمر را بعنوان پرایمرهاي اختصاصي جنس Glomus پیشنهاد نمود.

جفت پرایمر VANS1-VAGIGA به عنوان پرایمرهاي اختصاصي جنس Gigaspora با استفاده از DNA الگوي مستخرج از T_4 و T_2 (تیمارهایي که بصورت انفرادي یا مخلوط با *G. gigantean* مایه‌کوبي شده بودند) و در طیفي از دماهاي مختلف اتصال بین ۶۵-۵۰°C مورد آزمون قرار گرفتند. نتایج این آزمایش نشان‌دهنده هیچگونه محصولي با اندازه‌هایي که توسط

سایر محققین قبلاً گزارش شده بود نبود.

با توجه به اختلاف زیاد در دماي اتصال VANS1 (۶۶/۴°C) و NS61 (۷۸/۶°C) ما مجدداً این جفت پرایمر را در دماهاي بالاتر اتصال با استفاده از DNAالگوي T_4 مورد آزمون قرار دادیم و با موفقیت قطعه‌اي با اندازه حدود 1kb در دماي اتصال ۶۵°C بدست آوردیم که از نظر کمي چندان قابل توجه نبود به همین جهت از آن بعنوان DNA الگو در پروفیل دمایي مشابه (۶۵°C) استفاده نمودیم که منجر به بدست آوردن محصولي با کمیت و کیفیت بهتر شد (شکل ۸- چپ) سپس از این قطعه بعنوان DNA الگو به همراه جفت پرایمر VANS1-NS21 استفاده شد که منجر به تولید قطعه‌اي به اندازه ۵۵۰bp گردید که مورد انتظار بود (شکل ۸- راست). در آزمایش دیگري، جهت بررسي تشخیص جنس‌هاي Gigasprora و Glomus در تیمار مخلوط (T4)، قطعه بدست آمده در آزمایش بالا (1kb) بعنوان DNA الگو مورد استفاده قرار گرفت که منجر به تائید حضور جنس Glomus با بدست آوردن قطعه‌اي با اندازه تقریبي ۱۹۰bp گردید اما استفاده از جفت پرایمر VANS1- VAGIGA نتیجه‌اي در پي نداشت.

بحث

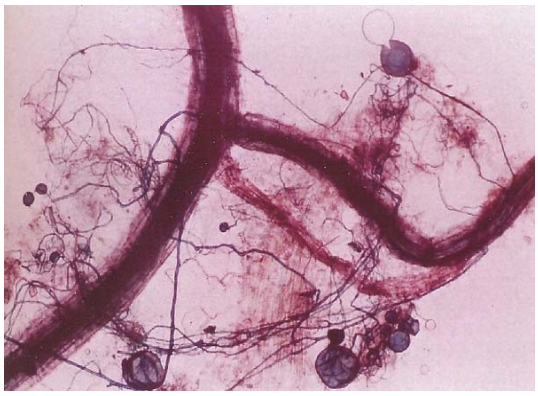
قارچ‌هاي میکوریز آربسکولار بدلیل اینکه مرحله رشد جنسي شناخته شده‌اي ندارند و بدون حضور يك گیاه میزبان قابل کشت نمي‌باشد به سختي قابل تشخیص و ارزیابي از نظر کمي مي‌باشند. شناسایي این قارچها اغلب بر اساس خصوصیات مرفولوژیکي اسپور مي‌باشد (Morton *et al.*,1993) در حالیکه براي ارزیابي میزان آلودگي ریشه به این قارچ‌ها از آزمون‌هاي بیوشیمیایي استفاده مي‌گردد (Frey *et al.*, 1995). آزمون‌هاي بیوشیمیایي اغلب بر اساس تعیین مقدار استرول‌ها و کیتین استوار است که هیچيك در مورد AMF مطلوب نمي‌باشد. شناسایي AMF در ریشه گیاه میزبان بر اساس مشاهدات میکروسکپي تقریباً غیرممکن است زیرا بین گونه‌هاي مختلف این قارچ، تفاوت‌هاي بسیار ناچیزي از نظر خصوصیات ظاهري میسلیوم وجود دارد بعلاوه شناسایي AMF در نمونه‌هاي مزرعه‌اي یا باغي بسیار سخت است و با قاطعیت نمي‌توان اظهار نظر کرد زیرا امکان کشت خالص این قارچ‌ها وجود نداشته و بعلاوه اسپورها که مي‌توان از خصوصیات آنها براي شناسایي استفاده کرد اغلب در خاك و خارج از ریشه‌هاي آلوده تشکیل مي‌گردند. در این تحقیق براي تشخیص AMF از یک روش مطمئن‌تر شامل تکثیر بخشي از ژن‌هاي هسته‌اي که ویژه AMF بوده و زیر واحد کوچکي از rRNA را کد مي‌نمایند بعلاوه جفت پرایمرهاي تخصصي و غیرتخصصي و با کاربرد روش PCR استفاده گردید. بنابر نتایج بدست آمده کاربرد پرایمر VAGLO که پرایمر تخصصي جنس Glomus مي‌باشد به همراه پرایمر VANS1 که اختصاصي راسته گلومرال است منجربه تکثیر قطعه اي با اندازه تقریبي ۱۹۰ bp درنمونه هاي *G. manihotis* و *G. mosseae* گردید که مطابق با یافته‌هاي قبلي مي‌باشد (Simon *et al.*, 1993). این قطعه در نمونه‌هاي *G. gigantean* و همچنین شاهد یافت نگردید. بنابراین استفاده ازاین جفت پرایمر مي‌تواند براي تشخیص کلیه گونه‌هاي جنس Glomus قابل توصیه باشد. استفاده از جفت پرایمر VANS1-VAGIGA منجر به تکثیر قطعه DNA مورد نظر نگردید که با نتایج Simon *et al.* (1993) مطابقت ندارد که مي‌تواند به درصدپائین آلودگي ریشه‌هاي کینو به *G. gigantean* مربوط باشد. استفاده ازجفت پرایمر VANS1-NS61 براي تکثیر قطعه نسبتاً کاملي از ژن‌هاي هسته‌اي که زیر واحد کوچکي از rRNA را در *Gigaspora* و *Glomus* کد مي‌نمایند با اندازه حدود ۱kb موفقیت‌آمیز بود و استفاده از این قطعه به عنوان DNA الگو پس از یک چرخه اضافي PCR (جهت تکثیر بیشتر) با استفاده از جفت پرایمرهاي VANS1-VAGLO و VANS1-VAGIGA منجر به تولید فرآورده‌اي در اندازه مورد نظر مربوط به جفت پرایمر اول گردید و در مورد جفت پرایمر دوم ناموفق بود که با نتایج قبلي ما مطابقت داشت. استفاده از جفت پرایمر VANS1-NS21 در ترکیب با نمونه‌هاي ریشه برگرفته از تیمارهاي مختلف در این آزمایش و همچنین دماهاي مختلف اتصال منجر به تولید هیچگونه فرآورده‌اي نگردید در حالي که Simon *et al.* با استفاده از جفت پرایمر مشابه و گونه‌هاي مختلف AMF فرآورده‌اي در اندازه ۵۵۰ bp

بدست آورده بودند. این تفاوت در نتایج به احتمال قوي به درصد پائین آلودگي در نمونه‌هاي ریشه کینو (۴۸-۲۰ درصد) مربوط مي‌شود. نتایج آزمایش ما نشان مي‌دهد که این تکنیک مي‌تواند به عنوان روشي براي تشخیص سریع و مطمئن آلودگي ریشه به میکوریز آربسکولار مورد استفاده قرار گیرد منتها طراحي پرایمرهاي تخصصي از یک طرف و میزان آلودگي ریشه گیاه میزبان از طرف دیگر حائز اهمیت زیادي مي‌باشد همچنین وجود آلودگي‌هاي دیگر در حین استخراج DNA با توجه به تکثیر سریع در این روش مي‌تواند بر روي نتایج بدست آمده تاثیر زیادي گذاشته و تفسیر نتایج بدست آمده را با اشتباه روبرو سازد.

REFERENCES

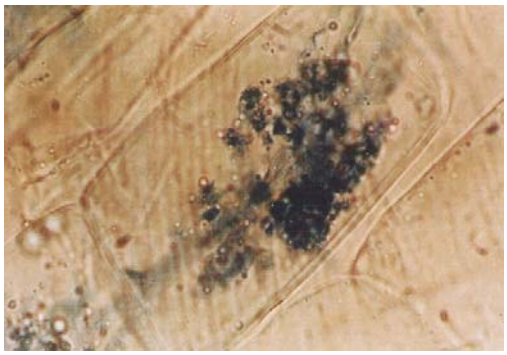
1. Clapp, J. P., Young, J. P. W., Merryweather, H. W. & Fitter, A. H. (1995). Diversity of fungal symbionts in arbuscular mycorrhizas from a natural community. *New Phytology*, 130, 259–265.
2. Cruz, A.F., Ishii,T. & Kadoya, K. (2000). Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on tree growth, leaf water potential and levels of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid and ethylene in the roots of papaya under water-stress condition. *Mycorrhiza*, 10, 121-123.
3. Di Bonito, R., Elliott, M. L. & Des Jardin, E. A. (1995). Detection of an arbuscular mycorrhizal fungus in roots of different plant species with the PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 2809–2810.
4. Declerck, S., Plenchette, S., & Strullu, D. G. (1995). Mycorrhizal dependency of banana (*Musa acuminata*, AAA group) cultivars. *Plant and Soil*, 176, 183-187.
5. Edwards, S. G., Fitter, A. H., & Young, J. P. W. (1997). Quantification of an arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus mosseae*, within plant roots by competitive polymerase chain reaction. *Mycology Research*, 101, 1440-1444.
6. Fortuna, P., Citernesi, A. S., Morini, S., Vitigliano, C. & Giovannetti, M. (1996). Influence of arbuscular mycorrhizae and phosphate fertilization on shoot apical growth of micropropagated apple and plum rootstocks. *Tree physiology*, 16,757-763.
7. Frey, J., Cheng, X., Kuhnert, P. & Nicolet, J. (1995). Identification and characterization of IS1296 in Mycoplasma mycoides subsp. mycoides SC and presence in related mycoplasmas. *Gene*, 160,95-100.
8. Helgason, T., Fitter, A. H. & Young, J. P. W. (1999). Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonizing Hyacinthoides non-scripta(bluebell) in a seminatural woodland. *Molecular Ecology*, 8, 659- 666.
9. Jalali, B. L. & Domsch, K. H. (1975). Effect of systemic fungi toxicants on development of endotrophic mycorrhiza. In Endomycorrhizas, Vol 11. Edited by F. E. Sanders, B. Mossee and P. B. Tinker. Academic press, London, pp 619-626.
10. Lopez-Aguilion, R. & Mosse, B. (1987). Experiments on competitiveness of three endo mycorrhizal fungi. *Plant and Soil*, 97, 155-170.
11. Menge, J. A., Larue, J., Labanauskas, C. K. & Johnson, E. L. V. (1980). The effect of two mycorrhizal fungi upon growth and nutrition of avocado seedlings growth with six fertilizer treatments. *Journal of American Society for Horticultural Science*, 105, 400-404.
12. Merryweather, J. & Fitter, A. (1998). The arbuscular mycorrhizal fungi of Hyacinthoides non-scripta: I. Diversity of fungal taxa. *New Phytologist*, 138,117–129.
13. Millner, P. D., Mulbry, W. W., Reynolds, S. L. & Patterson, C. A. (1998). A taxon-specific oligonucleotide probe for temperate zone soil isolates of *Glomus mosseae*. *Mycorrhiza*, 8, 19-27.
14. Morton, J. B., Bentivenga, S. P. & Wheeler, W. W. (1993). Germplasm in the International Collection of Arbuscular and Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi (INVAM) and procedures for culture development, documentation and storage. *Mycotaxon*, 48,491–528.
15. Oba, H., Tawaraya, K., Saito, M. & Wagatsuma, T. (2002). Semi-quantitative analysis of arbuscular mycorrhizal colonization of onion roots inoculated with single or mixed species based upon PCR-RFLP. *Soil Science and Plant Nutrition*, 48, 51-56.
16. Phillips, J. W. & Hayman, D. S. (1970). Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and VA mycorrhizal for rapid assessment of infection. *Trans British Mycology Society*, 55, 158-161.
17. Redecker, D., Thierfelder, H., Walker, C. & Werner, D.(1997). Restriction analysis of PCR- amplified internal transcribed spacers of ribosomal DNA as a root for species identification in different genera of the order Glomales. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 1756- 1761.
18. Redecker, D. (2000). Specific PGR primers to identify arbuscular mycorrhizal fungi within colonized roots. *Mycorrhiza*, 10,73–80.
19. Redecker, D., Hijri, I. & Wiemken, A. (2003). Molecular identification of arbuscular mycorrhizal fungi in roots: perspectives and problems. *Folia Geobotanica*, 38,113–124.

20. Sakamoto, K., Iijima, T. & Higuchi, R. (2004). Use of specific phospholipids fatty acids for identifying and quantifying the external hyphae of the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora rosea*. *Soil Biology and Biochemistry*, 36,1827–1834.
21. Schüßler, A., Schwarzott, D. & Walker, C. (2001). A new fungal phylum,the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycological Research*,105, 1413–1421.
22. Simon, L., Lalonde, M. & Bruns, T.D.(1992). Specific amplification of 18S fungal ribosomal genes from vesicular – arbuscular endomycorrhizal fungi colonizing roots. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 291-295.
23. Simon, L., Levesquq, C. R. & Lalonde, M. (1993). Identification of endomycorrhizal fungi colonizing roots by fluorescent single-strand conformation polymorphism-polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 4211-4215.
24. Sonawane, R. B., Konde, B. K., Indi, D. V. & Wani, P. V. (1998). Symbiosis between grapevine varieties and VAM fungi for uptake of nitrogen and phosphorus. *Journal of Maharastra Agricultural University*, 22, 184-186.
25. Turnau, K., Ryszka, P., Gianinazzi- Pearson, V. & Van Tuinen, D. (2001). Identification of arbuscular mycorrhizal fungi in soils and roots of plants colonizing zinc wastes in southern Poland. *Mycorrhiza*, 10, 196-174.
26. Usha, K., Saxena, A. & Singh, B. (2004). Rhizosphere dynamics influenced by arbuscular mycorrhizal fungus (*Glomus deserticola*) and related changes in leaf nutrient status and yield of Kinnow mandarin [King (*Citrus nobilis*) x Willow Leaf (*Citrus deliciosa*)]. *Australian Journal of Agricultural Research*, 55, 571-576.
27. Vandenkoornhuyse, P., Husband, R., Daniell, T. J., Watson, I. J., Duck, J. M., Fitter, A. H. & Young, J. P. W. (2002). Arbuscular mycorrhizal community composition associated with two plant species in a grassland ecosystem. *Molecular Ecology*, 11, 1555–1564.
28. Van Tuinen, D., Zhao, B., Gllotte, A. & Gianinazzi- Peason, V. (1998). Characterization of root colonization profiles by a microcosm community of arbuscular mycorrhizal fungi using 25S rDNA – targeted nested PCR. *Molecular Ecology*, 7, 879-887.
29. Wyss, P. & Bonfonte, P. (1993). Amplication of genomic DNA of arbuscular-mycorrhizal (AM) fungi by PCR using short arbitrary primers. *Mycological Research*, 97, 1351-1357.



شکل ۱- زایگوسپور،اسپورهاي جوانه زده و میسلیوم‌هاي خارجي *G. manihotis* بر روي درخت پیوندي کینو (۴۰×)

شکل ۲- وسیکل و میسلیوم‌هاي داخلي *G. manihotis* بر روي ریشه درخت پیوندي کینو (۱۰۰×)

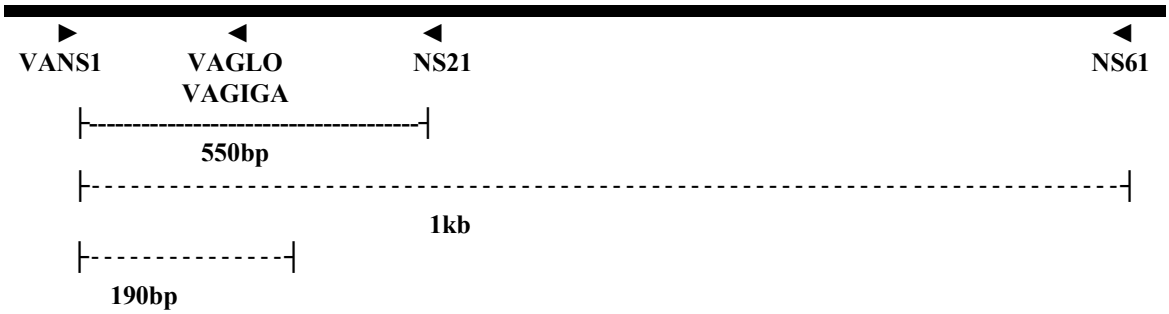


شکل ۳- آربسکول *G. mosseae* در سلول پوست ریشه درخت پیوندي کینو (۴۰۰×)

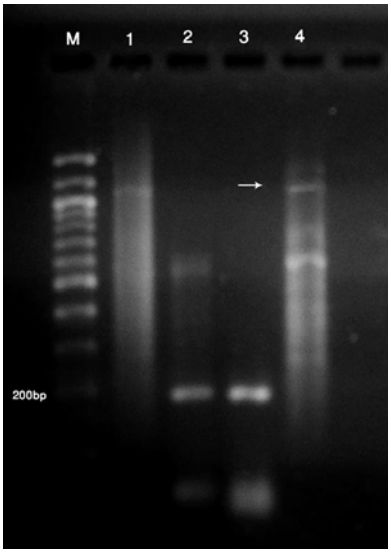
شکل ۴- میسلیوم‌هاي خارجي *G.gigantean* و ریشه‌هاي موئین دردرخت پیوندي کینو (۴۰×)

جدول ۱- نام و توالي پرایمرهاي مورد استفاده در این آزمایش

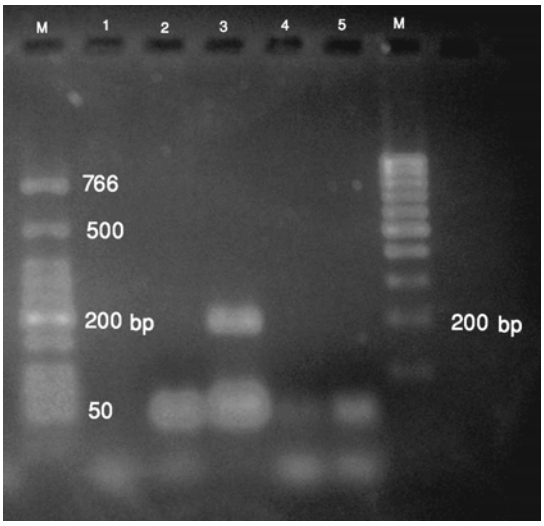
Primer		Sequence	
VANS1	5'	GTC TAG TAT AAT CGT TAT ACA GG	3'
NS61	5'	TCA GTG TAG CGC GCG TGC GGC	3'
NS21	5'	AAT ATA CGC TAT TGG AGC TGG	3'
VAGLO	5'	CAA GGG AAT CGG TTG CCC GAT	3'
VAGIGA	5'	TCA CCA AGG GAA ACC CGA AGG	3'



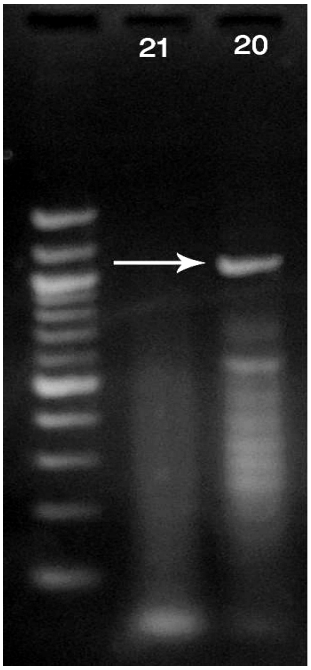
شکل ۵- طرح کلي ژن هسته‌اي که زیرواحد کوچکي از rRNA را کد مي‌نماید نشانگر مکان و جهت پرایمرهاي مورد استفاده در این آزمایش مي‌باشد.

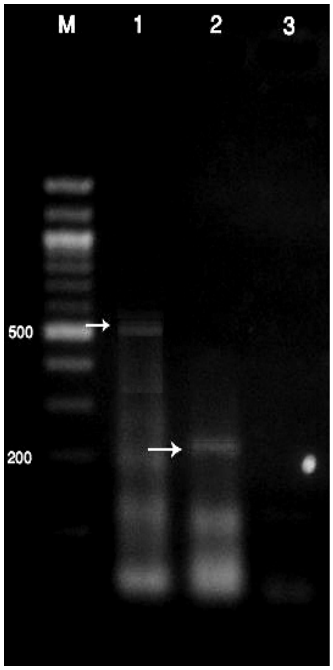


شكل ۶- فرآورده‌هاي PCR مربوط به نمونه هاي T0 تا T4 رنگ‌آميزي شده با اتيديوم بروماید در ژل آگارز
ستون ۱: T0 درترکیب باجفت پرایمرVANS1-NS61
ستون ۲: T1 درترکیب باجفت پرایمر VANS1-VAGLO
ستون ۳: T3 درترکیب با جفت پرایمر VANS1-VAGLO
ستون ۴: T4 درترکیب با جفت پرایمر VANS1-NS61



شكل ۷- فرآورده‌هاي PCR حاصل از تيمارهاي T0 تا T4 در تركيب با جفت پرايمر VANS1-VAGLO در دماي اتصال ۵۳ درجه سانتيگراد
ستون ۱: T1 ستون ۲: T2 ستون ۳: T3
ستون ۴: T4 ستون ۵ : T0 DNA:M ماركر





شكل ۸- چپ: فرآورده PCR حاصل از T4 در تركيب با جفت پرايمر VANS1-NS61 پس از ۲ دور تكثير (ستون ۲۰) نوک پيكان قطعه‌اي با اندازه حدود kb ۱ را نشان مي‌دهد.
شكل ۸- راست: فرآورده PCR با استفاده از فرآورده PCR ستون ۲۰ از آزمايش بالا به عنوان DNA الگو در تركيب با جفت پرايمر VANS1-NS21 (ستون۱)، VANS1-VAGLO (ستون۲)، VANS1-VAGIGA (ستون۳) در دماي اتصال ۵۳ درجه سانتيگراد