مجلة محيط شناسي،سال سي و چهارم ،تابستان ۸۷،شمارة۴۶،صفحة ۸۱-۸۸

تأثيرهمزيستي اکتوميکوريزي قارچ *Hebeloma cylindrosporum* بر رشد *pinus pinaster*

پونه رسولي*[۱]، رونالد مارمز[۲]، دِلفين ملايا[۲]، ژان کلود دبو[۳]

۱-دانش آموختهٔ کارشناسی ارشد اکولوژی میکرب از دانشگاه لیون ۱ فرانسه

۲- استادیار اکولوژی میکرب دانشگاه لیون ۱ فرانسه.گروه اکولوژی میکروب

۳-استاد اکولوژی میکرب دانشگاه لیون ۱ فرانسه. گروه اکولوژی میکروب

تاریخ دریافت:۸۵/۶/۲۱ تاریخ پذیرش:۸۶/۲/۲

چکیده

به منظور بررسی تغییرات فیزیولوژی و مورفولوژی نمونه‌های قارچی اکتومیکوریز (*Hebeloma cylindrosporum*) ، همزیست با درخت کاج (*Pinus pinaster*)، و نقش مؤثر آن در فرایند همزیستی، نمونه برداری از دو ایستگاه متفاوت ساحلی و جنگلی نزدیک شهر Bordeaux در جنوب غربی فرانسه در اکتبر ۲۰۰۳ انجام و نمونه‌ها به آزمایشگاه منتقل شد. در ابتدا کشت نمونه‌ها بر رویYMG صورت گرفت و پس از به دست آوردن نمونه‌های میسلیوم طبیعی دو هسته‌ای و نمونه‌های آزمایشگاهی حاصل از اختلاط نژاد نمونه‌های هاپلویید طبیعی، در آزمایشگاه، تغییرات رشد قطری در دو دمای ۱۲ و ۲۲ درجه سانتیگراد در فواصل زمانی ۱۳،۱۰ و۱۶روز پس از کشت اولیه بررسی و مشاهده شد که در نمونه‌های ساحلی، آن‌هم فقط در دمای ۱۲ درجه، تفاوت معنی‌داری از نظر میزان رشد قطری نسبت به نمونه‌های دیگر مشهود است. در ادامه، بررسی تغییرات رشد قطری، فنوتیپی، متابولیکی ومولکولی بر روی نمونه‌های موتان انجام شد. از میان ۴۳۳ نمونه مورد بررسی، تنها یک مورد، در محیط کشت حاوی آمیدون و در حضور گلوکز، ترشح آمیلاز به عنوان ترکیب بازدارنده عمل می‌کند و همچنین در این بین، تنها در حضور ترکیباتی چون سولفیت، متیونین وسیستئین قادر به ایجاد میکوریز با میزبانش است. در نهایت، بررسی‌های مولکولی بر روی ۱۰ نمونه از ۴۳۳ موتان انجام شد که در این بین در ۹ نمونه از موتان‌های مورد بررسی تنها یک کپی T-DNA به دست آمد. موتاسیون از طریق انتقال ژنتیکی T-DNA به وسیلهٔ باکتری فیتوپاتوژن (*Agrobacterium tumefacies*) موجب ایجاد فنوتیپ‌هایی می‌شود که می‌توانند نقش مفیدی در عملکرد همزیستی داشته باشند.

کلیدواژه

Agrobacterium tumefaciens- Pinus pinaster -Hebeloma cylindrosporum-T-DNA-همزیستی- Bordeaux - فرانسه.

سرآغاز

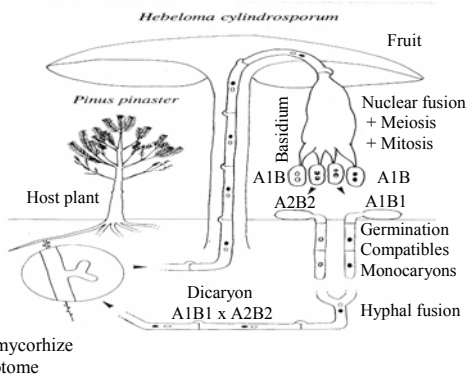
موفقیت در شکل‌گیری پوشش گیاهی مناسب، مستلزم وجود شرایط مناسب رشد، یعنی فراهم بودن آب واملاح به مقدار کافی است که در بعضی موارد می‌توان این‌گونه شرایط را با ایجاد همزیستی بین دو موجود بهبود بخشید. همزیستی موجودات در طبیعت از تاریخ بسیار کهن برخوردار است، لیکن «دباری» در سال ۱۸۷۹ برای اولین مرتبه واژهٔ سمبیوز را به روابط بین گونه‌های مختلف موجودات زنده استفاده کرد (مستأجران، وضوئی، ۱۳۸۵). از آن زمان تاکنون مطالعات بیشماری بر روی چگونگی این روابط صورت گرفته است، به طوری‌که در حال حاضر از روابط متعدد و مختلفی می‌توان نام برد.از موارد قابل توجه همزیستی موجودات زنده در طبیعت می‌توان به همزیستی قارچ و گیاه به‌عنوان میکوریز اشاره کرد. این مطلب مبین این است‌که قارچ در تحریک گیاه همزی خود وجذب و انتقال مواد از خاک به داخل ریشه فعال است. قارچهای میکوریزا از با اهمیت‌ترین میکروارگانیسم‌های موجود در اغلب خاکهای تخریب نشده‌اند. به‌طوری‌که برطبق تخمین‌های موجود حدود ۷۰ ٪ زیتوده‌های جامعهٔ میکربی خاکها را میسیلیوم این قارچها تشکیل می‌دهند (2003 ,Mukerji Chamola). اولین گزارش مبنی بر وجود این قارچها در اطراف ریشهٔ گیاه میزبان و به‌وجود آمدن رابطهٔ همزیستی میکوریزا به تحقیقات صورت‌گرفته توسط Hartig(1840) مربوط می‌شود. Reissek (1847) این قارچها را به عنوان موجودی مستقل در همزیستی با گیاهان ارکیده شناسایی و معرفی کرد. Frank(1885) به دنبال بررسی

نویسندهٔ مسئول: تلفن:۰۹۱۲۴۷۵۰۴۸۰ E-mail: poonehrasooli@yahoo.com

راهکارهایی به منظور کشت قارچ‌های خوراکی در منطقهٔ جنگلی Prussia حاصل از فعالیت مشترک، ریشهٔ گیاهان میزبان قارچ‌های میکوریزا همزیست را شناسایی و آن را مایکوریزا نامید. بیش از ۲۵۰۰ گونهٔ مختلف گیاهی با قارچ‌ها همزیست می‌شوند که مجموعهٔ وسیعی از گیاهان ابتدایی غیر آوندی فاقد دانه تا گیاهان بسیار پیشرفته را شامل می‌شوند. فقط تعداد کمی از خانواده‌های گیاهی، فاقد همزیستی میکوریزایی‌اند که به عنوان نمونه می‌توان از خانواده‌های Brassicaceae, Cyperaceae, Proteaceae نام برد. علاوه بر ریشه که اندام اصلی گیاهان در همزیستی میکوریزایی است، ساختارهای زیرزمینی در گیاهانی که ریشه تشکیل نمی‌دهند، نظیرگامتوفیت بریوفیت‌ها و پتریدوفیت‌ها و همین‌طور اسپوروفیت تریدوفیت‌ها نیز درگیر همزیستی میکوریزایی می‌شوند. قارچ‌های همزیست شامل اعضای سه شاخهٔ مهم در سلسله قارچ‌ها هستندکه عبارتند از Zygomycota, Ascomycota و Basidiomycota. همزیستی‌های میکوریزایی در دامنه وسیعی از اکوسیستم‌ها و اجتماعات گیاهی نظیر تالاب‌ها، بیابان‌ها، جنگل‌های خزان‌کننده، جنگل‌های بارانی حاره‌ای پست، اجتماعات گیاهی عرض های جغرافیایی بالا و ارتفاعات بالا، سیستم‌های آبی، اجتماعات اپی‌فیتی و... موجودند و فقط قطب است که فاقد گیاهان میکوریزایی است. میکوریزا از قدمتی دیرین برخوردار است و برخی از گیاهان قدیمی فسیل شواهدی از میکوریزا را ارائه می‌دهند. قدمت میکوریزای نخستین به حدود ۴۰۰ میلیون سال پیش مربوط می‌شود. این زمان، زمان گذار از آب به خشکی است و تصور می‌شود که شریک قارچی نقشی کلیدی در کمک رسانی به گیاهان در کلون‌کردن اکوسیستم خشکی ایفاء کرده است.نتیجهٔ حاصل از این همزیستی، فعالیت قارچ به منظور جذب و انتقال عناصر غذایی به گیاه میزبان از یک طرف و از طرف دیگر دریافت ترکیبات کربنه حاصل از فتوسنتز گیاه میزبان توسط قارچ همزیست است. این همزیستی بین گیاهان و قارچ‌هایی‌که در سیستم ریشه‌ای گیاه در ساختمان‌های ریشه‌مانند مستقر شده‌اند، به‌وجود می‌آید(Harly & Smith, 1983).

ابتدا انرژی از گیاه به قارچ همزیست منتقل شده و در ادامه عناصر غذایی از قارچ به گیاه منتقل می‌شود (Allen , 1991). قارچ‌ها از نظر بوم‌شناختی اهمیت بسیاری دارند. قارچ‌ها می‌توانند با سایر جانداران رابطهٔ همزیستی برقرار کنند. قارچ–ریشه‌ای و گلسنگ دو نمونهٔ مشخص از رابطهٔ همزیستی قارچ‌ها با جانداران فتوسنتزکننده است. قارچ–ریشه‌ای حاصل همزیستی قارچی از گروه بازیدیومسیت‌ها با ریشهٔ گیاه آوندی مثل کاج، بلوط و بید است. قارچ در این ارتباط به انتقال فسفر، ازت و مواد معدنی دیگر از خاک به ریشهٔ گیاهان کمک می‌کند و گیاه، کربوهیدرات مورد نیاز قارچ را تأمین می‌کند. میکوریز، همزیستی پایدار بین ریشهٔ گیاه و قارچ است که به دو نوع اصلی اکتومیکوریز و اندومیکوریز تقسیم می‌شود.در اندومیکوریز، میسلیوم به درون سلول‌های ریشه نفوذ کرده، اما در اکتومیکوریزها، میسلیوم در اطراف سلول میزبان جای گرفته و ایجاد شبکه Hartig را ایجاد کرده که کمک به تبادلات غذایی می‌کند. درختی که دارای میکوریزاست رشد به مراتب بیشتری از درختی که فاقد میکوریزاست دارد. ازدیاد فعالیت گیاه در ناحیهٔ ریشه فقط از طریق گسترش قارچ و ریشه صورت نمی‌گیرد، بلکه میسلیوم‌های قارچ به درون زمین نفوذ کرده، آب و مواد غذایی را به طور مستقیم از خاک جذب‌کرده و در اختیار گیاه قرار می‌دهند. مشاهدات عینی، آثار غیرقابل انکار میکوریزها را در رشد درختان تأیید می‌کند. در این تحقیق، نمونهٔ قارچی مورد مطالعه، گونه *H. cylindrosporum* از خانواده Cortinariaceae است که برای اولین بار توسط Romagnesi (1965) توصیف شد. این قارچ در جنوب غربی فرانسه در حاشیه آتلانتیک (Courtecuisse & Duhem, 1994) به صورت همزیست با درخت کاج *P.pinaster* مشاهده می‌شود و یگانه نمونه قارچی اکتومیکوریز مساعد رشد و تکثیر در محیط آزمایشگاه است(Debaud & Gay, 1987). فرضیهٔ اولیه انجام این تحقیق، به دست آوردن نمونه‌های ساحلی بوده که بتوانند همانند محیط طبیعی‌شان رشد بهتری نسبت به نمونه‌های جنگلی داشته باشند.

در چرخهٔ تولید مثل پس از تقسیم سلولی میتوز به دنبال میوز، دو مرحلهٔ تک و دو هسته‌ای است که میسلیوم‌های دو هسته‌ای قادر به تشکیل اکتومیکوریز هستند(شکل‌شمارهٔ ۱) .



شکل‌شمارهٔ(۱):چرخهٔ‌تولیدمثلی‌قارچ Hebeloma ylindroporum

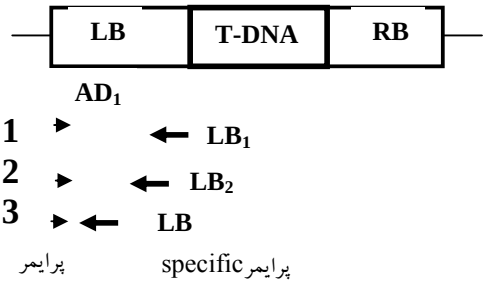
مواد و روش‌ها

این تحقیق طی دو سال از سپتامبر ۲۰۰۳ تا ژوئن ۲۰۰۵ در آزمایشگاه اکولوژی میکربی دانشگاه کلود برنارد لیون ۱ فرانسه بر روی نمونه های ذیل انجام شد ۱)- ۷۴ نمونه طبیعی جمع‌آوری شده (در منطقه(Truc Vert (TV در Arcachon نزدیک شهر Bordeaux در جنوب غربی فرانسه ;Gryta et al., 1997) (Guidot et al., 2002از دو ایستگاه متفاوت الف) ایستگاه ساحلی[1] با ۳۹ نمونه با خاک فقیرو تنوع کم گونه‌های قارچی ب) ایستگاه جنگلی[2] با ۳۵ نمونه و با خاک غنی و تنوع زیاد گونه‌های قارچی (به علت احداث اماکن تفریحی در این منطقه رشد این قارچ به صورت سالانه است ۲) - ۸۳ نمونهٔ مصنوعی (حاصل اختلاط نژاد نمونه‌های هاپلویید ساحلی و جنگلی (DxD, FxF, FxD تولید شده در آزمایشگاه .

پس از نمونه برداری از محیط طبیعی، ابتدا کشت میسلیوم‌های دوهسته‌ای بر روی محیط کشت YMG[3] مایع، حاوی آنتی‌بیوتیک‌های متفاوت انجام شد (Gryta et al., 1997). پس از رشد میسلیوم‌ها، کشت ساده آنها بر روی YMG جامد حاوی آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل صورت گرفت. سپس میسلیوم‌های تک‌هسته‌ای زیر میکروسکوپ شناسایی و اختلاط نژاد در داخل و در بین نمونه‌های ساحلی و جنگلی انجام شد. در ادامه، به منظور بررسی تغییرات رشد قطری، کشت میسلیوم‌ها (۵ mm) بر روی YMG جامد (۱۵ mm)، (۳ مرتبه تکرار کشت برای هر نمونه)، در دو دمای ۱۲درجه سانتیگراد (نزدیک به دمای محیط در زمان اوج باروری قارچ در اواخر پاییز) و ۲۲ درجه سانتی گراد (نزدیک به دمای اپتیمال رشد) انجام شد و رشد قطری بر حسب میلیمتر در ۱۰، ۱۳ و ۱۶ روز بعد از کشت اولیه اندازه‌گیری شد.

پس از آن تجزیه و تحلیل آماری با نرم افزار رایانه‌ای Statview (SE + Graphics) انجام شد. بر روی۴۳۳ نمونهٔ موتان از مجموعه‌ای شامل ۲۰۰۰ نمونه که در ابتدا به منظور شناسایی موتان‌های غیر میکوریز ایجاد شده بود (Combier et al., 2003) (این موتان‌ها در اثر انتقال ژنتیکی T-DNAتوسط Agrobacterium *tumefaciens* ایجاد شدند) موارد ذیل بررسی شد: تغییرات رشد قطری (کشت میسلیوم‌ها در محیط کشت YMG در دو دمای ۱۲ و ۲۲ درجه سانتیگراد)، تغییرات متابولیکی (محیط کشت N_2P_3 حاوی منابع جداگانه کربن، نیتروژن و فسفر)، تغییرات فنوتیپی (محیط کشت YMG)، شناسایی موتان‌های auxotroph در محیط کشت N_2P_3 حاوی انواع متفاوت ویتامین و اسید آمینه. مطالعات مولکولی بر روی ۱۰ نمونه موتان با ویژگی‌های خاص از بین ۴۳۳ موتان به شرح ذیل انجام گرفت.

استخراج DNA با استفاده از روش Van Kan, et al (1991) ، بررسی کمیت و کیفیت DNA استخراج‌شده با الکتروفورز با ژل آگاراز ۱٪ ،تعیین غلظت DNA با استفاده از اسپکتروفتومتر و سنجش میزان حد نوری نمونه‌های DNA در طول موج ۲۶۰nm و ۲۸۰nm و نسبت ۲۶۰ /۲۸۰=DO . سپس به منظور به دست آوردن نسخه‌های متعدد از ژن خاص از روش TAIL-PCR[5] (Liu et al, 1995) و با استفاده از پرایمرهای مخصوص این روش (شکل شمارهٔ۲ و جدول شمارهٔ۱). سپس برای شناسایی تعداد کپی T-DNA در هر موتان از روش ساترن بلاتینگ Southern Blot (Southern, 1975) استفاده شد که در این روش، پلاسمید pBGgHg به عنوان مشخص‌کننده می‌باشد (شکل‌شمارهٔ ۳).



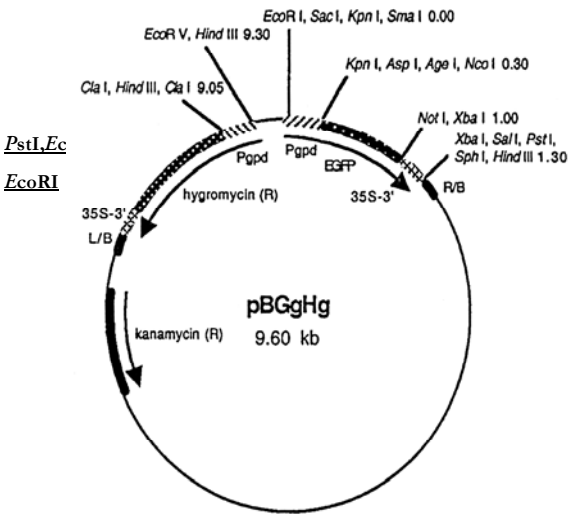
شکل شمارهٔ(۲):اساس روش TAIL-PCR (تکثیر DNA در سه مرحلهٔ ۱و۲و۳ به کمک پرایمرهای خاص هر مرحله به صورت مکمل انجام می‌شود. این دو پرایمر۱–محل ژنی که باید تکثیر شود را تعیین می‌کند و ۲–اندازهٔ قطعات تکثیر شونده را تخمین می زند.)

جدول‌شمارهٔ(۱): پرایمرهاي مورد استفاده در روش TAIL-PCR

پرایمر	سکانس 3’ ⟵ 5’	T^m(°C) اتصال
LB_1	GGGTTCCTATAGGGTTTCGCTCATG	٦٤
LB_2	CATGTGTTGAGCATATAAGAAACCCT	٦٠
LB_3	GAATTAATTCGGCGTTAATTCAGT	٥٦
AD_1	WGTGNAGWANCANAGA	٤٥

W:بازهای آلی Aیا T و

N: بازهای آلی C, T, A یا G



شكل‌شمارة (٣): پلاسميد pBGgHg به همراه آنزيم‌هاي محدودالاثر مؤثر برآن (Chen et al., 2000) (قطعه T-DNA (LB-RB) بر روی کارت نمایش داده شده که دارای ناحیهٔ ژنی مقاوم به آنتی بیوتیک hygromycine است. نواحی زیر خط کشیده شده (محل های جدید آنزیم های محدودالاثر شناسایی شده در این مطالعه است).

در ادامهٔ کلون‌کردن ژن، خالص‌سازی قطعهٔ DNA به دست آمده در مرحلهٔ TAIL-PCR3 توسط kit Qiagen سپس وارد کردن DNA به دست آمده به داخل وکتور pGEM-T به کمک آنزیم T4 DNA ligas و در ادامه وارد کردن وکتور به داخل سوش DH5α باکتری E.coli با کمک شوک حرارتی انجام شد و کلونی‌های سفید به دست آمده نشان داد که وکتور به داخل باکتری نفوذ کرده است در نهایت عمل تعیین توالی[۶] طبق برنامه BLAST[۷] صورت گرفت.

مواد و محیط کشت‌های به کار رفته در این پژوهش عبارتند از:

۱-محیط کشت YMG (Rao &Niederpruem) با ۸/۵ گرم آگار در لیتر به منظور نگهداری و کشت ساده نمونه‌های قارچی و استخراج DNA .

۲-محیط کشت N_2P_3 (Gay, 1990) برای مطالعه تغییرات فنوتیپی و متابولیکی موتان‌ها در محیط های کشت حاوی منابع کربن ، نیتروژن و فسفر به طور جداگانه.

۳-محیط کشت Melin (Gea et al,1994) که در سنتز میکوریز استفاده می‌شود.

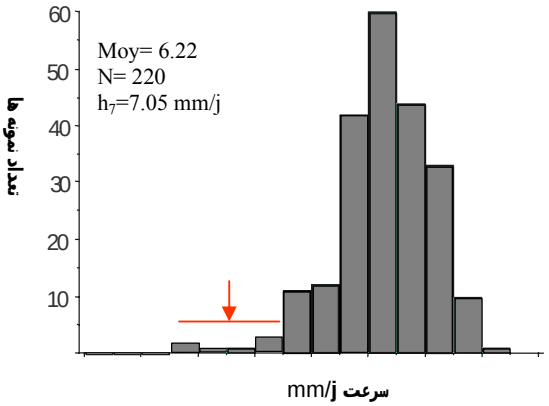
۴-تست Auxanography of Holliday (Holliday, 1956)، محیط کشت‌های حاوی انواع ویتامین و اسیدآمینه به منظور شناسایی (موتان‌هایی‌که در محیط کشت ساده رشد نمی‌کنند)[۴].

یافته ها

برای اثبات فرضیهٔ اولیه مبنی بر اینکه نمونه‌های ساحلی در محیط طبیعی خود میزان رشد بیشتر و بهتری نسبت به نمونه‌های جنگلی دارند، بررسی میزان رشد قطری میسلیوم‌ها در نمونه‌های طبیعی و آزمایشگاهی حاصل از اختلاط نژاد نمونه‌های هاپلوئید طبیعی، در آزمایشگاه صورت گرفت و مشاهده شد که فقط در نمونه‌های ساحلی در ۱۲ درجه سانتیگراد، تفاوت معنی‌داری از نظر میزان رشد قطری مشاهده شد که این تفاوت در بقیه گروهها مشهود نبود (جدول شمارهٔ ۲).

از طرف دیگر، در ۱۲ درجه در مقایسه با ۲۲ درجه سانتیگراد، پراکنش منظمی در روند رشد قطری مشاهده می‌شود.

به منظور مطالعه تغییرات رشد قطری و فنوتیپی نمونه‌های موتان در مقایسه با نمونه مادر و طبیعی h7، کشت آنها در YMG جامدصورت گرفت و مشاهده شد که تنها ۳/۵٪ از نمونه‌ها رشد پایینی دارند (شکل شمارهٔ۴).



شكل‌شمارة(۴): پراكنش رشد قطري نمونه‌هاي موتان در مقايسه با نمونه H7 (فلش نشان دهندهٔ موتان‌های با رشد پایین است.)

تغییرات متابولیکی در موتان‌ها، در محیط کشت N_2P_3 حاوی منابع جداگانه کربن (آمیدون)، ازت (ژلاتین) و فسفر (DNA) بررسی شد.در حالت طبیعی، در محیط کشت حاوی آمیدون، آنزیم خارج سلولی آمیلاز و آنزیم نوکلئاز در محیط کشت حاوی ژلاتین و آنزیم پروتئاز در محیط

جدول‌شمارۀ(۲):مقایسۀ دو به دو میانگین رشد قطري با کمك تستT

Habitat	DxD		FxF		DxF		D		F	
	Unpaired t value	prob	Unpaired t value	prob	Unpaired t value	prob	Unpaired t value	prob	Unpaired t value	prob
DxD			−۰/۱۲	۰/۴۵۳۳	−۱/۶۳	۰/۰۵۴۳	−۳/۸۲	۰/۰۰۰۲	−۱/۳۵	۰/۰۹۱۳
FxF	۲/۳۶	۰/۰۱۱۴			−۱/۴۶	۰/۰۷۵۴	−۳/۷۶	۰/۰۰۰۲	−۱/۲۴	۰/۱۰۹۹
DxF	۲/۱۲	۰/۰۱۹۳	−۰/۶	۰/۲۷۶۴			−۳/۱۷	۰/۰۰۱۱	−۰/۶	۰/۴۷۷۲
D	۲/۱۹	۰/۰۱۶۳	−۰/۲	۰/۴۱۹۹	۰/۳۸	۰/۳۵۱۵			۲/۸	۰/۳۳۰۰
F	۳/۵۲	۰/۰۰۰۴	۱/۱۷	۰/۱۲۳۸	۱/۹۸	۰/۰۲۵۷	۱/۴۷	۰/۰۷۳۶		

(نوشته های ایتالیک مربوط به رشد قطری در ۱۲ درجه سانتیگراد است.)

کشت حاوی DNA ترشح می‌شود که در حضور ترکیبات بازدارنده‌ای همچون:گلوکز، آمونیم و ارتوفسفات‌ها این آنزیم‌ها ترشح نمی‌شوند.

پس از کشت میسلیوم‌ها و رنگ‌آمیزی مربوط به هر محیط کشت، مشاهده شدکه فقط در یک مورد (نمونۀ ۵۵۱C۱) از ۴۳۳ نمونه موتان کشت داده شده، ترشح آمیلاز در محیط کشت حاوی آمیدون و در حضور گلوگز به عنوان ترکیب بازدارنده صورت می‌گیرد. سپس تست Auxanography Holliday به منظور شناسایی موتان‌های auxotroph در محیط کشت N_2P_3 حاوی انواع متفاوت اسید آمینه و ویتامین انجام شد(Holliday, 1956).

در این بررسی همچنین مشاهده شد که فقط نمونه ۵۵۳W۱ (در بین ۴۳۳ نمونه موتان) توانایی استفاده از سولفات به عنوان منبع گوگرد را ندارد و از سولفیت، میتیونین و سیستئین استفاده کرده و فقط در حضور این ترکیبات قادر به ایجاد میکوریز با میزبانش است. در نهایت، مطالعات مولکولی بر روی ۱۰ نمونۀ موتان انجام شد:

یک نمونه موتان auxotroph، یک نمونه موتان نامنظم در متابولیسم کربن، چهار نمونه موتان با میسلیوم پنبه‌ای و چهار نمونه با رشد قطری پایین. مطالعات مولکولی که شامل استخراج DNA، TAIL-PCR، Southern blot، کلون‌کردن ژن و Sequencing بوده، انجام شد.

پس از اطمینان از مطلوب بودن کمیت و کیفیت DNA استخراج شده نسبت به تکثیر DNA به کمک دستگاه PCR مطابق روش TAIL-PCR اقدام شد.

طول تقریبی قطعات DNA تکثیر شده، پس از مقایسۀ آن با مارکر DNA Ladder mix بر روی ژل آگاراز و رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید و اشعۀ UV، در نمونه‌های مختلف متفاوت است (جدول‌شمارۀ۳ و شکل‌های شمارۀ ۵ و۶).

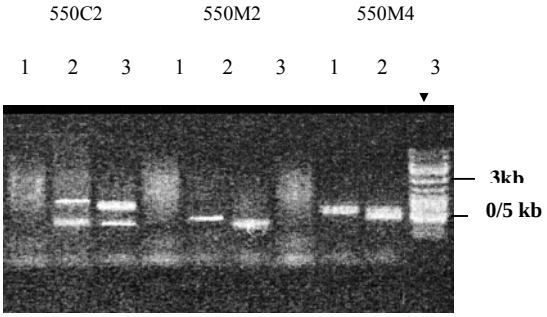
نمونه	فنوتیپ	تعداد کپی T -DNA	قطعه TAIL 2 (pb)	قطعه TAIL 3 (pb)
553W1	Auxotroph	۱	مشاهده نشد	۲۰۰
551C1	نا منظم در متابولیسم کربن	۱	۴۰۰	۳۰۰
549R3	رشد کم	۱	متغیر	۴۰۰
550C2	رشد کم	۲	۵۰۰	۴۰۰
			۹۰۰	۸۰۰
552G3	رشد کم	۱	مشاهده نشد	۳۰۰
555A1	رشد کم	۱	۴۰۰	متغیر
550M2	میسلیوم پنبه ای	۱	۵۰۰	۴۰۰
550M4	میسلیوم پنبه ای	۱	۶۰۰	۵۰۰
551E1	میسلیوم پنبه ای	۱	۵۰۰	۴۰۰
552Q2	میسلیوم پنبه ای	۱	۵۰۰	۴۰۰

جدول شمارۀ(۳): فهرست نمونه موتان‌هاي مورد مطالعه

بحث و نتیجه گیري

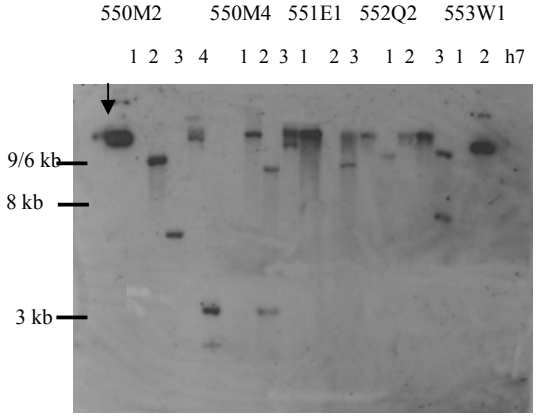
هدف از این مطالعه در شناسایی و تعیین میزان تغییرپذیری درگروههای مختلف نمونه‌های قارچی اکتومیکوریز *Hebeloma cylindrosporum* بوده است.به این منظور و با توجه به مطالعات قبلی انجام شده توسط Pringle & Taylor (2002)، تغییرپذیری میزان سرعت رشد قطری به عنوان اولین ویژگی مورد مطالعه در نظر گرفته شد.

هدف از این مطالعه در شناسایی و تعیین میزان تغییرپذیری درگروههای مختلف نمونه‌های قارچی اکتومیکوریز *Hebeloma cylindrosporum* بوده است.به این منظور و با توجه به مطالعات قبلی انجام شده توسط Pringle & Taylor (2002)، تغییرپذیری میزان



شکل‌شمارة(۵): نمایش تکثیر قطعه T-DNA **در روش** TAIL-PCR

(در سه نمونه از موتان به کمک پرایمرهای LB و AD1 . قطعات DNA بر اساس وزن مولکولی شان روی ژل آگاراز ۸/. درصد تفکیک شد. فلش، نشان دهندهٔ مارکر DNA Lader mix (GibcoBRL) است.)



شکل‌شمارة(۶): نمایش تعداد کپي T-DNA **به دست‌آمده در روش** *Southern blot به کمک آنزیم های محدودالاثر ۱- BgL II ۲- EcoR V ۳- Kpn I ۴- EcoR I . فلش، معرف پلاسمید pBGgHg به عنوان شاهد مثبت (دارای قطعه کامل T-DNA) و h7 به عنوان شاهد منفی (فاقد T-DNA).*

سرعت رشد قطری به عنوان اولین ویژگی مورد مطالعه در نظر گرفته شد.با در نظر گرفتن مطالعات Simchen (1966) بر روی نمونه ساپروفیت بازیدیومیست*Schizophyllum commune*، تفاوت معنی‌داری از نظر میزان رشد قطری در نمونه‌های متفاوت مشاهده شده، ولی در این تحقیق با در نظر گرفتن فرضیهٔ اولیه، نتیجه به دست آمده این بوده که نمونهٔ *H.cylindrosporum* در گروههای متفاوت، فقط در ۱۲درجه سانتیگراد، آن‌هم فقط در بین نمونه‌های ساحلی، تفاوت چشمگیری از نظر میزان رشد قطری نسبت به سایر نمونه‌ها مشاهده شده که این تفاوت در ۲۲ درجه مشهود نیست.

دومین ویژگی در نظر گرفته شده، مطالعهٔ تغییرات متابولیکی موتان‌ها در متابولیسم ازت، فسفر و کربن است. Jargeat et al., (2000,2003)نشان‌داده‌که‌درنمونه‌های*H.cylindrosporum*،متابولیسم ازت تحت کنترل آمونیم بوده وTatry (2003) نیز ثابت کرده که متابولیسم فسفر، درکنترل ارتوفسفات‌هاست. اما برای اولین بار کشت موتان‌ها به دلیل بررسی تغییرات در متابولیسم کربن در این تحقیق انجام شد و با به دست آوردن نمونه ۵۵۱C_1 که بی نظمی در متابولیسم کربن ایجاد کرده بود می‌توان به این نتیجه رسید که *H. cylindrosporum* بخوبی آمیدون را مورد استفاده قرار می‌دهد و همچنین متابولیسم کربن در این نمونهٔ قارچی کاملا در کنترل ترکیب بازدارنده‌ای مانند گلوکز نیست.

Smith &Read(1997) مطالعاتی را در ارتباط همزیستی میکوریز بر روی ترکیبات غذایی حاوی ازت، فسفات، و یا پتاسیم گیاه میزبان انجام دادند، اما مطالعات خیلی کمی بر روی ترکیبات گوگرد انجام شده که با توجه به نمونهٔ auxotroph به دست آمده می‌توان زمینهٔ انجام مطالعات بیشتری را در این رابطه فراهم ساخت. در نهایت با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان این نتیجه را گرفت که موتاسیون به وسیلهٔ انتقال ژنتیکی T- DNAباکتری A. tumefaciens، موجب ایجاد فنوتیپ‌های متفاوتی شده و نیز با در نظر گرفتن همزیست و اکتومیکوریز بودن این‌گونهٔ قارچی، از طریق موتاسیون می‌توان به نمونه‌های جدیدی دست یافت که بتوانند کارایی بهتر و مؤثرتری در عملکرد همزیستی و اکتومیکوریزی، به منظور بالاتر بردن رشد میزبان و بهبود کیفیت تنوع و احیای گونه‌ای در زیستگاه سود جست که این مستلزم ادامهٔ کشت موتان‌ها و مطالعات مولکولی است.

یادداشت ها

1- Dune
2- Forest
3- Yeast, Malt, Glucose
4- Auxotroph
5-Thermal Asymmetric Inter Laced-PCR
6- Sequencing
7-http://www.ncbi.nlm.nih.gov

منابع مورد استفاده

مستأجران، ا، وضوئی، ف، ۱۳۸۵.همزیستی. انتشارات دانشگاه اصفهان.

Allen, M. F. 1991. The ecology of mycorrhizae. Cambridge University Press. Cambridge.

Chen,D.L., et al.2000.Conditional identification of phosphate-starvation-response mutants in *Arabidopsis thaliana***.** Planta. 211, 13-22.

Combier, J.P.,et al .2003. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation as a tool for insertional mutagenesis in the symbiotic ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. FEMS. Microbiology. Letters. 220, 141-148.

Courtecuisse, R., Duhem, B. 1994. *Guide des champignons de France et d'Europe*. Lausanne, Suisse: Delachaux et Niestlé.

Debaud, J.C., Gay, G. 1987. *In Vitro* fruiting under controlled conditions of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* associated with *Pinus pinaster***.** New Phytol. 105, 429-435.

Frank, A. B. 1885. Uber die auf wurzesymbiose beruhende Ernahrung gewisser baumedurhch unterirdishe Pilze. Ber. Dtsch. Bat. Ges. 3:128-145. in press.

Gay, G. 1990. Effect of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma hiemale* on adventitious root formation in derooted *Pinus halepensis* shoot hypocotyls. Can. J. Bot. 68, 1265-1270.

Gea, L., et al. 1994. Structural aspects of ectomycorrhiza of Pinus pinaster (Ait.) Sol. Formed by an IAA-overproducer mutant of Hebeloma cylindrosporum Romagnesi. New Phytol. 128:659-670.

Gryta, H., et al. 1997. Fine-scale structure of population of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* in coastal sand dune forest ecosystems. Molecular Ecology. 6, 353-364.

Guidot, A., et al. 2002. Forest habitat characteristics affect balance between sexual reproduction and clonal propagation of the ectomycorrhizal mushroom *Hebeloma cylindrosporum***.** Oikos. 99, 25-36.

Harley, J. L., Smith, S. E. 1983. Mycorrhizal Symbiosis.Academic Press.London.

Hartig, T. 1840. Vollständige Naturgeschichte der forstlichen Culturpflanzen Deutschlands. Förstnersche Verlagsbuchhandlung, Berlin.

Holliday, R. 1956. A new method for the identification of biochemical mutants of microorganisms. Nature. 266, 987.

Jargeat, P., et al. 2000. Transcription of a nitrate reductase gene isolated from the symbiotic basidiomycete fungus *Hebeloma cylindrosporum* dose not require induction by nitrate. *Mol Gen Genet.* 263, 948-956.

Jargeat, P., et al.2003. Characterization and expression analysis of a nitrate from the transporter and nitrate reductase genes, two members of a gene cluster for nitrate assimilation symbiotic basidiomycete *Hebeloma cylindrosporum. Curr Genet.* 43, 199-205.

Liu, Y.G., et al. 1995. Efficient isolation and mapping of *Arabidopis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. Plant J. 8, 457–463.

Mukerji, K.G. , Chamola, B.P. 2003. Compendium of Mycorrhizal Research/edited New Delhi, A.P.H., 2 Vols, xviii, 632 p.

Paul, E.A. ,Clark, F.E. 1989. Soil microbiology and biochemistry. Academic San Diego made on sections of N. nidus-avis roots.

Pringle, A. ,Taylor, J.W. 2002. The fitness of filamentous fungi. Trends Microbiol. 10, 474-481.

Rao, P. S. ,Niederpruem, D. J. 1969. Carbohydrate metabolism during morphogenesis of *Coprinus lagopus* (sensu *Buller*). J. Bac. 100, 1222-1228.

Reissek, S. 1847. The first record of fungal infection in a myco-heterotrophic orchid.

Romagnesi, H. 1965. Etude sur le genre *Hebeloma*. Bull Soc Mycol Fr 81:321-344.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Simchen, G.1966. Fruiting and growth rates among dikaryotic progeny of signal wild isolates of *Schizophyllum commune*. Genetics. 53, 1151.

Smith, S. E. ,Read, D.J. 1997. Mycorrhizal Symbiosis, 2nd edn. Academic Press, San Diego, CA.

Southern, E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separeted by gel electrophoresis. J.Mol. Biol. 98, 503-517.

Tatry, M.V. 2003. Analyse moléculaire des effets bénéfiques de la symbiose mycorhiziene sur la nutrition phosphatée de l'hôte: identification de deux système de transport de Pi chez le basidiomycète *Hebeloma cylindrosporum*. Thèse de l'Université de Montpellier II.

Van Kan, J.A.L., et al. 1991. Cloning and characterization of the cDNA of virulence avr 9 of the fungal pathogen *Cladosporium fulvum*, the causal agent of tomato leaf mold. Mol. Plant-Microbe Interact. 4, 52–