DOI: 10.22092/irn.2021.123360

تاریخ دریافت ۱۳۹۹/۰۸/۱۳
تاریخ پذیرش ۱۳۹۹/۱۰/۲۴

نامه‌علمی

اثرات قارچ‌های اکتومیکوریز در سازگاری گیاهچه‌های کشت بافتی بلندمازو (*Quercus castaneifolia*) در محیط گل‌خانه

سیده معصومه زمانی[۱*]،عباس قمری زارع[۲]، میترا امام[۳] و داود بیات ترک[۴]

چکیده

انتقال گیاهچه‌ها به گلخانه، مهم‌ترین قدم در کشت بافت بوده و نیازمند یک مرحله سازگاری است. این مرحله خوگرفتن شروع زندگی اتوتروفی بوده و نیازمند ایجاد فرآیندهای فیزیولوژیکی ضروری برای بقا است. در مدت سازگاری، گیاهچه‌ها باید جذب آب و املاح را به موازات افزایش سرعت فتوسنتز بالا ببرند. در میان راهکارهای بهبود بقاء و رشد گیاهان کشت بافتی در گلخانه، تلقیح قارچ‌های میکوریزا، بعنوان روشی کارآمد معرفی شده است. در این تحقیق اثرات همزیستی اکتومیکوریزایی در ارتقاء سازگاری گیاهچه‌های کشت بافتی بلندمازو (*Quercus castaneifolia*) در گلخانه بررسی شد. بازیدیوکارپ قارچ *Tricholoma acerbum* از استان مازندران جمع‌آوری و کلنی خالص قارچی جداسازی شد. گیاهچه‌ها از طریق کشت جوانه‌های جانبی با تیمارهای ویژه هورمونی ریزازدیادی و با کشت خالص قارچ در آزمایشگاه و همچنین گلخانه تلقیح شدند. ۱۴ هفته پس از انتقال گیاهچه‌ها به گلخانه خصوصیات فیزیولوژیکی آن‌ها ارزیابی شد. براساس نتایج، تلقیح اکتومیکوریزا نه فقط برای استقرار و بقاء گیاهان در فاز سازگارسازی مفید بود بلکه وضعیت آبی و فیزیولوژیکی گیاهان را بهبود بخشید. بنابراین می‌توان برقراری این رابطه اکتومیکوریزایی را بعنوان راهکاری جهت افزایش تحمل گیاهچه‌های بلندمازو در برابر شوک انتقال به گلخانه و موفقیت تولید نهال در برنامه‌های احیائی جنگل‌های بلوط مد نظر قرار داد.

واژه‌های کلیدی: سازگاری، کشت بافت، همزیستی اکتومیکوریزایی.

Effects of ectomycorrhizal fungi on the acclimatization of micropropagated *Quercus castaneifolia* plantlets in greenhouse

S.M. Zamani[1*], A.Ghamari Zare[2], M.Emam[3] and D.Bayat Tork[4]

Abstract

Transfer of tissue culture seedlings to the greenhouse is the most important step in the micropropagation process and requires an adaptation stage. This phase of acclimatization is the beginning of autotrophic life and is associated with the establishment of physiological processes necessary for survival. During the acclimatization phase, seedlings should increase water and salt uptake as photosynthesis accelerates. Among the strategies to improve the survival and growth of tissue culture plants in the greenhouse, inoculation with mycorrhizal fungi has been introduced as an efficient method. In this study, the symbiotic effects of ectomycorrhizas on improving the compatibility of *Quercus castaneifolia* seedlings in greenhouse were investigated. Basidiocarps of *Tricholoma acerbum* were collected from Mazandaran province and pure colony of the ectomycorrhizal fungus was isolated. Seedling regeneration was performed by culturing single-node fragments with special hormonal treatments then inoculated by pure cultivation of the fungus in the laboratory and in the greenhouse. Fourteen weeks after seedling transfer to greenhouse, their physiological characteristics were evaluated. According to the results of ectomycorrhiza inoculation, it was not only useful for the establishment and survival of plants in the adaptation phase, but also improved the water and physiological condition of plants. Therefore, the establishment of this ectomycorrhizal relationship can be considered as a solution to increase the tolerance of *Quercus castaneifolia* seedlings against the shock of transfer to the greenhouse and the success of seedling production in oak reforestation programs.

Keywords: Acclimatization, Ectomycorrhizas, Tissue culture.

۱*- نویسنده مسئول، استادیار، موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران،
پست الکترونیک: mzamani@rifr-ac.ir و zamani832003@yahoo.com
۲- دانشیار پژوهش، موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران
۳- استادیار پژوهش، موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران
۴- کارشناس ارشد، موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران
1*- Corresponding author, Assistant Prof., Research Institute of Forests and Rangelands, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran. Email: mzamani@rifr-ac.ir, zamani832003@yahoo.com
2- Associate Prof., Research Institute of Forests and Rangelands, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO),Tehran, Iran
3- Assistant Prof., Research Institute of Forests and Rangelands, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO),Tehran, Iran
4- Senior expert, Research Institute of Forests and Rangelands, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO),Tehran, Iran

مقدمه

بررسی و مطالعه شرایط زیست از جنبه‌های محیطی، اقلیمی، خاک، گیاهان، جانوران و امثال آن برای انسان‌های قرن حاضر و آینده، این نکته مهم و قابل‌توجه را یادآوری می‌کند که انسان برای بهبود شرایط حیات خود، نیاز مبرم به استفاده از فناوری‌های جدید در زمینه‌های گوناگون به‌ویژه، علوم گیاهی و کشاورزی دارد. افزایش جمعیت جهان و کاهش منابع تولید فراورده‌های گیاهی و دامی در جهان یک مشکل جدی و اساسی است که دانشمندان را از دهه گذشته تاکنون به این فکر ترغیب کرده، تا با استفاده از شیوه‌های جدید در حفظ محیط‌زیست و عدم تغییر بنیادی در طبیعت، دست به تولید بهتر و بیشتر محصولات گیاهی بزنند، یکی از این روش‌های مدرن استفاده از فناوری کشت سلول و بافت‌های گیاهی است که از این راه می‌توان اقدام به تکثیر گیاهان مختلف اعم از صنعتی، دارویی، جنگلی، مرتعی و کشاورزی کرد. استفاده از تکنیک کشت بافت یا ریزازدیادی (Micropropagation Techniques) موجب افزایش میزان و سرعت تولید گیاهان مهم و برگزیده موردنظر شده است. همچنین کشت بافت گیاهی می‌تواند بستر مناسبی برای حفظ و نگهداری گونه‌ها و ژنوتیپ‌های مادر، یا در حال انقراض طبیعت به‌عنوان منابع باارزش ژرم‌پلاسم به شمار آید. علاوه‌براین فناوری کشت سلول و بافت‌های گیاهی در سال‌های اخیر به گونه‌ای توسعه یافته است که هم‌اکنون برای انتقال ژن‌های مطلوب، به‌ویژه ژن‌های ایجادکننده مقاومت نسبت به آفات و بیماری‌های گیاهی که هر ساله بخش عظیمی از تولیدات گیاهی را نابود می‌کند، در سطح گسترده استفاده می‌شود. بدیهی است اصلاح گیاهان به روش‌های سنتی، علاوه‌بر وقت‌گیر بودن، در بسیاری از موارد امکان‌پذیر نیست، درحالی‌که فناوری کشت سلول و بافت گیاهی این راه را به‌خوبی هموار ساخته و به پیش می‌برد (حسندخت، ۱۳۸۵). علی‌رغم تمام این محاسن، مشکلات متعددی استفاده گسترده از تکنیک ریزازدیادی را محدود می‌کند، یکی از مهم‌ترین آنها دشواری در سازگاری گیاهچه‌های به دست آمده در شرایط آزمایشگاه (*in vitro*) پس از انتقال آنها به فضای خارج از شیشه (*ex vitro*) است. به‌طوری‌که در بیشتر موارد، نرخ بالایی از مرگ‌ومیر در پی انتقال گیاهچه‌ها به شرایط *ex vitro* دیده می‌شود؛ چرا که این گیاهچه‌های کشت بافتی روزنه و منافذ بسیار کم و بدون عملکرد داشته، بدون کوتیکول یا دارای کوتیکول ضعیف بوده و نیز سیستم ریشه‌ای ضعیف و ناکارآمدی دارند (حسندخت، ۱۳۸۵). تلقیح قارچ‌های میکوریز به ریشه‌های گیاهچه‌های به دست آمده از کشت بافت، نقش بسیار مهم و مفیدی را در تقلیل شوک وارده به این گیاهان در زمان انتقال به شرایط گل‌خانه‌ای دارد (Kapoor *et al.*, 2008). علاوه‌براین، تحقیقات نشان می‌دهد که به‌کارگیری همزیستی میکوریزایی می‌تواند به‌عنوان یک راهکار بیوتکنولوژیکی برای بهبود رشد اندام‌های هوایی و ریشه گیاهچه‌های حاصل از ریزازدیادی و نیز کاهش استفاده از کودها و آفت‌کش‌های شیمیایی به کار گرفته شود (Fortuna *et al.*, 1996; Aka-Kacar *et al.*, 2010). برقراری این همزیستی منجر به کاهش مرگ‌ومیر گیاهچه‌های حاصل از کشت بافت پس از انتقال آنها به خاک گلدان و سبب تسهیل سازگاری آنها با شرایط طبیعی در مرحله سخت‌وارسازی می‌شود.

گونه‌های بلوط از مهم‌ترین و فراوان‌ترین درختان پهن‌برگ اکوسیستم‌های جنگلی، ازجمله جنگل‌های ایران هستند که ازنظر اقتصادی و اکولوژیکی اهمیت بسیار زیادی دارند. درختان بلوط به‌عنوان گیاهانی بسیار ارزشمند و قابل بهره‌وری در بخش‌های صنعتی از قبیل صنایع چوب، کاغذسازی، شیمی، رنگ‌سازی و داروسازی هستند.

مهم‌ترین روش تکثیر بلوط استفاده از بذور است که روش مناسبی برای فراهم کردن تنوع ژنتیکی این گونه‌ها در اکوسیستم‌های جنگلی است (Ostrolucka *et al.*, 2007). امکان تکثیر جنسی بلوط به دلایل متعددی بسیار محدود است، از آن جمله می‌توان به طولانی بودن مدت زمان لازم برای رسیدن بذور به بلوغ فیزیولوژیکی، نامنظم بودن زمان ظهور بذور در سال‌های مختلف، پایین بودن میزان تولید بذر در درختان بلوط، پایین بودن قوه نامیه بذور تولید شده و مشکل بودن ذخیره‌سازی بذور اشاره کرد (Ostrolucka *et al.*, 2007; Pijut *et al.*, 2011). همچنین بذور گونه‌های مختلف *Quercus* میزان توانایی متفاوتی را در جوانه‌زنی از خود نشان داده‌اند و به‌دلیل حساسیت بالا به خشک شدن و از دست دادن آب، می‌توان آنها را برای مدت کوتاهی ذخیره کرد (Ostrolucka *et al.*, 2007). علاوه‌بر اینها، روش تکثیر غیرجنسی درختان بلوط به‌دلیل مشکل بودن ریشه‌زایی قلمه‌های آن چندان میسر و عملی نیست. مشکلات یادشده در تکثیر بلوط را می‌توان با به کارگیری تکنیک‌های آزمایشگاهی (*in vitro*) بر طرف کرد (Ostrolucka *et al.*, 2007; Pijut *et al.*, 2011). به‌عنوان‌مثال تکثیر آزمایشگاهی جوانه‌های جمع‌آوری شده از درختان بلوط دارای کاربردهای مهمی ازجمله جنگل‌کاری‌های تجاری، تکثیر انبوه ژنوتیپ‌های خاص و برگزیده در معرض خطر انقراض و نیز ژنوتیپ‌های مقاوم یا متحمل به بیماری‌ها، آفات، یا آلودگی‌های محیط‌زیستی است (Ostrolucka *et al.*, 2007; Ostrolucka & Bezo, 1994). جمع‌آوری ریزنمونه‌ها از درختان بلوط مختلف در جنگل و تکثیر آزمایشگاهی آنها (*in vitro*) تولید تعداد زیادی از گیاهان بلوط با ژنوتیپ‌های متفاوت را امکان‌پذیر می‌کند که برای تأمین تنوع ژنتیکی در اکوسیستم‌های جنگلی موردنیاز است (Pijut *et al.*, 2011). اگرچه کشت بافت روشی گسترده برای تولید گیاهان برگزیده است، اما گیاهچه‌های حاصل از کشت بافت (به‌ویژه درمورد گیاهان چوبی) نیاز به مقاوم‌سازی فیزیولوژیکی قبل از انتقال برای کاهش شوک نشائی زودگذر دارند. استفاده از کشت بافت در تولید انبوه گیاهان، به‌دلیل میزان بقای ناچیز گیاهچه‌های درون‌شیشه‌ای در محیط بیرون، تنها با مقاوم‌سازی این گیاهچه‌ها امکان‌پذیر است. قارچ‌های میکوریز قادرند با افزایش جذب آب و کنترل اثرات منفی تنش‌های محیطی، موجب بهبود رشد و عملکرد گیاهان میزبان در مرحله سازگاری گل‌خانه‌ای شوند. قارچ‌های میکوریز در افزایش فتوسنتز گیاهان نقش بسزایی داشته و بیشتر با ریشه‌های باریک و تغذیه‌کننده ارتباط برقرار می‌کنند. در میان گونه‌های جنس بلوط، بلندمازو (*Quercus castanefolia*) از گونه‌های صنعتی و باارزش محیط‌زیست شمال ایران است که متأسفانه، در سال‌های اخیر به دلایل مختلف حجم این گونه

در رویشگاه‌های طبیعی در حال کاهش است. با توجه به اهمیت اکولوژیکی و نیز ارزش بالای اقتصادی و محیط‌زیستی آن لازم است در کنار احیای مناطق مخروبه، به افزایش کیفی نهال‌های مورداستفاده در این مناطق نیز توجه شود. براین‌اساس، هدف از این تحقیق بررسی اثر کاربرد اکتومیکوریزا در میزان جذب آب و فتوسنتز در گیاهان بلندمازو حاصل از کشت بافت طی مرحله سازگاری در شرایط گل‌خانه‌ای است.

● اقدامات و یافته‌ها

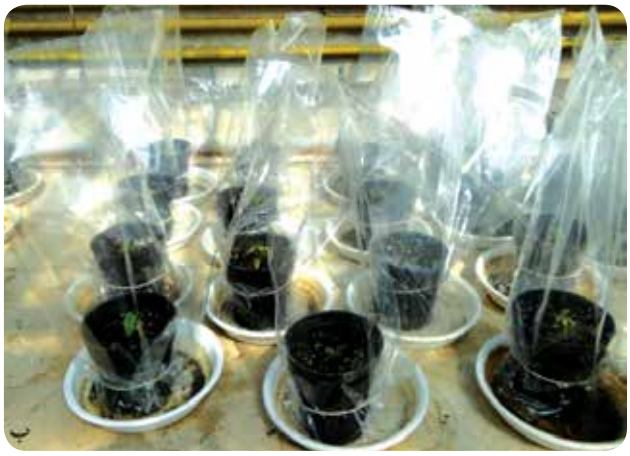
– اقدامات:

۱) جداسازی و کشت قارچ اکتومیکوریز و شناسایی آن: طی بازدید از رویشگاه طبیعی بلوط در استان مازندران– طرح جنگل‌داری نسارود (بینشکی)، از اسپوروکارپ‌های سالم و جوان رویش‌یافته در کنار درختان بلوط نمونه‌برداری و در کمترین زمان به آزمایشگاه منتقل شد. در آزمایشگاه و با هدف جداسازی و کشت قارچ‌های اکتومیکوریز و استفاده از آنها برای برقراری همزیستی با گیاهچه‌های بلوط، بلوک‌های بافتی قارچ در شرایط استریل از بخش درونی کلاهک‌های تازه، جداسازی و در محیط (MMN: Modified Melin Norkans) (Qu *et al.*, 2003) کشت شدند، سپس پتری‌ها به مدت دو ماه در انکوباتور ۲۳ درجه سانتی‌گراد و در شرایط تاریکی نگهداری شدند.

برای شناسایی قارچ جداسازی شده با استفاده از روش مولکولی ابتدا تکثیر میسلیوم قارچ توسط کشت در محیط مایع MMN و نگهداری کشت به مدت یک ماه در دمای ۲۳ درجه روی دستگاه شیکر انکوباتور با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه انجام شد. استخراج DNA کل از میسلیوم خالص جدایه قارچی با استفاده از روش صفایی و همکاران (۱۳۸۴) انجام شد. ناحیه ITS1-5.8S-ITS2 از DNA ریبوزومی قارچ با استفاده از آغازگرهای ITS1F و ITS4B تکثیر و تعیین توالی شد (White *et al.*, 1990; Gardes & Bruns, 1993). مواد مورد استفاده و حجم‌های به کار رفته از این مواد در واکنش PCR و برنامه حرارتی مطابق روش Gardes و Bruns (۱۹۹۳) تنظیم شد. توالی به دست آمده با استفاده از الگوریتم BLASTN با توالی‌های نوکلئوتیدی پایگاه GenBank و UNITE مقایسه شد و نزدیک‌ترین توالی به آن به‌عنوان توالی مرجع انتخاب شد. مقادیر e-value، score bit و sequence similarity توالی‌ها برای نتیجه‌گیری درمورد بهترین تطابق ارزیابی شد. e-value صفر به همراه ارزش بالای score bit (حداقل ۸۰۰) حالتی ایدئال و به‌عنوان یک تطابق قوی در نظر گرفته شد (Smith *et al.*, 2007). به منظور یافتن جایگاه تاکسونومیکی توالی به دست آمده، تجزیه‌وتحلیل فیلوژنتیکی آن با توالی‌های موجود در پایگاه داده‌ها با روش بیزی (Bayesian method) انجام شد (زمانی، ۱۳۹۳).

۲) تلقیح گیاهچه‌های *Quercus castaneifolia* توسط قارچ بومی *Tricholoma acerbum*: گیاهچه‌های *Quercus castaneifolia* به روش کشت بافت تکثیر شد (زمانی و همکاران، ۱۳۹۱). برای برقراری همزیستی اکتومیکوریزایی در شرایط درون‌شیشه‌ای از انتقال گیاهچه‌های ریشه‌دار و هم اندازه بلوط به ظروف پلی‌اتیلنی (Magentea™) ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی سوبسترای پیت– ورمیکولیت (۱: ۴) استفاده شد که قبلاً توسط محیط مایع MMN (با غلظت نصف شده از عناصر فسفر و نیتروژن و ۰/۲ درصد گلوکز؛ [pH= 5.6]) مرطوب و توسط میسلیوم قارچ اکتومیکوریز به مدت ۶ هفته کاملاً کلونیزه شده بودند (Duponnois & Garbaye, 1991; Oh *et al.*, 1995). پس از انتقال، گیاهچه‌ها در اتاقک‌های رشد با دوره نوری ۱۶ ساعت نور (۵۰۰۰ –۳۰۰۰ لوکس) تحت دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد و ۸ ساعت تاریکی با دمای ۱۹ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (شکل ۱ الف) (Martins, 2008; Repac, 2010).

پس از ۱۴ هفته گیاهان تلقیح شده و شاهد به خاک منتقل و سازگاری آنها با شرایط گل‌خانه‌ای طبق روش Marx و Bryan (۱۹۷۵) با بهینه‌سازی‌هایی استفاده شد. در این مرحله از میسلیوم قارچ کشت شده در محیط کشت استاندارد (Lambilliotte *et al.*, 2004) مایع (pH= 5.6) برای تلقیح سوبسترا (v/v 2: 0/5: 2) شامل ترکیبی از پیت، پرلیت و ورمیکولیت استفاده شد. به نمونه شاهد محیط مایع بدون میسلیوم قارچ به خاک اضافه شد. هر یک از گیاهچه‌ها به گلدان‌هایی با مقادیر



شکل ۱– برقرارسازی همزیستی میان گیاهچه‌های *Quercus castaneifolia* و قارچ اکتومیکوریز *Tricholoma acerbum* در آزمایشگاه (الف) و گل‌خانه (ب)

مساوی از خاک‌های حاوی قارچ، یا شاهد منتقل شد. به منظور طی نمودن مراحل سازگاری، گیاهچه‌ها به همراه گلدان‌های مربوطه، برای حفظ رطوبت، در کیسه‌های پلاستیکی شفاف نگهداری شدند (شکل ۱ ب) و بعد از گذشت هفت روز از انتقال، به‌تدریج سازگاری با هوادهی روزانه، شروع و پس از گذشت حدود چهار هفته مراحل آن تکمیل شد. هریک از گیاهان روزانه با مقادیر مساوی از محیط کشت استاندارد مایع و آب آبیاری شدند. نگهداری این گیاهان در گل‌خانه (دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد) به مدت ۱۰ هفته صورت گرفت.

۳) بررسی تأثیر همزیستی قارچ *Tricholoma acerbum* روی گیاهچه‌های *Quercus castaneifolia*: برای آزمون آماری گیاهچه‌ها در طرح کاملاً تصادفی با دو تیمار تلقیح با قارچ اکتومیکوریز و عدم تلقیح ارزیابی شدند. پس از ۱۴ هفته نگهداری گیاهچه‌ها در گل‌خانه، ۱۵ گیاهچه از هر تیمار (اکتومیکوریزایی و شاهد) به‌طور تصادفی انتخاب و داده‌های مربوط به جوان‌ترین و گسترش‌یافته‌ترین برگ‌ها برای ارزیابی مورد استفاده قرار گرفتند (Sebastiana *et al*., 2013). جهت اندازه‌گیری میزان کلروفیل برگ از دستگاه کلروفیل‌متر (Chlorophyll Content Meter) استفاده شد. همچنین وضعیت آبی گیاهان با اندازه‌گیری محتوای نسبی آب برگ (Leaf Relative Water Content) محاسبه شد (Catsky, 1960). مقایسه میانگین‌های دو تیمار تلقیح شده و شاهد با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون t برای دو نمونه مستقل (Independent-Samples T Test) برای هر متغیر و در سطح ۰/۰۵ انجام شد.

- یافته‌ها:

۱) جداسازی و کشت قارچ اکتومیکوریز و شناسایی آن: در بازدید از رویشگاه بلوط در استان مازندران- طرح جنگل‌داری نسارود (بینشکی) مشاهده شد که گیاهان بلوط و خاک منطقه به‌طور وسیعی توسط قارچ‌های اکتومیکوریز کلونیزه شده‌اند و براساس مشاهده اسپوروکارپ‌های قارچی (شکل ۲) و نیز وضعیت خاک ریزوسفر (شکل ۳) مشخص

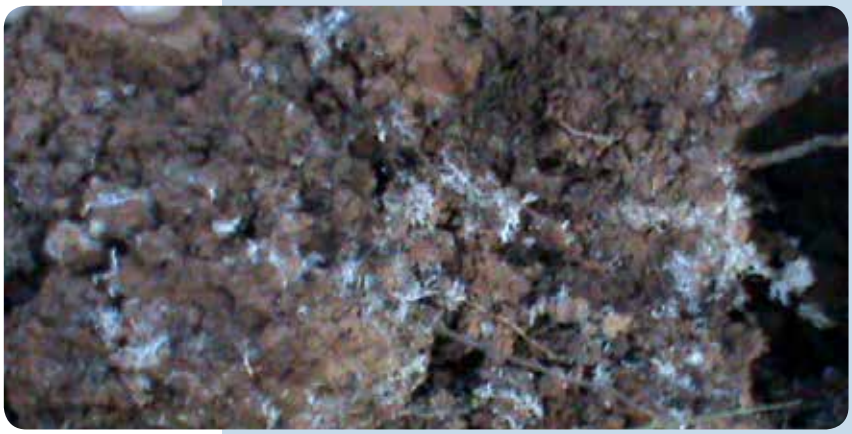
شکل ۲- جنگل بلوط *Quercus castaneifolia* نسارود- استان مازندران و کلاهک قارچ *Tricholoma acerbum* همراه میزبان

شد غالب‌ترین آنها گونه‌های مرتبط با جنس *Tricholoma* هستند. گونه‌های مرتبط با این جنس در خاک کلنی قارچی مشخصی را با عنوان "Shiro" (به معنای قلعه یا قلمرو) تشکیل می‌دهند. این کلنی‌ها در جنگل‌های کاج و سوزنی‌برگان به رنگ سفید و در جنگل‌های بلوط و دیگر پهن‌برگان خاکستری رنگ (شکل ۳) و شامل یک توده فشرده میسلیومی هستند که تمام خاک تحت قلمرو ازجمله ریشه گیاهان (اعم از ریشه‌های مویین، ریشه‌های فرعی و ریشه‌های اصلی)، گرانول‌های خاک و سنگ‌ها و شکاف بین گرانول خاک را کلونیزه می‌کنند (Vaario *et al*., 2010).

در پی تلاش برای به روی محیط آوردن قارچ‌های اکتومیکوریز، میسلیوم خالص یک قارچ اکتومیکوریز از اسپوروکاپ جمع‌آوری شده آن از رویشگاه بینشکی جداسازی و روی محیط MMN کشت شد (شکل ۴).

جداسازی، کشت و نگهداری قارچ‌های اکتومیکوریز گام اساسی و مهم در میکوریزایی نمودن مصنوعی گیاهچه‌های درختان جنگلی است (Repac, 2010). برخی قارچ‌های اکتومیکوریز را می‌توان به‌صورت خالص تحت شرایط کنترل شده آزمایشگاهی کشت کرد. جداسازی بافت قارچی به‌طور معمول از اندام‌های باردهی سالم و جوان در حداقل زمان ممکن پس از جمع‌آوری انجام می‌شود، اما تحقیقاتی هم وجود دارند که در آنها جداسازی این بافت قارچی از بافت اکتومیکوریزایی استریل شده سطحی، یا از ریزومورف‌ها انجام شده است (Obase *et al*., 2009). برای جداسازی و کشت قارچ‌های اکتومیکوریز تاکنون محیط‌های متفاوتی به کار گرفته شده که در میان آن‌ها محیط MMN شناخته‌شده‌ترین و مناسب‌ترین محیط است؛ هرچند محیط اولیه به منظور کاهش اثرات معکوس روی تشکیل همزیستی، که معمولاً توسط مقادیر بالای کربن خارجی ایجاد می‌شود، تغییرات متعددی داشته است (Repac, 2010).

برای شناسایی مولکولی این کلنی جداسازی شده، پس از تکثیر و تعیین توالی ناحیه ITS از DNA ریبوزومی آن (با کد دسترسی MH628231 در NCBI) و سپس مقایسه این توالی با توالی‌های مربوطه قرار داده



شکل ۳- کلنی قارچی *Tricholoma acerbum* در جنگل بلوط *Quercus castaneifolia* نسارود، استان مازندران

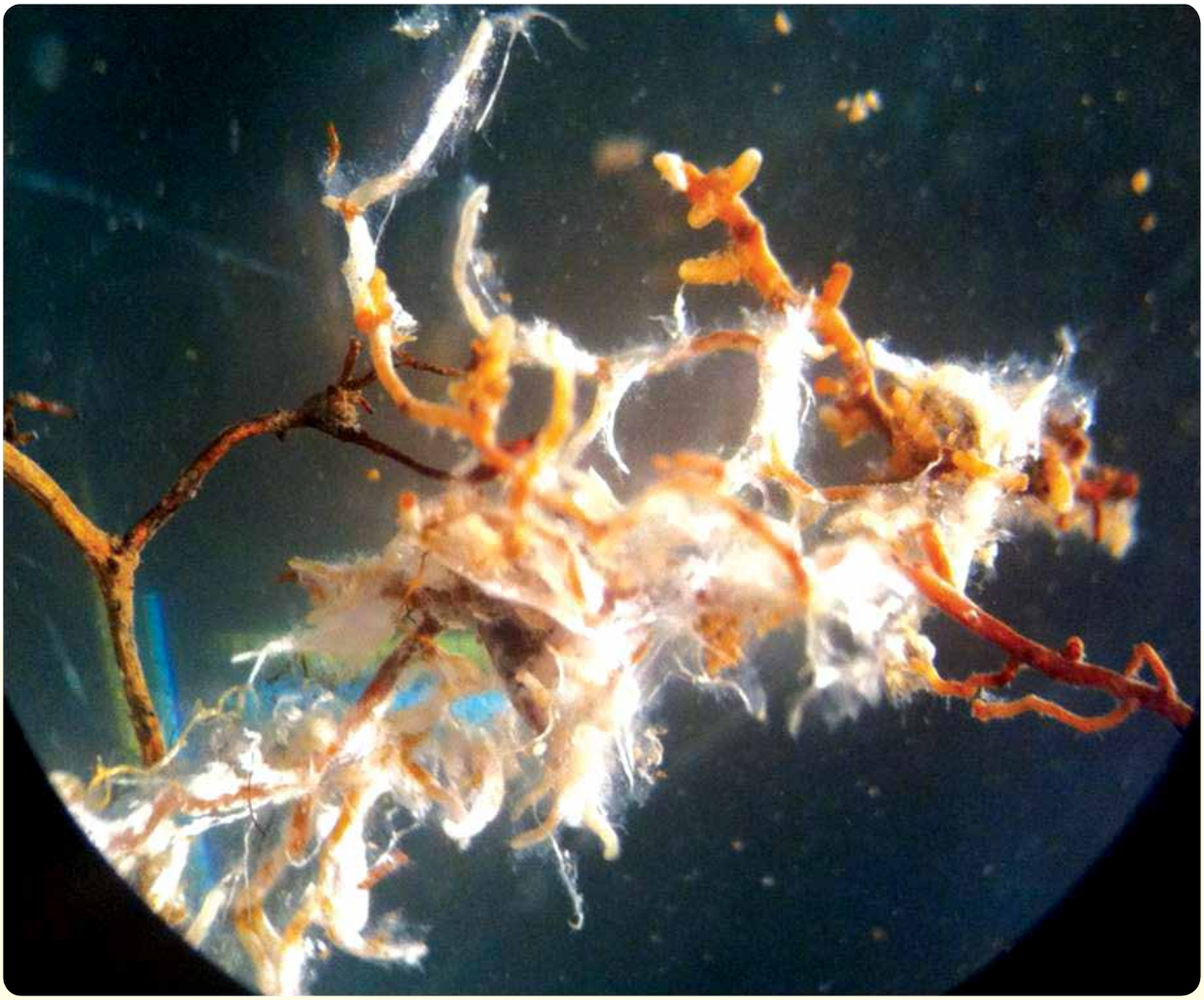
شکل ۴- میسلیوم جداسازی شده از قارچ اکتومیکوریز *Tricholoma acerbum*

شده در پایگاه داده‌ها مشخص شد که توالی این ناحیه در ایزوله جداسازی شده از اسپوروکارپ، بالاترین سطح تشابه (۹۹درصد) را با توالی ITS1-5.8S-ITS2 از DNA ریبوزومی قارچ *T. acerbum* (AF377247) معرفی شده توسط Bidartondo و Bruns (۲۰۰۲) از نروژ نشان می‌دهد (جدول ۱). ازاین‌رو ایزوله موردنظر به‌عنوان گونه *T. acerbum* در نظر گرفته شد. بررسی موقعیت فیلوژنتیکی این قارچ نیز تأییدکننده شناسایی آن به‌عنوان *T. acerbum* بود (زمانی، ۱۳۹۳).

۲) تلقیح گیاهچه‌های *Quercus castaneifolia* توسط قارچ بومی *Tricholoma acerbum*: پس از ۱۴ هفته نگهداری توأم قارچ و گیاه در گل‌خانه و با سوبسترا پیت، پرلیت و ورمیکولیت؛ میسلیوم قارچی اطراف سیستم ریشه گیاه را احاطه کرد و همزیستی اکتومیکوریزایی برقرار شد. طی این روش سنتزِ همزیستیِ اکتومیکوریزایی، تشکیل ریشه‌های کوتاه اکتومیکوریزایی یا همان ریشه‌های جانبی کوتاه و ضخیم انجام شد، درحالی‌که سیستم ریشه میزبان فاقد ریشه‌های مویین بود. میسلیوم متراکم قارچی سطح ریشه‌های جانبی را احاطه کرده و به سطح ریشه گسترش یافت؛ این حضور گسترده هیف سفید–کرم و متراکم قارچ در اطراف ریشه‌های *Q. castaneifolia*

جدول ۱– نتیجه شناسایی مولکولی قارچ اکتومیکوریز همراه بلوط در استان مازندران- طرح جنگل‌داری نسارود

گونه بلوط	رویشگاه	کد مورفوتایپ	*accession numbers*	طول (bp)	بالاترین مشابهت	کد دسترسی	درصد تشابه
Q. castaneifolia	بینشکی	Cas-4-20	MH628231	۶۷۰	*Tricholoma acerbum*	AF377247	۹۹درصد



شکل ۵– همزیستی میان ریشه گیاهچه‌های *Quercus castaneifolia* و قارچ اکتومیکوریز *Tricholoma acerbum*

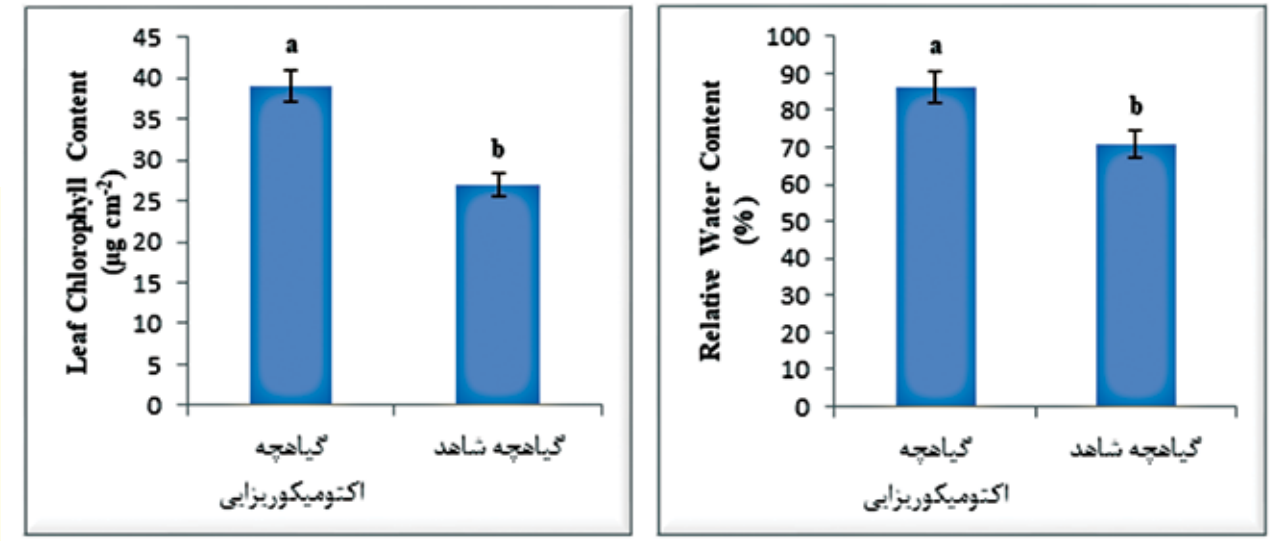
lia که از خصوصیات غلاف قارچی جنس *Tricholoma* است و عدم حضور ریشه‌های مویین، تأییدکننده برقراری همزیستی این جنس قارچی بود (Vaario *et al*., 2010) (شکل ۵). مناسب بودن سوبسترای پیت و ورمیکولیت، برای برقرارسازی همزیستی اکتومیکوریزایی در مطالعات دیگری نیز مشخص و به‌علاوه گزارش شده است که این نوع سیستم سنتز همزیستی، امکان توسعه طبیعی ریشه‌ها و تشکیل ریشه‌های جانبی محل استقرار قارچ اکتومیکوریز را فراهم می‌آورد (Duponnois & Garbay, 1991; Repac, 2010). به‌علاوه همسو با نتایج این تحقیق، گزارش شده است که استفاده از کشت مایع (به‌صورت قطعات میسلیومی) برای تلقیح قارچ اکتومیکوریز به سیستم سنتز همزیستی به‌دلیل کلونیزاسیون سریع‌تر و یکنواخت‌تر سوبسترای همزیستی بسیار مناسب‌تر از انتقال کشت آگار به اطراف ریشه‌های میزبان است (Repac, 2010).

۳) بررسی تأثیر همزیستی قارچ *Tricholoma acerbum* روی گیاهچه‌های *Quercus castaneifolia*: آنالیز محتوای کلروفیل برگ، به‌عنوان یک شاخص فیزیولوژیک مهم برای سنجش میزان فتوسنتز، نشان‌دهنده افزایش معنی‌دار این رنگدانه‌های فتوسنتزی در گیاهچه‌های میکوریزایی نسبت به گیاهچه‌های شاهد بود (شکل ۶)، که این مسئله مطابق با گزارش‌های ارائه شده سایر محققان (Martins, 2008; Turgeman *et al*., 2011) منجر به جذب فعال‌تر نور و نرخ بالاتر فتوسنتز در گیاهچه‌های تلقیح شده می‌شود.

همچنین ارزیابی تأثیر برقراری همزیستی اکتومیکوریزایی روی وضعیت آبی گیاهچه‌های میزبان نشان‌دهنده تأثیرات مثبت تلقیح ریشه‌های گیاهچه‌های بلندمازو توسط *T. acerbum* بود (شکل ۶)، به‌طوری‌که محتوای نسبی آب در گیاهچه‌های بلندمازو تلقیح شده نسبت به گیاهچه‌های شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد.

● نتیجه‌گیری نهایی و پیشنهادها

در گیاهان حاصل از کشت بافت معمولاً مرحله سازگاری نیاز به مدیریت خاص داشته و چنانچه با تدابیر کافی انجام نشود ممکن است استقرار گیاهچه‌ها را به تأخیر انداخته و توسعه و نمو آنها را با مشکل مواجه کند. اغلب در این مرحله شوک ناشی از انتقال، توقف رشد ایجاد کرده و در مواردی منجر به مرگ گیاهچه‌ها می‌شود. مشکل اساسی به‌دلیل عدم توسعه سیستم ریشه‌ای کارآمد در آن‌ها است (Klerk & Brugge, 1992). این مشکل از طریق به کارگیری قارچ‌های میکوریز در گیاهچه‌های حاصل از کشت بافت در چندین گونه گیاهی رفع شده است (Habte *et al*., 2001). در گیاهان بلوط هرچند پژوهش‌های کمتری در مایه‌زنی قارچ میکوریز بر گیاهچه‌های حاصل از کشت بافت انجام شده اما مطالعاتی وجود دارد که نتایج آن‌ها نشان‌دهنده تأثیرات سودمند کلونیزاسیون اکتومیکوریزایی روی گیاهان بلوط، شامل افزایش رشد، افزایش پتانسیل فتوسنتز و بهبود تغذیه گیاه هستند (Dominguez Nunez *et al*., 2008; Turgeman *et al*., 2011; Lehto & Zwiazek, 2011). درمجموع با نتایج این پژوهش مشخص شد که مایه‌زنی گیاهچه‌های حاصل از کشت بافت بلندمازو با قارچ اکتومیکوریز تأثیر قابل‌توجهی در افزایش محتوای کلروفیل برگ و نیز محتوای نسبی آب گیاهچه‌ها دارد. مجموع این دو یافته (افزایش میزان کلروفیل و محتوای نسبی آب در گیاه) اثبات‌کننده تعادل میان تعاملات قارچ *T. acerbum* و گیاه *Q. castaneifolia* است. به این ترتیب که افزایش محتوای کلروفیل و در مقابل نرخ فتوسنتز در گیاهچه‌های بلوط تلقیح شده، درواقع تنظیمی برای منبع فروبرنده کربن یا همان قارچ کلونیزه‌کننده ریشه است که در پاسخ موجب انتقال عناصر غذایی و آب به گیاه می‌شود و تجلی آن افزایش محتوای نسبی آب در گیاهچه‌های بلوط است. همچنین این نتایج نشان‌دهنده سازگاری میان گیاه *Q. castaneifolia* و قارچ بومی *T. acerbum* بوده و نشان می‌دهد استفاده



شکل ۶- میزان کلروفیل و محتوای نسبی آب در گیاهچه‌های *Quercus castaneifolia* شاهد و تلقیح شده با قارچ اکتومیکوریز *Tricholoma acerbum* ؛ حروف غیرمشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار (P=0.05) براساس آزمون *t* است. تعداد = ۱۵

از این همزیستی استراتژی مؤثری در به حداقل رساندن شوک ابتدایی و درنتیجه خشکیدگی گیاهچه‌های کشت بافتی منتقل شده به گل‌خانه در فاز سازگاری (که کلیدی‌ترین و مهم‌ترین فاز در کشت بافت است) خواهد بود و به استقرار مطلوب‌تر آن‌ها در محیط گل‌خانه کمک می‌کند.

منابع

حسندخت م.، راهله، الف. و ابراهیمی، ن.، ۱۳۸۵. مبانی کشت بافت گیاهی. انتشارات مرز دانش، تهران، ۳۲۸ صفحه.

زمانی، س.م.، ۱۳۹۳. شناسایی قارچ‌های اکتومیکوریز درختان بلوط در برخی جنگل‌های ایران و بررسی پروفایل متابولیکی و ترنسکریپتومیکی ریشه‌های همزیست *Quercus castaneifolia*. رساله دکترا، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ۲۲۸ صفحه.

زمانی س.م.، امام، م.، محمدی گل‌تپه، ا.، صفایی، ن.، قمری‌زارع، ع. و فارسی، م.ج.، ۱۳۹۱. تکثیر آزمایشگاهی بلوط بلندمازو (*Quercus castaneifolia*). تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران، ۲۰(۴۰): ۲۴۰-۲۵۲.

صفایی، ن.، علیزاده، ع.، سعیدی، ع.، رحیمیان، ح. و آدام، گ.، ۱۳۸۴. تشخیص مولکولی و بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های ایرانی *Fusarium graminearum*، عامل بلایت سنبله گندم. بیماری‌های گیاهی، ۴۱: ۱۷۱- ۱۸۹.

Aka-Kacar, Y., Akpınar, C., Agar, A., Yalcin-Mendi, Y., Serce, S. and Ortas, I., 2010. The effect of mycorrhiza in nutrient uptake and biomass of cherry rootstocks during the acclimatization Rom. Biotechnol. Lett., 15(3): 5246-5252.

Bidartondo, M.I. and Bruns, T.D., 2002. Fine-level mycorrhizal specificity in the Monotropoideae (Ericaceae): specificity for fungal species groups. Molecular Ecology, 11: 557-569.

Catsky, J., 1960. Determination of water deficit in discs cut out from leaf blades. Plant Biology, 2: 76–77.

Dominguez Nunez, J.A., Gonzalez, R.P., Rodriguez Barreal, J.A. and de Omenaca Gonzalez, J.A.S., 2008. The effect of Tuber melanosporum Vitt. mycorrhization on growth, nutrition, and water relations of *Quercus petraea* Liebl., *Quercus faginea* Lamk., and *Pinus halepensis* Mill. seedlings. New Forests, 35(2): 159-171.

Duponnois, R. and Garbaye, J., 1991. Techniques for controlled synthesis of Douglas-fir–Laccaria laccata ectomycorrhizal symbiosis. Annals of Forest Science, 48: 641–650.

Fortuna, P., Citernesi, A.S., Morini, S., Vitagliano, C. and Giovannetti, M., 1996. Influence of arbuscular mycorrhizae and phosphate fertilization on shoot apical growth of micropropagated apple and plum rootstocks. Tree Phys, 16: 757-763.

Gardes, M. and Bruns, T.D., 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes– application to the identification of mycorrhizae and rusts. Molecular Ecology, 2: 113-118.

Habte, M., Miyasaka, S.C. and Matsuyama, D.T., 2001. Arbuscular mycorrhizal fungi improve early forest tree establishment. Plant nutrition Food security and sustainability of agro-ecosystems. Kluwer Academic Publishers, Netherland, pp. 644-645.

Kapoor, R., Sharma, D. and Bhatnagar, A.K., 2008. Arbuscular mycorrhizae in micropropagation systems and their potential applications. Sci Hortic., 116: 227-239.

Klerk, G.I. and Brugge, J., 1992. Factors affecting adventitious root formation in microcuttings of Malus. Agronomie Journal, 12: 747-755.

Lambilliotte, R., Cooke, R., Samson, D., Fizames, C., Gaymard, F., Plassard, C., Tatry, M.V., Berger, C., Laudie, M., Legeai, F., Karsenty, E., Delseny, M., Zimmermann, S. and Sentenac, H., 2004. Large-scale identification of genes in the fungus *Hebeloma cylindrosporum* paves the way to molecular analyses of ectomycorrhizal symbiosis. New Phytologist, 164: 505–513.

Lehto, T. and Zwiazek, J.J., 2011. Ectomycorrhizas and water relations of trees: a review. Mycorrhiza, 2: 71–90.

Martins, A., 2008. In vitro Mycorrhization of Micropropagated Plants: Studies on Castanea sativa Mill. Siddiqui, Z.A., Akhtar, M.S. and Futai, K. (Eds.). Mycorrhizae: Sustainable Agriculture and Forestry. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 319-334.

Marx, D.H. and Bryan, W.C., 1975. Growth and ectomycorrhizal development of loblolly pine seedlings in fumigated soil infested with the fungal symbiont Pisolithus tinctorius. Forest Science, 21: 245–254.

Obase, K., Tamai, Y., Yajima, T. and Miyamoto, T., 2009. Mycorrhizal synthesis of four ectomycorrhizal fungi in potted *Populus maximowiczii* seedlings. Mycoscience, 50: 143–145.

Oh, K.I., Melville, L.H. and Peterson, R.L., 1995. Comparative structural study of Quercus serrata and *Q. acutissima* formed by *Pisolithus tinctorius* and Hebeloma cylindrosporum. Trees, 9(3): 171-179.

Ostrolucka, M.G. and Bezo, M., 1994. Utilization of meristem cultures in propagation of oak (*Quercus* spp.). Genetic Polonica, 35: 161–169.

Ostrolucka, M.G., Gajdosova, A. and Libiakova, G., 2007. Protocol for micropropagation of *Quercus* spp. In: Jain, S.M. and Haggman, H. (Eds.). Protocols for micropropagation of woody trees and fruits. Springer, Dordrecht, pp. 85–91.

Pijut, P.M., Lawson, S.S. and Michler, C.H., 2011. Biotechnological efforts for preserving and enhancing temperate hardwood tree biodiversity, health, and productivity. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant, 47: 123-147.

Qu, L., Quoreshi, A.M., Iwase, K., Tamai, Y., Funada, R. and Koike, T., 2003. In vitro ectomycorrhiza formation on two larch species of seedling with six different fungal species. Eurasian Journal of Forest Research, 6(1): 65-73.

Repac, I., 2010. Ectomycorrhizal inoculum and inoculation techniques. In: Rai, R., Varma, A. (Eds.) Diversity and biotechnology of ectomycorrhizae. Soil biology series. Springer, Berlin, pp. 43-63.

Sebastiana, M., Pereira, V.T., Alcantara, A., Pais, M.S. and Silva, A.B., 2013. Ectomycorrhizal inoculation with Pisolithus tinctorius increases the performance of *Quercus suber* L. (cork oak) nursery and field seedlings. New Forests, 44: 937-949.

Smith, M.E., Douhan, G.W. and Rizzo, D.M., 2007. Ectomycorrhizal community structure in a xeric *Quercus* woodland based on rDNA sequence analysis of sporocarps and pooled roots. New Phytologist, 174: 847–863.

Turgeman, T., Asher, J.B., Roth-Bejerano, N., Kagan-Zur, V., Kapulnik, Y. and Sitrit, Y., 2011. Mycorrhizal association between the desert truffle *Terfezia boudieri* and *Helianthemum sessiliflorum* alters plant physiology and fitness to arid conditions. Mycorrhiza, 21: 623–630.

Vaario, L.M., Pennanen, T., Sarjala, T., Savonen, E.M. and Heinonsalo, J., 2010. Ectomycorrhization of *Tricholoma matsutake* and two major conifers in Finland-an assessment of in vitro mycorrhiza formation. Mycorrhiza, 20(7): 511-8.

White, T.J., Bruns, T.D., Lee, S. and Taylor, J.W., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J. (Eds) PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, San Diego, pp. 315-322.