دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده کشاورزی

رساله دوره دکتری بیماری‌شناسی گیاهی
قارچ‌شناسی

شناسایی قارچ‌های اکتومیکوریز درختان بلوط در برخی جنگل‌های ایران و بررسی پروفایل متابولیکی و ترنسکریپتومیکی ریشه‌های همزیست *Quercus castaneifolia*

نگارش:
سیده معصومه زمانی

استاد راهنما (اصلی):
دکتر ابراهیم محمدی

استاد راهنما (دوم):
دکتر ناصر صفایی

استاد مشاور (اول):
دکتر محسن برزگر

استاد مشاور (دوم):
دکتر خدیجه رضوی

آذر ماه ۱۳۹۳

بسمه تعالی

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از رساله دکتری

خانم **سیده معصومه زمانی** رساله ۱۸ واحدی خود را با عنوان: **شناسایی قارچ‌های اکتومیکوریز درختان بلوط در برخی جنگل¬های ایران و بررسی پروفایل متابولیکی و ترنسکریپتومیکی ریشه‌های همزیست *Quercus castaneifolia*** در تاریخ **۹۳/۹/۳** ارائه کردند.

اعضای هیات داوران نسخه نهایی این رساله را از نظر فرم و محتوا تایید کرده است و پذیرش آنرا برای تکمیل درجه دکتری پیشنهاد می‌کنند.

اعضای هیأت داوران	نام و نام خانوادگی	رتبه علمی	امضاء
۱- استاد راهنمای اصلی	دکتر ابراهیم محمدی	استاد	
۲- استاد راهنمای دوم	دکتر ناصر صفایی	دانشیار	
۳- استاد مشاور اول	دکتر محسن برزگر	دانشیار	
۴- استاد مشاور دوم	دکتر خدیجه رضوی	استادیار	
۵- استاد ناظر	دکتر مسعود شمس بخش	دانشیار	
۶- استاد ناظر	دکتر سید علی موسوی جرف	دانشیار	
۷- استاد ناظر	دکتر واهه میناسیان	استاد	
۸- استاد ناظر	دکتر امیر موسوی	دانشیار	
۹- نماینده شورای تحصیلات تکمیلی	مسعود شمس بخش	دانشیار	

آیین‌نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهشهای علمی دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه: با عنایت به سیاست‌های پژوهشی و فناوری دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسانها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضای هیأت علمی، دانشجویان، دانش‌آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی که تحت عناوین پایان‌نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد زیر را رعایت نمایند:

ماده ۱- حق نشر و تکثیر پایان نامه/ رساله و درآمدهای حاصل از آنها متعلق به دانشگاه می باشد ولی حقوق معنوی پدید آورندگان محفوظ خواهد بود.

ماده ۲- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان‌نامه/ رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و با تایید استاد راهنمای اصلی، یکی از اساتید راهنما، مشاور و یا دانشجو مسئول مکاتبات مقاله باشد. ولی مسئولیت علمی مقاله مستخرج از پایان نامه و رساله به عهده اساتید راهنما و دانشجو می باشد.

تبصره: در مقالاتی که پس از دانش‌آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان‌نامه/ رساله نیز منتشر می‌شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده ۳- انتشار کتاب، نرم افزار و یا آثار ویژه (اثری هنری مانند فیلم، عکس، نقاشی و نمایشنامه) حاصل از نتایج پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی کلیه واحدهای دانشگاه اعم از دانشکده ها، مراکز تحقیقاتی، پژوهشکده ها، پارک علم و فناوری و دیگر واحدها باید با مجوز کتبی صادره از معاونت پژوهشی دانشگاه و براساس آئین نامه های مصوب انجام شود.

ماده ۴- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه یافته ها در جشنواره‌های ملی، منطقه‌ای و بین‌المللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرح‌های تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق معاونت پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ۵- این آیین‌نامه در ۵ ماده و یک تبصره در تاریخ ۸۷/۴/۱ در شورای پژوهشی و در تاریخ ۸۷/۴/۲۳ در هیأت رئیسه دانشگاه به تایید رسید و در جلسه مورخ ۸۷/۷/۱۵ شورای دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب در شورای دانشگاه لازم‌الاجرا است.

«اینجانب **سیده معصومه زمانی** دانشجوی رشته **بیماری‌شناسی گیاهی** ورودی سال تحصیلی **۱۳۸۸** مقطع **دکتری** دانشکده **کشاورزی** متعهد می‌شوم کلیه نکات مندرج در آئین نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهش‌های علمی دانشگاه تربیت مدرس را در انتشار یافته های علمی مستخرج از رساله تحصیلی خود رعایت نمایم. در صورت تخلف از مفاد آئین نامه فوق الاشعار به دانشگاه وکالت و نمایندگی می دهم که از طرف اینجانب نسبت به لغو امتیاز اختراع بنام بنده و یا هر گونه امتیاز دیگر و تغییر آن به نام دانشگاه اقدام نماید. ضمناً نسبت به جبران فوری ضرر و زیان حاصله بر اساس برآورد دانشگاه اقدام خواهم نمود و بدینوسیله حق هر گونه اعتراض را از خود سلب نمودم»

امضا:.....

تاریخ: .....

آیین نامه چاپ پایان‌نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان نامه (رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، مبین بخشی از فعالیتهای علمی-پژوهشی دانشگاه است، بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

ماده ۱: در صورت اقدام به چاپ پایان نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به طور کتبی به «دفتر نشر آثارعلمی» دانشگاه اطلاع دهد.

ماده ۲: در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه) عبارت ذیل را چاپ کند:

«کتاب حاضر، حاصل رساله دکتری نگارنده در رشته **بیماری‌شناسی گیاهی** است که در سال **۱۳۹۳** در دانشکده **کشاورزی** دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی جناب آقای **دکتر ابراهیم محمدی** و جناب آقای **دکتر ناصر صفایی** و مشاوره جناب آقای **دکتر محسن برزگر** و سرکار خانم **دکتر خدیجه رضوی** از آن دفاع شده است.»

ماده ۳: به منظور جبران بخشی از هزینه‌های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت‌چاپ) را به «دفتر نشر آثارعلمی» دانشگاه اهدا کند. دانشگاه می‌تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر درمعرض فروش قرار دهد.

ماده ۴: در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت‌مدرس، تأدیه کند.

ماده ۵: دانشجو تعهد و قبول می کند در صورت خودداری از پرداخت بهای خسارت، دانشگاه می‌تواند خسارت مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند؛ به علاوه به دانشگاه حق می‌دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در ماده ۴ را از محل توقیف کتاب‌های عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده ۶: اینجانب **سیده معصومه زمانی** دانشجوی رشته **بیماری شناسی گیاهی** مقطع **دکتری** تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی: **سیده معصومه زمانی**

تاریخ و امضا:

تقدیم به

مادرم؛

گل مقدس و نازنینی که از اهالی وسعت‌های روشن است؛ او که مظهر عشق است و از لالایی کودکی تا بالندگی امروز درخت زندگانیم را از سرچشمه زلال مهربانیش آبیاری نمود؛

پدرم؛

که پیامش مالامال از پند و دلش به بزرگی دریاست؛ او که جز در سایه پر مهرش بالندگی این نهال کوچک میسر نبود و در سایه لطف الهی هرچه دارم از وجود اوست؛

همسرم؛

که وجود مهربانش همواره سایه سار زندگیم بوده است؛ او که اسوه صبر و صمیمیت است و شادی زندگی‌ام را مدیون حضور دلگرم کننده او هستم.

تشکر و قدردانی

از دست و زبان که بر آید
کز عهده شکرش به‌در آید
بی شک اگر لطف و عنایت حضرت حق همراه نبود، انجام مراحل مختلف این تحقیق میسر نمی‌گشت. یگانه مهربان را شاکرم که چونان همیشه، دستم گرفت و راه هموار نمود تا از این مرحله نیز به خوبی عبور نمایم. اکنون که مراحل تحقیق و تدوین این رساله به اتمام رسیده است بر خود لازم می‌دانم که از تلاش و مساعدت‌های اساتید و همکاران محترمی که در این امر مرا یاری نموده‌اند تشکر و قدردانی نمایم.

از زحمات فراوان اساتید گرانقدر جناب آقای دکتر ابراهیم محمدی و جناب آقای دکتر ناصر صفایی که با صبر و بردباری، در انجام مراحل مختلف این تحقیق راهنمایی مرا بر عهده داشته‌اند کمال تشکر و قدردانی را دارم و از درگاه ایزد منان سلامتی و کامیابی روزافزون برایشان مسئلت دارم.

از جناب آقای دکتر محسن برزگر و سرکار خانم دکتر خدیجه رضوی که زحمت مشاوره این تحقیق را تقبل نمودند سپاسگزارم.

از اعضاء محترم هیأت داوران جناب آقای دکتر مسعود شمس بخش، جناب آقای دکتر علی موسوی، جناب آقای دکتر واهه میناسیان و جناب آقای دکتر امیر موسوی که زحمت بازخوانی و داوری این مجموعه را به عهده داشتند قدردانی می نمایم.

از همکاران محترم در موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور به پاس همه مساعدت‌ها و زحماتشان تشکر می‌کنم؛ بویژه از همکار گرامی سرکار خانم مهندس امام که از راهنمایی‌های پر ارزش و بی‌دریغشان در طول این دوره بهره‌مند شده‌ام، سپاسگزارم.

از همکلاسی‌های عزیزم آقای دکتر پدرام، خانم دکتر نورانی، دکتر موجرلو، دکتر ابطحی که در طول تحصیل همواره یاورم بودند سپاسگزارم و برایشان آرزوی پیروزی و موفقیت روزافزون دارم.

از زحمات بی‌شائبه پدر و مادرم در طول تمام مقاطع تحصیلی‌ام تشکر نموده و بر دستان پرمهرشان بوسه می‌زنم. چراغ وجودشان در زندگیم همواره روشن باد.

سپاس آخر را به همراه همیشه لحظات زندگیم، همسرم، تقدیم می‌کنم که حضورش در فضای زندگیم همواره مصداق بی‌ریای سخاوت بوده است. سایه پر مهرش در زندگیم مستدام باد.

چکیده

همزیستی اکتومیکوریزایی، نقش کلیدی را در استقرار و عملکرد درختان در اکوسیستم‌های جنگلی ایفا می‌کند. در بخش اول این تحقیق شناسایی برخی قارچ‌های اکتومیکوریزِ همراه با درختان بلوط (*Quercus*) - که مهمترین و فراوانترین گونه‌های درختی موجود در جنگل‌های کشور را تشکیل می‌دهند- در شش رویشگاه از جنگل‌های شمال کشور صورت گرفت. در بازدید از این جنگل‌ها، نوک‌ریشه‌های اکتومیکوریزایی درختان بلوط جمع‌آوری شد. برای شناسایی مولکولی قارچ‌ها ناحیه ITS1-5.8S-ITS2 با آغازگرهای گونه‌های قارچی، تکثیر و تعیین توالی شد. سپس تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی آنها با توالی‌های موجود در پایگاه داده‌ها با روش بیزی (Bayesian method) صورت گرفت. در مجموع ۲۰۷ سیستم ریشه‌ای از رویشگاه‌های مورد مطالعه جمع‌آوری و ۴۹ تاکسون از قارچ‌های اکتومیکوریز در میان آنها شناسایی شد که متعلق به ۱۳ جنس، شامل *Amanita*، *Boletus*،*Cortinarius*، *Hebeloma*، *Hydnum*، *Hygrophorus*، *Inocybe*، *Laccaria*، *Lactarius*، *Lycoperdon*، *Russula*، *Scleroderma* و *Tricholoma* بودند. گونه‌هایی از *Lactarius*، *Russula* و *Inocybe* غالب‌ترین و متنوع‌ترین گروه‌های یافت شده در این تحقیق بودند که این گروه‌ها از مشخص‌ترین قارچ‌های گزارش شده از ریشه بلوط در اکوسیستم‌های معتدله مختلف می‌باشند.

در بخش دوم این تحقیق برای شناسایی سازوکارهای مولکولی احتمالی دخیل در سیگنال‌دهی، برقراری ارتباط و تعاملات در همزیستی اکتومیکوریزایی و به دست آوردن تصویری شفاف‌تر از عملکرد این همزیستی، تلفیقی از راهکارهای بیوشیمیایی و مولکولی بکار گرفته شد. بدین منظور پس از برقرار نمودن همزیستی در شرایط درون شیشه‌ای میان قارچ اکتومیکوریز *Hebeloma sinapizans* و گیاهچه‌های کشت‌بافتی *Q. castaneifolia*، ارزیابی خصوصیات مرفولوژیکی و فیزیولوژیکی گیاهچه‌های مایه زنی شده در مقایسه با گیاچه‌های شاهد و سپس بررسی‌های بیوشیمیایی و ژنتیکی بمنظور شناسایی ژن‌ها و متابولیت‌های دخیل در تشکیل و عملکرد این همزیستی صورت گرفت. در این تحقیق پروتکلی برای ریزازدیادی آزمایشگاهی *Q. castaneifolia* با استفاده از بخش‌های گره‌دار و جوانه‌دار سرشاخه‌های این گیاه برای نخستین بار معرفی شد. همچنین برای اولین بار در کشور، همزیستی اکتومیکوریزایی در شرایط درون

شیشه‌ای روی گیاهچه‌های درختی برقرار شد. براساس این نتایج، ایجاد همزیستی اکتومیکوریزایی روی گیاهچه‌های *Q. castaneifolia* موجب افزایش معنی‌دار بیومس ساقه، بیومس، سطح و کلروفیل برگ و نیز بهبود محتوای آبی گیاهچه‌ها شد. بررسی‌های بیوشیمیایی روی نیمرخ آمینواسیدها (توسط HPLC)، قندها (توسط HPLC) و اسیدهای چرب (توسط GC-FID) در ریشه‌های درگیر در همزیستی اکتومیکوریزایی صورت گرفت. مطالعه محتوای اسیدهای آمینه نشان دهنده تجمع آرژینین، سیترولین و آسپارتیک اسید در ریشه‌های مستقل *Q. castaneifolia* در مقایسه با ریشه‌های همزیست شده بود. در سیستم ریشه‌ای میکوریزایی سطح این آمینواسیدها کاهش و به موازات آن غلظت اسیدهای آمینه گلوتامیک اسید، آسپاراژین، گلوتامین و آلانین افزایش یافت. ارتباط این تغییرات و عملکرد همزیستی اکتومیکوریزایی تفسیر شده است. در مجموع غلظت اغلب اسیدهای آمینه در سیستم ریشه‌ای میکوریزایی افزایش نشان داد. بررسی محتوای قندها نشان دهنده حضور مقادیر بالایی از کربوهیدرات‌ها در ریشه‌های اکتومیکوریزایی *Q. castaneifolia* بود که با افزایش ارسال کربن به سیستم ریشه‌ای میکوریزایی، در پاسخ به درخواست بالای کربن از جانب شریک قارچی همزیستی در ریشه‌های کلونیزه شده، در تطابق می‌باشد. اگرچه در ترکیب اسید چرب‌های غالب موجود در ریشه‌های اکتومیکوریزایی در مقایسه با ریشه‌های شاهد تغییری ایجاد نشد و اسید چرب‌های غالب در هر دو نوع ریشه شامل پالمیتیک اسید و لینولئیک اسید بود، اما تلقیح با قارچ موجب تغییراتی در محتوای اسیدچرب‌های مختلف ریشه *Q. castaneifolia* شد که دلایل این تغییرات در اثر همزیستی اکتومیکوریزایی تفسیر شده است. بمنظور بررسی نحوه‌ی تغییر در بیان ژن‌های گیاهچه‌های *Q. castaneifolia* طی برقراری همزیستی اکتومیکوریزایی و شناسایی ژن‌های اختصاصی این همزیستی، از تجزیه cDNA-AFLP استفاده شد. در مجموع با استفاده از ۹ ترکیب آغازگری ۱۵۳ قطعه مشتق از رونوشت با بیان افزایش یافته در ریشه اکتومیکوریزایی نسبت به ریشه شاهد مشاهده شد که از میان آنها ۱۱۶ قطعه با موفقیت تعیین توالی گردید. هجده قطعه شباهتی با توالی‌های نوکلئوتیدی ثبت شده در پایگاه اطلاعاتی NCBI نشان نداده و بعنوان ژن‌های جدید بافت همزیست *Q. castaneifolia/H. sinapizans* معرفی می‌شوند. توالی ۶۳ قطعه دارای همولوژی بالا ($>1e^{-5}$) با توالی ژن‌های کد کننده پروتئین‌های شناخته شده از گروه‌های مختلفی که در فرآیندهای تغییر مدل دیواره سلولی، تردد وزیکلی، فعال‌سازی تولید و ترشح متابولیت‌های ثانویه، تغییر در بیوسنتز فلاوونوئیدها، فعال‌سازی مسیرهای سیگنال‌دهی و شناسایی افکتورها، تنظیم بیان ژن‌ها و ترجمه پروتئین‌ها و نیز ژن‌هایی که در فرآیندهای همزیستی نظیر تبادلات غذایی، تشکیل ریشه‌های جانبی و زوال ریشه‌های مویین نقش دارند، نشان دادند. این نخستین مطالعه‌ای است که ژن‌های القاء شونده در اثر همزیستی اکتومیکوریزایی در ریشه‌های بلوط *Q. castaneifolia* را گزارش می نماید. شناسایی این ژن‌ها در ریشه‌های همزیست شده میزبان، نتایجی سودمند در جهت روشن ساختن مکانیسم‌های مولکولی کنترل کننده همزیستی اکتومیکوریزایی محسوب می‌گردد.

کلید واژه‌ها: *Quercus castaneifolia*، همزیستی اکتومیکوریزایی، ترنسکریپت‌ها، متابولیت‌ها.

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل ۱

مقدمه و اهداف ۶-۱

فصل ۲

مروری بر مطالعات انجام شده ۵۰-۷

۲-۱- همزیستی میکوریزایی ۷

۲-۲- تکامل و اهمیت همزیستی میکوریزایی ۹

۲-۳- مرفولوژی و عملکرد همزیستی اکتومیکوریزایی ۱۱

۲-۴- قارچ‌های تشکیل‌دهنده همزیستی اکتومیکوریزایی ۱۲

۲-۵- اهمیت درختان بلوط و به کارگیری تکنیک کشت بافت برای تکثیر آنها ۱۵

۲-۶- تلقیح مصنوعی ریشه درختان با قارچ‌های اکتومیکوریز ۱۷

۲-۷- تبادلات میان شریک قارچی و گیاه میزبان در همزیستی اکتومیکوریزایی ۲۱

۲-۷- ۱- جذب و هضم نیتروژن توسط قارچ اکتومیکوریز و انتقال آن به گیاه میزبان ۲۲

۲-۷- ۱- ۱- تجزیه خارج‌سلولی ترکیبات نیتروژن‌دار توسط قارچ اکتومیکوریز ۲۳

۲-۷- ۱- ۲- جذب ترکیبات نیتروژن‌دار توسط قارچ اکتومیکوریز ۲۳

۲-۷- ۱- ۳- هضم ترکیبات نیتروژن‌دار توسط قارچ اکتومیکوریز و انتقال آنها به گیاه میزبان ۲۶

۲-۷- ۲- تغذیه کربوهیدراتی شریک قارچی در همزیستی اکتومیکوریزایی ۲۹

۲-۷- ۲- ۱- تغذیه کربنی قارچ اکتومیکوریز از کربوهیدرات‌های خاک ۲۹

۲-۷- ۲- ۲- تغذیه کربنی قارچ اکتومیکوریز از سطح مشترک همزیستی ۳۱

۲- ۷- ۳- لیپیدها در همزیستی اکتومیکوریزایی ۳۶

۲- ۷- ۳- ۱- پروفایل لیپیدی قارچ‌های اکتومیکوریز ۳۷

۲- ۷- ۳- ۲- تغییرات ایجاد شده در لیپیدهای گیاهی پس از برقراری همزیستی اکتومیکوریزایی ۳۹

۲- ۷- ۳- ۳- نقش لیپیدهای گیاهی در برقراری همزیستی اکتومیکوریزایی ۴۲

۲- ۷- ۳- ۴- استفاده از اسیدهای چرب جهت بررسی جمعیت قارچ‌های اکتومیکوریز در خاک ۴۲

۲- ۸- مکانیسم‌های مولکولی دخیل در توسعه همزیستی اکتومیکوریزایی ۴۳

فصل ۳

مواد و روش‌ها ۸۴-۵۱

۳-۱- شناسایی گونه‌هایی از قارچ‌های اکتومیکوریز درختان بلوط در برخی جنگل‌های ایران ۵۱

۳-۱-۱- مناطق مورد مطالعه ۵۱

۳-۱-۲- نمونه‌برداری ۵۲

۳-۱-۳- استخراج DNA و انجام واکنش PCR ۵۴
۳-۱-۴- شناسایی قارچ‌های اکتومیکوریز همزیست با ریشه درختان بلوط ۵۶
۳-۱-۵- جداسازی و به روی محیط کشت آوردن قارچ‌های اکتومیکوریز و شناسایی آن‌ها ۵۷
۳-۲- بهینه‌سازی کشت بافت *Quercus castaneifolia* در شرایط آزمایشگاهی ۶۰
۳-۲-۱- جمع‌آوری ریزنمونه‌ها ۶۰
۳-۲-۲- جداسازی ریزنمونه‌ها، ضد عفونی و کشت آن‌ها ۶۰
۳-۲-۳- بررسی تاثیر ترکیبات معدنی روی میزان باززایی شاخه‌ها ۶۱
۳-۲-۴- بررسی تاثیر ترکیبات سیتوکینینی روی میزان باززایی شاخه‌ها ۶۲
۳-۲-۵- بررسی تاثیر ترکیبات جیبرلینی روی میزان باززایی و رشد طولی شاخه‌ها ۶۲
۳-۲-۶- بررسی تاثیر ترکیبات اکسینی روی ریشه‌زایی شاخه‌ها ۶۳
۳-۳- برقرار نمودن همزیستی اکتومیکوریزایی روی گیاهچه‌های کشت بافتی ۶۵
۳-۳-۱- تلقیح گیاهچه‌های *Quercus castaneifolia* توسط قارچ اکتومیکوریز ۶۵
۳-۳-۲- بررسی تاثیر همزیستی اکتومیکوریزایی روی خصوصیات فیزیولوژیکی و رویشی گیاهچه‌های *Quercus castaneifolia* ۶۶
۳-۴- تاثیر همزیستی اکتومیکوریزایی روی متابولیت‌ها و ترنسکریپت‌های ریشه گیاهچه‌های *Quercus castaneifolia* ۶۸
۳-۴-۱- شناسایی کیفی و کمی اسیدهای آمینه ریشه اکتومیکوریزایی گیاهچه‌های *Quercus castaneifolia* ۶۸
۳-۴-۲- شناسایی کیفی و کمی قندهای غالب ریشه اکتومیکوریزایی گیاهچه‌های *Quercus castaneifolia* ۷۰
۳-۴-۳- شناسایی کیفی و کمی اسیدهای چرب غالب ریشه اکتومیکوریزایی گیاهچه‌های *Quercus castaneifolia* ۷۱
۳-۴-۴- شناسایی ژن‌های القا شونده در ریشه اکتومیکوریزایی گیاهچه‌های *Quercus castaneifolia* ۷۳
۳-۴-۴-۱- استخراج RNA از ریشه گیاهچه‌های *Quercus castaneifolia* و میسلیوم قارچ *Hebeloma sinapizans* ۷۳
۳-۴-۴-۲- تیمار Total RNA با آنزیم *DNase*I ۷۵
۳-۴-۴-۳- سنتز cDNA ۷۶
۳-۴-۴-۳-۱- سنتز رشته اول cDNA ۷۶
۳-۴-۴-۳-۲- سنتز رشته دوم cDNA ۷۷
۳-۴-۴-۴- انجام تکنیک cDNA-AFLP ۷۸
۳-۴-۴-۴-۱- هضم cDNA ۷۸
۳-۴-۴-۴-۲- اتصال آداپتورها به قطعات حاصل از هضم ۷۸
۳-۴-۴-۴-۳- تکثیر پیش انتخابی ۷۹
۳-۴-۴-۴-۴- تکثیر انتخابی ۷۹
۳-۴-۴-۴-۵- الکتروفورز ژل اکریل‌آمید و رنگ‌آمیزی و ظهور ژل ۸۰

فصل ۴

نتایج و بحث ۸۵-۱۹۰

۴-۱- شناسایی گونه‌هایی از قارچ‌های اکتومیکوریز درختان بلوط در برخی جنگل‌های ایران ۸۵
۴-۱-۱- شناسایی قارچ‌های اکتومیکوریز همزیست با ریشه درختان بلوط ۸۵
۴-۱-۲- جداسازی و به روی محیط کشت آوردن قارچ‌های اکتومیکوریز و شناسایی آن‌ها ۱۲۰

۴-۲- بهینه‌سازی تکنیک کشت بافت *Quercus castaneifolia* در شرایط آزمایشگاهی ۱۲۲
۴-۲-۱- ضد عفونی و کشت ریزنمونه‌ها ۱۲۲
۴-۲-۲- بررسی تاثیر ترکیبات معدنی روی میزان باززایی شاخه‌ها ۱۲۳
۴-۲-۳- بررسی تاثیر ترکیبات سیتوکینینی روی میزان باززایی شاخه‌ها ۱۲۴
۴-۲-۴- بررسی تاثیر ترکیبات جیبرلینی روی میزان باززایی و رشد طولی شاخه‌ها ۱۲۵
۴-۲-۵- بررسی تاثیر ترکیبات اکسینی روی ریشه‌زایی شاخه‌ها ۱۲۶
۴-۳- برقرار نمودن همزیستی اکتومیکوریزایی در شرایط *in vitro* روی گیاهچه‌های کشت بافتی ۱۲۹
۴-۳-۱- تلقیح گیاهچه‌های *Quercus castaneifolia* توسط قارچ اکتومیکوریز ۱۲۹
۴-۳-۲- بررسی تاثیر همزیستی اکتومیکوریزایی روی خصوصیات فیزیولوژیکی و رویشی گیاهچه‌های *Quercus castaneifolia* ۱۳۱
۴-۴- تاثیر همزیستی اکتومیکوریزایی روی متابولیت‌ها و ترنسکریپت‌های ریشه گیاهچه‌های *Quercus castaneifolia* ۱۳۶
۴-۴-۱- شناسایی کیفی و کمی اسیدهای آمینه ریشه اکتومیکوریزایی گیاهچه‌های *Quercus castaneifolia* ۱۳۶
۴-۴-۲- شناسایی کیفی و کمی قندهای غالب ریشه اکتومیکوریزایی گیاهچه‌های *Quercus castaneifolia* ۱۴۳
۴-۴-۳- شناسایی کیفی و کمی اسیدهای چرب غالب ریشه اکتومیکوریزایی گیاهچه‌های *Quercus castaneifolia* ۱۴۷
۴-۴-۴- شناسایی ژن‌های القا شونده در ریشه اکتومیکوریزایی گیاهچه‌های *Quercus castaneifolia* ۱۵۵
۴-۴-۴-۱- استخراج RNA از ریشه گیاهچه‌های *Quercus castaneifolia* و میسلیوم قارچ *Hebeloma sinapizans* ۱۵۵
۴-۴-۴-۲- مقایسه ترنسکریپتومی میان ریشه‌های اکتومیکوریزایی و شاهد گیاهچه‌های *Quercus castaneifolia* ۱۵۶
۴-۴-۴-۲-۱- ژن‌های مرتبط با تغییر ساختار ریشه‌های اکتومیکوریزایی میزبان ۱۶۵
۴-۴-۴-۲-۲- ژن‌های مرتبط با تغییر مواد مترشحه ریشه‌های اکتومیکوریزایی میزبان ۱۷۱
۴-۴-۴-۲-۳- ژن‌های مرتبط با تبادلات غذایی در همزیستی اکتومیکوریزایی ۱۷۳
۴-۴-۴-۲-۴- ژن‌های مرتبط با وقایع شناسایی میان همزیست‌های اکتومیکوریزایی ۱۷۹
۴-۴-۴-۲-۵- ژن‌های مرتبط با سایر متابولیسم‌های دخیل در همزیستی اکتومیکوریزایی ۱۸۳
نتیجه‌گیری کلی ۱۹۱
پیشنهادها ۱۹۲
مراجع ۱۹۳-۲۲۸

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

شکل ۲-۱- توسعه تکاملی گیاهان آوندی به همراه شواهد فسیلی از انواع مختلف همزیستی..... ۱۰
شکل ۲-۲- همزیستی اکتومیکوریزایی در برش طولی و برش عرضی ریشه..... ۱۱
شکل ۲-۳- نواحی مورد مطالعه در شناسایی مولکولی قارچ‌ها..... ۱۵
شکل ۳-۱- موقعیت جنگل‌های شمال کشور و منطقه مورد مطالعه در این تحقیق..... ۵۱
شکل ۳-۲- جمع‌آوری نمونه‌هایی از خاک به همراه ریشه از ریزوسفر درختان بلوط..... ۵۳
شکل ۳-۳- تعدادی از مورفوتایپ‌های مشاهده شده تحت میکروسکوپ..... ۵۴
شکل ۳-۴- جداسازی ریزنمونه‌های *Quercus castaneifolia*، ضدعفونی و کشت آن‌ها در شرایط آزمایشگاه..... ۶۱
شکل ۳-۵- بازکشت شاخه‌های *Quercus castaneifolia* جهت انجام آزمون‌های آماری مربوط به باززایی..... ۶۲
شکل ۳-۶- بازکشت شاخه‌های *Quercus castaneifolia* جهت انجام آزمون‌های آماری مربوط به ریشه‌زایی..... ۶۳
شکل ۳-۷- انتقال گیاهچه‌های ریشه‌دار *Quercus castaneifolia* به گلخانه در مرحله سخت‌وارسازی..... ۶۴
شکل ۳-۸- روش‌های برقرارسازی همزیستی میان گیاهچه‌های *Quercus castaneifolia* و قارچ اکتومیکوریز *Hebeloma sinapizans*..... ۶۶
شکل ۳-۹- دستگاه کروماتوگرافی HPLC و GC مورد استفاده در این تحقیق..... ۷۲
شکل ۴-۱- محصول تکثیر ناحیه ITS از DNA قارچی استخراج شده از نوک‌ریشه اکتومیکوریزایی بلوط روی ژل آگاروز..... ۸۵
شکل ۴-۲- درخت فیلوژنی حاصل از آنالیز داده‌های مربوط به ناحیه ITS جنس *Amanita* به روش Bayesian..... ۹۱
شکل ۴-۳- درخت فیلوژنی حاصل از آنالیز داده‌های مربوط به ناحیه ITS جنس *Boletus* به روش Bayesian..... ۹۳
شکل ۴-۴- درخت فیلوژنی حاصل از آنالیز داده‌های مربوط به ناحیه ITS جنس *Cortinarius* به روش Bayesian... ۹۵
شکل ۴-۵- درخت فیلوژنی حاصل از آنالیز داده‌های مربوط به ناحیه ITS جنس *Hebeloma* به روش Bayesian..... ۹۸
شکل ۴-۶- درخت فیلوژنی حاصل از آنالیز داده‌های مربوط به ناحیه ITS جنس *Hydnum* به روش Bayesian..... ۹۹
شکل ۴-۷- درخت فیلوژنی حاصل از آنالیز داده‌های مربوط به ناحیه ITS جنس *Hygrophorus* به روش Bayesian..... ۱۰۲
شکل ۴-۸- درخت فیلوژنی حاصل از آنالیز داده‌های مربوط به ناحیه ITS جنس *Inocybe* به روش Bayesian..... ۱۰۴
شکل ۴-۹- درخت فیلوژنی حاصل از آنالیز داده‌های مربوط به ناحیه ITS جنس *Laccaria* به روش Bayesian..... ۱۰۶
شکل ۴-۱۰- درخت فیلوژنی حاصل از آنالیز داده‌های مربوط به ناحیه ITS جنس *Lactarius* به روش Bayesian.. ۱۰۸
شکل ۴-۱۱- درخت فیلوژنی حاصل از آنالیز داده‌های مربوط به ناحیه ITS جنس *Lycoperdon* به روش Bayesian..... ۱۱۰
شکل ۴-۱۲- درخت فیلوژنی حاصل از آنالیز داده¬های مربوط به ناحیه ITS جنس *Russula* به روش Bayesian.. ۱۱۲
شکل ۴-۱۳- درخت فیلوژنی حاصل از آنالیز داده¬های مربوط به ناحیه ITS جنس *Scleroderma* به روش Bayesian..... ۱۱۴

شکل ۴-۱۴- درخت فیلوژنی حاصل از آنالیز داده¬های مربوط به ناحیه ITS جنس *Tricholoma* به روش Bayesian ۱۱۶
شکل ۴-۱۵– اسپوروکارپ و میسلیوم جداسازی شده از قارچ اکتومیکوریز مرتبط با *Tricholoma* sp. ۱۲۱
شکل ۴-۱۶- مراحل مختلف ریزازدیادی بلوط *Quercus castaneifolia* ۱۲۷
شکل ۴-۱۷- همزیستی میان گیاهچه‌های *Quercus castaneifolia* و قارچ اکتومیکوریز *Hebeloma sinapizans* .. ۱۳۰
شکل ۴-۱۸- گیاهچه‌های *Quercus castaneifolia* شاهد و تلقیح شده با قارچ اکتومیکوریز *Hebeloma sinapizans* ۱۳۳
شکل ۴-۱۹- نتایج مقایسه میانگین‌های اسیدهای آمینه میسلیوم مستقل قارچ اکتومیکوریز *Hebeloma sinapizans*، ریشه مستقل و ریشه همزیست گیاهچه *Quercus castaneifolia* توسط آزمون دانکن ۱۳۹
شکل ۴-۲۰- نتایج مقایسه میانگین‌های قندهای میسلیوم مستقل قارچ اکتومیکوریز *Hebeloma sinapizans*، ریشه مستقل و ریشه همزیست گیاهچه *Quercus castaneifolia* توسط آزمون دانکن ۱۴۵
شکل ۴-۲۱- نتایج مقایسه میانگین‌های اسیدهای چرب میسلیوم مستقل قارچ اکتومیکوریز *Hebeloma sinapizans*، ریشه مستقل و ریشه همزیست گیاهچه *Quercus castaneifolia* توسط آزمون دانکن ۱۴۹
شکل ۴-۲۲- الکتروفورز نمونه‌های RNA استخراج شده روی ژل آگارز ۱/۲ درصد ۱۵۶
شکل ۴-۲۳- ژل اکریل آمید نمونه‌های cDNA میسلیوم مستقل قارچ اکتومیکوریز *Hebeloma sinapizans*، ریشه مستقل و ریشه همزیست گیاهچه *Quercus castaneifolia* در روش cDNA-AFLP ۱۵۸
شکل ۴-۲۴- الکتروفورز تعدادی از قطعات مشتق از رونوشت جداسازی شده از ژل اکریل آمید پس از تکثیر، روی ژل آگارز ۲ درصد ۱۶۱

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول ۳- ۱- تیمارهای سیتوکینینی مختلف جهت بهینه‌سازی شاخه‌زایی *Quercus castaneifolia*..... ۶۲
جدول ۳- ۲- تیمارهای مختلف سیتوکینینی و جیبرلینی جهت بهینه‌سازی شاخه‌زایی *Quercus castaneifolia*..... ۶۳
جدول ۳- ۳- تیمارهای هورمونی جهت بهینه‌سازی ریشه‌زایی *Quercus castaneifolia*..... ۶۳
جدول ۳- ۴- منحنی‌های کالیبراسیون خطی برای محاسبه غلظت اسیدهای آمینه بر اساس رسم منحنی استاندارد خارجی..... ۶۹
جدول ۳- ۵- منحنی‌های کالیبراسیون خطی برای محاسبه غلظت قندها بر اساس رسم منحنی استاندارد خارجی..... ۷۱
جدول ۴- ۱– نتایج شناسایی مولکولی قارچ‌های اکتومیکوریز همراه ریشه‌های بلوط..... ۸۶
جدول ۴- ۲- تیمارهای مختلف سترون‌سازی جهت ضدعفونی ریزنمونه‌های *Quercus castaneifolia*..... ۱۲۲
جدول ۴- ۳- بررسی تاثیر محیط‌های کشت مختلف روی میزان باززایی شاخه‌های *Quercus castaneifolia*..... ۱۲۳
جدول ۴- ۴- بررسی تاثیر ترکیبات سیتوکینینی مختلف روی میزان باززایی شاخه‌های *Quercus castaneifolia*... ۱۲۴
جدول ۴- ۵- مقایسه میانگین‌های عوامل رشد و ازدیاد شاخه *Quercus castaneifolia* تحت تاثیر ترکیبات سیتوکینینی مختلف..... ۱۲۴
جدول ۴- ۶- تاثیر تیمارهای BAP (6-Benzylaminopurine) و GA (Gibberellic acid) روی رشد و باززایی شاخه‌های *Quercus castaneifolia*..... ۱۲۵
جدول ۴- ۷- مقایسه میانگین‌های عوامل تولید و رشد ریشه در *Quercus castaneifolia* تحت تاثیر ترکیبات اکسینی مختلف..... ۱۲۷
جدول ۴- ۸- تاثیر قارچ اکتومیکوریز *Hebeloma sinapizans* روی خصوصیات فیزیولوژیکی و رویشی گیاهچه‌های *Quercus castaneifolia*..... ۱۳۱
جدول ۴- ۹- نتایج تجزیه واریانس محتوای اسید آمینه میسلیوم مستقل قارچ اکتومیکوریز *Hebeloma sinapizans*، ریشه مستقل و ریشه همزیست گیاهچه *Quercus castaneifolia*..... ۱۳۸
جدول ۴- ۱۰- نتایج تجزیه واریانس محتوای قندهای میسلیوم مستقل قارچ اکتومیکوریز *Hebeloma sinapizans*، ریشه مستقل و ریشه همزیست گیاهچه *Quercus castaneifolia*..... ۱۴۴
جدول ۴- ۱۱- نتایج تجزیه واریانس محتوای اسید چرب میسلیوم مستقل قارچ اکتومیکوریز *Hebeloma sinapizans*، ریشه مستقل و ریشه همزیست گیاهچه *Quercus castaneifolia*..... ۱۴۸
جدول ۴- ۱۲- قطعات مشتق از رونوشت افزایش بیان یافته در بافت همزیست *Quercus castaneifolia /Hebeloma sinapizans* و عملکرد آن‌ها..... ۱۶۱

فصل ۱

مقدمه و اهداف

تعامل میکوریزایی، رابطه همزیستی برقرار شده میان ریشه‌های گیاهان آوندی و گروه ویژه‌ای از قارچ‌های خاک است. این رابطه همزیستی، پدیده‌ای بسیار گسترده است که در بیش از ۸۰ درصد از گونه‌های گیاهی زمینی رخ می‌دهد و در راستای سازگارسازی گیاهان با اکوسیستم‌های خشکی، بهینه‌سازی تغذیه گیاه و کیفیت خاک تکامل یافته است (Smith & Read 2008). براساس مطالعات صورت گرفته، عملکرد همزیستی میکوریزایی از دیرباز براساس تاثیر آن روی گیاهان میزبان به سه گروه تقسیم شده است: اول اینکه قارچ‌های اکتومیکوریز املاح معدنی را در اختیار ریشه گیاهان همزیست قرار می‌دهند (کودهای بیولوژیک)، این قارچ‌ها موجب افزایش رشد و توسعه گیاهان می‌شوند (تنظیم‌کنندگان بیولوژیک) و نهایتاً اینکه این قارچ‌ها گیاهان میزبان خود را قادر به رقابت بیشتر و غلبه بر استرس‌های زنده و غیر زنده می‌سازند (حفاظت کنندگان بیولوژیک) (Smith & Read 1997).

همزیستی اکتومیکوریزایی، نوع گسترده‌ای از این همزیستی است که میان برخی قارچ‌های بازیدیومیست و آسکومیست، مانند ترافل‌ها، بولیت‌ها، آمانیتاها و کانترل‌ها، و ریشه‌های گونه‌های مهم و غالب درختیِ جنگل‌های معتدله (Temperate)، مدیترانه‌ای (Mediterranean) و نیمه‌گرمسیری (Subtropical)، مانند بلوط، کاج، صنوبر و غان شکل می‌گیرد (Smith & Read 1997; Read & Perez-Moreno 2003) و نقش مهمی در استقرار، عملکـرد و تکامل این گیاهان در اکوسیستم‌هـای جنگلی ایفا می‌کند. اگرچه تنها تعداد کمی از گونه‌های گیاهی قادر به برقراری همزیستی اکتومیکوریزایی هستند، اما غالبیت آن‌ها در اکوسیستم‌های جنگلی و نیز ارزش اقتصادی بالای آن‌ها، این همزیستی را در مرکز توجه و اهمیت قرار داده است (Read & Perez-Moreno 2003). از این‌رو مطالعه همزیستی اکتومیکوریزایی از موضوعات بسیار پایه‌ای و مفید است؛ زیرا نه تنها موجب پاسخ دادن به سوالاتی که در مورد تکامل هم‌زمان بین قارچ‌ها و گیاهان وجود دارد می‌گردد، بلکه ابهاماتی که در مورد اهمیت اکولوژیکی همزیستی میکوریزایی در کشاورزی و جنگل‌داری پایدار وجود دارد را نیز مرتفع می‌کند (Seddas *et al.* 2009).

در این رابطه همزیستی، هیف‌های منشعب و پیش‌رونده قارچ خاکی پس از مواجه با نوک ریشه میزبانِ مناسب، غلافی را در اطراف ریشه‌های کوتاه میزبان ایجاد نموده، در میان آپوپلاست سلول‌های اپیدرمی و گاهاً کورتکسی ریشه برای تبادلات غذایی انشعاب یافته و از ریشه‌های میزبان، میسلیوم خارج‌ریشه‌ای را توسعه می‌دهد که درون خاک گسترش یافته و شبکه هیفی عظیمی که برای دریافت آب و عناصر غذایی اختصاصیت دارد را تشکیل می‌دهد؛ بدین ترتیب موجب افزایش چشمگیر سطح جذب ریشه می‌گردد (Read & Perez-Moreno 2003). تخمین زده شده که بیش از یک‌سوم کربن هضم شده توسط گونه‌های درختی اکتومیکوریزایی به سوی قارچ همزیست آن‌ها ارسال می‌گردد (Nehls *et al.* 2007)؛ درحالی‌که حدود ۷۰ درصد از عناصر غذایی مهم و مورد نیاز درخت (از جمله نیتروژن و فسفر) از طریق قارچ‌های اکتومیکوریز کلونیزه کننده ریشه‌ها جذب و به میزبان منتقل می‌گردد (Martin & Tunlid 2009). این همراهی همزیست‌وارِ ۱۲۰ میلیون ساله (Brundrett 2002)، به میزبانان درختی این توانایی را می‌دهد که در شرایط نامساعد محیطی از جمله پایین بودن سطح عناصر غذایی در خاک، به طور کارآمدتری رشد کنند (Read & Perez-Moreno 2003). به علاوه، همزیستی اکتومیکوریزایی در بهبود سلامت گیاه از طریق محافظت از آن در برابر تنش‌های زنده (حمله بیمارگرها) و غیرزنده (خشکی، شوری و فلزات سنگین) و بهبود ساختار خاک از طریق افزایش اجتماع ذرات خاکی شرکت دارد (Barea *et al.* 2011).

شناسایی گونه‌های قارچ‌های برقرار کننده همزیستی اکتومیکوریزایی، گام نخست تمام مطالعاتیست که به بررسی جنبه‌های مختلف این همزیستی می‌پردازند و برای بهره‌برداری از حداکثر پتانسیل آن در مدیریت جنگل امری ضروریست. گونه‌های بلوط (*Quercus*) که از میزبانان مهمِ قارچ‌های اکتومیکوریز هستند (Smith & Read 2008)؛ مهمترین و فراوانترین درختان پهن‌برگ اکوسیستم‌های جنگلی ایران نیز بوده (پناهی ۱۳۹۰) و به عنوان گیاهانی بسیار ارزشمند و قابل بهره‌وری در انواع بخشهای صنعتی از قبیل صنایع چوب، کاغذسازی، شیمی، رنگسازی و داروسازی در ایران و نقاط مختلف دنیا مطرح می‌باشند (فتاحی ۱۳۷۳؛ پناهی ۱۳۹۰). این در حالیست که در ایران تاکنون مطالعات چندانی روی همزیستی اکتومیکوریزایی و شناسایی شریک‌های قارچی این همزیستی صورت نگرفته است.

هدف اول این تحقیق براساس شناسایی برخی قارچ‌های اکتومیکوریزِ همراه درختان بلوط جنگل‌های شمال کشور (که به جنگل‌های خزری یا هیرکانی موسومند) طراحی و اجرا شد و نتیجه آن معرفی تاکسون‌های مختلفی از قارچ‌های اکتومیکوریز متعلق به جنس‌های مختلف از گونه‌های بلوط جنگل‌های هیرکانی (شامل سه گونه *Q. castaneifolia* C.A.Mey.، *Q. macranthera* Fisch. & C.A.Mey. و *Q. petraea* L.) بود.

از سوی دیگر تولید نهال‌های با همزیستی اکتومیکوریزاییِ توسعه یافته استراتژی نویدبخشی برای کاستن از شوک ابتدایی انتقال نهال به عرصه و افزایش بقا و رشد نهال‌ها در طی اولین سال نهال‌کاری، که مهمترین فاز استقرار نهال است، می‌باشد. تلقیح میکوریزایی نه تنها می‌تواند به عنوان بهبود دهنده رشد نهال‌ها عمل نماید، بلکه قادر است وضعیت فیزیولوژیکی آن‌ها را از طریق افزایش پتانسیل فتوسنتز و افزایش

برداشت آب و عناصر غذایی و انتقال آن‌ها به بافت‌های نهال بهینه نماید (Dominguez Nunez *et al.* 2006). همچنین، در حال حاضر حدود یک‌سوم از اراضی زمین بدلیل خشک بودن شدید برای رشد گیاهان و تولیدات آن‌ها مناسب نیستند و نیز پیش‌بینی می‌شود گرم شدن همه‌گیر زمین گسترش خشکی را افزایش خواهد داد (Schar *et al.* 2004; Allan *et al.* 2010)؛ در این شرایط افزایش مرگ و میر درختان ناشی از گرما و خشکی در اکوسیستم‌های جنگلی، نظیر آنچه در جنگل‌های بلوط زاگرس در حال وقوع است (فتاحی ۱۳۷۳)، دور از انتظار نخواهد بود. از اینرو، تلاش برای یافتن استراتژی‌های سازگارسازی با تغییرات کلیمایی که می‌تواند بقا و رشد درختان را در اکوسیستم‌های تخریب شده بهبود بخشیده و موجب جنگل‌کاری‌های سریع این نواحی و احیاء آن‌ها گردد؛ در سراسر جهان در حال انجام است. از جمله راهکارهای تخفیف اثرات تغییرات فراگیر کلیمایی می‌تواند تا حدودی از طریق ریزش کربن در خاک (یعنی افزایش فروبرندگی کربن در اکوسیستم‌های خشکی) به دست آید. در این زمینه نیز همزیستی میکوریزایی می‌تواند نقش مهمی را در ریزش کربن به خاک ایفا کند؛ چراکه بخش اساسی از محصول هضم کربن توسط گیاهان میکوریزایی به درون خاک، یعنی محل حضور بیومس شریک قارچی ارسال می‌شود (Sebastiana *et al.* 2013).

بلوط بلندمازو (*Q. castaneifolia*) از گونه‌ها درختی مهم در شمال ایران است و پراکنش وسیعی در جنگل‌های هیرکانی دارد (ثابتی ۱۳۴۶، ۱۳۵۵؛ پناهی ۱۳۹۰)؛ همچنین این گونه در صنایع مختلف کاربردهای فراوانی داشته (میرکاظمی ۱۳۸۰) و با توجه به اهمیت اکولوژیکی و نیز ارزش بالای اقتصادی و زیست محیطی آن لازم است در کنار احیاء مناطق مخروبه، به افزایش کیفی نهال‌های مورد استفاده در این مناطق نیز توجه گردد. برقراری همزیستی اکتومیکوریزایی در این گیاه از مهمترین راهکارها برای بهینه‌سازی رشد و افزایش مقاومت آن‌ها به تنش‌های مختلف محیطی می‌باشد. در بسیاری از نواحی جهان، عدم موفقیت در جنگل‌کاری‌ها و نیز کاهش تکثیر و زادآوری در جنگل، منسوب به عدم حضور قارچ اکتومیکوریز مناسب شده است (Marx *et al.* 2002). قابل تامل آنکه در جنگل‌های تخریب شده، عدم حضور میزبانان گیاهی به مدت طولانی موجب زوال در تراکم پروپاگول‌های قارچی شده و بدین ترتیب جمعیت قارچ‌های اکتومیکوریز را متاثر می‌سازد؛ که این پدیده در نهایت منجر به کاهش نرخ کلونیزاسیون و نیز غنای گونه‌ای می‌شود (Ding *et al.* 2011). مطالعات نشان داده‌اند که تلقیح گونه‌های مختلف جنس بلوط با قارچ‌های اکتومیکوریز توانسته است تاثیر مثبتی در رشد گیاه و پاسخ‌های فیزیولوژیکی آن داشته باشد؛ بدین ترتیب که گیاهان اکتومیکوریزایی رشد، تثبیت کربن، دریافت عناصر غذایی و وضعیت آبی بسیار بهتری نسبت به گیاهان شاهد داشته‌اند (Dominguez Nunez *et al.* 2006, 2008; Southworth *et al.* 2009). هرچند، در برخی گونه‌های بلوط نیز مشخص شده تلقیح میکوریزایی تاثیری روی بیومس گیاه، هضم کربن و یا راندمان استفاده از آب نداشته است (Fini *et al.* 2011). علیرغم درک اهمیت درختان بلوط، تاکنون هیچ مطالعه‌ای در خصوص تاثیر (مثبت یا منفی) تلقیح میکوریزایی کنترل شده روی رشد و فیزیولوژی گیاهان بلوط ایران صورت نگرفته است.

در گام بعدی این تحقیق، همزیستی اکتومیکوریزایی روی گیاهچه‌های کشت‌بافتی بلوط بلندمازو (که پروتوکل تکثیر کشت بافتی آن برای نخستین بار در این تحقیق ارائه شد) برای اولین بار در کشور و نیز در دنیا مستقر شده و میزان سودمندی این تعامل در رشد، نمو و وضعیت فیزیولوژیکی میزبان از طریق ارائه نتایج حاصل از آنالیز پارامترهای ساختاری و فیزیولوژیکی متعدد در مقایسه با گیاهچه‌های شاهد گزارش شد. نتایج این تحقیق علاوه بر ارائه راهکارهای نوین در راستای برنامه‌ریزی صحیح برای حفاظت و احیاء این ذخیره ژنتیکی ارزشمند جنگل‌های هیرکانی؛ می‌تواند تحولی اساسی در مدیریت جنگل‌داری کشور با اندیشه‌ای نو مبتنی بر حفاظت اصولی از گونه‌های مهم گیاهی ایجاد نموده و کاربرد فراوانی در برنامه‌های احیایی مناطق خشک و نیمه‌خشک داشته باشد.

تشکیل، توسعه و عملکرد همزیستی اکتومیکوریزایی فرآیندی بسیار تنظیم شده است که دربرگیرنده تغییرات مرفولوژیکی و فیزیولوژیکی متعددی در گیاه از جمله تحریک توسعه ریشه‌های جانبی (Felten *et al.* 2009)، افزایش برخی اندامک‌ها و نیز حجم سلول‌های ریشه‌ای (Luo *et al.* 2009a)، توقف تشکیل ریشه‌های مویین میزبان (Ragnelli *et al.* 2013) و افزایش راندمان فتوسنتز گیاهی (Nehls *et al.* 2007) و از سوی دیگر تغییراتی در قارچ مانند تقسیمات هیفی، تغییر شکل سلولی، بازآرایی هیف‌ها و مرگ سلولی (Martin & Tunlid 2009) می‌باشد. یکی از راهکارهای شناسایی اساسِ فیزیولوژیکِ شکل‌گیری و عملکرد این همزیستی، بررسی پروسه‌ها یا فاکتورهایی است که احتمالاً در فرآیند تشخیص میان همزیست‌ها و نیز در عملکرد همزیستی مذکور دخیلند (Arlt *et al.* 2009). چراکه کلونیزه شدن موفقیت‌آمیز ریشه‌های میزبان توسط قارچ‌های اکتومیکوریز و تاثیرات میکروبی بعدی آن‌ها روی پروسه‌های گیاهی، به فرآیندهای تشخیصی بستگی دارد، که از برنامه‌های ژنتیکی هماهنگِ هر دو همزیست منتج می‌شوند و باید در هر مرحله از تعامل، این برنامه‌ها بین شرکاء برانگیخته شوند تا متابولیت‌های دخیل در سیگنال‌دهی و تشخیص دو جانبه‌ی شرکاء و سپس متابولیتهای دخیل در عملکرد میکوریزایی، تولید شوند (Seddas *et al.* 2009).

اگرچه فواید همزیستی اکتومیکوریزایی برای شریک گیاهی و نیز قارچی به خوبی توصیف و تشریح شده است (Smith & Read 2008)؛ اما اطلاعات ما در مورد برنامه‌های ژنتیکی منتج به تشخیص میان قارچ و گیاه میزبان، شکل‌گیری همزیستی اکتومیکوریزایی و حفظ تعاملات و فصلِ مشترک‌های این همزیستی، هنوز در مراحل ابتدایی خود به سر می‌برد، و دلیل این مسئله عمدتاً به پیچیدگی‌های وقایعی بازمی‌گردد که به طور هم‌زمان در همزیست‌های میکوریزایی (یعنی شرکاء قارچی و گیاهی) اتفاق می‌افتد (Seddas *et al.* 2009). در سال‌های اخیر بکارگیری تکنیک‌های بیولوژیکی جدید در سطح مولکولی و سلولی موجب شده است که مطالعات روی همزیستی میکوریزایی گسترش روز افزونی بیابد (Bucher *et al.* 2009; Nehls 2008). همچنین توسعه کاربرد تکنولوژی‌ها در مطالعه ترنسکریپتوم‌های گیاهی، به ویژه تکنولوژی ریزآرایه‌های DNA و توالی‌یابی ESTها، منجر به شناسایی ژن‌های قارچی و گیاهی دخیل در همزیستی اکتومیکوریزایی در مورد چندین ترکیب میزبان-قارچ شده است (Johansson *et al.* 2004a; Duplessis *et al.* 2005; Le Quere *et al.* 2005; Heller *et al.* 2008; Luo *et al.* 2009a; Flores-Monterroso

et al. 2013; Sebastiana *et al.* 2014). این پروفایل‌های بیانی آشکار کننده عملکردهای سلولی متعددی بوده‌اند که تحت همزیستی اکتومیکوریز در شرکاء تنظیم می‌گردد. به طور مثال در شریک گیاهی آنالیزهای ترنسکریپتوم نشان دهنده افزایش متابولیسم سلولی گیاه، القاء پاسخ‌های گیاهی مرتبط با تنش‌های زنده و غیرزنده، افزایش گسستگی دیواره سلولی، افزایش انتقال نیتروژن در ریشه‌ها و راندمان فتوسنتز در شاخ و برگ بوده است (Luo *et al.* 2009a). جالب اینکه مشخص شده است برنامه‌های متابولیکی و انتوژنتیکی منتج به توسعه همزیستی عمدتاً محصول بیانِ متمایز مسیرهای ژنتیکی از پیش موجود است، نه بیان شبکه ژنی مختص به همزیستی. آشکارسازی ماشین مولکولی که منجر به شناسایی میان شرکاء و پذیرفتن و سپس استقرار همزیستی اکتومیکوریزایی کارآمد می‌شود، گامی ضروری در درک فراگیر این برهمکنش همزیستی است (Martin & Tunlid 2009). آنالیز ترنسکریپتومی گسترده روی سایر ترکیب‌های قارچ‌های اکتومیکوریز و گیاهان میزبان آن‌ها، از طریق یافتن شبکه‌های ژنی مشترک، موجب شناسایی دقیق‌تر نقاط ژنتیکیِ کلیدیِ تنظیم‌کننده همزیستی، درک افزون‌تر پدیده‌های مولکولی واقع در بافت‌های همزیست و توصیف بهتر نقش هریک از شرکاء و عملکرد اکوسیستمی آن‌ها در برهمکنش همزیستی می‌گردد.

اگرچه ریزآرایه‌های DNA یک ابزار جدید و استاندارد برای بررسی بیانی وسیع ژنوم هستند اما کاربرد آن‌ها محدود به موجوداتی می‌باشد که توالی کامل ژنوم آن‌ها و یا مجموعه بزرگی از توالی رونوشت‌های شناخته شده از آن‌ها در دسترس باشد (Vuylsteke *et al.* 2007). استفاده از تکنیک cDNA-AFLP امکان مطالعه ژنومی عملکردی برای مشاهده تفاوت بیان ژن‌ها را در ارگانیسم‌های غیرمدل که، برخلاف گونه‌های قارچی اکتومیکوریز مدل *Laccaria bicolor* و *Tuber melanosporum* (Martin *et al.* 2008, 2010) و گیاه درختی مدل *Populus trichocarpa* (Tuskan *et al.* 2006)، ژنوم آن‌ها به طور کامل تعیین توالی نشده و آرایه‌های ژنومی آن‌ها در دسترس نیست را فراهم می‌سازد. از مزایای دیگر این تکنیک نسبت به ریزآرایه‌ها، مقادیر نسبتاً کم ماده شروع کننده و حساسیت زیاد آن می‌باشد که نمایش بیان ژن‌هایی با تشابه زیاد (نظیر اعضای خانواده‌های ژنی) و نیز تکثیر رونوشت‌های کمیاب را امکان‌پذیر می‌کند (Vuylsteke *et al.* 2007). در این راستا، تحقیق حاضر ارائه کننده نتایج حاصل از آنالیز ترنسکریپتومی بافت اکتومیکوریزایی ریشه‌های بلوط بلندمازو با استفاده از تکنیک cDNA-AFLP است.

از سوی دیگر، آنالیز محتوای کل (یا بخشی از) متابولیت‌های یک مایع زیستی (Biofluid)، کشت سلولی و یا نمونه بافتی موجودات برای درک فرآیندهای سلولی، در حال حاضر علاقه زیادی را در محققان ایجاد کرده است؛ چراکه وضعیت خزانه متابولیتی موجود در واقع بیانگر وضعیت فیزیولوژیکی آن موجود است و متضمن بقا، رشد و کارکرد صحیح آن می‌باشد (Hall 2006). هر تغییر در شرایط رشدی و یا محیط طبیعی گیاه (از جمله برقراری همزیستی اکتومیکوریزایی که تظاهر آن افزایش رشد، نمو و پایداری گیاه است) منجر به تغییر در هم‌ایستایی (Homeostasis) متابولیک گیاه می‌شود. این تغییرات رشدی نیازمند تنظیم مجدد مسیرهای متابولیکی است، با این هدف که وضعیت جدیدی از هم‌ایستایی در گیاه ایجاد شود که این فرآیند گیاهی را سازش نیز می‌نامند (Mittler 2006). بنظر می‌رسد چندین فاز مختلف در فرآیند