

بررسی تأثیر عامل‌های مؤثر در میزان تشکیل پروتوپلاست در قارچ *Fusarium oxysporum* با هدف استفاده در امتزاج پروتوپلاست

افشین رستمی^۱ و حسین صارمی^{۲*}

۱. دانشجوی دکتری، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان
۲. استاد، گروه گیاه‌پزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۶/۲۶ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۲/۱۸)

چکیده

امتزاج پروتوپلاست یکی از سیستم‌های تراریختی مؤثر در ایجاد تغییرهای ژنتیکی به منظور بهبود عملکرد میکروارگانیسم (ریزجانداران) است که امروزه در جهت رسیدن به یک عامل بیوکنترل (مهار زیستی) موفق در کنترل علف‌هرزهای مختلف استفاده می‌شود. در روش‌های معمول تراریختی قارچ‌های رشته‌ای مانند گونه‌های فوزاریوم، تهیه پروتوپلاست نخستین گام است. در این پژوهش، پس از جداسازی قارچ *Fusarium oxysporum* (عامل پژمردگی آوندی) از گیاه گل‌جالیز *Orobancha* sp.، بررسی‌های لازم برای شناسایی ریخت‌شناسی و مولکولی آن انجام شد. سپس تأثیر عامل‌های مختلف مانند تأثیر نوع محیط کشت در مقدار اسپور تولید شده، بهترین زمان برای جوانه‌زنی بیشینه‌ای اسپورها، غلظت‌های مختلف آنزیم‌های تجزیه‌کننده دیواره سلولی، زمان در معرض قرارگیری با آنزیم در تعداد پروتوپلاست‌های تولیدشده و نیز نوع و غلظت تثبیت‌کننده اسمزی در ایجاد و میزان زنده‌مانی پروتوپلاست‌ها ارزیابی شد. نتایج به‌دست‌آمده از تجزیه آماری داده‌ها، محیط Spezieller Nährstoffarmer Agar بهترین محیط کشت و زمان ۱۶ ساعت را بهترین زمان برای ایجاد و جوانه‌زنی اسپورها معرفی کرد. همچنین ترکیب آنزیمی Glucanex (۱۵ Mm) و Driselase (۲۰ Mm) در زمان پنج ساعت با فاصله معنی‌داری از دیگر تیمارها بیشترین پروتوپلاست را تولید کرده و تثبیت‌کننده KCl (۰/۶ مولار) نیز به عنوان بهترین تثبیت‌کننده معرفی شد.

واژه‌های کلیدی: بهینه‌سازی، پروتوپلاست، تثبیت‌کننده اسمزی، *Fusarium oxysporum*.

Analysis of the effect of effective factors in protoplast preparation of *Fusarium oxysporum* for using in protoplast fusion

Afshin Rostami¹ and Hossein Saremi^{2*}

1. Ph. D. Candidate, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran
2. Professor, Department of Plant Protection, College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
(Received: Sep. 17, 2017 - Accepted: Mar. 9, 2018)

ABSTRACT

Protoplast fusion as a transgenic system is an effective technique improving microorganism performances by making genetic changes. Today, exploitation of this technique has been beneficial in biocontrol of weeds. For filamentous fungi such as *Fusarium* species, protoplast preparation is the first step in the common genetic transformation process. For this objective, the *Fusarium oxysporum* isolates were isolated from Bromrape (*Orobancha* sp.) and were identified by morphological and molecular characteristics. Thereafter, the effects of various factors including medium and incubation time in spore preparation were evaluated. Furthermore, the effect of some factors on protoplast preparation and longevity including enzyme concentrations, type and concentration of osmotic stabilizers and lytic incubation times were also assessed. The results of this study demonstrated that Spezieller Nährstoffarmer Agar was the best medium to prepare spores and the best incubation time for spore germination was 16 hours. In addition, concentrations of 15mM for Glucanex and 20mM for Driselase and 5 hours incubation time were the best lytic enzyme complex and incubation time period, respectively. The KCl at the concentration of 0.6M was the best osmotic stabilizer in protoplast preparation and longevity.

Keywords: *Fusarium oxysporum*, Optimization, Osmotic stabilizer, Protoplast.

* Corresponding author E-mail: Hsn.saremi@ut.ac.ir

مقدمه

قارچ بیماری‌گر *F. oxysporum* یک گونه مرکب از جنس *Fusarium* با دامنه میزبانی گسترده‌ای است که بیش از ۱۰۰ گونه گیاهی را آلوده می‌کند (Michielse & Rep, 2009). هرچند که سویه‌هایی از آن، تنها قادر به آلوده‌سازی یک یا تعداد معدودی از گیاهان هستند. این استرین (سویه)‌های دارای تخصص یافتگی میزبانی، به عنوان شکل ویژه یا *forma specialis* (f. sp.) معرفی می‌شوند. بیش از ۱۲۰ شکل تخصص یافته در این گونه قارچی گزارش شده‌اند (Agrios, 2005; Ortu et al., 2013) که تخصص یافتگی میزبانی آن‌ها در سطح برهمکنش میزبان-بیمارگر و نیز در سطح مولکولی بررسی شده است (Schenk & Bergman, 1969; Lievens et al., 2008; Michielse & Rep, 2009). همچنین می‌توان از شکل ویژه هر جدایه به‌دست‌آمده از علف هرز در جهت کنترل بیولوژیک آن نیز استفاده کرد. نشانه‌های اولیه پژمردگی ناشی از این گونه قارچی، شامل روشن شدن رگبرگ‌ها و روخمشگی برگ‌ها است که به دنبال آن نشانه‌هایی مانند کوتاهی، زرد شدن برگ‌های پایینی، پژمردگی تدریجی برگ‌ها و ساقه و در نهایت مرگ گیاه، دیده می‌شود (Di Pietro et al., 2003).

تغییر ژنتیکی در قارچ‌ها در طبیعت ضمن تولیدمثل جنسی یا با فرایندهای غیرجنسی مختلف مانند جهش و نوترکیبی شبه جنسی صورت می‌گیرد، ولی در آزمایشگاه برای ایجاد سوش‌های بهبودیافته و کارا روش‌های مختلفی از جمله امتزاج پروتوپلاست (Protoplast fusion) استفاده می‌شود. به‌طورکلی امتزاج پروتوپلاست یک ابزار مهم برای بهینه‌سازی سوش‌ها به‌صورت ایجاد نوترکیب‌های ژنتیکی و توسعه سوش‌های امتزاج‌یافته در قارچ‌های رشته‌ای است. رشد سریع‌تر و تولید بیشتر متابولیت‌های مختلف در قارچ‌ها، از طریق امتزاج پروتوپلاست در امتزاج‌یافته‌های حاصل مشاهده شده است. همچنین از فناوری امتزاج پروتوپلاست، می‌توان برای پیوند هیف (ریسه)‌های دو گونه یا حتی دو جنس در قارچ‌ها که به‌طور طبیعی توانایی پیوند ندارند، از جمله قارچ‌های میتوسپوریک و سوش‌های ناسازگار و تیپ (جور)‌های آمیزشی متفاوت

استفاده کرد. لازمه انجام این فناوری برای تولید سویه‌های کارآمدتر، ایجاد پروتوپلاست با کارایی بالا است. پروتوپلاست شامل همه اندامک‌های درون سلولی است و یک رابط زنده برای انتقال ریزمولکول‌ها میان اندامک‌های سیتوپلاسمی است. با توجه به اهمیت قارچ‌های بیماری‌گر و همچنین قارچ‌های عامل بیوکنترل، فناوری امتزاج پروتوپلاست فناوری ساده و ارزانی برای ارزیابی استرین‌های قارچ و ایجاد استرین‌های جدید و کارا است (Scheng-Ming & Li, 1994).

دیواره سلولی قارچ‌ها از ترکیبات مختلفی تشکیل شده است که ترکیبات پروتئینی یکی از آنهاست. این ترکیبات پروتئینی در اعمال مختلف قارچ مانند تکثیر (افزودن) غیرجنسی آن دخیل هستند (Parry et al., 2009). کیتین نیز یکی از مهم‌ترین مواد تشکیل‌دهنده دیواره بوده که نقش‌های مختلفی در فرایندهای مربوط به رشد و نگهداری میسلیموم‌ها دارد. به‌منظور ایجاد پروتوپلاست قارچ‌ها، استفاده از آنزیم‌های تجزیه‌کننده مواد تشکیل‌دهنده دیواره سلولی لازم و ضروری است، از جمله این آنزیم‌ها می‌توان به کیتیناز، سلولاز، لامیناریاز و پروتئاز اشاره کرد (Adams, 2004; Kim et al., 2009).

با توجه به نتایج بررسی‌های انجام‌شده روی گونه‌های مختلف قارچی کنترل‌کننده گل جالیز، با توجه به محدود بودن دامنه میزبانی جدایه‌های *Fusarium oxysporum*، این قارچ می‌تواند یکی از بهترین نامزدهای عامل‌های بیولوژیکی برای مهار این علف هرز باشد. همچنین می‌توان از قارچ‌های مختلف و برتر که خاصیت بیماری‌زایی بیشتر و در نتیجه مهار بهتر گل جالیز دارند، برای امتزاج پروتوپلاست با جدایه فوزاریوم اختصاصی گل جالیز، به امتزاج‌یافته‌ای با توان بیماری‌زایی بالا، ضمن حفظ اختصاصیت میزبانی دست یافت. نازیما و مانگو از طریق امتزاج پروتوپلاست‌های *F. pallidoroseum* و *F. oxysporum* با استفاده از پلی‌اتیلن گلیکول توانستند هفت امتزاج‌یافته (F1-F2-F3-F4-F5-F6-F7) به‌وجود آورند که امتزاج‌یافته‌های F5 و F6 ضمن داشتن دامنه میزبانی محدود مشابه *F. pallidoroseum*، آلودگی بیشتری را مشابه والد *F. oxysporum* نسبت به والد

جدول ۱. برنامه گرمایی PCR برای تکثیر قطعات DNA با آغازگرهای اختصاصی گونه *F. oxysporum*

Table 1- Polymerase chain reaction temperature program for amplification of DNA fragment by FO primers.

Step	PCR program
First denaturation	95 °C for 3 min
Denaturation	95 °C for 1 min
Annealing	58 °C for 30 sec
Extension	72 °C for 1 min
Final extension	72 °C for 7 min

محیط کشت‌های مورد استفاده در تهیه سوسپانسیون اسپور

برای تهیه اسپور از قارچ مورد نظر تأثیر سه محیط کشت مختلف شامل: Potato Dextrose Agar (PDA)، Carnation Leaf Agar (CLA) و (SNA) Spezieller Nährstoffarmer Agar در سه تکرار بررسی شد. پس از سپری شدن یک هفته از کشت قارچ، اسپورها با استفاده از شستشوی سطح تشتک پتری با ۱ میلی‌لیتر آب مقطر استریل (سترون)، گرد آوری شدند. برای شناسایی محیط کشت مناسب برای تهیه سوسپانسیون (دروایی) اسپور مورد نیاز برای تهیه پروتوپلاست، تعداد اسپورهای تهیه شده در محیط کشت‌های مختلف با استفاده از لام هموسیئومتر شمارش و با هم مقایسه شدند.

جوانه‌زنی اسپورها در محیط کشت YEPD

برای جوانه‌زنی اسپورها، 1×10^7 اسپور به ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع YEPD (حاوی ۳ گرم Yeast extract، ۱۰ گرم Peptone و ۲۰ گرم Dextrose) درون فلاسک‌های ارلن مایر ۲۵۰ میلی‌لیتری در سه تکرار تلقیح و در دمای ۲۸ درجه سلسیوس و ۱۵۰ دور در دقیقه نگهداری شدند. برای بررسی درصد جوانه‌زنی در ساعت‌های مختلف، در زمان‌های ۸، ۱۰، ۱۲، ۱۴، ۱۶، ۱۸ و ۲۰ ساعت از هر سه تکرار، نمونه برداری انجام و زیر میکروسکوپ شمارش و محاسبه شد (Black et al., 2005).

تهیه پروتوپلاست

پس از تعیین بهترین زمان برای جوانه‌زنی اسپورها، مراحل تهیه پروتوپلاست با استفاده از روش Lee et al.

F. pallidoroseum نشان دادند و در نتیجه امتزاج‌یافته‌هایی با خاصیت علف‌کشی بالا با دامنه میزبانی کمتر حاصل شد (Naseema & Manju, 2010).

استفاده از فناوری امتزاج پروتوپلاست مابین *A. alternate* بیماری‌زا روی سیب که مولد توکسین (زهرابه) AM است و *A. alternate* بیماری‌زا روی گوجه‌فرنگی که توکسین AAL را تولید می‌کند، با روش‌های امتزاج الکتریکی و پلی‌اتیلن گلیکول، منتج به تولید امتزاج‌یافته‌هایی شد که هر دو توکسین را تولید می‌کردند و روی سیب و گوجه‌فرنگی بیماری‌زا بودند (Salamiah et al., 2001).

تولید کیتیناز ۴۲ با استفاده از فناوری امتزاج پروتوپلاست در قارچ *Trichoderma harzianum* افزایش یافت و بدین ترتیب قدرت بیوکنترلی این قارچ در مقابل قارچ بیماری‌گر *Fusarium graminearum* را بالا بردند (Kowsari et al., 2016).

با توجه به اینکه تعداد پروتوپلاست‌های تولیدشده و زنده‌مانی آن‌ها همواره از عامل‌های مهم در روند تولید پروتوپلاست است، بهینه‌سازی شرایط مربوطه بسیار اهمیت دارد. از این‌رو در این تحقیق سعی شده است که بتوان با استفاده از امکانات ساده به روشی کارآمد و سریع در تهیه پروتوپلاست از قارچ *F. oxysporum* دست یافت و پس از بهینه‌سازی شرایط دخیل در این امر، بتوان از این روش در امتزاج پروتوپلاست و رسیدن به امتزاج‌یافته‌هایی با ویژگی‌های برتر استفاده کرد.

مواد و روش‌ها

قارچ *Fusarium oxysporum* از گیاهان جالیز دارای علائم پژمردگی آوندی جداسازی شده و پس از خالص‌سازی مورد شناسایی ریخت‌شناسی با استفاده از کلیدهای شناسایی معتبر این جنس قارچی (Leslie & Summerell, 2006) و نیز شناسایی مولکولی با استفاده از آغازگر اختصاصی این گونه (آغازگر مستقیم FOF1: CCCGCCTGGCTGCGTCCGACT C و آغازگر معکوس FOR1: CAAGCATATGACTAC TGGC)، قرار گرفت. برنامه گرمایی به کار رفته برای واکنش PCR در جدول ۱ آورده شده است.

محاسبات آماری

آزمایش‌ها در قالب طرح کامل تصادفی با سه تکرار انجام شد و برای تجزیه داده‌ها از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ استفاده شد. از مقدار خطای استاندارد برای مشخص کردن محدوده خطا استفاده شد و برآورد اختلاف میانگین‌ها با روش توکی در سطح احتمال ۱ درصد انجام گرفت.

نتایج

شناسایی ریخت‌شناسی و مولکولی *F. oxysporum*

پس از کشت و خالص‌سازی قارچ، ویژگی‌های ماکروسکوپی و میکروسکوپی آن از جمله شکل و ظاهر پرگنه، نوع و تعداد سلول ماکروکنیدی، شکل ظاهری میکروکنیدی و فیالید آن و نیز نحوه تشکیل کلامیدوسپور با استفاده از کلیدهای معتبر بررسی و جدایی fox3-1 پس از شناسایی برای ایجاد پروتوپلاست انتخاب شد. همچنین به منظور تأیید تشخیص ریخت‌شناسی این جدایه، پس از استخراج DNA و انجام PCR با استفاده از پرایمر (آغازگر)های اختصاصی، باند (نوار) تکثیر شده شناسایی صحیح گونه را تأیید کرد. (شماره دسترسی توالی در بانک ژن (NCBI): MF611755 (Rostami et al., 2017).

تهیه پروتوپلاست

تهیه اسپور از قارچ

نتایج به دست آمده از مقایسه محیط کشت‌های مختلف، نشان از تفاوت معنی‌داری در تأثیر نوع محیط کشت در میزان اسپورزایی قارچ داشت (شکل ۱). محیط کشت SNA با میانگین $2/14 \times 10^5$ اسپور در هر میلی‌لیتر بیشترین میزان اسپورزایی را ایجاد کرده و برای مراحل بعدی استفاده شد. همچنین محیط‌های PDA و CLA هرکدام به ترتیب با میانگین اسپور $1/5 \times 10^5$ و $0/8 \times 10^5$ در میلی‌لیتر، با تفاوت معنی‌داری در رتبه‌های بعدی قرار گرفتند.

الگوی جوانه‌زنی اسپورها

در این مرحله، هدف رسیدن به زمان مناسبی است که در آن بیشترین درصد جوانه‌زنی پروتوپلاست را به‌رغم

(2011) انجام شد و میسلیموم‌ها با استفاده از کاغذصافی گردآوری شده و برای هضم آنزیمی، در شش ترکیب آنزیمی شامل غلظت‌های مختلفی از دو آنزیم Driselase (D9515; Sigma) from Basidiomycetes Lysin enzyme from *Trichoderma harzianum*;) (L1412; Sigma) قرار گرفتند (جدول ۲). سپس میزان پروتوپلاست‌های تولیدشده در هر تیمار پس از ۲، ۳، ۴، ۵ و ۶ ساعت، با استفاده از لام هموسایتومتر شمارش و بهترین ترکیب آنزیمی مشخص شد.

جدول ۲. ترکیب غلظت‌های متفاوتی از دو آنزیم

تجزیه‌کننده دیواره سلولی

Table 2. The combination of different concentrations of two cell wall lytic enzymes

Treatment	Enzyme Glucanex (mg/ml)	Driselase (mg/ml)
Treatment 1	10	15
Treatment 2	10	20
Treatment 3	15	15
Treatment 4	15	20
Treatment 5	20	15
Treatment 6	20	20

بررسی تأثیر تثبیت‌کننده‌های اسمزی

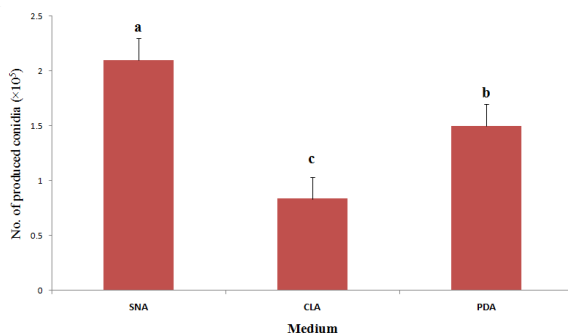
پس از مشخص شدن بهترین ترکیب آنزیم و بهترین زمان در معرض قرارگیری آنزیم، کارایی ایجاد پروتوپلاست و نیز زنده‌مانی آن در سه تثبیت‌کننده (KCl، Sucrose و Sorbitol) و هرکدام با سه غلظت (۰/۴، ۰/۶ و ۰/۸ مولار) بررسی شدند. در این بررسی برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد و برای مشخص شدن درصد پروتوپلاست‌های زنده در میان پروتوپلاست‌های تولیدی، از رنگ‌آمیزی Trypan blue استفاده شد، بدین ترتیب که یک قطره از محلول ۰/۰۶ درصد تریپان بلو روی لام قرار داده شد و مقدار ۱۰ میکرولیتر سوسپانسیون حاوی پروتوپلاست به آن افزوده شد، سپس تعداد پروتوپلاست‌هایی که تغییر رنگ داده بودند در تعداد ۱۰۰ پروتوپلاست شمارش و درصد آنها محاسبه شد (Feron et al., 2002). با توجه به اینکه پروتوپلاست‌های زنده رنگ نمی‌گیرند بنابراین درصد پروتوپلاست زنده با استفاده از فرمول Begume et al. (2010) به کار برده شد.

$$\% \text{ پروتوپلاست زنده} = \frac{\text{تعداد پروتوپلاست زنده}}{\text{تعداد کل پروتوپلاست‌های شمارش شده}} \times 100$$

غلظت نهایی ۱۵ میلی‌مولار برای آنزیم Glucanex و ۲۰ میلی‌مولار برای آنزیم Driselase با ایجاد $4/2 \times 10^7$ پروتوپلاست در هر میلی‌لیتر بیشترین تعداد پروتوپلاست را ایجاد کرده و با تفاوت معنی‌داری از ترکیب پیش از خود قرار می‌گیرد (شکل‌های ۳ و ۴). ترکیب آنزیمی ۱۰ میلی‌مولار آنزیم Glucanex و ۱۵ میلی‌مولار آنزیم Driselase نیز کمترین تعداد پروتوپلاست را ایجاد کرده است. زمان در معرض قرارگیری با آنزیم نیز در این آزمون به‌طور همزمان بررسی شد که زمان ۵ ساعت بیشترین تعداد پروتوپلاست را در همه ترکیب‌های آنزیمی به دست آمد. زمان‌های ۲، ۳، ۴ و ۶ ساعت محصول پروتوپلاست کمتری نسبت به زمان ۵ ساعت داشتند. در نهایت، ترکیب آنزیمی با غلظت نهایی ۱۵ میلی‌مولار برای آنزیم Glucanex و ۲۰ میلی‌مولار برای آنزیم Driselase و زمان ۵ ساعت به‌عنوان شرایط بهینه برای ایجاد پروتوپلاست قارچ *F. oxysporum* در نظر گرفته شد.

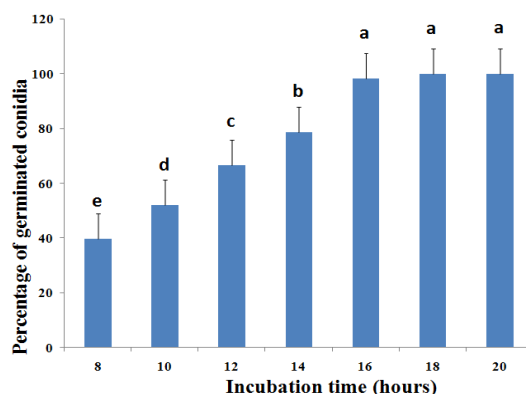
نبود انشعاب میسلیمومها را داشته باشیم. بر اساس مشاهده‌های میکروسکوپی در هفت زمان مختلف و سه تکرار در هر زمان، بهترین زمان نگهداری سوسپانسیون اسپور در محیط کشت تهیه پروتوپلاست، ۱۶ ساعت ارزیابی شد. به‌طوری‌که در این زمان نزدیک به همه اسپورها جوانه زده، در حالی که در زمان‌های ۸ تا ۱۴ ساعت این درصد به مراتب کمتر بود (شکل ۲). با وجود جوانه‌زنی ۱۰۰ درصد در زمان‌های ۱۶ ساعت به بعد، به‌علت ورود به مرحله رویشی و منشعب شدن میسلیمومها و ضخیم شدن دیواره سلولی، این زمان‌ها قابل ترجیح نبود و زمان ۱۶ ساعت به‌عنوان زمان بهینه برای تهیه پروتوپلاست در نظر گرفته شد.

تأثیر غلظت‌های مختلف آنزیم‌های تجزیه‌کننده دیواره و زمان در معرض قرار گرفتن با آنزیم‌ها در تهیه پروتوپلاست با توجه به نتایج حاصل از مشاهده‌های میکروسکوپی و شمارش پروتوپلاست‌های ایجادشده، ترکیب آنزیمی با



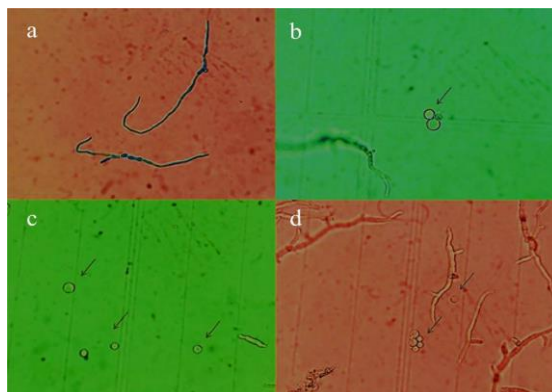
تصویر ۱. مقایسه نتایج حاصل از تأثیر محیط کشت‌های مختلف در میزان اسپورهای تولیدشده

Figure 1. Comparison between the effects of different media on spore production



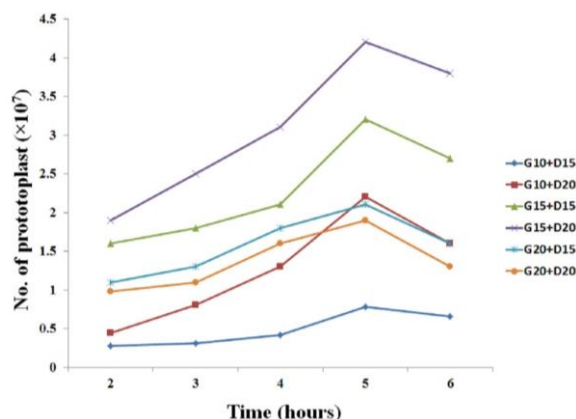
شکل ۲. میزان درصد جوانه‌زنی اسپورها در محیط کشت YEPD در زمان‌های ۸، ۱۰، ۱۲، ۱۴، ۱۶، ۱۸، ۲۰ ساعت بعد از شروع نگهداری

Figure 2. Percentage of germinated spores in YPDE medium at 8, 10, 12, 14, 16, 18 and 20 h after incubation



شکل ۳. تولید پروتوپلاست از اسپورهای جوانه‌زده *F. oxysporum* در زمان‌های مختلف: (a) اسپورهای جوانه‌زده پیش از اضافه کردن آنزیم‌های تجزیه‌کننده. (b) پروتوپلاست‌های ایجادشده در زمان ۲ ساعت. (c) پروتوپلاست‌های ایجادشده در زمان ۳ ساعت. (d) پروتوپلاست‌های ایجادشده در زمان ۵ ساعت.

Figure 3. Protoplast produced from *F. oxysporum* germinated spores at different times after adding lytic enzyme complex: a) germinated spores before adding lytic enzymes, b) created protoplast at 2 h, c) created protoplast at 3 hours, d) created protoplast at 5 h

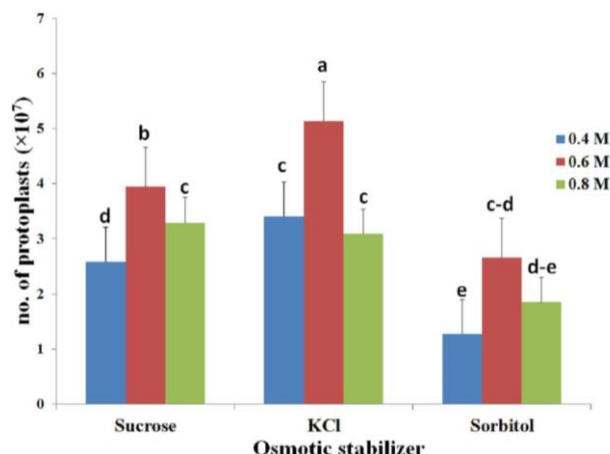


شکل ۴. مقایسه تعداد پروتوپلاست‌های تولیدی در ۵ زمان مختلف در معرض قرارگیری با شش غلظت مختلف از آنزیم‌های تجزیه‌کننده
Figure 4. Comparison between six different concentrations of lytic enzymes in production of protoplasts at 5 different times

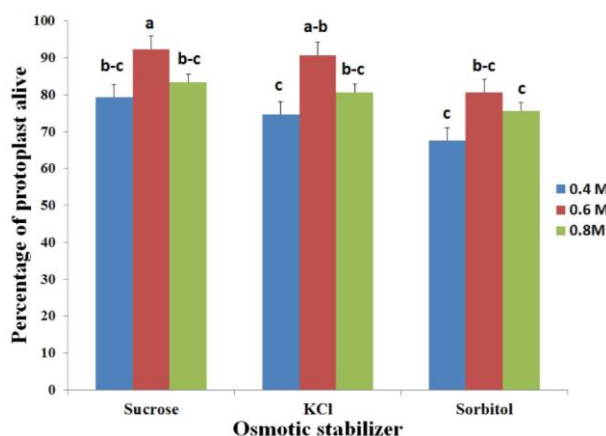
افزون بر تأثیر تثبیت‌کننده در تعداد پروتوپلاست‌های ایجادشده، تأثیر ترکیب و غلظت‌های مختلف آن در زنده ماندن پروتوپلاست نیز امری ضروری است که پس از رنگ‌آمیزی، نتایج بررسی شد. از نظر زنده‌مانی پروتوپلاست‌ها، تثبیت‌کننده‌های KCl و Sucrose در غلظت ۰/۶ مولار بهترین عملکرد را داشته و با تفاوت معنی‌داری نسبت به دیگر غلظت‌ها و تثبیت‌کننده‌ها قرار گرفتند. با توجه به نبود تفاوت معنی‌دار بین این دو ترکیب در غلظت ۰/۶ مولار و با توجه به عملکرد بالاتر KCl در ایجاد پروتوپلاست نسبت به Sucrose، ترکیب KCl با غلظت ۰/۶ مولار به‌عنوان بهترین تثبیت‌کننده در ایجاد پروتوپلاست قارچ *F. oxysporum* شناخته شد (شکل‌های ۵ و ۶).

تأثیر تثبیت‌کننده‌های اسمزی در ایجاد و زنده‌مانی پروتوپلاست

انواع و غلظت‌های متفاوتی از تثبیت‌کننده‌های اسمزی نتایج متفاوتی در دستیابی به پروتوپلاست نشان دادند، به‌طوری‌که بهترین غلظت برای همه انواع تثبیت‌کننده ۰/۶ مولار بود و تثبیت‌کننده KCl در این غلظت، به‌طور میانگین با ایجاد $5/12 \times 10^7$ پروتوپلاست، به‌عنوان مناسب‌ترین تثبیت‌کننده در ایجاد پروتوپلاست شناخته شد. تثبیت‌کننده سوکرز در غلظت ۰/۶ مولار با میانگین تعداد پروتوپلاست تولیدی $3/94 \times 10^7$ و تثبیت‌کننده‌های کلرید پتاسیم در غلظت ۰/۴ و سوکرز در غلظت ۰/۸ با میانگین تعداد پروتوپلاست $3/3 \times 10^7$ نیز به‌عنوان تثبیت‌کننده‌های مفید بعدی ارزیابی شدند (شکل ۵).



شکل ۵. مقایسه تأثیر سه ترکیب تثبیت کننده اسمزی مختلف با سه غلظت متفاوت در تعداد پروتوپلاست تولید شده
Figure 5. Comparison between the effects of three different osmotic stabilizing compounds with three different concentrations on the number of produced protoplasts



شکل ۶. مقایسه تأثیر سه ترکیب تثبیت کننده اسمزی مختلف با سه غلظت متفاوت در درصد زنده ماندن پروتوپلاستها
Figure 6. Comparison between the effects of three different osmotic stabilizing compounds with three different concentrations on protoplasts aliveness percentage

پیدا کرد (Van Heeswijck, 1984; Yabuki *et al.*, 1984; Crowe *et al.*, 1987; Hebraud & Fevre, 1988; Balasubramanian & Lalithakumari, 2008; Moradi *et al.*, 2012; Kari-Dolatabad, 2016). با توجه به تنوع موجود در ساختار دیواره سلولی قارچها، نمی توان یک روش عمومی را برای تهیه پروتوپلاست برای همه گونه های قارچی توصیه کرد. از این رو شرایط تأثیرگذار روی کمیّت و کیفیت پروتوپلاست های تولید شده، باید برای هر گونه قارچی به طور جداگانه بررسی و بهینه سازی شود.

با توجه به اینکه گام نخست در بررسی های مولکولی با استفاده از پروتوپلاست از جمله تراریخت سازی، هیبریداسیون (دورگ گیری) و دیگر موارد، تولید تعداد

بحث

با توجه به پراکندگی و دامنه میزبانی گسترده قارچ *F. oxysporum* جداسازی آن از نواحی مختلف قابل پیش بینی است. لذا جداسازی این قارچ از گیاه گل جالیز و همچنین تراریخت کردن آن به منظور ایجاد جدایه ای با کارآمدی بیشتر در جهت مهار بیولوژیک این علف هرز انگل، می تواند امیدی در مهار اقتصادی این گیاه خسارتزا ایجاد کند. در مسیر تراریخت کردن این قارچها، تهیه پروتوپلاست نخستین گام است. تولید پروتوپلاست برای گونه های مختلف از گروه های مختلف قارچی به روش های مختلف انجام شده است و همواره سعی بر این است که بتوان برای هر گونه قارچی به روشی با بیشترین کارایی دست

و *Basidiomycota* و *Ascomycota Zygomycotina* قارچ‌های ناقص استفاده شده است (Kitamoto *et al.*, 1987). در مورد تأثیر زمان در معرض آنزیم قرار گرفتن میسلیوم‌های جوان در میزان آزادسازی پروتوپلاست نیز بررسی‌هایی صورت گرفته است به طوری که این زمان برای قارچ *Phytophthora parasitica* یک ساعت، در قارچ‌های *Aspergillus nidulans* و *Penicillium chrysogenum* دو تا سه ساعت، در قارچ *Mycrosporium gypseum* پنج ساعت و در قارچ *Phialophora cinerescens* شش ساعت است (Hamlyn *et al.*, 1981; Hebraud & Fevre, 1988; Chadegani *et al.*, 1989). در این تحقیق زمان ۵ ساعت بهترین زمان در معرض قرارگیری آنزیم در ایجاد پروتوپلاست برای قارچ *F. oxysporum* تعیین شد. همچنین محیط YEPD برای جوانه‌زنی اسپور استفاده شد که از محیط‌های کشت پیشنهادی دیگر نظیر Littman OXGall ساده‌تر بود (Watson *et al.*, 2008).

با توجه به اینکه تنها پروتوپلاست‌های زنده قادر به دریافت DNA و رشد پس از آن هستند، تعداد پروتوپلاست‌های زنده نیز عامل بسیار مهمی در موفقیت تراریختی قارچ است. افزون بر سن میسلیوم، نوع و غلظت تثبیت‌کننده نیز عامل مهمی در ایجاد و زنده‌مانی پروتوپلاست‌های قارچی است. نوع و غلظت تثبیت‌کننده باید به گونه‌ای باشد که غشا پروتوپلاست را از شوک (تکانه)‌های اسمزی حفظ کرده و به زنده ماندن آن کمک کند (Scheng-Ming & Li, 1994). تثبیت‌کننده‌های مختلفی برای تولید پروتوپلاست از سلول‌های قارچی وجود دارند، ولی لازم است تأثیر هر یک از آن‌ها برای هر گونه قارچی بررسی شود و بهترین نوع و غلظت تثبیت‌کننده مشخص شود. در این تحقیق از سه گروه تثبیت‌کننده نمکی غیرارگانیک، قندی و الکل‌های قندی استفاده شد. بدین منظور KCl به‌عنوان تثبیت‌کننده نمکی، ساکارز به‌عنوان تثبیت‌کننده قندی و سوربیتول به‌عنوان یک الکل قندی انتخاب شد. بنا بر نتایج این تحقیق کلرید پتاسیم به‌عنوان بهترین تثبیت‌کننده اسمزی برای این گونه قارچی معرفی می‌شود که با نتایج بررسی‌های

زیادی پروتوپلاست با قابلیت زنده‌مانی بالا است. به همین دلیل، در این تحقیق تلاش شد روی تولید پروتوپلاست و بهینه‌سازی همه شرایط مربوط به آن در گونه قارچی مهم *F. oxysporum* بررسی شود.

بدین منظور ابتدا باید میسلیوم‌های جوان قارچ را به دست آورد و آنگاه با تیمارهای آنزیمی دیواره سلولی را از بین برده تا بتوان ترکیب کردن ژنوم (ژنگان) و پروتوپلاست دو جدایه مورد بررسی، به جدایه‌ای تراریخت دست یافت. از معمول‌ترین محیط کشت‌های مورد استفاده در تولید اسپور قارچ *Fusarium* می‌توان به محیط‌های کشت SNA، CLA، PDA و YEPD اشاره کرد (Moradi *et al.*, 2012). در این پژوهش، سه محیط کشت SNA، CLA و PDA از نظر تولید اسپور با یکدیگر مقایسه شدند که SNA با توجه به نتایج قابل ملاحظه‌ای که در ایجاد اسپور حاصل کرد برای دیگر مراحل نیز استفاده شد.

سن میسلیوم به عنوان یک عامل تعیین‌کننده در تهیه پروتوپلاست اهمیت دارد و در صورت استفاده از میسلیوم‌های جوان، تعداد پروتوپلاست بیشتری به دست خواهد آمد. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده در این تحقیق، بهترین زمان نگهداری سوسپانسیون اسپور در محیط کشت تهیه پروتوپلاست، ۱۶ ساعت ارزیابی شد. این در حالی است که محققان مختلف با بررسی تأثیر سن میسلیوم‌ها در آزادسازی پروتوپلاست به نتایج مختلفی رسیدند، به طوری که در قارچ *Conidiobolus lampaugis* و *Trichoderma reesei* بیشترین پروتوپلاست در میسلیوم‌هایی با سن ۲۰ ساعت (Picataggio *et al.*, 1983; Ishikawa & Oishi, 1985) و در قارچ *Penicillium chrysogenum* در میسلیوم‌هایی با سن ۱۵ ساعت، به دست آمدند (Anne *et al.*, 1974). طبق تحقیقات به‌عمل‌آمده روی بسیاری از قارچ‌ها، استفاده از میسلیوم‌هایی با سن بیش از ۲۰ ساعت، به علت ضخامت بیشتر دیواره سلولی و در نتیجه مقاومت بالاتر در برابر آنزیم‌های لیزکننده، کاهش چشمگیری در ایجاد پروتوپلاست خواهد داشت (Peberdy, 1987).

کمپلکس آنزیمی Novozyme (Glucanex) در تهیه پروتوپلاست قارچ‌های مختلفی شامل

می‌گیرند، درحالی‌که رنگ به داخل پروتوپلاست‌های زنده نفوذ نمی‌کند. با بررسی نتایج مشخص شد که میسلیم‌هایی با عمر ۱۶ ساعت بیشترین مقدار پروتوپلاست را تولید می‌کنند که از این تعداد، ۹۰ درصد زنده هستند که مقدار زنده‌مانی بالایی است. نتایج متفاوت به‌دست‌آمده در بررسی‌های مختلف انجام‌شده روی عامل‌های مختلف مؤثر روی میزان تولید پروتوپلاست، خود بیانگر اهمیت در دسترس بودن یک شرایط و روش بهینه تولید پروتوپلاست به صورت جداگانه برای هر قارچ است.

دیگر محققان روی بسیاری از گونه‌های قارچی تطابق دارد (Balasubramanian & Lalithakumari, 2008; Kari-dolatabad, 2016). طبق نتایج تحقیقات قبلی که نشان می‌دهد، تثبیت‌کننده‌های نمکی برای قارچ‌های ریشه‌ای مناسب‌ترند، نتایج این تحقیق نیز این امر را تأیید می‌کند. KCl به‌عنوان بهترین تثبیت‌کننده در تولید و باززایی پروتوپلاست‌های قارچ *P. chrysogenum* و *M. gypesum* معرفی شده است (Peberdy et al., 1976; Smith et al., 1985). با رنگ‌آمیزی تریپان بلو، پروتوپلاست‌های مرده کاملاً رنگ

REFERENCES

- Adams, D. J. (2004). Fungal cell wall chitinase and glucanase. *Microbiology*, 150, 2029-2035.
- Agrios, G. N. (2005). *Plant pathology*. (5th ed.). Elsevier Academic Press, 952 pp.
- Anne, J., Eyssen, H. & DeSommer, P. (1974). Formation and regeneration of *Penicillium chrysogenum* protoplasts. *Archive of Microbiology*, 98, 159-166.
- Begume, M. F., Mahal, M. F. & Alam, M. S. (2010). Inhibition of spore germination and mycelial growth of three fruit rot pathogens using some chemical fungicides and botanical extracts. *Journal of Life Science*, 5, 23-27.
- Black, E. P., Koziol-Dube, K., Guan, D., Wei, J., Setlow, B., Cortezzo, D. E., Hoover, D. G. & Setlow, P. (2005). Factors influencing the germination of *Bacillus subtilis* spores via the activation of nutrient receptors by high pressure. *Applied Environmental Microbiology*, 71, 5879-5887.
- Chadegani, M., John, J. Brink, A., Shehata, F. & Ahmadian, V. (1989). Optimization of protoplast formation, regeneration, and viability in *Microsporium gypseum*. *Mycopathologia*, 107, 33-50.
- Crowe, H. M., Levitz, S. M. & Sugar, A. M. (1987). Rapid method for the production of *Blastomyces dermatitidis* protoplasts. *Experimental Mycology*, 11, 59-161.
- Di Pietro, A., Madrid, M. P., Caracuel, Z., Delgado-Jarana, J. & Roncero, M. I. G. (2003). *Fusarium oxysporum*: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus. *Molecular Plant Pathology*, 4, 315-325.
- Feron, E. J., Veckeneer, M., Parys-Van, G. R., Van, L. A., Melles, G. R. J. & Stalmans, P. (2002). Trypan blue staining of epiretinal membranes in proliferative vitreoretinopathy. *Archives of Ophthalmology Journal*, 120, 141-144.
- Hamlyn, P. F., Bradshaw, R. E., Mellon, F. M., Santiago, C. M., Wilson, J. M. & Peberdy, J. F. (1981). Efficient protoplast isolation from fungi using commercial enzymes. *Enzyme and Microbial Technology*, 3, 321-325.
- Hebraud, M. & Fevre, M. (1988). Protoplast production and regeneration from mycorrhizal fungi and their use for isolation of mutants. *Candian Journal of Microbiology*, 34, 157-161.
- Ishikawa, F. & Oishi, K. (1985). Formation and regeneration of protoplasts from *Conidiobolus lamprauges*. *Journal of Microbiology and Genetics*, 131, 3311-3316.
- Kim, J. E., Lee, H. J., Lee, K. K., Yun, W., Shim, S. H. & Lee, Y. W. (2009). *Gibberella zeae* chitin synthase are required for hyphal growth, perithecia formation and pathogenicity. *Current Genetics*, 55 (4), 449-459.
- Kitamoto, Y., Kagawa, I., Nagao, N., Nakamata, M. & Ichikawa, Y. (1987). High-productivity protoplasting and reversion of protoplasts in *Coprinus cinereus* with a single preparation of lytic enzyme from *Trichoderma harzianum*. *Transactions of the Mycological Society of Japan*, 28, 217-227.
- Kowsari, M., Zamani, M. R. & Motallebi, M. (2016). Overexpression of chimeric chitinase 42 enhances the antifungal activity of *Trichoderma harzianum* against *Fusarium graminearum*. *Mycologia Iranica*, 3(1), 15-23.
- Lee, K. M., Yu, J., Son, M., Lee, Y. W. & Kim, K. H. (2011). Transmission of *Fusarium boothii* mycovirus via protoplast fusion causes hypovirulence in other phytopathogenic fungi. *PLoS ONE*, 6(6), e21629.
- Leslie, J. F. & Summerell, B. A. (2006). *The Fusarium laboratory manual*. Blackwell Publishing Ltd, 388 pp.

18. Lievens, B., Rep, M. & Thomma, B. P. H. J. (2008). Recent developments in the molecular discrimination of formae speciales of *Fusarium oxysporum*. *Pest Management Science*, 64(8), 781-788.
19. Michielse, C. B. & Rep, M. (2009). Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. *Molecular Plant Pathology*, 10(3), 311-324.
20. Moradi, S., Sanjarian, F. & Safaee, N. (2012). Optimization of protoplast production in plant pathogen fungus *Fusarium graminearum* in order to its transformation. *Iranian Journal of Biology*, 25(4), 493-500. (in Farsi)
21. Naseema, A. & Manju, E. P. (2010). Protoplast fusion enhances mycoherbicidal efficiency of *Fusarium pallidoroseum* (Cooke) Sacc., a pathogen of water hyacinth. *Journal of Tropical Agriculture*, 48, 58-60.
22. Ortu, G., Bertetti, D., Gullino, M. L. & Garibaldi, A. (2013). A new forma specialis of *Fusarium oxysporum* on *Crassula ovata*. *Journal of Plant Pathology*, 95 (1), 33-39.
23. Parry, D. W., Jenkinson, P. & Mcleod, L. (1995). *Fusarium* head blight (scab) in small grain cereals. *Journal of Plant Pathology*, 44, 207-238.
24. Peberdy, J. F., Buckley, C. E., Daltrey, D. C., Moore, P. M. (1976). Factors affecting protoplast release in some filamentous fungi. *Transaction of British Mycological Society*, 67, 23-26.
25. Peberdy, J. F. (1987). Developments in protoplast fusion in fungi. *Microbiological Sciences*, 4, 108-114.
26. Picataggio, S. K., Schamhart, D. H. J., Montencourt, B. S. & Eveleigh, D. E. (1983). Sphaeroplast formation and regeneration in *Trichoderma reesei*. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 17, 121-1285.
27. Rostami, A., Saremi, H. & Javan-Nikkhah, M. (2017). Morphological and phylogenic analysis of *Fusarium* species associated with vertical system of *Orobanche* spp.. *Mycologia Iranica*. In press.
28. Salamiah, A.H., Fukumassa-nakai, Y., Otani, H. & Kodama, M. (2001). Construction and genetic analysis of hybrid strains between apple and tomato pathotypes of *Alternaria alternata* by protoplast fusion. *Journal of General Plant Pathology*, 67, 97-105.
29. Saremi, H. (2005). *Fusarium: biology, ecology and taxonomy*. Jihad Daneshgahi Press, 164 pp. (in Farsi)
30. Scheng-Ming, J. T. & Li, I. F. (1994). Optimization of formation and regeneration of protoplasts from biocontrol agents of *Trichoderma* species. *Mycoscience*, 35, 257-263.
31. Schenk, P. K. & Bergman, B. H. H. (1969). Uncommon disease symptoms caused by *Fusarium oxysporum* in tulips forced in the glasshouse after precooling at 5°C. *Netherlands Journal Of Plant Pathology*, 75, 100-104.
32. Smith, P. K., Krohu, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. & Klenk, D. C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 1985, 150, 76-85.
33. Van Heeswijck R. (1984). The formation of protoplasts from 50 *Mucor* species. *Carlsberg Research Communications*, 49, 597-609.
34. Watson, R. J., Burchat, S. & Bosley, J. (2008). A model for integration of DNA into the genome during transformation of *Fusarium graminearum*. *Fungal genetic and Biology*, 45, 1348-1363.
35. Yabuki, M., Kasai, Y., Ando, A. & Fujii, T. (1984). Rapid method for converting fungal cells into protoplasts with a high regeneration frequency. *Experimental Mycology*, 8, 386-390.