مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی
سال اول، شماره اول، پاییز ۱۳۹۰ (۷۵-۶۱)

جداسازی و شناسایی قارچ‌های میکوریز آربوسکولار غالب در ریزوسفر گندم، جو و علف‌های هرز برخی مناطق زراعی شور ایران

غلامرضا صالحی جوزانی[1]*، سپیده اکبری والا[2]، مهدی ثابت جهرمی[3] و حسن مرسلی[4]
۱، ۲، ۳، ۴، استادیار و کارشناسان بخش بیوتکنولوژی میکروبی و ایمنی زیستی پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران (ABRII)
(تاریخ دریافت: ۹۰/۸/۲۶- تاریخ تصویب: ۹۰/۹/۲۸)

چکیده

گیاهانی که ریشه آن‌ها توسط قارچ‌های میکوریز آربوسکولار کلونیزه می‌شوند، بطور معمول نسبت به تنش‌های مختلف از قبیل شوری تحمل بالاتری دارند، بنابراین جداسازی و شناسایی این قارچ‌ها می‌تواند جهت تولید کودهای بیولوژیک برای مناطق مذکور بسیار مفید باشد. به این منظور پس از نمونه‌برداری ریشه و اسپور از ریزوسفر گیاهان مورد مطالعه (گندم، جو و برخی از علف‌های هرز) از خاک‌های شور استان‌های یزد، آذربایجان شرقی، قم و مرکزی، کل ژنوم گیاه و ریزوسفر با روش PCR آشیانه‌ای دومرحله‌ای برای حضور قارچ‌های میکوریز مورد بررسی قرار گرفت. در مرحله اول PCR از آغازگرهای اختصاصی قارچ‌های میکوریزی (LSU-Glom1 and SSU-Glom1) و پس از هضم آنزیمی با *Alu*1، در مرحله دوم PCR از آغازگرهای عمومی قارچ‌ها (ITS5 و ITS4) استفاده شد. محصولات مرحله دوم PCR هر نمونه، همسانه‌سازی و کلنی‌های مثبت با آنزیم برشی *Taq*1 هضم شدند. با مقایسه الگوهای RFLP نمونه‌های هضم‌شده و توالی‌یابی نماینده‌هایی از هر الگوی برشی، وجود جنس‌های *Glomus* و *Acaulospora* در ریزوسفر نمونه‌ها مشخص شد. جنس *Glomus* غالب‌ترین جنس (بیش از ۹۰ درصد) و گونه‌های *Glomus mosseae* (۵۰٪)، *G. intraradices*، *G. versiforme*، *G. sinuosum*، *G. fulvum*، *G. constrictum* و *Glomus sp* در جنس مذکور مشاهده شدند. بیشترین تنوع گونه‌ای در خاک‌های یزد و در گیاه گندم مشاهده شد. نتایج نشان داد که گونه *G. mosseae* دارای بالاترین سازگاری به شرایط شور در مناطق مختلف کشور بوده و لذا می‌تواند پس از انجام آزمایشات تکمیلی به عنوان کود بیولوژیک در این مناطق توصیه شود.

واژه‌های کلیدی: میکوریز آربوسکولار، شناسایی مولکولی، تنش شوری، Internal transcribed Spacer (ITS)، Nested PCR

* نویسنده مسئول: غلامرضا صالحی جوزانی E-mail: gsalehi@abrii.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

شوری خاک یکی از مهم‌ترین مشکلات کشاورزی در سطح دنیا بوده و بطور مداوم در مناطق مختلف دنیا در حال گسترش است (Giri *et al*. 2003; Al-Karaki. 2006) و با توجه به اینکه ایران در منطقه خشک و نیمه‌خشک واقع شده است، درصد بالایی از مناطق کشور حاوی خاک‌های شور می‌باشند. از آثاری شوری خاک بر گیاه زراعی می‌توان به کاهش آب قابل استفاده گیاه، ایجاد مسمومیت توسط برخی یون‌های سمی، فعالیت اندک گیاه، ناهنجاری‌های تغذیه‌ای، کاهش رشد و کیفیت محصول اشاره نمود (Bahmani and Bahmani. 2005).

به‌منظور کاهش شوری خاک و کاستن از اثرات مخرب آن بر روی گیاه، روش‌های متعددی از قبیل اصلاح گیاهان زراعی، اصلاح خاک و اضافه‌کردن اصلاح‌کننده‌های خاک پیشنهاد و انجام شده است، اما ناکارآمد بودن و هزینه‌بر بودن این روش‌ها باعث شده تا دانشمندان بدنبال روش‌های موثرتری برای حل این مشکل باشند. یکی از این روش‌ها که در چند سال اخیر مورد استفاده قرار گرفته است، استفاده از میکروارگانیسم‌های همزیست نظیر قارچ‌ها و باکتری‌ها در مقابله با تنش شوری در خاک است. میکوریزا (قارچ–ریشه)، همزیستی بین قارچ و گیاه می‌باشد که میکوریزا آربوسکولار، رایج‌ترین نوع همزیستی مسالمت‌آمیز بین میکروارگانیسم‌های خاکزی و گیاهان است که اهمیت اکولوژیک و اقتصادی فراوانی دارد. این قارچ‌ها تقریباً ۵ تا ۳۶ درصد زیست‌توده خاک و ۹ تا ۵۵ درصد زیست‌توده میکروارگانیسم‌های خاک را در اراضی کشاورزی شامل می‌شوند (Olsson *et al*. 1999).

مطالعات زیادی در زمینه نقش قارچ‌های میکوریزی در محافظت گیاه علیه استرس شوری انجام شده است و مشخص گردیده که رابطه همزیستی این نوع قارچ‌ها، معمولاً در نتیجه افزایش در جذب مواد غذایی (Al-Karaki and Clark. 1998)، افزایش ضریب فتوسنتزی (El-Desouky and Atawia. 1998) و افزایش راندمان آب قابل استفاده توسط گیاه می‌باشد (Jahromi *et al*. 2008; Graham *et al*. 1987; Tavasolee *et al*. 2011).

در سال‌های قبل برای شناسایی قارچ‌های میکوریزی تنها از روش مورفولوژی اسپورها استفاده می‌شد (Kariman *et al*. 2005; Aliagharzad. 2000). در غیاب اسپورها، ساختارهای درون ریشه‌ای قارچ‌ها در بهترین حالت فقط شناسایی در حد خانواده را ممکن می‌ساخت (Merryweather and Fitter. 1998). علاوه براین، در چند سال گذشته چندین نوع از قارچ‌های میکوریزا شناسایی شدند که ریسه آن‌ها به هیچ عنوان قابل رنگ‌آمیزی نبوده و یا تنها با استفاده از رنگ‌های استاندارد به صورت خیلی ضعیف رنگ می‌شدند (Morton and Redecker. 2001). محدودیت دیگری که روش‌های مورفولوژیکی دارند این‌است که معمولاً اسپورهای جمع‌آوری شده از زمین زراعی پارازیته شده‌اند و در نتیجه قابل شناسایی نیستند. لذا برای شناسایی از طریق اسپور لازم است ابتدا با کشت تله گلدانی تعداد زیادی اسپور سالم تولید نموده و سپس شناسایی صورت پذیرد. بنابراین با توجه به این مشکلات امروزه برای شناسایی و تشخیص مولکولی قارچ‌های میکوریز از روش‌های مولکولی به عنوان روش تکمیلی برای روش‌های مورفولوژیک استفاده می‌شود.

در چند سال اخیر با پیشرفت روش‌های مولکولی، امکان تکثیر اختصاصی، تهیه نقشه‌های RFLP و توالی‌یابی قطعات خاصی از ژنوم این نوع قارچ به‌وجود آمده است. یک الگوی RFLP پس از ثبت‌شدن می‌تواند برای مقایسه با توالی‌های جدید،

Archive of SID

www.SID.ir

بدون نیاز به توالی‌یابی مجدد بکار رود (Redecker *et al*. 2003). علاوه براین در چند سال گذشته با استفاده از یک جفت آغازگر اختصاصی (LSU-Glom1 و SSU-Glom1) در ترکیب با جفت آغازگرهای عمومی قارچی ITS4/ITS5 و با استفاده از روش PCR آشیانه‌ای، امکان شناسایی این نوع قارچ‌ها بوجود آمده است (Renker *et al*. 2003). اخیراً نیز از ژن‌های میتوکندریایی و اینترون‌های آن‌ها، به‌عنوان ژن‌های نشانگر جایگزین، برای تجزیه و تحلیل بهتر تاکسون‌های با روابط نزدیک استفاده شده است (Raab, 2007). علاوه بر ملکول‌های DNA، ملکول‌های دیگر مثل پروتئین‌های محلول اسپورها (SDS-EPAG D)، اسیدهای چرب (NLFA, PLFA)، الگوهای ایزوزایم‌ها و همچنین روش‌های سرولوژی مثل آنتی‌بادی فلوروسنت و تکنیک الایزا نیز برای شناسایی و طبقه‌بندی این قارچ‌ها مورد بررسی قرار گرفته‌اند، اما بطور خیلی وسیع استفاده نشده‌اند. از آنتی‌بادی‌های فلوروسنت در بعضی تحقیقات به‌عنوان نشانگرهای پروتئینی استفاده شده است. آنتی‌بادی‌های متناظر با پروتئین‌های قارچی برای شناسایی گونه قارچی و یا برای تشخیص حضور قارچ میکوریز آربوسکولار در ریشه گیاه و خاک بکار رفته‌اند (Krishna. 2005).

تحقیق حاضر به عنوان اولین تحقیق مولکولی در راه شناسایی قارچ‌های میکوریز در شرایط تحت تنش شوری در کشور با استفاده از روش‌های مولکولی و معرفی سویه‌های متحمل به تنش خشکی برای استفاده از آن‌ها به عنوان کود بیولوژیک در شرایط تنش‌های شوری انجام گردید.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری از خاک‌های زراعی مناطق شور

در ماه‌های اریبهشت و خرداد سال ۱۳۸۸، تعداد ۱۸۳ نمونه از ریشه و خاک ریزوسفر گیاهان گندم، جو و علف‌های هرز موجود در مزارع مذکور از قبیل شیرین‌بیان، تلخ‌بیان، یولاف وحشی، سلمک (سلمه تره)، چچم و خارشتر در مناطق مختلف تحت تنش شوری استان‌های مرکزی، یزد، قم و آذربایجان‌شرقی با میزان EC بین ۸ تا ۱۲ جمع‌آوری شد. نمونه‌برداری از عمق ۵ تا ۳۰ سانتی‌متری خاک انجام و سپس نمونه‌های مختلف یک مزرعه (حاوی خاک و ریشه گیاه مربوطه) با هم مخلوط و نمونه مرکب تهیه شد. از این مخلوط یک نمونه ۲ کیلوگرمی انتخاب شده و درون فویل‌های آلومینیومی به آزمایشگاه انتقال داده شده و در شرایط ۲۰- درجه سلسیوس جهت آزمایشات مولکولی نگهداری شدند.

استخراج اسپور

از هر نمونه خاک سه نمونه ۲۰۰ گرمی انتخاب و با استفاده از روش‌های Gerdemann and Nicolson (1963) و Jenkis (1964) اسپور قارچ‌های میکوریزا آربوسکولار جداسازی شدند. هر نمونه ۲۰۰ گرمی خاک در یک بشر ۲ لیتری با مقدار کافی آب، بوسیله میله شیشه‌ای به صورت سوسپانسیون درآمد. برای چند ثانیه اجازه داده شد تا ذرات سنگین رسوب کنند. سپس مایع بالایی از سری مرتب شده الک‌های ۲۵، ۸۰ و ۴۰۰ مش[1] عبور داده شد. این مرحله سه مرتبه تکرار گردید. تعداد اسپور و اسپورکارپ‌های موجود مستقیماً در زیر بینوکولر (۳۰ X) شمارش گردیدند. هر اسپورکارپ به عنوان یک اسپور در نظر گرفته شد.

شناسایی مورفولوژیک قارچ‌های میکوریز آربوسکولار و تنوع آن‌ها در خاک‌های مناطق شور مورد مطالعه

برای تهیه اسلایدهای دائمی از اسپورهای مزرعه‌ای، در دو گوشه یک لام دو قطره از محلول ملزر-PVLG با فاصله کافی گذاشته شد و سپس به

1. U.S. Mesh (ASTM) No. 25, 80 and 400 or 0.710, 0.180 and 0.037 mm

Archive of SID

www.SID.ir

کمک سوزن اسپورها به این قطرات منتقل گردیدند. پس از حدود ۵ دقیقه که اسپورها در این محیط تثبیت شدند بر روی هر قطره یک لامل قرار داده شد. اسلایدها به مدت ۳-۲ روز در دمای معمولی روی سطح افقی یا میز آزمایشگاه نگهداری شدند تا حباب‌های هوا خارج و اسپورها به خوبی تثبیت شوند. بعد از این مدت، دور یکی از لامل‌ها لاک گرفته شد و بر روی لامل دیگر به کمک مداد به آرامی فشار وارد گردید تا اسپورها شکسته شوند و لایه‌های دیواره اسپورها قابل مشاهده و بررسی گردند (Schenck and Perez. 1990). مواد اضافی خارج‌شده از لبه لامل بوسیله پنبه آغشته به الکل حذف گردید و دور این لامل هم لاک گرفته شد. در مورد اسپورکارپ‌ها، هر یک از آن‌ها به کمک تیغ، دو قسمت شدند. یکی از قسمت‌ها برای بررسی وجود یا عدم‌وجود پریدیوم، نوع و آرایش اسپورها و شکل و ضخامت پریدیوم استفاده گردید. نیمه دیگر با تیغ به چند قسمت برش داده شد تا اسپورها، ضخامت دیواره‌ها و محل اتصال اسپورها به هیف مورد بررسی قرار گیرد. از اسپورکارپ‌ها نیز اسلایدهای دائمی مشابه با روش اسپور تهیه گردید.

در این مطالعه، برای تشخیص قارچ‌های میکوریز تا سطح گونه از خصوصیات زیر استفاده شد: ۱- رنگ اسپور و لایه‌های دیواره آن، ۲- شکل اسپور، ۳- تعداد و ضخامت لایه‌های دیواره اسپور، ۴- نحوه اتصال هیف به اسپور، ۵- شکل ایجاد شده در محل اتصال هیف به اسپور، ۶- تشکیل یا عدم تشکیل اسپور در ریشه‌ها، ۷- وجود یا عدم وجود لایه‌های قابل ارتجاع تندشی، ۸- باز یا بسته بودن روزنه هیف در محل اتصال به اسپور و نحوه انسداد در صورت بسته‌بودن، ۹- نحوه اتصال و پیوستگی دیواره‌های اسپور و هیف، ۱۰- مشخصات اسپورکارپ و پریدیوم در صورت وجود آن‌ها.

برای بررسی خصوصیات مورفولوژیک و مورفومتری اسپورها از میکروسکپ نوری (Nikon Eclipse E800) استفاده گردید. برای تعیین اندازه اسپورها، ۶۰-۳۰ اسپور از هر گونه، اندازه‌گیری گردیدند. شناسایی دقیق گونه‌ها با استفاده از اطلاعات ارائه شده در سایت‌های اینترنتی INVAM و Blaszkowski، و کتاب راهنمای شناسایی قارچ‌های میکوریز آربوسکولار (Schenck and Perez. 1990) انجام گردید.

استخراج DNA از ریشه و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز آشیانه‌ای (Nested PCR)

استخراج DNA ریشه‌ها (حاوی ژنوم گیاه و فلور میکروبی در داخل و خارج آن) با استفاده از روش‌های Redecker (2000 a,b) صورت پذیرفت. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به صورت آشیانه‌ای برای جلوگیری از تکثیر آلودگی‌های جانبی، کاهش اثر مواد بازدارنده و اختصاصی‌تر کردن واکنش براساس روش Renker *et al.* (2003) با انجام تغییراتی در دستگاه ترموسایکلر iCYCLER (Bio Rad) انجام شد. جفت آغازگرهای اختصاصی قارچ‌های میکوریزا آربوسکولار شامل LSU Glom1 و SSU Glom1 در مرحله اول و جفت آغازگرهای عمومی برای قارچ‌ها شامل ITS4 و ITS5 در مرحله دوم PCR به منظور تکثیر قطعه ITS استفاده شدند (جدول ۱).

جدول ۱- آغازگرها و توالی‌های آن‌ها

نام آغازگر	توالی (´3-´5)
LSU-Glom1	CTTCAATCGTTTCCCTTTCA
SSU-Glom1	ATTACGTCCCTGCCCTTTGTACA
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC
ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG

مواد مرحله اول PCR برای یک نمونه با حجم کل ۵۰ میکرولیتری تهیه شد (آب مقطر استریل ۴۰ میکرولیتر، کلریدمنیزیم (۲۵ میلی‌مولار) ۲ میکرولیتر، بافر PCR (۱۰X) ۵ میکرولیتر، dNTP ۲ میلی‌مولار و برای هر آغازگر مقدار ۰/۸ میکرولیتر، آغازگر ۱ (LSU Glom1) (۵۰ پیکومول در میکرولیتر) ۱

Archive of SID

www.SID.ir

میکرولیتر، آغازگر ۲ (SSU Glom1) (۵۰ پیکومول در میکرولیتر) ۱ میکرولیتر، آنزیم Taq دی.ان.ا پلیمراز (۵ واحد در میکرولیتر) ۰/۲ میکرولیتر.

برنامه دمائی PCR شامل: واسرشت‌سازی اولیه ۱۵ دقیقه در ^{o}C ۹۵، برنامه PCR شامل ۳۵ چرخه (واسرشت‌سازی ۴۰ ثانیه ^{o}C۹۴، اتصال آغازگر ۳۰ ثانیه ^{o}C۵۴، بسط ۴۰ ثانیه ^{o}C۷۲ و بسط نهائی به مدت ۴ دقیقه در ^{o}C۷۲) انجام پذیرفت که در این مرحله قطعه‌ای به اندازه ۱۱۰۰bp–۱۰۰۰ تکثیر می‌گردد. به منظور اجتناب از تکثیر مناطق ITS موجوداتی غیر از قارچ‌های میکوریز آربوسکولار که بیشتر دارای سایت برشی *Alu*1 می‌باشند (Renker *et al.* 2003)، ۵ میکرولیتر از محصول اولین PCR به مدت ۱ ساعت در حجم کل ۲۰ میکرولیتر با استفاده از ۵ واحد آنزیم *Alu*1 (Fermentas, St. Leon-Rot, Germany) برش داده شد. بعد از هضم آنزیمی، DNA در ۵۰ میکرولیتر اتانول ۱۰۰ درصد رسوب و به مدت ۱ ساعت در روی یخ قرار داده شد. در ادامه به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۲۰۰۰۰g سانتریفوژ و پس از حذف مایع‌رویی، ماده ته‌نشین شده به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ^{o}C۳۷ خشک و در ۱۰ میکرولیتر آب استریل حل گردید.

محصول PCR هضم‌شده در مرحله دوم واکنش PCR استفاده شد. در این مرحله واکنش PCR با حجم کل ۵۰ میکرولیتر مطابق با مرحله اول PCR با آغازگرهای ITS5 و ITS4 انجام پذیرفت (جدول ۱). در این مرحله برای قارچ‌های میکوریز آربوسکولار، قطعه‌ای به اندازه ۶۵۰bp–۵۰۰ تکثیر می‌گردد. مقداری از محصولات دومین مرحله PCR بر روی ژل آگاروز ۱/۲ درصد جریان (Run) داده شد و اندازه هر محصول به کمک مارکر تخمین زده شد. برای هر نمونه، محصول PCR با قوی‌ترین باند روی ژل و طول قطعه ITS مورد نظر برای قارچ‌های میکوریز آربوسکولار (۶۵۰bp–۵۰۰) انتخاب و با استفاده از دستورالعمل کیت خالص‌سازی PCR (Fermentas) خالص‌سازی شد.

تهیه نقشه برشی و توالی‌یابی محصولات PCR.

به منظور بررسی نقشه برشی محصولات PCR، ۷ میکرولیتر از هر کدام از محصولات PCR بدست آمده با استفاده از ۵ واحد آنزیم Taq1(Fermentas) در دمای ^{o}C۶۵ به مدت ۱ ساعت برش داده شدند و بر روی ژل آگاروز ۲ درصد جریان داده شدند. کلونینگ محصولات PCR انتخاب‌شده براساس نقشه برشی به داخل وکتور pTZ بر اساس پروتکل کارخانه Cloning Kit (Invitrogen Life) TOPO TA همسانه و درون باکتری اشرشیاکلی XL1blue ترانسفورم گردید. قطعات کلون‌شده سپس برای توالی‌یابی ارسال گردید.

تفسیر نتایج و تشکیل دندروگرام

توالی‌های بدست‌آمده با استفاده از BLASTN کنترل (Altschul *et al.* 1997) و نزدیک‌ترین توالی به آن‌ها به عنوان توالی مرجع انتخاب شد. توالی‌های بدست‌آمده و مرجع با کمک برنامه ClustalX (Thompson *et al.* 1994) صف‌بندی و سپس در برنامه BioEdit نسخه ۷ /۰/۹ (Hall, 1999) تنظیم گردید. روابط فیلوژنتیک با استفاده از مدل Kimura-2-parameter (Kimura, 1980) با الگوریتم نزدیک‌ترین همسایه (Neighbor Joining (NJ) algorithm)، (Saitou and Nei. 1987) با کمک MEGA4، (Tamura *et al.* 2007) ترسیم و تفسیر گردید.

توالی‌های دارای نیای مشترک که در یک تبار یا شاخه قرار گرفتند و همچنین دارای شباهت توالی حداقل ۹۲ درصد بودند، به صورت مشابه با آرایه‌های مرجع و بقیه به صورت گونه‌های نامشخص جنس قارچ‌های آربوسکولار نامگذاری و بطور متوالی شماره‌گذاری شدند. خط برش (Cutoff) براساس تحقیقات Borstler *et al.* (2006) و Wubet *et al.* (2003) برای تنوع طبیعی توالی آشکارشده در

Archive of SID

www.SID.ir

داخل و بین اسپورهای گونه مشابه قارچ میکوریز آربوسکولار انتخاب شده است.

نتایج و بحث

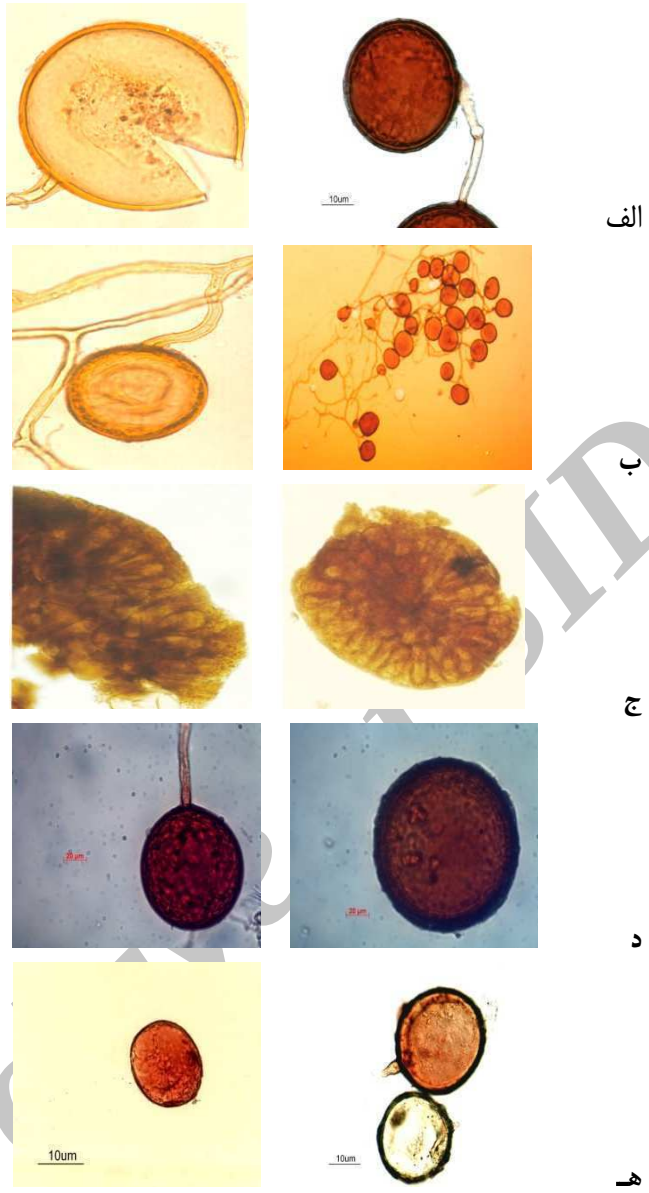
در این تحقیق جداسازی و شناسایی قارچ‌های میکوریز آربوسکولار غالب در خاک‌های شور زراعی با میزان EC بین ۸ تا ۱۲ برخی مناطق کشور شامل استان‌های مرکزی، یزد، قم و آذربایجان‌شرقی صورت پذیرفت. تعداد ۱۸۳ نمونه از مناطق مختلف اشاره‌شده از مزارع گندم، جو و علف‌های هرز جمع‌آوری و سپس برای جداسازی اسپور قارچ‌های مذکور و همچنین استخراج DNAی ژنومی از ریشه و ریزوسفر استفاده شدند. مطالعه مورفولوژی و مورفومتری اسپورها در مخلوط PVLG و ملزر (۱:۱) با میکروسکوپ‌نوری نشان داد که گونه‌های متعلق به دو جنس میکوریز آربوسکولار شامل *Glomus* و *Acaulospora* در ریزوسفر گیاهان مورد مطالعه وجود دارند. بیش از ۹۰ درصد گونه‌ها متعلق به جنس *Glomus* و ۱۰ درصد بقیه متعلق به جنس *Acaulospora* بودند که به ترتیب به خانواده‌های گلومراسه (راسته گلومرال) و آکولوسپوراسه (راسته آکولوسپورا) تعلق دارند (شکل ۱). نکته قابل توجه اینکه مطالعات شناسایی مورفولوژیک نشان داد که حدود ۵۰٪ اسپورهای جداسازی شده جنس *Glomus* مشاهده شده در نمونه‌ها از گونه *G. mosseae* بودند و گونه *G. intraradices* نیز به میزان حدود ۲۰ درصد در رتبه دوم قرار داشت. همچنین مطالعات مورفولوژیک حضور گونه *G. sinuosum* را مشخص نمود (حدود ۵ درصد)، اما حدود ۲۵ درصد نیز به عنوان *Glomus sp.* در حد جنس شناسایی شدند (شکل ۱).

پس از انجام دو مرحله واکنش زنجیره‌ای پلیمراز آشیانه‌ای (شکل ۲) برای DNAی استخراج‌شده از نمونه‌ها و خالص‌سازی محصولات PCR، نقشه RFLP بیش از ۱۸۰ محصول PCR با آنزیم برشی Taq1 تهیه گردید (شکل ۳) و نماینده‌های هر الگو، پس از کلونینگ، توالی‌یابی گردیدند. حدود ۱۰۰ توالی محصول PCR و RFLP توالی‌یابی گردید. در اولین مرحله با کمک جستجوگر BLASTN، مشخص شد که فقط حدود ۵۰ درصد از کل RFLPها مربوط به میکوریز بودند و حدود ۵۰ درصد نیز متعلق به قارچ‌هایی غیر از میکوریز بودند که عمدتاً بازیدیومیست‌های اطراف ریشه گیاهان مورد آزمایش و همچنین برخی مخمرهای موجود در شرایط آزمایشگاه را شامل می‌شدند.

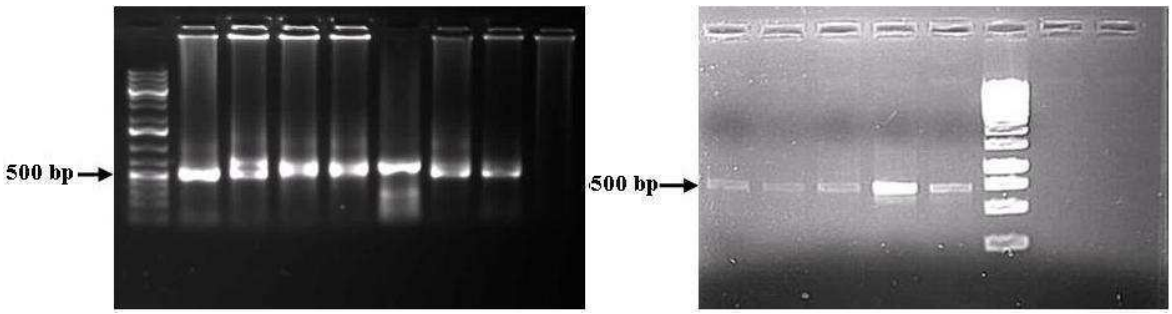
با توجه به نتایج بدست‌آمده از این پژوهش و سایر مطالعات به نظر می‌رسد که روش مولکولی استفاده‌شده در این تحقیق نسبت به سایر روش‌ها بدلیل آلودگی کمتر و ردیابی دقیق‌تر ارجحیت بیشتری نسبت به سایر روش‌ها داشته باشد (Renker *et al.* 2003). Borstler *et al.* (2006) نیز با استفاده از روش مشابه، حضور ۱۹ گونه متفاوت از نظر مولکولی متعلق به جنس‌های عمده قارچ‌های میکوریز را در مناطق مرتعی گزارش نمودند. Hempel *et al.* (2007) با روشی مشابه به استثنای حذف مرحله هضم‌آنزیمی، جامعه قارچ‌های میکوریز را در خاک، ریشه و اسپورها مطالعه کردند و توانستند گروه‌های عمده متعلق به تمامی خانواده‌های قارچ میکوریز را شناسایی کنند. در این پژوهش، براساس روش کار این محققین، ابتدا از مرحله هضم‌آنزیمی استفاده نشد ولی نتایج نشان داد که قسمت عمده توالی‌ها بدست‌آمده متعلق به مخمرهای بازیدیومیستی بودند. در حالی که با اعمال روش هضم‌آنزیمی، بطور موفقیت‌آمیزی اکثر این توالی‌های آلوده‌کننده حذف شدند. به منظور کاهش هزینه‌های همسانه‌سازی و زمان آزمایش، در یک سری از آزمایش‌های مولکولی، بعد از مرحله دوم واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، محصولات مثبت گیاهان انتخاب‌شده در هر منطقه مخلوط و بقیه کارهای مولکولی بر روی آن دنبال گردید. مشابه این روش

Archive of SID

www.SID.ir

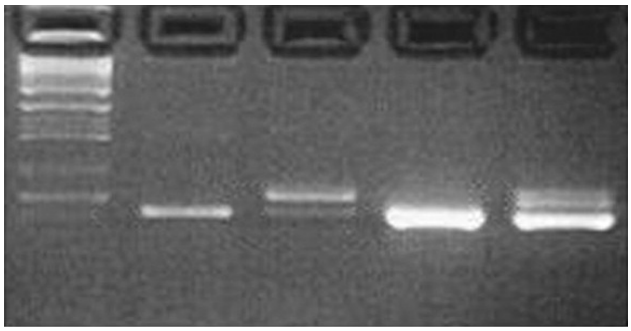


شکل ۱- خصوصیات مورفولوژیک برخی گونه های میکوریز آربوسکولار جداسازی شده از مناطق شور الف) *G. mossae*؛ ب) *G. intraradices*؛ ج) *G. sinousum*؛ د) *Glomus* Sp. ؛ هـ) Aculospora



شکل ۲- محصول مرحله دوم PCR نمونه‌های مناطق مختلف روی ژل آگاروز ۱/۲ درصد (اندازه قطعات بین ۵۰۰ تا ۶۵۰ باز می باشد).

www.SID.ir



شکل۳- مشاهده محصول برش خورده مرحله دوم PCR توسط آنزیم Taq1 نمونه‌های مناطق مختلف در روی ژل آگاروز ۱ درصد. از چپ بترتیب: مارکر اندازه 1Kb، نمونه ۲۴، نمونه ۱۳، نمونه ۵۲، نمونه ۵

بوسیله Renker *et al.* (2006) و Hempel *et al.* (2007) نیز انجام شده است. همچنین برای کاهش هزینه‌های توالی‌یابی و زمان، در سری اول آزمایش‌های مولکولی، در هر واکنش همسانه‌سازی ۶۰ کلونی مثبت و در سری دوم ۳۰ کلونی مثبت انتخاب و با آنزیم برشی Taq1 الگوهای RFLP آن‌ها تهیه گردید. سپس ۱ تا ۳ نماینده از هر الگوی برشی انتخاب و توالی‌یابی شد. این روش با استناد به کارهای Landweert *et al.* (2003) و Hempel *et al.* (2007) است که به ترتیب ۳۰ و ۶۰ کلنی از هر نمونه را آنالیز نموده و با منحنی‌های قیاس آماری نشان دادند که این تعداد کلنی برای تخمین تنوع کافی می‌باشد. با این حال با توجه به اینکه به هنگام تکثیر اختصاصی دومرحله‌ای توالی‌های ITS جنس‌های میکوریز همزمان توالی‌های برخی از قارچ‌های مشابه از قبیل بازیدیومیست‌ها، آسکومیست‌ها و مخمرها نیز تکثیر می‌شوند تا حدودی کارایی این روش را پایین آورده است. بنابراین پیشنهاد می‌شود با مطالعه دقیق توالی‌های ITS و rDNA این نوع قارچ‌ها آغازگرهای اختصاصی‌تر و روش‌های مناسب‌تر با کارایی بالاتر طراحی شوند.

توالی‌های مربوط به قارچ‌های میکوریز بدست‌آمده در این تحقیق با شماره‌های HQ386983- HQ386963 و FJ008590-FJ008666 و GU322941-GU323006 در بانک‌ژن NCBI ثبت شدند. تطابق ترادف‌های بدست‌آمده با ترادف‌های موجود در بانک‌های اطلاعاتی از قبیل NCBI و Blast نشان داد که بیشتر از ۹۵ درصد گونه‌های قارچ‌های میکوریز آربوسکولار موجود در مناطق تحت تنش‌شوری در این پژوهش از جنس *Glomus* بودند. محققین دیگر نیز *Glomus* را به عنوان جنس غالب قارچ‌های میکوریز آربوسکولار در خاک‌های تحت تنش غیرزنده (فلزات سنگین و خشکی) گزارش نموده‌اند (Tonin *et al*. 2001). گونه‌های جنس *Glomus* و *Acaulospora* در مقایسه با جنس‌های دیگر در طیف وسیعی از شرایط مختلف محیطی ازجمله شوری و خشکی شناسایی شده‌اند (Aliasgharzad. 2000; Stutz *et al*. 2000). Aliasgharzad (2000) در مطالعه پراکنش و تراکم جمعیت قارچ‌های میکوریز آربوسکولار در خاک‌های شور دشت تبریز، در سطوح شوری پایین، جمعیت غالب قارچ‌های میکوریز آربوسکولار را از جنس *Glomus* و تعداد کمتری را از جنس *Acaulospora* و در خاک‌های بسیار شور تنها حضور قارچ‌های متعلق به جنس *Glomus* را گزارش داده است. Stutz *et al.* (2000) ترکیب و توزیع گونه‌ای قارچ‌های میکوریز آربوسکولار را در مناطق خشک و نیمه‌خشک شمال آمریکا مطالعه کردند. در مناطق مورد مطالعه آن‌ها فقط گونه‌هایی از جنس‌های *Glomus* و *Acaulospora* مشاهده شدند و گونه‌های متعلق به *Glomus* بیشترین

Archive of SID

www.SID.ir

بوده‌اند. Renker *et al.* (2005) در خاک‌های آلوده به فسفات فقط گونه‌های جنس *Glomus* را گزارش داده‌اند. از دلایل غالب‌بودن گونه‌های یک جنس یا محدودبودن گونه‌های جنس دیگر، می‌توان به میزان اسپورزایی گونه‌های قارچی و توانایی آن‌ها در کلنیزه‌کردن گیاه و همچنین به روش‌های مورد استفاده برای آشکارسازی این قارچ‌ها اشاره کرد. بطور مثال، گونه‌های *Glomus* توانایی کلنیزه‌کردن گیاه را از طریق اسپور و نیز قطعات ریشه‌های میکوریزی یا میسلیوم‌ها دارند، در حالی که اعضای خانواده جایگوسپوراسه فقط بواسطه اسپورها گیاه را کلنیزه می‌کنند (Daniell *et al.* 2001, Vallinio *et al.* 2006).

گونه‌های متعلق به جنس *Glomus* مشاهده‌شده در این تحقیق از طریق توالی‌یابی شامل *G. mosseae*، *G. intraradices*، *G. versiforme*، *G. sinuosum*، *G. geosporum*، *G. etunicatum* و *Glomus sp.* بودند. در صورتی که در مطالعه مورفولوژیک فقط سه گونه مورد شناسایی قرار گرفت و سایر موارد تا حد جنس شناسایی شدند. لازم به ذکر است که دو گونه *G. versiforme* و *G. fulvum* در مطالعه قبل نویسندگان حاضر در خصوص شناسایی گونه‌های میکوریزی غالب در شرایط تحت تنش خشکی و آلودگی به فلزات سنگین شناسایی نشده بودند (Zarei *et al.* 2008, 2010). حدود ۵ درصد از توالی‌ها نیز متعلق به جنس *Acaulospora* بودند. حدود ۷۵ درصد از گونه‌های جنس *Glomus* شناسایی‌شده شامل *G. mosseae* و *G. intraradices* بودند که *G. mosseae* به میزان ۵۰ درصد بیشترین فراوانی را داشت. با توجه به این موارد نتایج شناسایی مولکولی تا حدود زیادی نتایج بررسی مورفولوژیک را تایید نمود. تحقیقات گذشته نیز نشانگر این قضیه بوده است که گونه *G. mosseae* در خاک‌های تحت تنش دارای بالاترین غالبیت و فراوانی بوده است که این موضوع نشانگر قابلیت سازگاری بالای این گونه با شرایط نامساعد محیطی می‌باشد (Zarei *et al.* 2008, 2010).

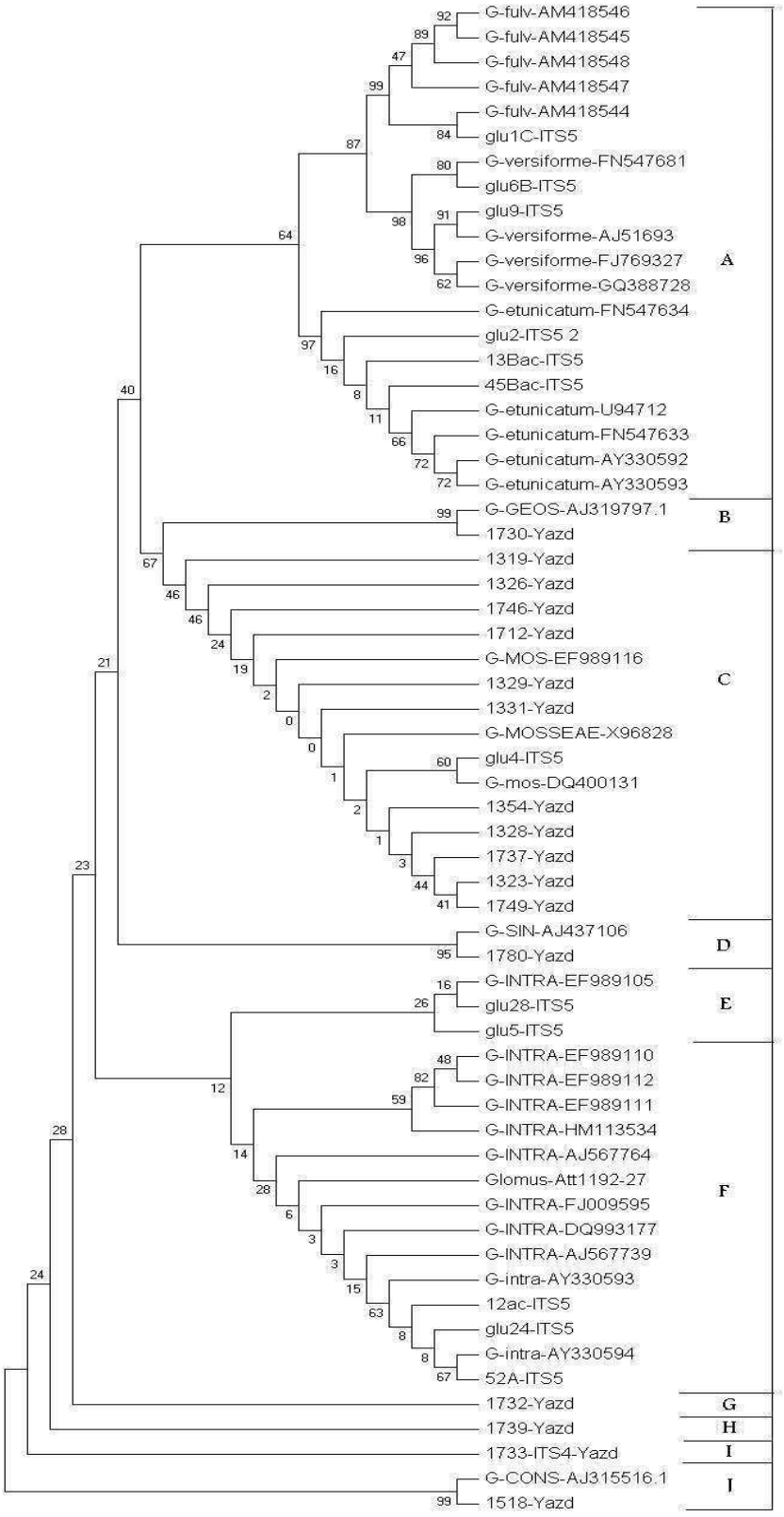
نتایج فیلوژنتیکی نمونه‌های توالی‌یابی‌شده با توالی‌های رفرنس موجود در بانک‌های اطلاعاتی به عنوان گونه‌های رفرنس در شکل ۴ آورده شده است. در دندروگرام سعی شده فقط یک یا دو گروه رفرنس نزدیک به توالی‌های بدست‌آمده استفاده شوند، همچنین یک گونه مجزا به عنوان گونه متفاوت و خارج از گروه[1] در نظر گرفته شده است. لازم بذکر است که تعداد ۱۷ توالی نیز شباهت کمتر از ۹۰ درصد با گونه‌های شناخته شده داشتند که در این دندروگرام آورده نشده‌اند. احتمال می‌رود توالی‌های مذکور مربوط به گونه‌های جدیدی از جنس *Glomus* باشند که نیاز به مطالعات تکمیلی دارند.

داده‌های جدول ۲ نشان می‌دهد که تنوع میکوریزا تاحدودی به مناطق جغرافیایی و گیاه میزبان مرتبط است. بیشترین میزان تنوع و گروه‌های بدست‌آمده در منطقه یزد مشاهده شد. در جدول مربوط به گیاهان میزبان، گروه F (شامل گونه *G. intraradices*) فقط از گیاه میزبان جو و علف‌هرز جداسازی شدند و گروه‌های A (*G. versiforme* و *G. fulvum* و *G. etunicatum*) و C (*G. mosseae*) هر دو گیاه میزبان را شامل می‌شوند. سایر گروه‌ها از میزبان گندم جدا شدند. محققین قبلا گزارش داده‌اند که علاوه بر خصوصیات خاک، گونه گیاه میزبان نیز بر تنوع و فراوانی قارچ‌های میکوریز آربوسکولار اثر می‌گذارد (Bever *et al.* 1996; Del Val *et al.* 1999a). در این مطالعه نیز اثر گونه‌های گیاهی بومی بر فراوانی و نوع قارچ‌های میکوریز آربوسکولار

1. Out group

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۴- درخت فیلوژنی توالی‌های ITS- rDNA *گلوموس* ترسیم شده بر اساس فاصله ژنتیکیK80 با الگوریتم نزدیک‌ترین همسایه. نمونه‌های دارای کد بانک ژن، به عنوان رفرنس نمونه‌های ایرانی انتخاب شده‌اند . گونه کانستریکتوم به عنوان out group در نظر گرفته شده‌اند.

www.SID.ir

کاملاً مشخص بود و تنوع و میزان قارچهای میکوریز بر حسب نوع گیاه متفاوت بود (جدول ۲).

در مناطق جغرافیایی گروه A نیز بیشترین تعداد متعلق به استان مرکزی بود و این گروه بجز استان قم کلیه استان‌ها را شامل می‌شد که این گروه‌ها شامل گونه‌های *G. versiforme* و *G. fulvum* است. احتمالاً خاک این منطقه شرایط مناسب‌تری را برای این گونه‌ها دارد. گروه E هم فقط شامل گونه *G. intraradices* بود که فقط در استان‌های قم و مرکزی یافت شد که شاید به دلیل نزدیکی این دو استان به یکدیگر باشد. نکته جالب این است که این استرین در بانک اطلاعاتی NCBI بیشترین فاصله ژنتیکی را با سایر استرین‌های ثبت‌شده گونه *G. intraradices* دارد. پس می‌توان نتیجه گرفت که این استرین را شاید بتوان با انجام آزمایشات شناسایی تکمیلی به عنوان یک گونه مجزا و جدید معرفی کرد. همچنین نمونه‌های یزد اختلاف معنی‌داری با یکدیگر و گونه *G.mosseae* نشان دادند که این دسته را نیز می‌توان به عنوان گونه‌های حد واسط و یا جدید در نظر گرفت.

جدول ۲- ارتباط گروه‌های ژنومیک بدست آمده از تکنیک PCR آشیانه‌ای با میکوریزای جدا شده از میزبان‌های مختلف گیاهی و در مناطق جغرافیایی مختلف

گروه‌های دندروگرام	گیاه میزبان			گروه‌ها	مناطق جغرافیایی			
	گندم	جو	علف‌های هرز		یزد	آذربایجان شرقی	قم	مرکزی
A	۴	۲		A	۱	۱		۴
B	۱			B	۱			
C	۱۱	۱		C	۱۱			۱
D	۱			D	۱			
E	۲			E			۱	۱
F		۲	۱	F	۲	۱		
G	۱			G	۱			
H	۱			H	۱			
I	۱			I	۱			
J	۱			J	۱			
مجموع	۲۳	۵	۱	مجموع	۲۰	۲	۱	۶

در بررسی‌های مولکولی این پژوهش، گونه‌های جنس *Glomus* بطور فراوان و غالب در همه مناطق در ریزوسفر گیاهان مختلف و جنس *Acaulospora* در برخی مناطق شناسایی شدند. نکته مهم در این پژوهش اینکه در همه مناطق شور مطالعه‌شده هم در گندم و هم در جو، گونه *G.mosseae* و *G.intraradices* دارای غالبیت کامل بودند. این موضوع نشانگر این نکته می‌تواند باشد که این گونه دارای سازگاری بالایی با شرایط تحت تنش شوری می‌باشد.

بعد از *G. mosseae*، گونه *G. intraradices* دارای غالبیت بود که تقریباً در همه مناطق البته با فراوانی کمتر نسبت به *G. mosseae* وجود داشت. سایر گونه‌های اشاره‌شده در قسمت نتایج به میزان کمتری در مناطق مطالعه‌شده وجود داشتند و حتی در برخی مناطق نیز بطور کلی مشاهده نشدند. بر اساس مطالعات مولکولی، گونه *G. fulvum* در استان‌های مرکزی، قم و تبریز دیده نشد و تنها در یزد آشکار گردید. گونه‌های *G. Constrictum*، *G. sinuosum* و *G. etunicatum* فقط در استان آذربایجان شرقی و گونه *G. versiforme* نیز فقط در یزد مشاهده گردید. جنس *Acaulospora* نیز در

Archive of SID

www.SID.ir

استان‌های مرکزی و آذربایجان‌شرقی مشاهده شد. با توجه به اینکه نمونه‌های خاک و ریشه بدست‌آمده در گیاهان گندم و جو در همه مناطق دارای گونه‌های میکوریزی بودند و از طرفی با توجه به نتایج محققین قبلی (Aliasgharzad. 2000) که وجود همزیستی میکوریزی را در این گیاهان تایید نمودند، می‌توان با استفاده از تکنولوژی تکثیر درون‌شیشه و یا روش‌های جدیدتر، گونه‌های غالب شناسایی‌شده در این تحقیق را به تولید انبوه رساند و به عنوان کود بیولوژیک در اختیار کشاورزان قرار داد تا در مناطق تحت تنش برای افزایش عملکرد استفاده نمایند.

مطالعات مولکولی پژوهش حاضر نشان داد که گونه *G. fulvum* فقط از مناطق تحت تنش شوری شناسایی شد در حالی‌که در مطالعات قبلی نویسندگان مقاله حاضر در مناطق تحت تنش خشکی و آلوده به فلزات سنگین (Zarei *et al*. 2008, 2010)، این گونه مشاهده نشده است. این نتیجه گواه این مطلب می‌تواند باشد که این گونه احتمالاً اختصاصیت و توانایی بالایی در سازگاری با خاک‌های شور دارد.

همچنین اکثر نمونه‌های متعلق به گونه *G. mosseae* در مناطق یزد یافت شدند که مبین وفور این گونه در خاک‌های این منطقه نسبت به سایر مناطق می‌باشد.

بطور کلی با توجه به نتایج بدست‌آمده در این تحقیق می‌توان این‌طور جمع‌بندی نمود که قارچ میکوریز آربوسکولار دارای تنوع گونه‌ای خوبی در مناطق زراعی شور کشور وجود است و حداقل ۶ گونه *Glomus* و یک گونه *Acaulospora* در این مناطق وجود دارند. از طرف دیگر با توجه به تنوع بدست‌آمده در خصوص گیاهان و مناطق مورد مطالعه در این تحقیق، تنوع قارچ‌های میکوریز وابستگی زیادی به منطقه اقلیمی و گیاه میزبان دارد. از طرف دیگر گونه *G. mosseae* دارای بالاترین غالبیت و سازگاری و همچنین پراکنش در مناطق مختلف و گیاهان مختلف در کشور می‌باشد و به همین دلیل می‌تواند به‌عنوان یک گونه مناسب برای تولید کود بیولوژیک در مزارع موجود در مناطق شور کشور می‌باشد.

REFERENCES

Al-Karaki GN, Clark RB (1998) Growth, mineral acquisition and water use by mycorrhizal wheat grown under water stress. Journal of Plant Nutrition. 21: 263-276.

Al-Karaki GN (2006) Nursery inoculation of tomato with arbuscular mycorrhizal fungi and subsequent performance under irrigation with saline water. Scientia Horticulturae. 109: 1-7.

Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang JH, Zhang Z, Miller W and Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Research. 25: 3389-3402.

Aliasgharzad N (2000) Distribution and density of *Mycorrhiza arbuscular* fungi in saline soils and determine their effects on the improving of tolerance of onion and barley to salinity in plain of Tabriz, Mycorrhiza, 2001, 11:119-122.

Bahmani, A, Bahmani SH (2005) the Effects of salinity on nutrient uptake by soil, 9th *Soil Science Congress* of *Iran, Tehran. pp 120-124.*

Bever JD, Morton JB, Antonovics J, Schultz PA (1996) Host-dependent sporulation and species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in a mown grassland. J. Ecol. 84: 71-82.

Borstler B, Renker C, Kahmen A, Buscot F (2006) Species composition of arbuscular mycorrhizal fungi in two mountain meadows with differing management types and levels of plant biodiversity. Biol Fertil Soils. 42: 286-298.

Brunner I, Brodbeck S, Buchler U, Sperisen C (2001) Molecular identification of fine roots

Archive of SID

www.SID.ir

of trees from the Alps: reliable and fast DNA extraction and PCR–RFLP analyses of plastid DNA. Molecular Ecology. 10: 2079-2087.

Daniell TJ, Husband R, Fitter AH, Young JPW (2001) Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonising arable crops. FEMS Microbiol. Ecol. 36: 203-209.

Del Val C, Barea JM, Azcon-Aguilar C (1999) Diversity of arbuscular mycorrhizal fungus populations in heavy-metal-contaminated soils. Appl. Environ. Microbiol. 65: 718-723.

El-Desouky SA, Atawia AAR (1998). Growth performance of some citrus rootstocks under saline conditions. Alexandria J. of Agric. Research. 43(3): 231-254.

Gerdemann JW, Nicolson TH (1963) Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting, Trans. Br. Mycol. Soc. 46: 235-244.

Giri B, Kapoor R, Mukerji KG (2003) Influence of arbuscular mycorrhizal fungi and salinity on growth, biomass and mineral nutrition of Acacia auriculiformis. Biology and Fertility of Soils. 38: 170-175.

Graham JH, Syvertsen JP, Smith ML (1987) Water relations of mycorrhizal and phosphorus-fertilized nonmycorrhizal citrus under drought stress. New Phytol. 105, 411-419.

Hall TA (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows95/98/NT. Nucleic Acid Symposium Series. 41:95-98.

Hempel S, Renker C, Buscot F (2007) Differences in the species composition of arbuscular mycorrhizal fungi in spores, root and soil communities in grassland ecosystem. Environmental Microbiology. 9: 1930-1938.

Jahromi F, Aroca R, Porcel R, Ruiz-Lozano JM. (2008). Influence of salinity on the *in vitro* development of Glomus intraradices and on the *in vivo* physiological and molecular responses of mycorrhizal lettuce plants. Microbial Ecology. 55: 45-53.

Jakobsen I, Rosendahl L (1990) Carbon flow into soil and external hyphae from roots of mycorrhizal cucumber roots. New Phytol. 115: 77-83.

Jenkis WR (1964) A rapid centrifugal flotation technique for separating nematodes from soil, Plant Disease Reporter, Washington. 48, 692.

Juniper S, Abbott LK (1993) Vesicular-arbuscular mycorrhizas and soil salinity. Mycorrhiza. 4: 45-57.

Kariman KH, Goltapeh EM, Minassian V (2005) Arbuscular mycorrhizal fungi from Iran. Journal of Agricultural Technology. 1(2): 301-313.

Krishna KR (2005) Mycorrhiza, a molecular analysis. Science Publisher, Inc., NH, USA.

Landeweert R, Leeflang P, Kuyper TW, Hoffland E, Rosling A, Wernars K, Smit E (2003) Molecular identification of ectomycorrhizal mycelium in soil horizons. Appl. Environ.Microbiol. 69: 327-333.

Merryweather J, Fitter A (1998) The arbuscular mycorrhizal fungi of Hyacinthoides non-scripta. II. Seasonal and spatial patterns of fungal populations.New Phytol. 138, 131-142.

Morton JB, Redecker D (2001) Two new families of Glomales, Archaeosporaceae and Paraglomaceae, with two new genera *Archaeospora* and *Paraglomus*, based on concordant molecular and morphological characters. Mycologia. 93: 181-195.

Olsson PA, Thingstrup I, Jakobsen I, Bååth E (1999) Estimation of the biomass of arbuscular mycorrhizal fungi in a linseed field. Soil Biol. Biochem. 31: 1879-1887.

Raab PA (2007) Development of new molecular markers for phylogeny and molecular identification of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). Ph.D. thesis, University of Basel, Basel, Switzerland

Redecker D (2000) Specific PCR primers to identify arbuscular mycorrhizal fungi within colonized roots. Mycorrhiza, 10: 73-80.

Archive of SID

www.SID.ir

Redecker D, Hijri I, Wiemken A (2003) Molecular identification of Arbuscular mycorrhizal fungi in roots: perspective and problems. Folia Geobotanica, 38:113-124.

Redecker D, Kodner R, Graham LE (2000a) Glomalean fungi from the Ordovician. Science. 289: 1920-1921.

Redecker D, Morton JB, Bruns TD (2000b) Molecular phylogeny of the arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus sinuosum* and *Sclerocystis coremioides*. Mycologia. 92: 282-285.

Redecker D, Morton JB, Bruns TD (2000a) Ancestral lineages of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales). Mol. Phylogenet. Evol. 14: 276-284.

Renker C, Blanke V, Buscot F (2005) Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in grassland spontaneously developed on area polluted by a fertilizer plant. Environ. Pollut. 135: 255-266.

Renker C, Heinrichs J, Kaldorf M, Buscot F (2003) Combining nested PCR and restriction digest of the internal transcribed spacer region to characterize arbuscular mycorrhizal fungi on roots from the field. Mycorrhiza. 13: 191-198.

Renker C, Weisshuhn K, Kellner H, Buscot F (2006) Rationalizing molecular analysis of field-collected roots for assessing diversity of arbuscular mycorrhizal fungi: to pool, or not to pool, that is the question. Mycorrhiza. 16: 525-531.

Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution. 4: 406-425.

Schenck NC, Perez Y (1990) Manual for the Identification of VA Mycorrhizal Fungi. INVAM. Univ of Florida, Gainsville. 286 p.

Stutz JC, Copeman R, Martin CA, Morton JB (2000) Patterns of species composition and distribution of arbuscular mycorrhizal fungi in arid regions of southwestern North America and Nambia, Africa. Can. J. Bot. 78: 237-245.

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution. 24: 1596-1599.

Tavasolee A, Aliasgharzad N, Salehi Jouzani Gh, Mardi M, Asgharzadeh A, Akbarivala S (2011) Effects of Co-Inoculation with Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Rhizobia on Fungal Occupancy in Chickpea Root and Nodule Determined by Real-Time PCR, Current Microbiology. 63(2): 107-114.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research. 22: 4673-4680.

Tonin C, Vandenkoornhuyse P, Joner EJ, Straczek J, Leyval C (2001) Assessment of arbuscular mycorrhizal fungi diversity in the rhizosphere of *Viola calaminaria* and effect of these fungi on heavy metal uptake by clover. Mycorrhiza. 10: 161-168.

Vallino M, Massa N, Lumini E, Bianciotto V, Berta G, Bonfante P (2006) Assessments of arbuscular mycorrhizal fungal diversity in roots of Solidago gigantea growing in a polluted soil in Northern Italy. Environmental Microbiology. 8: 971-983.

Wubet T, Weiß M, Kottke I, Oberwinkler F (2003) Morphology and molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in wild and cultivated yew (*Taxus baccata*). Canadian Journal of Botany. 81: 255-266.

Zarei M, Hempel S, Wubet T, Schäfer T, Savaghebi Gh, Salehi Jouzani Gh, Khayam Nekouei M, Buscot F (2010) Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in relation to soil chemical properties along a gradient of heavy metal contamination, Environmental Pollution. 158(8): 2757-2765.

Zarei M, Saleh-Rastin N, Salehi Jouzani Gh, Savaghebi Gh, Buscot F (2008) Arbuscular

Archive of SID

www.SID.ir

mycorrhizal abundance in contaminated soils around a zinc and lead deposit. European Journal of Soil Biology. 44, 381-391.

Archive of SID

www.SID.ir

Crop Biotech. Vol. 1, No. 1, 2011

Isolation and Identification of Dominant Arbuscular Mycorrhizal Fungi in the Rhizosphere of Wheat, Barley and Weeds in some Saline Regions of Iran

GH. SALEHI JOUZANI[1]*, S. AKBARI VALA[2], M. SABET JAHROMI[3] AND H. MORSALI[4]

1, 2, 3, 4, Assistant Professor, and Researchers, Microbial Biotechnology and Biosafety Department of Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII)

(Received: Nov. 17, 2011- Accepted: Dec. 19, 2011)

ABSTRACT

Commonly, plant roots colonized by arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) can tolerate different stresses such as soil salinity. Thereby, identification of the dominant AMF species in the saline soils and their application as biofertilizer could be very useful in order to increase crop productivity under such conditions. For this purpose, sampling was performed from root and rhizosphere of wheat, barley and weeds in Yazd, East Azerbaijan, Qom and Markazi provinces of Iran. The spore morphological properties of the isolated AMFs were studied. Then, samples were screened using a two-step nested PCR methodology. At the first step, AMF-specific primers, including LSU-Glom1 and SSU-Glom1 were used, followed by *Alu*1 digestion of the PCR products, and then at the second step, the digested PCR products were amplified by using fungal universal primers (ITS4 and ITS5) in order to amplify the ITS-rDNA region. The PCR products were then cloned, and digested by *Taq*1. The results of the morphological characteristics and sequence analyses showed that two AMF genus, including *Glomus* (more than 90%) and *Acaulospora* (10%) were dominant. The species *G. mosseae* (50%)*, G. intraradices, G. sinosum, G. constrictum, G. etunicatum, G. versiforme, G. fulvom,* and *Glomus* sp were identified using the molecular analysis. The maximum species diversity was observed in the fields located in Yazd Province and in rhizosphere of wheat. Overall, the results of the present study showed that the species *G. mosseae* had the highest dominancy and adaptivity under saline conditions. Hence, this species can be used as a source of biofertilizer in such regions after performing complementary experiments.

Keywords: Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), Salinity tolerance, molecular identification, Internal Transcribed Spacer (ITS), Nested PCR

* Corresponding author: Gh. Salehi Jouzani Email: gsalehi@abrii.ac.ir

Archive of SID

www.SID.ir