Archive of

Shahid Bahonar University of Kerman
Agricultural Biotechnology Journal
Iranian Biotechnology Society
Print ISSN: 2228-6705 Online ISSN: 2228-6500

Isolation and study of morphology and phylogeny of arbuscular mycorrhizal fungi coexisting with the roots of some medicinal plants in Kerman province

Narges hatami

Ph.D. student, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran.Email: Nrges.hatamy123@gmail.com

Eidi bazgir

* Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran.Email: Bazgire.ei@lu.ac.ir

Ebrahim Sedghati

Assistant Professor, Department of Plant Protection. Faculty of Agriculture, Vali-e-Asr University, Rafsanjan, Iran.Email: Sedaghati@vru.ac.ir

Mostafa Darvishnia

Associated Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran.Email: Darvishnia.m@lu.ac.ir

Abstract

Objective

Plants that have a symbiotic relationship with arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) compared with non-mycorrhizal plants have a higher ability to resist against various biotic and abiotic environmental stresses such as drought, salinity, pests, and plant diseases. This study aim is studying different species of AMFs in Kerman province. The identification of these microorganisms is to provide the basis for further studies on the use of these microorganisms in germination, growth, and proliferation of medicinal plants.

Methods

To molecular and morphological identification of arbuscular mycorrhizal fungi, sampling was done from the rhizosphere of medicinal plants in some areas of Kerman province.

www.SID.ir

Archive of SID

Arbuscular mycorrhizal fungi spores were isolated from the sampled soils by the wet sieve method. The grouping was done based on spore microscopic slides and morphological characteristics such as spore color, shape, surface ornamentation, size, wall structure and spore characteristics in water. DNA was extracted from single spores. A Part of ribosomal DNA was amplified by nested PCR using SSUmaf and LSUmAr primers in the first step, SSUmCf, and LSUmBr in the second step. After horizontal agarose gel electrophoresis and see the related band the PCR product was sent for sequencing. Then sequencing results were analyzed using BLAST, Gene Runner and Clustal Omega Softwares, and the phylogenetic tree was plotted using MEGA 7 software.

Results

According to morphological and molecular studies, *Viscospora viscosa*, *Septoglomus deserticola*, *Funneliformis caledonium*, *Funneliformis mosseae*, and *Diversispora spurca* were identified. Finally, the existence and manner of species identity were investigated in the phylogeny tree.

Conclusion

Since the morphological features used in the identification and classification of mycorrhizal fungi are limited, molecular methods can be used for safer classification, and in this way, Recognize differences of Similar species morphologically and similarity of different species in appearance.

Keywords: Classification, Nested PCR, Primer, Ribosomal DNA, Symbiosis

Citation: Hatami N, Bazgir E, Sedaghati E, Darvishnia M (2020) Isolation and study of morphology and phylogeny of arbuscular mycorrhizal fungi coexisting with the roots of some medicinal plants in Kerman province. Agricultural Biotechnology Journal 12(1), 23-44.

Agricultural Biotechnology Journal 12(1), 23-44.
DOI: 10.22103/jab.2020.15110.1189
Received: December 16, 2019; Accepted: January 9, 2020
© Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society

www.SID.ir

Archive of SID

مطالعه‌ی مورفولوژیکی و فیلوژنتیکی قارچ‌های میکوریز آربوسکولار همزیست با ریشه‌ی برخی گیاهان دارویی استان کرمان

نرگس حاتمی

دانشجوی دکتری، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران، ایمیل: Narges.hatamy123@gmail.com

عیدی بازگیر

استادیار، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران، ایمیل: Bazgir.ei@lu.ac.ir

ابراهیم صداقتی

استادیار، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی‌عصر، رفسنجان، ایران، ایمیل: Sedaghati@vru.ac.ir

مصطفی درویش نیا

دانشیار، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران، ایمیل: Darvishnia.m@lu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۹/۲۵، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۰/۱۹

چکیده

هدف: گیاهانی که ریشه‌ی آن‌ها با قارچ های میکوریز آربوسکولار رابطه‌ی همزیستی دارند، نسبت به گیاهان غیرمیکوریزی، توانایی بالاتری دربرابر تنش‌های مختلف زنده و غیرزنده‌ی محیطی همچون خشکی، شوری و آفات و بیماریهای گیاهی دارند. هدف از این مطالعه، بررسی گونه‌های مختلف AMF در استان کرمان است. شناسایی این میکروارگانیسم‌ها مبنایی برای مطالعات بیشتر در مورد استفاده از این میکروارگانیسم‌ها در جوانه‌زنی ، رشد و تکثیر گیاهان دارویی است.

مواد و روش‌ها: به‌منظور شناسایی مولکولی و مورفولوژیکی قارچهای میکوریز آربوسکولار، نمونه‌برداری از منطقه‌ی ریزوسفر گیاهان دارویی در برخی مناطق استان کرمان انجام شد. اسپورهای قارچ میکوریز آربوسکولار از خاکهای نمونه‌برداری شده با استفاده از روش الک مرطوب جداسازی شدند. گروه‌بندی بر اساس اسلاید میکروسکوپی و ویژگیهای مورفولوژیکی مانند رنگ اسپور، شکل، تزئینات سطح، اندازه و ساختار دیواره آنها و خصوصیات اسپور ها در آب انجام شد. استخراج DNA از تک اسپور

www.SID.ir

Archive of SID

انجام شد. بخشی از DNA ریبوزومی با روش PCR آشیانه‌ای، با استفاده از آغازگرهای SSUmaf و LSUmAr در مرحله اول و SSUmCf و LSUmBr در مرحله دوم تکثیر گردید و محصول PCR پس از الکتروفورز افقی ژل آگاروز و مشاهده‌ی باند مربوطه برای توالی یابی ارسال شد. سپس نتایج توالی‌یابی با استفاده از نرم‌افزارهای BLAST، Gene Runner و Clustal Omega مورد بررسی قرار گرفت و با استفاده از نرم‌افزار MEGA 7، درخت فیلوژنی رسم شد.

یافته‌ها: براساس بررسی‌های مورفولوژیکی و مولکولی، گونه‌های *Viscospora viscosa*، *Septoglomus deserticola*، *Funneliformis caledonius*، *Funneliformis mosseae* و *Diversispora spurca* شناسایی گردید. در انتها، وجود و چگونگی قرابت گونه های شناسایی شده در درخت فیلوژنی مورد بررسی قرار گرفت.

نتیجه‌گیری: ازآن‌جا که ویژگی‌های مورفولوژیکی مورد استفاده در شناسایی و رده‌بندی قارچ‌های میکوریز محدود می‌باشند، می‌توان برای رده‌بندی مطمئن‌تر از روش‌های مولکولی استفاده کرد و از این طریق تمایز گونه‌های مشابه از نظر مورفولوژیکی و یا تشابه نمونه‌های متفاوت از نظر ظاهری را تشخیص داد.

واژگان کلیدی: آغازگر، رده‌بندی، هم‌زیستی، DNA ریبوزومی، PCR آشیانه‌ای

مقدمه

تحقیقات نشان داده‌اندکه در اکوسیستم‌های طبیعی، ۹۰ درصد ریشه گیاهان با قارچ¬های میکوریزهمزیستی دارند. حاصل این همزیستی، فعالیت قارچ در جهت جذب و انتقال عناصر غذایی به گیاه میزبان و دریافت ترکیبات کربنه حاصل از فتوسنتز گیاه میزبان توسط قارچ همزیست می¬باشد همزیستی بین ریشه‌های گیاهان و قارچها اولین بار در سال ۱۸۸۱ توسط کامنسکی[1] قارچ‌شناس لهستانی کشف شد (Kamienski 1881). اصطلاح میکوریز اولین بار توسط فرانک[2] در سال ۱۸۸۵ برای توصیف این رابطه مورد استفاده قرار گرفت (Frank 1885). میکوریز نوعی رابطه همزیستی بین برخی قارچها با ریشه گیاهان است که اکثراً هر دو طرف سود می‌برند. بیشتر گیاهان خاکزی حداقل دارای یک نوع همزیستی میکوریزایی هستند. همزیستی میکوریزی دارای انواع مختلفی می‌باشد. در بین انواع مختلف میکوریز، قارچ‌های میکوریز آربسکولار، رایج‌ترین نوع رابطه‌ی میکوریزایی را با حدود ۸۰ درصد گیاهان تشکیل می‌دهند (Sylvia 1992; Miyasaka et al. 2003). گیاهانی که دارای همزیستی میکوریزی می‌باشند، به دلیل این‌که عناصر غذایی و آب بیشتری از خاک جذب می‌کنند، رشد و عملکرد بهتر و مقاومت بیشتری در برابر تنش‌های زنده (عوامل بیماری‌زایی که ریشه گیاه را مورد حمله قرار می‌دهند) و غیر زنده (کمبود یا مسمومیت مواد غذایی، خشکی، شوری و عناصر سنگین) از خود نشان می‌دهند (Sylvia & Will 1988). در تحقیقی که توسط احیایی و همکارانش (۱۳۸۸) انجام شد تاثیر تنش خشکی بر شاخص‌های مورفولوژیکی برخی گیاهان دارویی ازجمله ارتفاع گیاهان، تعداد برگ، تعداد دانه و وزن

[1]. Kamienski
[2]. Frank

www.SID.ir

Archive of SID

گیاهان مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان دهنده تاثیر معنی‌دار تیمارهای مختلف تنش بر روی کلیه‌ی صفات مورد نظر در گیاهان دارویی بود (Ehyaei et al. 2009). کمبود شدید آب می تواند صدمات سنگینی به رشد و نمو و همچنین بر مواد موثره دارویی گیاهان وارد نماید (Omidbeigi 2005). فدایی و همکارانش در تحقیقی تأثیر تنش خشکی، میکوریزا و فسفر بر شاخص‌های رشد و کمیت و کیفیت اسانس بادرشبو را مورد بررسی قرار داده و نتایج این تحقیق نشان داد که بکارگیری گونه های مختلف قارچ های میکوریز در تنش خشکی شدید توانست عملکرد فیزیولوژیک و درصد اسانس بادرشبو را ۴۵ تا۱۰۰ درصد افزایش دهد (Fadaei et al. 2018). این قارچها می‌توانند مواد آلی مورد نیاز خود را از گیاه دریافت کرده و در مقابل در جذب عناصر غذایی بی‌تحرک مانند فسفر، مس، روی، منگنز، آهن و غیره از خاک به گیاه کمک کنند (Sadhana 2014). قارچهای میکوریز آربسکولار به دلیل اینکه می‌توانند ۴ تا ۲۰ درصد از کربن تثبیت شده توسط گیاهان را استفاده کنند، به‌عنوان مهم‌ترین تنظیم کننده‌های جریان کربن از گیاهان به خاک، به شمار می‌آیند. این قارچها دارای اثرات سینرژیستی با سایر میکروارگانیسم‌ها به‌خصوص ریزوباکترهای محرک رشد گیاه نیز می‌باشند (Smith & Read 2010). هیف خارج ریشه‌ای میکوریز آربسکولار باعث بهبود ساختمان خاک با اتصال ذرات خاک به یکدیگر می‌شود و از پراکندگی ذرات خاک جلوگیری می‌کند. همچنین تعدادی از آنان نیز با تولید ترکیبات پلی‌ساکاریدی و نفوذ و انتشار در بین ذرات خاک، تهویه خاک را افزایش داده و از فرسایش آن جلوگیری می‌کنند و به‌طور کلی کیفیت خاک را بهبود می‌بخشند (Augé 2001).

در این مطالعه، قارچهای همزیست با برخی گیاهان دارویی مورد بررسی قرار گرفته‌اند. گیاهان دارویی در زمینه‌ی حفظ اکوسیستم‌ها، توسعه اقتصادی، امنیت غذایی، ذخایر ژنتیکی و خودکفایی دارویی دارای اهمیت فراوان‌اند. خواص دارویی این گیاهان به‌طور معمول به‌دلیل وجود متابولیت‌های ثانویه است که در شرایط رشد طبیعی و تنش‌های مختلف از جمله رقابت با گونه‌های نزدیک، بیشتر سنتز می‌شوند (Uniyal et al. 2000). همچنین کشت زراعی گیاهان دارویی به دلایل مختلفی از جمله سرعت رشد پایین، نیازهای محیطی خاص، سرعت جوانه زنی پایین، خواب بذر و حساسیت به برخی آفات و بیماری ها چندان ساده و گاهی امکان‌پذیر نمی‌باشد. در تحقیقاتی که با استفاده از کودهای زیستی در گیاهان داروئی مختلف به‌عمل آمده، مشاهده شده که حداکثر ماده مؤثره‌ی گیاه دارویی در شرایط مصرف کود زیستی حاصل می شود (Gupta et al. 2002). همزیستی قارچهای میکوریز آربوسکولار با گیاه موجب تغییرات در تجمع متابولیت های ثانویه از جمله ترکیبات فنلی در ریشه و اندام هوایی و روغن های ضروری در گیاهان میزبان می‌شود (Copetta et al. 2006). تجمع فلاونوئیدها، مشتقات سیکلوهگزانون و آپوکاروتنوییدها، ترکیبات فنلی، و تریترپنوییدها در گیاهان همزیست با میکوریز گزارش شده است (Vierheilig et al. 2000a; Vierheilig et al. 2000b; AKiyAMA & HAyAsHi 2002; Toussaint et al. 2007). طبق گزارش‌ها کیفیت ترکیب اسانس ریحان همزیست با قارچهای میکوریز آربوسکولار از طریق افزایش لینالول و متیل چاویکول افزایش می‌یابد (Zolfaghari et al. 2013). شناسایی قارچهای همزیست با ریشه‌ی این گیاهان در مناطق و شرایط مختلف، مهم است؛ زیرا می‌توان با معرفی جنس و گونه‌ی قارچ همزیست موثر در رشد گیاه از آن‌ها به‌عنوان کود بیولوژیک و محرک رشد در شرایط خاص استفاده کرد.

www.SID.ir

Archive of SID

شناسایی و رده‌بندی قارچ‌های میکوریز آربوسکولار به‌طور معمول براساس مورفولوژی اسپورها انجام می‌شود. از آن‌جا که این دسته از ویژگیهای مورفولوژیکی محدود هستند، تشخیص گونه‌های نزدیک به هم در بعضی مواقع دشوار است. طی سه دهه‌ی اخیر با توسعه‌ی روش‌های مولکولی، از این روش‌ها نیز برای اطمینان بیش‌تر در رده‌بندی استفاده می‌شود. اکثر روش‌های شناسایی این قارچها بر اساس توالی‌یابی DNA ریبوزومی (rDNA) انجام می‌شود. در ژنوم این قارچها به‌طور متوسط 40 تا 400 نسخه از واحدهای DNA ریبوزومی وجود دارد که طول آن‌ها بین ۷ تا ۵۰ کیلو باز متغیر است (Wöstemeyer & Burmester 1986). در سطح گونه، میزان تغییرات زیر واحد کوچک DNA ریبوزومی نسبت به ITS کمتر میباشد، همچنین این زیر واحد نسبت به زیر واحد بزرگ DNA ریبوزومی بیشتر مورد مطالعه قرار گرفته است و اکثر آغازگرهای اختصاصی طراحی‌شده مربوط به این ناحیه می‌باشد (Sanders et al. 1995). روشهای مولکولی به‌دلیل دقت زیاد در شناسایی و داشتن پایه‌ی ژنتیکی میتوانند به‌عنوان مکمل روشهای مورفولوژیکی باعث اطمینان بیشتر در شناسایی و رده‌بندی این قارچها شوند. هدف از این پژوهش شناسایی مورفولوژی و مولکولی گونه‌های میکوریز آربوسکولار همزیست با ریشه‌ی تعدادی از گیاهان دارویی مناطق مختلف استان کرمان می‌باشد که برای اولین بار در استان کرمان انجام می‌شود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری در مناطق مختلف استان کرمان از عمق صفر تا سی سانتیمتری ناحیه ریزوسفر هر گیاه که شامل خاک و ریشه‌های ظریف بود در بهار ۱۳۹۶ انجام شد (جدول ۱). نمونه‌های خاک به آزمایشگاه منتقل و به‌مدت دو هفته در دمای آزمایشگاه قرار داده شدند، تا خشک شوند (Błaszkowski 1993). سپس اسپورهای قارچهای میکوریز آربوسکولار به‌روش الک مرطوب و سانتریفیوژ در محلول شکر از خاک جداسازی و به یک پتری دیش منتقل گردید (Gerdemann & Nicolson 1963). بررسی‌های ظاهری اولیه، تعیین رنگ اسپور ها در آب و تفکیک ابتدایی، با استفاده از استریومیکروسکوپ (Nikon SMZ 1000) انجام شد. به منظور شناسایی اسپورها با استفاده از یک لوپ بسیار کوچک یا سمپلر، اسپورقارچهای میکوریز از پتری دیش حاوی آن‌ها برداشته و به قطرات (glycerol / PVLG polyvinyl alcohol-lactic acid) به همراه معرف ملزر (Meltzer reagent) روی اسلاید میکروسکوپی منتقل و پس از خشک شدن لام، زیر میکروسکوپ نوری (Nikon-ECLIPSE-80i) مشاهده شدند (Schenck & Perez 1990). در بررسی اسلایدهای تهیه‌شده، ویژگیهایی مانند شکل، رنگ، اندازه و ساختار دیواره اسپور، نحوه اتصال هیف به اسپور و باز یا بسته بودن روزنه هیف در محل اتصال به اسپور و نحوه انسداد در صورت بسته بودن، بررسی و صفات مورد مشاهده با استفاده از تارنماهای اینترنتی معتبر http://www.invam.wvu.edu و http://www.zor.zut.edu.plو مقالات کلیدی برای شناسایی استفاده شد (Oehl et al. 2011).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱. نام علمی و مشخصات جغرافیایی محل جمع آوری گیاهان مورد مطالعه

Table 1- Scientific name and geographical characteristics of the studied plants

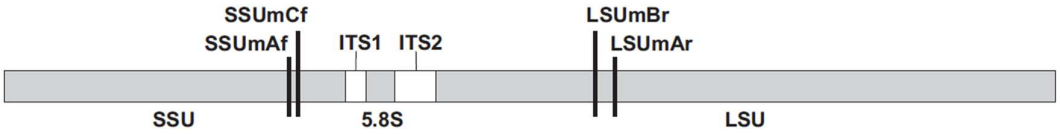
نام Name	نام علمی Scientific name	محل جمع آوری sampling	ارتفاع Altitude	طول جغرافیایی Longitude	عرض جغرافیایی Latitude
آویشن ولگار(باغی) oregano	*Thymus vulgaris*	بردسیر Bardsir	2471	417607	3304925
کلپوره- مریم نخودی Polygermander	*Teucrium polium*	کرمان Kerman	1920	490036	3351632
استبرق Milkweed	*Calotropis procera*	ریگان Rigan	720	682653	3177658
بادرشبو Moldavain	*Dracocephalum moldavica*	ماهان Mahan	1901	527679	3322145
نعنا فلفلی Peppermint	*Mentha piperita*	سیرجان Sirjan	1946	386420	3273444
چای ترش Hibiscus	*Hibiscus sabdarifaa*	جوپار joopar	1819	506055	3332385
هندوانه ابوجهل Bitter Cucumber	*Citrullus colocynthis*	جیرفت Jiroft	650	573255	2932385
گل گاوزبان ایرانی Bugloss	*Echium amoenum*	گلباف Golbaf	1630	573417	3305484

به‌منظور شناسایی مولکولی، از مجموعه‌ی اسپورهای تفکیک‌شده، فراوان‌ترین اسپور زنده جدا شده از خاک هر نمونه، انتخاب و درون میکروتیوب‌های ۰/۲ میلی‌لیتری حاوی آب مقطر استریل قرار داده شدند. قبل از استخراج DNA، برای حذف ذرات خاک و سایر میکروارگانیسم‌های متصل به دیواره اسپور، اسپورها به مدت ۳۰ ثانیه در معرض امواج مافوق صوت (37 KHz) در حمام اولتراسونیک قرار داده شده و سپس سه مرتبه با آب دو بار تقطیر استریل، شسته شدند. از هر گروه اسپوری یک اسپور در ۲۰ میکرولیتر محلول شامل ۱۰ میکرولیتر بافر 5X GoTaq PCR (شرکت سیناکلون) و ۱۰ میکرولیتر آب مقطر

www.SID.ir

Archive of SID

استریل،به وسیله سوزن استریل خرد شده و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۶۰ تا ۶۵ درجه سلسیوس قرار داده شد .سانتریفیوژ با سرعت ۱۳۰۰۰ دور بر دقیقه به‌مدت ۱۰ دقیقه، انجام و فاز رویی به‌عنوان DNA الگو جداسازی شد (Saitou & Nei 1987). برای تکثیرDNA استخراج شده از تک اسپور، از روش PCR آشیانه‌ای استفاده شد. آغازگرهای مورد استفاده برای تکثیر در PCR اول، SSUmaf (TGGGTAATCTTDTGAAACTTYA) و LSuMAR (TGCTGWHACTCAAWYCTATCRAW) بودند که قادر به تکثیر قطعه‌ای به طول ۱۸۰۰ جفت باز از DNA ریبوزومی می‌باشند. مرحله‌ی دوم PCR با آغازگرهای اختصاصی قارچ میکوریز آربسکولار، SSUmCf (TATYGYTCTTNAACGAGGAATC) و LSUmBr (DAACACTCGCAYAYATGYTAGA)، که قادر به تکثیر قطعه‌ی ۱۵۰۰ جفت بازی از DNA ریبوزومی بودند، انجام گردید (شکل ۱) (Krüger et al. 2009).



شکل ۱. نواحی SSU، ITS و LSU از DNA ریبوزومی *Glomus sp.* به طول ٥٤٦٥ جفت باز و موقعیت فرضی پرایمرهای مورد استفاده روی این نواحی (Krüger et al. 2009).

Figure 1. Small subunit (SSU) rDNA, internal transcribed spacer (ITS) region and large subunit (LSU) rDNA (5465 bp) of *Glomus sp.*

واکنش تکثیری اول با حجم ۲۵ میکرولیتر و شامل ۵/۵ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه، ۱۲/۵ میکرولیتر Ampliqon PCR Master Mix 2x، یک میکرولیتر آغازگر رفت ، یک میکرولیتر آغازگر برگشت و پنج میکرولیتر DNA استخراج شده از تک اسپورها انجام گرفت. در واکنش تکثیری دوم به جای DNA استخراج شده، پنج میکرولیتر از محصول PCR اول به‌عنوان DNA الگو مورد استفاده قرار گرفت. حجم واکنش تکثیری، تعداد چرخه‌ها و مراحل PCR دوم مشابه با PCR اول، اما دمای مرحله اتصال برای PCR اول ۵۵ و برای PCR دوم ۶۰ درجه سلسیوس بود .برای بررسی درستی کار، محصول PCR آشیانه‌ای روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد با بافر TBE 1X با اختلاف پتانسیل 85 ولت الکتروفورز شد. مقدار ۳۰ میکرولیتر از هر نمونه به شرکت ژن فناوران جهت ارسال به شرکت Macrogen (کشور کره جنوبی) برای توالی‌یابی فرستاده شد سپس نتایج با استفاده از نرم‌افزارهای BLAST، Gene Runner و Clustal Omega مورد بررسی، هم‌ردیفی و ویرایش قرار گرفت و بر این اساس، نزدیک‌ترین گونه‌ی ثبت شده در بانک ژن NCBI به هر یک از توالی‌های خوانش شده، مشخص شد. در نهایت، رابطه‌ی فیلوژنی

www.SID.ir

Archive of SID

بین توالی‌های خوانش شده وتعدادی از توالی‌های بانک ژن با استفاده از برنامه‌ی MEGA 7 تجزیه و تحلیل گردید و درخت فیلوژنتیکی با روش Neighbor-Joining و براساس آزمون اعتبارسنجی ۱۰۰۰ تکرار رسم شد.

نتایج

بر اساس مطالعات مورفولوژیکی، گونه‌های قارچی مختلفی (جدول ۲) از ریزوسفر گیاهان دارویی مناطق مختلف استان کرمان، شناسایی شدند (شکل ۲).

ویژگی‌های مورفولوژیکی گونه‌های قارچ میکوریز آربوسکولار شناسایی شده؛ گونه *Viscospora viscosa*: دارای اسپورهای کروی تا نیمه کروی و گاهی نامنظم با قطر ۵۰ تا ۱۲۰ میکرومتر به رنگ زرد کاهی و به سطح آن ذرات خاک چسبیده ، است و این اسپورها دارای دیواره دو لایه بوده،لایه اول: نیمه ارتجاعی، موسیلاژی و شفاف با ضخامت ۲-۱ میکرومتر ، لایه دوم: ارتجاعی و شفاف با ضخامت ۰/۵ میکرومتر، لایه سوم: ورقه‌ای و شفاف است و دارای هیف اتصال استوانه‌ای تا کمی قیفی و سه لایه‌ای می‌باشد.

گونه *Septoglomus deserticola*: دارای اسپورهای نیمه‌کروی با قطر ۱۳۰×۱۳۵ میکرومتر به رنگ نارنجی که در محلول ملزر قهوه ای مایل به قرمز می‌شوند، دیواره دارای دولایه است، لایه اول: موسیلاژی روشن با ضخامت ۳ میکرومتر، لایه دوم: ورقه‌ای زرد با ضخامت ۳,۲میکرومتر و هیف اتصال آن زرد کم رنگ با منفذ باز می باشد.

گونه *Funneliformis mosseae*: دارای اسپورهای منفرد به رنگ زرد مایل به قهوه‌ای که در هنگام بلوغ، تیره می‌شوند،که اغلب کروی و به قطر ۱۹۵ تا ۲۰۵ میکرومتر می باشد، دیواره اسپور از ۳ لایه تشکیل شده است؛ لایه اول ناپایدار و موسیلاژی با ضخامت ۱ تا ۴ میکرومتر، لایه دوم قهوه‌ای مایل به قرمز با ضخامت کمتر از ۱ میکرومتر، لایه سوم تیغه‌ای زرد مایل به قهوه‌ای با ضخامت ۳ تا ۵ میکرومتر. رشد این لایه به داخل هیف متصل به اسپور ادامه پیدا کرده و باعث بسته شدن روزنه می‌شود. هیف استوانه‌ای تا قیفی است و دیواره آن از دولایه تشکیل شده است.

گونه*Funneliformis caledonius* : دارای اسپورهای کروی با قطر 190 میکرومتربه رنگ زرد مایل به نارنجی است که دیواره آنها دارای چهار لایه می باشند لایه اول: موسیلاژی با ضخامت ۱ میکرومتر، لایه دوم: سخت و شفاف با ضخامت ۱ میکرومتر، لایه سوم: شکننده و شفاف با ضخامت 2 میکرومتر و لایه چهارم: ورقه‌ای با ضخامت 5 میکرومتراست.

گونه *Diversispora spurca*: اسپورها در این گونه نیمه‌کروی با قطر 109×103 میکرومتراست و شفاف تا زرد کم‌رنگ می باشند دیواره اسپور دارای سه لایه است، لایه اول: موسیلاژی، همرنگ اسپور با ضخامت 1 میکرومتر، لایه دوم: پایدار، ارتجاعی همرنگ اسپور با ضخامت ۱ میکرومتر، لایه سوم: ورقه‌ای شفاف با ضخامت ۴ میکرومتر است.

گونه *Claroideoglomus etunicatum*: دارای اسپورهای منفرد زرد تا نارنجی رنگ کروی به قطر ۷۵ تا ۱۶۰ میکرومترهستند. دیواره اسپوردولایه ، لایه اول : موسیلاژی صورتی مایل به قرمز با ضخامت ۰,۵ تا ۲,۵ میکرومتر ، لایه دوم : ورقه ای با زیرلایه های بهم چسبیده زردرنگ با ضخامت ۴,۵ تا ۱۱میکرومتر می‌باشدو هیف اتصال استوانه‌ای و ممکن است نیمه قیفی باشد و منفذ توسط لایه دوم بسته شده است .

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲. گونه‌های قارچ میکوریز آربوسکولار شناسایی شده همزیست با گیاهان مورد بررسی

Table 2. Identified Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF) species symbiont with studied plants

Scientific name نام علمی گیاه	Arbuscular Mycorrhizal Fungi(AMF) قارچ‌های میکوریز آربوسکولار
Thymus vulgaris	*Glomus ambisporum, Viscospora viscosa Septoglomus constrictum, Funneliformis mosseae, Claroideglomus etunicatum*
Teucrium polium	*Septoglomus constrictum, Funneliformis mosseae, Claroideglomus etunicatum Diversispora spurca*
Calotropis procera	*Septoglomus constrictum, Funneliformis mosseae, Funneliformis caledonium Septoglomus deserticola*
Dracocephalum moldavica	*Viscospora viscosa, Funneliformis mosseae*
Mentha piperita	*Entrophospora infrequens, Claroideglomus etunicatum, Funneliformis caledonium*
Hibiscus sabdarifaa	*Funneliformis mosseae, Viscospora viscosa*
Citrullus colocynthis	*Funneliformis mosseae, Claroideglomus etunicatum*
Echium amoenum	*Septoglomus constrictum, Funneliformis mosseae, Claroideglomus etunicatum Funneliformis caledonium*

گونه: *Septoglomus constrictum* نام و صفت گونه به حالت باریک شدن ریشه در نزدیک محل اتصال به اسپور اشاره دارد، اسپورها منفرد قرمز تا قهوای تیره و کروی به قطر ۱۵۳ تا ۱۸۲ میکرومتر هستند که دیواره دولایه دارند، لایه اول: دیواره ، شفاف و ناپایدار با ضخامت ۰٫۵ تا ۲ میکرومتر و لایه‌ی دوم: ورقه ای قرمز مایل به قهوه ای با ضخامت ۷٫۵ تا ۱۱ میکرومتر است. هیف متصل به اسپور، زرد مایل به قهوه ای، مستقیم یا خمیده و در محل اتصال، باریک شده است روزنه، ابتدا نازک و سپس با افزایش سن، ضخیم می‌شود و به‌وسیله یکی از لایه های داخلی لایه دوم بسته می‌شود.

گونه *Entrophospora infrequens*: اسپورها در خاک به صورت تکی و کروی زرد رنگ تا نارنجی مایل به قهوه ای و قطر ۹۵ تا ۱۷۵ میکرومتر هستند که اسپور دارای دیواره چهار لایه است لایه اول: شفاف با ضخامت ۱٫۵ تا ۴٫۵ میکرومتر ، لایه دوم: صاف با ضخامت ۲٫۸ تا ۶

www.SID.ir

Archive of SID

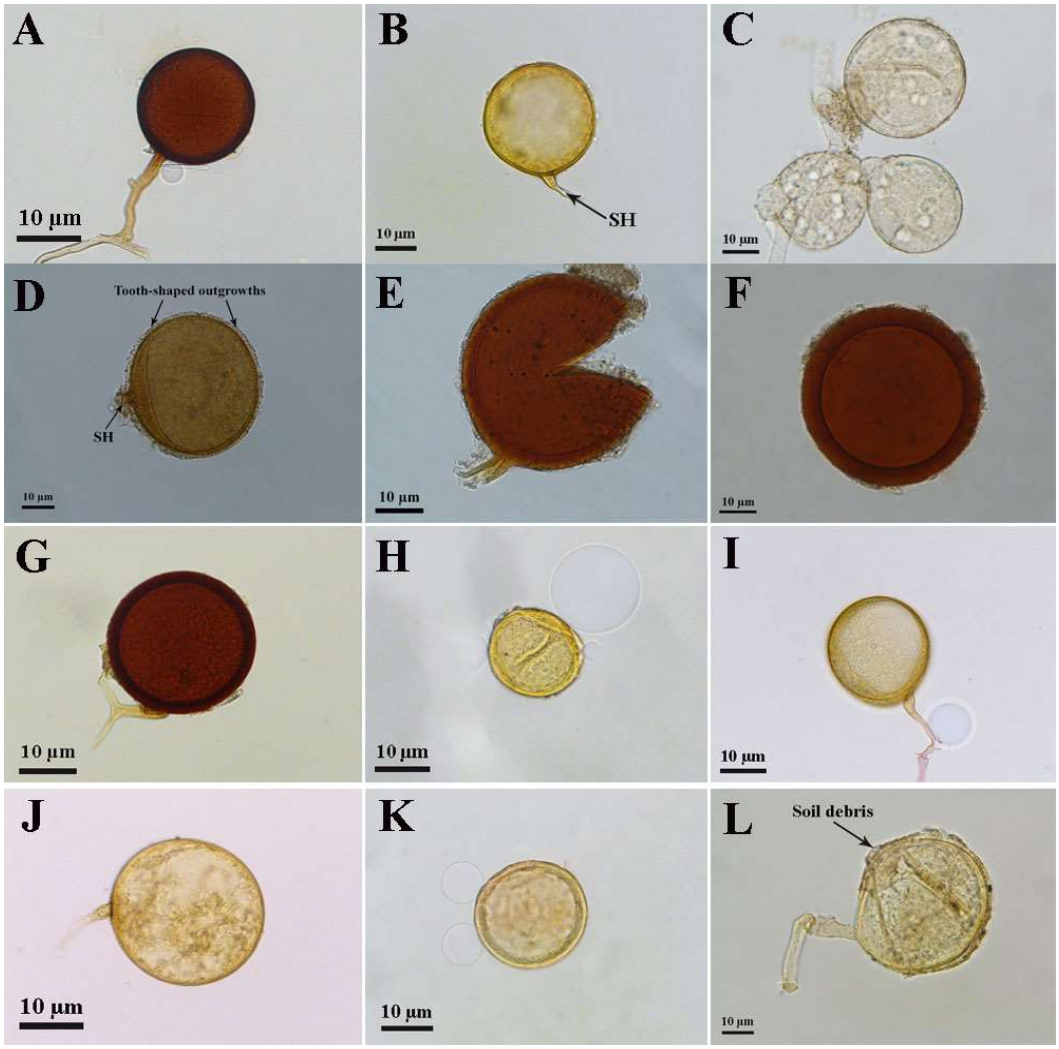
میکرومتر ، لایه سوم: ورقه ای به رنگ نارنجی مایل به قهوه ای و ضخامت ۱،۵ تا ۴،۵ میکرومتر و لایه چهارم نیمه ارتجاعی صاف وزرد طلایی با ضخامت ۰،۵ میکرومتر است(لایه چهارم اغلب به سختی مشاهده می شود).

گونه *Glomus ambisporum* : دارای اسپورهای کروی ، نیمه کروی یا بیضوی به قطر ۱۰۰ تا ۲۰۰ میکرومتر است، اسپورها به صورت منفرد یا تجمعی به رنگ قهوه‌ای روشن یا تیره تا سیاه رنگ مشاهده می شوند و دیواره اسپور دارای سه لایه است لایه اول: ناپایدار، نیمه شفاف با ضخامت ۱،۵ تا ۵ میکرومتر ، لایه دوم: ورقه‌ای قهوه‌ای رنگ با ضخامت ۶ تا ۱۴ میکرومتر و لایه سوم: نیمه ارتجاعی با ضخامت کمتر از ۱ میکرومتر و هیف اتصال اسپورها به رنگ روشن، مستقیم، دو لایه‌ای (لایه اول و دوم دیواره اسپور) که روزنه باز یا بسته می‌باشد.

با توجه به این‌که برای شناسایی مولکولی اسپورهای قارچ های مایکوریز سلامت آن‌ها مهم می‌باشد، اسپورهای با ظاهر سالم و زنده و دارای محتویات سیتوپلاسمی برای مطالعات مولکولی، جداسازی شدند و پس از استخراج DNA و به دنبال تکثیر ناحیه ITS و بخشی از ناحیه SSU و LSU با استفاده از آغازگرهای SSUmAf و LSUmAr در مرحله اول و SSUmCf و LSUmBr در مرحله دوم واکنش PCR آشیانه‌ای، قطعه مورد انتظار به طول ۱۵۰۰ جفت باز روی ژل الکتروفورز، مشاهده شد (شکل ۳). پس از دریافت نتیجه‌ی توالی‌یابی محصولات PCR آشیانه‌ای DNA اسپورهای مورد مطالعه و ویرایش و بررسی آن‌ها با نرم‌افزارهای BLAST، Gene Runner و Clustal Omega، ۵ گونه متعلق به ۳ جنس، شناسایی گردید که عبارتند از: *Viscospora viscosa*، *Septoglomus deserticola*، *Funneliformis mosseae*، *Funneliformis caledonium* و *Diversispora spurca*. پس از رسم درخت فیلوژنی، مشاهده شد که جدایه B جدا شده از نمونه خاک ریزوسفر گیاه بادرشبو و جدایه C جدا شده از نمونه خاک ریزوسفر گیاه چای ترش به عنوان گونه‌ی *Viscospora viscosa*با درجه اعتبار ۱۰۰ درصد به همراه توالی‌های مرجع در یک کلاد مجزا قرار گرفتند و جدایه T جدا شده از نمونه خاک ریزوسفر گیاه استبرق به عنوان گونه‌ی *Septoglomus deserticola* با درجه اعتبار ۹۸ درصد به همراه توالی های مرجع مرتبط در کلاد اختصاصی قرار گرفت و با درجه اعتبار ۹۳ درصد به صورت خواهری در کنار گونه های *Septoglomus africanum* و *Septoglomus turnauae* قرار گرفت. جدایه P متعلق به گونه‌ی *Funneliformis caledonium* که از نمونه خاک ریزوسفر گیاه نعناع فلفلی جداسازی شده با درجه اعتبار ۹۰ درصد به همراه توالی مرجع در کلاد مجزا قرار گرفت و جدایه‌های D,M و H به عنوان گونه‌ی *Funneliformis mosseae* به ترتیب از نمونه خاک های ریزوسفر گیاهان آویشن ولگار ، گل گاوزبان و هندوانه ابوجهل جداسازی شدند و با درجه اعتبار ۹۴ درصد به همراه توالی های مرجع در کلاد مجزا قرار گرفتند و جدایه K به عنوان گونه‌ی *Diversispora spurca* که از نمونه خاک ریزوسفر گیاه مریم نخودی جداسازی شده با درجه اعتبار ۱۰۰ درصد به همراه توالی های مرجع در کلاد مجزا قرار گرفت. و جدایه های M,D,P و H با درجه اعتبار ۱۰۰ در صد در کنار گونه های *Funneliformis mosseae* و *Funneliformis coronatum* قرار گرفتند (شکل ۴).

www.SID.ir

Archive of SID

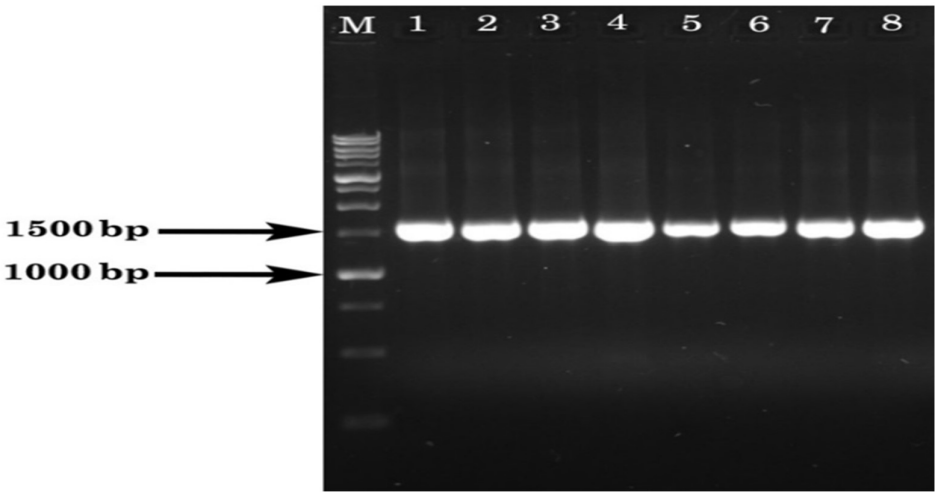


شکل ۲. ویژگی های میکروسکوپی گونه های قارچ های میکوریز آربوسکولار شناسایی شده در ریزوسفر گیاهان مورد مطالعه؛ تصاویر به ترتیب از A تا L: ***Septoglomus constrictum*** **،** ***Funneliformis mosseae*** **،** ***Viscospora viscosa*** **،** ***Entrophospora infrequens*** **،** ***Glomus ambisporum*** **،** ***Septoglomus deserticola*** **،** ***Diversispora spurca*** **،** ***Funneliformis mosseae*** **،** ***Funneliformis mosseae*** **،** ***Funneliformis caledonius*** **،** ***Viscospora viscosa***

Figure 2. Microscopic characteristics of AMF species identified in the studied plants rhizosphere; Images respectively A to L: ***Septoglomus conestrictum, Funneliformis mosseae, Viscospora viscosa Entrophospora infrequens, Glomus ambisporum, Septoglomus deserticola, Diversispora spurca, Funneliformis mosseae, Funneliformis mosseae, Funneliformis caledonius, Viscospora viscosa***

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳. نیم‌رخ الکتروفورزی محصول PCR آشیانه‌ای ناحیه ITS و بخشی از LSU و SSU قارچ‌های میکوریز آربسکولار. ۱ تا ۸، به‌ترتیب اسپورهای B، C، D، H، K، M، P و T می‌باشند.. M: نشانگر مولکولی DNA 1kb (Fermentas).

Figure 3. The electrophoretic profile of Nested-PCR product represents amplification of ITS region and fragments of LSU and SSU regions from AMF spores. 1 to 8, respectively are B, C, D, H, K, M, P and T. M: 1Kb Ladder (Fermentas, company).

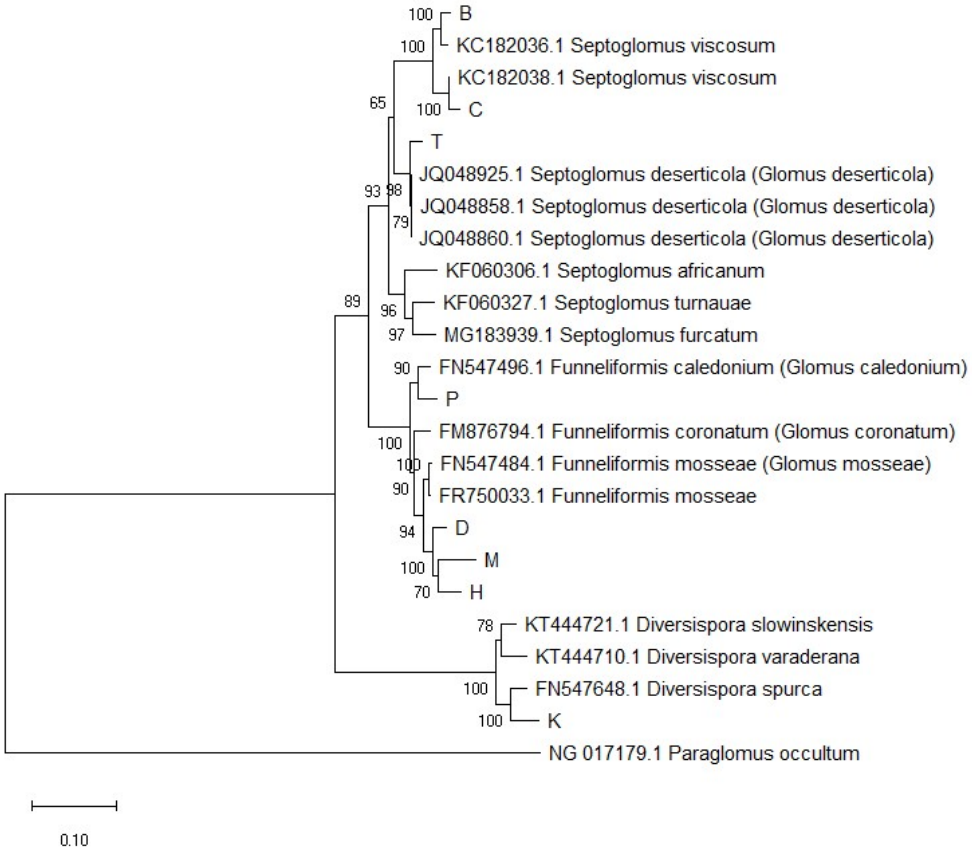
بحث

پژوهشگران شاخه Glomeromycota را به چهار راسته Diversisporales، Glomerales، Archaeosporales و Paraglomerales تقسیم نمودند (Krüger et al. 2012). پژوهشگران دیگر پس از تشکیل شاخه جدید Glomeromycota در قارچ‌ها اظهار نمودند که جنس Glomus باید به چند خانواده تقسیم شود (SCHÜßLER et al. 2001). اولین راسته‌ی Glomeromycota که بر پایه مطالعات اولیه SSU rDNA ایجاد گردید Glomerales می‌باشد. هم‌اکنون این راسته دارای دو خانواده Glomeraceae و Claroideoglomeraceae می‌باشد (Helgason et al. 2003). براساس تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی ناحیه SSU rDNA، خانواده Glomeraceae ایجاد و جنس Glomus به جنس‌های Funneliformis، Sclerocystis و Rhizophagus تفکیک شد و در این خانواده قرار گرفت (Schüßler & Walker 2010). این خانواده شامل جنس‌های Glomus، Funneliformis، Simiglomus و Septoglomus می‌باشد. در این مطالعه، گونه‌های شناسایی شده به روش مولکولی در راسته Glomerales قرار گرفتند. جنس Viscospora به عنوان جنس جدید در راسته Claroideoglomeraceae ارائه شد (Oehl et al 2011). بعضی گونه‌های قارچ میکوریز آربوسکولار، مثل Funneliformis mosseae در مناطق مختلف جهان و در طیف وسیعی از اکوسیستم‌های طبیعی، یافت شده که نشان‌دهنده‌ی

www.SID.ir

Archive of SID

ترجیح کم میزبانی و وفور آن‌هاست (Öpik et al. 2003; Börstler et al. 2006). در بررسی‌های مورفولوژیکی و مولکولی، گونه Funneliformis mosseae به طور فراوان از ناحیه ریزوسفر گیاهان دارویی استان کرمان شناسایی شد.



شکل ٤. درخت فیلوژنی گونه‌های قارچ‌های میکوریز آربسکولار جداسازی و شناسایی شده بر اساس بخشی از DNA ریبوزومی. این شجره با استفاده از نرم‌افزار MEGA7 و روش Neighbor-Joining از طریق آزمون اعتبار سنجی bootstrap با ۱۰۰۰ تکرار آنالیز و رسم شده است. گونه‌ی *Paraglomus accultum* به‌عنوان out group استفاده گردید. گونه‌های تعیین توالی شده، با حروف B، C، D، H، K، M، P و T مشخص شده‌اند.

Figure 4. AMF identified species Phylogenetic tree. This tree analyzed by MEGA7 software through Neighbor-Joining method and bootstrap test with 1000 repetition. *Paraglomus accultum* was used as out group. The sequenced species are identified by the letters B, C, D, H, K, M, P and T.

نتایج پژوهشی نشان داد گونه *F. mosseae* فراوان‌ترین گونه در مناطق خشک ایران است (Sabetjahromi et al. 2012). این امر می‌تواند به علت سازگاری بالا *F. mosseae* با تنش‌ها و شرایط محیطی مختلف و همچنین ترجیح کم میزبانی

www.SID.ir

Archive of SID

این گونه باشد (Öpik et al. 2003; Börstler et al. 2006). نتایج این پژوهش می‌تواند گویای اختصاصی نبودن گیاه میزبان برای *F. mosseae* باشد. در نتایج پژوهش ما نیز بیشترین اسپورهای زنده جدا شده از گیاهان دارویی متعلق به این گونه بود به‌طوری‌که از بین هشت جدایه که شناسایی شده سه جدایه متعلق به گونه *F. mosseae* بود و همچنین نتایج بررسی فیلوژنتیکی گونه‌های مختلف این جنس در پژوهش حاضر با همه‌ی نتایج پژوهش‌های قبلی مطابقت دارد. این گونه از زیتون، سویا، مرکبات و پسته شناسایی شده است (Sadravi 2002; Sadravi & Seifi 2002; Sedaghati et al. 2005; Zangeneh et al. 2005). همچنین Salehi-jozani et al. (2011) و Sabetjahromi et al. (2012) با استفاده از روش مولکولی این گونه را شناسایی کرده‌اند. جنس *Funneliformis* در سال ۲۰۱۱ با استفاده از توالی DNA ریبوزومی و ژن بتاتوبولین به‌عنوان جنس جدید معرفی شد. نام‌گذاری این جنس براساس شکل قیفی محل اتصال هیف به اسپور می‌باشد (Oehl et al. 2011). گونه‌ی *Funneliformis caledonium*، در مزرعه و در انواع خاک‌های فقیر و غنی یافت می‌شود. اسپور این گونه از نظر اندازه و رنگ و نحوه اتصال قیفی شکل هیف به اسپور با گونه *F. mosseae* شباهت دارد؛ این دو گونه در تعداد لایه‌های دیواره اسپور، متفاوت می‌باشند (Blaszkowski 1989). گونه *F.caledonium* در پژوهش Krüger et al. (2012) که براساس تعیین توالی بخشی از ناحیه DNA ریبوزومی انجام شد، به همراه گونه *F. coronatum* در کلاد مشترک در کنار سایر گونه‌های جنس *Funneliformis* قرار گرفت. گونه‌ی *Funneliformis mosseae* ، به افتخار یابنده آن، خانم دکتر باربارا موسی[3] نام‌گذاری شده‌است. نزدیک‌ترین گونه به این قارچ گونه *F. coronatum* است؛ ولی در این گونه دیواره اسپور از دو لایه تشکیل شده است و فاقد لایه موسیلاژی می‌باشد (Hall 1984). گونه *F.caledonium* از ریشه‌ی گندم، جو، ذرت و سورگوم گزارش شده است (Sadravi 2002).

در بررسی Schubler et al. (2001) که براساس توالی SSU rDNA انجام شده بود، گونه‌های جنس *Septoglomus* به همراه اعضای جنس *Glomus* در یک گروه قرار گرفتند. تا اینکه جنس *Septoglomus* در سال ۲۰۱۱ با استفاده از توالی DNA ریبوزومی و ژن بتاتوبولین، از *Glomus* جدا و به‌عنوان جنس جدید معرفی شد (Oehl et al. 2011). گونه‌ی *Se. deserticola* تقریباً مشابه گونه *Se. constrictum* می‌باشد اما دیواره اسپورهای *Se. deserticola* شامل یک لایه موسیلاژی و یک لایه ورقه‌ای است (Stürmer & Morton 1997). در این پژوهش از بین گونه های شناسایی شده ۳ گونه متعلق به جنس *Septoglomus* بود که دو گونه آن شناسایی مولکولی شد موقعیت فیلوژنتیکی این جنس در پژوهش حاضر با نتایج فوق مطابقت دارد. این گونه در ایران از زیتون، مرکبات و گندم گزارش شده است (Sadravi & Seifi 2002; Zangeneh et al. 2005; Sadravi 2006). این گونه را Salehi-jozani et al. (2011) با استفاده از روش مولکولی شناسایی کردند. در این مطالعه، موقعیت فیلوژنتیکی و جایگاه تاکسونومیکی اعضای راسته‌ی Glomerales نسبت به یکدیگر و سایر تاکسون‌های مورد بررسی در درخت ترسیم شده با نتایج Redecker et al. (2013) مطابقت دارد.

[3]. Barbara Mosse

www.SID.ir

Archive of SID

تعدادی از گونه‌های جنس *Glomus* از جمله *G. eburneum* و *G. aurantium* قبلا در گروه *Glomus* group c قرار داشتند. با استفاده از توالی زیر واحد بزرگ و کوچک DNA ریبوزومی، توالی بتاتوبولین و خصوصیات مورفولوژیکی، این جنس را در کلاد جداگانه‌ی با درجه اعتبار ۹۵ درصد قرار داده و به‌عنوان جنس جدید *Diversispora* و در خانواده Diversisporaceae معرفی نموده‌اند. در جنس *Diversispora* اسپورها به‌صورت Diversisporoid تشکیل می‌شوند و گونه تیپ این جنس *D. spurca* معرفی شده است (Oehl et al. 2011). در این تحقیق بیشترین اسپور زنده متعلق به نمونه خاک ریزوسفر گیاه مریم نخودی به این جنس تعلق داشت که از لحاظ مورفولوژی و مولکولی با مشخصات آن منطبق بود. بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه، ناحیه‌ی تکثیر شده به‌خوبی راسته‌ها، خانواده‌ها و جنس‌های میکوریز آربسکولار را از همدیگر تفکیک نمود و تمامی گونه‌های شناسایی شده در جایگاه تاکسونومیکی اختصاصی مورد انتظار خود قرار گرفتند. در این پژوهش، روش‌های شناسایی مورفولوژی و مولکولی، تکمیل کننده و تأییدکننده‌ی یکدیگر بوده است. با توجه به لزوم استفاده از DNA به دست آمده از تک اسپور و میزان پایین DNA استخراج شده، واحدهای تکراری DNA ریبوزومی به‌عنوان یک ناحیه مناسب برای شناسایی بسیاری از گونه‌های قارچ‌های میکوریز آربسکولار در اکثر پژوهش‌ها استفاده شده‌اند (Vierheilig et al. 2005).

تاکسونومی قارچ‌های میکوریز آربسکولار به‌طور معمول براساس مورفولوژی اسپورها پایه‌ریزی شده است. جنس‌ها و خانواده‌ها عمدتاً بر اساس اندازه و رنگ اسپور، تعداد و نوع لایه‌های دیواره اسپور، نحوه اتصال هیف به اسپور و نحوه تشکیل اسپور قابل تشخیص می‌باشند. در حالی که ریز ساختارهای دیواره اسپور نقش مهمی را در تشخیص گونه‌ها بازی می‌کنند. که در این پژوهش ۷ گونه قارچ میکوریز آربسکولار نیز به خوبی با توجه به ویژگی‌های مورفولوژیکی نامبرده شناسایی شدند. البته با توجه به تنوع بسیار بالای ویژگی‌های مورفولوژیکی اسپورهای یک گونه، امکان شناسایی مورفولوژیکی در همه مراحل رشد و توسعه امکان‌پذیر نمی‌باشد. به همین دلیل استفاده از روش های مولکولی برای شناسایی این اسپورها از اهمیت ویژه ای برخوردار است. به‌طور کلی تعداد و نوع اسپورهای قارچ میکوریز آربسکولار موجود در خاک با عوامل متعددی از جمله فعالیت میکروبی خاک، درجه حرارت، عملیات خاکی انجام شده، نور و حاصلخیزی خاک ارتباط دارد. اما اختصاصیت میزبانی کامل بین گونه‌های قارچ‌های میکوریز آربسکولار با گیاهان میزبان وجود ندارد (Schenck & Schroder 1974; Menge et al. 1978; Johnson et al. 1982; Walker 1982; Zak et al. 1982).

نتیجه‌گیری: در تحقیق اخیر از ریزوسفر ریشه گیاهان دارویی تعداد فراوانی اسپور قارچ های میکوریز آربوسکولار جداسازی و شناسایی شد. با توجه به اینکه نقش این قارچ ها در تحمل تنش های شوری و خشکی توسط محققین بسیاری به اثبات رسیده، حضور این گیاهان به صورت خودرو در اکثر مناطق استان با پراکنش فراوان و همچنین رشد و تکثیر خوب آنها در مناطق مختلف آب و هوایی، نشان‌دهنده تاثیر حضور این قارچ های همزیست در تکثیر و رشد این گیاهان بوده که باعث سازگاری این گیاهان با مناطق خشک و نیمه خشک و کوهستانی استان شده و این گیاهان را به تنش‌های خشکی و شوری منطقه متحمل کرده است.

www.SID.ir

Archive of SID

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از خانم دکتر مهدیه اسدی عضو علمی گروه حشره شناسی دانشگاه شهید باهنر کرمان به دلیل در اختیار گذاشتن امکانات برای تکمیل این تحقیق سپاسگزاری می‌کنند.

منابع

احیایی احمد رضا؛ رضوانی مقدم پرویز؛ امیری ده احمدی سید رضا (۱۳۸۸) بررسی تاثیر تنش خشکی بر برخی شاخص های مورفولوژیکی سه گیاه دارویی خارمریم ، همیشه بهار و سیاهدانه در شرایط گلخانه. اولین همایش ملی تنش های محیطی در علوم کشاورزی

امیدبیگی رضا (۱۳۸۴) تولید و فرآوری گیاهان دارویی. ویرایش دوم. انتشارات آستان قدس رضوی. ۴۳۸.

ثابت جهرمی مهدی؛ صالحی جوزانی غلامرضا؛ حسینی ملیحه؛ خیام نکویی سید مجتبی؛ اکبری والا سپیده (۱۳۹۱) جداسازی و شناسایی قارچ‌های میکوریز آربسکولار بومی در خاک‌های مناطق خشک زراعی ایران با استفاده از روش PCR آشیانه‌ای. زیست فناوری تربیت مدرس ۳. ۱-۱۳.

زنگنه سیما؛ شیروانی علی بخش؛ علیان یعقوب؛ نجفی‌نیا موسی؛ کرم‌پور فرزاد؛ قلعه‌دزدانی حجت الله (۱۳۸۴) معرفی گونه‌های جدیدی از قارچ‌های آربسکولار-میکوریزا از ریزوسفر مرکبات ایران. رستنی‌ها جلد ۶، ۷۷-۸.

صالحی‌جوزانی غلامرضا؛ اکبری‌والا سپیده؛ ثابت‌جهرمی مهدی؛ مرسلی حسن (۱۳۹۰) جداسازی و شناسایی قارچ‌های میکوریز آربوسکولار غالب در ریزوسفر گندم، جو و علف‌های هرز برخی مناطق زراعی شور ایران. مجله علمی-پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی. جلد ۱، ۷۵-۶۱.

صدروی مهدی (۱۳۸۱) معرفی پنج گونه گلوموس از قارچ‌های میکوریز آربوسکولار ایران. علوم کشاورزی و منابع طبیعی ایران. جلد ۹. ۳۰-۱۵.

صدروی مهدی؛ (۱۳۸۵) قارچ‌های میکوریز آربوسکولار مزارع گندم در استان گلستان. مجله رستنی‌ها. جلد ۷، ۱۴۰-۱۲۹.

فدایی الهام؛ پرویزی یحیی؛ گردکانه محمد؛ خان احمدی معصومه (۱۳۹۷) تأثیر القای سویه های قارچ میکوریزا Glomus intraradiceae Glomus mosseae و فسفر بررشد و ترکیبات فیتوشیمیایی بادرشبو (Dracocephalum moldavica L.) تحت شرایط تنش خشکی. فصلنامه گیاهان دارویی ۱۷، ۱۱۷-۱۳۰.

www.SID.ir

Archive of SID

References

Akiyama K, Hayashi H (2002) Arbuscular mycorrhizal fungus-promoted accumulation of two new triterpenoids in cucumber roots. Biosci Biotech Bioch 66, 762-769.

Augé RM (2001) Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. Mycorrhiza 11, 3-42.

Blaszkowski J (1989) Polish Endogonaceae 1. Acaulospora bireticulata, Entrophospora infrequens, Glomus caledonium, and Scutellospora pellucida. Karstenia 29, 1-10.

Błaszkowski J (1993) Comparative studies of the occurrence of arbuscular fungi and mycorrhizae (Glomales) in cultivated and uncultivated soils of Poland. Acta Mycol 28, 93.

Börstler B, Renker C, Kahmen A et al. (2006) Species composition of arbuscular mycorrhizal fungi in two mountain meadows with differing management types and levels of plant biodiversity. Biol Fert Soil 42, 286-298.

Copetta A, Lingua G, Berta G (2006) Effects of three AM fungi on growth, distribution of glandular hairs, and essential oil production in Ocimum basilicum L .var. Genovese. Mycorrhiza 16, 485-494.

Ehyaei A, Rezvanimoghadam P, Amiridehahmadi S (2009) Investigation of the effect of drought stress on some morphological indices of three medicinal plants of thistle, evergreen and black seed in greenhouse conditions. First National Conference on Environmental Stress in Agricultural Sciences.

Fadaei E, Parvizi Y, Gordekaneh M et al. (2018) Effect of induction of Mycorrhiza fungi strains Glomus intraradiceae Glomus mosseae and phosphorus and phytochemicals on Dracocephalum moldavica L. under drought stress. J Medicin Plant 17, 117-130.

Frank A (1885) Über die auf Würzelsymbiose beruhende Ehrnährung gewisser Bäum durch unterirdische Pilze Berichte der Deutschen. Ber Dtsch Bot Ges 3 3, 128–145.

Gerdemann J, Nicolson TH (1963) Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. British Mycological Society 46, 235-244.

Gupta M, Prasad A, Ram M et al. (2002) Effect of the vesicular–arbuscular mycorrhizal (VAM) fungus Glomus fasciculatum on the essential oil yield related characters and nutrient acquisition in the crops of different cultivars of menthol mint (Mentha arvensis) under field conditionsBioresour. Technol. 81, 77-79.

www.SID.ir

Archive of SID

Hall I (1984) Taxonomy of VA mycorrhizal fungi. VA Mycorrhiza, 57-94.

Helgason T, Watson IJ, Young JPW (2003) Phylogeny of the Glomerales and Diversisporales (Fungi: Glomeromycota) from actin and elongation factor 1-alpha sequences. FEMS Microbiol Lett 229, 127-132

Johnson C, Menge J, Schwab S et al. (1982) Interaction of photoperiod and vesicular-arbuscular mycorrhizae on growth and metabolism of sweet orange. New Phytol 90, 665-669.

Kamienski F (1881) Die Vegetation sorgane der Monotropa hypopitys L. Bot Zeitschr 39, 225-234.

Krüger M, Krüger C, Walker C et al. (2012) Phylogenetic reference data for systematics and phylotaxonomy of arbuscular mycorrhizal fungi from phylum to species level. New Phytol 193, 970-984.

Krüger M, Stockinger H, Krüger C et al. (2009) DNA-based species level detection of Glomeromycota: one PCR primer set for all arbuscular mycorrhizal fungi. New Phytol 183, 212-223.

Menge J, Steirle D, Bagyaraj D et al. (1978) Phosphorus concentrations in plants responsible for inhibition of mycorrhizal infection. New Phytol 80, 575-578.

Miyasaka SC, Habte M, Friday J et al. (2003) Manual on arbuscular mycorrhizal fungus production and inoculation techniques. SCM-5 21, 1-4

Oehl F, Silva GAd, Goto BT et al. (2011) Glomeromycota: three new genera and glomoid species reorganized. Mycotaxon 116, 75-120.

Omidbeigi R (2005) Production and Processing of Medicinal Plants. Astan Ghods Razavi.

Öpik M, Moora M, Liira J et al. (2003) Divergent arbuscular mycorrhizal fungal communities colonize roots of Pulsatilla spp. in boreal Scots pine forest and grassland soils. New Phytol 160, 581-593.

Redecker D, Schüßler A, Stockinger H et al. (2013) An evidence-based consensus for the classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). Mycorrhiza 23, 515-531.

Sabetjahromi M, Slehijozani G, Hoseini M et al. (2012) Isolation and characterization of native arbuscular mycorrhizal fungi in soils of arid regions of Iran using nested PCR method. Trbiat Modares Biotechol 3, 1-13.

www.SID.ir

Archive of SID

Sadhana B (2014) Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF) as a Biofertilizer-a Review. Int J Curr Microbiol App Sci 3, 384-400.

Sadravi M (2002) Symbiotic fungi of soybean root, sunflower and sesame in Golestan province. The first national conference and festival of oilseeds.

Sadravi M (2006) Arbuscular mycorrhizal fungi in wheat fields in Golestan province. Vegetable 7, 129-140.

Sadravi M, Seifi A (2002) Symbiotic fungi of olive root in Golestan province, Province SCoRPoG (ed).

Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol 4, 406-425.

Salehi-jozani G, Akbari-vala S, Sabet-Jahromi M et al. (2011) Isolation and identification of dominant arbuscular mycorrhizal fungi in wheat, barley and weed rhizosphere of some saline crop areas of Iran. Crop Biotechnol 1, 61-75.

Sanders IR, Alt M, Groppe K et al. (1995) Identification of ribosomal DNA polymorphisms among and within spores of the Glomales: application to studies on the genetic diversity of arbuscular mycorrhizal fungal communities. New Phytol 130, 419-427.

Schenck N, Schroder V (1974) Temperature response of Endogone mycorrhiza on soybean roots. Mycologia 66, 600-605.

Schenck NC, Perez Y (1990) Manual for the identification of VA mycorrhizal fungi. Synergistic Publications Gainesville.

SCHÜßLER A, Schwarzott D, Walker C (2001) A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. Mycol Res 105, 1413-1421.

Schüßler A, Walker C (2010) The Glomeromycota: a species list with new families and new genera. The Royal Botanic Garden Kew, Botanische Staatssammlung Munich, and Oregon State University 19.

Sedaghati E, Hosseini A, Khodayegan P et al. (2005) Report of some species of arbuscular Mycorrhiza fungi from Pistachio orchards Rafsanjan, Iran. In: Proceedings of the International Symposium on Pistachio and Almond ISHS Tehran Iran.

Smith SE, Read DJ (2010) Mycorrhizal symbiosis. Academic Press.

Stürmer SL, Morton JB (1997) Developmental patterns defining morphological characters in spores of four species in Glomus. Mycologia 89, 72-81.

www.SID.ir

Archive of SID

Sylvia D, Will M (1988) Establishment of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and other microorganisms on a beach replenishment site in Florida. Appl Environ Microbiol 54, 348-352.

Sylvia DM (1992) 3 Quantification of External Hyphae of Vesicular-arbuscular Mycorrhizal Fungi. Meths Microbiol 53-65.

Toussaint J-P, Smith F, Smith S (2007) Arbuscular mycorrhizal fungi can induce the production of phytochemicals in sweet basil irrespective of phosphorus nutrition. Mycorrhiza 17, 291-297.

Uniyal RC, Uniyal MR, Jain P (2000) Cultivation of medicinal plants in India: a reference book. TRAFFIC-India.

Vierheilig H, Gagnon H, Strack D et al. (2000a) Accumulation of cyclohexenone derivatives in barley, wheat and maize roots in response to inoculation with different arbuscular mycorrhizal fungi. Mycorrhiza 9, 291-293.

Vierheilig H, Maier W, Wyss U et al. (2000b) Cyclohexenone derivative-and phosphate-levels in split-root systems and their role in the systemic suppression of mycorrhization in precolonized barley plants. J Plant Physiol 157, 593-599.

Vierheilig H, Schweiger P, Brundrett M (2005) An overview of methods for the detection and observation of arbuscular mycorrhizal fungi in roots. Physiol Plantarum 125, 393-404.

Walker C (1982) Species in the Endogonaceae: a new species (Glomus occultum) and a new combination (Glomus geosporum). Mycotaxon 15, 49-61.

Wöstemeyer J, Burmester A (1986) Structural organization of the genome of the zygomycete Absidia glauca: evidence for high repetitive DNA content. Curr. Genet 10, 903-907.

Zak J, Danielson R, Parkinson D (1982) Mycorrhizal fungal spore numbers and species occurrence in two amended mine spoils in Alberta, Canada. Mycologia 74, 785-792.

Zangeneh S, Shirvani A, Alian Y et al. (2005) Introducing new species of arbuscular-mycorrhizal fungi from the Iranian citrus rhizosphere. Vegetable 6, 8-77.

Zolfaghari M, Nazeri V, Sefidkon F et al. (2013) Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on plant growth and essential oil content and composition of Ocimum basilicum L.

www.SID.ir

Archive of SID

www.SID.ir