

## تنوع قارچ‌های اکتومیکوریز همزیست با ریشه گونه‌های مختلف بلوط در جنگل‌های هیرکانی

سیده معصومه زمانی<sup>۱</sup>، ابراهیم محمدی گل تپه<sup>۲</sup>، ناصر صفایی<sup>۳\*</sup> و مجید پدرام<sup>۴</sup>

۱- استادیار، مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

۲- استاد، گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- نویسنده مسئول، دانشیار، گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران. پست الکترونیک: nsafaie@modares.ac.ir

۴- استادیار، گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۱/۲۷

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۴/۳۱

### چکیده

همزیستی اکتومیکوریزی نقش کلیدی در استقرار و عملکرد درختان در بوم‌سازگان‌های جنگلی ایفا می‌کند. با وجود اهمیت فراوان قارچ‌های اکتومیکوریز در سلامت درختان میزبان، اطلاعات کمی در مورد نحوه پراکنش و فراوانی این قارچ‌های همزیست در جنگل‌های ایران موجود است. این در حالی است که شناسایی این قارچ‌ها، گام نخست مطالعات مرتبط با این همزیستی محسوب می‌شود و برای بهره‌برداری از حداکثر پتانسیل آن در مدیریت جنگل، امری ضروری است. در این پژوهش، شناسایی قارچ‌های اکتومیکوریز همراه با درختان بلندمازو (*Quercus castaneifolia* C. A. Mey.)، اوری (*Q. macranthera* Fisch. & C. A. Mey. ex Hohen.) و بلوط سفید (*Q. petraea* L.) در شش رویشگاه از جنگل‌های هیرکانی انجام شد. ابتدا نوک‌ریشه‌های اکتومیکوریزی پایه‌هایی از هر گونه جمع‌آوری شد. شناسایی مولکولی قارچ همزیست آن‌ها از طریق تکثیر نواحی ITS گونه‌های قارچی و تعیین توالی این نواحی و تجزیه و تحلیل‌های فیلوژنتیکی آن‌ها با توالی‌های موجود در پایگاه داده‌ها توسط روش بیزین (Bayesian) انجام شد. دویست و هفت سیستم ریشه‌ای از رویشگاه‌های مورد مطالعه جمع‌آوری شد و ۴۹ تاکسون از قارچ‌های اکتومیکوریز بر اساس الگوریتم بلاست (Blast) در میان آن‌ها شناسایی شد. در مجموع، این قارچ‌ها به ۱۳ جنس مختلف شامل *Boletus*, *Amanita*, *Scleroderma*, *Russula*, *Lycoperdon*, *Lactarius*, *Laccaria*, *Inocybe*, *Hygrophorus*, *Hydnum*, *Hebeloma*, *Cortinarius* و *Tricholoma* تعلق داشتند و گونه‌هایی از *Russula*, *Lactarius* و *Inocybe* غالب‌ترین و متنوع‌ترین گروه‌های یافت‌شده بودند. همچنین، براساس تجزیه و تحلیل‌های فیلوژنتیکی، شناسایی ۱۷ تاکسون در سطح گونه و ۳۲ تاکسون در سطح جنس تأیید شد. نتایج این پژوهش نشان داد که جمعیت متنوعی از قارچ‌های اکتومیکوریز در جنگل‌های هیرکانی همراه با درختان بلوط وجود دارد.

واژه‌های کلیدی: الگوریتم بلاست، اوری، بلندمازو، بلوط سفید، تحلیل فیلوژنتیکی، جمعیت، روش بیزین.

### مقدمه

گونه‌های مهم و غالب درختی در جنگل‌های معتدله، مدیترانه‌ای و نیمه‌گرمسیری شکل می‌گیرد و نقش مهمی در استقرار، عملکرد و تکامل درختان در بوم‌سازگان‌های جنگلی ایفا می‌کند (Smith & Read, 2008). این همزیستی در بهبود سلامت گیاه از طریق محافظت از آن در برابر

همزیستی اکتومیکوریزی، همزیستی گسترده‌ای است که میان برخی قارچ‌های بازیدیومیست و آسکومیست مانند ترافل‌ها (Truffles)، بولت‌ها (Bolets)، آمانیتاها (Amanitas) و کانترل‌ها (Chanterelles) با ریشه‌های

شده است. به‌خصوص زمانی که داده‌های ریخت‌شناسی مفید نباشند و یا تعیین دقیق مرز گونه‌های نزدیک به هم امکان‌پذیر نباشد (Suz *et al.*, 2008). در این زمینه تا کنون تکنیک‌های مولکولی متفاوتی مانند Polymerase Chain Reaction Restriction Fragment Length Real-DNA probing, Polymorphism (PCR-RFLP) time PCR و تعیین توالی ژنوم قارچی (اعم از نواحی ITS، زیرواحد کوچک (SSU) و زیرواحد بزرگ (LSU) از ژن‌های DNA ریپوزومی به‌کار گرفته شده است (Suz *et al.*, 2012; Timling *et al.*, 2008). توالی این نواحی DNA با دیگر توالی‌های پایگاه داده‌ها مانند NCBI UNITE (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) یا mor (<http://mor.clarku.edu/>) مقایسه می‌شود تا امکان شناسایی نمونه‌ها فراهم شود.

گونه‌های جنس بلوط (*Quercus*) که از میزبان‌های مهم قارچ‌های اکتومیکوریز هستند (Smith & Read, 2008)، مهم‌ترین درختان پهن‌برگ بوم‌سازگان‌های جنگلی ایران به‌شمار می‌روند و گیاهانی بسیار ارزشمند و قابل بهره‌وری در بخش‌های صنعتی مختلف مانند صنایع چوب، کاغذسازی، شیمی، رنگ‌سازی و داروسازی در ایران و نقاط مختلف دنیا هستند (Sagheb Talebi *et al.*, 2014). در ایران تاکنون مطالعه منسجمی در مورد همزیستی اکتومیکوریزی بلوط‌ها و شناسایی قارچ‌های همزیست انجام نشده است. هدف این پژوهش، شناسایی قارچ‌های اکتومیکوریز درختان بلوط جنگل‌های هیرکانی از طریق روش‌های مولکولی بود.

## مواد و روش‌ها

### نمونه‌برداری

ریشه‌های درختان سه گونه بلوط شامل بلندمازو (*Quercus castaneifolia* C. A. Mey.)، اوری (*Q. macranthera* Fisch. & C. A. Mey. ex Hohen.) و بلوط سفید (*Q. petraea* L.) از شش رویشگاه طبیعی در سه استان شمالی شامل جنگل‌های خیرود و بنیشکی در

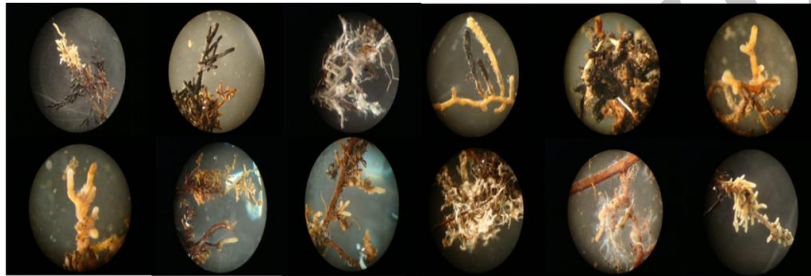
تنش‌های زنده (بیمارگرها)، غیرزنده (خشکی، شوری و فلزات سنگین) و بهبود ساختار خاک و اجتماع ذرات خاکی نقش دارد (Barea *et al.*, 2011).

به‌تقریب ۲۰۰۰۰ تا ۲۵۰۰۰ گونه قارچ اکتومیکوریز در طبیعت وجود دارد (Tedersoo *et al.*, 2010) و گیاهان میزبان، اغلب توسط گونه‌های مختلفی از این قارچ‌ها کلونیزه می‌شوند. شناسایی گونه‌های قارچ‌های میکوریز گام اول تمام مطالعاتی است که به بررسی جنبه‌های مختلف این همزیستی می‌پردازند و برای بهره‌برداری از حداکثر پتانسیل آن در مدیریت جنگل، ضروری است. در گذشته شناسایی این قارچ‌ها بر اساس ارزیابی اسپوروکارپ‌های آن‌ها انجام می‌شد (Courtecuisse, 1999)، اما فقط پرداختن به بررسی حضور اسپوروکارپ‌ها و شناسایی آن‌ها، راهکار مناسبی برای ارزیابی جمعیت قارچ‌های اکتومیکوریز در ریزوسفر نیست، چراکه عامل‌های متعددی مانند میزان بارندگی و دما تأثیر مستقیم بر تشکیل اسپوروکارپ این قارچ‌ها دارند. از سوی دیگر، برخی گونه‌ها اندام باردهی مشخصی را تولید نمی‌کنند یا به‌ندرت تولید می‌کنند (Horton & Bruns, 2001). روش دیگری که توسط پژوهشگران برای شناسایی قارچ‌های اکتومیکوریز به‌کار گرفته شده است، شناسایی در سطح نوک‌ریشه (Root tip identification) است. در این نوع مطالعه، ویژگی‌های مختلفی مانند ریخت‌شناسی و رنگ نوک‌ریشه‌های درگیر در همزیستی اکتومیکوریزی، نحوه انشعاب، ریخت‌شناسی هیف قارچ در درون و سطح غلاف مانتل (Mantle) و نیز بافت غلاف، حضور یا عدم حضور ریزومرف مورد بررسی قرار می‌گیرد تا امکان شناسایی قارچ همزیست فراهم شود (Agerer, 1986-2006). اما وقتی تعداد زیادی نوک‌ریشه وجود دارد، به‌کارگیری این روش شناسایی، چندان عملی نیست و به‌علاوه ویژگی‌های ریخت‌شناسی نوک‌ریشه‌ها به‌شدت متأثر از شرایط محیطی، سن ریشه و نوع میزبان است (Pena *et al.*, 2014).

در دو دهه اخیر، به‌کارگیری تکنیک‌های مولکولی DNA موجب برطرف ساختن ابهامات رده‌بندی و نیز بررسی دقیق ساختار، ترکیب و تنوع جمعیت‌های قارچ‌های اکتومیکوریز

شد. در هر نمونه، بر اساس مشاهدات میکروسکوپی، نوک‌ریشه‌های اکتومیکوریزی که دارای ویژگی‌های ریخت‌شناسی مشابه مانند رنگ مانند، خصوصیات سطح مانند و نحوه انشعاب بودند، به دسته‌های مشخص (مورفوتایپ) تقسیم شدند (شکل ۱). از مورفوتایپ غالب، تعدادی نوک‌ریشه (حداقل پنج عدد) برای استخراج DNA و تشخیص مولکولی قارچ همزیست به‌کار گرفته شد (Morris *et al.*, 2009).

استان مازندران، جنگل‌های سیاهکل و سفارود در استان گیلان و جنگل‌های لوه و توسکاستان در استان گلستان جمع‌آوری شدند. از هر رویشگاه، حداقل ۱۰ پایه از درختان سالم گونه‌های بلوط با رعایت پراکنش مناسب (حداقل فاصله ۵۰ متری) به‌صورت تصادفی انتخاب شدند. از قسمت سایه‌انداز درختان انتخاب‌شده (فاصله ۰/۵ تا یک متری از قاعده درخت)، نمونه‌های خاک به‌همراه ریشه از عمقی بین صفر تا ۳۰ سانتی‌متری ریزوسفر هر گیاه جمع‌آوری شد. در آزمایشگاه، خاک همراه ریشه‌ها شسته



شکل ۱- تعدادی از مورفوتایپ‌های مشاهده‌شده با استریومیکروسکوپ

(Bruns, 1993). مواد مورد استفاده و حجم‌های به‌کاررفته از این مواد در واکنش PCR و برنامه حرارتی مطابق روش Gardes و Bruns (1993) تنظیم شد. برای مشاهده قطعه DNA ریبوزومی تکثیرشده، الکتروفورز با ژل آگارز دو درصد انجام شد. باندهای DNA دوتایی که گاهی روی ژل مشاهده می‌شدند، به‌عنوان آلودگی قارچ‌های غیراکتومیکوریزی یا تکثیر توأم اندوفیت‌های همراه ریشه و یا دیگر گونه‌های قارچ‌های اکتومیکوریز در نظر گرفته شد و از چرخه آزمایش خارج شدند. باندهای تک و مشخص بر روی ژل برای تعیین توالی به شرکت تکاپوزیست ارسال شدند.

شناسایی قارچ‌های اکتومیکوریز همزیست با ریشه درختان بلوط توالی‌های باندهای خالص توسط الگوریتم بلاست (BLAST) با توالی‌های نوکلئوتیدی پایگاه GenBank و

#### استخراج DNA و انجام واکنش PCR

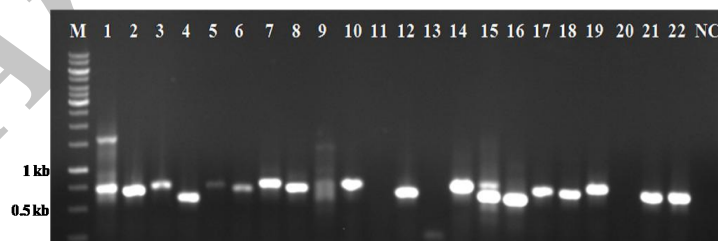
استخراج DNA از نوک‌ریشه‌های اکتومیکوریزی توسط پروتکل بهینه‌سازی‌شده Cetyl Three methyl (CTAB) Amonium Bromide انجام شد (Gardes & Bruns, 1993). برای انجام واکنش PCR و تکثیر ناحیه ITS1-ITS2 از DNA ریبوزومی قارچ‌های اکتومیکوریز، آغازگرهای مورد استفاده ITS1F (Gardes & Bruns, 1993) و ITS4B (در ابتدا) یا ITS4 (در صورت عدم تکثیر با آغازگر اختصاصی بازیدیومیست‌ها) بودند. لازم به ذکر است که آغازگر ITS4B، اختصاصی بازیدیومیست‌ها است، اما آغازگر ITS4 این‌گونه نیست و می‌توان از آن برای شناسایی قارچ‌های اکتومیکوریزی که همزیستی را با نوک‌ریشه‌های گیاهان بلوط برقرار می‌کنند و ممکن است به هر یک از گروه‌های آسکومیکوتا و یا زیگومیکوتاها تعلق داشته باشند، استفاده کرد (White *et al.*, 1990; Gardes & Bruns, 1993).

زنجیره مارکوف مونت‌کارلو ( Markov Monte Carlo Chain) با نرم‌افزار MrBayes v. 3.12 انجام شد (Sherafati *et al.*, 2014).

### نتایج

در مجموع، ۲۰۷ سیستم ریشه‌ای از رویشگاه‌های مورد مطالعه جمع‌آوری شد. ۱۸۳ سیستم ریشه‌ای دارای همزیستی اکتومیکوریزی قابل تمایز بودند که مورفوتایپ غالب از هر یک از آن‌ها به‌طور مجزا جداسازی شد. پس از استخراج DNA از این تعداد نوک‌ریشه، ۵۶ عدد به‌طور موفقیت‌آمیز توسط پرایمرهای اختصاصی قارچی تکثیر شدند و توالی‌های DNA خالص و قابل هم‌ردیف‌سازی (Clean DNA sequences that could be aligned) را تولید کردند. در مورد نوک‌ریشه‌های دیگر، DNA توسط هیچ‌یک از ترکیب‌پرایمرها (ITS4B + ITS1F یا ITS1F + ITS4) تکثیر نشد یا چندین باند تکثیرشده روی ژل آگاروز مشاهده شد که نشان‌دهنده وجود آلودگی بود. از این‌رو، آن‌ها از چرخه آزمایش‌ها حذف شده و یا این‌که توالی‌هایی را ایجاد کردند که قابل هم‌ردیف‌سازی نبودند. در شکل ۲ نمونه‌ای از محصولات PCR تفکیک‌شده بر روی ژل آگاروز شامل باندهای تکی، باندهای چندگانه و DNAهای تکثیرنشده نشان داده شده است.

UNITE مقایسه شدند تا امکان شناسایی مورفوتایپ‌ها فراهم شود. مقادیر score bit، e-value و sequence similarity توالی‌ها برای نتیجه‌گیری در مورد بهترین تطابق‌ها ارزیابی شد. e-value صفر به‌همراه ارزش زیاد score bit (حداقل ۸۰۰) ایده‌آل‌ترین حالت و به‌عنوان یک تطابق قوی در نظر گرفته شد (Smith *et al.*, 2007). به‌منظور تعیین جایگاه تاکسونومیک دقیق توالی‌ها، درخت تشابه (Similarity tree) برای هر یک از آن‌ها ترسیم شد. بدین ترتیب که برای هر توالی مورفوتایپ، ۱۰۰ عدد از نزدیک‌ترین توالی‌های پایگاه داده‌ها با استفاده از تجزیه بلاست (Blast) مشخص شد و مقایسه فاصله مولکولی آن‌ها از طریق رسم درخت محتمل‌ترین (Maximum Likelihood) با استفاده از نرم‌افزار Mega v. 5 در مورد هر کلاد (Clade) انجام شد تا توالی‌های تکراری و غیرمرتبط مشخص شوند. پس از حذف آن‌ها، در مرحله بعدی فقط نزدیک‌ترین تاکسون‌ها از نظر فیلوژنتیکی تجزیه شدند. تحلیل‌های فیلوژنتیک با محاسبه درخت‌های مولکولی بیزین (Bayesian) بر ماتریس داده‌های محدودشده انجام شد. در تمام تجزیه و تحلیل‌ها، توالی‌ها با استفاده از ClustalX هم‌ردیف و نقاط مبهم به‌صورت چشمی تنظیم شدند. مدل تکاملی مربوطه با استفاده از نرم‌افزارهای PAUP و MrModeltest2 انتخاب شد. تحلیل بیزین توسط روش



شکل ۲- محصول تکثیر ناحیه ITS از DNA قارچی استخراج‌شده از نوک‌ریشه اکتومیکوریزی بلوط روی ژل آگاروز

قارچ‌هایی که اکتومیکوریز بودن آن‌ها در ابهام است، بودند. همچنین، مشخص شد که ۴۹ تاکسون اکتومیکوریز در مجموع به ۱۳ جنس تعلق داشتند (جدول ۱).

از بین ۵۶ توالی خالص به‌دست‌آمده، ۴۹ توالی با تاکسون‌های قارچ‌های اکتومیکوریز مطابقت داشتند. هفت عدد نیز دارای توالی‌های مرتبط با قارچ‌های ساپروفیت یا

جدول ۱- نتایج شناسایی مولکولی قارچ‌های اکتومیکوریز همراه ریشه‌های گونه‌های مختلف بلوط توسط الگوریتم BLAST

ردیف	گونه	رویشگاه	کد مورفوتا پ	طول (bp)	بیشترین شباهت	کد دسترسی	درصد تشابه
۱	<i>Q. castaneifolia</i>	شفارود	*Cas-1-3	۷۶۵	<i>Inocybe erubescens</i>	AM882951	۹۸
۲			Cas-1-5	۷۳۰	<i>Hygrophorus</i> sp.	EF417821	۹۸
۳			Cas-1-11	۷۶۰	<i>Hebeloma</i> sp.	FR852300	۹۷
۴			*Cas-1-14	۷۸۶	<i>Inocybe</i> aff. <i>grammata</i>	AM882976	۹۹
۵			Cas-1-15	۸۰۴	<i>Russula</i> sp.	JX425387	۹۶
۶			*Cas-1-16	۷۹۰	<i>Lactarius azonites</i>	JQ446087	۹۹
۷			Cas-1-24	۷۵۰	<i>Russula</i> sp.	JX425387	۹۷
۸	<i>Q. castaneifolia</i>	سیاهکل	Cas-3-1	۷۰۵	<i>Lactarius subumbonatus</i>	KF432981	۹۹
۹			Cas-3-6	۸۳۹	<i>Russula</i> cf. <i>emetic</i>	AY228350	۹۷
۱۰			*Cas-3-11	۷۲۴	<i>Inocybe maculate</i>	AM882964	۹۹
۱۱			Cas-3-12	۶۹۸	<i>Lactarius subumbonatus</i>	KF432981	۹۹
۱۲			Cas-3-15	۶۸۱	<i>Hebeloma</i> sp.	GQ478005	۱۰۰
۱۳			Cas-3-16	۸۱۹	<i>Inocybe</i> sp.	FR852236	۹۳
۱۴			*Cas-3-18	۷۴۲	<i>Inocybe rhodiola</i>	FJ904175	۹۹
۱۵			Cas-3-20	۵۲۰	<i>Tricholoma acerbum</i>	AF377247	۹۸
۱۶			Cas-3-28	۸۲۰	<i>Cortinarius aurantiorufus</i>	EU655684	۹۹
۱۷	<i>Q. castaneifolia</i>	بنیشکی	Cas-4-4	۵۹۸	<i>Tricholoma acerbum</i>	AF377247	۹۸
۱۸			Cas-4-5	۸۳۳	<i>Russula</i> sp.	EU819429	۹۷
۱۹			Cas-4-11	۵۹۲	<i>Tricholoma acerbum</i>	AF377247	۹۸
۲۰			*Cas-4-16	۷۲۷	<i>Inocybe fibrosoides</i>	HQ586863	۱۰۰
۲۱			Cas-4-20	۶۷۲	<i>Tricholoma acerbum</i>	AF377247	۹۹
۲۲			*Cas-4-23	۶۷۰	<i>Lactarius</i> sp.	FR852034	۹۸
۲۳	<i>Q. castaneifolia</i>	خیرود	Cas-2-2	۶۹۵	<i>Lactarius subumbonatus</i>	KF432981	۹۹
۲۴			Cas-2-3	۶۰۹	<i>Hydnum vesterholtii</i>	HE611086	۹۷
۲۵			*Cas-2-5	۷۳۰	<i>Inocybe</i> sp.	JX625281	۹۹
۲۶			Cas-2-7	۶۷۰	<i>Lactarius subumbonatus</i>	KF432981	۹۹
۲۷			*Cas-2-12	۶۷۶	<i>Tricholoma cingulatum</i>	KJ705244	۹۹
۲۸			Cas-2-17	۶۷۰	<i>Lactarius</i> sp.	FR852027	۹۹
۲۹			*Cas-2-19	۶۵۱	<i>Amanita rubescens</i>	AJ889923	۱۰۰
۳۰			*Cas-2-21	۷۰۱	<i>Lycoperdon perlatum</i>	KF668322	۹۹

ردیف	گونه	رویشگاه	کد مورفوتایپ	طول (bp)	بیشترین شباهت	کد دسترسی	درصد تشابه
۳۱			Cas-2-22	۶۷۴	<i>Laccaria laccata</i> var. <i>moelleri</i>	GQ406465	۹۷
۳۲			Cas-2-24	۶۵۲	<i>Lactarius subumbonatus</i>	KF432981	۹۹
۳۳			Cas-2-28	۶۳۶	<i>Cortinarius</i> sp.	FR852019	۱۰۰
۳۴			Pet-2-5	۶۵۴	<i>Lactarius subumbonatus</i>	KF432981	۹۹
۳۵	<i>Q. petraea</i>	خیرود	Pet-2-9	۶۶۸	<i>Lactarius subumbonatus</i>	KF432981	۹۹
۳۶			*Pet-2-10	۶۶۸	<i>Amanita phalloides</i>	GQ250407	۹۹
۳۷			Cas-5-2	۷۷۱	<i>Inocybe bulbosissima</i>	FJ904159	۹۶
۳۸	<i>Q. castaneifolia</i>	لوه	Cas-5-9	۷۹۴	<i>Russula</i> sp.	HE601889	۱۰۰
۳۹			*Cas-5-11	۷۶۱	<i>Scleroderma areolatum</i>	EU718116	۹۹
۴۰			Cas-5-14	۶۷۶	<i>Tricholoma scalpturatum</i>	EU160589	۹۸
۴۱	<i>Q. castaneifolia</i>	لوه	*Cas-5-29	۹۴۶	<i>Laccaria montana</i>	EU486434	۹۹
۴۲			Pet-5-1	۷۷۷	<i>Russula</i> sp.	HE601889	۱۰۰
۴۳	<i>Q. petraea</i>	لوه	*Pet-5-8	۸۲۸	<i>Russula risigallina</i>	AY061713	۹۹
۴۴			Pet-5-10	۷۰۹	<i>Amanita oblongispora</i>	JF907762	۹۷
۴۵			*Mac-6-9	۷۲۰	<i>Russula vesca</i>	JF908637	۱۰۰
۴۶			Mac-6-15	۷۶۷	<i>Hebeloma cylindrosporum</i>	EF564167	۹۹
۴۷	<i>Q. macranthera</i>	توسکاستان	Mac-6-16	۸۱۶	Uncultured Boletaceae	FM995552	۹۸
۴۸			*Mac-6-21	۸۰۵	<i>Russula vesca</i>	JF908637	۱۰۰
۴۹			Mac-6-25	۸۴۲	Uncultured Boletaceae	FM995552	۹۸

\*شناسایی مورفوتایپ‌های ستاره‌دار پس از رسم درخت فیلوژنی Bayesian در سطح گونه فراهم شد.

مونوفایلتیک مجزایی به ترتیب به همراه گونه‌های *A. phalloides* و *A. rubescens* در نتیجه شناسایی این مورفوتایپ‌ها در سطح گونه منتهی شد، اما مورفوتایپ Pet-5-10 با هیچ یک از گونه‌های *Amanita* sp. گروه‌بندی نشد و شناسایی آن در سطح *Amanita* sp. باقی ماند.

(۲) توالی ناحیه ITS دو مورفوتایپ از *Q. macranthera* با توالی ITS یک اکتومیکوریز بولت از خانواده *Boletaceae* مرتبط بود (جدول ۱). پس از رسم درخت فیلوژنتیک، این دو مورفوتایپ به صورت گونه‌ای مستقل و

به منظور شناسایی دقیق‌تر ۴۹ توالی به دست آمده مربوط به تاکسون‌های قارچ‌های اکتومیکوریز، در کنار تجزیه بلاست، این توالی‌ها از نظر فیلوژنتیک نیز بررسی شدند که به شناسایی دقیق ۱۷ تاکسون در سطح گونه و ۳۲ تاکسون در سطح جنس منتهی شد. در ادامه به نتایج تجزیه بلاست و برخی درخت‌های فیلوژنتیکی اشاره شده است:

(۱) سه مورفوتایپ بیشترین تشابه را با گونه‌های *Amanita* داشتند (جدول ۱). آنالیز Bayesian به قرارگیری Cas-2-19 و Pet-2-10 در گروه‌های

قرار گرفت. مطابق با تجزیه‌های فیلوژنتیکی این پژوهشگران، تفکیک کاملی بین گونه‌های این کلاد ایجاد نشد. مورفوتایپ Cas-1-11 در کلاد *Velutipes* (Boyle *et al.*, 2006) قرار گرفت. در این کلاد نیز گونه‌های ریخت‌شناسی قرار گرفتند که تفکیک فیلوژنتیکی آن‌ها چندان امکان‌پذیر نبود. همچنین، مورفوتایپ Mac-6-15 با حمایت زیادی (BPP برابر با ۰/۹۷) گروه خواهری را با اعضاء *H. cylindrosporium* تشکیل داد. به این ترتیب، با استفاده از تجزیه‌های فیلوژنتیکی این پژوهش، شناسایی مورفوتایپ‌های مرتبط با *Hebeloma* در سطح گونه میسر نشد.

۶) ده مورفوتایپ به دست آمده با تاکسون‌هایی از جنس *Lactarius* مرتبط بودند (جدول ۱). از بین آن‌ها مورفوتایپ Cas-1-16 با چندین تاکسون از *L. azonites* و مورفوتایپ Cas-4-23 با چندین تاکسون از *L. glaucescens*، کلادی مشترک با حمایت BPP برابر با ۱/۰۰ ایجاد کردند و در نتیجه در سطح گونه نام‌گذاری شدند، اما توالی ناحیه ITS مورفوتایپ Cas-2-17 و نیز هفت مورفوتایپ Cas-3-1، Cas-3-12، Cas-2-2، Cas-2-7، Cas-2-24، Pet-2-5 و Pet-2-9 پس از تجزیه‌های فیلوژنتیکی با گونه مشخصی از جنس *Lactarius* کلادی مونوفایلیتیک را تشکیل نداد. از این‌رو، معرفی آن‌ها در سطح *Lactarius* sp. باقی ماند (شکل ۴).

۷) در میان ریشه‌های اکتومیکوریزیایی بلوط، قارچ مورفوتایپ Cas-2-3 بیشترین تشابه (۹۷ درصد) را با *Hydnum vesterholtii* (HE611086) داشت (جدول ۱) و پس از تجزیه‌های فیلوژنتیکی به صورت کلاد خواهری با دو شاخه در برگیرنده این گونه قرار گرفت. از این‌رو، باید به ارائه عنوان *Hydnum* sp. به این مورفوتایپ اکتفا کرد.

۸) بلاست توالی‌های ناحیه ITS نشان‌دهنده تشابه نه مورفوتایپ این پژوهش با تاکسون‌های *Russula* بود (جدول ۱). پس از تجزیه‌های فیلوژنتیکی، مورفوتایپ‌های Cas-1-15 و Cas-1-24 و نیز مورفوتایپ‌های Pet-5-1 و Cas-5-9 به صورت گروه خواهری تاکسون‌های

کلاد خواهری توالی‌های *B. rubellus* با یکدیگر دسته‌بندی شدند که این مسئله موجب معرفی آن‌ها به صورت *Boletus* sp. شد.

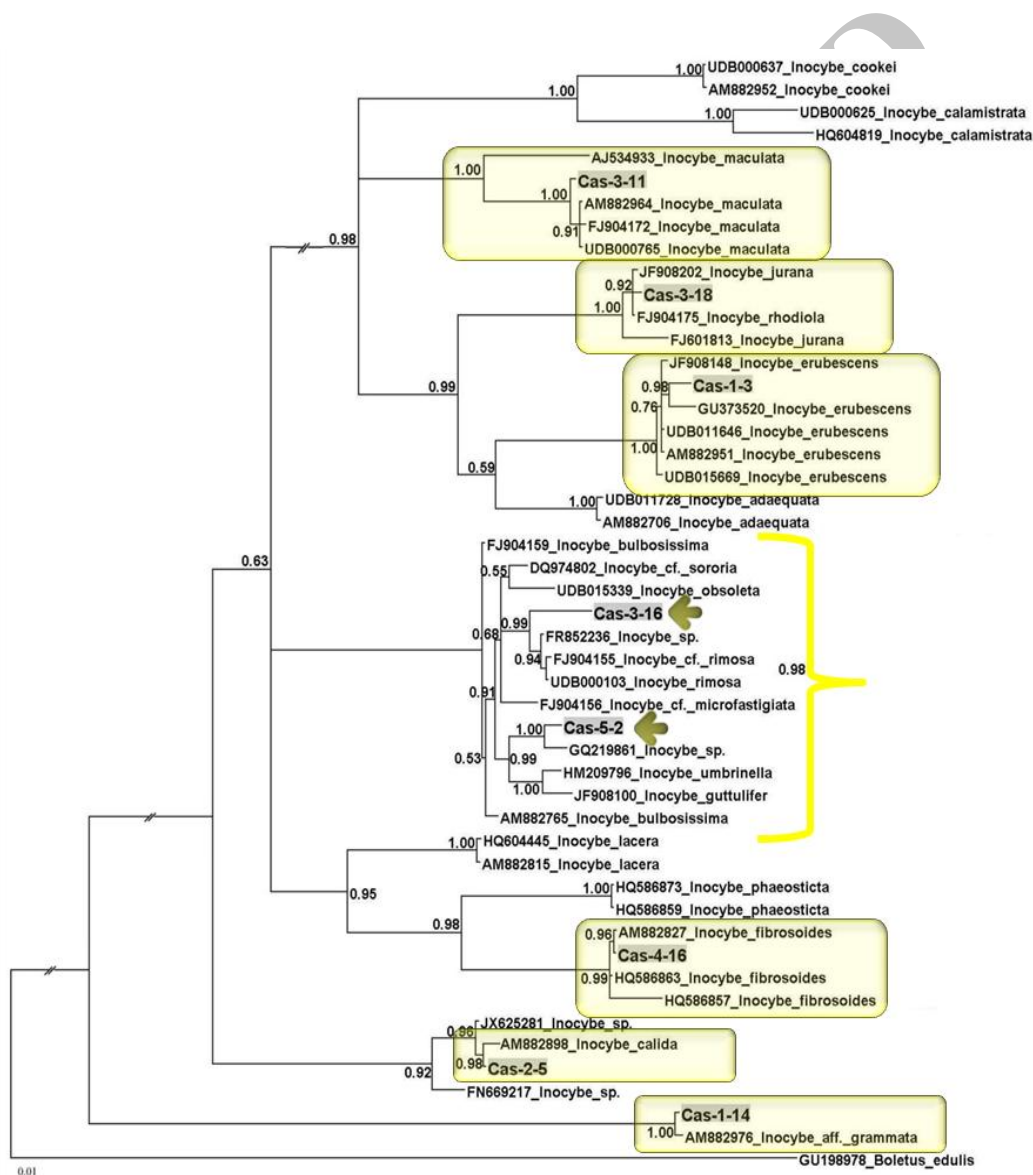
۳) دو مورفوتایپ با اعضاء *Cortinarius* مرتبط بودند (جدول ۱). تجزیه‌های فیلوژنتیکی مرتبط‌کننده مورفوتایپ Cas-2-28 تنها با *Cortinarius* sp. (FR852019) در یک شاخه مجزا از گونه‌های دیگر این جنس بود. از این‌رو، شناسایی این مورفوتایپ در سطح *Cortinarius* sp. باقی ماند. همچنین، مورفوتایپ Cas-3-28 در یک کلاد مونوفایلیتیک با حمایت احتمال پسین بیزین (BPP) برابر با ۰/۹۵ قرار گرفت که این کلاد در برگیرنده چندین گونه ریخت‌شناسی از *Cortinarius* بود که بین این گونه‌ها تنوع بسیار کمی (۰/۲ درصد) در توالی ناحیه ITS وجود دارد (Garnica *et al.*, 2009). بر این اساس، معرفی مورفوتایپ Cas-3-28 نیز در سطح *Cortinarius* sp. باقی ماند.

۴) توالی ناحیه ITS قارچی تکثیرشده از هشت مورفوتایپ مرتبط با اعضاء جنس *Inocybe* بود (جدول ۱). در تجزیه‌های فیلوژنتیکی، مورفوتایپ Cas-1-14 با *I. aff. grammata* مورفوتایپ Cas-2-5 با *I. calida* مورفوتایپ Cas-4-16 با *I. fibrosoides* مورفوتایپ Cas-3-11 با *I. maculate* مورفوتایپ Cas-3-18 با *I. erubescens* و گروه‌های مونوفایلیتیک با حمایت زیاد ایجاد کردند. به این ترتیب، شناسایی آن‌ها در سطح گونه فراهم شد. همچنین، پس از تجزیه‌های فیلوژنتیکی، رابطه نزدیک مورفوتایپ Cas-5-2 و Cas-3-16 با اعضایی از جنس *Inocybe* مشخص شد، اما این دو مورفوتایپ هر یک جداگانه گروه‌های خواهری را با اعضاء مذکور تشکیل دادند و در نهایت شناسایی آن‌ها در سطح گونه امکان‌پذیر نبود (شکل ۳).

۵) از سه مورفوتایپ مرتبط با جنس *Hebeloma* (جدول ۱)، در درخت فیلوژنتیکی، مورفوتایپ Cas-3-15 در کلاد *Denudata* از تحقیق Boyle و همکاران (۲۰۰۶)

به‌همین دلیل نام‌گذاری آن تنها در سطح *Russula* sp. میسر شد، اما مورفوتایپ Pet-5-8 شاخه مونوفایلیتیکی حمایت BPP برابر با ۱/۰۰ را با *R. risigallina* ایجاد کرد که منجر به نام‌گذاری آن به‌صورت *R. risigallina* شد. مورفوتایپ‌های Mac-6-9 و Mac-6-21 نیز در درخت فیلوژنتیکی کلاد مونوفایلیتیکی را با *R. vesca* تشکیل دادند و در سطح گونه شناسایی شدند (شکل ۵).

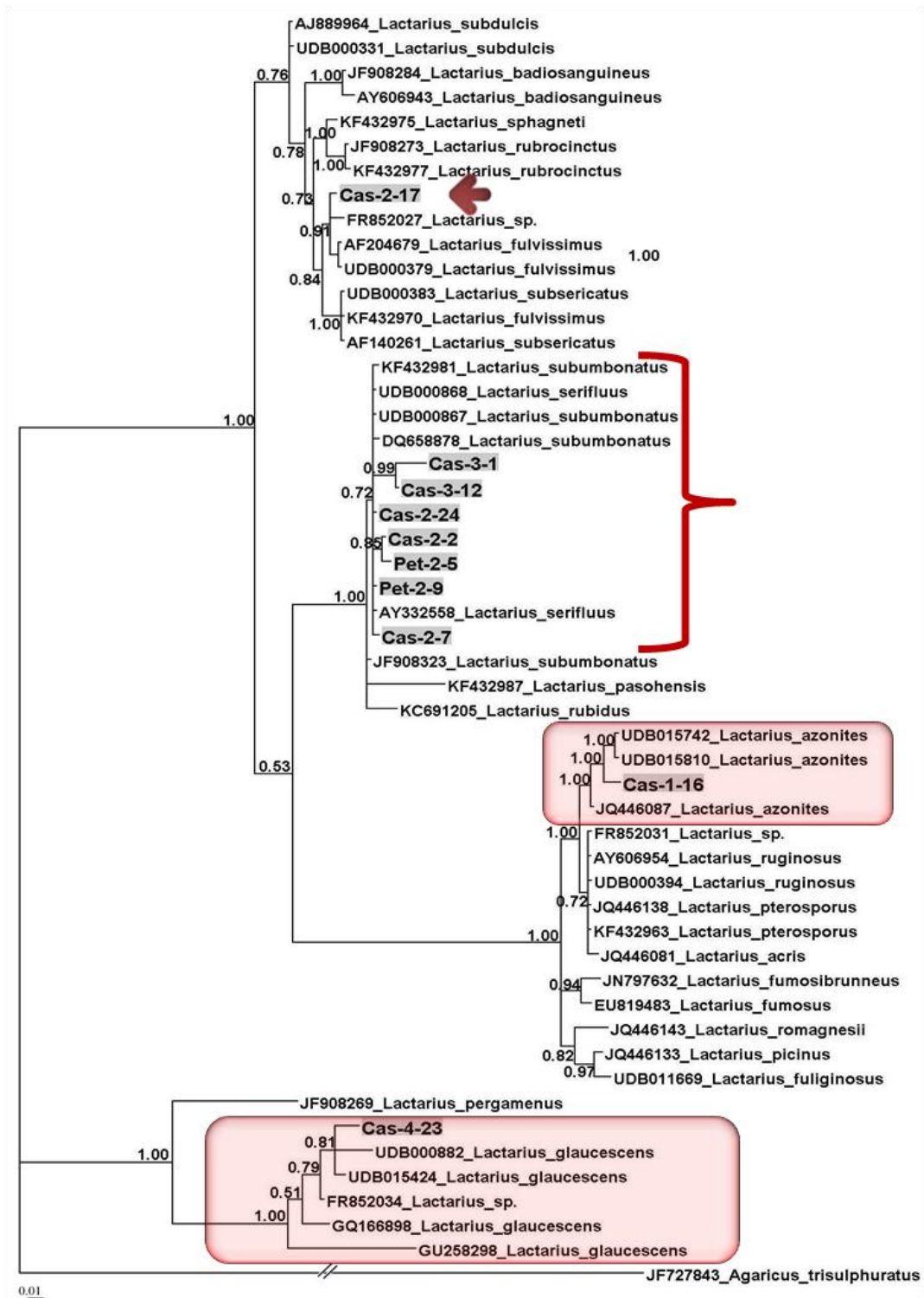
نام‌گذاری‌شده در سطح جنس (یعنی *Russula* sp.) گروه‌بندی شدند. از این‌رو، معرفی آن‌ها در سطح گونه امکان‌پذیر نبود. مورفوتایپ Cas-4-5 نیز در درخت فیلوژنتیکی به‌صورت گروه خوهری *R. rosea* گروه‌بندی شد. بدین ترتیب، معرفی این مورفوتایپ نیز به‌صورت *Russula* sp. امکان‌پذیر بود. همچنین، توالی ناحیه ITS مورفوتایپ Cas-3-6 نیز در درخت فیلوژنتیک در کلادی مشترک با چند گونه مختلف از این جنس قرار گرفت.



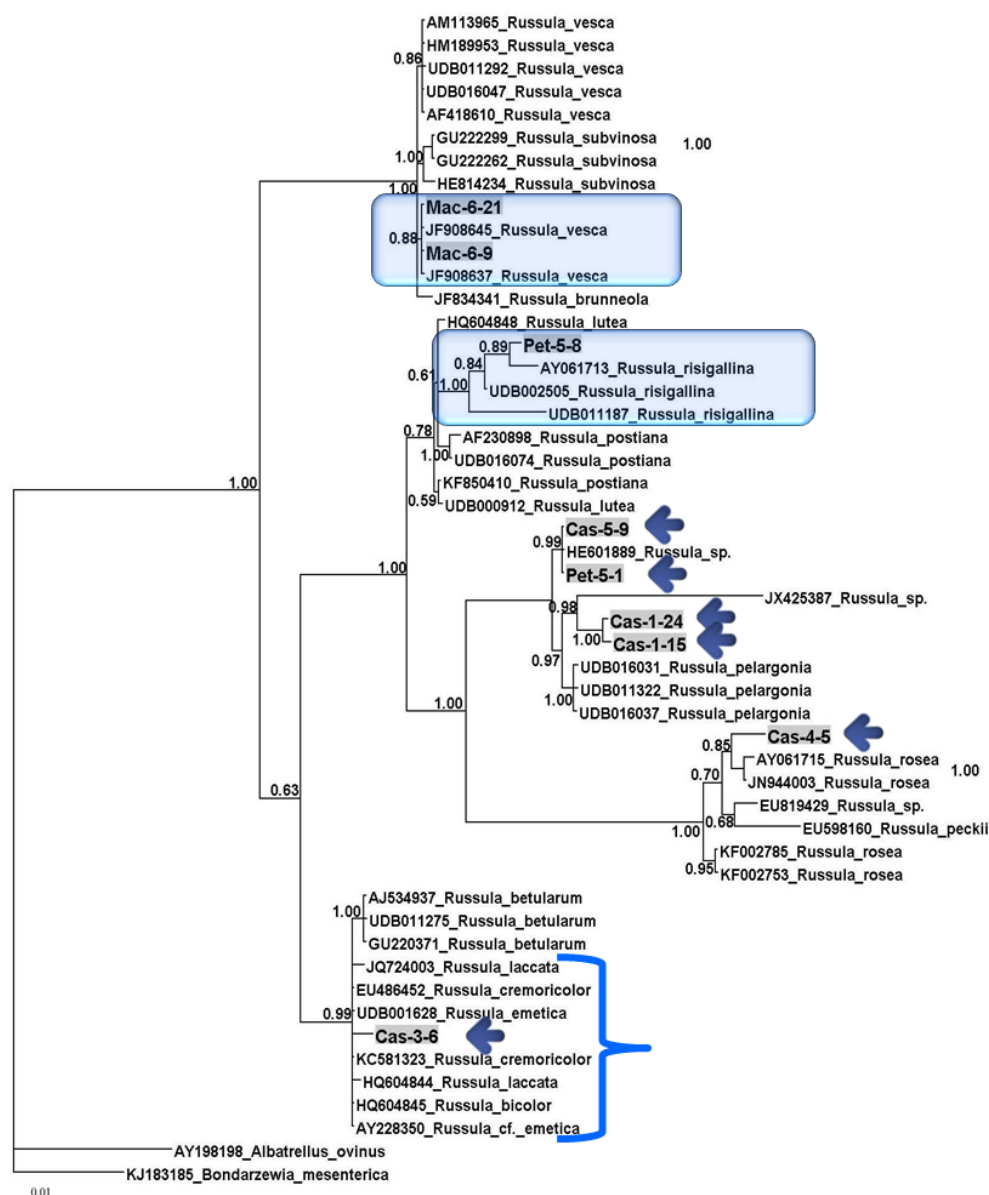
شکل ۳- درخت فیلوژنی به‌دست آمده از تجزیه داده‌های توالی ITS جنس *Inocybe* به روش Bayesian.

اعداد کنار شاخه: احتمال پسین بیزین (BPP)





شکل ۴- درخت فیلوژنی به دست آمده از تجزیه داده‌های توالی ITS جنس *Lactarius* به روش Bayesian. اعداد کنار شاخه: احتمال پسین بیزین (BPP)



شکل ۵- درخت فیلوژنی به دست آمده از تجزیه داده‌های توالی ITS جنس *Russula* به روش Bayesian.

اعداد کنار شاخه: احتمال پسین بیزین (BPP)

از این رو، شناسایی گونه این مورفوتایپ میسر نشد. ۱۰) دو مورفوتایپ Cas-5-29 و Cas-2-22 مرتبط با جنس *Laccaria* بودند (جدول ۱). پس از تجزیه بیزین، مورفوتایپ Cas-5-29 شاخه مونوفایلیتیکی با تعدادی از تاکسون‌های *Laccaria laccata* تشکیل داد و در سطح گونه شناسایی شد، اما Cas-2-22 در کلادی مونوفایلیتیکی با حمایت زیاد با دو گونه *Laccaria maritima*

قارچ اکتومیکوریز مورفوتایپ Cas-1-5 که دارای تشابه ۹۸ درصدی با دو قارچ *Hygrophorus* sp. شناسایی شده از نوک‌ریشه‌های درختان بلوط کالیفرنیا با کدهای EF417821 (Morris *et al.*, 2008) و FJ196924 (Morris *et al.*, 2009) بود (جدول ۱). پس از ترسیم درخت فیلوژنتیکی نیز در میان گونه‌های مختلف *Hygrophorus* تنها با این دو تاکسون رابطه نزدیکی داشت.

توسعه روش‌های مولکولی راهکاری جدید را برای برطرف کردن دشواری‌های مربوط به شناسایی گونه‌ها فراهم کرده است (Suz et al., 2008). در همین راستا، شناسایی‌های مولکولی بر اساس مقایسه توالی‌های ایجاد شده و توالی‌های در دسترس در پایگاه داده‌ها در حال افزایش است. به‌خصوص این روش به اساس مطالعات جمعیت قارچ‌های اکتومیکوریزی از نمونه‌های محیطی تبدیل شده است (Jargeat et al., 2010). در پژوهش پیش‌رو نیز مشخص شد که استفاده از توالی ناحیه ITS، ابزاری مناسب برای شناسایی اکتومیکوریزهای جمع‌آوری شده از عرصه است.

این بررسی نشان داد که جمعیت متنوعی از قارچ‌های اکتومیکوریز در جنگل‌های هیرکانی به‌همراه درختان بلوط وجود دارند. مهم‌ترین گروه‌های تاکسونومیک یافت شده در این جنگل‌ها مشابه با گروه‌های گزارش شده در نواحی معتدله دیگر بود. قارچ‌های *Lactarius* (ده تاکسون)، *Russula* (نه تاکسون) و *Inocybe* (هشت تاکسون) از مهم‌ترین گروه‌های یافت شده در این پژوهش بودند. این گروه‌ها از مشخص‌ترین قارچ‌های گزارش شده از ریشه بلوط در بوم‌سازگان‌های معتدله مختلف هستند (Walker et al., 2005; Scattolina et al., 2014; Sarrionandia & Salcedo, 2018). تشابه کیفی دیگر جمعیت اکتومیکوریزی گزارش شده در این پژوهش با بوم‌سازگان‌های دیگر بلوط در نواحی معتدله، در غالب بودن اکتومیکوریزهای بازیدیومیستی و کم بودن جمعیت آسکومیستی یافت شده در این نواحی است (Walker et al., 2005). در حالی که جمعیت اکتومیکوریزی گزارش شده بر روی خانواده *Fagaceae* در نواحی مدیترانه‌ای، غنا و تنوع بیشتری از آسکومیست‌های اکتومیکوریزی داشت (Smith et al., 2007; Morris et al., 2008). گونه‌هایی از *Boletus* و *Hebeloma* از گونه‌های دیگر یافت شده بر روی ریشه درختان بلوط بودند. براساس گزارش سایر پژوهشگران، این گونه‌ها از شایع‌ترین اکتومیکوریزهای یافت شده در بوم‌سازگان‌های بلوط بوده و به‌طور مثال حضور آن‌ها در جنگل‌های بلوط ایالت متحده و آمریکای مرکزی، انگلستان،

(UDB001495) و *Laccaria laccata* (GQ406465) گروه‌بندی شد، بنابراین نام‌گذاری آن در سطح *Laccaria* sp. میسر شد.

(۱۱) تجزیه فیلوژنتیکی داده‌های توالی ناحیه ITS مورفوتایپ Cas-2-21 نشان داد که این مورفوتایپ با چندین تاکسون از *L. perlatum* در یک کلاد گروه‌بندی شدند. این مسئله موجب معرفی این مورفوتایپ به‌عنوان *L. perlatum* شد.

(۱۲) تجزیه فیلوژنتیکی بر اساس ناحیه ITS از DNA ریوزومی، حمایت قوی را برای قرار گرفتن مورفوتایپ Cas-5-11 در کنار *Scleroderma areolatum* به‌عنوان یک گروه مونوفایلیتیک فراهم کرد. این توپولوژی به‌همراه تشابه ۹۹ درصدی تجزیه بلاست بین این دو تاکسون (جدول ۱)، معرفی‌کننده این مورفوتایپ به‌عنوان *S. areolatum* بود.

(۱۳) شش مورفوتایپ به‌دست‌آمده از *Q. castaneifolia* با جنس *Tricholoma* مرتبط بودند (جدول ۱). پس از رسم درخت فیلوژنتیکی مشخص شد که سه مورفوتایپ Cas-4-11, 20 و Cas-4-4 از رویشگاه بنیشکی و یک مورفوتایپ Cas-3-20 از رویشگاه سیاهکل با یکدیگر و سپس به‌همراه یک تاکسون *T. acerbum* کلادی مشترک را تشکیل دادند. از این‌رو شناسایی آن‌ها در سطح *Tricholoma* sp. باقی ماند. مورفوتایپ Cas-2-12 گروه مونوفایلیتیک را با اعضاء *T. cingulatum* تشکیل داد و شناسایی آن در سطح گونه فراهم شد. مورفوتایپ Cas-5-14 در شاخه‌ای گروه‌بندی شد که توسط Jargeat و همکاران (۲۰۱۰) مجموعه *Tricholoma scalpturatum* نامیده شده بود. به‌کارگیری نشان‌گر ITS به‌تنهایی در تفکیک گونه‌های آن مؤثر نبود. از این‌رو، شناسایی این مورفوتایپ در سطح *Tricholoma* sp. باقی ماند.

## بحث

در سلسله قارچی، گونه‌ها از دیرباز بر اساس ساختارهای زایشی جنسی و غیرجنسی توصیف شده‌اند، اما

نتیجه می‌تواند قارچ‌های اکتومیکوریز خاک را تحت تأثیر قرار دهد (Jonsson et al., 2006). در همین راستا، تفاوت در کیفیت لاشبرگ‌های گونه‌های بلوط مورد نظر در این پژوهش نیز می‌تواند توضیحی برای ترجیح میزبانی احتمالی قارچ‌های اکتومیکوریز باشد. Tedersoo و همکاران (۲۰۰۸) ترجیح میزبانی قوی در قارچ‌های اکتومیکوریز نسبت به سه گونه درختی کنار یکدیگر و متعلق به خانواده‌های گیاهی مختلف را گزارش کردند. اگرچه در مورد ترجیح میزبانی قارچ‌های اکتومیکوریز بر روی گونه‌های مختلف یک جنس، مطالعات زیادی وجود ندارد، اما در مجموع در میان منابع موجود، دو پژوهش مهم وجود دارد که حاکی از اختلاف قابل تمایزی در جمعیت اکتومیکوریزی کلونیزه‌کننده گونه‌های بلوط هستند (Morris et al., 2008; Cavender-Bares et al., 2009).

در مجموع، به دلیل متفرق بودن گونه‌های بلوط مورد مطالعه در زیستگاه‌های مختلف، فقط می‌توان گفت که ترجیح میزبانی نیز ممکن است در ساختار جمعیت اکتومیکوریزی گونه‌های درختی تأثیرگذار باشد، چراکه نقش تأثیر زیستگاه را نمی‌توان نادیده گرفت، اما بی‌تردید وجود تفاوت در جمعیت اکتومیکوریزی یافت‌شده بر روی سه گونه بلوط میزبان که چندان هم به یکدیگر مرتبط نیستند (*Q. petraea* و *Q. macranthera* از بخش *Quercus* و *Q. castaneifolia* از بخش *Cerris*) و افتراق رویشگاهی نیز دارند (*Q. macranthera* در مناطق بالابند و *Q. petraea* به صورت تک‌پایه‌های پراکنده در برخی نواحی جنگل‌های هیرکانی حضور دارند. در حالی که *Q. castaneifolia* گونه اصلی بلوط جنگل‌های هیرکانی است و به صورت توده، پراکنش وسیعی از جلگه تا ارتفاعات دارد)، چندان دور از انتظار نیست. برای کامل شدن این پژوهش، بررسی‌های بیشتری لازم است تا نقش جایگاه تاکسونومیک، توزیع جغرافیایی و تفاوت اکولوژیک (به‌عنوان مثال فنولوژی برگ‌ها) گونه‌های مختلف بلوط در اختصاصی کردن میزبانی اکتومیکوریزی بهتر تفکیک شود.

کارولینای شمالی و مکزیک بر روی گونه‌های دیگر بلوط نیز گزارش شده است (Walker et al., 2005; Smith & Pfister, 2009). از شباهت‌های دیگر جمعیت اکتومیکوریزی گزارش‌شده در این پژوهش با مایکوفلورای اکتومیکوریزی متعلق به سایر بوم‌سازگان‌های بلوط، حضور گونه‌های مختلف *Amanita* است که این تاکسون‌ها همراه با گونه‌های بلوط مناطق دیگر به‌عنوان مثال جنگل‌های بلوط آمریکای شمالی گزارش شدند (Binion et al., 2008; Rasmussen et al., 2018).

در این پژوهش مشخص شد که گونه‌های بلوط و یا زیستگاه موجب بروز تغییراتی در توزیع قارچ‌های اکتومیکوریز در سطح نوک‌ریشه‌ها می‌شوند. به‌طور مثال، برخلاف *Russula* که بر روی هر سه گونه بلوط یافت شد، *Inocybe* ترجیح مشخصی را در کلونیزه کردن *Q. castaneifolia* داشت. همچنین *Boletus* منحصراً بر روی *Q. macranthera* یافت شد. اگرچه به دلیل استقرار و گسترش گونه‌های مختلف بلوط در زیستگاه‌های مختلف و حتی ارتفاعات مختلف یک زیستگاه (به‌طور مثال، *Q. macranthera* در ارتفاعات بالاتر و *Q. castaneifolia* در ارتفاعات پایین‌تر استان گلستان گسترش دارند)، تمایز تأثیر جداگانه نوع میزبان گیاهی و نوع زیستگاه بر تنوع جمعیت قارچ‌های اکتومیکوریز امکان‌پذیر نیست.

بر اساس گزارش‌های موجود، هم نوع زیستگاه و ویژگی‌های خاک آن و هم نوع میزبان گیاهی می‌تواند توزیع تاکسون‌های اکتومیکوریزی را تغییر دهد. به‌عنوان مثال، مشخص شد که ویژگی‌های غیرزیستی خاک می‌تواند تولید اسپوروکارپ، تشکیل همزیستی بر روی ریشه و نیز ساختار جمعیت قارچ‌های اکتومیکوریز را تغییر دهد (Rasmussen et al., 2018). ویژگی‌های خاک می‌تواند از طریق متأثر کردن ترکیب جمعیت گیاهی، اثر مستقیمی بر جمعیت اکتومیکوریزی نیز داشته باشد (Rasmussen et al., 2018). همچنین، عامل‌های غیرقابل اندازه‌گیری خاک می‌تواند جمعیت اکتومیکوریزی را متأثر سازد. به‌طور مثال، شیمی بقایای برگ بین گونه‌های گیاهی مختلف، متفاوت است و در

- co-occurring oaks (*Quercus* spp.) in a tropical cloud forest. *FEMS Microbiology Ecology*, 69(2): 274-287.
- Morris, M.H., Smith, M.E., Rizzo, D.M., Rejmánek, M. and Bledsoe, C.S., 2008. Contrasting ectomycorrhizal fungal communities on the roots of co-occurring oaks (*Quercus* spp.) in a California woodland. *New Phytologist*, 178: 167-176.
  - Pena, R., Lang, C., Naumann, A. and Polle, A., 2014. Ectomycorrhizal identification in environmental samples of tree roots by Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy. *Frontiers in Plant Science*, 5: 229.
  - Rasmussen, A.L., Busby, R.R. and Hoeksema, J.D., 2018. Host preference of ectomycorrhizal fungi in mixed pine-oak woodlands. *Canadian Journal of Forest Research*, 48(2): 153-159.
  - Sagheb Talebi, Kh., Sajedi, T. and Pourhashemi, M., 2014. *Forests of Iran: A Treasure from the Past, A Hope for the Future*. Springer, 152p.
  - Sarrionandia, E. and Salcedo, I., 2018. Macrofungal diversity of holm-oak forests at the northern limit of their distribution range in the Iberian Peninsula. *Scandinavian Journal of Forest Research*, 33(1): 23-31.
  - Scattolina, L., Lancellotti, E., Franceschini, A. and Montecchio, L., 2014. The ectomycorrhizal community in Mediterranean old-growth *Quercus ilex* forests along an altitudinal gradient. *Plant Biosystems*, 148(1): 74-82.
  - Sherafati, M., Kazempour Osaloo, Sh., Khoshokhan Mozaffar, M., Esmailbegi, Sh. and Saadati, N., 2014. Molecular phylogeny of the genus *Myosotis* (Boraginaceae) based on nrDNA ITS sequences. *Taxonomy and Biosystematics*, 6(19): 83-94 (In Persian).
  - Smith, M.E., Douhan, G.W. and Rizzo, D.M., 2007. Ectomycorrhizal community structure in a xeric *Quercus* woodland based on rDNA sequence analysis of sporocarps and pooled roots. *New Phytologist*, 174(4): 847-863.
  - Smith, M.E. and Pfister, D.H., 2009. Tuberculate ectomycorrhizae of angiosperms: the interaction between *Boletus rubropunctus* (Boletaceae) and *Quercus* species (Fagaceae) in the United States and Mexico. *American Journal of Botany*, 96(9):1665-1675.
  - Smith, S.E. and Read, D.J., 2008. *Mycorrhizal Symbiosis* (Third edition). Academic Press, New York, 800p.
  - Suz, L.M., Azul, A.M., Morris, M.H., Bledsoe, C.S., and Martín, M.P., 2008. Morphotyping and molecular methods to characterize ectomycorrhizal roots and hyphae in soil: 437-474. In: Nautiyal C.S. and Dion P. (Eds.). *Molecular Mechanisms of Plant and Microbe Coexistence*. *Soil Biology*, vol 15,

## References

- Agerer, R., 1986-2006. *Colour Atlas of Ectomycorrhizae*. Einhorn-Verlag, Schwäbisch Gmünd, Germany.
- Barea, J.M., Palenzuela, J., Cornejo, P., Sánchez-Castro, I., Navarro-Fernández, C., Lopéz-García, A., Estrada, B., Azcón, R., Ferrol, N. and Azcón-Aguilar, C., 2011. Ecological and functional roles of mycorrhizas in semiarid ecosystems of Southeast Spain. *Journal of Arid Environments*, 75(12): 1292-1301.
- Binion, D.E., Stephenson, S.L., Roody, W.C., Burdsall, H.H. Jr., Vasilyeva, L.N. and Miller, O.K. Jr., 2008. *Macrofungi Associated with Oaks of Eastern North America*. West Virginia University Press, Morgantown, W.V., 468p.
- Boyle, H., Zimdars, B., Renker, C. and Buscot, F., 2006. A molecular phylogeny of *Hebeloma* species from Europe. *Mycological Research*, 110(4): 369-380.
- Cavender-Bares, J., Izzo, A., Robinson, R. and Lovelock, C.E., 2009. Changes in ectomycorrhizal community structure on two containerized oak hosts across an experimental hydrologic gradient. *Mycorrhiza*, 19(3): 133-142.
- Courtecuisse, R., 1999. *Mushrooms of Britain and Europe*. HarperCollins Publishers, London, 960p.
- Gardes, M. and Bruns, T.D., 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 2: 113-118.
- Garnica, S., Weiß, M., Oertel, B., Ammirati, J. and Oberwinkler, F., 2009. Phylogenetic relationships in *Cortinari*, section *Calochroi*, inferred from nuclear DNA sequences. *BMC Evolutionary Biology*, 9(1): 1.
- Horton, T.R. and Bruns, T.D., 2001. The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: peeking into the black-box. *Molecular Ecology*, 10: 1855-1871.
- Jargeat, P., Martos, F., Carriconde, F., Gryta, H., Moreau, P.A. and Gardes, M., 2010. Phylogenetic species delimitation in ectomycorrhizal fungi and implications for barcoding: the case of the *Tricholoma scalpturatum* complex (Basidiomycota). *Molecular Ecology*, 19: 5216-5230.
- Jonsson, L.M., Dighton, J., Lussenhop, J. and Koide, R.T., 2006. The effect of mixing ground leaf litters to soil on the development of pitch pine ectomycorrhizal and soil arthropod communities in natural soil microcosm systems. *Soil Biology and Biochemistry*, 38(1): 134-144.
- Morris, M.H., Pérez-Pérez, M.A., Smith, M.E. and Bledsoe, C.S., 2009. Influence of host species on ectomycorrhizal communities associated with two

- fungal communities across the North American Arctic. *Ecosphere*, 3(11): 111.
- Walker, J.F., Miller, O.K. and Horton, J.L., 2005. Hyperdiversity of ectomycorrhizal fungus assemblages on oak seedlings in mixed forests in the southern Appalachian Mountains. *Molecular Ecology*, 14(3): 829-838.
  - White, T.J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J.W., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics: 315-322. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J. (Eds.). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, Inc., New York, 482p.
  - Tedersoo, L., Jairus, T., Horton, B.M., Abarenkovi, K., Suvi, T., Saar, I. and Kõljalg, U., 2008. Strong host preference of ectomycorrhizal fungi in a Tasmanian wet sclerophyll forest as revealed by DNA barcoding and taxon-specific primers. *New Phytologist*, 180(2): 479-490.
  - Tedersoo, L., May, T.W. and Smith, M.E., 2010. Ectomycorrhizal lifestyle in fungi: global diversity, distribution, and evolution of phylogenetic lineages. *Mycorrhiza*, 20(4): 217-263.
  - Timling, I., Dahlberg, A., Walker, D.A., Gardes, M., Charcosset, J.Y., Welker, J.M. and Taylor, D.L., 2012. Distribution and drivers of ectomycorrhizal

Archive of SID

## Diversity of ectomycorrhizal fungi recovered from the roots of oak trees in Hyrcanian forests of Iran

S.M. Zamani<sup>1</sup>, E. Mohammadi Goltapeh<sup>2</sup>, N. Safaie<sup>3\*</sup> and M. Pedram<sup>4</sup>

1- Assistant Prof., Research Institute of Forests and Rangelands, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran

2- Prof., Department of Plant Pathology, College of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

3\* - Corresponding author, Associate Prof., Department of Plant Pathology, College of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran. E-mail: nsafaie@modares.ac.ir

4- Assistant Prof., Department of Plant Pathology, College of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Received: 16.04.2018

Accepted: 22.07.2018

### Abstract

Ectomycorrhizal symbiosis is essential for the establishment and functioning of trees in forest ecosystems. Despite widespread recognition of important roles of ectomycorrhizal fungi in improving plant nutrition, increasing the resistance of host plants to drought stress and suppressing of root pathogens, little studies have been carried out on the diversity of the fungal symbionts, especially in ectomycorrhizal symbiosis in Iran. Identification of ectomycorrhizal fungi is the first step in all studies related to this symbiosis and is essential to exploit its maximum potential in forest management. The aim of this study was to identify the ECM fungal associating with oak trees (*Quercus castaneifolia* C. A. Mey., *Q. macranthera* Fisch. & C. A. Mey. ex Hohen. and *Q. petraea* L.) in the 6 locations of north forests of Iran. The ectomycorrhizal root tips of oak trees were collected for molecular identifications. Molecular analysis involved sequencing of the Internal Transcribed Spacer (ITS) region and Bayesian phylogenetic analysis with other sequences on website databases. A total of 207 root systems were sampled and documented high ectomycorrhizal diversity with a total of 49 taxa by Blast algorithm. These taxa belonging to 13 genus, including *Amanita*, *Boletus*, *Cortinarius*, *Hebeloma*, *Hydnum*, *Hygrophorus*, *Inocybe*, *Laccaria*, *Lactarius*, *Lycoperdon*, *Russula*, *Scleroderma* and *Tricholoma*. Species of *Lactarius*, *Russula* and *Inocybe* were diverse and dominant. Bayesian analysis confirmed the species-level and genus-level identification of 17 and 32 ectomycorrhizal fungi, respectively. This study documented high ectomycorrhizal diversity in Hyrcanian forests with oak trees.

**Keywords:** Bayesian method, Blast algorithm, community, phylogenetic analysis, *Q. castaneifolia*, *Q. macranthera*, *Q. petraea*.