شناسایی مورفولوژیکی و مولکولی قارچ‌های میکوریز آربوسکولار همزیست با ریشه پسته در استان کرمان

مرضیه یزدان‌پناه[۱]، ابراهیم صداقتی[۲*]، پژمان خدایگان[۳]، حسین علایی[۲]

تاریخ دریافت: ۹۴/۸/۵ تاریخ پذیرش: ۹۵/۷/۱۴

چکیده

قارچ‌های میکوریز آربوسکولار، موجب بهبود رشد گیاهان و مقاومت بیشتر به تنش‌های زیستی و غیرزیستی می‌شوند. به‌منظور شناسایی مولکولی و مورفولوژیکی قارچ‌های میکوریز آربوسکولار، از منطقه‌ی ریزوسفر درختان پسته استان کرمان در سال‌های ۱۳۹۳-۱۳۹۲ نمونه‌برداری انجام شد. اسپورهای قارچ میکوریز آربوسکولار از خاک‌های نمونه‌برداری شده با استفاده از روش الک مرطوب جداسازی و بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیکی مانند رنگ اسپور، شکل، تزئینات سطح، اندازه و ساختار دیواره آن‌ها گروه‌بندی شدند. استخراج DNA از تک اسپور انجام شد. بخشی از ناحیه 18S rDNA با استفاده از آغازگر عمومی NS4 و آغازگر اختصاصی قارچ میکوریز آربوسکولار AML1 در مرحله اول و آغازگرهای اختصاصی قارچ میکوریز آربوسکولار AML1/AML2 در مرحله دوم واکنش PCR آشیانه‌ای، تکثیر شد. براساس بررسی‌های مورفولوژیکی و مولکولی، گونه‌های *Funneliformis mosseae*، *Claroideoglomus claroideum* و *Rhizophagus iranicus* شناسایی گردید. گونه *R. iranicus* برای فلور قارچی درختان پسته جدید می‌باشد. با توجه به محدودیت ویژگی‌های مورفولوژیکی در شناسایی و تاکسونومی این گروه مهم از قارچ‌ها، روش‌های مولکولی می‌توانند به‌عنوان مکمل روش‌های مورفولوژیکی موجب اطمینان بیشتر در تاکسونومی و تمایز گونه‌های مشابه به حساب آیند.

واژگان کلیدی: پسته، شناسایی مولکولی، قارچ میکوریز آربوسکولار، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز آشیانه‌ای، همزیستی.

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی‌عصر(عج) رفسنجان

[۲] استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی‌عصر(عج) رفسنجان

[۳] دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی‌عصر(عج) رفسنجان

ایمیل نویسنده مسئول: **Sedaghatiebrahim@yahoo.com**

مقدمه

پسته (*Pistacia vera* L.) گیاهی نیمه‌گرمسیری از خانواده Anacardiaceae و متعلق به جنس *Pistacia* می‌باشد. از بین ۱۱ گونه این جنس، تنها گونه *Pistacia vera* L. یا پسته اهلی ارزش اقتصادی دارد (۱). ایران به‌عنوان یکی از عمده‌ترین تولید کننده‌های پسته در دنیا بوده و بیش از ۶۰ درصد سطح زیر کشت این محصول در ایران قرار دارد. براساس آمار منتشر شده، در ایران بیش از ۴۴۰ هزار هکتار پسته با تولید سالانه ۲۵۰ هزار تن پسته وجود دارد (۱۵). خشکی و خشکسالی از خصوصیات طبیعی و اقلیمی ایران است و میزان بارندگی در کشورمان به‌طور متوسط نزدیک به یک سوم متوسط جهانی است. با توجه به اهمیت اقتصادی قابل توجه این محصول و اثرات سوء ناشی از تنش‌های محیطی در مناطق پسته‌کاری، راهکارهای افزایش مقاومت و تحمل گیاه در این مناطق باید مورد توجه بیشتری قرار گیرد (۵). یکی از روش‌های قابل استفاده برای کاهش اثرات مخرب ناشی از تنش‌های محیطی زنده و غیرزنده، استفاده از قارچ‌های میکوریز آربوسکولار (AMF) می‌باشد (۷).

در بین انواع مختلف روابط میکوریزایی، AMF به‌علت پراکنش جهانی و نیز ارتباط گسترده آن‌ها با گیاهان، رایج‌ترین نوع همزیستی مسالمت‌آمیز را در طبیعت تشکیل می‌دهند (۴۳). با توجه به افزایش جذب آب و مواد غذایی از خاک در همزیستی میکوریزایی، گیاهان دارای این نوع همزیستی رشد و عملکرد بهتر و مقاومت بیشتری را در برابر تنش‌های زنده (عوامل بیماریزایی که ریشه گیاه را مورد حمله قرار می‌دهند) و غیر زنده (کمبود یا مسمومیت مواد غذایی، خشکی، سرما، شوری و عناصر سنگین) از خود نشان می‌دهند (۵۰). از نقش‌های کلیدی این قارچ‌ها موثر بودن در افزایش جذب فسفر از خاک و انتقال به گیاه میزبان است (۳۳). پسته از جمله گیاهانی است که ریشه‌های فرعی آن گستردگی زیادی ندارند و همزیستی آن‌ها با AMF موجب افزایش سطح جذب کننده ریشه و مقاومت گیاه به کم آبی می‌شود (۲۰). بنابراین با استفاده از قابلیت این قارچ‌ها در افزایش رشد، تحمل به شوری، تحمل به تنش‌های آبی و غیره می‌توان شرایط مناسب‌تری را برای کشت محصولات کشاورزی از جمله پسته فراهم نمود.

شناسایی و تاکسونومی قارچ‌های AM به‌طور معمول براساس مورفولوژی اسپورها پایه‌ریزی شده است. با توجه به محدود بودن ویژگی‌های مورفولوژیکی مبتنی بر اسپور، تمایز گونه‌های نزدیک به هم در برخی جنس‌ها دشوار می‌باشد. در سال‌های

[1] Arbuscular mycorrhizal fungi

اخیر با توجه به توسعه روش‌های جدید مولکولی، مطالعه روابط فیلوژنتیکی و تنوع ژنتیکی AMF بر اساس این روش‌ها بیشتر انجام شده است. اکثر روش‌های شناسایی این قارچ‌ها بر اساس توالی‌یابی DNA ریبوزومی[1] بوده است. اطلاعات توالی DNA ریبوزومی در حال افزایش و توالی‌های آن‌ها در پایگاه داده‌ها، برای محققین قابل دسترس است (۲۲). به‌طور متوسط ۴۰ تا ۴۰۰ کپی از واحدهای DNA ریبوزومی در ژنوم این قارچ‌ها موجود و طول آن‌ها بین ۵۰-۷ کیلو باز متغیر است (۵۵). میزان تغییرات در زیر واحد کوچک DNA ریبوزومی در سطح گونه 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 مربوط به این ناحیه می‌باشد (۴۰). روش‌های مولکولی به‌دلیل دقت زیاد در شناسایی می‌توانند به‌عنوان مکمل روش‌های مورفولوژیکی مطرح و موجب اطمینان بیشتر در شناسایی و ثبات بیشتر در تاکسونومی این قارچ‌ها شوند. هدف از این پژوهش شناسایی گونه‌های AMF همزیست با ریشه درختان پسته با استفاده از روش‌های مولکولی و مورفولوژیکی می‌باشد. این نوع از شناسایی برای اولین بار در مناطق پسته‌کاری ایران انجام می‌شود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

نمونه‌برداری از برخی باغ‌های پسته در شهرستان‌های رفسنجان و زرند (استان کرمان) در سال‌های ۱۳۹۲ و ۱۳۹۳ انجام شد. نمونه‌برداری به‌صورت تصادفی از چند نقطه مختلف باغ و از عمق پنج تا ۵۰ سانتی‌متری خاک اطراف ریشه درختان پسته صورت گرفت. هر نمونه شامل یک کیلوگرم خاک و ریشه‌های نازک اطراف درخت بود. نمونه‌های خاک به آزمایشگاه منتقل شده و به‌مدت دو هفته در دمای آزمایشگاه قرار داده شدند، تا خشک شوند (۹).

جداسازی و گروه‌بندی اسپورها بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیکی

پس از نمونه‌برداری، جهت اثبات رابطه همزیستی قارچ‌های AM با درختان پسته، رنگ‌آمیزی ریشه‌ها با استفاده از روش فیلیپس و هیمن[2] (۳۲) انجام شد. سپس اسپورهای AMF از خاک‌های نمونه‌برداری شده، بر اساس روش سری الک مرطوب جداسازی گردید (۱۸). اسپورهای جدا شده در زیر استریومیکروسکوپ (Nikon SMZ 1000) بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیکی مانند اندازه، رنگ، شکل، تزئینات سطح و هیف اتصال (۸ و ۴۴) گروه‌بندی شده و هر کدام از این گروه‌های

[1] Ribosomal DNA
[2] Philips and Hyman

اسپوری نیز به سه گروه تقسیم شدند (۱۳). یکی از این گروه‌ها برای شناسایی مورفولوژیکی، یک گروه برای شناسایی مولکولی و گروه دیگر برای استقرار کشت چند اسپوری میکوریزایی (خالص‌سازی) مورد استفاده قرار گرفتند.

شناسایی مورفولوژیکی میکوریز آربوسکولار

جهت بررسی ویژگی‌های مورفولوژیکی و مورفومتریکی اسپورها، از مخلوط حجمی PVLG[1] و معرف ملزر به نسبت ۱:۱ استفاده گردید (۱۹). شناسایی مورفولوژیکی گونه‌های AMF با استفاده از میکروسکوپ نوری کالیبره شده (Nikon-ECLIPSE-80i) و با بررسی 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 انجام شد. شناسایی اسپورها با استفاده از تارنماهای اینترنتی معتبر http://www.invam.wvu.edu و http://www.zor.zut.edu.pl و مقالات کلیدی (۳۰) انجام شد.

استخراج DNA از اسپور

قبل از استخراج DNA، هر اسپور به مدت ۳۰ ثانیه در معرض امواج مافوق صوت با شدت ۳۷ هرتز قرار گرفت. اسپورهای تیمار شده 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 و ۱۰ میکرولیتر آب مقطر استریل خرد شده و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۶۰ تا ۶۵ درجه سلسیوس قرار داده شد. بعد از ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ با سرعت ۱۳۰۰۰ دور بر دقیقه، فاز رویی به‌عنوان DNA الگو در PCR استفاده شد (۴۱).

تکثیر DNA

برای تکثیر DNA استخراج شده از تک اسپور متعلق به هر گروه اسپوری، از روش PCR آشیانه‌ای استفاده شد. مرحله اول PCR با استفاده از آغازگر اختصاصی میکوریز آربوسکولار AML1 (5'-TTCCGTCAATTCCTTTAAG-3') و آغازگر عمومی NS4 (5'-AACTTTCGATGGTAGGATAGA-3') انجام گردید (۲۵). واکنش تکثیری در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۵/۵ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه، ۱۲/۵ میکرولیتر Ampliqon Taq DNA Polymerase 2x، یک میکرولیتر آغازگر رفت ۱۰ میکرومولار، یک میکرولیتر آغازگر برگشت ۱۰ میکرومولار و پنج میکرولیتر DNA استخراج شده با شرایط زیر انجام شد: سه دقیقه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس برای واسرشت نمودن اولیه DNA و سپس ۳۰ چرخه شامل ۳۰ ثانیه در ۹۵ درجه سلسیوس، یک دقیقه در ۴۵ درجه سلسیوس و یک دقیقه در ۷۲ درجه سلسیوس و در آخر ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه

[1] Polyvinyl-Lacto-Glycerol

سلسیوس برای گسترش نهایی. مرحله دوم PCR با آغازگرهای اختصاصی قارچ میکوریز آربوسکولار، AML1 و AML2 (5'-CCAAACACTTTGGTTTCC-3') انجام گردید (۲۵). در این مرحله پنج میکرولیتر از محصول PCR اول به‌عنوان DNA الگو استفاده شد. حجم واکنش تکثیری، تعداد چرخه‌ها و مراحل PCR دوم مشابه به PCR اول بود اما با این تفاوت که دمای مرحله اتصال ۴۳ درجه سلسیوس بود. محصول حاصل از PCR آشیانه‌ای به‌منظور صحت تکثیر DNA روی ژل آگارز ۱/۵ درصد با بافر[1]TBE با اختلاف پتانسیل ۸۵ ولت الکتروفورز شد. جهت محاسبه و بررسی اندازه قطعات DNA تکثیر شده، از نشانگر استاندارد ۱۰۰ جفت بازی (شرکت کیاژن) استفاده گردید.

تعیین توالی قطعات تکثیر شده و رسم درخت فیلوژنتیکی

قطعات تکثیر شده از هر نمونه جهت تعیین توالی از طریق شرکت دنازیست (http://www.denazist.com) به شرکت ماکروژن کره‌جنوبی ارسال گردید. نتایج توالی‌ها پس از دریافت، با استفاده از نرم‌افزار BioEdit ویرایش و بررسی مشابهت توالی ژن‌ها با اطلاعات موجود در بانک ژن مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی[2](NCBI) انجام شد. توالی‌های مرجع با بیشترین میزان شباهت انتخاب و همردیف‌سازی توالی‌ها با نرم‌افزار Clustal W انجام گردید (۵۱). رابطه فیلوژنی بین توالی‌های حاصل و توالی‌های برداشت شده از بانک ژن با استفاده از برنامه MEGA6.06 تجزیه و تحلیل گردید. در آخر شجره فیلوژنتیکی با روش[3]NJ و براساس آزمون اعتبارسنجی[4]۱۰۰۰ تکرار رسم شد (۴۲).

خالص‌سازی قارچ‌های میکوریز آربوسکولار

برای تکثیر و خالص‌سازی گونه‌های AMF شناسایی شده، از روش کشت چند اسپوری استفاده شد. گیاه سورگوم (*Sorghum bicolor*) به‌منظور استقرار کشت خالص میکوریزی انتخاب گردید. بذور سورگوم قبل از کشت به مدت ۱۰ دقیقه در هیپوکلریت سدیم یک درصد غوطه‌ور شده و پس از اتمام زمان مورد نظر، چند مرتبه با آب مقطر شسته شدند. در نهایت هشت تا ۱۰ عدد بذر در گلدان‌های حاوی محیط پایه (خاک، ماسه و پرلایت با نسبت ۱:۳:۱) کشت شدند. به مدت دو تا سه هفته به بذرها فرصت رشد و جوانه‌زنی داده شد تا ریشه‌زایی اولیه کافی برای مایه‌زنی داشته باشند. بعد از این مدت، هر گروه

[1] Tris Borate EDTA
[2] National Center for Biotechnology Information
[3] Neighbor joining
[4] Bootstrapping

اسپوری متعلق به یک گونه با میکروپیپت برداشته و در مجاورت ریشه گیاهان قرار گرفتند. گلدان‌ها در گلخانه به مدت چهار تا پنج ماه با دمای ۳۰-۲۵ درجه سلسیوس قرار داده شدند (۵۳).

بررسی موفقیت کشت خالص

بعد از گذشت چهار تا پنج ماه از نگهداری گلدان‌های کشت خالص در گلخانه، تنش خشکی با قطع آبیاری صورت گرفت تا گونه‌های AMF وارد دوره اسپورزایی شوند. پس از خشک شدن کامل، اندام‌های هوایی گیاهان از سطح خاک بریده شده و خاک گلدان‌ها به همراه ریشه‌های گیاهان به‌منظور بررسی آلودگی میکوریزایی جمع‌آوری شدند. رنگ‌آمیزی ریشه‌ها با روش فیلیپس و هیمن (۳۲) انجام شد. اندام‌های قارچی به رنگ آبی و از طیف پر رنگ تا کم‌رنگ براساس میزان تراکم ساختار قارچی و رنگ‌پذیری آن‌ها قابل مشاهده بودند.

نتایج و بحث

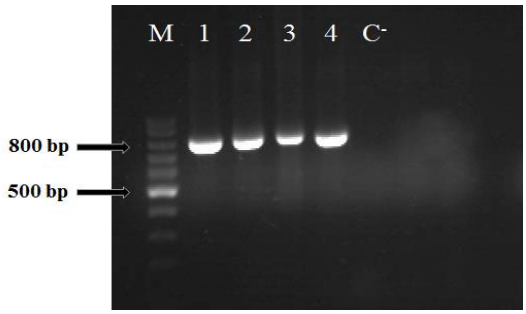
نمونه برداری از ۱۲ منطقه استان کرمان انجام شد و از بین نمونه‌های خاک پسته جمع‌آوری شده، تعدادی از آن‌ها برای شناسایی مولکولی مناسب بودند (جدول ۱).

جدول ۱- گونه‌های قارچ میکوریز آربوسکولار شناسایی شده از مناطق مورد بررسی

شماره	منطقه نمونه‌برداری	رقم پسته	گونه قارچ میکوریز آربوسکولار
۱	رفسنجان	اکبری	*Claroideoglomus claroideum*
۲	رفسنجان	احمدآقایی	*Rhizophagus iranicus*
۳	هرم‌اباد-رفسنجان	احمدآقایی	-
۴	رفسنجان	احمدآقایی	*Funneliformis mosseae*
۵	رفسنجان	اکبری و اوحدی	-
۶	مقویه-رفسنجان	اکبری و احمدآقایی	*Funneliformis mosseae*
۷	نوق-رفسنجان	کله‌قوچی	*Funneliformis mosseae*
۸	نوق-رفسنجان	احمدآقایی	*Funneliformis mosseae*
۹	نوق-رفسنجان	کله‌قوچی	-
۱۰	کوهبنان-زرند	اوحدی	*Funneliformis mosseae*
۱۱	زرند	اوحدی	*Funneliformis mosseae*
۱۲	زرند	اوحدی و ممتاز	-

از آنجایی‌که شرط شناسایی مولکولی AMF براساس اسپور، وجود اسپورهای سالم، جوان و بالغ می‌باشد، اسپورهای با ظاهر سالم و زنده و دارای محتویات سیتوپلاسمی از هر نمونه خاک جمع‌آوری و براساس ویژگی‌های مورفولوژی گروه‌بندی شدند. طبق نتایج به‌دست آمده، جمعیت و تنوع اسپوری سالم در نمونه‌های خاک پسته پایین بود که این امر می‌تواند به‌علت موقعیت اقلیمی و بافت خاک درختان پسته باشد.

روش به‌کار برده شده برای استخراج DNA کارایی مناسبی دارد اما به‌علت میزان کم DNA در هر اسپور، برخی از واکنش‌های PCR با موفقیت انجام نشد. لذا در برخی موارد چندین مرتبه استخراج DNA از تک اسپور صورت گرفت. به دنبال تکثیر بخشی از ناحیه 18S rDNA با استفاده از آغازگرهای AML1/NS4 در مرحله اول و AML1/AML2 در مرحله دوم واکنش PCR آشیانه‌ای، قطعه‌ای به طول ۷۹۳ جفت باز تکثیر گردید (شکل ۱).



شکل۱ – قطعه ۷۹۳ جفت بازی تکثیر شده از ناحیه 18S rDNA قارچ میکوریز آربوسکولار

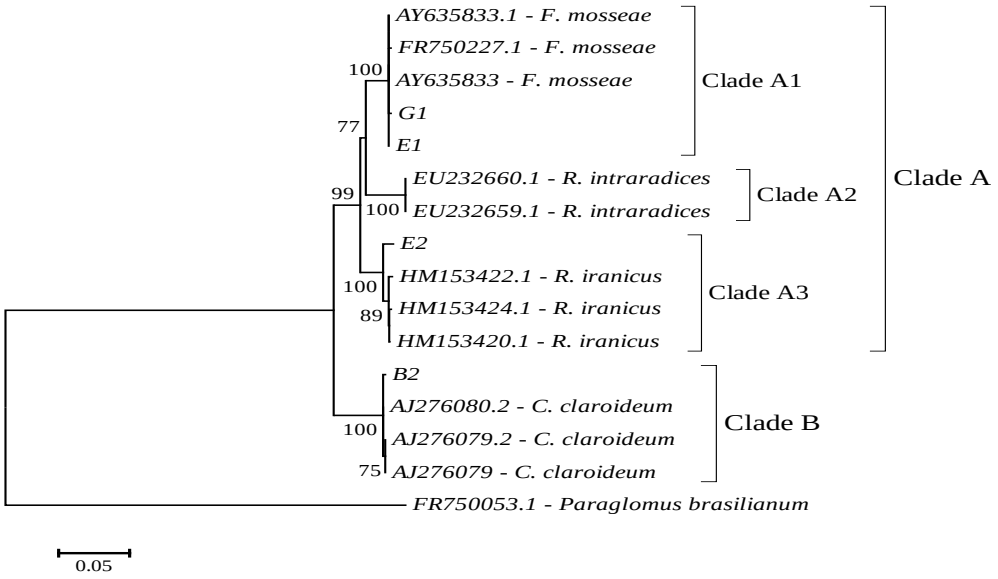
M، نشانگر اندازه DNA ۱۰۰ جفت باز.

چاهک‌های ۴-۱، اسپورهای قارچ میکوریز آربوسکولار جدا شده از نمونه خاک پسته شهرستان رفسنجان. C^-، کنترل منفی.

در این تحقیق سه گونه متعلق به سه جنس و دو خانواده در راسته Glomerales شناسایی شدند (شکل ۲). آغازگرهای مورد استفاده قابلیت تفکیک قارچ‌های میکوریز آربوسکولار در سطح جنس را دارند و آن‌ها را با درجه اعتبار نسبتاً بالا از یکدیگر متمایز می‌نمایند. قابلیت تفکیک و شناسایی گونه‌های مختلف در هر جنس توسط این آغازگرها متفاوت بود.

راسته Glomerales شامل دو خانواده Glomeraceae و Claroideoglomeraceae می‌باشد که به ترتیب در Clade A و Clade B قرار گرفتند. در شکل ۲، کلادهای معتبری که معرف خانواده یا جنس‌های این راسته هستند، با درجه اعتبار بالا از

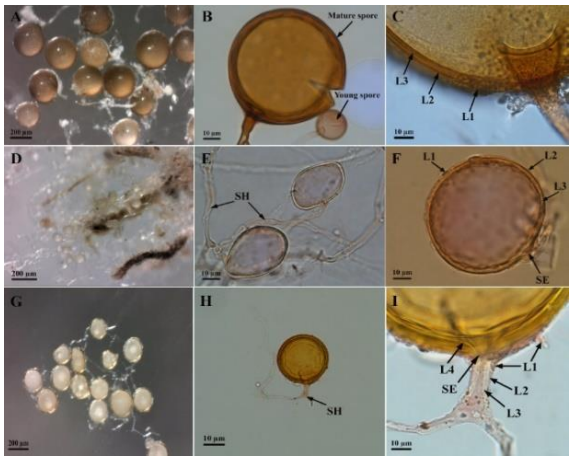
یکدیگر متمایز شده‌اند. موقعیت فیلوژنتیکی و جایگاه کلادها و دودمان‌های اعضای این راسته نسبت به یکدیگر و سایر کلادهای مورد بررسی در درخت ترسیم شده با نتایج کروگر[1] همکاران (۲۳) مطابقت دارد.



شکل ۲- روابط تکاملی گونه‌های شناسایی شده از قارچ‌های میکوریز آربوسکولار با استفاده از روش Neighbor-Joining با نرم‌افزار MEGA6.06 آنالیز شده است. آزمون اعتبار سنجی با روش bootstrap و ۱۰۰۰ تکرار در کنار انشعابات نشان داده شده است.گونه FR750053.1 *Paraglomus brasilianum* - به‌عنوان out group استفاده گردیده است.

در پژوهش حاضر، با استفاده از تجزیه و تحلیل توالی‌های حاصل از تکثیر بخشی از ناحیه زیر واحد کوچک DNA ریبوزومی و بررسی ویژگی‌های مورفولوژیکی، جدایه B2 جدا شده از نمونه خاک رفسنجان به‌عنوان گونه *Claroideoglomus claroideum*، جدایه‌های E1 و G1 جدا شده از نمونه‌های خاک زرند و رفسنجان و جدایه E2 جدا شده از رفسنجان به‌عنوان *Rhizophagus iranicus* شناسایی شدند. گونه‌های شناسایی شده با درجه اعتبار ۱۰۰ درصد به همراه توالی‌های مرجع در کلادهای مجزا قرار گرفتند (شکل ۲). بررسی ویژگی‌های مورفولوژیکی اسپورها نشان داد که جدایه‌های مختلف *Funneliformis mosseae* دارای تنوع مورفولوژیک بالایی می‌باشند. علاوه‌برآن، با بررسی اسپورهای زنده جدا شده از نمونه‌های خاک به صورت ضمنی می‌توان گفت که اسپورهای این گونه در بیشتر خاک‌های مورد بررسی با فراوانی بالاتری نسبت به سایر گونه‌ها وجود داشتند. تصاویر مربوط به گونه‌های شناسایی شده در شکل ۳ نشان داده شده است.

[1] Kruger



شکل ۳- گونه‌های قارچ میکوریز آربوسکولار شناسایی شده در ریزوسفر درختان پسته استان کرمان. A، B و C: *Funneliformis mosseae*. D، E و F، *Rizophagus iranicus*. G، H و I: *Claroidoglomus claroideum*. لایه‌های دیواره اسپور، L1: لایه اول، L2: لایه دوم، L3: لایه سوم، L4: لایه چهارم، SE: سپتوم (دیواره عرضی).

دو گونه *F. mosseae* و *C. claroideum*، قبلا از نقاط مختلف ایران و از محصولات مختلف از جمله پسته، مرکبات، غلات، بادام، سیب‌زمینی و غیره گزارش شده‌اند (۱، ۲ و ۴). گونه *R. iranicus* برای فلور قارچی درختان پسته ایران جدید می‌باشد. این گونه از نمونه خاک جمع‌آوری شده از گندم در جنوب غربی ایران شناسایی گردید (۱۱) اما ویژگی‌های مورفولوژیکی آن تاکنون توصیف نشده است. توصیف گونه *R. iranicus* به شرح زیر است:

Rhizophagus iranicus (Blaszkowski *et al.*,) Walker and Schussler
Syn.: *Glomus iranicum* Blaszkowski *et al*

اسپوروکارپ در این گونه مشاهده نشد و اسپورها عمدتاً به‌صورت خوشه‌ای و به‌ندرت منفرد در خاک باغ و گاهی اوقات داخل ریشه گیاهان تله تشکیل می‌شوند. اسپورها به رنگ زرد کم‌رنگ، کروی تا نیمه کروی، برخی مواقع بیضوی، به‌ندرت کشیده با اشکال نامنظم با ابعاد ۷۰-۵۰ میکرومتر می‌باشند. دیواره اسپور از سه لایه تشکیل شده است که در معرف ملزر فقط لایه اول واکنش نشان داده و به رنگ قرمز تا قهوه‌ای مایل به قرمز در می‌آید. لایه اول (L1) موسیلاژی، شفاف، زبر و به ضخامت ۱/۵-۱ میکرومتر است. این لایه معمولاً در اسپورهای بالغ تجزیه شده بود. لایه دوم (L2) پایدار، نیمه سخت، شفاف و به ضخامت ۱/۸-۱ میکرومتر که اتصال ضعیفی به لایه سوم دارد. لایه سوم (L3) ورقه‌ای، صاف، روشن تا زرد کم‌رنگ که ۳-۲ میکرومتر ضخامت دارد. هیف متصل به اسپور (SH)، به رنگ روشن تا زرد کم‌رنگ، مستقیم یا خمیده، استوانه‌ای تا کمی قیفی شکل مشاهده شد. قطر هیف در محل اتصال به اسپور ۹-۶/۵ میکرومتر می‌باشد. دیواره هیف اتصال از سه لایه

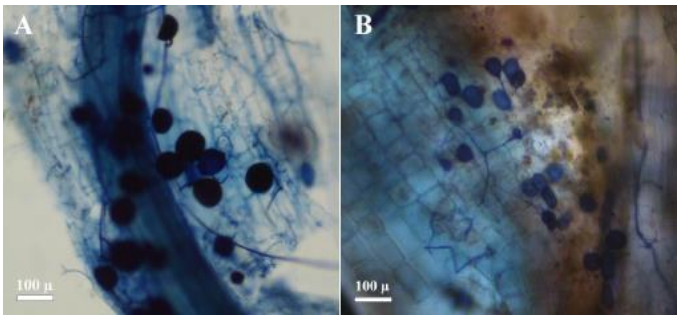
تشکیل شده که امتداد لایه‌های دیواره اسپور می‌باشند. منفذ (P)، در بیشتر اسپورهای بالغ باز بوده و گاهی اوقات توسط یک دیواره امتداد یافته از لایه سوم دیواره اسپور بسته شده است.

براساس منابع، این گونه از نظر ساختار دیواره اسپور شباهت زیادی به *Septoglomus xanthium* دارد و اندازه اسپورهای بالغ و لایه دوم دیواره اسپور هر دو گونه شبیه یکدیگر است (۱۰). اسپورهای *Se. xanthium* به‌طور قابل توجهی تیره‌رنگ هستند و هیچ کدام از لایه‌های دیواره اسپورها روشن و شفاف نمی‌باشند. همچنین لایه اول این گونه در معرف ملزر واکنش نشان نمی‌دهد و در اکثر اسپورهای بالغ دیده می‌شود. گونه دیگر شبیه به *R. iranicus*، *Viscospora viscosa* می‌باشد که اسپورهایش روشن تا زرد کم‌رنگ و سه لایه‌ای هستند. اسپورهای *Vi. viscosa* از نظر اندازه بزرگ‌تر بوده و دو لایه داخلی دیواره اسپور بسیار نازک، پایدار و و نیمه ارتجاعی می‌باشد. همچنین، لایه اول دیواره اسپور در معرف ملزر واکنش نمی‌دهد و در اسپورهای بالغ باقی مانده و ذرات خاک به آن می‌چسبند (۵۲).

اگرچه *R. iranicus* از نظر ویژگی‌های مورفولوژیکی مشابه دو گونه ذکر شده می‌باشد اما موقعیت فیلوژنتیکی این سه گونه متفاوت است (۱۱). در بررسی انجام شده توسط کروگر و همکاران (۲۳) موقعیت فیلوژنتیکی *G. iranicum* (*R. iranicus*) نامشخص باقی ماند و به همراه گونه *G. indicum* یک کلاد پایه در خانواده Glomeraceae تشکیل دادند که در پژوهش حاضر نیز این گونه از *R. intraradices* جدا شده است. ردکر[1] و همکاران (۳۶) بر این باورند گونه *G. iranicum* به اشتباه به جنس *Rhizophagus* منتقل شده است. بنابراین موقعیت فیلوژنتیکی آن به‌طور دقیق مشخص نیست و باید با نام *G. iranicum* معرفی شود. از آن‌جایی که این گونه به تازگی توصیف شده و تعداد توالی‌های موجود در بانک ژن بسیار اندک می‌باشد، تعیین دقیق موقعیت فیلوژنتیکی و جایگاه تاکسونومیکی آن نیاز به بررسی بیشتر با آغازگرهای مختلف دارد.

پس از گذشت چهار تا پنج ماه از استقرار کشت چند اسپوری، در نمونه‌های ریشه رنگ‌آمیزی شده مربوط به گونه‌های *F. mosseae* و *R. iranicus* اندام‌های قارچی مرتبط با AMF (اسپور، میسیلیوم، آربوسکول، وزیکول و غیره) مشاهده شد که بیانگر برقراری ارتباط همزیستی آن‌ها با سورگوم و تکثیر گونه‌ها می‌باشد (شکل ۴).

[1] Redecker



شکل ۴- اندام‌های قارچی میکوریز آربوسکولار داخل ریشه‌های رنگ‌آمیزی شده گیاه سورگوم.

A: *Funneliformis mosseae* .B: *Rizophagus iranicus*.

تعداد و نوع اسپورهای AMF موجود در خاک با عوامل متعددی از جمله فعالیت میکروبی خاک (۳۸)، درجه حرارت (۴۵)، عملیات خاکی انجام شده (۵۶)، نور (۲۱) و حاصلخیزی خاک (۲۸) بستگی دارد. همچنین عواملی مانند اسیدیته و میزان فسفر خاک جوانه‌زنی و تولید اسپور را تحت تأثیر قرار می‌دهند (۵۰). تنوع و جمعیت اسپوری این گروه از قارچ‌ها زمانی‌که اکوسیستم‌های طبیعی در معرض دخالت انسان قرار گیرد، کاهش می‌یابد که دلیل اصلی آن دست‌ورزی مداوم خاک و افزایش استفاده از نهاده‌های کشاورزی می‌باشد (۳۷). بدیهی است به‌علت ویژگی‌های ساختمانی خاک‌های مناطق پسته‌کاری استان کرمان از جمله اسیدته و شوری بالا، دست‌ورزی زیاد خاک، پایین بودن تنوع گیاهی، فعالیت ریشه‌های پسته در اعماق بیش از ۵۰ سانتی‌متر، پایین بودن جمعیت و تنوع اسپورهای سالم و زنده قابل انتظار است. با این وجود، گونه *F. mosseae* به میزان فراوان و در بیشتر مناطق نمونه‌برداری، از ناحیه ریزوسفر درختان پسته شناسایی شد. این امر می‌تواند به‌علت سازگاری بالای این گونه با تنش‌ها و شرایط محیطی مناطق مختلف، قابلیت استفاده بیشتر از ترشحات ریشه، تأثیر کمتر عملیات خاکی بر اسپورزایی آن و تولید خوشه‌های اسپوری باشد (۱۲ و ۳۱).

شناسایی مورفولوژیکی AMF دارای محدودیت‌هایی می‌باشد، از جمله این‌که ویژگی‌های مورفولوژیکی اسپورها محدود بوده و تولید اسپور به شدت تحت تأثیر شرایط محیطی قرار دارد. به‌طوری‌که برخی گونه‌ها تحت شرایط خاص اسپور تولید می‌کنند و در بیشتر شرایط محیطی فقط اندام‌های رویشی دارند. همچنین برخی گونه‌ها اسپوری که دو شکلی مورفولوژیکی دارد، تولید می‌کنند که موجب شناسایی اشتباه می‌شود. علاوه برآن تنوع زیادی در مورفولوژی اسپور قارچ‌های AM حتی درون یک گونه وجود دارد (۲۹). اسپورهای جمع‌آوری شده از مزرعه اغلب پارازیته، تخریب شده یا نابالغ‌اند و درنتیجه فاقد مشخصات مشخص و ضروری برای تشخیص گونه می‌باشند. این مشکل می‌تواند با کشت‌های تله گلدانی AMF همراه گیاهان میزبان مناسب آن‌ها مانند سورگوم، ذرت و غیره حل شود که در این‌صورت اسپورهای سالم در همه مراحل به‌دست می‌آیند.

البته ممکن است در نمونه خاک به‌کار گرفته برای کشت‌های تله، همه گونه‌های قارچی مزرعه وجود نداشته باشد تا بتواند گیاه مورد استفاده را کلونیزه کنند. بنابراین به‌منظور مطالعه جمعیت‌های اسپوری یک منطقه، بررسی نمونه‌های خاک طبیعی و کشت تله گلدانی مورد نیاز است. در اکثر موارد این روش‌ها قادر نیستند گونه یا گونه‌هایی از AMF را که داخل ریشه‌های گیاهان وجود دارند، شناسایی و تفکیک کنند (۳۵). این مشکل به‌علت وجود اسپور طیف وسیعی از این قارچ‌ها در مجاورت ریشه‌ها و کلونیزه شدن ریشه گیاه توسط بیش از یک گونه قارچ می‌باشد (۳۴). علاوه براین کلید شناسایی جامع و دقیقی برای AMF تاکنون ارائه نشده است. این مشکلات سبب شده برداشت ما از جوامع AMF و فراوانی گونه‌های آن کامل و صحیح نباشد و بسیاری از گونه‌ها در مطالعات اکولوژیکی نادیده گرفته شوند. با توجه به اهمیت این گروه مهمی قارچی و همچنین معایب شناسایی مورفولوژیکی، این پژوهش با تلفیق روش‌های مولکولی و مورفولوژیکی انجام شد.

در قارچ‌های AM استخراج DNA از نمونه‌های خاک (۲۷)، ریشه‌های کلونیزه شده (۱۴ و ۳۹)، چند اسپور (۱۳) یا تک اسپور (۲۵، ۲۶ و ۴۱) صورت می‌گیرد. با توجه به این‌که در این گروه قارچی، اندام‌های آن‌ها به‌طور عمیقی در ریشه‌ها نفوذ می‌کنند، استخراج DNA این قارچ‌ها از ریشه‌های کلونیزه شده به‌علت وجود اسیدهای نوکلئیک گیاه و همچنین حضور قارچ‌های ساپروفیت و برخی مواقع پاتوژن در ریشه گیاهان، مشکلات زیادی به همراه دارد (۶). برای غلبه بر این مشکلات، باید از آغازگرهای اختصاصی قارچ‌های AM استفاده کرد. علاوه بر آن در شرایط طبیعی یک قطعه ریشه ممکن است توسط گونه‌های مختلف این گروه قارچی کلونیزه شود. استخراج DNA از ریشه‌های میکوریزایی در مطالعات اکولوژیکی کاربرد دارد ولی در بررسی‌های تاکسونومیکی و فیلوژنتیکی به DNA خالص یک جدایه نیاز است (۵۴). مهم‌ترین دلیل استخراج DNA از تک اسپور، کاهش آلودگی‌های جانبی توسط ارگانیسم‌های دیگر می‌باشد. حذف آلودگی متصل به سطح تک اسپور در مقایسه با چند اسپور و ریشه کلونیزه شده آسان‌تر و سریع‌تر می‌باشد (۴۶).

با توجه به لزوم استفاده از DNA به‌دست آمده از تک اسپور و میزان پایین DNA استخراج شده، واحدهای تکراری DNA ریبوزومی به‌عنوان یک ناحیه مناسب برای شناسایی بسیاری از گونه‌های AMF در اکثر پژوهش‌ها استفاده شده‌اند (۵۰). براساس تحقیقات انجام شده، تجزیه و تحلیل ناحیه 18S rDNA روش مناسبی برای شناسایی AMF، تجزیه و تحلیل روابط فیلوژنتیکی، بررسی تنوع در جوامع اکولوژیکی و مطالعات بیولوژیکی جمعیت این قارچ‌ها می‌باشد (۱۶ و ۴۷). با توجه به عوامل بیان شده، ناحیه 18s rDNA برای تکثیر و شناسایی مولکولی گونه‌های مختلف AMF انتخاب شد. از طرف دیگر، به‌منظور جلوگیری از تکثیر آلودگی‌های جانبی، کاهش اثر بازدارنده، اختصاصی‌تر کردن واکنش و همچنین وجود میزان پایین

DNA در تک اسپور، از روش بسیار حساس و دقیق PCR آشیانه‌ای استفاده شد. شرایط واکنش باید به گونه‌ای باشد که تکثیر کارآمد و همه نمونه‌ها به یک اندازه و به‌طور یکسان تکثیر شوند زیرا تکثیر توالی‌های غیراختصاصی منجر به تفسیر کاذب می‌شود.

چو[1] و همکاران (۱۳) جهت شناسایی و بررسی تنوع قارچ‌های AM در بخش مرکزی کره جنوبی، واکنش PCR آشیانه‌ای با استفاده از جفت آغازگرهای عمومی NS1/NS4 در PCR اول و جفت آغازگرهای اختصاصی AML1/AML2 در PCR دوم انجام دادند. در این بررسی استخراج DNA از مجموع اسپورها (۵۰ تا ۶۰ اسپور برای هر گونه) صورت گرفت و قطعه‌ای به طول ۷۹۳ جفت باز با موفقیت تکثیر شد. لی و همکاران (۲۵) با بهبود و توسعه جفت آغازگرهای AML1/NS4 برای PCR اول و جفت آغازگرهای AML1/AML2 برای PCR دوم اقدام به شناسایی مولکولی گونه‌های مختلف AMF با استفاده از DNA استخراج شده از تک اسپور، کردند. آن‌ها نشان دادند جفت آغازگرهای AML1 و AML2 حداکثر تطابق با توالی‌های حاصل از تکثیر گونه‌های مختلف AMF دارند. بنا به‌دلیل برخی مشکلات از جمله عدم تکثیر برخی گونه‌ها و نیز برای جلوگیری از تکثیر ژنوم ارگانیسم‌های غیر هدف، لی و همکاران (۲۶) آغازگرهای AML1/AML2 به‌منظور افزایش اختصاصیت بهبود بخشیدند. با این حال، دو گونه گیاهی (*Lilium tigrinum* و *Sorghum bicolor*) از ۱۴ گونه گیاهی مورد بررسی و همچنین سه گونه قارچ متعلق به شاخه Basidiomycota (*Coprinus atramentarius*، *Naematoloma fasciculare* و *Boletus violaceofuscus*) خیلی ضعیف تکثیر شدند.

تنوع ژنتیکی در جوامع AMF بسیار بالا است و این تنوع نه تنها بین گونه‌های مختلف، بلکه درون تک اسپور یک گونه نیز گزارش شده است که یکی از مشکلات اصلی شناسایی مولکولی می‌باشد. از طرف دیگر، وجود چندین DNA ریبوزومی با کمی تفاوت در تک اسپور اثبات شده است (۲۴ و ۴۰). بنابراین به‌علت ناهمگنی DNA ریبوزومی، تشخیص گونه‌ها یا جدایه‌هایی که ارتباط نزدیکی با هم دارند، دشوار می‌باشد. شناسایی و تعیین موقعیت فیلوژنتیکی در سطح خانواده و جنس با استفاده از ناحیه SSU یا بخشی از ناحیه LSU به‌دست می‌آید. درحالی‌که نواحی فوق ممکن است امکان تمایز گونه‌های نزدیک به هم را نداشته باشند. در این صورت با تلفیق روش‌های مولکولی و مورفولوژیکی و تعیین توالی قسمت بیشتری از نواحی DNA ریبوزومی یا سایر نواحی نتایج دقیق‌تری حاصل می‌شود (۵۲). برای تعداد محدودی از گونه‌های شاخه

[1] Cho

Glomeromycota نواحی مختلف DNA ریبوزومی توالی‌یابی شده و در دسترس می‌باشد ولی برای برخی تاکسون‌ها که به تازگی توصیف شده‌اند، توالی مولکولی از آن‌ها وجود ندارد یا محدود می‌باشد (۴۰). این امر باعث شده که گاهی جایگاه‌های فیلوژنتیکی متفاوتی برای یک تاکسون مشخص با توجه به ناحیه ژنتیکی بررسی شده و روش تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی، پیشنهاد شود. بنابراین هر طبقه‌بندی فیلوژنتیکی برای تعیین روابط تکاملی بین گروه‌های مختلف شاخه Glomeromycota نشان‌دهنده یک فرضیه است که می‌تواند مورد بررسی و آزمایش قرار گیرد (۴۹).

در درخت فیلوژنتیکی به‌دست آمده، جایگاه تاکسونومیکی *R. iranicus* در یک کلاد متفاوت از *R. intraradices* قرار دارد. بنابراین تعیین دقیق موقعیت فیلوژنتیکی این گونه مستلزم بررسی بیشتر با آغازگرهای مناسب‌تر می‌باشد و شاید در آینده به‌عنوان یک جنس جدید معرفی شود. با توجه به نتایج حاصل و معایب هر کدام از روش‌ها، می‌توان با ترکیب نتایج به‌دست آمده از روش‌های مورفولوژی و مولکولی بر محدودیت‌های موجود در هر روش غلبه کرد (۱۷). بنابراین، تلفیق این دو روش از دقت و صحت بالاتری در شناسایی و طبقه‌بندی قارچ‌های میکوریز آربوسکولار برخوردار می‌باشد.

مهم‌ترین مانع برای تولید انبوه AMF، ماهیت همزیست اجباری بودن این قارچ‌ها می‌باشد. با توجه به تنوع بسیار بالای ویژگی‌های مورفولوژیکی اسپورهای یک گونه، امکان شناسایی مورفولوژیکی در همه مراحل رشد و توسعه امکان‌پذیر نمی‌باشد. تهیه کشت خالص گونه‌های میکوریزایی امکان بررسی‌های آنتوژنتیکی، تاکسونومیکی، فیلوژنتیکی و استفاده کاربردی به عنوان کودهای بیولوژیکی را فراهم می‌کند. خالص‌سازی با استفاده از روش کشت تک اسپوری، درصد موفقیت پایینی دارد (کمتر از ۱۰ درصد). کشت چند اسپوری احتمال موفقیت خالص‌سازی میکوریز را تا بیش از ۷۰ درصد افزایش می‌دهد. با این وجود امکان مایه‌زنی اسپورهای گونه‌های مشابه از نظر مورفولوژیکی وجود دارد. بنابراین جهت اطمینان از دقت خالص‌سازی لازم است پس از اتمام دوره کشت اسپورهای تکثیر شده مجددا مورد بررسی قرار گیرند (۴۹).

نتیجه‌گیری کلی

نتایج رنگ‌آمیزی ریشه و وجود اسپورهای AMF در خاک ریزوسفر درختان پسته، نشان‌دهنده رابطه همزیستی میکوریزایی می‌باشد. در این پژوهش، سه گونه متعلق به سه جنس *Claroidoglomus*، *Funneliformis* و *Rhizophagus* در نمونه‌های خاک پسته شناسایی گردید. با توجه به نتایج به‌دست آمده در خصوص گیاهان و مناطق مورد مطالعه در این تحقیق، تنوع AMF وابستگی زیادی به منطقه اقلیمی و گیاه میزبان دارد. گونه *F. mosseae* بیشترین فراوانی و سازگاری را با درختان پسته در استان کرمان دارد. آغازگرهای مورد استفاده در این پژوهش، اختصاصی AMF بودند اما برخی مواقع DNA

ارگانیسم‌های غیر هدف توسط این آغازگرها تکثیر شد. بنابراین مطالعات جامع در مورد ساختارهای گونه‌های مختلف AMF و همچنین بررسی تنوع زیستی آن‌ها، نیاز به آغازگرهایی با اختصاصیت بالا دارد که بتواند همه یا اکثر گونه‌های این قارچ را تکثیر کند.

منابع

۱- رضایی‌دانش، ی. ۱۳۹۱. بررسی وضعیت قارچ‌های میکوریز آربوسکولار همراه جو در منطقه دامغان. نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)، ۲۶: ۴۳۷-۴۴۹.

۲- زنگنه، س.، شیروانی، ع.، علیان، ی.، نجفی‌نیا، م.، کرم‌پور، ف. و ح. قلعه‌دزدانی. ۱۳۸۴. معرفی گونه‌های جدیدی از قارچ‌های آربسکولار-میکوریزا از ریزوسفر مرکبات ایران. رستنی‌ها، ۶: ۷۷-۸.

۳- شیبانی، ا.، فریورمهین، ح. و ع. ازغندی. ۱۳۷۳. پسته و تولید آن در ایران. انتشارات موسسه تحقیقات پسته کشور، رفسنجان.

۴- صدروی، م. ۱۳۸۵. قارچ‌های میکوریز آربوسکولار مزارع گندم در استان گلستان. مجله رستنی‌ها، ۷: ۱۴۰-۱۲۹.

۵- میرزایی خلیل‌آبادی، ح. ر. ۱۳۷۶. بررسی اقتصادی آب کشاورزی شهرستان رفسنجان. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس.

6- Anderson, J.B. and R.C. Ullrich. 1979. Biological species of *Armillaria mellea* in North America. Mycologia, 71:402-414.

7- Auge, R.M. 2001. Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. Mycorrhiza, 11:3-42.

8- Bethenfalvay, G.J. and J.F. Yoder. 1981. The glycine max-*Glomus fasciculatus Rhizobium japonicum* symbiosis 1. Phosphorus effect on nitrogen fixation and mycorrhizal infection. Physiologia Plantarum, 52:141-145.

9- Blaszkowski, J. 1993. Comparative studies of the occurrence of arbuscular fungi and mycorrhizae (Glomales) in cultivated and uncultivated soils of Poland. Acta Mycologica, 28:93-140.

10- Blaszkowski, J., Blanke, V., Renker, C. and F. Buscot. 2004. *Glomus aurantium* and *G. xanthium*, new species in Glomeromycota. Mycotaxon, 90:447-467.

11- Blaszkowski, J., Balazs, T.K., Orlowska, E., Sadravi, M., Wubet, T. and F. Buscot. 2010. *Glomus africanum* and *G. iranicum*, two new species of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). Mycologia, 102:1450-1462.

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

13- Cho, N.S., Kim, D.H., Eom, A.H., Lee, J.W., Choi, T.H., Cho, H.Y., Leonowicz, A. and S. Ohaga. 2006. Indetification of symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi in Korea by morphological and DNA sequencing features of their spores. Journal of the Faculty of Agriculture Kyushu University, 51:201-210.

14- Di Bonito, R., Ellitt, M.L. and E.A. Des Jardin. 1995. Detection of an arbuscular mycorrhizal fungus in roots of different plant species with the PCR. Applied and Environmental Microbiology, 61:2809-2810.

15- FAO. 2012. Statistics, Production, Pistachio production. Food and Agriculture Organization of the United Nations.

16- Gamper, H.A., van der Heijden, M.G.A. and G.A. Kowalchuk. 2010. Molecular trait indicators moving beyond phylogeny in arbuscular mycorrhizal ecology. New Phytologist, 185:67-82.

17- Gamper, H., Walker, C. and A. Schussler. 2009. *Diversispora celata* sp. nov.: molecular ecology and phylotaxonomy of an inconspicuous arbuscular mycorrhizal fungus. New Phytologist, 182:495-506.

18- Gerdemann, J. and T.H. Nicolson. 1963. Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. Transactions of the British Mycological Society, 46:235-244.

19- Hall, I.R. 1984. Taxonomy of VA mycorrhizal fungi. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.

20- James, B., Rodel, D., Lorettu, U., Reynaldo, E. and H. Tariq. 2008. Effect of vesicular arbuscular mycorrhiza (VAM) fungi inoculation on coppicing ability and drought resistance of *Senna spectabilis*. Pakistan Journal of Botany, 40:2217-2224.

21- Johnson, C.R., Menge, J.A., Chawb, S.S. and I.P. Ting. 1982. Interaction of photoperiod and vesicular-arbuscular mycorrhiza on growth and metabolism of sweet orange. New Phytologist, 90:665-669.

22- Kirk, J.L., Beaudette, L.A., Hart, M., Moutoglis, P., Klironomos, J.N., Lee, H. and J.T. Trevors. 2004. Methods of studying soil microbial diversity. Journal of Microbiological Methods, 58:169-188.

23- Kruger, M., Kruger, C., Walker, C., Stockinger, H. and A. Schussler. 2012. Phylogenetic reference data for systematics and phylotaxonomy of arbuscular mycorrhizal fungi from phylum to species level. New Phytologist, 193:970-984.

24- Lanfranco, L., Delpero, M. and P. Bonfante. 1999. Intrasporal variability of ribosomal sequences in the endomycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. Molecular Ecology Resources, 8:37-45.

25- Lee, J., Lee, S., Peter, W. and W. Young. 2008. Improved PCR primers for the detection and identification of arbuscular mycorrhizal fungi. FEMS Microbiology Ecology, 65:339-349.

26- Lee, J., Park, S.H. and A.H. Eom. 2006. Molecular identification of arbuscular mycorrhizal fungal spores collected in Korea. Mycobiology, 34:7-13.

27- Lochan, M., Bhargav, P., Jain, N. and R. Nadgauda. 2011. A direct DNA isolation method from field collected soil colonizing *Jatropha curcas* rhizosphere for the study of mycorrhizal community. Agricultural Science Research Journal, 1:264-271.

28- Menge, J.A., Steirle, O., Bagyaraj, D.J., Johnson, E.L.V. and R.T. Leonard. 1978. Phosphorus concentration in plant responsible for inhibition of mycorrhizal infection. New Phytologist, 85:575-578.

29- Merryweather, J. and A. Fitter. 1998. The arbuscular mycorrhizal fungi of *Hyacinthoides* non-scripta I. Diversity of fungal taxa. New Phytologist, 138:117-129.

30- Oehl, F., Silva, G.A., Goto, B.T. and E. Sieverding. 2011. Glomeromycota: three new genera, and glomoid species reorganized. Mycotaxon, 116:75-120.

31- Opik, M., Moora, M., Liira, J., Koljalg, U., Zobel, M. and R. Sen. 2003. Divergent arbuscular mycorrhizal fungal communities colonize roots of *Pulsatilla* spp. in boreal Scots pine forest and grassland soils. New Phytologist, 160:581-593.

32- Philips, J.M. and D.S. Hyman. 1970. Improved procedures clearing root and staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. Mycological Research, 55:158-161.

33- Rausch, C., Daram, P., Brunner, S., Jansa, J., Laloi, M., Leggewie, G., Amrhein, N. and M. Bucher. 2001. A phosphate transporter expressed in arbuscule containing cells in potato. Nature, 414:462-470.

34- Reddy, S.R., Pindi, P.K. and S. Reddy. 2005. Molecular methods for research on arbuscular mycorrhizal fungi in India: problems and prospects. Current Science-Banglore, 89:1699-1709.

35- Redecker, D., Morton, J.B. and T.D. Bruns. 2000. Ancestral lineages of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales). Molecular Phylogenetics and Evolution, 14:276-284.

36- Redecker, D., Schussler, A., Stockinger, H., Sturmer, S.L., Morton, J.B. and C. Walker. 2013. An evidence-based consensus for the classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). Mycorrhiza, 23:515-531.

37- Rillig, M.C. and D.L. Mummey. 2006. Mycorrhizas and soil structure. New Phytologist, 171:41-53.

38- Ross, J.P. 1980. Effect of nontreated field soil on sporulation of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi associated with soybean. Phytopathology, 70:100-105.

39- Ryszka, P., Blaszkowski, J., Jurkiewicz, A. and K. Turnau. 2010. Arbuscular mycorrhiza of Arnica montana under field conditions conventional and molecular studies. Mycorrhiza, 20:551-557.

40- Sanders, I.R., Alt, M., Groppe, K., Boller, T. and A. Wiemken. 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 Phytologist, 130:419-427.

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

42- Sasvari, Z., Magurno, F., Galanics, D., Hang, T.T.N., Ha, T.T.H., Luyen, N.D. and K. Posta. 2012. Isolation and identification of arbuscular mycorrhizal fungi from agricultural fields of Vietnam. American Journal of Plant Sciences, 3:1796-1801.

43- Schalamuk, S., Velazquez, S., Chidichimo, H. and M. Cabello. 2006. Fungal spore diversity of arbuscular mycorrhizal fungi associated with spring wheat: effects of tillage. Mycologia, 98:16-22.

44- Schenck, N.C. and Y. Perez. 1988. Manual for the identification of VA mycorrhizal fungi. Plant Pathology Department Institute of Food and Agricultural Sciences University of Florida.

45- Schroder, N.V. 1974. Temperature response of *Endogone* mycorrhiza on soybean roots. Mycologia, 66:600-605.

46- Schwarzott, D., Walker, C. and A. Schussler. 2001. *Glomus*, the largest genus of the arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales), is nonmonophyletic. Molecular Phylogenetics and Evolution, 21:190-197.

47- Stockinger, H., Kruger, M. and A. Schussler. 2009. '*Glomus intraradices* DAOM197198', a model fungus in arbuscular mycorrhiza research, is not *Glomus intraradices*. New Phytologist, 183:1176-1187.

48- Stockinger, H., Kruger, M. and A. Schussler. 2010. DNA barcoding of arbuscular mycorrhizal fungi. New Phytologist, 187:461-474.

49- Sturmer, S.L. 2012. A history of the taxonomy and systematics of arbuscular mycorrhizal fungi belonging to the phylum Glomeromycota. Mycorrhiza, 22:247–258.

50- Sylvia, D. and M. Will. 1988. Establishment of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and other microorganisms on a beach replenishment site in Florida. Applied and Environmental Microbiology, 54:348-352.

51- Thompson, J.D., Higgins, D.G. and T.J. Gibson. 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.

52- Walker, C., Giovannetti, M., Avio, L., Citernesi, A.S. and T.H. Nicolson. 1995. A new fungal species forming arbuscular mycorrhizas: *Glomus viscosum*. Mycological Research, 99:1500-1506.

53- Walker, C. 1999. Methods for culturing and isolating arbuscular mycorrhizal fungi. Mycorrhiza News, 11: 1-4.

54- Weider, L.J., Elser, J.J., Crease, T.J., Mateos, M., Cotner, J.B. and T.A. Markow. 2005. The functional significance of ribosomal (r) DNA variation: impacts on the evolutionary ecology of organisms. Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics, 36:219-242.

55- Wostemeyer, J. and A. Burmester. 1986. Structural organization of the genome of the Zygomycete *Absidia glauca*: evidence for high repetitive DNA content. Current Genetics, 10:903-907.

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

Molecular and Morphological Identification of Arbuscular Mycorrhizal Fungi Associated with Pistachio Roots in Kerman Province

Marzieh Yazdanpanah[1], Ebrahim Sedaghati[2], Pezhman Khodygan[3], Hossein Alaei[2]

Abstract

Arbuscular mycorrhiza fungi (AMF) promote plant growth and enhance resistance against biotic and abiotic stresses. In order to study morphological and molecular identification of AMF, samples of rhizosphere soil of pistachio orchards in Kerman province were collected during 2013-2014. AMF spores were extracted from the soil samples using wet sieving and were assorted based on morphological characteristics such as spore color, shape, surface ornamentation, spore contents and wall structures. DNA was extracted from a single spore. Partial 18S rDNA was amplified by nested PCR method using universal primer NS4 and AML1 in the first amplification and AML1/AML2 in the second amplification. Based on the morphological and molecular criteria, *Funneliformis mosseae*, *Claroideoglomus claroideum* and *Rhizophagus iranicus* were identified. *R. iranicus* is the new record for pistachio mycoflora. Due to the limitations of morphological characteristics for identification and taxonomy of this important group of fungi, molecular methods can apply as complementary tools for the differentiation of morphologically similar species and taxonomic purposes.

Keywords: Arbuscular mycorrhizal fungi, Molecular identification, Nested PCR, Pistachio, Symbiosis.

[1] MSc Student, Department of Plant Protection, College of Agriculture, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Iran.
[2] Assistant Professor, Department of Plant Protection, College of Agriculture, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Iran.
[3] Associated Professor, Department of Plant Protection, College of Agriculture, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Iran.