

جداسازی و شناسایی قارچ‌های میکوریزا آربوسکولار بومی در خاک‌های مناطق خشک زراعی ایران با استفاده از روش PCR آشیانه‌ای

مهدی ثابت جهرمی^{۱*}، غلامرضا صالحی جوزانی^۲، ملیحه حسینی^۳، سید مجتبی خیام نکوئی^۴، سپیده اکبری والا^۵

- ۱- کارشناس ارشد بیماری شناسی گیاهی، دانشکده طب و دارو سازی سنتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
- ۲- استادیار، دکتری تخصصی بیوتکنولوژی کشاورزی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، ایران، کرج، ایران
- ۳- کارشناس ارشد بیماری شناسی گیاهی، دانشکده طب و دارو سازی سنتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
- ۴- دانشیار، دکتری تخصصی بیوتکنولوژی کشاورزی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، ایران، کرج، ایران
- ۵- کارشناس مهندسی کشاورزی گیاهپزشکی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، ایران، کرج، ایران

* تهران، کد پستی ۱۱۴۷۳۳۳۱۱۱

mejahromi@yahoo.co.uk

(دریافت مقاله: ۸۹/۱۰/۲، پذیرش: ۹۰/۱۱/۲۷)

چکیده - تحقیقات نشان داده گیاهانی که ریشه آن‌ها به وسیله قارچ‌های اندوفیت میکوریزا آربوسکولار آلوده می‌شود، نسبت به گیاهان غیرمیکوریزی، توانایی بالاتری برای تحمل تنش‌های زنده و غیرزنده محیطی مانند خشکی دارند. پس مطالعه گونه‌های غالب میکوریزا در مناطق خشک برای استفاده از آن‌ها به عنوان کود بیولوژیک می‌تواند مفید باشد. در این پژوهش ابتدا از ریشه گیاهان (گندم و جو) در مناطق تحت تنش خشکی (اراک، اصفهان، یزد، تهران، تبریز، قزوین) نمونه برداری شد. سپس برای شناسایی جنس‌ها و گونه‌های میکوریزا، نواحی ITS-rDNA به وسیله دو پرایمر اختصاصی (LSU-Glom1 و SSU-Glom1) و پرایمرهای عمومی قارچ‌ها (ITS4/ITS5) با تکنیک PCR آشیانه‌ای تکثیر شد. محصولات مثبت مرحله دوم PCR هر نمونه، همسان‌سازی شده و کلنی‌های مثبت با آنزیم برشی Taq1، هضم و الگوهای RFLP نمونه‌های هضم‌شده با هم مقایسه و یک نماینده از هر الگوی برشی توالی‌یابی شد. نتایج مطالعات مورفولوژیک و مولکولی نشان داد که بیش از ۹۰ درصد نمونه‌های جداسازی شده از جنس *Glomus* است. گونه‌های *Glomus* مشاهده شده از طریق توالی‌یابی، *Glomus geosporum sinuosum*، *Glomus fasciculatum*، *Glomus intraradices*، *Glomus mosseae*، *Glomus macrocarpum*، *Glomus etunicatum*، *Glomus dimorficum* و *Glomus sp* بود. که دو گونه *dimorficum* و *etunicatum* در مشاهدی مورفولوژیک مشخص نشده بود. نکته چشمگیر این است که گونه *mosseae* غلبه‌ی کاملی در همه مناطق داشت و نتایج مولکولی نیز وجود بیش از ۷۰ درصد از این گونه را نشان می‌داد.

کلید واژگان: تنش خشکی، گوناگونی ژنتیکی، میکوریزا آربوسکولار، Internal Transcribed Spacer (ITS)

۱- مقدمه

کشور ما در منطقه خشک و نیمه خشک قرار گرفته و میزان بارندگی سالانه در بیشتر مناطق پایین تر از نیاز گیاهان زراعی است؛ بنابراین تنش خشکی همواره از اصلی ترین عوامل کاهنده محصولات زراعی بوده است. خشکی زمانی اتفاق می افتد که ترکیبی از عوامل فیزیکی و محیطی سبب تنش در گیاه شده و تولید را کاهش دهد. این کاهش در نتیجه تأخیر و یا استقرار نداشتن گیاه، تضعیف و یا از بین رفتن گیاهان استقرار یافته، مستعد شدن گیاه برای حمله آفت ها و بیماری های گیاهی، تغییرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در سوخت و ساز گیاه، تغییرات در کیفیت دانه، علوفه، الیاف و روغن به وجود می آید. مشخص شده است که گیاهانی که در ریزوسفر خود همزیستی با قارچ های میکوریز دارند، تنش ها به خصوص تنش های خشکی را می توانند بیشتر تحمل کنند و طی زمان کمتری بعد از رفع شدن کمبود آب، بازیابی و احیا می شوند [۱، ۲، ۳ و ۴]. سازو کارهای زیادی برای افزایش تحمل خشکی و کمبود آب گیاهان و قارچ های همزیست آنها در نظر گرفته شده است. برای نمونه احتمال می رود قارچ های میکوریز در افزایش تراکم و طول ریشه و همچنین تغییر مورفولوژی سیستم ریشه برای افزایش تحمل، نقش داشته باشند. در این سازوکار افزایش طول سبب دسترسی گیاه به حجم بیشتری از خاک شده و راحت تر آب مورد نیاز خود را جذب می کنند [۵، ۶ و ۷]. علاوه بر این ممکن است هیف های قارچ های میکوریز مستقیماً در جذب آب برای سیستم ریشه نقش داشته باشند [۱، ۸، ۹ و ۱۰]. همچنین مشخص شده است که هیف های قارچ میکوریز می توانند به

ذرات خاک متصل شده و ارتباط مستقیمی بین ریشه و خاک ایجاد کنند؛ در نتیجه جذب آب در شرایط خشکی راحت تر خواهد بود [۵]. برای نمونه در آزمایشی مشخص شد که قارچ های میکوریز در گیاه رز به طور غیرمستقیم با افزایش سطح فسفر در برگ ها، کنترل روزه ها را افزایش می دهند و تحمل گیاه را به خشکی بالا می برند. [۱۱]. همچنین مشخص شده است که افزایش تحمل کم آبی و خشکی معمولاً با افزایش جذب فسفر همراه است و قارچ های میکوریز در جذب مواد معدنی و به خصوص فسفر نقش دارند [۱۲، ۱۳ و ۱۴]. محققان دیگری هم نقش قارچ های میکوریز آربوسکولار را در افزایش سازگاری گیاهان جنگلی و مرتعی مناطق خشک استوایی ثابت کرده اند [۱۵].

شناسایی قارچ های مؤثر در مناطق و شرایط مختلف بسیار ارزشمند است؛ زیرا می توان با معرفی جنس و گونه قارچ همزیست مؤثر در رشد، از آنها به عنوان کود بیولوژیک و محرک رشد در شرایط خاص استفاده کرد. در کشور ما نیز تحقیقاتی درباره شناسایی و تنوع قارچ های میکوریز آربوسکولار بومی خاک های ایران بر اساس ویژگی های مورفولوژیک این قارچ ها انجام شده [۱۶، ۱۷ و ۱۸] ولی تاکنون برای بررسی گوناگونی این قارچ ها در خاک های ایران و در اکوسیستم های تحت تنش های محیطی از روش های پیشرفته مولکولی استفاده نشده است؛ بنابراین، این پژوهش اولین گام برای شناسایی این قارچ ها با استفاده از روش های پیشرفته مولکولی و تهیه سویه های متحمل تنش خشکی تا از آنها به عنوان کود بیولوژیک در شرایط تنش های خشکی و کم آبی استفاده شود. در سطح جهانی نیز استفاده از روش های

اسپوره‌های قارچ‌های میکوریزا در واحد وزن خشک خاک، محاسبه گردید و تعداد اسپور و اسپوروکارپ‌های موجود مستقیماً در زیر بینوکولر-ST (30R-2 Germany) با بزرگ‌نمایی $30 \times$ شمارش شد.

هر اسپوروکارپ به‌عنوان یک اسپور در نظر گرفته شد. ذرات و مواد آلی درشت خاک، اسپوروکارپ‌های بزرگ پشت الک $700 \mu\text{m}$ میکرومتر، و اجزای ریز خاک، ریشه‌ها، اسپوروکارپ‌ها و اسپوره‌های بزرگ از روی الک $180 \mu\text{m}$ میکرومتر جمع‌آوری شدند.

مواد نگهداری شده روی الک $45 \mu\text{m}$ میکرومتر شامل ذرات ریز خاک و اسپورها به یک لوله سانتریفوژ 50 mL میلی‌لیتری منتقل و 5 min دقیقه با سرعت 4500 rpm دور در دقیقه سانتریفوژ شد. مایع بالایی با دقت داخل یک ظرف پتری ریخته شد و بخش ته‌نشین شده در محلول سوپانسیون 55 mL درصد به صورت سوپانسیون درآمد و 2 min دقیقه با سرعت 2000 rpm دور در دقیقه سانتریفوژ شد. مایع بالایی همراه با مایع مرحله قبل روی الک $45 \mu\text{m}$ میکرومتر ریخته شد و برای حذف ساکارز با آب شست و شو شد. مواد باقی‌مانده بر روی این الک با 50 mL میلی‌لیتر آب به صورت سوپانسیون یکنواخت درآمد؛ سپس اسپورها در محلول‌های 5 mL میلی‌لیتری در 5 min تکرار، زیر بینوکولر (X) $30 \times$ شمارش و تعداد اسپور برای حجم 50 mL میلی‌لیتر محاسبه شد. تعداد کل اسپورها در یک نمونه 200 mL گرمی از مجموع تعداد اسپوره‌های شمارش شده از الک‌های $45 \mu\text{m}$ ، $180 \mu\text{m}$ و $700 \mu\text{m}$ میکرومتر تخمین زده شد. اسپوره‌های شمارش شده بر اساس مشخصات مورفولوژیک آن‌ها گروه‌بندی شدند برای تعیین نوع اسپور موجود در خاک، از هر نمونه اسپور

مولکولی برای شناسایی این قارچ‌ها بیشتر مربوط به دو دهه اخیر بوده و این روش‌ها اکنون در حال گسترش است [۱۹، ۲۰ و ۲۱].

۲- مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری میکوریزا آربوسکولار در خاک‌های مناطق خشک:

نمونه‌برداری به‌طور تصادفی از مزارع گندم و جو مناطق مختلف تحت تنش کم‌آبی کشور در استان‌های آذربایجان شرقی، مرکزی، قم، تهران و اصفهان و از گیاهان کاملاً سالم انجام شد. نمونه‌برداری از عمق 5 cm تا 30 cm سانتی‌متری خاک انجام شده، سپس نمونه مرکب تهیه شد. از این مخلوط، یک نمونه 2 kg کیلوگرمی انتخاب شده و پس از خشک شدن برای کشت تله‌گلدانی استفاده شد.

۲-۱- استخراج و شمارش اسپور

از هر نمونه خاک سه نمونه 200 g گرمی انتخاب و با استفاده از روش‌های Nicolson و Gerdemann [۲۲] و Jenkis [۲۳] اسپور قارچ‌های میکوریزا آربوسکولار جداسازی شد. هر نمونه 200 g گرمی خاک در یک بشر 2 L لیتری با مقدار کافی آب، به‌وسیله میله شیشه‌ای به‌صورت سوپانسیون درآمد. برای چند ثانیه اجازه داده شد تا ذرات سنگین رسوب کنند. سپس مایع بالایی به‌ترتیب از الک‌های $45 \mu\text{m}$ ، $180 \mu\text{m}$ و $700 \mu\text{m}$ میکرومتر عبور داده شد. این مرحله سه مرتبه تکرار و بعد از آن، مواد باقی‌مانده روی الک‌های $700 \mu\text{m}$ و $180 \mu\text{m}$ میکرومتر به‌طور جداگانه به کمک آبفشان شست‌وشو داده و در ظروف پتری نگهداری شدند با استفاده از کاغذ صافی و زیر بینوکولار، تعداد

سرانجام ۴۲ میکرولیتر آب مقطر استریل به هر ویال اضافه شد تا به حجم مورد نظر برسد. هنگام انجام PCR، بر اساس تعداد نمونه‌ها، یک مخلوط PCR شامل همه مواد بجز الگو، تهیه و سپس مقدار ۴۹-۴۸ میکرولیتر آن در هر لوله آزمایش یا خانه پلیت‌های PCR توزیع شد و سرانجام مقدار ۲-۱ میکرولیتر از نمونه DNA به آن افزوده شد.

برنامه دمایی PCR شامل واسرشت‌سازی اولیه، ۱۵ دقیقه در 94°C بود برنامه PCR شامل ۳۵ چرخه (واسرشت‌سازی ۴۰ ثانیه در 94°C ، اتصال آغازگر ۳۰ ثانیه در 54°C ، بسط ۱ دقیقه 72°C) و بسط نهایی به مدت ۵ دقیقه در 72°C انجام شد.

برای پیش‌گیری از تکثیر مناطق ITS موجوداتی غیر از قارچ‌های میکوریز آربوسکولار که بیشتر دارای سایت برشی Alu1 است [20]، ۵ میکرولیتر از محصول اولین PCR با استفاده از ۵ واحد آنزیم Alu1 به مدت یک ساعت در حجم کل ۲۰ میکرولیتر، برش داده شد. مقداری از محصولات دومین مرحله PCR روی ژل آگاروز ۱/۲ درصد الکتروفورز شد و اندازه هر محصول به کمک نشانگر تخمین زده شد. برای هر نمونه، محصول PCR با قوی‌ترین باندها روی ژل و طول قطعه ITS مورد نظر برای قارچ‌های میکوریز آربوسکولار (۶۵۰-۵۰۰ bp) انتخاب و با استفاده از کیت خالص‌سازی محصول PCR (شرکت فرمنتاز) خالص‌سازی شد و در مرحله بعد محصولات خالص‌شده PCR داخل وکتور pTZ بر اساس پروتکل شرکت فرمنتاز همسان و به باکتری *E. coli* منتقل شد.

توالی‌های به‌دست آمده با استفاده از نرم‌افزار BLASTN با توالی‌های موجود در بانک اطلاعاتی

مشاهده‌شده زیر بینوکولار، چندین نمونه لام آزمایشگاهی و از هر مورفوتیپ، اسلاید دائمی تهیه شد. با استفاده از میکروسکوپ دوربین دار از اسپورها عکس گرفته شد؛ سپس با استفاده از نرم‌افزار کامپیوتری سنجش اندازه اسپورها انجام شده و با توجه به ویژگی‌های اسپورها و اندازه آن‌ها و نیز بر اساس دستورالعمل تشخیص و رده‌بندی قارچ‌ها^۱ جنس و گونه قارچ‌ها مشخص شد [۲۵ و ۲۴].

۲-۲- واکنش زنجیره‌ای پلیمرز آشیانه‌ای

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به‌صورت آشیانه‌ای برای جلوگیری از تکثیر آلودگی‌های جانبی، کاهش اثر مواد بازدارنده و اختصاصی‌تر کردن واکنش، استفاده شده است PCR آشیانه‌ای بر اساس روش Renker و همکاران [۲۰] با تغییراتی انجام شد. جفت آغازگرهای اختصاصی قارچ‌های میکوریز آربوسکولار شامل LSU Glom1(5'ATTACGTCCCTGCCCTTTGTACA3') و SSU Glom1(5'CTTCAATCGTTTCCCTTTCA3') و در مرحله اول PCR و جفت آغازگرهای عمومی برای قارچ‌ها شامل ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3') و ITS5 (5'GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG3) و ITS5 در مرحله دوم PCR برای تکثیر قطعه استفاده شدند. همه‌ی مراحل PCR با دستگاه ترموسایکلر (Bio Rad, Germany) iCYCLER انجام شد. تکثیر ناحیه ITS در حجم $50\mu\text{l}$ حاوی ۲ واحد آنزیم Taq ۴۰ میکرولیتر بافر PCR $10\times$ ، ۵ میکرولیتر کلرید منیزیم ۲۵ میلی‌مولار، ۰/۸ میکرولیتر dNTP ۲ میلی‌مولار و برای هر آغازگر مقدار ۲ میکرولیتر به غلظت ۵۰ پیکومول در میکرولیتر و

1. <http://invam.caf.wvu.edu>

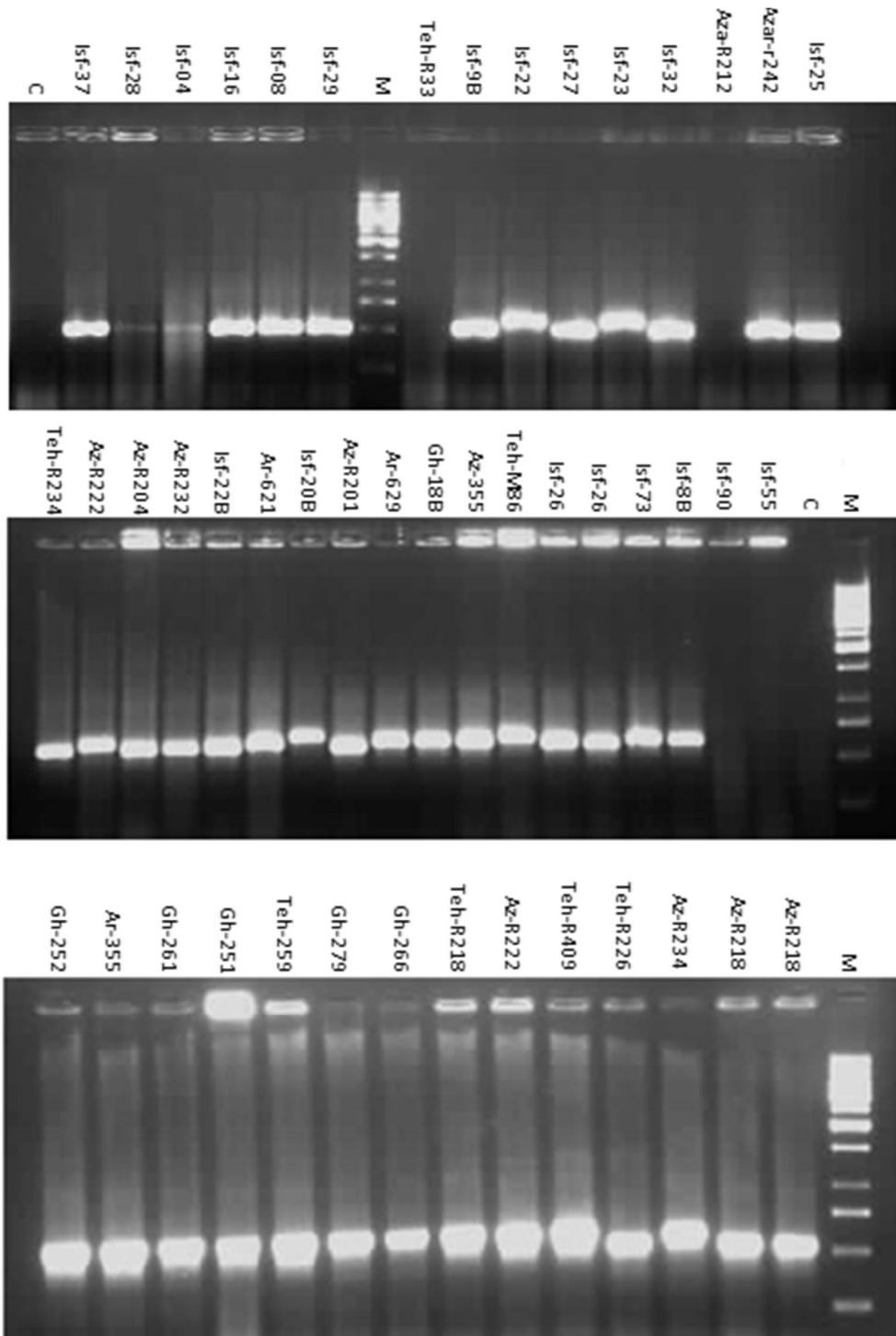
اولین مرحله با کمک جست‌وجوگر BLAST، حدود ۲۰ درصد از کل توالی‌های به‌دست‌آمده متعلق به قارچ‌های غیرمیکوریزا آربوسکولار بودند که بیشتر مربوط به بازیدیومیست‌های اطراف ریشه گیاهان آزمایش شده و همچنین برخی مخمرهای موجود در آزمایشگاه بود. تطابق ترادف‌های به‌دست‌آمده با ترادف‌های موجود در بانک‌های اطلاعاتی از قبیل NCBI نشان داد که بیش از ۹۵ درصد گونه‌های قارچ‌های میکوریزا آربوسکولار از نوع گلوموس است که تقریباً با نتایج شناسایی مورفولوژیک قارچ‌ها یکسان است. گونه‌های گلوموس مشاهده‌شده از طریق توالی‌یابی، شامل *G. fasciculatum*، *G. intraradices*، *G. mosseae*، *G. macrocarpum*، *G. geosporum*، *G. sinuosum*، *Glomus sp.*، *G. dimorficum*، *G. etunicatum* بودند که دو گونه *etunicatum* و *dimorficum* در مشاهدات مورفولوژیک مشخص نشده بود. نقطه مهم این است که گونه *mosseae* غلبه‌ی کاملی در همه مناطق داشت و نتایج مولکولی نیز وجود بیش از ۷۰ درصدی این گونه را نشان می‌داد. در ادامه درخت فیلوژنتیکی هر گروه از گونه‌های نزدیک به هم همراه توالی‌های رفرنس از بانک ژن NCBI تشکیل شد که در شکل‌های ۲ و ۳ قابل رویت می‌باشد.

NCBI مقایسه و صف‌بندی شد [۲۶] و نزدیک‌ترین توالی به آن‌ها به عنوان توالی مرجع انتخاب شد. توالی‌های به‌دست‌آمده و مرجع با کمک برنامه ClustalX [۲۷] صف‌بندی و سپس در برنامه BioEdit نسخه ۷/۰/۹ [۲۸] تنظیم شد. روابط فیلوژنتیک با استفاده از مدل parameter Kimura-2 – (K80 or Kimura) با الگوریتم نزدیک‌ترین همسایه [۲۹] با کمک نرم‌افزار MEGA4 [۳۰] ترسیم و تفسیر شد.

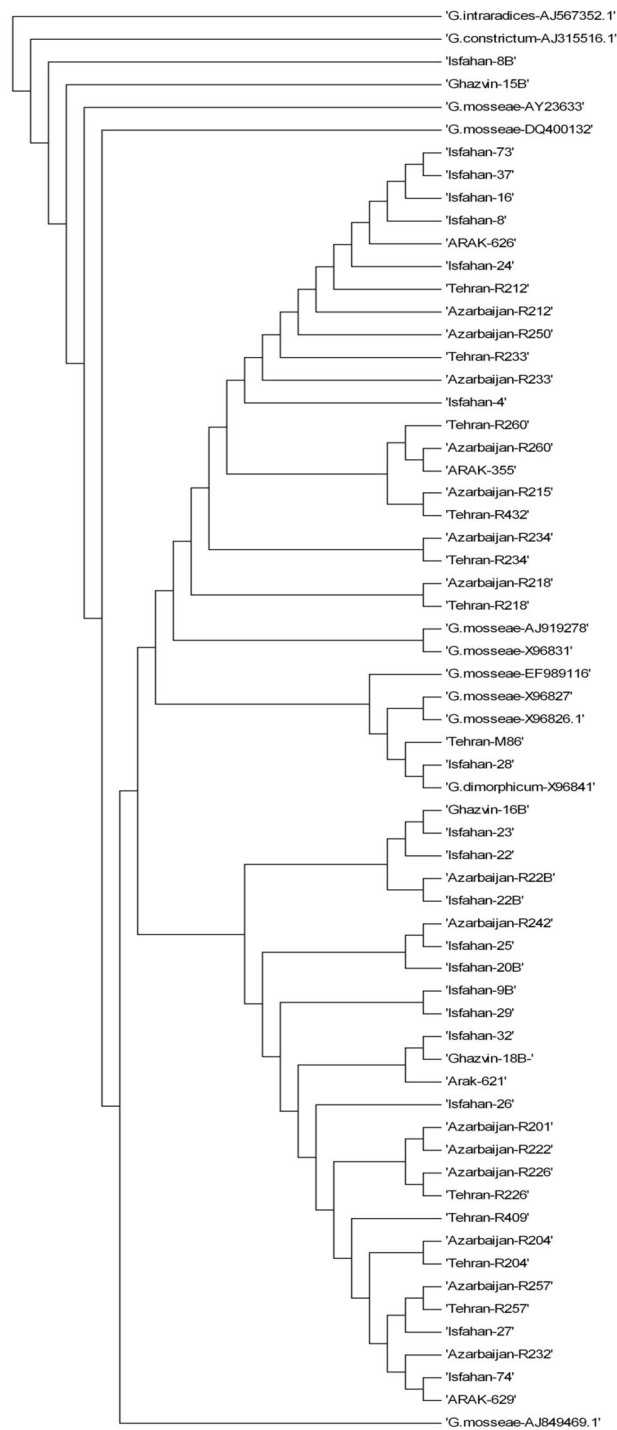
۳- یافته‌ها

مطالعه مورفولوژی و مورفومتری اسپورها نشان داد که ۹۰ درصد گونه‌ها متعلق به جنس گلوموس و ۱۰ درصد بقیه متعلق به جنس آکولوسپورا بودند. نکته مهم این است که مطالعات شناسایی مورفولوژیک نشان داد که بیش از ۵۰ درصد قارچ‌های جنس گلوموس مشاهده‌شده در نمونه‌ها از گونه *G. mosseae* و گونه *G. intraradices* در رتبه دوم بود. گونه‌های دیگر این جنس از قبیل *G. geosporum*، *G. sinuosum*، *G. fasciculatum*، *G. macrocarpum* و *G. constrictum* نیز شناسایی شدند.

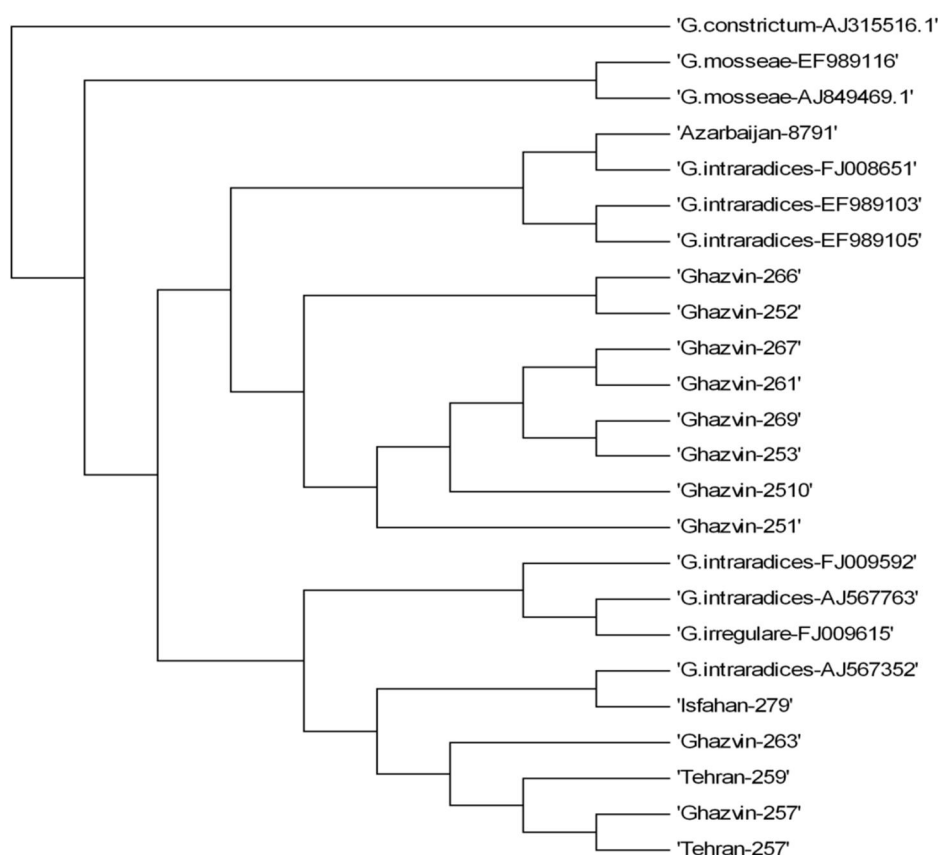
پس از تکثیر دو مرحله‌ای توالی ITS قارچ‌های اندوفیت جداسازی‌شده، محصول PCR خالص‌سازی و کلون و برای توالی‌یابی ارسال شدند (شکل ۱). در



شکل ۱ مشاهده محصول مرحله دوم PCR روی ژل آگاروز ۱/۲ درصد (اندازه قطعات ۵۰۰ تا ۶۵۰ جفت باز است).
C: کنترل منفی M، نشانگر مولکولی 1Kb (Fermentas)



شکل ۲ درخت فیلوژنی توالی‌های *G. mosseae* ITS- rDNA بر اساس فاصله ژنتیکی K80 با الگوریتم نزدیک‌ترین همسایه رسم شده است. نمونه‌های دارای کد بانک ژن به عنوان رفرنس نمونه‌های ایرانی انتخاب شده است. گونه‌های *intraradices* و *constrictum* به عنوان out group در نظر گرفته شده است.



شکل ۳ درخت فیلوژنی توالی‌های ITS- rDNA *G. intraradices* بر اساس فاصله ژنتیکی K80 با الگوریتم نزدیک‌ترین همسایه رسم شده است. نمونه‌های دارای کد بانک ژن، به عنوان رفرنس نمونه‌های ایرانی انتخاب شده است. گونه‌های *constrictum* و *mosseae* به عنوان out group در نظر گرفته شده است.

۴- بحث

در برخی مناطق شناسایی شدند. محققین دیگر نیز گلوموس را به عنوان جنس غالب قارچ‌های میکوریز آربوسکولار در خاک‌های تحت تنش معرفی نموده‌اند [۳۱، ۳۲ و ۳۳]. نکته مهم در این پژوهش این است که در همه مناطق خشک مطالعه شده هم در گندم و هم در جو، گونه *G. mosseae* غلبه‌ی کامل داشت. این موضوع پیشنهاد می‌کند که این گونه سازگاری بالایی با تنش‌ها دارد. مطالعات قبلی نویسندگان این گزارش در بررسی گونه‌های غالب میکوریز آربوسکولار در مناطق آلوده به فلزات سنگین در کشور نیز گواه این مسئله بود که

در شرایط فعلی با افزایش جمعیت و پدیده گرمایش کره زمین که نتیجه آن شور شدن خاک و گسترش بیابان‌هاست، بیش از هر چیز نیازمند محصولات زراعی هستیم که بتوانند در خاک‌هایی با خشکی و یا شوری بالا رشد کنند. دستیابی به این هدف نیازمند شناسایی ساز و کارهایی است که گیاهان در طبیعت در شرایط تنش استفاده می‌کنند. در بررسی‌های مورفولوژیک و مولکولی، گونه‌های جنس گلوموس به‌طور فراوان و غالب در همه مناطق در ریزوسفر گیاهان مختلف و جنس آکولوسپورا

مثل *G. mosseae* در مناطق مختلف جهان و در طیف وسیعی از اکوسیستم‌های محیطی یافت شده که نشان‌دهنده ترجیح کم میزبانی و وفور آن‌ها است [۳۶] و [۳۷]. نتایج این پژوهش نیز می‌تواند گویای اختصاصی نبودن گیاه میزبان برای *G. mosseae*، به‌خصوص در مناطق تحت تنش زیاد باشد. در مورد مناطق جغرافیایی هیچکدام از گونه‌ها برای یک منطقه خاص اختصاصی نبود؛ ولی در مورد سایر گونه‌ها طیف میزبانی اختصاصی گیاه و میکوریزا نشانگر ارتباط ریشه گیاه خاص با میکوریزا است. برای نمونه دو گونه *dimorphicum* و *sinuosum* فقط در گیاه گندم جدا شدند و سایر گونه‌ها نیز کمابیش در یکی از دو گیاه جمعیت بیشتری داشتند. با توجه به این که تعداد گیاهان میزبان، کم (فقط گندم و جو) بود تصمیم کلی در مورد این نظر قطعی نیست و نیازمند تحقیقات بیشتری است ولی مشابه چنین نتایجی در مطالعات قبلی نیز مشاهده شده است [۲۱، ۳۵، ۳۶] و [۳۸]. بر اساس این نتایج، این فرضیه مطرح می‌شود که افزایش جمعیت یک گونه میکوریزایی تحت تأثیر ترشحات ریشه یک گیاه است؛ به‌عبارت دیگر، گیاهان با ترشح مواد غذایی خاص به‌درون خاک از میان گونه‌ها میکوریزایی انتخاب می‌کنند. بنابر این گونه‌هایی که بتوانند از ترشحات ریشه گیاه استفاده کنند تراکم جمعیت بیشتری خواهند داشت. سؤال دیگری که مطرح است تأثیر یک گونه خاص میکوریزا یا چندین گونه به‌صورت مرکب در عملکرد یک گیاه است. بدین معنی که آیا گونه‌ها در کنار یکدیگر اثر رقابتی دارند یا اثر همدیگر را افزایش می‌دهند. پاسخ به این پرسش‌ها نیازمند مطالعات زراعی و بیوشیمیایی در مراحل بعدی است. نتایج این تحقیقات می‌تواند در انتخاب یک گونه اختصاصی میکوریزایی برای یک گیاه خاص، سودمند

گونه *G. mosseae* در آن شرایط نیز غلبه کامل داشته است [۳۴]. همچنین در این پژوهش مشخص شد که گندم و جو با گونه‌های میکوریزا آربوسکولار هم زیستی دارند که نتایج محققین قبلی در این خصوص را نیز تأیید می‌کند [۱۶]؛ بنابراین می‌توان با استفاده از تکنولوژی‌های جدید درون شیشه این گونه‌های غالب را تکثیر و به عنوان کود بیولوژیک در اختیار کشاورزان قرار داد تا در مناطق تحت تنش استفاده شوند.

برای کاهش هزینه‌های همسان سازی و زمان آزمایش، در تعدادی از آزمایش‌های مولکولی، بعد از مرحله دوم واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، محصولات مثبت گیاهان انتخاب‌شده در هر منطقه مخلوط و بقیه کارهای مولکولی روی آن دنبال شد. مشابه این روش بوسیله محققین دیگر نیز انجام شده است [۲۱، ۳۵]. برای کاهش هزینه‌های توالی‌یابی و زمان، در سری اول آزمایش‌های مولکولی، در هر واکنش همسان سازی، ۶۰ کلنی مثبت و در سری دوم ۳۰ کلنی مثبت انتخاب و با آنزیم برشی TaqI الگوهای RFLP آن‌ها تهیه شد. سپس ۱ تا ۳ نماینده از هر الگوی برشی، انتخاب و توالی‌یابی شد. این روش با تکیه بر کارهای Hempel و همکاران [۳۵] انجام شد که به ترتیب ۳۰ و ۶۰ کلنی از هر نمونه را آنالیز کرده و با منحنی‌های قیاس آماری نشان دادند که این تعداد کلنی برای تخمین گوناگونی کافی است.

در این مطالعه، قارچ‌های شناسایی‌شده در کشت تله گلدانی و نمونه‌های مزرعه‌ای (مورفولوژیک و مولکولی) تقریباً مشابه بودند، با این تفاوت که در مطالعات مولکولی *G. dimorphicum* و *G. etunicatum* نیز آشکار شدند.

به‌طور کلی در این پژوهش روش‌های شناسایی مورفولوژیک و مولکولی تکمیل‌کننده و مؤید یکدیگر بوده است. بعضی گونه‌های قارچ میکوریزا آربوسکولار

- [6] Kothari, S. K., Marschner, H., and George, E. (1990) Effect of VA mycorrhizal fungi and rhizosphere microorganisms on root and shoot morphology, growth, and water relations of maize. *New Phytol.* 116, 303–311.
- [7] [V]Subramanian, K. S., Santhanakrishnan, P., Balasubramanian, P. (2006) Responses of field grown tomato plants to arbuscular mycorrhizal fungal colonization under varying intensities of drought stress, *Scientia Horticulturae.* 107, 245–253.
- [8] Al-Karaki, GN. (2006). Nursery inoculation of tomato with arbuscular mycorrhizal fungi and subsequent performance under irrigation with saline water. *Sci. Hort.* 109, 1-7.
- [9] Faber, B. A., Zasoski, R. J., Munns, D. N., and Shackel, K. (1991) A method for measuring hyphal nutrient and water uptake by mycorrhizal plants. *Can. J. Bot.* 69, 87–94.
- [10] Redecker, D., (2005) Arbuscular mycorrhizal fungi and their relatives. *Tree of life website.* www.tolweb.org/
- [11] Aug'e, R. M., Schekel, K. A. and Wample, R. L. (1986) Greater leaf conductance of well-watered VA mycorrhizal rose plants is not related to phosphorus nutrition. *New Phytol.* 103, 107-116.

باشد که افزایش بهره‌وری گیاه میزبان در خشکی را در پی خواهد داشت.

۵- مراجع

- [1] Allen M. F., and Boosalis M. G. (1983) Effects of two species of VA mycorrhizal fungi on drought tolerance of winter wheat. *New Phytol.* 93, 67-76.
- [2] Bildusas, I. J., Dixon, R. K., Pflieger, F. L. and Stewart, E. L. (1986) Growth, nutrition and gas exchange of *Bromus inermis* inoculated with *Glomus fasciculatum*. *New Phytol.* 102, 303-311.
- [3] Henderson, J. C., and Davies, J. F. T. (1990) Drought acclimation and the morphology of mycorrhizal *Rosa hybrida* L. cv. 'Ferdy' is independent of leaf elemental content. *New Phytol.* 115, 503–510.
- [4] Sheng, M., Tang, M., Chan, H., Yang, B., Zhang, F., Huang, Y. (2008) Influence of arbuscular mycorrhizae on photosynthesis and water status of maize plants under salt stress. *Mycorrhiza.* 18, 287–296.
- [5] Davies, F. T., Svenson, S. E., Cole, J. C., Phavaphutanon, L., Duray, S. A., Olaldeportugal, V., Meier, C.E. & Bo, S. H. (1996) Non-nutritional stress acclimation of mycorrhizal woody plants exposed to drought. *Tree Physiology.* 16, 985-993.

- mycoparasitism in spores of AM fungi isolated from sugarcane fields of Iran. 8th Conference of the European Foundation for Plant Pathology and British Society for Plant Pathology Presidential meeting. Sustainable disease management: the European Perspective. 13th -17th August 2006, KVL, Frederiksberg, Denmark. P16/3.
- [19] Redecker, D., Hijri, I., Wiemken, A., (2003) Molecular identification of arbuscular mycorrhizal fungi in roots: perspectives and problems. *Folia Geobotanica*. 38,113–124.
- [20] Renker, C., Heinrichs, J., Kaldorf, M., and Buscot, F. (2003) Combining nested PCR and restriction digest of the internal transcribed spacer region to characterize arbuscular mycorrhizal fungi on roots from the field. *Mycorrhiza*. 13,191–198.
- [21] Renker, C., Weisshuhn, K., Kellner, H., and Buscot, F. (2006) Rationalizing molecular analysis of field-collected roots for assessing diversity of arbuscular mycorrhizal fungi: to pool, or not to pool, that is the question. *Mycorrhiza*. 16, 525–531.
- [22] Gerdemann, J. W., and Nicolson, T. H. (1963) Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting, *Trans. Br. Mycol. Soc.* 46, 235-244.
- [12] Fitter, A. H. (1988). Water relations of red clover *Trifolium pratense* L. as affected by VA mycorrhizal infection and phosphorus supply before and during drought. *Journal of Experimental Botany*. 39, 595-604.
- [13] Graham, J. H., Syvertsen, J. P., and Smith, M. L. (1987) Water relations of mycorrhizal and phosphorus-fertilized nonmycorrhizal citrus under drought stress. *New Phytol.* 105, 411–419.
- [14] Nelson, C. E., and G. R. Safir. (1982) The water relations of well-watered, mycorrhizal, and nonmycorrhizal onion plants. *Journal for the American Society of Horticulture Science*. 107,171-274.
- [15] Gavito, M., Curtis, P., Jakobsen, I. (2008) neither mycorrhizal inoculation nor atmospheric CO₂ concentration has strong effects on pea root production and root loss 38, 170–175.
- [۱۶] علی اصغرزاده، ن. (۱۳۷۹) بررسی پراکنش و تراکم قارچ‌های میکوریزا آربوسکولار در خاک‌های شور دشت تبریز و تعیین اثرات آن‌ها در بهبود تحمل پیاز و جو به تنش شوری. پایان‌نامه دکتری گروه خاکشناسی دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران.
- [17] Kariman, K. H., Goltapeh, E. M., and Minassian, V. (2005) Arbuscular mycorrhizal fungi from Iran. *Journal of Agricultural Technology*. 1, 301-313.
- [18] Kariman, K. H., Goltapeh, E. M., and Minassian, V. (2006) Evidences of

- for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. 4, 406-425.
- [30] Tamura. K., Dudley, J., Nei, M., and Kumar, S., (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*. 24, 1596–1599.
- [31] Pawlowska, T. E., Blazkowski, J., and Rühling, A. (1996) The mycorrhizal status of plants colonizing a calamine spoil mound in southern Poland. *Mycorrhiza*. 6, 499-505.
- [32] Tonin, C., Vandenkoornhuysse, P., Joner, E. J., Straczek, J. and Leyval, C. (2001) Assessment of arbuscular mycorrhizal fungi diversity in the rhizosphere of *Viola calaminaria* and effect of these fungi on heavy metal uptake by clover. *Mycorrhiza*. 10,161-168.
- [33] Whitfield, L., Richards, A. J., and Rimmer, D. L. (2004) Relationships between soil heavy metal concentration and mycorrhizal colonization in *Thymus polytrichus* in Northern England. *Mycorrhiza*. 14, 55-62.
- [34] Zarei, M., Saleh-Rastin, N., Jouzani, G. S., Savaghebi, G., Buscot, F. (2008) Arbuscular mycorrhizal abundance in contaminated soils around a zinc and lead deposit. *European Journal of Soil Biology*. 44, 381-391.
- [23] Jenkis, W. R. (1964) A rapid centrifugal flotation technique for separating nematodes from soil. *Plant Disease Reporter*, Washington. 48, 692.
- [24] Cardoso, I. M. and Kuyper, T. W. (2006) Mycorrhizas and tropical soil fertility. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 116,72-84.
- [25] Tao, L. and Zhiwei, Z. (2005) Arbuscular mycorrhizas in a hot and arid ecosystem in southwest china. *Applied SoilEcology*. 29, 135-141.
- [26] Altschul, S. F., Madden T. L., Schaffer A. A., Zhang J. H., Zhang Z., Miller, W. and Lipman, D. J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*. 25, 3389-3402.
- [27] Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J. (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.
- [28] Hall, T. A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows95/98/NT. *Nucleic Acid Symposium Series*. 41, 95–98.
- [29] Nei, M., and Saitou, N. (1987) The neighbor-joining method: A new method

- [37] Öpik, M., Moora, M., Liira, J., Kõljalg, U., Zobel, M., and Sen, R. (2003) Divergent arbuscular mycorrhizal fungal communities colonize roots of *Pulsatilla* spp. in boreal Scots pine forest and grassland soils. *New Phytologist*. 160, 581–593.
- [38] McGonigle, T. P., Fitter, A. H. (1988) Growth and phosphorus inflows of *Trifolium repens* L. with a range of indigenous vesicular-arbuscular mycorrhizal infection levels under field conditions. *New Phytologist*. 108, 59-65.
- [35] Hempel, S., Renker, C., Buscot, F. (2007) Differences in the species composition of arbuscular mycorrhizal fungi in spores, root and soil communities in grassland ecosystem. *Environmental Microbiology*. 9, 1930-1938.
- [36] Borstler B, Renker C, Kahmen A and Buscot F (2006) Species composition of arbuscular mycorrhizal fungi in two mountain meadows with differing management types and levels of plant biodiversity. *Biol. Fertil. Soils*. 42, 286-298.