Agricultural Biotechnology Journal
p-ISSN 2228-6705
e-ISSN 2228-6500
Shahid Bahonar University of Kerman
Iranian Biotechnology Society

Comparison of diversity and abundance of selective arbuscular mycorrhizal fungi of pistachio and some native plants from Kerman province using morphological and molecular (qPCR) method

Zahra Paymaneh

Ph.D. Student, Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran. Tel: +989162491621, Email: z.paymaneh@yahoo.com

Mehdi Sarcheshmehpour

* Assistant Professor, Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran. Tel: +989131403484, Email: msarcheshmeh@uk.ac.ir

Hamid Mohammadi

Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran. Tel: +989173041735, Email: hmohammadi@uk.ac.ir

Abstract

Objective

Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) establish symbiosis with a great number of plant species. This group of fungi plays an important role in ecosystem stability. Some AMF species can quickly adapt to stress conditions. The diversity of native AMF is less studied in Iran. In the present study, we identified AMF symbionts of pistachio trees under salinity and drought stress. Furthermore, the results were compared with some native plants in Kerman province.

Materials and methods

In this study, 56 and 40 samples from the rhizosphere of pistachio trees and native plants were collected respectively. After root colonization assessment, 37 samples with more colonization percentages were selected as initial inoculums. Inoculums prepared with sorghum plant in a pot experiment. In the next step, molecular identification of eight isolates (four isolates from pistachio and four isolates from the native plant) was performed using qPCR method in root samples of *Andropogon gerardii*.

Results

The result showed that root colonization was lower in pistachio than sorghum plants which were in contrast to native plants. Morphological identification of AMF spores showed all samples were contained *Rhizophagus* except for sample ID 42 of pistachio orchards. *Claroideoglomus*, *Funneliformis* ,and *Rhizophagus* were found as dominant species in pistachio orchards.

Conclusions

The present study shows that AMF diversity was higher in native plants than pistachio. *Diversispora* had the highest rate of root colonization followed by *Funneliformis, Rhizophagus, Claroideoglomus,* and *Racocetra.*

Keywords: *Andropogon*, species diversity, dominant species, molecular identification.

Citation: Paymaneh Z, Sarcheshmehpour M, Mohammadi H (2019) Comparison of diversity and abundance of selective arbuscular mycorrhizal fungi of pistachio and some native plants from Kerman province using morphological and molecular (qPCR) method. Agricultural Biotechnology Journal 10(4), 19-34.

Agricultural Biotechnology Journal 10 (4), 19-34.
DOI: 10.22103/jab.2019.2247
Received: December 27, 2018; Accepted: January 24, 2019
© Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society

مقایسه تنوع و فراوانی جدایه‌های انتخابی میکوریز پسته و برخی گیاهان بومی استان کرمان با استفاده از روش‌های ریخت شناختی و مولکولی (qPCR)

زهرا پیمانه

دانشجوی دکتری گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران. تلفن: ۰۹۱۶۲۴۹۱۶۲۱، ایمیل: z.paymaneh@yahoo.com

مهدی سرچشمه‌پور

* نویسنده مسئول، استادیار گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران. تلفن: ۰۹۱۳۱۴۰۳۴۸۴، ایمیل: msarcheshmeh@uk.ac.ir

حمید محمدی

دانشیار گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران. تلفن: ۰۹۱۷۳۰۴۱۷۳۵، ایمیل: hmohammadi@uk.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۰/۰٦، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۱/۰٤

چکیده

هدف: قارچ‌های میکوریز با دامنه وسیعی از گیاهان همزیست هستند و نقشی کلیدی در پایداری اکوسیستم دارند. برخی از گونه‌های قارچ‌های میکوریز قابلیت سازگاری با شرایط سخت را دارند. تحقیقات کمی بر روی تنوع قارچ‌های میکوریز در ایران انجام گرفته است. این تحقیق به منظور شناسایی قارچ‌های میکوریز درونزی همزیست با درختان پسته در شرایط شوری و خشکی شدید و مقایسه نتایج با جدایه‌های برخی گیاهان غیر زراعی انجام شده است.

مواد و روش‌ها: در این بررسی ابتدا تعداد ۵۶ نمونه ریزوسفری از درختان پسته و ۴۰ نمونه ریزوسفری از گیاهان غیرزراعی جمع‌آوری و درصد کلنیزاسیون ریشه آنها تعیین شد. سپس ۳۷ جدایه که درصد کلنیزاسیون بالاتری داشتند انتخاب و با استفاده از گیاه سورگوم در گلدان تکثیر شدند. در مرحله بعد تعداد هشت جدایه برتر (چهار جدایه از پسته و چهار جدایه از گیاهان غیر زراعی) بر روی گیاه اندروپگون (*Andropogon gerardii*) تلقیح و شناسایی مولکولی به روش qPCR انجام شد.

نتایج: درصد کلنیزاسیون نمونه‌های پسته در گلخانه بر روی سورگوم نسبت به پسته در شرایط مزرعه بیشتر بود در حالی که در گیاهان بومی درصد کلنیزاسیون نسبت به سورگوم بیشتر بود. قارچ *Rhizophagus* بر اساس ویژگی‌های ریخت شناختی اسپورها

در خاک، در تمام نمونه‌های پسته بجز نمونه ۴۲ شناسایی گردید. سه جنس *Claroideoglomus*، *Funneliformis* و *Rhizophagus* جنس‌های غالب باغ های پسته بودند.

نتیجه گیری: تنوع گونه‌های قارچ میکوریز در مناطق غیر کشاورزی بیشتر از باغ‌های پسته بود. بیشترین سرعت کلنیزاسیون ریشه مربوط به *Diversispora* می‌باشد و جدایه‌های *Funneliformis*، *Rhizophagus*، *Claroideoglomus* و *Racocetra* در رتبه‌های بعدی قرار گرفتند.

کلمات کلیدی: اندروپگون، تنوع گونه‌ای، جدایه غالب، شناسایی مولکولی

مقدمه

پسته یکی از گیاهانی است که سازگاری بالایی به شرایط سخت محیطی دارد (Abrishami 1994). رفسنجان به عنوان مهمترین منطقه تولید کننده پسته در ایران به شمار می‌رود. با این وجود محدودیت‌های شدید کمی و کیفی منابع آبی یکی از موانع اصلی در توسعه روز افزون سطح زیر کشت این محصول می‌باشند و در چنین شرایطی لازم است که از میزان آب و زمین موجود حداکثر بهره‌وری را داشته باشیم (Sarcheshmehpour 2009). قارچ‌های میکوریز داخلی، قارچ‌های همزیست با ریشه گیاهان هستند که آب و عناصر غذایی را از ناحیه خارج از منطقه تخلیه ریشه جذب نموده و در اختیار گیاه قرار می‌دهند و در عوض گیاه نیز کربوهیدرات مورد نیاز این گروه از قارچ‌ها را تامین می‌کند (Smith & Read 2008). قارچ‌های میکوریز داخلی سبب افزایش مقاومت گیاهان به تنش خشکی می‌شوند و میزان جذب آب در گیاهان را تا ۲۰ درصد افزایش می‌دهند (Khalvati et al. 2005). نتایج پژوهشی که Marouf et al. (2015) از قارچ‌های بومی برای استقرار گیاهان در منطقه تخریب شده توسط فعالیت‌های صنعتی استفاده کردند، نشان داد که رشد گیاهان تلقیح شده به طور معنی‌داری افزایش می یابد. قارچ‌های مورد استفاده در پژوهش مذکور بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی اسپور مربوط به جنس‌های *Acaulospora*، *Gigaspora*، *Scutellospora* و *Glomus* بودند. نتایج پژوهش Song et al. (2015) که بیان ژن‌ها در گیاهان تلقیح شده با قارچ میکوریز مورد مطالعه قرار گرفت، نشان داد که در گیاهان مایه‌زنی شده تعداد ۷۷ پروتئین دچار تغییر قابل توجهی می‌شوند و علاوه بر این تعداد نه پروتئین نیز مربوط به قارچ میکوریز هستند. قارچ‌های میکوریز در ابتدا بر اساس ویژگی‌های ظاهری اسپور شناسایی می‌شدند و در صورت عدم تولید اسپور، ویژگی‌های مربوط به اندام‌های داخلی برای شناسایی مورد استفاده قرار می‌گرفت (Krüger et al. 2009). در این روش برخی از جدایه‌های قارچ‌های میکوریز شناسایی شده، با استفاده از رنگ آمیزی در داخل ریشه قابل دیدن نبودند یا با استفاده از رنگ‌های استاندارد، اثرات ضعیفی از آنها یافت می‌شد. قدرت تولید اسپور نیز تا حد زیادی وابسته به ویژگی‌های فیزیولوژیک قارچ‌های میکوریز و شرایط محیطی دارد. در این زمینه یک قارچ میکوریز ممکن است در یک شرایط به خصوص یا در طول یک فصل، تعداد زیادی اسپور تولید کند و به عنوان قارچ غالب در کلنیزاسیون ریشه عمل کند و در شرایط متفاوت ممکن است چنین حالتی دیده نشود. اصولاً توانایی قدرت تولید اسپور و میزان کلنیزه کردن گیاهان در قارچ‌های مختلف متفاوت است (Smith &

Read 2008). شرایط مشابه‌ای در رابطه با قارچ‌های اکتومیکوریز یا همان میکوریزهای خارجی نیز گزارش شده است، در پژوهشی Gardes & Bruns(1996) نشان دادند که قارچ اکتومیکوریز *Suillus pungens* تنها چهار درصد از ریشه را اشغال می‌کند، در صورتی که با در نظر گرفتن اندام‌های خارجی این قارچ، اکثر مناطق ریشه کلنیزه می‌شود. یکی دیگر از جنبه‌های محدودیت شناسایی ریخت‌شناختی در قارچ میکوریز به ویژه در مورد نمونه‌های صحرایی، تخریب اکثر اسپورهای قارچ‌ها و در نتیجه عدم امکان شناسایی صحیح آنها است. این مشکل سبب می‌شود که از کشت تله‌ای استفاده شود. جهت بررسی اسپور قارچ‌های میکوریز جمع‌آوری شده، ابتدا آنها را در شرایط کنترل شده در تماس با یک گیاه مناسب قرار می‌دهند تا اسپورهای تازه و سالم با شکل استاندارد تولید شوند (Morton & Redecker 2001). لازم به ذکر است که حتی با وجود اسپورهای سالم نیز شناسایی جدایه‌ها بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی اغلب کار ساده‌ای نیست، چراکه بعضی از گونه‌ها تفاوت‌های ظاهری مشخص و تعیین کننده‌ای ندارند. به عنوان مثال اگرچه دو جنس *Glomus* و *Paraglomus* وابستگی کمی به یکدیگر دارند، ولی شناسایی و تشخیص آنها از یکدیگر تنها بر اساس ویژگی‌های ریخت شناختی امکانپذیر نیست (Schubler et al. 2001). علاوه بر این برخی از گونه‌های این گروه از قارچ‌ها نیز دو شکلی هستند که این امر خود سبب گمراهی بیشتر در زمینه شناسایی می‌شود. اما استفاده از روش‌های مولکولی در شناسایی قارچ‌های میکوریز یک انقلاب برای اکولوژی این گروه از قارچ‌ها محسوب می‌گردد، زیرا در این گونه روش‌ها بدون وجود اسپور و تنها با وجود ریشه گیاه یا ریسه‌های قارچ درون خاک می‌توان قارچ را به دقت شناسایی نمود (Jansa et al. 2002; Morton & Redecker 2001). در اغلب موارد شناسایی قارچ‌های میکوریز براساس Ribosomal DNA انجام می‌شود، زیرا نسخه‌های فراوانی از آن در ژن وجود دارد و دارای نواحی حفاظت شده و متغیر است که می‌تواند به‌خوبی گونه‌ها را در سطوح مختلف از یکدیگر جدا کند (Krüger et al. 2009). علاوه بر این ناحیه ژنومی، بخش‌های دیگری از DNA و ایزوآنزیم‌ها نیز در بررسی‌های مولکولی مورد استفاده قرار گرفته است، ولی از گستردگی بالایی در مطالعات برخوردار نمی‌باشند. با پیشرفت در زمینه‌های مولکولی و به ویژه PCR، تجزیه و تحلیل مولکولی مقدار کمی از DNA میکروارگانیسم‌هایی همانند قارچ‌های میکوریز داخلی که امکان کشت آنها بر روی محیط کشت وجود ندارد، نیز امکان پذیر شد (Saiki et al. 1988). کرمان به عنوان مهمترین منطقه تولید پسته در ایران شناخته می‌شود. علاوه بر شرایط اقلیمی خاص و وجود مشکل کمبود آب، کیفیت آب آبیاری نیز نامناسب بوده و سبب گسترش شوری در باغ‌های این استان شده است. عوامل و محدودیت‌های فوق هر کدام به گونه‌ای باعث کاهش میزان تولید پسته در این منطقه از کشور شده است. یکی از راهکارهای مناسب در کشاورزی پایدار استفاده از کودهای زیستی (بیولوژیک) مانند قارچ‌های میکوریز می‌باشد که سبب کاهش اثرات مخرب این گونه تنش‌های محیطی می‌شود. عقیده بر این است که قارچ‌های میکوریزی که خود را با شرایط نامساعد سازگار نموده‌اند از کارایی بیشتری برخوردارند. در این پژوهش قارچ‌های میکوریز جدا شده از درختان پسته تحت تنش شوری و خشکی و برخی گیاهان بومی که مورد غربالگری اولیه قرار گرفته بودند، به گیاه اندروپوگون مایه زنی و تنوع و جمعیت آنها با استفاده از روش Quantitative real-time PCR (qPCR) تعیین و مورد مقایسه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه و انتخاب اولیه جدایه‌ها: در این پژوهش ابتدا تعداد ۵۶ نمونه از ریزوسفر درختان پسته منطقه رفسنجان و تعداد ۴۰ نمونه از ریزوسفر برخی گیاهان بومی استان کرمان تهیه شد. برای جمع‌آوری ریشه پسته، پس از دسترسی به ریشه اصلی درختان، از ریشه‌های مویین و خاک اطراف آنها نمونه‌برداری شد. نمونه‌های جمع‌آوری شده برای تعیین درصد کلنیزاسیون به آزمایشگاه منتقل و در یخچال نگهداری شدند. یک نمونه خاک نیز به صورت مرکب از اعماق صفر تا ۴۰ و ۴۰ تا ۸۰ سانتی‌متری هر باغ جمع‌آوری گردید. خاک‌های هر عمق باهم مخلوط و حدود پنج کیلوگرم از هر عمق خاک به عنوان نمونه اصلی انتخاب و به آزمایشگاه منتقل شد و میزان EC عصاره با رقت یک به پنج نمونه‌ها قرائت شد. هم‌چنین برخی از اطلاعات نظیر مقدار آب مصرفی و دور آبیاری قطعه مورد نظر نیز ثبت گردید. رنگ‌آمیزی ریشه بر اساس روش Phillips & Hayman (1970) انجام شد. در این روش ابتدا ریشه‌ها با محلول هیدروکسید پتاسیم (KOH) ۱۰ درصد در دمای ۹۰ درجه سلسیوس رنگ‌بری شدند. برای رنگ‌بری بهتر از آب اکسیژنه ۱۰ درصد به مدت ۱۵ دقیقه نیز استفاده شد و با اسید کلریدریک ۰/۱ نرمال اسیدی شد. عمل رنگ آمیزی ریشه ها با محلول رنگ تریپن بلو (شامل ۶۵۰ میلی‌لیتر لاکتیک اسید، ۶۰۰ میلی‌لیتر گلیسرول، ۸۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر و ۱/۸۳ گرم رنگ تریپن بلو) صورت گرفت و در نهایت در محلول نگه‌دارنده (۱۰۰ میلی‌لیتر لاکتیک اسید، ۲۰۰ میلی‌لیتر گلیسرول و ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر) قرار داده شدند. در ادامه اندام‌های قارچی شامل آربسکول، هیف و وزیکول‌های قارچ‌های میکوریز داخلی در زیر میکروسکوپ نوری بررسی و درصد کلنیزاسیون با استفاده از پلیت مشبک تخمین زده شد.

غربالگری اولیه با استفاده از کشت سورگوم: با توجه به نتایج شوری خاک، میزان آب مصرفی باغ‌های پسته، درصد کلنیزاسیون ریشه‌های پسته و همچنین درصد کلنیزاسیون گیاهان بومی، ۳۷ جدایه قارچ میکوریز (۱۷ جدایه از پسته و ۲۰ جدایه از گیاهان بومی) به عنوان جدایه‌های اولیه انتخاب و برای تکثیر و غربالگری بر روی گیاه سورگوم تلقیح شدند. بر اساس درصد کلنیزاسیون و ویژگی‌های رشد سورگوم، هشت جدایه نهایی (چهار جدایه مربوط به پسته و چهار جدایه مربوط به گیاهان بومی) بر اساس صفات رویشی گیاه سورگوم و درصد کلنیزاسیون قارچ روی ریشه آن انتخاب شدند.

شناسایی ریخت‌شناسی و تعیین جمعیت و شناسایی مولکولی با استفاده از کشت اندروپوگون: در این مرحله هشت جدایه انتخابی به منظور شناسایی مولکولی و تعیین تنوع قارچ‌های میکوریز بر روی گیاه اندروپوگون تلقیح شدند. برای شناسایی قارچ‌های میکوریز ابتدا اسپورها با استفاده از روش الک تر و سانتریفیوژ با ساکارز استخراج شدند (Jansa et al. 2002) و سپس اسلایدهای میکروسکوپی با استفاده از محلول ملزر[1] و PVLG[2] تهیه و شناسایی آنها با استفاده از سایت INVAM انجام شد. در مرحله بعد شناسایی مولکولی قارچ‌های میکوریز با استفاده از روش qPCR نیز انجام شد. برای اینکار ابتدا هشت جدایه قارچ انتخاب

[1] Melzer
[2] Polyvinyl alcohol-lactic acid-glycerol

شده طی آزمایش گلخانه‌ای در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار بر روی گیاه اندروپوگون تلقیح شدند. برای کشت آنها گلدان‌های حاوی زئولیت، شن و خاک به ترتیب با نسبت ۲:۹:۹ استفاده شد. برای انجام این بخش ۱۰۰ گرم مایه تلقیح به صورت یک لایه در عمق ۵ سانتی‌متر گلدان قرار داده شد و با یک لایه خاک استریل پوشانده شد. سپس حدود ۵۰ عدد بذر از گیاه اندروپگون بر روی خاک قرار داده شد و روی آنها با لایه نازک خاک پوشانده شد. گلدان‌ها در شرایط گلخانه قرار داده شدند و به صورت روزانه با آب مقطر آبیاری شدند. بعد از گذشت هفت هفته، اولین مرحله برداشت انجام شد. برای این منظور دو گیاه از هر گلدان برداشت گردید و اندام‌هوایی آنها توزین و در داخل آون قرار داده شدند. در مرحله بعد ریشه‌های گیاهان در لوله فالکن قرار داده شدند و در دمای ۸۰ – درجه سلسیوس نگهداری گردیدند. ۱۱ هفته پس از کاشت، باقیمانده گیاهان نیز برداشت و مجدداً ریشه‌ها در لوله فالکن و در دمای ۸۰ – درجه سلسیوس قرار داده شدند. استخراج DNA با استفاده از کیت NucleoSpin® Plant ساخت شرکت Macherey-Nagel آلمان انجام شد. بدین منظور مقدار ۳۰۰ میلی‌گرم ریشه تازه در هاون چینی اتوکلاو شده قرار داده شد. سپس مقدار ۵۰۰ میکرولیتر از محلول استخراج کیت بر روی آن ریخته شد و به‌خوبی هموژنیزه گردید و سپس به لوله‌های استخراج DNA کیت انتقال داده شد. استخراج DNA مطابق با دستور کار شرکت مربوطه انجام و مقدار کیفیت DNA با اسپکتروفتومتر نانودراپ اندازه‌گیری گردید. نمونه‌ها در فریزر با دمای۲۰– درجه سلسیوس نگهداری شدند. از هشت آغازگر اختصاصی گونه‌های قارچ میکوریز مربوط به زیر واحد بزرگ ریبوزوم (LSU)، کاوشگر فلورسنت و برنامه PCR طراحی شده بوسیله Thonar et al. (2012) برای انجام Quantitative real-time PCR (qPCR) استفاده شد. قارچ‌های مورد بررسی شامل *Funneliformis mosseae*، *Diversispora*، *Gigaspora margarita*، *Rhizophagus intraradices*، *Acaulospora morowiae*، *Acaulospora tuberculat*، *Claroideoglomus* و *Racocetra* (*Scutellospora pellucida*) بود و یک گونه نیز با ژن میتوکندری (*Rhizophagus intraradices*) مورد بررسی قرار گرفت (Thonar et al. 2012). برای رسم نمودار استاندارد، ابتدا DNA از اسپورهای خالص قارچ میکوریز استخراج و پس از تهیه سری‌های رقت مختلف و انجام qPCR نمودارها رسم شدند (Thonar et al. 2012). آنالیز آماری نتایج با نرم افزار SAS 9.1، آنالیز درختی شباهت‌ها با نرم افزار PAST و روش Ward و رسم نمودارها نیز با Sigma Plot 14 انجام شد.

نتایج و بحث

درصد کلنیزاسیون ریشه: نتایج درصد کلنیزاسیون جدایه‌های نهایی روی ریشه درختان پسته، گیاهان بومی و تلقیح آنها بر روی سورگوم در جدول ۱ آورده شده است. با توجه به این نتایج، درصد کلنیزاسیون جدایه‌ها روی ریشه درختان پسته کمتر و روی ریشه گیاهان بومی بیشتر از کلنیزاسیون روی ریشه سورگوم بوده است (جدول ۱). احتمالاً انجام فعالیت‌های کشاورزی، بخصوص

کود دهی از جمله استفاده از کودهای حاوی فسفر (Xiang et al. 2014) و مصرف سموم مختلف (Channabasava et al. 2015) در باغ‌های پسته گسترش قارچ میکوریز را محدود کرده است.

جدول ۱. نتایج درصد کلنیزاسیون جدایه‌های میکوریز روی ریشه گیاهان در شرایط مزرعه و گلخانه

Table 1. Colonization percentage of mycorrhizal isolates on plant roots under field and greenhouse conditions

نمونه Sample ID	گیاه Plant	کلنیزاسیون ریشه در شرایط مزرعه (٪) Root Colonization in the Field (%)	کلنیزاسیون ریشه سورگوم (٪) Sorghum Root Colonization (%)
2P	پسته (Pistachio)	45.46	84.00
25P	پسته (Pistachio)	5.76	67.34
42P	پسته (Pistachio)	78.56	73.00
51P	پسته (Pistachio)	86.22	90.00
5N	بومی (Native)	98.65	76.52
10N	بومی (Native)	75.00	56.57
26N	بومی (Native)	98.76	76.01
30N	بومی (Native)	97.98	81.82

شناسایی بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی: نتایج شناسایی ریخت‌شناسی با استفاده از اسپورهای موجود در خاک نشان داد که تنوع قارچ‌ها در نمونه‌های مربوط به گیاهان بومی بیشتر است. گونه‌های مربوط به خانواده *Glomeraceae* بیشترین فراوانی را در این مطالعه داشتند (جدول ۲). گونه‌های مختلف قارچ *Glomus* در سایر تحقیقات نیز به عنوان گونه‌های با فراوانی بالا گزارش شده‌اند (Oehl et al. 2003).

جدول۲. نتایج شناسایی ریخت‌شناسی اسپور قارچ میکوریز در نمونه‌های خاک

Table 2. Morphological identification of AMF spores in soil samples

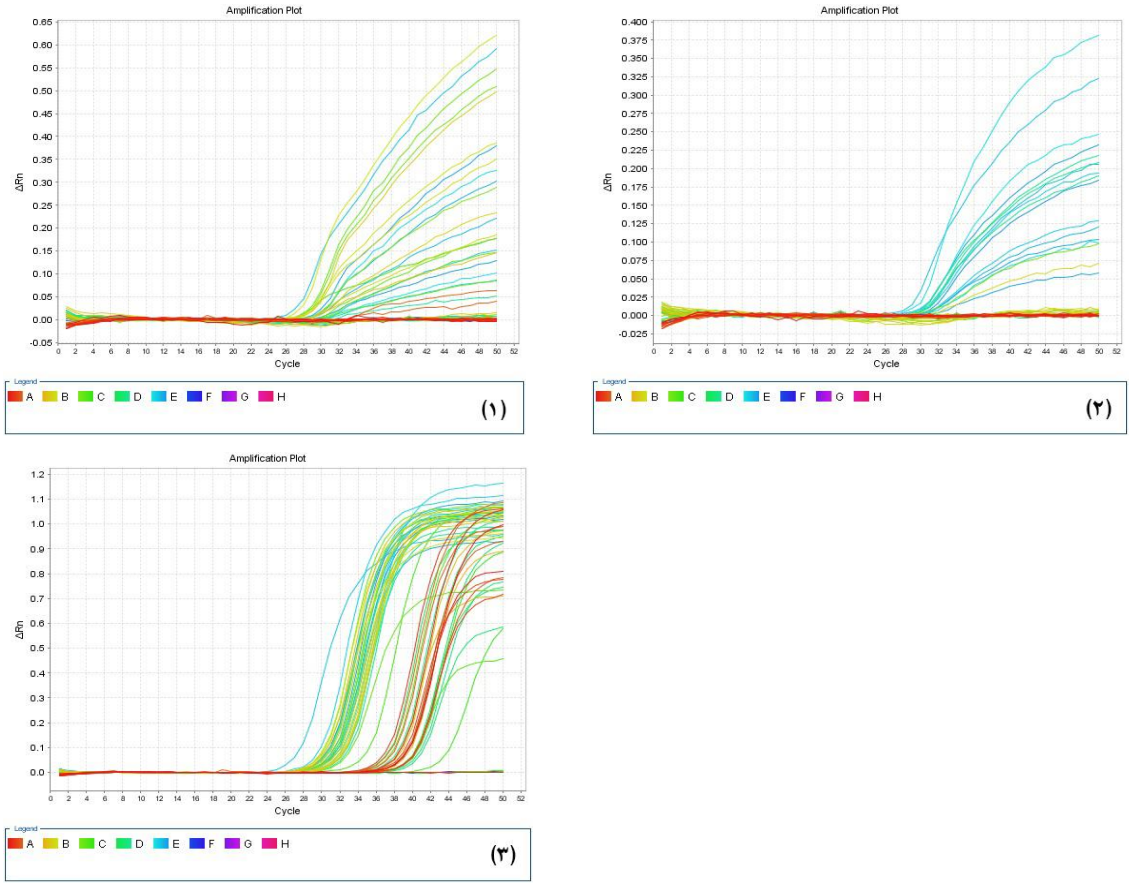
نمونه Sample ID	گیاه Plant	قارچ میکوریز Mycorrhizal Fungi
2P	پسته (Pistachio)	*Acaulospora*, *Funneliformis mosseae*, *Claroideoglomus*, *Scutellopora*, *Rhizophagus intraradices*
25P	پسته (Pistachio)	*Glomus nanolumen*, *Glomus geosporum*, *Funneliformis mosseae*
42P	پسته (Pistachio)	*Acaulospora*
51P	پسته (Pistachio)	*Glomus mosseae*
5N	بومی (Native)	*Sclerocystis*, *Claroideoglomus*, *Acaulospora*, *Funneliformis*
10N	بومی (Native)	*Archaeospora*, *Paraglomus*, *Acaulospora*
26N	بومی (Native)	*Rhizophagus irregularis*
30N	بومی (Native)	*Glomus geosporum*, *Rhizophagus irregularis*, *Rhizophagus* sp., *Glomus* sp

شناسایی مولکولی: نتایج تلقیح قارچ‌های میکوریز بر روی گیاه اندروپوگون نشان داد که قارچ‌های میکوریز انتخابی ریشه گیاه اندروپوگون را نیز به خوبی کلنیزه می‌کنند (شکل‌های ۱ و ۲). بررسی تنوع جمعیت قارچ‌های میکوریز در نمونه‌های مربوط به پسته نشان داد که در برداشت اول قارچ *Funneliformis* غالب می‌باشد. در گیاهان بومی تنوع گونه‌های میکوریز نسبت به گیاه پسته بیشتر بود، به‌طوریکه در نمونه‌های ۵، ۱۰ و ۳۰ قارچ *Rhizophagus* و در نمونه ۲۶ قارچ *Claroideoglomus* جمعیت غالب را تشکیل دادند. نتایج بررسی‌های پیشین نشان داده است که تنوع جمعیت قارچ‌های میکوریز در نواحی با اراضی غیر کشاورزی بیشتر است (Oehl et al. 2003). نتایج تحقیق حاضر نشان داد اثر گیاهان میزبان در نوع گونه قارچ میکوریز موثرتر از زمان برداشت است. اصولاً قارچ‌های میکوریز همزیست اختصاصی نیستند، ولی گیاهان و همچنین قارچ‌ها دارای انتخاب ترجیحی هستند (Smith & Read 2008). بر اساس نتایج این تحقیق، بیشترین فراوانی در برداشت اول به ترتیب مربوط به قارچ‌های *Funneliformis*، *Rhizophagus*، *Claroideoglomus* و *Racocetra* و در برداشت دوم مربوط به *Rhizophagus*، *Funneliformis* و *Claroideoglomus* می‌باشد. مقایسه دو برداشت نشان می‌دهد که *Funneliformis* و *Rhizophagus* توانسته‌اند سهم بیشتری از فضای ریشه را کلنیزه کنند و سایر قارچ‌ها را تا حدی حذف و خود جایگزین آنها شوند. بیشترین جمعیت قارچ *Claroideoglomus* در نمونه ۲۶ بود که از گیاهان بومی استخراج شد. جمعیت این قارچ در مرحله اول برداشت بیشتر بوده و با رشد گیاه توسط سایر قارچ‌ها جایگزین شده است. تعداد کپی‌های زیر واحد بزرگ ریبوزوم قارچ *Claroideoglomus* در نمونه ۲۶ به میزان ۲۹/۵۸ درصد نسبت به برداشت اول کاهش داشت، در حالیکه در نمونه ۴۲ حدود ۱۴/۳۳ درصد افزایش پیدا کرده است. جمعیت *Funneliformis* هم با افزایش رشد گیاه کاهش پیدا کرده است و بیشترین جمعیت آن مربوط به نمونه‌های جدا شده از درختان پسته بوده است (شکل۲). بیشترین جمعیت قارچ *Rhizophagus* مربوط به نمونه ۲۵ بود که با افزایش رشد و سن گیاه مقدار رشد این قارچ نسبت به برداشت اول بیشتر بوده است. قارچ *Racocetra* در نمونه‌های گیاهان بومی بیشتر از پسته بوده است و بیشترین جمعیت این قارچ در نمونه ۳۰ بود که در برداشت دوم مشاهده گردید. نتایج در مورد جمعیت قارچ *Diversispora* نشان داد که با افزایش رشد گیاه، جمعیت آن کاهش می‌یابد و بیشترین جمعیت در نمونه ۳۰ از گیاهان بومی ثبت گردید. بر اساس شکل ۲ بیشترین تعداد کپی زیر واحد بزرگ ریبوزوم در برداشت اول و مربوط به نمونه ۲ بوده است. در برداشت دوم تعداد کپی زیر واحد بزرگ ریبوزوم در بیشتر نمونه‌ها افزایش داشته است و در این خصوص بیشترین تعداد آن مربوط به قارچ‌های *Funneliformis* و *Rhizophagus* می‌باشد. نتایج رشد قارچ‌ها نشان می‌دهد که سرعت جوانه زنی اسپور و کلنیزه کردن ریشه گیاه توسط قارچ‌ها به ترتیب مربوط به جنس‌های *Diversispora*، *Funneliformis*، *Rhizophagus*، *Claroideoglomus* و *Racocetra* بوده است که با نتایج Jansa et al. (2008) مطابقت دارند. در مطالعه‌ای که توسط این گروه انجام شد، سه قارچ *Claroideoglomus*، *Funneliformis* و *Rhizophagus* بر روی گیاهان یونجه و تره‌فرنگی مایه‌زنی شدند که در نهایت بیشترین و کمترین میزان سرعت کلنیزه کردن گیاه به ترتیب مربوط به *Funneliformis* و *Claroideoglomus* بود و *Rhizophagus* حد واسط این دو جنس قرار گرفت. در بررسی حاضر از اسپورهای *Acaulospora* در شناسایی ریخت شناختی

Journal of Agricultural Biotechnology; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

استفاده گردید، ولی در روش مولکولی کارآیی لازم را برای شناسایی آن نداشت. این امر می‌تواند به علت عدم جوانه زدن اسپورهای این قارچ و در نتیجه کلنیزه نشدن ریشه میزبان باشد. در پژوهش Oehl et al. (2009) ابتدا قارچ‌های میکوریز *Glomus* (بخصوص *Glomus mosseae*) تولید اسپور کردند و تعداد اسپورهای این قارچ در مقایسه با سایر قارچها بیشتر و سرعت تولید اسپور آن نسبت به سایر گونه‌ها بیشتر بود. بررسی‌های انجام شده نشان می‌دهند که اگر قارچ‌های میکوریز داخلی در شرایط سخت‌تری از میزبان جدا شده باشند و بعد در شرایط مساعد قرار گیرند، میزان اسپوردهی آنها نسبت به سایر گونه‌ها در زمان کوتاهتری آغاز می‌شود (Oehl et al. 2009). نتایج تحقیق حاضر نشان داد که تنوع قارچها در گیاهان بومی بیشتر از پسته می‌باشد، اما سرعت گسترش و کلنیزاسیون در قارچ‌های جدا شده از پسته بیشتر از جدایه‌های مربوط به گیاهان بومی است.

در پژوهش Brundrett et al (1999) مشخص شد که میزان تولید و درصد جوانه‌زنی اسپور در گونه‌های *Glomus* وابسته به شرایط قبلی رشد و توسعه آنها است، در صورتی که این گونه شاخص‌ها در *Acaulospora* و *Diversispora* وابسته به ژنتیک است و جوانه‌زنی آنها پس از طی کردن یک دوره نهفته آغاز می‌شود. نتایج نمودار درختی نمونه‌های مورد بررسی نشان می‌دهد(شکل ۳) که در اولین مرحله از برداشت، نمونه‌های پسته در کنار یکدیگر و نمونه‌های گیاهان غیر زراعی در دو شاخه در کنار یکدیگر قرار می‌گیرند. در دومین مرحله برداشت نمونه‌های ۲۵ و ۵۱ در کنار یکدیگر و نمونه‌های ۲ و ۴۲ در کنار نمونه‌های مربوط به گیاهان غیرزراعی قرار گرفته‌اند. در اولین مرحله از برداشت در گیاهان پسته، جمعیت غالب *G. mosseae* بوده و به همین دلیل این نمونه‌ها در درخت در کنار یکدیگر قرار گرفته‌اند. در دومین مرحله برداشت در نمونه ۲۵ و ۵۱ جمعیت قارچ *R. intraradices* افزایش و جمعیت قارچ G. *mosseae* کاهش کمی داشته است و این دو نمونه همچنان در کنار یکدیگر هستند. در نمونه‌های ۴۲ و ۲ جمعیت *G. mosseae* به شدت کاهش یافته و در نتیجه این نمونه‌ها به نمونه‌های گیاهان بومی نزدیک شده‌اند. مقایسه دو ژن میتوکندری و زیر واحد بزرگ ریبوزوم (شکل۴) نشان داد که نتایج مربوط به شناسایی *Rhizophagus* بر اساس این دو ناحیه متفاوت است (شکل۴)، در نمونه ۵ گیاهان بومی، زمانیکه از ژن میتوکندری استفاده گردید قارچ *Rhizophagus* تشخیص داده شد ولی با استفاده از زیر واحد بزرگ ریبوزوم این قارچ قابل شناسایی نبود. در پژوهش Voříšková et al. (2017) که زیر واحد بزرگ ریبوزوم و میتوکندری مورد مقایسه قرارگرفتند، مشخص شد که بین این دو ژن ارتباط نزدیک وجود دارد، درصورتیکه تحقیق حاضر نتیجه‌ای معکوس را در پی داشت که احتمالاً حاکی از متفاوت بودن نوع قارچ‌های بررسی شده در این مطالعه می‌باشد.

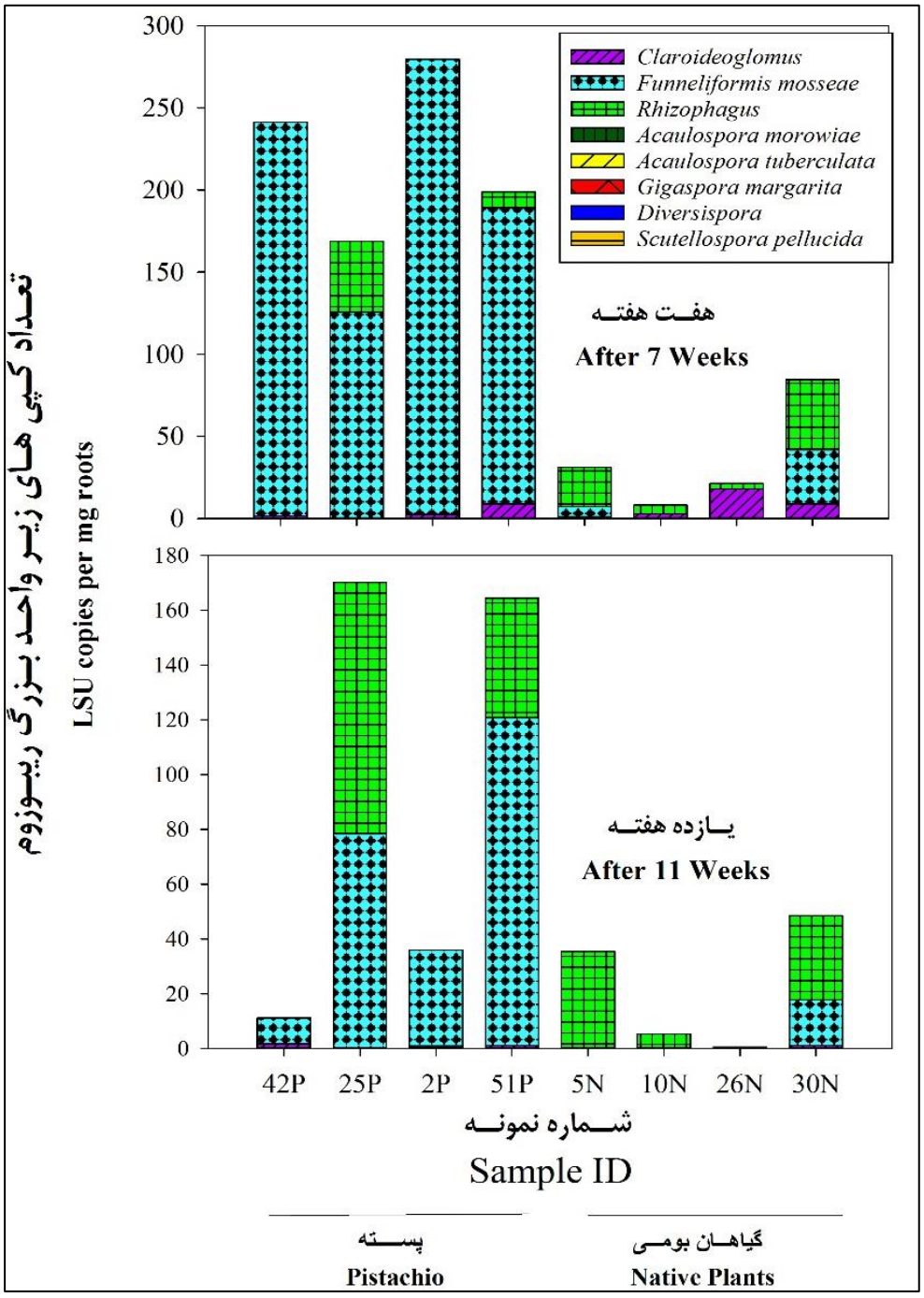


شکل۱. نمودارهای تکثیر qPCR در جنس‌های *Rhizophagus* (۱)، *Claroideoglomus* (۲) و *Funneliformis* (۳). رنگ نمودارها نشان دهنده تعداد کپی‌های زیر واحد بزرگ ریبوزوم تشخیص داده شده است که A بیشترین و H کمترین تعداد را دارد

Figure 1. Amplification plots of qPCR in *Rhizophagus* (1), *Claroideoglomus* (2) and *Funneliformis* (3) genus. The color of curves indicates the detected number of LSU copies that shows A and H are the highest and lowest copies

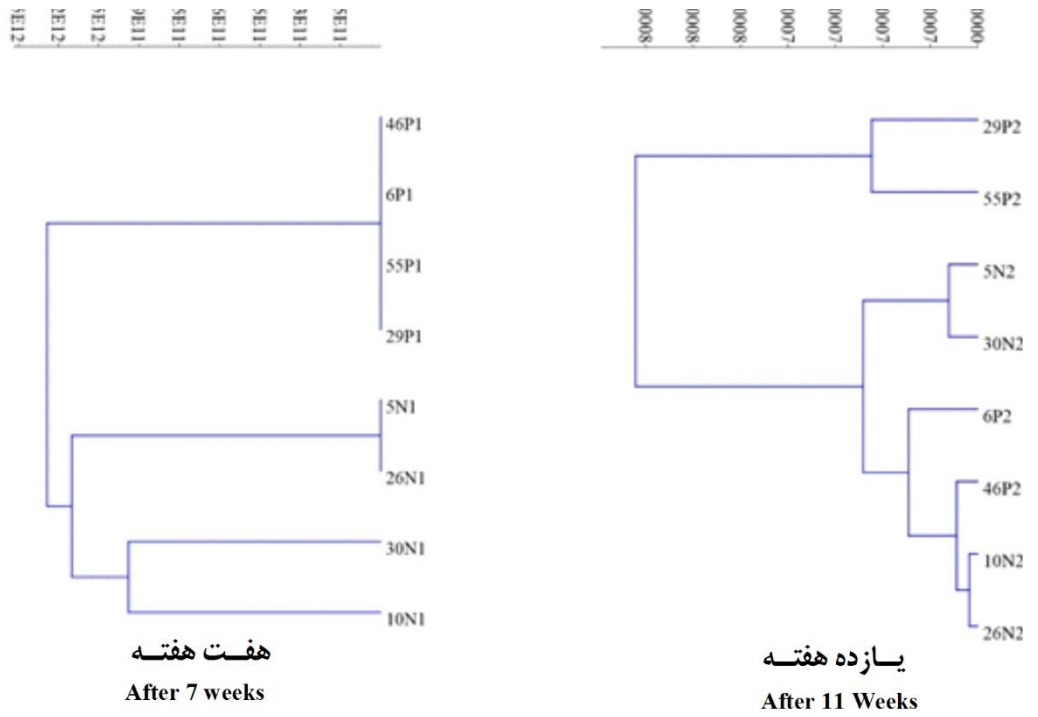
ویژگی‌های رشدی گیاه اندروپوگون: نتایج این تحقیق نشان داد که بیشترین رشد گیاهان مربوط به نمونه تلقیح شده با جدایه ۲۵ و کمترین آن مربوط به نمونه تلقیح شده با ۲۶ می‌باشد. این دو نمونه دارای اختلاف معنی‌داری با سایر نمونه‌ها بودند. بین سایر نمونه‌ها، اختلاف معنی‌دار از نظر وزن خشک و تازه دیده نشد (شکل ۵).

Journal of Agricultural Biotechnology; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500



شکل۲. اثر زمان برداشت و گیاه بر تعداد کپی‌های زیر واحد بزرگ ریبوزوم (۱۰۰۰۰۰۰ *) بر اساس میلی گرم از ریشه گیاه اندروپگون

Figure 2. Effect of harvest period and plant on the copy numbers of LSU (*1000000) mg/root of Andropogon



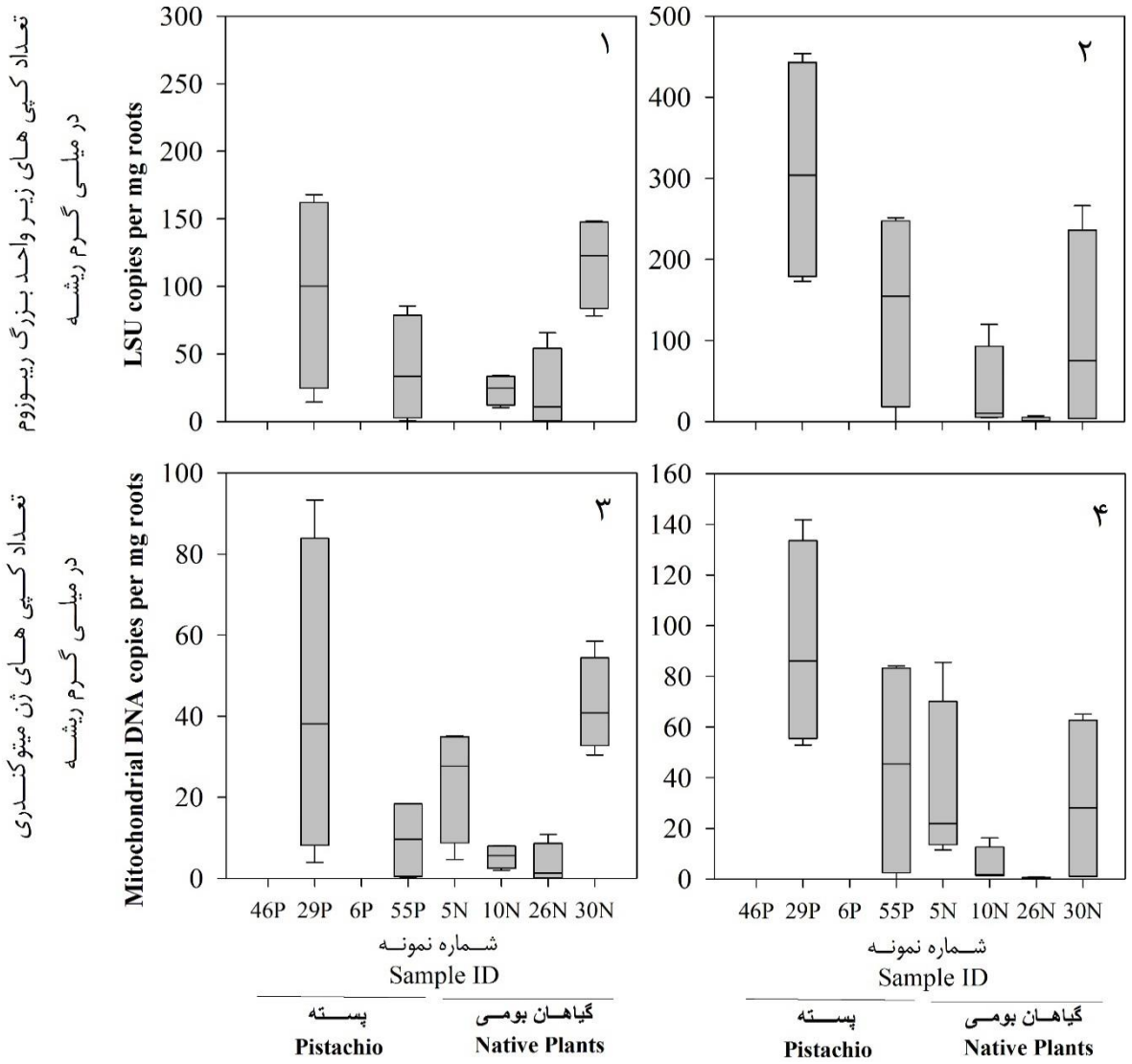
شکل۳. نمودار درختی تحلیل خوشه‌ای بر اساس شباهت‌های جمعیت قارچ‌های میکوریز در دو مرحله برداشت

Figure 3. Cluster analysis based on the similarity of the AMF communities in two harvest periods

این نتایج با میزان غلظت تعداد کپی زیر واحد بزرگ ریبوزوم رابطه مستقیم دارد و با توجه به شکل۲، نمونه ۲۵ گیاه پسته بیشترین و نمونه ۲۶ گیاهان بومی کمترین تعداد کپی زیر واحد بزرگ ریبوزوم را داشتند. نتایج Jansa et al. (2002) نشان داد بین کلنیزاسیون قارچ میکوریز در ریشه و میزان رشد گیاهان همبستگی مثبت وجود دارد که با نتایج این تحقیق نیز مطابقت دارد.

نتیجه گیری

به‌طور کلی تحقیق حاضر نشان داد سرعت جوانه زنی اسپور و کلنیزه کردن ریشه گیاه توسط قارچها به ترتیب مربوط به جنس‌های *Diversispora*، *Funneliformis*، *Rhizophagus*، *Claroideoglomus* و *Racocetra* بوده است که مرحله رشد گیاه می‌تواند ترکیب جمعیت قارچ‌های میکوریز را تحت تأثیر قرار دهد. اگر چه قارچ‌های میکوریز همزیست اختصاصی نیستند، ولی نوع گیاه میزبان می‌تواند بر ترکیب جمعیت قارچ میکوریز تأثیر گزینشی داشته باشد.

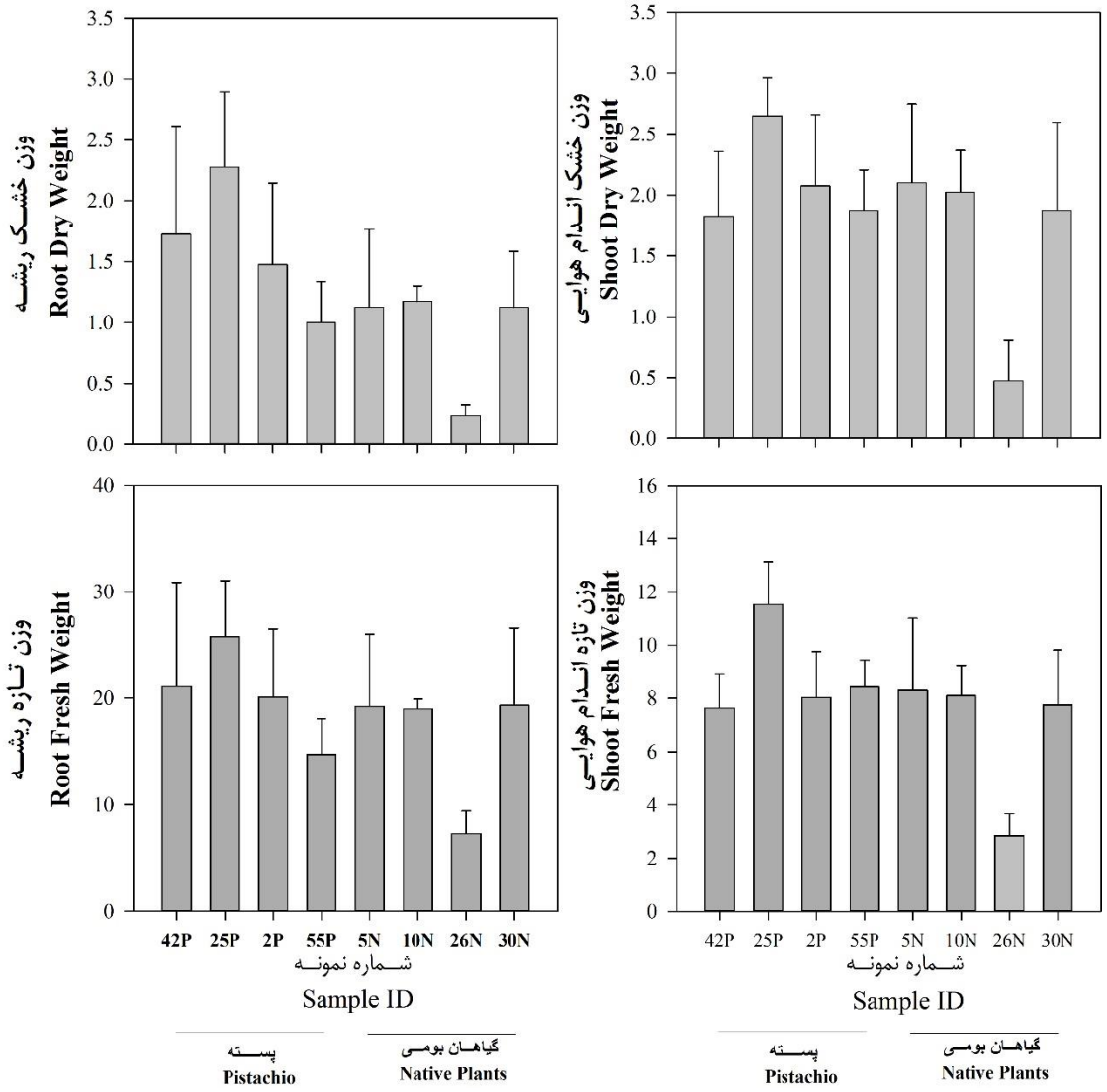


شکل٤. مقایسه ژنوم میتوکندری (mtDNA) (۱ و ۲)، زیر واحد بزرگ ریبوزوم (۳ و٤) در زمان‌های هفت (۱ و ۳) و یازده (۲ و ٤) هفته پس از کشت

Figure 4. Comparison of the mitochondrial (mtDNA) and ribosomal DNA (1 and 2) and LSU (3 and 4) in seven (1 and3) and eleven (2 and 4) weeks after planting.

سپاسگزاری

از صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور که از این طرح پژوهشی به شماره ۹۵۹۸۰۰۰۳ حمایت مالی کرده‌اند، سپاسگزاری می‌شود.



شکل۵. اثر تلقیح قارچ‌های میکوریز بومی بر وزن تر و خشک گیاه اندروپگون (گرم در گلدان)

Figure 5. Effect of native AMF on fresh and dry weight of Andropogon plant (gr pot^{-1})

References

Abrishami MH (1994) Iran Pistachio-Historical Recognition, Tehran University Press.

Brundrett M, Abbott LK, Jasper DA (1999) Glomalean mycorrhizal fungi from tropical Australia, Comparison of the effectiveness and specificity of different isolation procedures. Mycorrhiza 8, 305–314.

Channabasava A, Lakshman HC, Jorquera MA (2015) Effect of fungicides on association of arbuscular mycorrhiza fungus *Rhizophagus fasciculatus* and growth of Proso millet (*Panicum miliaceum* L.). J Soil Sci Plant Nutr 15, 35-45.

Gardes M, Bruns T (1996) Community structure of ectomycorrhizal fungi in a *Pinus muricata* forest: above-and below-ground views. Can J Bot 74, 1572-1583.

Jansa J, Mozafar A, Anken T, Ruh R, Sanders IR, Frossard E (2002) Diversity and structure of AMF communities as affected by tillage in a temperate soil. Mycorrhiza 12, 225-234.

Jansa J, Smith A, Smith SE (2008) Are there benefits of simultaneous root colonization by different arbuscular mycorrhizal fungi?. New Phytol 177, 779-789.

Khalvati MA, Hu Y, Mozafar A, Schmidhalter U (2005) Quantification of water uptake by arbuscular mycorrhizal hyphae and its significance for leaf growth, water relations, and gas exchange of barley subjected to drought stress. Plant Biol 7, 706-712.

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

Marouf KB, Ighilhariz Z, de Lajudie P, Duponnois R, Bekki A (2015) Assessing the native arbuscular mycorrhizal symbioses to rehabilitate a degraded coastal sand dune in Algeria. Int J Agric Crop Sci 8, 194-202.

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

Oehl F, Sieverding E, Ineichen K, Ma der P, Boller T, Wiemken A (2003) Impact of land use intensity on the species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in agroecosystems of Central Europe. Appl Environ Microbiol 69, 2816-2824.

Oehl F, Sieverding E, Ineichen K, Ma¨der P, Wiemken A, Boller T (2009) Distinct sporulation dynamics of arbuscular mycorrhizal fungal communities from different agroecosystems in long-term microcosms. Agr Ecosyst Environ 134, 257-268.

Phillips JM, Hayman DS (1970) Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. Trans Br Mycol Soc 55, 158-161.

Saiki RK, Gelfand D, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239, 487-91.

Sarcheshmehpour M, Savaghebi GR, Saleh Rastin N, Alikhani HA, Siadat H (2009) Evaluation of Effectiveness of Selected Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) of the Pistachio Trees on the Nutrition and Growth Promotion of Seedling under Salt and Drought Stress Conditions. Ph.D. Thesis at Tehran University, Dept. of Soil Science.

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

Smith S, Read D (2008) Mycorrhizal Symbiosis. Academic Press, New York, 787 pp.

Song YY, Simard SW, Carroll A, Mohn WW, Zeng RS (2015) Defoliation of interior Douglas-fir elicits carbon transfer and stress signalling to ponderosa pine neighbors through ectomycorrhizal networks. Sci Rep 5, 8495.

Thonar C, Erb A, Jansa J (2012) Real-time PCR to quantify composition of arbuscular mycorrhizal fungal communities—marker design, verification, calibration and field validation. Mol Ecol Resour 12, 219-232.

Voříšková A, Jansa J, Püschel D, Krüger M, CajthamlT, Vosátka M, Janoušková M (2017) Real-time PCR quantification of arbuscular mycorrhizal fungi: does the use of nuclear or mitochondrial markers make a difference?. Mycorrhiza 27, 577-585.

Xiang D, Verbruggen E, Hu YJ, Veresoglou SD, Rillig MC, Zhou W, Xu TL, Li H, Hao ZP, Chen YL, Chen BD (2014) Land use influences arbuscular mycorrhizal fungal communities in the farming-pastoral ecotone of northern China. New Phytol 204, 968-978.