

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

Narges hatami

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

Eidi bazgir

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

Ebrahim Sedghati

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

Mostafa Darvishnia

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

Abstract

Objective

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

Methods

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

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

Results

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

Conclusion

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

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

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

Agricultural Biotechnology Journal 12(1), 23-44.

DOI: 10.22103/jab.2020.15110.1189

Received: December 16, 2019; Accepted: January 9, 2020

© Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society

مطالعه‌ی مورفولوژیکی و فیلوژنتیکی قارچ‌های میکوریز آربوسکولار همزیست با ریشه‌ی

برخی گیاهان دارویی استان کرمان

نرگس حاتمی

دانشجوی دکتری، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران، ایمیل:

Narges.hatamy123@gmail.com

عیدی بازگیر

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

ابراهیم صدافتی

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

مصطفی درویش نیا

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

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

چکیده

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

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

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

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

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

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

مقدمه

تحقیقات نشان داده‌اند که در اکوسیستم‌های طبیعی، ۹۰ درصد ریشه گیاهان با قارچ‌های میکوریز هم‌زیستی دارند. حاصل این هم‌زیستی، فعالیت قارچ در جهت جذب و انتقال عناصر غذایی به گیاه میزبان و دریافت ترکیبات کربنه حاصل از فتوسنتز گیاه میزبان توسط قارچ هم‌زیست می‌باشد هم‌زیستی بین ریشه‌های گیاهان و قارچ‌ها اولین بار در سال ۱۸۸۱ توسط کامنسکی^۱ قارچ‌شناس لهستانی کشف شد (Kamienski 1881). اصطلاح میکوریز اولین بار توسط فرانک^۲ در سال ۱۸۸۵ برای توصیف این رابطه مورد استفاده قرار گرفت (Frank 1885). میکوریز نوعی رابطه هم‌زیستی بین برخی قارچ‌ها با ریشه گیاهان است که اکثراً هر دو طرف سود می‌برند. بیشتر گیاهان خاکزی حداقل دارای یک نوع هم‌زیستی میکوریزایی هستند. هم‌زیستی میکوریزی دارای انواع مختلفی می‌باشد. در بین انواع مختلف میکوریز، قارچ‌های میکوریز آربسکولار، رایج‌ترین نوع رابطه میکوریزی را با حدود ۸۰ درصد گیاهان تشکیل می‌دهند (Sylvia 1992; Miyasaka et al. 2003). گیاهانی که دارای هم‌زیستی میکوریزی می‌باشند، به دلیل این‌که عناصر غذایی و آب بیشتری از خاک جذب می‌کنند، رشد و عملکرد بهتر و مقاومت بیشتری در برابر تنش‌های زنده (عوامل بیماری‌زایی که ریشه گیاه را مورد حمله قرار می‌دهند) و غیر زنده (کمبود یا مسمومیت مواد غذایی، خشکی، شوری و عناصر سنگین) از خود نشان می‌دهند (Sylvia & Will 1988). در تحقیقی که توسط احیایی و همکارانش (۱۳۸۸) انجام شد تاثیر تنش خشکی بر شاخص‌های مورفولوژیکی برخی گیاهان دارویی از جمله ارتفاع گیاهان، تعداد برگ، تعداد دانه و وزن

[1]. Kamienski

[2]. Frank

گیاهان مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان دهنده تاثیر معنی‌دار تیمارهای مختلف تنش بر روی کلیه صفات مورد نظر در گیاهان دارویی بود (Ehyaei et al. 2009). کمبود شدید آب می‌تواند صدمات سنگینی به رشد و نمو و همچنین بر مواد موثره دارویی گیاهان وارد نماید (Omidbeigi 2005). فدایی و همکارانش در تحقیقی تأثیر تنش خشکی، میکوریزا و فسفر بر شاخص‌های رشد و کمیت و کیفیت اسانس بادرشبو را مورد بررسی قرار داده و نتایج این تحقیق نشان داد که بکارگیری گونه‌های مختلف قارچ‌های میکوریز در تنش خشکی شدید توانست عملکرد فیزیولوژیک و درصد اسانس بادرشبو را ۴۵ تا ۱۰۰ درصد افزایش دهد (Fadaei et al. 2018). این قارچ‌ها می‌توانند مواد آلی مورد نیاز خود را از گیاه دریافت کرده و در مقابل در جذب عناصر غذایی بی‌تحرک مانند فسفر، مس، روی، منگنز، آهن و غیره از خاک به گیاه کمک کنند (Sadhana 2014). قارچ‌های میکوریز آربسکولار به دلیل اینکه می‌توانند ۴ تا ۲۰ درصد از کربن تثبیت شده توسط گیاهان را استفاده کنند، به‌عنوان مهم‌ترین تنظیم‌کننده‌های جریان کربن از گیاهان به خاک، به شمار می‌آیند. این قارچ‌ها دارای اثرات سینرژیستی با سایر میکروارگانیسم‌ها به‌خصوص ریزوباکترهای محرک رشد گیاه نیز می‌باشند (Smith & Read 2010). هیف خارج ریشه‌های میکوریز آربسکولار باعث بهبود ساختمان خاک با اتصال ذرات خاک به یکدیگر می‌شود و از پراکندگی ذرات خاک جلوگیری می‌کند. همچنین تعدادی از آنان نیز با تولید ترکیبات پلی‌ساکاریدی و نفوذ و انتشار در بین ذرات خاک، تهویه خاک را افزایش داده و از فرسایش آن جلوگیری می‌کنند و به‌طور کلی کیفیت خاک را بهبود می‌بخشند (Augé 2001).

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

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

مواد و روش‌ها

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

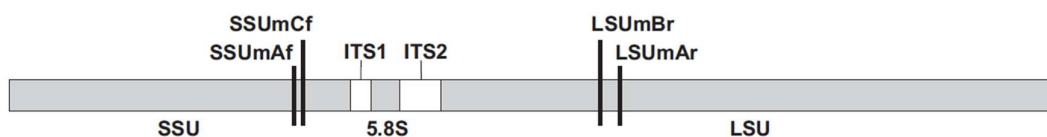
جدول ۱. نام علمی و مشخصات جغرافیایی محل جمع آوری گیاهان مورد مطالعه

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

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

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

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



شکل ۱. نواحی SSU، ITS و LSU از DNA ریبوزومی *Glomus sp.* به طول ۵۴۶۵ جفت باز و موقعیت فرضی پرایمرهای مورد استفاده روی این نواحی (Krüger et al. 2009).

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

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

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

نتایج

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

ویژگی‌های مورفولوژیکی گونه‌های قارچ میکوریز آربوسکولار شناسایی شده؛ گونه *Viscospora viscosa*: دارای

اسپوره‌های کروی تا نیمه کروی و گاهی نامنظم با قطر ۵۰ تا ۱۲۰ میکرومتر به رنگ زرد کاهی و به سطح آن ذرات خاک چسبیده، است و این اسپورها دارای دیواره دو لایه بوده، لایه اول: نیمه ارتجاعی، موسیلاژی و شفاف با ضخامت ۲-۱ میکرومتر، لایه دوم: ارتجاعی و شفاف با ضخامت ۵/۰ میکرومتر، لایه سوم: ورقه‌ای و شفاف است و دارای هیف اتصال استوانه‌ای تا کمی قیفی و سه لایه‌ای می‌باشد.

گونه *Septoglomus deserticola*: دارای اسپوره‌های نیمه کروی با قطر ۱۳۰×۱۳۵ میکرومتر به رنگ نارنجی که در محلول ملز قهوه

ای مایل به قرمز می‌شوند، دیواره دارای دولایه است، لایه اول: موسیلاژی روشن با ضخامت ۳ میکرومتر، لایه دوم: ورقه‌ای زرد با ضخامت ۳،۳ میکرومتر و هیف اتصال آن زرد کم رنگ با منفذ باز می‌باشد.

گونه *Funneliformis mosseae*: دارای اسپوره‌های منفرد به رنگ زرد مایل به قهوه‌ای که در هنگام بلوغ، تیره می‌شوند، که اغلب

کروی و به قطر ۱۹۵ تا ۲۰۵ میکرومتر می‌باشد، دیواره اسپور از ۳ لایه تشکیل شده است؛ لایه اول ناپایدار و موسیلاژی با ضخامت ۱ تا ۴ میکرومتر، لایه دوم قهوه‌ای مایل به قرمز با ضخامت کمتر از ۱ میکرومتر، لایه سوم تیغه‌ای زرد مایل به قهوه‌ای با ضخامت ۳ تا ۵ میکرومتر. رشد این لایه به داخل هیف متصل به اسپور ادامه پیدا کرده و باعث بسته شدن روزنه می‌شود. هیف استوانه‌ای تا قیفی است و دیواره آن از دولایه تشکیل شده است.

گونه *Funneliformis caledoniensis*: دارای اسپوره‌های کروی با قطر ۱۹۰ میکرومتر به رنگ زرد مایل به نارنجی است که دیواره آنها

دارای چهار لایه می‌باشند لایه اول: موسیلاژی با ضخامت ۱ میکرومتر، لایه دوم: سخت و شفاف با ضخامت ۱ میکرومتر، لایه سوم: شکننده و شفاف با ضخامت ۲ میکرومتر و لایه چهارم: ورقه‌ای با ضخامت ۵ میکرومتر است.

گونه *Diversispora spurca*: اسپورها در این گونه نیمه کروی با قطر ۱۰۹×۱۰۳ میکرومتر است و شفاف تا زرد کمرنگ می‌باشند

دیواره اسپور دارای سه لایه است، لایه اول: موسیلاژی، هم‌رنگ اسپور با ضخامت ۱ میکرومتر، لایه دوم: پایدار، ارتجاعی هم‌رنگ اسپور با ضخامت ۱ میکرومتر، لایه سوم: ورقه‌ای شفاف با ضخامت ۴ میکرومتر است.

گونه *Claroideoglossum etunicatum*: دارای اسپوره‌های منفرد زرد تا نارنجی رنگ کروی به قطر ۷۵ تا ۱۶۰ میکرومتر هستند.

دیواره اسپور دولایه، لایه اول: موسیلاژی صورتی مایل به قرمز با ضخامت ۰.۵ تا ۲.۵ میکرومتر، لایه دوم: ورقه‌ای با زیرلایه‌های بهم چسبیده زردرنگ با ضخامت ۴.۵ تا ۱۱ میکرومتر می‌باشد و هیف اتصال استوانه‌ای و ممکن است نیمه قیفی باشد و منفذ توسط لایه دوم بسته شده است.

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

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

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

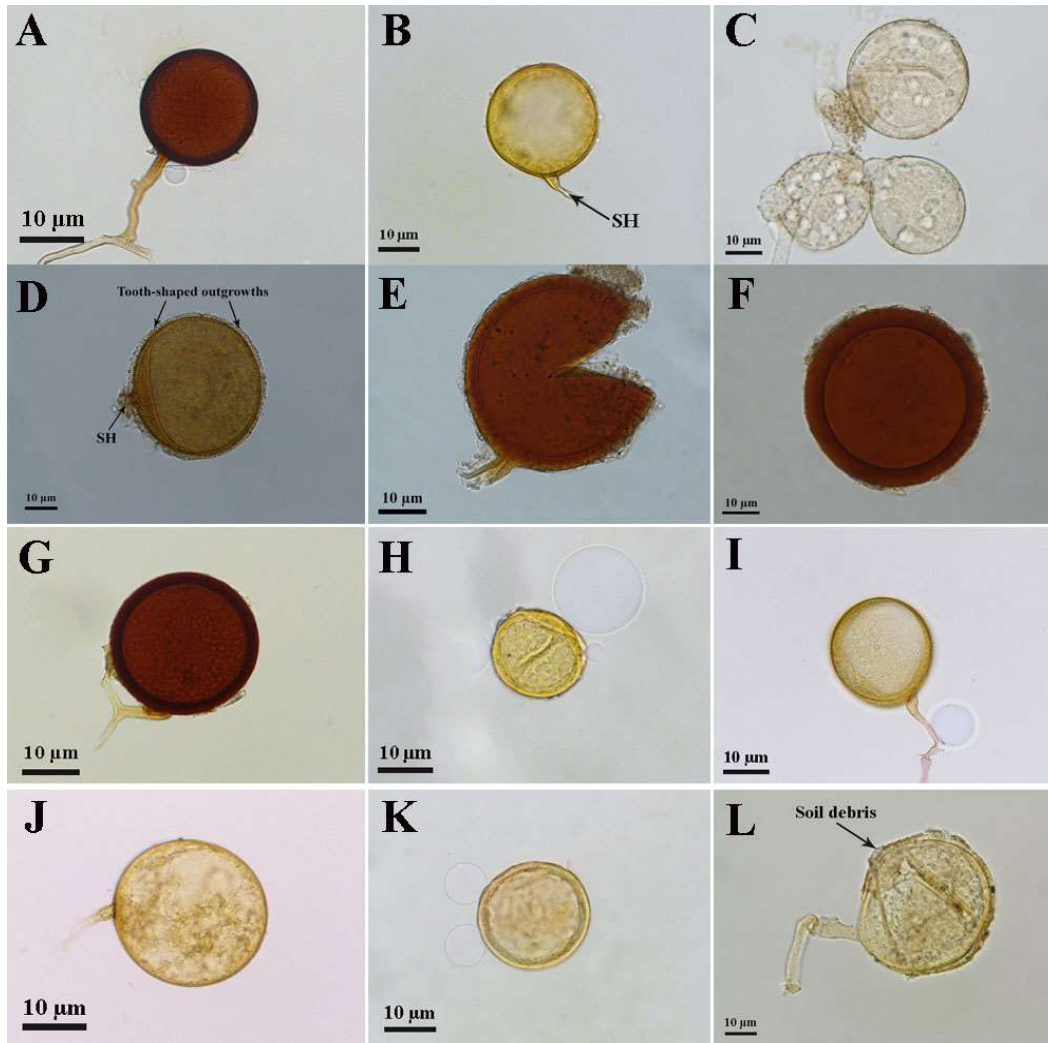
گونه: *Septoglo mus constrictum*: نام و صفت گونه به حالت باریک شدن ریشه در نزدیک محل اتصال به اسپور اشاره دارد، اسپورها منفرد قرمز تا قهوه‌ای تیره و کروی به قطر ۱۵۳ تا ۱۸۲ میکرومتر هستند که دیواره دولایه دارند، لایه اول: دیواره، شفاف و ناپایدار با ضخامت ۰.۵ تا ۲ میکرومتر و لایه‌ی دوم: ورقه‌ی قرمز مایل به قهوه‌ای با ضخامت ۷.۵ تا ۱۱ میکرومتر است. هیف متصل به اسپور، زرد مایل به قهوه‌ای، مستقیم یا خمیده و در محل اتصال، باریک شده است روزنه، ابتدا نازک و سپس با افزایش سن، ضخیم می‌شود و به‌وسیله یکی از لایه‌های داخلی لایه دوم بسته می‌شود.

گونه *Entrophospora infrequens*: اسپورها در خاک به صورت تکی و کروی زرد رنگ تا نارنجی مایل به قهوه‌ای و قطر ۹۵ تا ۱۷۵ میکرومتر هستند که اسپور دارای دیواره چهار لایه است لایه اول: شفاف با ضخامت ۱.۵ تا ۴.۵ میکرومتر، لایه دوم: صاف با ضخامت ۲.۸ تا ۶

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

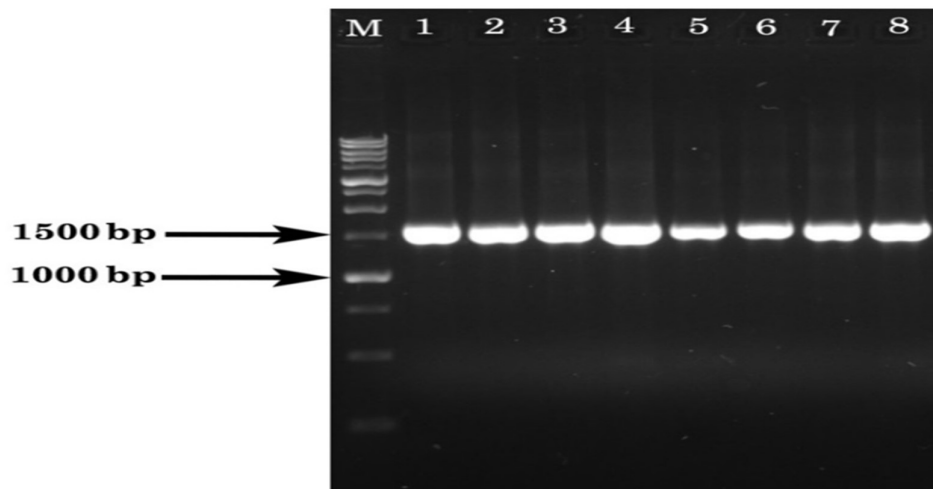
گونه *Glomus ambisporum*: دارای اسپوره‌های کروی ، نیمه کروی یا بیضوی به قطر ۱۰۰ تا ۲۰۰ میکرومتر است، اسپورها به صورت منفرد یا تجمعی به رنگ قهوه‌ای روشن یا تیره تا سیاه رنگ مشاهده می شوند و دیواره اسپور دارای سه لایه است لایه اول: ناپایدار، نیمه شفاف با ضخامت ۱٫۵ تا ۵ میکرومتر ، لایه دوم: ورقه‌ای قهوه‌ای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

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



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

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



شکل ۳. نیم‌رخ الکتروفورزی محصول PCR آشیانه‌ای ناحیه ITS و بخشی از LSU و SSU قارچ‌های میکوریز آربوسکولار.

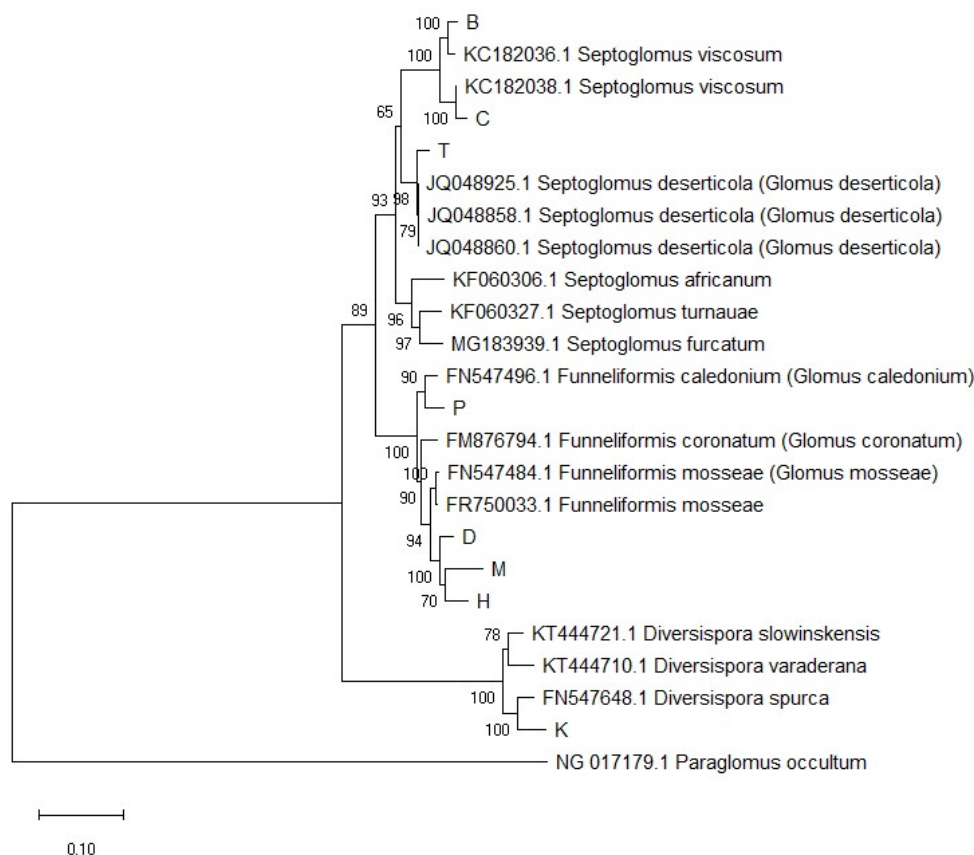
۱ تا ۸، به ترتیب اسپورهای B، C، D، H، K، M، P و T می‌باشند... M: نشانگر مولکولی 1kb DNA (Fermentas).

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

بحث

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

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



شکل ۴. درخت فیلوژنی گونه‌های قارچ‌های میکوریز آربسکولار جداسازی و شناسایی شده بر اساس بخشی از DNA ریبوزومی. این شجره با استفاده از نرم‌افزار MEGA7 و روش Neighbor-Joining از طریق آزمون اعتبار سنجی bootstrap با ۱۰۰۰ تکرار آنالیز و رسم شده است. گونه‌ی *Paraglomus accultum* به‌عنوان out group استفاده گردید. گونه‌های تعیین توالی شده، با حروف B، C، D، H، K، M، P و T مشخص شده‌اند.

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

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

این گونه باشد (Öpik et al. 2003; Börstler et al. 2006). نتایج این پژوهش می‌تواند گویای اختصاصی نبودن گیاه میزبان برای *F. mosseae* باشد. در نتایج پژوهش ما نیز بیشترین اسپورهای زنده جدا شده از گیاهان دارویی متعلق به این گونه بود به طوری که از بین هشت جدایه که شناسایی شده سه جدایه متعلق به گونه *F. mosseae* بود و همچنین نتایج بررسی فیلوژنتیکی گونه‌های مختلف این جنس در پژوهش حاضر با همه‌ی نتایج پژوهش‌های قبلی مطابقت دارد. این گونه از زیتون، سویا، مرکبات و پسته شناسایی شده است (Sadravi 2002; Sadravi & Seifi 2002; Sedaghati et al. 2005; Zangeneh et al. 2005). همچنین Salehi-jozani et al. (2011) و Sabetjahromi et al. (2012) با استفاده از روش مولکولی این گونه را شناسایی کرده‌اند. جنس *Funneliformis* در سال ۲۰۱۱ با استفاده از توالی DNA ریبوزومی و ژن بتاتوبولین به‌عنوان جنس جدید معرفی شد. نام‌گذاری این جنس براساس شکل قیفی محل اتصال هیف به اسپور می‌باشد (Oehl et al. 2011). گونه‌ی *Funneliformis caledonium* در مزرعه و در انواع خاک‌های فقیر و غنی یافت می‌شود. اسپور این گونه از نظر اندازه و رنگ و نحوه اتصال قیفی شکل هیف به اسپور با گونه *F. mosseae* شباهت دارد؛ این دو گونه در تعداد لایه‌های دیواره اسپور، متفاوت می‌باشند (Blaszkowski 1989). گونه *F. caledonium* در پژوهش Krüger et al. (2012) که براساس تعیین توالی بخشی از ناحیه DNA ریبوزومی انجام شد، به همراه گونه *F. coronatum* در کلاد مشترک در کنار سایر گونه‌های جنس *Funneliformis* قرار گرفت. گونه‌ی *Funneliformis mosseae*، به افتخار یابنده آن، خانم دکتر باربارا موسی^۳ نام‌گذاری شده‌است. نزدیک‌ترین گونه به این قارچ گونه *F. coronatum* است؛ ولی در این گونه دیواره اسپور از دو لایه تشکیل شده است و فاقد لایه موسیلاژی می‌باشد (Hall 1984). گونه *F. caledonium* از ریشه‌ی گندم، جو، ذرت و سورگوم گزارش شده است (Sadravi 2002).

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

[3]. Barbara Mosse

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

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

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

سپاسگزاری

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

منابع

- احیایی احمد رضا؛ رضوانی مقدم پرویز؛ امیری ده احمدی سید رضا (۱۳۸۸) بررسی تاثیر تنش خشکی بر برخی شاخص های مورفولوژیکی سه گیاه دارویی خارمریم ، همیشه بهار و سیاهدانه در شرایط گلخانه. اولین همایش ملی تنش های محیطی در علوم کشاورزی
- امیدبگی رضا (۱۳۸۴) تولید و فرآوری گیاهان دارویی. ویرایش دوم. انتشارات آستان قدس رضوی. ۴۳۸.
- ثابت چهارمی مهدی؛ صالحی جوزانی غلامرضا؛ حسینی ملیحه؛ خیام نکویی سید مجتبی؛ اکبری والا سپیده (۱۳۹۱) جداسازی و شناسایی قارچ‌های میکوریز آربسکولار بومی در خاک‌های مناطق خشک زراعی ایران با استفاده از روش PCR آشیانه‌ای. زیست فناوری تربیت مدرس ۳-۱-۱۳.
- زنگنه سیما؛ شیروانی علی بخش؛ علیان یعقوب؛ نجفی‌نیا موسی؛ کرم‌پور فرزاد؛ قلعه‌دزدانی حجت الله (۱۳۸۴) معرفی گونه‌های جدیدی از قارچ‌های آربسکولار-میکوریزا از ریزوسفر مرکبات ایران. رستنی‌ها جلد ۶، ۷۷-۸.
- صالحی‌جوزانی غلامرضا؛ اکبری‌والا سپیده؛ ثابت‌چهرمی مهدی؛ مرسلی حسن (۱۳۹۰) جداسازی و شناسایی قارچ‌های میکوریز آربوسکولار غالب در ریزوسفر گندم، جو و علف‌های هرز برخی مناطق زراعی شور ایران. مجله علمی-پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی. جلد ۱، ۶۱-۷۵.
- صدری مهدی (۱۳۸۱) معرفی پنج گونه گلوموس از قارچ‌های میکوریز آربوسکولار ایران. علوم کشاورزی و منابع طبیعی ایران. جلد ۹. ۳۰-۱۵.
- صدری مهدی؛ (۱۳۸۵) قارچ‌های میکوریز آربوسکولار مزارع گندم در استان گلستان. مجله رستنی‌ها. جلد ۷، ۱۴۰-۱۲۹.
- فدایی الهام؛ پرویزی یحیی؛ گردکانه محمد؛ خان احمدی معصومه (۱۳۹۷) تأثیر القای سویه های قارچ میکوریزا *Glomus intraradiceae* و *Glomus mosseae* و فسفر بر رشد و ترکیبات فیتوشیمیایی بادرشو (*Dracocephalum moldavica* L.) تحت شرایط تنش خشکی. فصلنامه گیاهان دارویی ۱۷، ۱۱۷-۱۳۰.

References

- Akiyama K, Hayashi H (2002) Arbuscular mycorrhizal fungus-promoted accumulation of two new triterpenoids in cucumber roots. *Biosci Biotech Bioch* 66, 762-769.
- Augé RM (2001) Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza* 11, 3-42.
- Błaszowski J (1989) Polish Endogonaceae 1. *Acaulospora bireticulata*, *Entrophospora infrequens*, *Glomus caledonium*, and *Scutellospora pellucida*. *Karstenia* 29, 1-10.
- Błaszowski J (1993) Comparative studies of the occurrence of arbuscular fungi and mycorrhizae (Glomales) in cultivated and uncultivated soils of Poland. *Acta Mycol* 28, 93.
- Börstler B, Renker C, Kahmen A et al. (2006) Species composition of arbuscular mycorrhizal fungi in two mountain meadows with differing management types and levels of plant biodiversity. *Biol Fert Soil* 42, 286-298.
- Copetta A, Lingua G, Berta G (2006) Effects of three AM fungi on growth, distribution of glandular hairs, and essential oil production in *Ocimum basilicum* L. var. *Genovese*. *Mycorrhiza* 16, 485-494.
- Ehyaei A, Rezvanimoghadam P, Amiridehahmadi S (2009) Investigation of the effect of drought stress on some morphological indices of three medicinal plants of thistle, evergreen and black seed in greenhouse conditions. First National Conference on Environmental Stress in Agricultural Sciences.
- Fadaei E, Parvizi Y, Gordekaneh M et al. (2018) Effect of induction of Mycorrhiza fungi strains *Glomus intraradiceae* *Glomus mosseae* and phosphorus and phytochemicals on *Dracocephalum moldavica* L. under drought stress. *J Medicin Plant* 17, 117-130.
- Frank A (1885) Über die auf Wurzelsymbiose beruhende Ernährung gewisser Bäume durch unterirdische Pilze *Berichte der Deutschen. Ber Dtsch Bot Ges* 3 3, 128–145.
- Gerdemann J, Nicolson TH (1963) Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. *British Mycological Society* 46, 235-244.
- Gupta M, Prasad A, Ram M et al. (2002) Effect of the vesicular–arbuscular mycorrhizal (VAM) fungus *Glomus fasciculatum* on the essential oil yield related characters and nutrient acquisition in the crops of different cultivars of menthol mint (*Mentha arvensis*) under field conditions *Bioresour. Technol.* 81, 77-79.

- Hall I (1984) Taxonomy of VA mycorrhizal fungi. VA Mycorrhiza, 57-94.
- Helgason T, Watson IJ, Young JPW (2003) Phylogeny of the Glomerales and Diversisporales (Fungi: Glomeromycota) from actin and elongation factor 1-alpha sequences. FEMS Microbiol Lett 229, 127-132
- Johnson C, Menge J, Schwab S et al. (1982) Interaction of photoperiod and vesicular-arbuscular mycorrhizae on growth and metabolism of sweet orange. New Phytol 90, 665-669.
- Kamienski F (1881) Die Vegetation sorgane der Monotropa hypopitys L. Bot Zeitschr 39, 225-234.
- Krüger M, Krüger C, Walker C et al. (2012) Phylogenetic reference data for systematics and phylotaxonomy of arbuscular mycorrhizal fungi from phylum to species level. New Phytol 193, 970-984.
- Krüger M, Stockinger H, Krüger C et al. (2009) DNA-based species level detection of Glomeromycota: one PCR primer set for all arbuscular mycorrhizal fungi. New Phytol 183, 212-223.
- Menge J, Steirle D, Bagyaraj D et al. (1978) Phosphorus concentrations in plants responsible for inhibition of mycorrhizal infection. New Phytol 80, 575-578.
- Miyasaka SC, Habte M, Friday J et al. (2003) Manual on arbuscular mycorrhizal fungus production and inoculation techniques. SCM-5 21, 1-4
- Oehl F, Silva GAd, Goto BT et al. (2011) Glomeromycota: three new genera and glomoid species reorganized. Mycotaxon 116, 75-120.
- Omidbeigi R (2005) Production and Processing of Medicinal Plants. Astan Ghods Razavi.
- Öpik M, Moora M, Liira J et al. (2003) Divergent arbuscular mycorrhizal fungal communities colonize roots of Pulsatilla spp. in boreal Scots pine forest and grassland soils. New Phytol 160, 581-593.
- Redecker D, Schüßler A, Stockinger H et al. (2013) An evidence-based consensus for the classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). Mycorrhiza 23, 515-531.
- Sabetjahromi M, Slehijozani G, Hoseini M et al. (2012) Isolation and characterization of native arbuscular mycorrhizal fungi in soils of arid regions of Iran using nested PCR method. Trbiat Modares Biotechol 3, 1-13.

- Sadhana B (2014) Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF) as a Biofertilizer-a Review. *Int J Curr Microbiol App Sci* 3, 384-400.
- Sadravi M (2002) Symbiotic fungi of soybean root, sunflower and sesame in Golestan province. The first national conference and festival of oilseeds.
- Sadravi M (2006) Arbuscular mycorrhizal fungi in wheat fields in Golestan province. *Vegetable* 7, 129-140.
- Sadravi M, Seifi A (2002) Symbiotic fungi of olive root in Golestan province, Province SCoRPoG (ed).
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4, 406-425.
- Salehi-jozani G, Akbari-vala S, Sabet-Jahromi M et al. (2011) Isolation and identification of dominant arbuscular mycorrhizal fungi in wheat, barley and weed rhizosphere of some saline crop areas of Iran. *Crop Biotechnol* 1, 61-75.
- Sanders IR, Alt M, Groppe K et al. (1995) Identification of ribosomal DNA polymorphisms among and within spores of the Glomales: application to studies on the genetic diversity of arbuscular mycorrhizal fungal communities. *New Phytol* 130, 419-427.
- Schenck N, Schroder V (1974) Temperature response of *Endogone* mycorrhiza on soybean roots. *Mycologia* 66, 600-605.
- Schenck NC, Perez Y (1990) Manual for the identification of VA mycorrhizal fungi. Synergistic Publications Gainesville.
- SCHÜßLER A, Schwarzott D, Walker C (2001) A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycol Res* 105, 1413-1421.
- Schüßler A, Walker C (2010) The Glomeromycota: a species list with new families and new genera. The Royal Botanic Garden Kew, Botanische Staatssammlung Munich, and Oregon State University 19.
- Sedaghati E, Hosseini A, Khodayegan P et al. (2005) Report of some species of arbuscular Mycorrhiza fungi from Pistachio orchards Rafsanjan, Iran. In: Proceedings of the International Symposium on Pistachio and Almond ISHS Tehran Iran.
- Smith SE, Read DJ (2010) Mycorrhizal symbiosis. Academic Press.
- Stürmer SL, Morton JB (1997) Developmental patterns defining morphological characters in spores of four species in *Glomus*. *Mycologia* 89, 72-81.

- Sylvia D, Will M (1988) Establishment of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and other microorganisms on a beach replenishment site in Florida. *Appl Environ Microbiol* 54, 348-352.
- Sylvia DM (1992) 3 Quantification of External Hyphae of Vesicular-arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Meths Microbiol* 53-65.
- Toussaint J-P, Smith F, Smith S (2007) Arbuscular mycorrhizal fungi can induce the production of phytochemicals in sweet basil irrespective of phosphorus nutrition. *Mycorrhiza* 17, 291-297.
- Uniyal RC, Uniyal MR, Jain P (2000) Cultivation of medicinal plants in India: a reference book. TRAFFIC-India.
- Vierheilig H, Gagnon H, Strack D et al. (2000a) Accumulation of cyclohexenone derivatives in barley, wheat and maize roots in response to inoculation with different arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 9, 291-293.
- Vierheilig H, Maier W, Wyss U et al. (2000b) Cyclohexenone derivative-and phosphate-levels in split-root systems and their role in the systemic suppression of mycorrhization in precolonized barley plants. *J Plant Physiol* 157, 593-599.
- Vierheilig H, Schweiger P, Brundrett M (2005) An overview of methods for the detection and observation of arbuscular mycorrhizal fungi in roots. *Physiol Plantarum* 125, 393-404.
- Walker C (1982) Species in the Endogonaceae: a new species (*Glomus occultum*) and a new combination (*Glomus geosporum*). *Mycotaxon* 15, 49-61.
- Wöstemeyer J, Burmester A (1986) Structural organization of the genome of the zygomycete *Absidia glauca*: evidence for high repetitive DNA content. *Curr. Genet* 10, 903-907.
- Zak J, Danielson R, Parkinson D (1982) Mycorrhizal fungal spore numbers and species occurrence in two amended mine spoils in Alberta, Canada. *Mycologia* 74, 785-792.
- Zangeneh S, Shirvani A, Alian Y et al. (2005) Introducing new species of arbuscular-mycorrhizal fungi from the Iranian citrus rhizosphere. *Vegetable* 6, 8-77.
- Zolfaghari M, Nazeri V, Sefidkon F et al. (2013) Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on plant growth and essential oil content and composition of *Ocimum basilicum* L.

