

## شناسایی مورفولوژیکی و مولکولی چند گونه قارچ میکوریز از ریزوسفر درختان میوه هسته دار مناطق کوهستانی رفسنجان

لاله ایلخان<sup>۱\*</sup>، ابراهیم صداقتی<sup>۱</sup>، حمید رحیم زاده بهزادی<sup>۱</sup>، ماریه نادی<sup>۲</sup> و یوسف دادی زاده<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> گروه گیاه پزشکی دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان

<sup>۲</sup> گروه فناوری و مدیریت تولید، پژوهشکده پسته، موسسه علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی

<sup>۳</sup> اداره منابع طبیعی و آبخیزداری شهرستان جاسک

\*[laleilkhan@gmail.com](mailto:laleilkhan@gmail.com) نویسنده مسئول:

### چکیده

با هدف شناسایی گونه‌های میکوریز همزیست ریشه درختان میوه در مناطق کوهستانی نمونه‌برداری از عمق ۱۰ تا ۵۰ سانتی متری از ریزوسفر درختان هسته‌دار صورت گرفت. مناطق و گونه‌های درختی نمونه برداری شده به این ترتیب بودند: داوران با ارتفاع از سطح دریا ۱۸۸۷ متر؛ زردآلو، گیلاس. راویز ارتفاع از سطح دریا ۲۱۱۸ متر؛ گیلاس، آلبالو، سرچشمه ارتفاع از سطح دریا ۲۶۲۷ متر؛ زردآلو و آلبالو. اسپوره‌های میکوریز با استفاده از روش الکترون میکروسکوپی و گروه‌بندی براساس صفات ریخت‌شناسی (رنگ، شکل، لایه‌های دیواره سلولی و اندازه اسپور) صورت گرفت. پس از استخراج DNA از تک اسپورها، بخشی از DNA ریبوزومی با روش PCR آشیانه‌ای، با استفاده از آغازگرهای LSUmAr و SSUmaf در مرحله اول و LSUmBr و SSUmCf در مرحله دوم تکثیر گردید. طبق بررسی‌های انجام‌شده ریخت‌شناسی و مولکولی، گونه‌های *Rhizophagus intraradices* *Funneliformis mosseae*، *Funneliformis caledonium* *Acaulospora punctata* از گیلاس، گونه‌های *Funneliformis coronatum* و *Funneliformis caledonium* از زردآلو جداسازی شدند. گونه *Acaulospora punctata* برای فلور ایران جدید می‌باشد.

**واژه‌های کلیدی:** شناسایی ریخت‌شناسی و مولکولی، میکوریز، مناطق کوهستانی، هسته‌داران

### مقدمه

قارچ‌های میکوریز آریسکولار همزیست اجباری بسیاری از گیاهان خشکی‌زی هستند. این قارچ‌ها اهمیت اقتصادی و اکولوژیکی زیادی دارند. دلایل این اهمیت، توانایی ارتقا تغذیه گیاهان، در دسترس قرار دادن آب برای گیاهان، ارتقا ساختار خاک و افزایش تحمل گیاهان به پاتوژن‌ها و تنش‌های محیطی می‌باشد. از آنجا که در حال حاضر این گونه‌های زیستی را به‌صورت موجوداتی با تولید مثل غیرجنسی می‌شناسیم، لذا نمی‌توان آن‌ها را به‌عنوان گونه بیولوژیکی تعریف کرد (Senés-Guerrero and Schüßler, 2016). تاریخچه شناسایی این قارچ‌ها از طریق ریخت‌شناسی اسپوره‌های آن‌ها می‌باشد. این روش به تنهایی می‌تواند موجب بروز اشتباهاتی در زمینه شناسایی این گونه‌های قارچی شود، زیرا برخی از گونه‌ها چندین شکل از اسپورها را داشته و از سوی دیگر گروهی از این قارچ‌ها دارای دوره استراحت اسپوری بوده و نمیتوان آنها را در این دوره به‌عنوان جمعیت فعال میکوریزی محسوب کرد (Hempel et al., 2007). همچنین درون ریشه‌ای یا برون ریشه‌ای بودن ریشه‌های این قارچ‌ها تنها از طریق بررسی توسط میکروسکوپ الکترونی امکان پذیر است. با توجه به همه دلایلی که ذکر شد، شناسایی مولکولی روشی قابل اطمینان برای شناسایی این گروه از قارچ‌ها می‌باشد. در این بررسی سعی شد شناسایی گونه‌های میکوریز مناطق کوهستانی شهرستان رفسنجان از میزبان‌های گیاهان هسته‌دار به صورت ریخت‌شناسی و مولکولی صورت گیرد.

### مواد و روش‌ها

نمونه برداری از مناطق کوهستانی شهرستان رفسنجان از برخی از درختان هسته‌دار (گیلاس، آلبالو و زردآلو) از نواحی سرچشمه (ارتفاع: ۲۶۲۷ متر)، راویز (ارتفاع: ۲۱۱۸ متر) و داوران (ارتفاع: ۱۸۸۷ متر) انجام شد. نمونه‌برداری‌ها از عمق ۵ تا ۵۰ سانتی‌متری خاک ریزوسفر این درختان به همراه ریشه‌های فرعی به‌میزان یک کیلوگرم انجام و نمونه‌ها به آزمایشگاه منتقل شدند. ریشه‌ها به‌روش فیلیپس

و همین رنگ آمیزی شد (Phillips and Hayman, 1970). از ریشه‌های رنگ‌آمیزی جهت بررسی میزان همزیستی میکوریزی با استفاده از میکروسکوپ کالیبره شده (ECLIPSE-80i -Nikon) عکس‌برداری صورت گرفت. سپس اسپورها به روش سری الک مرطوب از خاک جداسازی شدند (Gerdemann *et al.*, 1963). اسپورهای جداسازی شده در زیر استریومیکروسکوپ از نظر شکل، اندازه، رنگ، تزئینات دیواره، هیف اتصال و تعداد لایه‌های دیواره سلولی مورد بررسی قرار گرفته و شناسایی ظاهری شدند. شناسایی ریخت‌شناسی اسپورها که در محلول ملزر و PVLG (Polyvinyl-Lacto-Glycerol) به صورت لام فیکس شده بودند، بر اساس منابع معتبر شناسایی قارچ‌های میکوریز <http://www.zor.zut.edu.pl> و <http://www.invam.wvu.edu> انجام شد. استخراج DNA از تک اسپورها طبق روش یزدان‌پناه و همکاران صورت گرفت (یزدان‌پناه و همکاران، ۱۳۹۵). برای تکثیر DNA استخراج شده از تک اسپور متعلق به هر گروه اسپوری، از روش PCR آشیانه‌ای استفاده شد. آغازگرهای مورد استفاده برای تکثیر در PCR اول SSUmaf (TGGGTAATCTTDTGAAACTTYA) و LSuMAR (TGCTGWHACTCAAWYCTATCRAW) قادر به تکثیر قطعه ۱۸۰۰ جفت بازی DNA ریبوزومی بوده و در مرحله دوم PCR، از SSUmCf (TATYGYTCTTNAACGAGGAATC) و LSuMBR (DAACACTCGCAYAYATGYTAGA) که قادر به تکثیر قطعه‌ای به طول ۱۵۰۰ جفت باز از DNA ریبوزومی بودند، استفاده شد (Krüger *et al.*, 2009). قطعات تکثیر شده از هر نمونه برای تعیین توالی به شرکت ژن فن آوران ارسال گردید. بررسی مشابهت توالی‌ها با اطلاعات موجود در بانک ژن انجام شده و با استفاده از نرم‌افزار MAFFT هم‌ردیف‌سازی توالی‌ها صورت گرفت. در مرحله بعد با استفاده از نرم‌افزار Mesquite v.3.10 توالی‌ها ویرایش شده و در نهایت تصویرسازی داده‌ها با دو نرم‌افزار "NCBI multiple sequence alignment viewer" و "Weblogo" انجام شد.

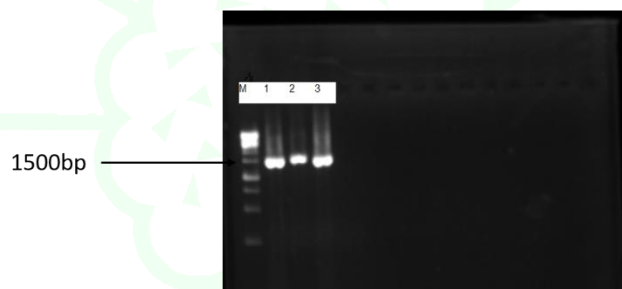
## نتایج و بحث

قارچ‌های میکوریز همزیست ریشه درختان هسته‌دار قبلاً توسط محققان گزارش شده و این قارچ‌ها می‌توانند رابطه همزیستی خوبی با این گروه از درختان میوه برقرار کنند (Calvet *et al.*, 2004, Summuna *et al.*, 2019). مثال‌هایی از گونه‌های گزارش شده میکوریز از درختان میوه هسته‌دار، گونه‌های *Dentiscutata Glomus xanthium*, *Scutellospora tricalypta*, *S. armeniaca* می‌باشند (Summuna *et al.*, 2019). در پژوهش حاضر، ۷ جدایه قارچ میکوریز با بررسی ویژگی‌های مورفولوژیکی و با استفاده از تجزیه و تحلیل توالی‌های حاصل از تکثیر بخشی از ناحیه زیر واحد کوچک DNA ریبوزومی شناسایی شدند (جدول شماره یک). جنس *Prunus* sp به نسبت بسیار بالایی با گونه *Rhizophagus intraradices* قابلیت همزیستی دارد (Calvet *et al.*, 2004) که این گونه در بین گونه‌های شناسایی شده در این پژوهش نیز به چشم می‌خورد. این قارچ‌ها می‌توانند موجب رشد بهتر درختان هسته‌دار در خاک‌های سنگین و شور شوند (Jeffries *et al.*, 1988). مقاومت در برابر نماتدهای ریشه نیز در درختان میوه‌ای که با قارچ‌های میکوریز تلقیح شده بودند، در چندین مورد گزارش شده است (Vasilikiotis *et al.*, 2020). این یافته‌ها با یافته‌های این پژوهش که همزیستی موفق قارچ‌های میکوریز را نشان می‌دهد، مطابقت دارد. گونه‌های میکوریز شناسایی شده از درختان میوه هسته دار مناطق نمونه‌برداری شده در جدول زیر آورده شده‌اند.

جدول شماره ۱- گونه‌های میکوریز شناسایی شده درختان هسته دار از مناطق مختلف نمونه برداری شده شهرستان رفسنجان.

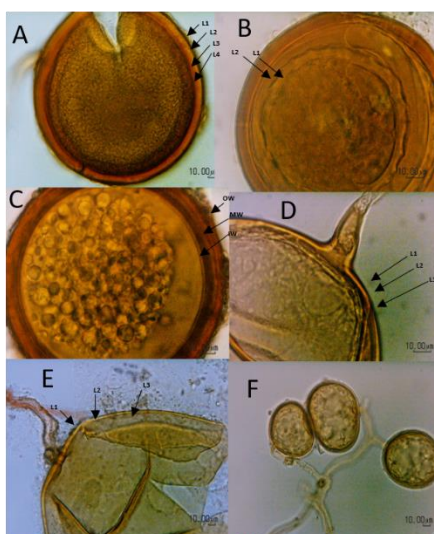
شماره	منطقه نمونه برداری شده	گونه گیاهی	گونه میکوریزی شناسایی شده
۱	راویز	<i>Prunus cerasus</i>	<i>Acaulospora punctata</i>
۲	راویز	<i>Prunus cerasus</i>	<i>Funneliformis caledonium</i>
۳	راویز	<i>Prunus avium</i>	<i>Funneliformis mosseae</i>
۴	سرچشمه	<i>Prunus armeniaca</i>	<i>Funneliformis caledonium</i>
۵	سرچشمه	<i>Prunus cerasus</i>	<i>Funneliformis caledonium</i>
۶	داوران	<i>Prunus armeniaca</i>	<i>Funneliformis coronatum</i>
۷	داوران	<i>Prunus avium</i>	<i>Rhizophagus intraradices</i>

مشخصات ریخت‌شناسی گونه جدید شناسایی شده میکوریز به این شرح بود: *Acaulospora punctata*: اسپوره‌های این گونه قهوه ای روشن تا کرم رنگ بوده و از سه نوع لایه دیواره سلولی بیرونی، میانی و درونی تشکیل می‌شوند. وجه مشخصه این گونه سطح حفره مانند اسپور است (Oehl *et al.*, 2011). این گونه تا کنون از ایران گزارش نشده است. سایر گونه‌های شناسایی شده با شرح ریخت شناسی منابع هم‌خوانی داشته و تصاویر مربوط به آن‌ها در شکل شماره ۲ آورده شده است.



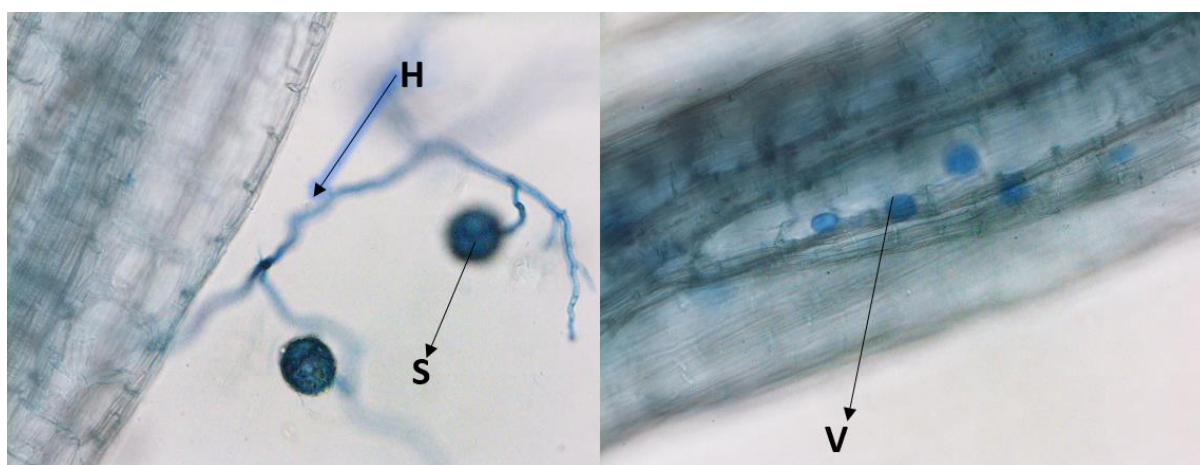
شکل شماره ۱- تکثیر ناحیه DNA ریبوزومی قارچ میکوریز آریسکولار.

(راهک‌های ۱ تا ۳ نماینده اسپوری از گروه‌های Thermo Fisher Scientific (ساخت شرکت DNA جفت بازی 1000، نشانگر وزنی M راهک مختلف قارچ میکوریز آریسکولار به ترتیب جدا شده از میزبان‌های آلبالو، بادام و گیلاس.



۲- اسپوره‌های قارچ‌های میکوریز شناسایی شده. شکل شماره

A- گونه *Funneliformis caledonium*، B- گونه *Funneliformis coronatum*، C- گونه *Acaulospora punctata*، D- گونه *Funneliformis mosseae*، E و F- گونه *Rhizophagus intraradices*، L1 تا L4: لایه‌های دیواره اسپور، L1: لایه اول، L2: لایه دوم، L3: لایه سوم، L4: لایه چهارم، OW: دیواره خارجی، MW: دیواره میانی، IW: دیواره داخلی.



۳- اندام‌های میکوریزی گونه *Rhizophagus intraradices* شکل شماره ۳- اسپور، S و زیکول، V: در ریشه رنگ شده گیاه گیلاس، *Rhizophagus intraradices* شکل شماره ۳- اندام‌های میکوریزی گونه : هیف. H.

## منابع

- یزدان پناه، م.، صداقتی، ا.، خدایگان، پ.، علایی، ح. و نادى، م. ۱۳۹۵. شناسایی مورفولوژیکی و مولکولی قارچ‌های میکوریز آربوسکولار همزیست با ریشه پسته در استان کرمان. مجله علوم و فناوری پسته. ۱۱: ۴-۲۹.
- Calvet, C., Estaún, V., Camprub, A., Hernández-Dorrego, A., Pinochet, J. and Moreno M.a.A. 2004. Aptitude for mycorrhizal root colonization in Prunus rootstocks. *Journal of Scientia Horticulturae*, 100: 39-49.
- Gerdemann, J. and Nicolson, T.H. 1963. Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Journal of Transactions of the British mycological Society*, 46: 235-244.
- Hempel, S., Renker, C. and Buscot, F. 2007. Differences in the species composition of arbuscular mycorrhizal fungi in spore, root and soil communities in a grassland ecosystem. *Journal of Environmental Microbiology*, 9: 1930-1938.
- Jeffries, P., Spyropoulos, T. and Vardavarkis, E. 1988. Vesicular-arbuscular mycorrhizal status of various crops in different agricultural soils of northern Greece. *Journal of Biology and Fertility of Soils*, 5: 333-337.
- Krüger, M., Stockinger, H., Krüger, C. and Schüßler, A. 2009. DNA- based species level detection of Glomeromycota: one PCR primer set for all arbuscular mycorrhizal fungi. *Journal of New phytologist*, 183: 212-223.
- Oehl, F., Silva, G., Palenzuela, J., Sánchez-Castro, I., Castillo, C. and Sieverding, E. 2011. *Acaulospora punctata*, a new fungal species in the Glomeromycetes from mountainous altitudes of the Swiss Alps and Chilean Andes. *Journal of Nova Hedwig*, 93: 353-362.
- Phillips, J.M. and Hayman, D. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Journal of Transactions of the British mycological Society*, 55: 158-161.
- Senés-Guerrero, C. and Schüßler, A. 2016. DNA-based characterization and identification of arbuscular mycorrhizal fungi species. *Journal of Microbial Environmental Genomics (MEG)*, 5: 101-123.
- Summuna, B., Sheikh, P., Gupta, S., Dar, W.A. and Dar, G. 2019. Diversity and distribution of arbuscular mycorrhizal fungi in pome and stone Fruit orchards of North Western Himalayan State of Jammu & Kashmir. *Journal of Indian Phytopathology*, 72: 343-350.
- Vasilikiotis, C., Li, M., Schmidt, J., Azimi, A., Garcia, J., Volder, A., Lampinen, B. and Gaudin, A. 2020. Orchard management practices affect arbuscular mycorrhizal fungal root colonisation of almond. *Journal of Biological Agriculture & Horticulture*, 36: 230-248.

## Morphological and molecular identification of several species of mycorrhizal fungi from rhizosphere of stone fruit trees in mountainous areas of Rafsanjan

Laleh Ilkhan <sup>1\*</sup>, Ebrahim Sedaghati <sup>1</sup>, Marieh Nadi <sup>2</sup>, Hamid Rahimzadeh Behzadi <sup>1</sup> and Yousef Dadizadeh <sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Vali-e-Asr University, Rafsanjan

<sup>2</sup>Department of Technology and Production Management, Pistachio Research Institute, Institute of Horticultural Sciences, Agricultural Research, Education and Extension Organization

<sup>3</sup>Jask Natural Resources Management Department

\*Corresponding Author: laleilkhan@gmail.com

### Abstract

In order to identify mycorrhizal species, the rhizosphere area of stone fruit trees in mountainous areas were sampled from a depth of 10 to 50 cm. Areas and tree species sampled were as follows: Davaran, altitude: 1887 MSL (metres above mean sea level): apricots, cherries. Raviz altitude :2118 MSL: cherries, sour cherries, Sarcheshme, altitude 2627 MSL: apricots and cherries. Mycorrhizal spores were isolated from the soil using wet sieving method and grouped based on morphological traits (color, shape, cell wall layers and spore size). Total DNA was extracted from single spores and part of rDNA was amplified by nested PCR using SSUmaf and LSumAr primers in the first step, SSUmCf and LSumBr in the second step. According to morphological and molecular studies, *Rhizophagus intraradices*, *Funneliformis mosseae* were isolated from cherries, *Acaulospora punctata*, *Funneliformis caledonium* from cherries and *Funneliformis mosseae*, *Funneliformis coronatum* and *Funneliformis caledonium* from apricots. *Acaulospora punctata* is new to the flora of Iran.

**Keywords:** Mycorrhizae, Stone fruits, Morphological and Molecular identification, Mountainous areas