

## Identification of Arbuscular Mycorrhizal Fungi Associated with Different Plants in Rafsanjan Based on Morphological Characteristics and $\beta$ -tubulin Gene Sequence

**Parisa Aminiannasab**

Plant Protection Department, Agriculture Faculty, Vali-e-Asr University, Rafsanjan, Iran, parisaam59@gmail.com

**Ebrahim Sedaghati\***

Plant Protection Department, Agriculture Faculty, Vali-e-Asr University, Rafsanjan, Iran, sedaghati@vru.ac.ir

**Samin Hosseini**

Plant Protection Department, Agriculture Faculty, Vali-e-Asr University, Rafsanjan, Iran, s.hosseini@vru.ac.ir

**Roohollah Saberi Riseh**

Plant Protection Department, Agriculture Faculty, Vali-e-Asr University, Rafsanjan, Iran, r.saberi@vru.ac.ir

### Abstract

**Introduction:** Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF), as the most abundant mutual symbiotic association between fungi and plants in the soil, are of great ecological and economic importance. The present study aimed to identify AMF species associated with different plant roots based on morphological and molecular characteristics of  $\beta$ -tubulin gene sequences of collected samples in Raviz and Daveran regions of Rafsanjan city.

**Materials and methods:** Samples were collected from the rhizosphere of different plants and AMF spores were isolated from the soil samples using the wet sieve method. The identification was performed based on morphological characteristics of the spores such as the color, shape, surface ornamentation, size, wall structure as well as characterization of the spores in water. The DNA of the fungi was extracted from single spores and partial sequences of  $\beta$ -tubulin gene were amplified by three nested PCR using appropriate primers. The PCR products of the selected samples were sent for Sanger sequencing. The phylogenetic relationship of the selected sequences with other available isolates in GenBank was analyzed using the Maximum likelihood method.

**Results:** Based on morphological characteristics and phylogenetic analysis of the partial sequence of  $\beta$ -tubulin gene, the following species were detected: *Funneliformis mosseae*, *Funneliformis coronatum*, *Gigaspora gigantean*, *Scutellospora calospora*, and *Septoglomus constrictum*. *F. mosseae* followed by *F. coronatum* were recognized as the dominant species in the present study.

**Discussion and conclusion:** The partial sequence of  $\beta$ -tubulin gene was well separated from the studied orders, families, and genera of arbuscular mycorrhiza fungi. All the identified species in this study were placed in the expected taxonomic level. The results of the molecular analysis confirmed the classification of species based on morphological characterization.

**Key words:** Symbiosis, Arbuscular Mycorrhizal Fungi, Phylogeny, Alignment,  $\beta$ -tubulin

---

\* Corresponding author

**Received:** July 22, 2020 / **Accepted:** October 10, 2020

فصلنامه علمی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها (نوع مقاله پژوهشی)

سال دهم، شماره ۳۸، تابستان ۱۴۰۰، صفحه ۲۷ - ۴۰

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۵/۰۱ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۷/۱۹

doi: [10.22108/BJM.2020.123989.1311](https://doi.org/10.22108/BJM.2020.123989.1311)

## شناسایی قارچ‌های میکوریز آربوسکولار همزیست با برخی گیاهان در شهرستان رفسنجان بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی و توالی ناحیه بتاتوبولین

پریسا امینیان‌نسب: دانشجوی دکتری گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولیعصر (عج)، رفسنجان، ایران، parisaaam59@gmail.com  
ابراهیم صدیقی\*: دانشیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولیعصر (عج)، رفسنجان، ایران، sedaghati@vru.ac.ir  
ثمین حسینی: استادیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولیعصر (عج)، رفسنجان، ایران، s.hosseini@vru.ac.ir  
روح‌الله صابری ریشه: دانشیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولیعصر (عج)، رفسنجان، ایران، r.saberi@vru.ac.ir

### چکیده

**مقدمه:** قارچ‌های میکوریز آربوسکولار (AMF) فراوان‌ترین عوامل ایجادکننده همزیستی بین قارچ و گیاه در خاک به شمار می‌آیند و از این رو، اهمیت اکولوژیکی و اقتصادی فراوانی دارند. مطالعه حاضر با هدف شناسایی گونه‌های AMF همزیست با ریشه گیاهان مختلف بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی و مولکولی ژن بتاتوبولین در دو منطقه راویز و داوران شهرستان رفسنجان انجام شد.

**مواد و روش‌ها:** نمونه‌برداری از منطقه ریزوسفر گیاهان مختلف انجام شد. اسپورهای AMF از خاک نمونه‌ها با استفاده از روش الک مرطوب جداسازی شدند. گروه‌بندی بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی مانند رنگ اسپور، شکل، تریئات سطح، اندازه و ساختار دیواره آنها و ویژگی‌های اسپورها در آب انجام شد. استخراج DNA از تک اسپور انجام شد و بخشی از ژن بتاتوبولین به روش PCR آشیانه‌ای سه مرحله‌ای با آغازگرهای مناسب تکثیر شد. محصول PCR نمونه‌های انتخابی به روش سنگر توالی‌یابی شد. رابطه فیلوژنتیکی توالی‌های انتخابی پس از اصلاح و بازیابی با استفاده از روش حداکثر احتمال با سایر جدایه‌های انتخابی از بانک ژن ارزیابی شد.

**نتایج:** بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی و فیلوژنی مبتنی بر ژن بتاتوبولین، گونه‌های *Funneliformis mosseae*، *Septoglomus constrictum* و *Scutellospora calospora*، *Gigaspora gigantea*، *Funneliformis coronatum* شناسایی شدند. گونه *F. mosseae* و پس از آن، گونه *F. coronatum* گونه‌های غالب در مناطق بررسی شده بودند.

**بحث و نتیجه‌گیری:** ژن بتاتوبولین، راسته‌ها، خانواده‌ها و جنس‌های میکوریز آربوسکولار مطالعه‌شده در پژوهش حاضر را به خوبی از یکدیگر تفکیک کرد و تمام گونه‌های شناسایی‌شده در جایگاه تاکسونومیک اختصاصی خود قرار گرفتند. نتایج تجزیه و تحلیل مولکولی تأییدکننده نتایج شناسایی بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی بودند.

**واژه‌های کلیدی:** همزیستی، قارچ میکوریز آربوسکولار، فیلوژنی، هم‌ردیف‌سازی، بتاتوبولین

\* نویسنده مسئول مکاتبات

Copyright©2021, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

## مقدمه

قارچ‌های میکوریز آربوسکولار (AMF) در شاخه گلمرومیکوتا قرار دارند و فراوان‌ترین عوامل ایجادکننده همزیستی در خاک هستند؛ از این رو، اهمیت اکولوژیکی و اقتصادی فراوانی دارند (۱). این دسته از قارچ‌ها به‌طور همزیست اجباری با ریشه گیاهان ارتباط برقرار می‌کنند و بخشی از مواد غذایی لازم برای آنها را از طریق هیف‌های خود فراهم می‌کنند؛ از سوی دیگر، این قارچ‌ها برای رشد و تکمیل چرخه زندگی خود به ریشه و سلول‌های گیاه میزبان وابسته‌اند (۲). پژوهش‌ها نشان می‌دهند حدود ۸۰ درصد گیاهان زمینی و آوندی با این دسته از قارچ‌ها ارتباط دارند (۱). کلونیزاسیون ریشه با قارچ‌های میکوریز آربوسکولار سبب افزایش مقاومت گیاه در برابر عوامل بیماری‌زا، تنش خشکی و شوری، افزایش تثبیت نیتروژن زیستی، افزایش فتوسنتز در گیاه میزبان و مهم‌تر از همه، کاهش غلظت عناصر فلزی سنگین مانند کادمیوم و آرسنیک در بافت گیاه می‌شود (۳).

در سال ۱۸۴۵، برادران تلاسنه<sup>۱</sup> نخستین شرح را برای این دسته از قارچ‌ها ارائه کردند و ساختار اسپورهای جنس *Glomus* و دو گونه آن را تنها بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی شناسایی و معرفی کردند (۴). ویژگی‌های ریخت‌شناسی تا مدت‌ها برای شناسایی این دسته از قارچ‌ها استفاده می‌شدند؛ اما با توجه به ساختار بسیار ساده اسپور و وجود ویژگی‌های محدود برای تفکیک این دسته از قارچ‌ها، شناسایی بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی همواره با خطاها و مشکلاتی همراه بوده است (۵). در سال‌های اخیر، روش‌های مولکولی به‌طور گسترده برای مطالعه روابط فیلوژنتیکی و تنوع ژنتیکی قارچ‌های میکوریز آربوسکولار و

به‌شکل روش‌های مکمل برای شناسایی بر پایه ویژگی‌های ریخت‌شناسی استفاده می‌شوند. به‌منظور بررسی مولکولی، استفاده از نشانگرهای مناسب و مطمئن نقش مهمی را در شناسایی دقیق گونه ایفا می‌کند؛ به‌طوری‌که نشانگرها باید حفاظت زیادی بین تاکسون‌های بررسی شده داشته باشند و بتوانند آنها را به‌طور دقیق تفکیک کنند (۶).

مدتی طولانی، تنها نشانگر موجود برای شناسایی و بازسازی روابط فیلوژنتیکی قارچ‌های میکوریز آربوسکولار، ژن‌های DNA ریپوزومی هسته بود؛ DNA ریپوزومی هسته شامل نواحی بسیار حفاظت‌شده و درعین‌حال، متغیر است و بنابراین برای شناسایی در سطح گونه تا شاخه در فیلوژنی مناسب است (۷). مطالعه‌های فیلوژنتیکی تمام طول زیرواحد کوچک DNA ریپوزومی به‌طبقه‌بندی جدید قارچ‌های میکوریز آربوسکولار منجر شدند و این قارچ‌ها به‌شکل گروه مونوفیلیک از قارچ‌های *Zygomycota* جدا و در شاخه *Glomeromycota* قرار گرفتند (۸)؛ با گذشت زمان و استفاده از توالی بخش‌های بیشتری از DNA ریپوزومی به‌ویژه زیرواحد کوچک DNA ریپوزومی (SSU) و نواحی بین‌ژنی (ITS) و به میزان کمتر، زیرواحد بزرگ DNA ریپوزومی (LSU) و استفاده از ویژگی‌های ریخت‌شناسی در قارچ‌های میکوریز آربوسکولار، تغییرات زیادی در زمینه تاکسونومی آنها ایجاد شده است؛ اما مشکل این ژن‌ها در قارچ‌های میکوریز آربوسکولار این است که نواحی متغیری که برای شناسایی گونه بسیار مفید هستند، تغییراتی را درون یک موجود نشان می‌دهند (۷ و ۹). در یک تک‌اسپور از قارچ‌های میکوریز آربوسکولار ممکن است توالی‌های متعددی از DNA ریپوزومی هسته با تفاوت‌های اندک

سایر مناطق شهرستان دارند، بررسی شدند و به‌منظور شناسایی قارچ‌ها از روش‌های ریخت‌شناسی و مولکولی مبتنی بر توالی ناحیه بتاتوبولین استفاده شد.

### مواد و روش‌ها

**نمونه‌برداری:** نمونه‌برداری در تابستان سال‌های ۱۳۹۴ و ۱۳۹۵ در دو منطقه داوران و راوز شهرستان رفسنجان انجام شد. نمونه‌برداری به‌طور تصادفی و از نقاط مختلف باغ‌ها، مزارع و مراتع دو منطقه یادشده و از عمق ۵ تا ۳۰ سانتی‌متری ناحیه ریزوسفر گیاهان انجام شد. به‌منظور تهیه هر نمونه مرکب، ۵ نمونه خاک از نقاط مختلف مزرعه یا باغ جمع‌آوری و باهم مخلوط شدند و در نهایت، ۹ نمونه مرکب خاک (یک کیلوگرمی) همراه با ریشه‌های نازک تهیه و پس از ثبت مشخصات به آزمایشگاه منتقل شدند. نمونه‌ها به‌مدت دو هفته در برابر جریان هوا خشک و پس از این مدت تا زمان جداسازی اسپور، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (۲۲) (جدول ۱).

**استقرار کشت تله گلدانی:** گیاه ذرت (*Zea mays*) به‌عنوان گیاه تله برای اسپورزایی و افزایش جمعیت اسپورهای سالم استفاده شد. در هر گلدان، ۱۰ عدد بذر در محیط پایه خاک، ماسه و پرلیت با نسبت ۱:۱:۱ و ۲۰۰ گرم از هر نمونه خاک جمع‌آوری شده کشت شد. گلدان‌ها به‌مدت پنج ماه در گلخانه با دمای ۲۵ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و پس از پنج ماه، تنش خشکی با قطع آبیاری گلدان‌ها اعمال شد تا گونه‌های میکوریز وارد دوره اسپورزایی شوند. زمانی که گلدان‌ها کاملاً خشک شدند، اندام‌های هوایی گیاهان از سطح خاک بریده شدند و خاک گلدان‌ها همراه با ریشه‌های گیاهان جمع‌آوری و در دمای کم نگهداری شد (۲۳).

وجود داشته باشند که شناسایی و تشخیص گونه‌های نزدیک به هم را دشوار می‌کنند (۱۰). به‌منظور حل مشکل یادشده، تعیین توالی هم‌زمان چندین بخش از DNA ریبوزومی و در کنار آنها سایر نواحی ژنی مدنظر قرار گرفته است؛ به این منظور، ژن‌های پروتئینی متعددی از قارچ‌های میکوریز آربوسکولار مانند فاکتورهای  $\alpha$ -1 elongation، H ATPase، BIP، اکتین و بتاتوبولین بررسی شده‌اند (۱۰). در سال ۲۰۰۴، کردادی<sup>۲</sup> و همکاران بر اساس فیلوژنی مبتنی بر ژن بتاتوبولین، رابطه خواهری دو خانواده Acaulosporaceae و Gigasporaceae را اثبات کردند (۱۱). در سال ۲۰۰۹، امسیسکا<sup>۳</sup> و مورتون<sup>۴</sup> کارایی ژن بتاتوبولین در حل روابط تکاملی شاخه گلوومرومایکوتا را مطالعه کردند. نتایج این پژوهش نشان دادند ژن بتاتوبولین به اندازه ژن‌های 18S rDNA و 28S rDNA توانایی حل روابط فیلوژنتیکی قارچ‌های میکوریز را در سطح خانواده و گونه دارد.

در سال‌های اخیر، پژوهش‌های متعددی بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی (۱۲-۱۶) و مولکولی (۱۷-۲۱) برای جداسازی و شناسایی قارچ‌های میکوریز آربوسکولار بومی خاک‌های ایران در ریزوسفر گیاهان مختلف انجام شده‌اند. در تمام پژوهش‌های مولکولی یادشده از نواحی مختلف DNA ریبوزومی برای تفکیک این قارچ‌ها استفاده شده است. بر اساس دانش ما، در هیچ‌کدام از پژوهش‌های مولکولی انجام‌شده در ایران، ژن بتاتوبولین برای رده‌بندی و بررسی فیلوژنی قارچ‌های میکوریز آربوسکولار استفاده نشده است.

در پژوهش حاضر، گونه‌های AMF همزیست با ریشه گیاهان مختلف در دو منطقه راوز و داوران شهرستان رفسنجان که تنوع گیاهی بیشتری نسبت به

جدول ۱- ویژگی‌های جغرافیایی محل جمع‌آوری گیاهان مطالعه‌شده

شماره	گیاه میزبان	منطقه جمع‌آوری	ارتفاع	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی
۱	پیاز	راویز	۷۸۶۹	۳۴۵۶۰۱	۳۳۶۰۶۳۴
۲	آفتابگردان	راویز	۷۶۵۰	۳۴۷۳۸۸	۳۳۶۰۷۷۵
۳	مرغ	راویز	۷۵۷۰	۳۴۷۵۳۶	۳۳۶۰۱۸۵
۴	بادام	راویز	۷۷۸۶	۳۴۶۲۶۴	۳۳۶۰۷۱۹
۵	ذرت	داوران	۶۲۲۲	۴۲۲۴۷۱	۳۳۸۳۰۲۵
۶	یونجه	داوران	۶۰۴۹	۴۱۱۸۵	۳۳۸۲۷۳۴
۷	هلو	داوران	۶۱۵۱	۴۲۲۰۵۷	۳۳۸۲۷۶۶
۸	زردآلو	داوران	۶۲۱۳	۴۲۲۴۵۲	۳۳۸۲۹۴۳
۹	تاغ	داوران	۶۰۶۹	۴۲۰۸۳۴	۳۳۸۳۳۲۹

http://www.zor.zut.edu.pl و مقاله‌های کلیدی (۲۹) انجام شد.

**استخراج DNA اسپور قارچ‌ها و تکثیر DNA:** پیش از استخراج DNA، هر اسپور به مدت ۳۰ ثانیه در معرض امواج مافوق صوت با شدت ۳۷ هرتز قرار گرفت؛ سپس اسپورهای تیمار شده سه مرتبه با آب دو بار تقطیر استریل شسته شدند. یک اسپور از هر گروه اسپوری در ۲۰ میکرولیتر محلول شامل ۱۰ میکرولیتر بافر 5X GoTaq PCR و ۱۰ میکرولیتر آب مقطر استریل خرد شد و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۶۰ تا ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد؛ پس از ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ با سرعت ۱۳۰۰۰ دور بر دقیقه، فاز رویی به عنوان DNA الگو در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز استفاده شد (۳۰). به منظور تکثیر بخشی از ژن  $\beta$ -tubulin از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز آشیانه‌ای سه مرحله‌ای استفاده شد؛ به این ترتیب که مرحله اول با جفت آغازگر C2F و FBtub4R، مرحله دوم با جفت آغازگر GiH4R و IB36F و سومین مرحله با جفت آغازگر Fsp و GiH3R انجام شد. آغازگرهای یاد شده می‌توانند قطعه‌ای با اندازه ۸۶۱ تا ۱۰۱۴ جفت باز را تکثیر کنند

### جداسازی و بررسی ریخت‌شناسی قارچ‌های

**جداسازی شده:** پس از نمونه برداری و به منظور اثبات رابطه همزیستی قارچ‌های میکوریز آربوسکولار با ریشه گیاهان مختلف، رنگ آمیزی ریشه‌ها به روش فیلپس<sup>۵</sup> و هیمن<sup>۶</sup> (۲۴) انجام شد؛ سپس اسپورهای AMF بر اساس روش سری الک مرطوب از خاک‌های نمونه برداری شده جداسازی شدند (۲۵). اسپورهای جدا شده بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی مانند اندازه، رنگ، شکل، تزئینات سطح و هیف اتصال (۲۶ و ۲۷) زیر استریومیکروسکوپ (Nikon SMZ 1000) گروه‌بندی شدند. مخلوط حجمی پلی‌وینیل لاکتو گلیسرول<sup>۷</sup> و معرف ملزر با نسبت ۱:۱ برای بررسی ویژگی‌های ریخت‌شناسی و مورفومتریک اسپورها استفاده شد (۲۸). ریخت‌شناسی گونه‌های AMF با میکروسکوپ نوری کالیبره شده (Nikon-ECLIPSE-80i) و ویژگی‌هایی مانند شکل، رنگ، اندازه و ساختار دیواره اسپور، شیوه اتصال هیف به اسپور و باز یا بسته بودن روزنه هیف در محل اتصال به اسپور و شیوه انسداد در صورت بسته بودن بررسی شدند. شناسایی اسپورها با مراجعه به تارنماهای اینترنتی معتبر <http://www.invam.wvu.edu>

بررسی شده با سایر توالی‌های موجود در بانک ژن، ابتدا توالی‌های بتاتوبولینی که شباهت زیادی با توالی‌های پژوهش حاضر داشتند با استفاده از برنامه BLASTN از بانک ژن برداشت شدند. هم‌ردیف‌سازی چندگانه بر اساس توالی نوکلئوتیدی ژن‌های مختلف بررسی شده با نرم‌افزار MAFFT v.7 با تنظیمات پیش‌فرض انجام شد (۳۲). فایل‌های هم‌ردیف‌سازی شده به‌طور دستی با برنامه Mesquite v.3.04 بازبینی شدند (۳۳). به‌منظور رسم درخت فیلوژنی از روش حداکثر احتمال<sup>۱۱</sup> با برنامه IQtree v.1.6 استفاده شد (۳۴)؛ این برنامه به‌طور خودکار بهترین و مناسب‌ترین مدل را برای رسم درخت فیلوژنی انتخاب می‌کند. به‌منظور بررسی اعتبار درخت‌های فیلوژنتیکی رسم‌شده از آزمون اعتبارسنجی UFBoot<sup>۱۱</sup> با ۱۰۰۰ تکرار استفاده شد و درنهایت، درخت رسم‌شده با برنامه Figtree به تصویر کشیده شد.

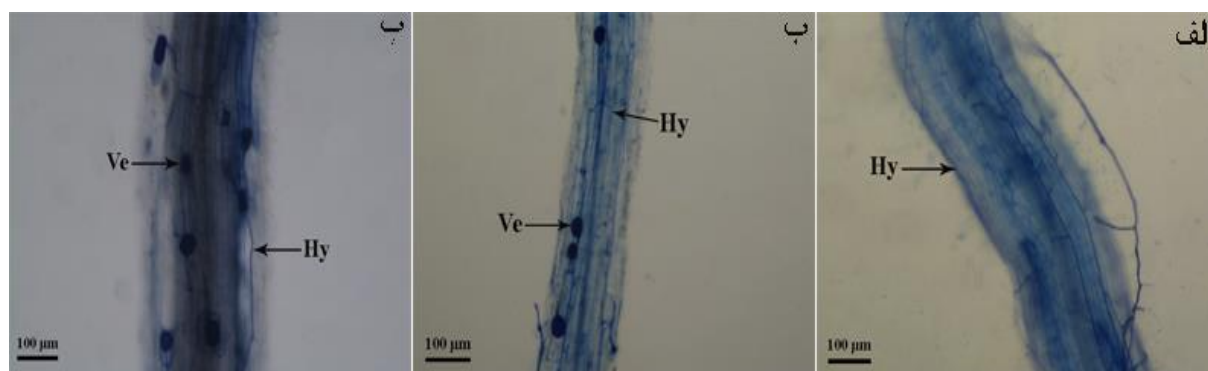
### نتایج

در پژوهش حاضر، نمونه‌برداری به‌طور تصادفی از دو منطقه داوران و راویز شهرستان رفسنجان و از ریزوسفر ۹ گیاه باغی، زراعی و مرتعی که فراوانی بیشتری داشتند، انجام شد (جدول ۲). گیاه ذرت (*Zea mays*) به‌عنوان گیاه تله برای اسپورزایی و افزایش جمعیت اسپورهای سالم استفاده شد و پس از پنج ماه، ریشه‌ها رنگ آمیزی و وجود اندام‌های قارچی میکوریز آربوسکولار درون ریشه‌ها بررسی شد (شکل ۱). اسپورهای سالم و زنده در هر نمونه خاک بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی گروه‌بندی و شناسایی شدند و مشخص شد به پنج گونه مختلف تعلق دارند و همچنین گونه غالب در هر نمونه خاک مشخص شد (شکل ۲ و جدول ۳).

(۳۱). واکنش تکثیری در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۵/۵ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه، ۱۲/۵ میکرولیتر بافر Amplicon Taq DNA polymerase 2x، ۱ میکرولیتر آغازگر رفت ۱۰ میکرومولار، ۱ میکرولیتر آغازگر برگشت ۱۰ میکرومولار و ۵ میکرولیتر DNA استخراج شده با شرایط زیر انجام شد: مرحله اول به مدت ۲ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌منظور واسرشت کردن اولیه DNA و سپس ۳۰ چرخه شامل ۳۰ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه در ۵۲ درجه سانتی‌گراد و ۱ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و درنهایت، ۷ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای گسترش نهایی. در مرحله دوم، ۵ میکرولیتر از محصول PCR اول و در مرحله سوم، ۵ میکرولیتر از محصول PCR دوم برای DNA الگو استفاده شد. حجم واکنش تکثیری، تعداد چرخه‌ها و مراحل PCR دوم و سوم مشابه PCR اول بود. پس از انجام PCR و به‌منظور بررسی درستی تکثیر DNA، ۵ میکرولیتر از محصول روی ژل آگارز ۱/۵ درصد با بافر TBE<sup>۱۲</sup> الکتروفورز شد.

**تعیین توالی نواحی تکثیرشده و بررسی فیلوژنتیکی بر اساس توالی ژن بتاتوبولین:** قطعه‌های تکثیرشده از ۹ نمونه قارچ انتخابی برای توالی‌یابی به شرکت XCELRLIS کشور هند ارسال شدند و ژن بتاتوبولین به‌طور دوطرفه و به روش سنگر<sup>۹</sup> توالی‌یابی شد. فایل توالی‌های رفت و برگشت ارسالی از شکل ABI به شکل FASTQ تبدیل و سپس با برنامه Seqtk، نواحی ابتدایی و انتهایی که کیفیت کمی داشتند با حالت پیش‌فرض تصحیح و با نرم‌افزار MAFFT v.7 با تنظیمات پیش‌فرض (۳۲) هم‌ردیف‌سازی شدند و توالی توافقی<sup>۱۱</sup> به‌عنوان توالی نهایی استفاده شد.

به‌منظور بررسی روابط فیلوژنتیکی توالی قارچ‌های



شکل ۱- اندام‌های قارچی میکوریز آربوسکولار درون ریشه‌های رنگ آمیزی شده گیاه ذرت (Hy: هیف، Ve: وزیکول)

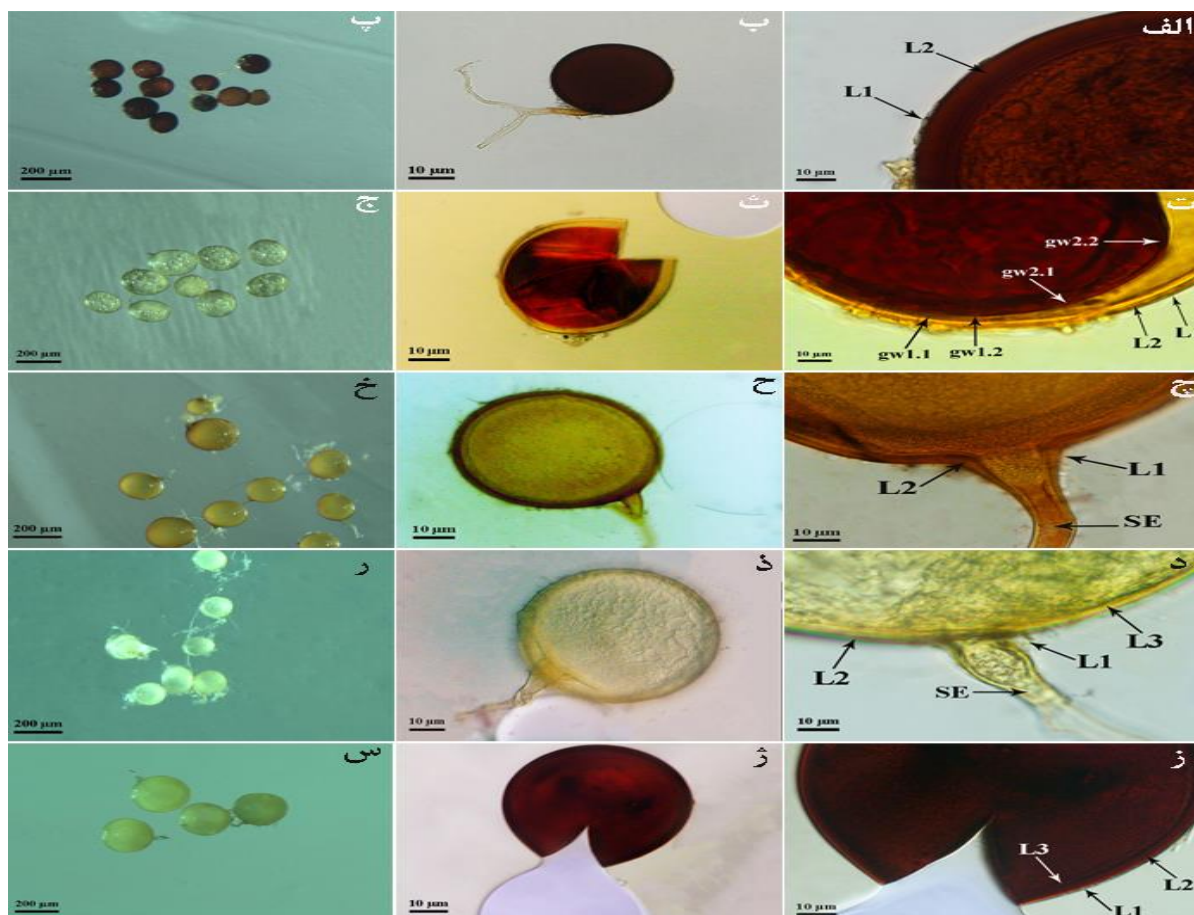
جدول ۲- گونه‌های غالب قارچ‌های میکوریز آربوسکولار شناسایی شده همزیست با گیاهان بررسی شده

گیاه میزبان	منطقه جمع‌آوری	درصد فراوانی اسپور	گونه غالب شناسایی شده	نام جدایه	شماره توالی در بانک ژن
پیاز	راویز	۷۳/۸۸	<i>Funneliformis coronatum</i>	VRU1	MT892857
آفتابگردان	راویز	۹۰/۶۲	<i>Funneliformis mosseae</i>	VRU9	MT892856
مرغ	راویز	۷۸/۸۲	<i>Funneliformis mosseae</i>	VRU10	MT892854
بادام	راویز	۲۷/۷۷	<i>Septoglo mus constrictum</i>	VRU13	MT892860
ذرت	داوران	۳۶/۹۱	<i>Funneliformis coronatum</i>	VRU17	MT892859
یونجه	داوران	۴۳/۸۴	<i>Funneliformis coronatum</i>	VRU2	MT892858
هلو	داوران	۲۰/۵۷	<i>Gigaspora gigantea</i>	VRU15	MT892853
زردآلو	داوران	۲۲/۰۳	<i>Scutellospora calospora</i>	VRU21	MT892852
تاغ	داوران	۴۳/۶۹	<i>Funneliformis mosseae</i>	VRU22	MT892855

این پژوهش بودند، با ۴۶ جدایه انتخابی از بانک ژن بررسی شدند. بر اساس نتایج، ماتریکس هم‌ردیف‌سازی شده ۵۶ توالی و ۱۲۳۷ کاراکتر داشت؛ بین کاراکترهای بررسی شده، ۵۵۴ کاراکتر parsimony-informative، ۱۴۸ کاراکتر parsimony-non-informative و ۵۳۵ کاراکتر ثابت بودند. بهترین مدل انتخاب شده با برنامه IQtree بر اساس BIC (Bayesian Information Criterion)، مدل TPM2+F+I+G4 بود. یک توالی بتاتوبولین مربوط به *Paraglo mus brasilianum* (FJ174314) به عنوان ریشه درخت انتخاب شد.

**بررسی مولکولی:** به منظور تأیید نتایج بررسی‌های ریخت‌شناسی و بررسی کارایی ژن بتاتوبولین در شناسایی این گونه‌ها، بخشی از انتهای ۳' ژن بتاتوبولین تکثیر شد؛ به دنبال تکثیر این ژن با استفاده از آغازگرهای C2F و FBtub4R در مرحله اول، آغازگرهای GiH4R و IB36F در مرحله دوم و آغازگرهای Fsp و GiH3R در مرحله سوم واکنش PCR آشیانه‌ای سه مرحله‌ای، قطعه‌ای به طول حدود ۸۶۰ تا ۱۰۰۰ جفت باز تکثیر شد (شکل ۳).

پس از توالی‌یابی و ویرایش توالی‌ها، روابط فیلوژنتیکی توالی‌های حاصل که نتیجه تکثیر بخشی از انتهای ۳' ژن بتاتوبولین از تک اسپور جدایه‌های حاضر در



شکل ۲- ویژگی‌های میکروسکوپی گونه‌های قارچ‌های میکوریز آربوسکولار شناسایی شده در ریزوسفر گیاهان مطالعه شده؛ الف، ب، پ. *Funneliformis mosseae*، د، ر. *Funneliformis coronatum*، ج، ح، خ. *Scutellospora calospora*، ت، ث، ج. *Septogloium constrictum*، ز، س. *Gigaspora gigantea*. لایه‌های دیواره اسپور: L1. لایه اول، L2. لایه دوم، L3. لایه سوم، L4. لایه چهارم، SE. دیواره عرضی

چهار جنس تعلق دارند. جدایه VRU1 جدا شده از نمونه خاک ریزوسفر گیاه پیاز در راوز، جدایه VRU2 جدا شده از نمونه خاک ریزوسفر گیاه یونجه در داوران و جدایه VRU17 جدا شده از نمونه خاک ریزوسفر گیاه ذرت در داوران به‌عنوان گونه *Funneliformis coronatum* با درجه اعتبار ۹۹ درصد همراه با توالی های مرجع در یک کلاد مجزا قرار گرفته‌اند؛ این سه توالی به ترتیب ۹۹/۰۳ درصد، ۹۹/۳۲ درصد و ۹۹/۲۸ درصد مشابه توالی نوکلئوتیدی *Funneliformis coronatum* هستند.

همان‌طور که در شکل ۴، الف و ب مشاهده می‌شود، قارچ‌ها به تفکیک جنس و گونه به خوبی از یکدیگر متمایز شده‌اند و تمام توالی‌های بررسی شده در ۹ جنس در درخت شکل ۴، الف قرار گرفته‌اند. هر کدام از جنس‌های موجود، یک گروه مونوفیلیتیک تشکیل داده است و درجه اعتبار همه گروه‌ها بین ۹۸ تا ۱۰۰ درصد است که اعتبار گروه‌های تشکیل شده را نشان می‌دهد. گونه‌های تاکسون‌های بررسی شده در شکل ۴، ب به وضوح و با درجه اعتبار زیاد از یکدیگر متمایز شده‌اند. همان‌طور که در درخت شکل ۴، ب مشخص شده است، ۹ گونه جداسازی شده در پژوهش حاضر به

جدول ۳- ویژگی‌های ریخت‌شناسی گونه‌های قارچ میکوریز آربوسکولار شناسایی شده

گونه شناسایی شده	نام جدايه، ميزبان و منطقه جمع‌آوری	ویژگی‌های ریخت‌شناسی
<i>Funneliformis coronatum</i>	پياز/راویز VRU1	اسپورها نیمه کروی تا کروی، به رنگ زرد تیره و نارنجی تیره مایل به قهوه‌ای و قطر ۱۵۰ تا ۲۳۵ میکرومتر، دیواره اسپور (SW) دولایه، لایه اول (L1) شفاف و به ضخامت ۱/۷ تا ۲/۵ میکرومتر و لایه دوم (L2) ورقه‌ای و به ضخامت ۳/۸ تا ۴/۵ میکرومتر، هیف اتصال (SH) در محل اتصال قیفی شکل و عرض آن در محل اتصال ۳۵ تا ۴۴ میکرومتر
<i>Funneliformis mosseae</i>	آفتابگردان/راویز VRU9	اسپور منفرد و یا اکثراً گروهی و در خوشه اسپور، اسپورهای بالغ زرد تا زرد لیمویی، اسپورهای جوان شفاف یا بی‌رنگ، نیمه کروی تا کروی و به قطر ۱۱۰ تا ۲۰۰ میکرومتر، دیواره اسپور (SW) سه‌لایه، لایه اول (L1) شفاف، ناپایدار و موسیلاژی و به ضخامت ۱ تا ۲ میکرومتر، لایه دوم (L2) به ضخامت ۱/۸ تا ۲ میکرومتر، لایه سوم (L3) ورقه‌ای به رنگ قهوه‌ای و به ضخامت ۲/۶ تا ۴ میکرومتر، هیف متصل به اسپور (SH) در محل اتصال قیفی شکل و به شکل راست تا خمیده به اسپور متصل می‌شود، قطر هیف در محل اتصال به اسپور ۱۸/۲ تا ۲۴/۱ میکرومتر
<i>Gigaspora gigantea</i>	هلو/داوران VRU15	اسپورها نیمه کروی تا کروی، به رنگ زرد مایل به سبز و قطر ۳۰۳ تا ۳۲۰ میکرومتر، دیواره اسپور سه‌لایه، لایه اول به رنگ قهوه‌ای تیره و ضخامت ۲/۹ تا ۳/۰۶ میکرومتر، لایه دوم ورقه‌ای، روشن‌تر و به ضخامت ۸/۲ تا ۱۰/۸ میکرومتر، لایه سوم به رنگ قهوه‌ای تیره و ضخامت ۳/۲ تا ۴/۱ میکرومتر
<i>Scutellospora calospora</i>	زردآلو/داوران VRU21	اسپورها منفرد، به رنگ زرد با ته‌رنگ مایل به سبز، نیمه کروی تا کروی و بیضوی به قطر ۲۰۸/۸ تا ۲۲۰ میکرومتر، دیواره اسپور (SW) متشکل از دو لایه، لایه اول (L1) صاف و شفاف و به ضخامت ۱ تا ۱/۲ میکرومتر، لایه دوم (L2) ورقه‌ای و به ضخامت ۱/۹ تا ۳/۱ میکرومتر، دیواره تندشی اول شامل دو لایه (GW1)، لایه اول معمولاً متصل به لایه دوم و به ضخامت ۰/۹ تا ۱/۵ و لایه دوم به ضخامت ۱ تا ۱/۲ میکرومتر، متصل به دیواره اسپور، دیواره تندشی دوم (GW2) دولایه، لایه اول روشن، انعطاف‌پذیر و ۰/۸ تا ۱/۸ میکرومتر، لایه دوم شفاف و به ضخامت ۱ تا ۲/۱ میکرومتر، غلاف جوانه‌زنی بیضوی یا نامنظم، به رنگ زرد کم‌رنگ، طول آن تقریباً ۱/۵ برابر عرض آن، این ناحیه شکننده است و به آسانی قطعه‌قطعه می‌شود.
<i>Septoglomus constrictum</i>	بادام/راویز VRU13	اسپور به رنگ قرمز مایل به قهوه‌ای تیره، نیمه کروی تا کروی و به قطر ۱۵۲ تا ۱۹۸ میکرومتر، دیواره اسپور (SW) با ضخامت متفاوت در بخش‌های مختلف و دولایه، لایه اول (L1) شفاف و ناپایدار و به ضخامت ۲ تا ۴ میکرومتر، لایه دوم (L2) ورقه‌ای، قرمز مایل به قهوه‌ای و به ضخامت ۶/۸ تا ۱۰/۶ میکرومتر، هیف متصل به اسپور (SH) زرد مایل به قهوه‌ای‌رنگ و معمولاً در محل اتصال به اسپور به حالت باریک‌شده، گاهی هیف به شکل قیفی یا استوانه‌ای به اسپور متصل، روزنه (P) نازک است و با افزایش سن ضخیم می‌شود و با یکی از لایه‌های داخلی لایه دوم بسته می‌شود.



در این پژوهش بین ۹۴ تا ۹۹ درصد با گونه‌های گروه خود شباهت نشان دادند.

### بحث و نتیجه‌گیری

جدایه‌های بررسی شده در مطالعه حاضر بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی و فیلوژنی مبتنی بر ژن بتاتوبولین تجزیه و تحلیل و بر اساس آن، پنج گونه شامل *Funneliformis mosseae*، *Funneliformis Scutellospora*، *Gigaspora gigantea*، *coronatum* و *calospora* *Septoglomus constrictum* شناسایی شدند که به چهار جنس در دو خانواده *Glomeraceae* و *Gigasporaceae* و راسته‌های *Glomerales* و *Diversisporales* تعلق دارند (شکل ۴).

اسپوره‌های گونه *F. mosseae* در درجه اول و پس از آن، گونه *F. coronatum* به‌طور فراوان و غالب در دو منطقه بررسی شده شناسایی شدند. در بررسی‌های گوناگون در زمینه گیاهان مختلف در مناطق متفاوت به‌ویژه نواحی خشک ایران، همواره گونه *F. mosseae* به‌شکل گونه غالب شناسایی و گزارش شده است (۱۷، ۱۹، ۲۰، ۲۱ و ۳۵) که این موضوع می‌تواند ناشی از سازگاری زیاد این گونه با شرایط محیطی و تنش‌های مختلف باشد. این گونه در مناطق مختلف جهان و در طیف گسترده‌ای از اکوسیستم‌های محیطی گزارش شده است که ترجیح کم‌میزبانی و فراوانی آن را نشان می‌دهد (۳۶ و ۳۷). نتایج مطالعه حاضر، اختصاصی نبودن گیاه میزبان برای *F. mosseae* را نشان دادند.

بررسی ریخت‌شناسی اسپورها نشان داد جدایه‌های مختلف *F. coronatum* و *F. mosseae* تنوع ریخت‌شناسی زیادی دارند. باتوجه‌به تنوع زیاد ویژگی‌های ریخت‌شناسی اسپوره‌های یک گونه، امکان

جدایه VRU10 جدا شده از نمونه خاک ریزوسفر علف هرز مرغ در راویز، جدایه VRU22 جدا شده از نمونه خاک ریزوسفر درختچه تاغ در داوران و جدایه VRU9 جدا شده از نمونه خاک ریزوسفر گیاه آفتابگردان در راویز با درجه اعتبار ۱۰۰ درصد همراه با توالی‌های *Funneliformis mosseae* در یک کلاد مجزا قرار گرفته‌اند؛ این سه توالی به ترتیب ۹۵/۶۲ درصد، ۹۵/۹۱ درصد و ۹۶/۴۸ درصد مشابه توالی نوکلئوتیدی *Funneliformis mosseae* هستند. نتایج جستجوی BLASTN توالی بتاتوبولین جدایه VRU13 جدا شده از نمونه خاک ریزوسفر بادام در راویز نشان داد توالی نوکلئوتیدی این جدایه دارای ۹۴/۱۴ درصد شباهت با گونه *Septoglomus constrictum* است و همراه با تنها توالی موجود از این گونه با درجه اعتبار ۱۰۰ درصد قرار می‌گیرد. نتایج جستجوی BLASTN توالی بتاتوبولین جدایه VRU15 جدا شده از نمونه خاک ریزوسفر هلو در داوران نشان داد این توالی با گونه نوکلئوتیدی است و همراه با سایر توالی‌های *G. gigantea* در کلادی با درجه اعتبار ۱۰۰ درصد قرار می‌گیرد. نتایج جستجوی BLASTN توالی بتاتوبولین جدایه VRU21 جدا شده از نمونه خاک ریزوسفر زردآلو در داوران نشان داد این توالی با گونه نوکلئوتیدی *Scutellospora calospora* دارای ۹۷/۵۷ درصد شباهت نوکلئوتیدی است و همراه با تنها توالی موجود مربوط به این گونه در یک گروه با درجه اعتبار ۹۸ درصد قرار می‌گیرد.

بر اساس پژوهش امیسسکا و مورتون (۳۱)، توالی‌های ژن بتاتوبولین در اعضای یک گونه بیش از ۹۴ درصد شباهت نشان می‌دهند. گونه‌های بررسی شده

ناحیه‌های ITS، SSU و LSU بسیار متداول است؛ اما وجود چندین DNA ریپوزومی با کمی تفاوت، حتی در تک‌اسپور این قارچ‌ها اثبات شده است؛ علاوه بر این، ناهمگنی در هسته این گروه از قارچ‌ها گزارش شده است و این ناهمگنی ممکن است با ساختار پلی‌ژنوم پیشنهاد شده برای قارچ‌های شاخه گلومرومایکوتا در ارتباط باشد (۴۰)، در نتیجه، تشخیص گونه‌ها یا جدایه‌هایی که ارتباط نزدیکی باهم دارند، دشوار است و ممکن است نواحی یاد شده امکان تمایز گونه‌های نزدیک به هم را نداشته باشند؛ به این دلیل، تعیین توالی هم‌زمان بخش‌های بیشتری از نواحی DNA ریپوزومی و همچنین سایر نواحی ژنی و همچنین تلفیق آنها با روش‌های ریخت‌شناسی سبب می‌شود نتایج دقیق‌تری حاصل شوند (۴۱). کروگر<sup>۳</sup> و همکاران با استفاده هم‌زمان از نشانگرهای ITS، SSU و LSU، امکان شناسایی قارچ‌های میکوریز آربوسکولار را تا سطح پایین‌تر از گونه فراهم کردند (۴۲). امروزه، علاوه بر DNA ریپوزومی، نشانگرهای مولکولی دیگر از جمله ژن‌های پروتئینی مثل بتاتوبولین در دسترس هستند که استفاده از آنها به حل روابط فیلوژنتیکی این قارچ‌ها کمک می‌کند. در سال ۲۰۰۴، کرادلی و همکاران بر اساس فیلوژنی مبتنی بر ژن بتاتوبولین، رابطه‌خواهری دو خانواده Acaulosporaceae و Gigasporaceae را اثبات کردند. در سال ۲۰۰۹، امسیسکا و مورتون با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز آشیانه‌ای سه مرحله‌ای، انتهای ۳ بتاتوبولین را در ۴۵ گونه از شاخه گلومرومایکوتا تکثیر کردند و استخراج DNA از تک‌اسپور قارچ‌های یاد شده انجام شد. هدف این پژوهشگران، بررسی کارایی ژن بتاتوبولین در حل روابط تکاملی شاخه گلومرومایکوتا با افزایش تاکسون‌های

شناسایی ریخت‌شناسی در همه مراحل رشد وجود نداشت و از سوی دیگر، جمعیت و تنوع اسپورهای سالم در نمونه‌های بررسی شده کم بود. به منظور حل مشکل وجود اسپورهای پارازیت و نابالغ از کشت تله استفاده شد و گونه‌های قارچی به خوبی تکثیر شدند. قارچ‌های شناسایی شده در کشت تله گلدانی و نمونه‌های مزرعه‌ای تقریباً مشابه بودند. به طور کلی، دلایل متعددی از جمله تنوع زیاد اسپورهای قارچ، توانایی برخی گونه‌های قارچی در تولید اسپورهای دوشکلی و امکان تغییرات خودبه‌خودی در ویژگی‌های اسپورها از جمله اندازه و رنگ، شناسایی ریخت‌شناسی این قارچ‌ها را همواره با خطاها و مشکلاتی روبه‌رو کرده است (۵).

تنوع ژنتیکی قارچ‌های میکوریز آربوسکولار بین جدایه‌های مختلف یک گونه و درون تک‌اسپور یک گونه زیاد است و این مطلب یکی از مشکلات شناسایی مولکولی این قارچ‌ها به شمار می‌آید (۹ و ۳۸). به منظور غلبه بر مشکل یاد شده و حذف آلودگی‌های جانبی از طریق سایر موجودات، استخراج DNA از تک‌اسپور انجام و به علت کم بودن میزان ژنوم در دسترس و برای افزایش دقت، روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز آشیانه‌ای استفاده شد (۳۹) که روش مناسبی برای مطالعه مولکولی این گروه از قارچ‌ها محسوب می‌شود. در مطالعه حاضر، بخشی از انتهای ژن بتاتوبولین از تک‌اسپور قارچ‌های میکوریز آربوسکولار با واکنش زنجیره‌ای پلیمرز آشیانه‌ای سه مرحله‌ای تکثیر شد و آغازگرهای استفاده شده قابلیت خوبی برای تفکیک جنس و گونه قارچ‌های انتخابی داشتند.

در قارچ‌های میکوریز آربوسکولار، شناسایی و تعیین موقعیت فیلوژنتیکی در سطح خانواده و جنس با استفاده از نواحی مختلف DNA ریپوزومی و به ویژه

## References

- (1) Smith SE., Read JD. *Mycorrhizal symbiosis*. 3rd ed. London: Academic Press; 2008.
- (2) Dotzler N., Walker C., Krings M., Hass H., Kerp H., Taylor TN., Agerer R. Acaulosporoid glomeromycotan spores with a germination shield from the 400-million-years old Rhynie chert. *Mycological Progress* 2009; 8: 9-18.
- (3) Wehner J., Antunes PM., Powell JR., Mazukatow J., Rilling MC. Plant pathogen protection by Arbuscular mycorrhizas: A role for fungal diversity. *Pedobiologia* 2010; 53: 197-201.
- (4) Tulasne LR., Tulasne C. Fungi *Nonnulli hypogaei*, novi v. minus cogniti. *Giornale botanico Italiano* 1845; 2(7-8): 55-63.
- (5) Kruger M., Stockinger H., Kruger C., Schubler A. Phylogenetic reference data for systematics and phylotaxonomy of arbuscular mycorrhizal fungi from phylum to species level. *New phytologist* 2012; 193: 970-984.
- (6) Gamper HA., Walker C., Schubler A. *Diversispora Celata* sp. nov: molecular ecology and phylotaxonomy of an inconspicuous arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytologist* 2009; 182: 495-506.
- (7) Jansa J., Mozafar A., Banke S., McDonald BA., Frossard E. Intra and inter sporal diversity of ITS rDNA sequences in *Glomus intraradices* assessed by cloning and sequencing, and by SSCP analysis. *Mycology Research* 2002; 106: 670-681.
- (8) Schubler A., Schwarzott D., Walker C. A new fungal phylum, the Glomeromycota phylogeny and evolution. *Mycological Research* 2001; 105: 1413-1421.
- (9) Sanders IR., Alt M., Groppe K., Boller T., Wiemken A. Identification of ribosomal DNA polymorphisms among and within spores of the Glomales: application to studies on the genetic diversity of arbuscular mycorrhizal fungal communities. *New Phytologist* 1995; 130: 419-427.

مطالعه‌شده بود. نتایج نشان دادند ژن بتاتوبولین به اندازه ژن‌های 18S rDNA و 28S rDNA توانایی حل روابط فیلوژنتیکی بین قارچ‌های میکوریز آربوسکولار در سطح خانواده و گونه را دارد. در مطالعه حاضر، ژن بتاتوبولین به خوبی جنس‌های میکوریز آربوسکولار انتخابی را از یکدیگر تفکیک کرد و تمام گونه‌های شناسایی شده در جایگاه تاکسونومیکی اختصاصی خود قرار گرفتند. تقسیم‌بندی انجام‌شده و روابط جنس‌های مختلف به شکل زیر مشاهده شد:

((Gigaspora, Dentiscutata), Racocetra), Scutellospora), ((Funneliformis, Septoglosum), Claroideoglosum), (Diversispora, Acaulospora))

گروه‌بندی ایجادشده و روابط خوهری مشاهده‌شده بر اساس ژن بتاتوبولین کاملاً با طبقه‌بندی ایجادشده بر اساس سه ناحیه LSU-SSU-ITS در پژوهش‌های گذشته (۲۹) مطابقت دارد. در پژوهش حاضر، روش‌های شناسایی بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی و مولکولی تکمیل‌کننده یکدیگر بودند. نتایج نشان دادند تقسیم‌بندی انجام‌شده تنها بر اساس تک ژن بتاتوبولین نمونه‌های بررسی‌شده می‌تواند در تفکیک جنس و گونه‌های آنها مانند سیستم تقسیم‌بندی بر اساس روابط فیلوژنی چند ژن LSU-SSU-ITS عمل کند؛ از جمله محدودیت‌های موجود می‌توان به کمبود داده‌های مربوط به ناحیه بتاتوبولین در بانک ژن و نام‌گذاری نادرست و کیفیت کم برخی توالی‌های ثبت‌شده اشاره کرد. انتظار می‌رود در مطالعه‌های شناسایی گونه‌های مختلف میکوریز آربوسکولار در ایران، نتایج قطعی‌تر و بهتری در زمینه شناسایی گونه‌ها با بررسی ژن بتاتوبولین در کنار بررسی سایر نواحی ژنی و همچنین تلفیق این روش‌های مولکولی با روش‌های ریخت‌شناسی حاصل شوند.

- (10) Raab, PA. Development of new molecular markers for phylogeny and molecular identification of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota) [Dissertation]. Basel: Basel Univ; 2007.
- (11) Corradi N., Kuhn G., Sanders IR. Monophyly of  $\beta$ -tubulin and H-ATPase gene variants in *Glomus intraradices*: consequences for molecular evolutionary studies of AM fungal genes. *Fungal genetic Biology* 2004; 41: 262-273.
- (12) Aminizadeh S. Identification of Arbuscular Mycorrhizal Fungi associated with Pistachio root in Rafsanjan city [Dissertation]. Rafsanjan: Vali-e-Asr Univ; 2012.
- (13) Bahraminezhad M. Identification of Arbuscular Mycorrhizal Fungi associated with Almond roots in wet and dry farming in Baft city of Kerman province and Investigation of drought tolerance of some Almond rootstocks in the presence of these fungi [Dissertation]. Rafsanjan: Vali-e-Asr Univ; 2014.
- (14) Kolahnamadi Chorsi M. Distribution of Arbuscular mycorrhizal fungi associated with potato in the north of West Azerbaijan province [Dissertation]. Rafsanjan: Vali-e-Asr Univ; 2013.
- (15) Sadravi M. Arbuscular mycorrhizal fungi in wheat fields in Golestan province. *Vegetables* 2006; 7: 129-140.
- (16) Sedaghati E. Isolation and identification of Arbuscular Mycorrhizal Fungi associated with the roots of Grapes in Khorasan and Qazvin provinces [Dissertation]. Tehran: Tarbiat Modares Univ; 2002.
- (17) Hatami N., Bazgir E., Sedaghat E., Darvishnia M. 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* 2020; 12(1): 23-44.
- (18) Mahmoudi M. Purification, molecular and morphological identification of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in some potato fields in Iran [Dissertation]. Rafsanjan: Vali-e-Asr Univ; 2015.
- (19) Sabetjahromi M., Salehijozani G., Hoseini M. Isolation and characterization of native arbuscular mycorrhizal fungi in soils of arid regions of Iran using nested PCR method. *Trbiat Modares Biotechnology* 2012; 3: 1-13.
- (20) Salehijozani G., Akbarivala S., SabetJahromi M. Isolation and identification of dominant arbuscular mycorrhizal fungi in wheat, barley and weeds in some saline Regions of Iran. *Crop Biotechnology* 2011; 1: 61-75.
- (21) Yazdanpanah M., Sedaghati E., Khodygan P., Alaei H. Molecular and morphological identification of Arbuscular Mycorrhizal Fungi associated with pistachio roots in Kerman province. *Pistachio Science and Technology* 2017; 2(4): 11-28.
- (22) Blaszkowski J. Comparative studies of the occurrence of arbuscular fungi and mycorrhizae (Glomales) in cultivated and uncultivated soils of Poland. *Acta Mycologica* 1993; 28: 93-140.
- (23) Menge JA. Inoculum production. *Plant Pathology* 1984; 59: 187-203.
- (24) Philips JM., Hyman DS. Improved procedures clearing root and staining parasitic and vesicular Arbuscular Mycorrhizal Fungi for rapid assesment of infection. *Mycological Research* 1970; 55: 158-161.
- (25) Gerdemann J., Nicolson, H. Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological Society* 1963; 46: 235-244.
- (26) Cho NS., Kim DH., Eom AH., Lee JW., Choi TH., Cho HY., Leonowicz A., Ohaga S. Identification of symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi in Korea by morphological and DNA sequencing features of their spores. *Journal of the Faculty of Agriculture Kyushu University*

- 2006; 51: 201-210.
- (27) Schenck NC., Perez Y. *Manual for the identification of VA Mycorrhizal Fungi*. Florida: Synergistic Publication; 1990.
- (28) Hall IR. *Taxonomy of VA mycorrhizal fungi*. Florida: CRC Press; 1984.
- (29) Oehl F., Silva GA., Goto BT., Sieverding E. Glomeromycota: Three new genera, and glomoid species reorganized. *Mycotaxon* 2011; 116: 75-120.
- (30) Sasvari Z., Agurno F., Galanics D., Hang TTN., Luyen, ND., Posta K. Isolation and identification of arbuscular mycorrhizal fungi from agricultural field of Vietnam. *American Journal of Plant Sciences* 2012; 3: 1796-1801.
- (31) Msiska Z., Morton J. Phylogenetic analysis of the Glomeromycota by partial  $\beta$ -tubulin gene sequences. *Mycorrhiza* 2009; 19: 1432-1890.
- (32) Katoh K., Standley DM. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution* 2013; 30: 772-780.
- (33) Maddison WP., Maddison DR. Mesquite A modular system for evolutionary analysis. Version 3.04. 2015. <http://www.mesquiteproject.org>.
- (34) Nguyen LT., Schmidt HA., Haeseler A., Minh BQ. IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 2014; 32(1): 268-274.
- (35) Zarei M., Konig S., Hempel S., Nekouei MK., Savaghebi G., Buscot F. Community structure of arbuscular mycorrhizal fungi associated to *veronica rechingeri* at the Anguran zinc and lead mining region. *Environmental Pollution* 2008; 156: 1277-1283.
- (36) Redecker D., Schussler A., Stockinger H., Sturmer SL., Morton JB., Walker C. An evidence-based consensus for the classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *Mycorrhiza* 2013; 23: 515-531.
- (37) Rillig MC., Mummey DL. Mycorrhizas and soil structure. *New Phytologist* 2006; 171: 41-53.
- (38) Lanfranco L., Delpero M., Bonfante P. Intrasporal variability of ribosomal sequences in the endomycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. *Molecular Ecology Resources* 1999; 8: 37-45.
- (39) Lee J., Park SH., Eom AH. Molecular identification of arbuscular mycorrhizal fungi spores collected in Korea. *Mycobiology* 2006; 34: 7-13.
- (40) Kuhn G., Hijri M., Sanders IR. Evidence for the evolution of multiple genomes in an arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* 2001; 414: 745-748.
- (41) Walker C., Giovannetti M., Avio L., Citernesi AS., Nicolson TH. A new fungal species forming arbuscular mycorrhizas: *Glomus viscosum*. *Mycological Research* 1995; 99: 1500-1506.
- (42) Kruger M., Stockinger H., Kruger C., Schubler A. DNA- based species level detection of Glomeromycota: one PCR primer set for all arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 2009; 183: 212-223.

---

<sup>1</sup>- Tulasne  
<sup>2</sup>- Corradi  
<sup>3</sup>- Msiska  
<sup>4</sup>- Morton  
<sup>5</sup>- Philips  
<sup>6</sup>- Hyman  
<sup>7</sup>- Polyvinyl-Lacto-Glycerol (PVLG)  
<sup>8</sup>- Tris-Borate\_EDTA  
<sup>9</sup>- Sanger  
<sup>10</sup>- Consensus  
<sup>11</sup>- Maximum likelihood  
<sup>12</sup>- Ultrafast Bootstrapping  
<sup>13</sup>- Kruger