ژنتیک نوین
دوره پنجم، شماره ۱، بهار ۱۳۸۹
صفحه ۲۰-۵

شناسایی قارچ‌های میکوریز آربوسکولار، راهکارها و چالش‌های موجود

مهدی زارعی*[۱]، غلامرضا صالحی جوزانی[۲]

۱- استادیار بخش علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز
۲- استادیار بخش تحقیقات بیوتکنولوژی میکروبی و ایمنی زیستی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی
* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mehdizarei20@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۸۸/۴/۹ - تاریخ پذیرش: ۸۹/۲/۱۹)

چکیده

در بین انواع مختلف میکوریزا، میکوریز آربوسکولار، رایج‌ترین نوع همزیستی مسالمت‌آمیز بین میکروارگانیسم‌های خاکزی و گیاهان می‌باشد که بدلیل کمک به گیاه در شرایط تنش‌های مختلف، دارای اهمیت اکولوژیک و اقتصادی فراوانی می‌باشد. تقریباً بیش از ۸۰ درصد گونه‌های گیاهی دارای میکوریز آربوسکولار (AM) می‌باشند. تا چند سال قبل قارچ‌های شرکت کننده در این همزیستی بطور سنتی با روش‌های مورفولوژیک شناسایی می‌شدند، اما با توجه به گستردگی تعداد جنس و گونه این قارچها و محدودیت‌ها و مشکلات روش‌های مورفولوژیک، استفاده از تکنیک‌های جدید برای تکمیل شناسایی قارچ‌های AM گسترش یافته است. روش‌های مولکولی مورد استفاده شامل تکثیر توالی‌های DNA-ریبوزومی، مارکرهای مولکولی از قبیل SSCP, SNP, RFLP, AFLP, RAPD، PCR چندگانه و PCR کمی و همچنین میکروآری‌ها بوده است. تقریباً اکثر سیستم‌های شناسایی مولکولی قارچ‌های AM براساس توالی ژن‌های DNA-ریبوزومی بوده است. قطعات DNA-ریبوزومی مورد استفاده برای طبقه‌بندی به خوبی شناخته شده‌اند، و توالی‌های آن‌ها در پایگاه داده‌ها، برای محققین قابل دسترس هستند. علاوه بر ملکول‌های DNA، ملکول‌های دیگر مثل پروتئین‌های محلول اسپورها (PAGE- SDS D1) و اسیدهای چرب (PLFA, FALN)، الگوهای ایزوزایم‌ها و همچنین روش‌های سرولوژی مثل آنتی بادی فلوروسنت، ایمنواسی، ایمنو الکترون میکروسکوپی، فلوسایتومتری و تکنیک الایزا نیز برای شناسایی و طبقه‌بندی این قارچ‌ها مورد توجه قرار گرفته‌اند. در این مقاله سعی شده است روش‌های مختلف شناسایی این قارچ‌ها و مسائل مرتبط با آنها مورد بررسی قرار گیرند. بطور کلی، با انجام همزمان روش‌های مولکولی و بررسی‌های مورفولوژیک، می‌توان تصویر دقیق‌تری از تنوع قارچ‌های میکوریز آربوسکولار در مناطق مورد مطالعه بدست آورد.

واژه‌های کلیدی

**قارچ‌های میکوریز آربوسکولار (AM)،
مارکرهای مولکولی و بیوشیمیایی،
rDNA، Internal Transcribed Spacer (ITS)،**

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.1.1.2]

مقدمه

همزیستی بین ریشه‌های گیاه (ماکروسمبیونت) و قارچ (میکروسمبیونت)، اولین بار در سال ۱۸۸۱ در گیاهان بوسیله کامنسکی[1] قارچ شناس لهستانی کشف و بعداً به عنوان میکوریزا یا قارچ- ریشه نام‌گذاری شد (۷). قارچ- ریشه‌ها شامل انواع مختلف، میکوریزا آربوسکولار([2] AM)، اکتو میکوریزا، اکتندو میکوریزا، اریکوئید، آربوتوئید، مونوتروپوئید و ارکید میکوریزا می‌باشند. مشخص شده است که در بین ۳۶۱۷ گونه متعلق به ۲۶۳ خانواده از گیاهان خشکی‌زی، ۸۰ درصد گونه‌ها و ۹۲ درصد خانواده‌ها، میکوریزی هستند که این مقادیر در نهاندانگان، بازدانگان، سرخسیان و بریوفیت‌ها متفاوت می‌باشند (۷۸).

در بین انواع مختلف میکوریزا، میکوریزا آربوسکولار، رایج‌ترین نوع همزیستی مسمالت‌آمیز بین میکروارگانیسم‌های خاکزی و گیاهان می‌باشد که اهمیت اکولوژیک و اقتصادی فراوانی دارد. قارچ‌های AM به دلیل اینکه می‌توانند ٤ تا ۲۰ درصد کربن تثبیت شده توسط گیاهان را مصرف کنند، به عنوان مهمترین تنظیم کننده‌های جریان کربن از گیاهان به خاک، به شمار می‌آیند (۳٦، ۸۸). این قارچ‌ها تقریباً ۵ تا ۳٦ درصد زیست توده خاک و ۹ تا ۵۵ درصد زیست توده میکروارگانیسم‌های خاک را در اراضی کشاورزی شامل می‌شوند (۵۵). یک قطعه ریشه گیاه، ممکن است بوسیله مخلوطی از گونه‌های قارچی AM کلنیزه شود (۲۷). مطالعات مزرعه‌ای با استفاده از روش‌های شناسایی مولکولی نشان داده‌اند که جامعه قارچی مشخص می‌تواند با میزبان‌های مختلف همراه باشد (۷٦). مشخص شده است که این قارچها در اکوسیستمهای مختلف ازجمله آلوده به فلزات سنگین (۲، ۸٦،۸۷) و سایر اکوسیستمها وجود دارند و در تحمل تنش های مختلف شامل عناصر غذایی، غرقابی، خشکی، شوری، فلزات سنگین و عوامل بیماریزا و همچنین افزایش رشد گیاهان نقش به سزایی دارند. این قارچها دارای اثرات سینرژیستی با سایر میکروارگانیسم‌ها بخصوص ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه نیز می‌باشند (۱،۸۵). بعضی از ویژگی‌های قارچ‌های AM مانند نقش‌های مستقیم یا غیرمستقیم آن‌ها در شرایط محیطی گوناگون در افزایش رشد گیاه و بهبود خصوصیات اکوسیستم خاک، بطور گسترده‌ای مورد تحقیق قرار گرفته و نتایج مثبت حاصل، ضرورت استفاده از آن‌ها را به صورت مایه تلقیح یا کودهای بیولوژیک در کشاورزی پایدار، جنگل و باغبانی نشان داده است.

از مهمترین مشخصات قارچ‌های AM سمبیونت اجباری بودن، تشکیل آربوسکول در ریشه گیاه، داشتن اسپورهای بزرگ چند هسته‌ای با دیواره یا دیواره‌های چند لایه‌ای و هیف‌های بدون دیواره عرضی (به جز در هیف‌های مسن و یا در محل اتصال هیف به اسپور) می‌باشد. میکروسمبیونت قارچی در داخل ریشه‌های گیاهان بدون ایجاد هیچ‌گونه علائم بیماری رشد و گسترش می‌یابد. انتقال مواد بین سلول‌های کورتکس ریشه گیاه کلنیزه شده با قارچ و آربوسکول‌های قارچ، مهمترین مشخصه همزیستی AM می‌باشد. سمبیونت قارچی مواد کربوهیدراتی عمدتاً به شکل ساکارز از گیاه دریافت می‌کند و در عوض آب، عناصر غذایی (عمدتاً فسفر) و فاکتورهای رشد را در اختیار گیاه قرار می‌دهد.

تاکسونومی این قارچها همواره مورد بحث و شبهه بوده و در طی یکصد سال گذشته همواره با تغییرات زیادی همراه بوده است. در ابتدا این قارچها در جنس اندوگون قرار داده می‌شدند، Gerdemann و Trappe (۱۹۷٤) با جدا کردن این قارچها از جنس اندوگون، Morton و Benny (۱۹۹۰) و Cavalier-Smith (۱۹۹۸) به ترتیب با قرار دادن این قارچها در راسته گلومال‌ها (Glomales) و رده گلومرومیست‌ها (Glomeromycetes) تمایزهایی را قائل شدند ولی آن‌ها را در شاخه زیگومیکوتا قرار دادند. با افزایش یافتن نشانه‌هایی مثل عدم وجود زیگوسپور، همزیستی مسالمت‌آمیز اجباری و فیلوژنی زیر واحد کوچک DNA-ریبوزومی که قارچ‌های AM را از زیگومیکوتا متمایز می‌کردند، مشخص شد که قارچ‌های AM می‌توانند در داخل یک شاخه مجزا به عنوان گلومرومیکوتا (Glomeromycota) (٦۹) طبقه‌بندی شوند. در حال حاضر رده‌بندی قارچ‌های AM بر اساس پیشنهاد Schussler و همکاران (۲۰۰۱) بصورت شاخه گلومرومیکوتا درنظر گرفته می‌شود که شامل ۲۱۴ گونه که در ۱۹

[1] Kamienski
[2] *Arbuscular Mycorrhiza*

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.1.1.2]

جنس، ۱۳ خانواده و ٤ راسته شامل گلومرال (Glomerales)، دایورسیسپورال (Diversisporales)، پاراگلومرال (Paraglomerales) و آرکئوسپورال (Archaeosporales) قرار گرفته‌اند.

با توجه به پیچیدگی‌های موجود در شناسایی قارچ‌های AM و گستردگی تعداد جنس و گونه‌های آن‌ها، تنوع وسیع ژنتیکی آنها و با توجه به اهمیت این قارچ‌ها در همزیستی با گیاهان در طول چند دهه اخیر از تکنیک‌های مختلفی برای شناسایی دقیق و رده‌بندی صحیح آنها استفاده شده است، لذا در این مقاله سعی شده است به این موارد اشاره شده و نقاط ضعف و قوت آنها مورد بررسی قرار گیرند.

شناسایی قارچ‌های AM با روش‌های مورفولوژیک

تقریباً ۱٦۰ گونه از قارچ‌های AM، با استفاده از مورفولوژی اسپورهای آن‌ها شناسایی شده‌اند. در صورت عدم حضور اسپورها، وجود یا نبود اندام‌های قارچی درون ریشه‌ای مانند آربوسکول و وزیکول‌ها و نیز ویژگی‌های ساختمانی آن‌ها به عنوان بهترین ابزار شناسایی تا سطح خانواده و جنس مطرح هستند. بطور کلی روش‌های مورفولوژیک برای شناسایی اولیه و تکمیلی قارچ‌های AM شامل موارد زیر می‌باشند (۷، ۳٤، ۵۰، ٦۷، ۷۷):

- ساختارهای میکوریزی درون و برون ریشه‌ای مثل آربوسکول‌ها، وزیکول‌ها و سلول‌های کمکی در ریشه‌های گیاهی قابل دسترس، برای شناسایی در سطح خانواده و جنس مناسب‌اند.
- بررسی ساختار سلولی اسپور مثل رنگ، اندازه، دیواره و تعداد لایه‌های اسپور، نحوه اتصال هیف به اسپور، شکل ایجاد شده در محل اتصال هیف به اسپور، تشکیل یا عدم تشکیل اسپور در ریشه، باز یا مسدود بودن روزنه هیف و چگونگی انسداد روزنه در صورت بسته بودن، وجود یا عدم وجود پریدیوم در اطراف اسپورکارپ، وجود یا عدم وجود لایه‌های قابل ارتجاع داخلی در اسپور، نحوه اتصال دیواره‌های ریسه و اسپور به یکدیگر و مشخصات اسپورکارپ که برای شناسایی تا سطح گونه مفید می‌باشند.
- روش جوانه زدن اسپور و نحوه تشکیل و تکامل آن که برای شناسایی تا سطح خانواده و جنس بکار می‌رود.

در عین حال، روش‌های مورفولوژیک دارای محدودیت‌ها و مشکلات متعددی هستند که در زیر اشاره شده‌اند.

شناسایی قارچ‌های AM بر اساس مشخصات مورفولوژی اندام‌های مختلف قارچی نیاز به مهارت خاص دارد و به تنهایی، موقعیت طبقه‌بندی را تعیین نمی‌کند. این موضوع، به علت مرفولوژی نسبتاً یکنواخت و نداشتن مرحله تولید مثل جنسی در این قارچ‌هاست که اطلاعات کمی را برای شناسایی دقیق آن‌ها فراهم کرده است. قارچ‌های AM بطور سنتی بوسیله مرفولوژی اسپورها شناسایی می‌شوند. در غیاب اسپورها، ساختارهای درونی ریشه اجازه شناسایی در سطح خانواده را فراهم می‌کنند (۳٤، ٤۹). با این وجود، چندین دودمان از قارچ‌های AM شامل جنس‌های پاراگلوموس (*Paraglomus*) و آرکئوسپورا (*Archaeospora*) با روش‌های شناخته شده رنگ‌آمیزی نشده یا بطور خیلی ضعیف رنگ می‌گیرند. بنابراین در صورت حضور در داخل بافت‌های ریشه گیاهان میزبان فقط با روش‌های مولکولی می‌توانند شناسایی شوند (۵۹).

تولید اسپور همیشه با کلنیزاسیون ریشه همبستگی نداشته (۳، ٤۹) و بیشتر به پارامترهای فیزیولوژیک قارچ‌های AM و شرایط محیطی وابسته است. تحت شرایط خاص یا در فصل‌های خاصی از سال، بعضی قارچ‌های AM اسپورهای زیادی تولید می‌کنند و بر این اساس ممکن است به عنوان اشغال کننده‌های غالب ریشه محسوب شوند در حالیکه تحت شرایط دیگر، ممکن است اصلاً اسپورزایی نکنند (٦۱). بعلاوه، ممکن است دینامیک تولید اسپور و کلنیزاسیون ریشه در بین گونه‌ها متفاوت باشد (۹، ۱۳، ٤۱، ٤۹). در مطالعه اکولوژی قارچ‌های AM در شرایطی که گونه‌های غیر اسپورزا قابل بررسی و شمارش نباشند، گونه‌های تولید کننده اسپور به عنوان گونه غالب معرفی می‌شوند، در حالیکه ممکن است گونه‌های غیر اسپورزا به مقدار فراوان‌تری در همان محل وجود داشته باشند.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.1.1.2]

محدودیت دیگر این می‌باشد که اکثر اسپورهای نمونه‌گیری شده از مزارع، انگل‌زده یا تخریب شده یا نابالغ‌اند و بنابراین فاقد مشخصات مرفولوژیک مشخص و ضروری برای تشخیص گونه می‌باشند. این مشکل می‌تواند با کشت‌های تله‌ای[3] این قارچ‌ها حل گردد به این صورت که در شرایط کنترل شده، نمونه‌های خاک مزارع در تماس با گیاه میزبان مناسب قارچ‌های AM قرار داده می‌شوند. این کار به منظور تکثیر گونه‌های قارچی موجود در شرایط مزرعه و تهیه اسپورهای تازه و سالم‌تر در مراحل مختلف رشد و توسعه، انجام می‌گیرد. با این وجود، ممکن است در این کشت‌ها، خصوصیت ترجیح میزبانی برخی گونه‌های قارچی نسبت به گونه گیاهی مورد استفاده در کشت تله‌ای (۳۸) و یا عوامل محیطی، مثل تنش فلزات سنگین روی فراوانی (۸٦) و میزان تکثیر گونه‌های مختلف قارچی اثر بگذارند. بعلاوه، ممکن است در نمونه خاک به کار رفته در کشت تله‌ای همه گونه‌های قارچی مزرعه وجود نداشته باشند تا بتوانند گیاه مورد استفاده در کشت گلدانی را کلنیزه کنند. بطور کلی، روش‌های بررسی اسپورهای مزرعه‌ای با استفاده از کشت‌های گلدانی وسیله‌ای برای ارزیابی پتانسیل جمعیت‌های گوناگون قارچ‌های AM، به عنوان زادمایهٔ خاک مزارع هستند و نشان می‌دهند که مجموعه‌ای از قارچ‌ها در ریشه‌های گیاهان زراعی حضور دارند. با این حال، در اکثر موارد این روش‌ها قادر نیستند که گونه یا گونه‌هایی از قارچ‌های AM را که به طور واقعی در داخل ریشه‌های گیاهان مزرعه‌ای فعال هستند و در رشد گیاه میزبان مؤثر می‌باشند، شناسایی و تفکیک کنند (٦۳). این مشکل به دلیل وجود اسپور طیف وسیعی از این قارچ‌ها در مجاورت ریشه‌ها و کلنیزه شدن ریشه گیاه بوسیله بیش از یک گونه قارچ می‌باشد (۵۸).

شناسایی برخی از این قارچ‌ها حتی به وسیله اسپورهای سالم آن‌ها نیز مشکل است، زیرا مشخصات مورفولوژیک متمایز کننده آنها برای تشخیص دقیق، کافی نیستند. بطور مثال دو جنس گلوموس و پارا گلوموس، گرچه قرابت دوری با یکدیگر دارند ولی از لحاظ مورفولوژی اسپور از هم قابل تفکیک نیستند (۵۳).

جنس گلوموس براساس معیارهای مولکولی دارای دو نیای مستقل می‌باشد (۷۰) که تشخیص این حالت چند نیایی بر اساس مطالعات مورفولوژیک مقدور نبوده است. علاوه بر این، تنوع ژنتیکی در جنس گلوموس و همچنین تنوع در سطح سویه‌های یک گونه آن بوسیله مشخصات مورفولوژی اسپورها قابل تشخیص نمی‌باشد. در واقع، مرفولوژی اسپورها، تنوع قارچ‌های میکوریزی درسطح گونه و جمعیت‌های داخل یک گونه را به درستی منعکس نمی‌کند، درحالیکه با روش‌های مولکولی می‌توان توالی‌ها یا فیلوتیپ‌های غالب را در داخل ریشه گیاه میزبان شناسایی نمود (٦۰). زارعی (۱۳۸۷) تنوع مرفولوژیک و مولکولی قارچ‌های AM در طول یک ترانسکت در منطقه معدن انگوران بررسی نموده است. ده گونه مرفولوژیک در کل منطقه مورد مطالعه شامل گلوموس موسه‌ای (*Glomus mosseae*)، گلوموس اینترارادیسز (*Glomus intraradices*)، گلوموس ورسیفورم (*Glomus versiforme*)، گلوموس آمبیسپوروم (*Glomus ambisporum*)، گلوموس کانستریکتم (*Glomus constrictum*)، گلوموس فاسیکولاتوم (*Glomus fasciculatum*)، گلوموس ژئوسپوروم (*Glomus geosporum*)، گلوموس سینوزوم (*Glomus sinosum*)، یک گونه شناسایی نشده گلوموس (*Glomus* sp.) و آکالوسپور (*Acaulospora* sp.) شناسایی شدند. در حالیکه با روش‌های مولکولی علاوه بر آشکار شدن گونه‌های مرفولوژیک شاخص، تنوع فیلوتیپ‌ها یا نوع توالی‌ها در سطح هر گونه بوضوح نشان داده شده است، بطوریکه حتی توالی‌های متعلق به یک گونه شناسایی شده با کمک روش‌های مرفولوژیک در سطوح مختلف آلودگی فلزات سنگین با یکدیگر تا اندازه‌ای متفاوت بدست آمده‌اند.

امروزه تشخیص گونه‌های مرفولوژیک (واحد سیستم لینه) بخصوص در مورد ارگانیسم‌هایی با مشخصات مورفولوژیک نامکفی، بسیار محدود شده است. قارچ‌های AM تولید مثل جنسی ندارند و یا شناخته شده نیست. بنابراین شناسایی مرفولوژی این قارچ‌ها بر اساس اندام‌هایی است که به شیوه غیر جنسی بوجود آمده‌اند. این معیارها علاوه بر کافی نبودن، سبب

[3] Trap cultures

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.1.1.2]

آشفته شدن وضعیت رده‌بندی قارچ‌ها شده است. امروزه با روش‌های مولکولی بر این مشکلات چیره شده‌اند.

شناسایی قارچ‌های AM با روش‌های مولکولی

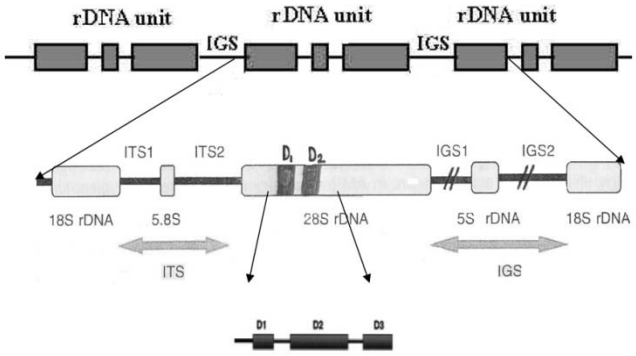
روش‌های مولکولی به منظور افزایش دانش در زمینه ساختار و نقش موجودات متفاوت و همچنین برای دریافت پاسخ سؤالات در ارتباط با ژن‌ها و تغییرات آن‌ها، ژنوم و تغییرات ژنتیکی متداول شده‌اند.

ژنوم قارچ‌های AM نسبتاً بزرگ است و دارای ۰/۱۳ تا بیشتر از یک پیکوگرم DNA در هسته با حدود 10^8 تا 10^9جفت باز می‌باشد (۳۱)، در حالیکه ژنوم بسیاری از قارچ‌های عالی، به جز موارد استثناء در بین آن‌ها، اکثراً بین $10^6 \times 8/13$ تا $10^6 \times 50$ جفت باز دارند (۲۵). در مورد اندازه ژنوم قارچ‌های AM گزارش‌های متناقضی نیز وجود دارد مبنی بر این که اندازه ژنوم این قارچ‌ها کوچکتر و شبیه به ژنوم قارچ‌های دیگر است (۳۰). بزرگ بودن ژنوم می‌تواند به دلیل تکرار پی در پی توالی‌های مناطق متغیر ریبوزومی (تا مناطق کد کننده) در طی دوران تکامل طولانی مدت قارچ‌های AM باشد. این موضوع سبب پیچیدگی ساختار ژنوم شده است بدون این که تغییر مهمی در آشیان اکولوژیک آن‌ها ایجاد کند (۵۲).

محققین نشان داده‌اند که مقدار گوانین و سیتوزین توالی‌های گلومرومیکوتایی با توالی‌های گروه‌بندی شده در دودمان‌های دیگر تفاوت زیادی دارد. آنالیزهای DNA بر اساس ترکیب ۱۰ گونه قارچ گلومالین، مقادیر گوانین وسیتوزین را در ژنوم این قارچ‌ها ۳۵-۳۰ درصد در مناطق کد کننده و غیر کد کننده، با سطوح بالای متیل سیتوزین تا ٤/٢٦ درصد نشان داده‌اند (۳۳). مقدار گوانین و سیتوزین در یک توالی نمی‌تواند مشخص کننده منشاء قارچ میکوریزی و یا آلودگی باشد و فقط اگر مقدار گوانین و سیتوزین از ۳۵-۳۰ زیادتر شود می‌تواند هشداری برای وجود توالی‌های آلوده غیر میکوریزی محسوب گردد.

طی دو دهه اخیر از بهترین روش‌های متداول در بیولوژی ملکولی، برای شناسایی و طبقه‌بندی قارچ‌های AM استفاده شده است. تقریباً اکثر سیستم‌های شناسایی قارچ‌های AM براساس توالی ژن‌های DNA-ریبوزومی بوده است. قطعات DNA-ریبوزومی مورد استفاده برای طبقه‌بندی به خوبی شناخته شده‌اند، و توالی‌های آن‌ها در پایگاه داده‌ها، برای محققین قابل دسترس هستند (٤٠). ژن‌های این ناحیه به طور پشت سر هم در ژنوم قارچ‌ها تکرار شده‌اند. هر واحد تکرار شونده حاوی توالی‌های ژن‌های RNA ریبوزومی است که شامل ژن های کد شونده 18S (زیر واحد کوچک[4])، 5.8S، 28S (زیر واحد بزرگ[5])، 5S و مناطق غیر کد شونده ITS[6] و IGS[7] می‌باشد (شکل۱). ژن‌های 5S یا با واحدهای تکرار شونده یکی شده یا در جائی دیگر از ژنوم هسته قرار گرفته‌اند. زیر واحدهای 18S، 5.8S، 28S و5S کاملاً محافظت شده هستند، در حالی که مناطق ITS و IGS متغیرند (٤٣) و ممکن است که به صورت توالی‌های متفاوت از یکدیگر، یا با مقدار کم همولوژی و یا بدون هیچ گونه همولوژی، در ژنوم نمایان شوند.

[4] Small subunit (SSU) ribosomal DNA
[5] Large subunit (LSU) ribosomal DNA
[6] Internal Transcribed Spacer region (ITS)
[7] Intergenic Spacer region (IGS)



شکل۱- ژن‌های DNA- ریبوزومی و اجزای سازنده آن (Krishna ۲۰۰۵ و Reddy و همکاران ۲۰۰۵)

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.1.1.2]

توالی‌های واحدهای DNA- ریبوزومی به صورت تعداد کپی بالا در دسترس هستند. مشخص شده که در قارچ‌ها، بطور متوسط ۴۰۰-۴۰ کپی از ژن‌های ریبوزومی در هر ژنوم هاپلوئید تکرار شده (۸۰) و طول آن‌ها بین kb ۵۰-۷ متغیر است. این مناطق ارزش تکاملی بالایی دارند و می‌توانند برای تشخیص تاکسون‌ها در هر سطح بکار روند (٦٠). تغییرات در زیر واحدهای کوچک DNA-ریبوزومی (18S) در سطح درون گونه‌ای نسبت به منطقه ITS کمتر است. همچنین، این زیر واحد نسبت به زیر واحدهای بزرگ DNA- ریبوزومی (28S) بیشتر مورد مطالعه بوده و از این جهت برای ادامه بررسی‌ها و ایجاد یک فیلوژنی ثابت بیشتر مناسب‌تر است (٦٦).

برای انجام تحقیقات مولکولی به مقدار کافی DNA ژنومی نیاز است. در حالی‌که، به دلیل طبیعت اجباری بودن همزیستی قارچ‌های AM با میزبان، این قارچ‌ها بر روی محیط‌های غذایی قابل کشت نیستند و تاکنون راه‌حل مناسبی برای رفع این مشکل پیدا نشده است. بنابراین تجزیه و تحلیل‌های فیلوژنتیک، در ابتدا به دلیل وجود مقدار کم DNA قارچ در گیاه و مخلوط بودن آن با ژنوم گیاهی و پروکاریوت‌های همراه، بسیار مشکل به نظر می‌رسید. با پیدا شدن تکنیک واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)[8] این مانع بزرگ از سر راه تکنیک‌های مولکولی قابل استفاده برای شناسایی این قارچ‌ها برداشته شده و تجزیه و تحلیل مقادیر کم DNA ارگانیسم‌هایی مانند قارچ‌های AM که کشت آن‌ها بدون میزبان مقدور نیست، تسهیل شده است. اکثر محققین با استفاده از آغازگرهای عمومی و اختصاصی قسمت‌ها یا محل‌های نشانه یا هدف خاصی از زیر واحدهای بزرگ، کوچک، منطقه ITS ریبوزومی و DNA ژنومی این قارچ‌ها را با استفاده از انواع مختلف PCR (معمولی، آشیانه‌ای[9]، رقابتی[10] و...) تکثیر و سپس با یا بدون تکنیک‌های انگشت نگاری مثل RFLP[11] و غیره آن‌ها را تجزیه و تحلیل و توالی‌یابی نموده‌اند. امروزه اطلاعات لازم در مورد توالی‌های بدست آمده در یک پایگاه داده‌ای، قابل دسترس می‌باشند که می‌توان با کسب اطلاعات صحیح از فیلوژنی این قارچ‌ها در مورد تنوع و بیوسیستماتیک انواع بومی مورد نظر اقدام نمود. برخی از تحقیقات مولکولی در زمینه قارچ‌های AM در جدول۱ خلاصه شده است.

اولین بار توالی زیر واحد کوچک DNA- ریبوزومی قارچ‌های AM بوسیله Simon و همکاران (۱۹۹۲) تعیین گردید. بر اساس این اطلاعات، یک آغازگر اختصاصی برای قارچ‌های AM به نام VANS1 طراحی گردید و بعداً آغازگرهای گروهی اختصاصی برای نسب و دودمان قارچ‌های AM به آن اضافه شدند و با استفاده از SSCP[12] یک سیستم شناسایی پیشنهاد شد (۷۱) که پلی مورفیسم جدید و یا شناخته شده را شناسایی می‌کرد (۳۲).

از آغازگر VANS1 در بعضی مطالعات استفاده شد، ولی هنگامی که توالی‌های بیشتری از زیر واحد کوچک DNA- ریبوزومی قابل دسترس گردیدند، آشکار شد که توالی مرتبط با این آغازگر به خوبی قادر نیست همه تاکسون‌های AM را تکثیر نماید (۱۱). Clapp و همکاران (۱۹۹۵) با استفاده از آغازگرهای طراحی شده بوسیله Simon و همکاران (۱۹۹۳) و تکنیک تفریق-هیبریداسیون[13] برای تکثیر توالی‌های قارچی، جمعیت مزرعه‌ای قارچ‌های AM را مطالعه کرده‌اند. نتایج آن‌ها برای گونه‌های مربوط به جنس‌های آکولوسپورا و اسکیوتلوسپورا (*Scutellospora*) عمدتاً با تعداد اسپور هماهنگ بودند اما اختلاف شدیدی بین کلنیزاسیون ریشه و عدم وجود اسپورزایی در گلوموس موسه‌ای مشاهده شد.

Redecker (۲۰۰۰) آغازگرهای گروهی اختصاصی برای پنج دودمان عمده قارچ‌های AM را طراحی کرد تا مناطق با تغییر زیاد ITS، زیر واحدهای کوچک و زیر واحدهای DNA 5.8S- ریبوزومی را تکثیر کنند. در این مطالعه آرکئوسپورا و پاراگلوموس که در مطالعات قبلی فیلوژنی ملکولی تشخیص داده نشده بودند (بدلیل رنگ پذیری ضعیف یا عدم رنگ پذیری) آشکار شدند. طرحی از ژن‌های DNA- ریبوزومی با مناطقی که آغازگرها به آن متصل می‌شوند در شکل ۲ نشان داده شده است.

[8] Polymerase Chain Reaction (PCR)
[9] Nested PCR
[10] Competitive PCR
[11] Restriction Fragment Length Polymorphism

[12] Single-Strand Conformation Polymorphism.
[13] Subtraction-Hybridization Technique

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.1.1.2]

جدول۱- خلاصه‌ای از تحقیقات مولکولی بر اساس واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در زمینه قارچ‌های میکوریز آربوسکولار

منطقه تکثیر شده	آغازگر/آغازگرها	ارگانیسم هدف	منبع
SSU	VANS1 and NS21	*Glomus intraradices*	Di Bonito و همکاران ۱۹۹۵
Genomic DNA	PO and M3	*G. mosseae*	Edwards و همکاران ۱۹۹۷
SSU 1492	NS71and SSU1492	*Gigaspora* sp.	Bago و همکاران ۱۹۹۸
Partial rDNA	SS38 and VANS1 VANS1 VAGIGA	*Scutellospor*a and *Glomus* Gigasporaceae	Clapp و همکاران ۱۹۹۹
ITS1 and ITS2	ITS1 and ITS2	*Gigaspora margarita*	Lanfranco و همکاران ۱۹۹۹
ITS	ITS1 and ITS4	*Glomus mosseae* and *Gigaspora margarita*	Antoniolli و همکاران 2000
SSU rDNA	LR1 and FLR2 FLR2-5.23 and FLR2-8.23 LR1-23.46	Subgroup of Glomales *Glomus mosseae,Glomus intraradices* *Gigaspora roseae*	Jacquot و همکاران 2000
SSU rDNA	NS31 and AM1	*Glomus* sp.	Daniell و همکاران 2000
ITS	ITS1 and ITS4	*G. mosseae*	Giovannetti و همکاران 2000
SSU	NS31–AM1	AMF taxa	Öpik و همکاران ۲۰۰۳
ITS	Family specific, nested PCR	AMF taxa	Wubet و همکاران ۲۰۰۳
ITS	Family specific, nested PCR	AMF taxa	Wubet و همکاران ۲۰۰٤
SSU	NS31–AM1	AMF taxa	Scheublin و همکاران ۲۰۰٤
SSU	NS31–AM1; ITS4–ARCH1311	AMF taxa	Wirsel ۲۰۰٤
SSU	NS31–AM1	AMF taxa	Jumpponen و همکاران ۲۰۰۵
SSU	NS31–AM1	AMF taxa	Douhan و همکاران ۲۰۰۵
ITS	LSU-Glom1 and SSU-Glom1/ ITS4 and ITS5	AMF taxa	Zarei و همکاران ۲۰۰۸

نمونه‌های قارچ می‌توانند با آغازگرهای اختصاصی بوسیله PCR تکثیر شوند و به منظور شناسایی قارچ‌های مورد نظر، محصولات PCR- همسانه سازی و سپس توالی‌یابی گردند. این روش گران و زمان بر است. از این رو، تهیه نقشه‌های RFLP یک روش راحت و مناسب برای کوتاه کردن زمان بری و کم کردن هزینه‌های توالی‌یابی DNA می‌باشد. یک الگوی RFLP پس از ثبت شدن می‌تواند برای مقایسه با توالی‌های جدید، بدون نیاز به توالی یابی مجدد بکار رود. Redecker و همکاران (۲۰۰۳) گزارش کرده‌اند که ارزیابی RFLP با استفاده از آنزیم‌های *MboI* و *HinfI*، برای تشخیص بسیاری از گونه‌های قارچ‌های گلومالین که از نظر مورفولوژی متفاوت هستند، مناسب است، البته یک استثناء در مورد جایگوسپوراسه (Gigasporaceae) مشاهده کرده‌اند.

Renker و همکاران (۲۰۰۳) یک جفت آغازگر اختصاصی برای قارچ‌های AM و تعداد معدودی از قارچ‌های دیگر طراحی و در ترکیب با جفت آغازگرهای عمومی قارچی ITS4/ITS5 از آن در یک PCR آشیانه‌ای برای تکثیر قارچ‌های AM استفاده نمودند. جفت آغازگرهای LSU-Glom1 وSSU-Glom1 بر اساس توالی‌های DNA- ریبوزومی قابل دسترس از تاکسون‌های مختلف در داخل ژن‌های کد شونده زیر واحد بزرگ و کوچک DNA- ریبوزومی طراحی شده که حداقل یکی از آن‌ها برای قارچ‌های AM اختصاصی است. این جفت آغازگرها در مرحله اول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بکار رفتند که محصول آن حاوی بعضی قارچ‌های آلاینده شامل بازیدیومیکوتا و بطور خیلی محدودتر آسکومیکوتا بوده است. Renker و همکاران (۲۰۰۳) براساس آزمون چندین نوع آنزیم برشی و همچنین براساس توالی‌های قابل

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.1.1.2]

دسترس در بانک ژنی نشان دادند که اکثر قارچ‌های گلومرومیکوتا ناحیه قابل برش با آنزیم برشی *Alu1* را ندارند در حالی‌که سایر قارچ‌های آلاینده حاوی این ناحیه می‌باشند. بنابراین آن‌ها تکثیر اکثر آلاینده‌ها را با استفاده از هضم برشی با این آنزیم کاهش دادند.

با استفاده از روش‌های مولکولی نشانه‌هایی از تنوع مخفی در سطح گونه قارچ‌های AM آشکار شده است، بطوریکه تعداد گونه‌ها از ۱۶۰ به ۲۰۶ گونه افزایش یافته است که بر اساس نظر Morton و همکاران (۱۹۹٤) ممکن است به ۲۷۰۰ گونه هم برسد. Zarei و همکاران (۲۰۰۸b) در مطالعه تنوع قارچ‌های AM کلنیزه کننده ریشه گیاه ورونیکا ریچنجری (*Veronica rechingeri*) در منطقه معدن انگوران، در بررسی‌های مورفولوژیک فقط ۳ گونه متعلق به *گلوموس*، در حالیکه با روش‌های مولکولی ۷ گونه قارچ‌های AM را شناسایی نموده‌اند. در این مطالعه ۷ نوع توالی متعلق به *گلوموس* گروه A و B شناسایی گردید. بطور کلی تکنیک‌های شناسایی ملکولی پتانسیل متحول کردن اکولوژی قارچ‌های AM را دارند به دلیل اینکه این روش‌ها، فرصت شناسایی این قارچ‌ها را در هر نمونه‌ای از ریشه بدون نیاز به حضور اسپور فراهم می‌کنند. همچنین روش‌های مولکولی، پتانسیل شناسایی هیف‌های موجود در خاک را دارند که بایستی تکنیک‌های لازم برای انجام آن توسعه یابند (۶۱، ۲۹). در ضمن، می‌توان با انجام همزمان روش‌های مولکولی و بررسی‌های مرفولوژیک، تصویر دقیق‌تری از این قارچ‌ها در مناطق مورد مطالعه ارائه نمود. Redecker و همکاران (۲۰۰۳) روش‌های ملکولی همراه با تجزیه و تحلیل مرفولوژی اسپورها به روش کلاسیک را به عنوان یک استراتژی قابل قبول و با ارزش، برای مشخص کردن جامعه قارچ‌های AM در ریشه‌ها معرفی کردند.

مطالعات کمتری هم روی مناطق دیگر DNA با بکار بردن تکنیک RAPD[14] (۸۳) برای تکثیر قطعات ناشناخته، AFLP[15] (۶۵) و میکروساتلایت‌ها (۱۸) انجام شده‌اند، با این هدف که با استفاده از این تجزیه‌ها طیف وسیعی از مناطق ژنوم نسبت به تک منطقه DNA ریبوزومی مورد بررسی و شناسایی قرار گیرد. تکنیک RAPD به فراوانی در شناسایی قارچ‌های AM به خصوص برای تک اسپور که مقدار DNA در آن کم می‌باشد استفاده شده است. از معایب آن عدم تکرار پذیری می‌باشد که کاربرد این روش را کاهش داده است (۸۳). تکنیک AFLP برای شناسایی پلی مورفیسم در DNA تک اسپور قارچ AM استفاده شده است. در این روش DNA استخراج و با آنزیم‌های برشی هضم می‌شود تا قطعات بدست آید. این قطعات با اتصال دهنده‌ها همراه و با اضافه شدن الیگونوکلئوتیدها به آن تکثیر می‌شود تا الگوهای چند شکلی مشخص و تکرار پذیری بدست آید (۶۵). اخیراً نیز از ژن‌های میتوکندریایی و اینترون‌های آن‌ها، به عنوان ژن‌های نشانگر جایگزین، برای تجزیه و تحلیل بهتر تاکسون‌های با روابط نزدیک استفاده شده است (۵۷). Raab (۲۰۰۷) بر اساس توالی‌های نوکلئوتیدی منتشر شده زیر واحد بزرگ DNA ریبوزومی میتوکندریایی، آغازگرهای اختصاصی جدید طراحی کرد که برای تکثیر یک قسمت از توالی زیر واحد بزرگ ریبوزومی میتوکندریایی قارچ‌های AM بکار می‌رود. در این مطالعه یک آغازگر اختصاصی برای گلوموس اینترارادیسز و گلوموس پرولیفروم (*Glomus proliferum*) طراحی شد که نشان داد هیچ نشانه‌ای از تغییرات ژنتیکی در توالی‌های ریبوزومی میتوکندریایی در بین جدایه‌های این دو گونه وجود ندارد. بعلاوه جدایه‌های گلوموس اینترارادیسز بطور خیلی مشخصی از یکدیگر قابل تفکیک هستند. آنالیز فیلوژنتیک توالی‌های ریبوزومی میتوکندریایی قارچ‌های حقیقی، هیچ مدرکی که حاکی از ارتباط قارچ‌های گلومالین با دودمان‌های قارچی دیگر باشد نشان نداده است که احتمالاً به دلیل متغیر بودن این توالی‌ها در شاخه‌های مختلف است. بطور کلی Raab (۲۰۰۷) نشان داد که توالی‌های ریبوزومی میتوکندریایی و اینترون‌های آن‌ها نشانگرهای مولکولی با دقت بالا برای تجزیه و تحلیل جامعه و جمعیت‌های قارچ‌های AM می‌باشند.

[14] Random Amplified Polymorphic DNA
[15] Amplified Fragment Length Polymorphism

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.1.1.2]

اخیرا نیز با استفاده از سیستم‌های PCR کمی[16] و میکروواری[17] با استفاده از آغازگرها و کاوشگرهای اختصاصی برای تعیین میزان جمعیت هرکدام از گونه‌های قارچ AM و شناسایی همزمان آنها استفاده شده است. با توسعه این روش‌ها و ارزانتر شدن کار با آنها این روشها به مرور کاربرد آنها گسترش خواهد یافت (۴۳).

روش‌های بیوشیمیایی برای شناسایی قارچ‌های AM

علاوه بر ملکول‌های DNA، ملکول‌های دیگر مثل پروتئین‌های محلول اسپورها (SDS -PAGE[18]) و اسیدهای چرب (PLFA، N LFA[19]) و الگوهای آیزوزایم‌ها و همچنین روش‌های سرولوژی مثل آنتی بادی فلوروسنت، وسترن بلاتینگ، بیوایمنو اسی[20]، فلو سایتومتری[21] و ایمنوالکترون میکروسکوپی[22] و تکنیک الایزا نیز برای شناسایی و طبقه‌بندی این قارچ‌ها مورد بررسی قرار گرفته‌اند، اما بطور خیلی وسیع استفاده نشده‌اند. از آنتی بادی‌های فلوروسنت در بعضی تحقیقات به عنوان نشانگرهای پروتئینی استفاده شده است. آنتی بادی‌های متناظر با پروتئین‌های قارچی برای شناسایی گونه قارچی و یا برای تشخیص حضور قارچ AM در ریشه گیاه و خاک بکار رفته‌اند. الگوهای ایزوزایم‌ها برای شناسایی اسپور و میسلیوم قارچ AM درساختارهای همزیستی مورد توجه بوده‌اند (٤٣). در زیر به خلاصه‌ای از موارد مذکور اشاره می‌شود:

پروتئین‌های محلول

الگوهای پروتئین برای تمایز تاکسونومیکی بین گونه‌ای از نظر مورفولوژی یکسان و شناسایی جدایه‌های بسیاری از موجودات استفاده شده است. Dodd و همکاران (۱۹۹۶) الکتروفورز SDS–ژل پلی اکریل آمید تک بعدی پروتئین‌های اسپورها را برای آشکار کردن تغییرات درون و برون گونه‌ای مفید دانستند و Thingstrup و همکاران (۱۹۹۵) آن را برای کشف موقعیت فیلوژنی بکار بردند. با این وجود بدست آوردن الگوهای ثابت به فاکتورهایی چون شرایط استاندارد قابل کشت و روش‌های استخراج بستگی دارد. Avio و Giovannetti (۱۹۹۸) با استفاده از کشت گونه‌های مشابه قارچ‌های AM منشا گرفته از مکان‌های جغرافیایی مختلف و تکثیر شده در مجاور میزبان‌های مختلف و در زمان‌های متفاوت، الگوهای پروتئین‌های اسپورها را ارزیابی نمودند. نتایج آنها نشان داد که پروفیل‌های پروتئین‌های اسپور پایدار بوده‌اند و از مکان جغرافیایی، میزبان و زمان تاثیر پذیرفته‌اند. بطور مثال شاخص شباهت برای دو جدایه *گلوموس کورونا‌توم* (*Glomus coronatum*) متمایز، ۹۸ درصد بوده است. بطور مشابهی، شاخص شباهت ایزوله‌های گلوموس موسه‌ای منشا گرفته از میزبان‌های مختلف ۱۰۰ درصد گزارش شده است. وضعیت فیزیولوژیک اسپورها عامل مهمی است که جنبه‌های کمی و کیفی الگوهای پروتئین‌ها را تحت تاثیر قرار می‌دهد. پروفیل‌های پروتئین‌های اسپورهای در حال جوانه زنی در مقایسه با اسپورهای در حالت رکود، تغییر قابل ملاحظه‌ای دارند. برای مثال زمانیکه جوانه زنی اسپورها انجام می‌شود، پلی پپتیدهای خاص مثل پروتئین‌های ذخیره‌ای ناپدید می‌شوند. بنابراین اسپورها یا هیف‌های جدایه‌های متفاوت باید در یک حالت متابولیک خاص، انتخاب و مقایسه شوند. Dodd و همکاران (۱۹۹۶) با تجزیه و تحلیل تعداد قابل توجهی از قارچ‌های AM نشان دادند که گونه‌ها و جدایه‌های متفاوت قارچ‌های AM، پروفیل های پلی پپتیدی SDS متمایزی دارند که اجازه جداسازی تاکسونومیک آن‌ها را می‌دهد. در بسیاری موارد نتایج فیلوژنتیک مشتق از الگوهای پروتئینی با الگوهای آیزوزیم و RFLP مشابه بوده است. Xavier و همکاران (۲۰۰۰) ۵۰۰ اسپورهای کشت تک گونه‌ای چهار گونه متفاوت قارچ AM شامل *گلوموس فاسیکولاتوم*، *گلوموس اتونیکاتوم*، *گلوموس کلارم* و *گلوموس موسه‌ای* را جمع آوری و پروتئین‌های محلول آنها را با الکتروفورز ژل پلی اکریل آمید بررسی نمودند. گونه‌های قارچی به آسانی بر اساس الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های محلول اسپور آنها جداسازی شدند. بعلاوه، هر گونه قارچی، باندهای پروتئینی مشخصی داشته که قابل تولید و دارای ثبات بوده است.

[16] Real Time PCR
[17] Microarray Systems
[18] One-dimensional SDS-polyacrylamide gel electrophoresis
[19] Phospholipids and neutral lipid fatty acids
[20] Bioimmunoassay
[21] Flow Cytometry
[22] Immunoelectron Microscopy

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.1.1.2]

آیزوزایم‌ها

الکتروفورز ژل پلی اکریل آمید و رنگ آمیزی برای آنزیم‌های خاص بطور موفقیت آمیزی برای شناسایی و حتی کمی کردن قارچ‌های میکوریزی استفاده شده است. Alia و Dodd (۱۹۹۸) الگوهای ایزوزایمی مالات دهیدروژناز و استراز را به منظور شناسایی ایزوله‌های *گلوموس اتونیکاتوم* بکار بردند. بطور مشابهی، Giovannetti و همکاران (۲۰۰۳) پلی مورفیسم مالات دهیدروژناز و استراز را برای تمایز بین *گلوموس موسه‌ای* و *گلوموس کالدونیوم* بکار بردند. فیلوژنی قارچ‌های AM می‌تواند با توجه به تغییرات در توالی‌های نوکلئوتیدی کد کننده آنزیم‌های خاص بررسی گردد. بطور مشابهی توالی اسید آمینه آنزیم‌ها برای تفسیر وضعیت فیلوژنتیک قارچ‌های میکوریزی نیز بکار رفته است. فیلوژنتیک *گلوموس موسه‌ای* بوسیله Harrier و همکاران (۱۹۹۸) با مطالعه شباهت توالی نوکلئوتیدی در داخل ژن کد کننده آنزیم ۳ فسفوگلسیرات کیناز بررسی گردید. آن‌ها نتیجه گیری نمودند که در ژن این آنزیم، توالی‌های نوکلئوتیدی با قارچ‌های دیگر مشابه، ولی با گیاهان متفاوت بوده است.

پروفیل اسیدهای چرب

ارزیابی کمی و کیفی اسیدهای چرب می‌تواند نشان دهنده زیست توده قارچی در خاک باشد و برخی مواقع برای شناسایی کردن گونه‌های خاص قارچ‌های میکوریزی نیز بکار رود. Larson و همکاران (۱۹۹۸) اسیدهای چرب خنثی و فسفولیپید را در قارچ میکوریز *گلوموس اینترارادیسز* و چندین قارچ ساپروفیت ارزیابی نمودند. مقدار اسید چرب ۱۸:۲ امگا ۶ و۹ در قارچ‌های ساپروتروف غالب و در *گلوموس اینترارادیسز* کم برآورد گردید. یک اسید چرب منحصر به فرد در *گلوموس اینترارادیسز* مشاهده گردید که در قارچ‌های ساپروتروف دیگر مشاهده نگردید. بطور قابل توجهی ترکیب اسید چرب در *گلوموس اینترارادیسز* به چندین *گلوموس* و جدایه‌های دیگر *گلوموس اینترارادیسز* مشابه بوده است. بنابراین در این مورد اسیدهای چرب می‌تواند برای تشخیص قارچ‌های ساپروتروف و همزیست استفاده گردد. Larson و همکاران (۱۹۹۸) اسیدهای چرب ویژه را یک وسیله با ارزش در مطالعه میسلیوم‌های قارچ AM در خاک و تشخیص آنها پیشنهاد نموده‌اند. Jansa و همکاران (۱۹۹۹) نشان دادند که بیشتر قارچ‌های AM پروفیل‌های اسید چرب مشخصی دارند که از سایر موجودات متفاوت است. آنها سه گروه عمده از پروفیل‌های اسید چرب را شناسایی نمودند. Madan و همکاران (۲۰۰۲) در بررسی پروفیل‌های اسید چرب متیل استر در اسپور گونه‌های متفاوت قارچ‌های AM، اسید چرب ۱۶:۱ امگا ۹ کربنه را غالب و همچنین ۱۶:۱ امگا ۵ کربنه را یک اسید چرب نشانگر خوب برای شناسایی گونه‌های قارچ میکوریز AM معرفی نمودند. برای *جایگوسپورا مارگاریتا* (*Gigaspora margarita*) آنها ۲۱:۱ امگا ۹ کربنه را یک نشانگر مفید دانستند. پروفیل اسیدهای چرب می‌تواند دانش راجع به فیلوژنی قارچ‌های میکوریز آربوسکولار را افزایش دهند (۴۳).

موانع موجود در شناسایی مولکولی

محدودیت‌های متدولوژی و فقدان دانش تاکسونومی از مهم‌ترین مشکلات برای مطالعه تنوع قارچ‌های AM محسوب می‌شوند. برای درک بهتر مشکلات مربوط به مطالعه مولکولی جامعه قارچ‌های AM بهتر است که سیستم‌های بیولوژیک درگیر در شناسایی مولکولی آن‌ها با قارچ‌های اکتومیکوریزی مقایسه شوند. شناسایی مولکولی قارچ‌های اکتومیکوریزی پیش از شناسایی قارچ‌های AM شروع شده است (۲۱). سیستم‌های بیولوژیک قارچ‌های AM و قارچ‌های اکتومیکوریزی به لحاظ بعضی جنبه‌ها با هم تفاوت دارند. نسبت قارچ به بافت گیاهی در اکتو میکوریزا نسبت به AM بیشتر است. معمولاً نوک ریشه‌های اکتومیکوریزی با یک نوع قارچ اشغال می‌شوند که به آسانی قابل جداسازی می‌باشد. علاوه بر این، در نوک ریشه‌ها قارچ‌های دیگر نسبت به قارچ اکتومیکوریزی کمتر مشاهده می‌شوند. بنابراین بکار بردن یک آغازگر اختصاصی قارچی برای تمایز آن از DNA بافت گیاهی کافی است. همچنین این قارچ‌ها به صورت خالص و بدون هیچ گونه آلودگی[23] بر روی محیط‌های غذایی کشت می‌شوند و بنابراین کاربرد روش‌های بیولوژی ملکولی برای آن‌ها سریع‌تر و

[23] Axenic

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.1.1.2]

آسان‌تر می‌باشد. در قارچ‌های AM بدلیل این‌که، بافت‌های قارچی بطور عمیقی در ریشه‌ها نفوذ کرده و در سلول‌های آن محصور[24] می‌شوند، استخراج DNA آن‌ها به علت وجود اسیدهای نوکلئیک گیاه و نیز حضور قارچ‌های ساپروفیت و احتمالاً پاتوژن در ریشه‌ها مشکلات بیشتری به همراه دارد. برای غلبه بر این مشکلات، امروزه از آغازگرهای اختصاصی برای این قارچ‌ها استفاده می‌گردد. طراحی یک آغازگر اختصاصی برای قارچ‌های گلومالین بطور متمایز از سایر قارچ‌ها و گیاهان، مشکلی است که برای رفع آن بایستی از آغازگرهای اختصاصی برای هر گروه[25] استفاده شود (٦١). یک قطعه از ریشه می‌تواند بوسیله قارچ‌های AM مختلف کلنیزه شود. کمیت قارچ‌های اکتومیکوریزی را می‌توان از روی تعداد یا وزن نوک ریشه‌ها تعیین کرد ولی قارچ‌های AM را فقط می‌توان بوسیله کلن کردن محصولات PCR مجزا نمود (١٣، ٧٥) و با استفاده از تعداد نسبی کلن‌ها، کلنیزاسیون ریشه توسط گونه‌های آن را به صورت کمی بیان کرد (٢٧).

فقدان مفهومی روشن برای گونه و پلی مورفیسم ژن‌های نشانگری که در حال حاضر مورد استفاده هستند، توصیف دقیق گونه‌های قارچ AM بوسیله روش‌های مولکولی را با مشکل مواجه کرده است. توالی‌های DNA- ریبوزومی در اسپورهای منفرد قارچ‌های AM شدیداً پلی مورفیک یا چند شکلی[26] هستند که این حالت توسط Sander و همکاران (١٩٩٥)، Lloyd Macglip و همکاران (١٩٩٦) و Honsy و همکاران (١٩٩٩) گزارش و تأیید شده است. در سایر قارچ‌ها، توالی متغیر DNA- ریبوزومی در یک گونه، معمولاً یکسان است، ولی استثناهایی در قارچ‌های اکتومیکوریزی، قارچ‌های دیگر و گیاهان گزارش شده است.

به دلیل تغییرات مشاهده شده، منطقهITS در مجموعه ژنی DNA- ریبوزومی برای شناسایی تک اسپور قارچ‌های AM، به خصوص هنگامی که گونه یا جدایه‌های نزدیک به هم مورد مقایسه باشند، مناسب نیست (٦٠، ٦٦). برای مثال یک توالی از ITS را بندرت می‌توان دوبار به طور یکسان از یک اسپور بدست آورد. حتی هنگامی که توالی‌هایی از اسپورها و ریشه‌ها در یک محل مشخص از DNA- ریبوزومی در دسترس باشند، معمولاً شباهت کمی بین آن‌ها وجود دارد (٦١). بنابراین، مطالعات ملکولی جامعه قارچ‌های AM عمدتاً توالی گروه‌ها و نه گونه‌ها را شناسایی می‌کند. این گروه‌ها سرانجام ممکن است در ارتباط با گونه‌های متفاوت یا مشابه از نظر مورفولوژی پیدا شوند. هنگامی که تجزیه و تحلیل‌های فیلوژنی نشان دهد که یک توالی در بین توالی‌های نیایی یک گونه شناسایی شده بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیک قرار گرفته است، این شناسایی می‌تواند نسبتاً صحیح و مطمئن باشد. البته این شناسایی فقط در مواردی که توالی DNA کلن‌های متعددی از جدایه‌های یک گونه مورفولوژیک قابل دسترس باشند، مقدور است.

Clapp و همکاران (٢٠٠١) در یک بررسی پیشنهاد کرده‌اند که اسپورهای *گلوموس کروناتوم*[27] ممکن است حاوی ژن‌های ریبوزومی گونه‌هایی باشند که از نظر مورفولوژی با هم متفاوت هستند. آنها در بیشتر موارد، استخراجDNA برای تجزیه و تحلیل های ژنتیکی را با استفاده از جدایه‌های چند اسپوره و با تعداد زیاد اسپور انجام داده‌اند، بنابراین دقیقاً روشن نیست که این نتایج بیشتر منعکس کننده غیر یکنواختی جمعیت اسپورها و یا حضور مخلوط هسته‌های متفاوت می‌باشد.

از نظر مفهوم بیولوژیک، یک گونه واحد، متشکل از افرادی است که با هم پیوند نژادی یکسان دارند[28]. در مورد بعضی قارچ‌ها از آزمون‌های آمیزشی[29] برای تشخیص گونه استفاده می‌شود (٤). استفاده از این روش برای برخی قارچ‌ها از جمله قارچ‌های AM که به آسانی کشت نمی‌شوند و یا این‌که در شرایط آزمایشگاهی با هم آمیزش پیدا نمی‌کنند، مشکل است. امروزه روش‌های مولکولی با استفاده از کاربرد نشانگرهای ژنتیکی این توانایی را دارند تا جریان ژن‌ها را در قارچ‌هایی که خویش آمیزی دارند ولی قابل کشت نمی‌باشند، آشکار سازند. با استفاده از روش خالص سازی ژن‌ها و مطابقت دادن آن‌ها با مفهوم گونه فیلوژنتیک بر

[24] Embedded
[25] Group Specific Primers
[26] Highly Polymorphic in Single Spores

[27] *Glomus coronatum*
[28] A Species is a Unit of Interbreeding Individuals
[29] Mating Tests

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.1.1.2]

اساس شجره ژن[30] می‌توان گونه‌های متفاوت را تشخیص داد (۷۳). تاکنون با این روش، نشانه‌هایی از وجود گونه‌های مخفی[31] حتی در بین گونه‌هایی که از نظر مورفولوژی به خوبی شناسایی شده‌اند مشاهده شده است (٤٢). کاربرد مفاهیم مربوط به گونه فیلوژنتیک برای قارچ‌های AM بدلیل این‌که هسته‌های موجود در میسلیوم‌های بدون دیواره عرضی[32] آن‌ها از نظر ژنتیکی متفاوت هستند و تکثیر آن‌ها به روش غیر جنسی همسانه‌ای[33] انجام می‌شود مورد سؤال است (٤٤،٦١). اصولاً، این مفهوم برای دودمان‌هایی که تکثیر همسانه‌ای حقیقی[34] دارند قابل استفاده نیست زیرا ممکن است هر یک از گونه‌ها از نظر ژنتیکی از دودمان‌های دیگر جدا شده و بیانگر یک گونه متفاوت باشند (٦١). فرض شده است که پدیده ریسه پیوندی[35] بین میسلیوم‌های قارچ‌های AM می‌تواند دلیلی برای تبادل ژنتیکی باشد. با این وجود، گرچه این پدیده بین میسلیوم‌های مشابه و نسل‌های جدایه مشابه متداول است (٢٤) ولی هیچ مدرکی دال بر این‌که این پدیده بین افراد جدایه‌های مختلف نیز اتفاق می‌افتد، وجود ندارد (٦١).

علاوه بر موارد فوق، به دلیل اشتباه در تشخیص و یا در موارد دیگر به علت زیر سوال بودن توالی‌های ارائه شده در پایگاه داده‌ها، ابهاماتی برای شناسایی مولکولی بوجود آمده است (٦٢). بطور کلی، با توجه به تعدد توالی‌هایی که در پایگاه داده‌ها به صورت اشتباه نشانه گذاری شده‌اند و نیز به دلیل کثرت چند شکلی بودن DNA- ریبوزومی اسپورها و همچنین وجود DNA های خارجی در اسپورها، مفهوم گونه فیلوژنتیک برای گلومال‌ها و نیز جنبه‌های دیگری از ژنتیک آن‌ها به صورت یک معمای پیچیده باقی مانده است. بطور کلی، مطالعات نشان داده‌اند که یکی از چالش‌های تحقیقات میکوریزی درهزاره جدید، تعیین مفهوم و تعریف گونه میکوریز آربوسکولار و همچنین ارائه روش شناسایی دقیق آن می‌باشد.

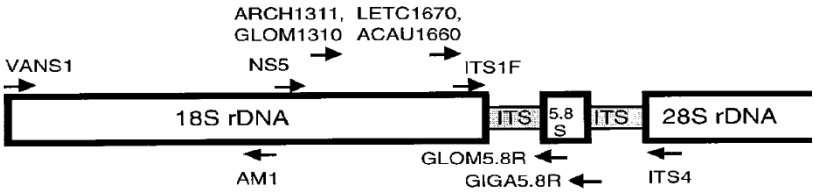
یکی از مشکلات ژنتیکی دیگر، تعیین نزدیک‌ترین خویشاوند به قارچ‌های AM است. Schussler و همکاران (۲۰۰۱) شاخه گلومرومیکوتا را براساس توالی‌های مربوط به زیر واحدهای کوچک DNA– ریبوزومی، به عنوان گروه خواهری شاخه آسکومیکوتا و بازیدیومیکوتا معرفی کردند. Corradi و همکاران (۲۰۰٤) براساس نتایج مطالعه بتا – توبولین ،گلومرومیکوتا را گروه خواهری شاخه کیتیریدیومیکوتا[36] معرفی کردند. Schussler و همکاران (۲۰۰۱) و همچنین Helgason و همکاران (۲۰۰۳) به ترتیب بر اساس تجزیه و تحلیل فیلوژنی توالی‌های زیر واحد کوچک DNA– ریبوزومی، توالی‌های اسید امینه اکتین و EF1-alpha[37] پیشنهاد داده‌اند که بعضی از گونه‌های موجود در راسته مورتییرلال[38] از رده زیگومیست، گروه خواهری قارچ‌های AM می‌باشد. از این رو مطالعات فیلوژنتیک بیشتری به منظور تعیین نزدیک‌ترین خویشاوند به گلومرومیکوتا مورد نیاز است. از آنجا که گروه مونوفیلتیک گلومرومیکوتا براساس مطالعه تک ژنی است، گام قانونی و یکی از چالش‌های تحقیقاتی در آینده این است که این فیلوژنی بوسیله تجزیه و تحلیل ژن‌های دیگر بررسی شود و اعتبار یابد.

اهمیت همزیستی میکوریزی در طبیعت و اثرات مفید آن روی بسیاری از فرآیندهای بیولوژیک، سبب شده که محققین میکوریزی جایگاه مناسبی برای توسعه تحقیقات میکوریزی در آینده داشته باشند. بنابراین، یکی از چالش‌های عمده برای محققین میکوریزی در سال‌های آتی، مطالعه و بررسی گسترده‌تر همزیستی میکوریزی و شناسایی دقیق گونه و ایزوله ها، و مطالعه آن در ارتباط با علوم مختلف بیولوژی و شرکت فعالانه در کلیه کنفرانس‌های بیولوژی و ژنتیک می‌باشد.

[30] Genealogical Concordance Phylogenetic Species Recognition (GCPSR)
[31] Cryptic Species
[32] Coenocytic Mycelium
[33] Clonally
[34] Truly Clonal Lineages
[35] Anastomosis

[36] Chytridiomycota
[37] Elongation Factor
[38] Mortierellales

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.1.1.2]



شکل۲- آغازگرهای اختصاصی طراحی شده توسط Redecker (۲۰۰۰) برای گروه‌های فیلوژنتیک قارچ‌های AM

منابع

۱. زارعی. م. (۱۳۸۲). بررسی اثرات متقابل سویه های ریزوبیومی حل کننده فسفات و قارچ های میکوریز آربوسکولار در رشد و جذب فسفر گیاه عدس، پایان نامه کارشناسی ارشد در رشته خاکشناسی (گرایش بیولوژی خاک) دانشگاه تهران. ۱۶۰ صفحه.

۲. زارعی. م. (۱۳۸۷). بررسی تنوع قارچ های میکوریز آربوسکولار در خاک های آلوده به فلزات سنگین و کارآیی آنها در گیاه پالایی، رساله دکتری در گرایش بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، گروه مهندسی علوم خاک، دانشکده مهندسی آب و خاک، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران. ۲۲۰ صفحه.

3. Alia, R. and Dodd, J.C. (1998). The screening of isolates of *Glomus etunicatum* for their effects on the growth of different plants and the presence of isozyme markers for detection in planta. Second International Conference on Mycorrhizas. Uppsala, Sweden, Http://www.mycorrhizas.ag.utk.edu.

4. Anderson, J.B. and Ullrich, R.C. (1979). Biological species of *Armillaria mellea* in North America. Mycologia 71: 402–414.

5. Antoniolli, Z.I., Schachtman, D.P., Ophel, K.K. and Smith, S.E. (2000). Variation in rDNA its sequences in *Glomus mosseae* and *Gigaspora margarita* spores from a permanent pasture. Mycol. Res. 104:708–715.

6. Avio, L. and Giovannetti, M. (1998). The protein patterns of spores of arbuscular mycorrhizal fungi: Comparison of species, isolates and physiological stages. Mycol. Res. 102:985-990.

7. B1aszkowski website –http://www.agro.ar.szczecin.pl/wjblaszkowski.

8. Bago. B., Bentivenga, S.P., Brenec, V., Dodd, J.C., Piche, Y. and Simon, L. (1998). Molecular analysis of *Gigaspora*, *Glomales*, *Gigasporaceae*. New Phytol. 139: 581–588.

9. Bever, J.D., Morton, J.B., Antonovics, J. and Schultz, P.A. (1996). Host-dependent sporulation and species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in a mown grassland. J. Ecol. 84: 71–82.

10. Cavalier-Smith, T. (1998). A revised six-kingdom system of life. Biol. Rev. 73: 203-266.

11. Clapp, J.P., Fitter, A.H. and Young, J.P.W. (1999). Ribosomal small subunit sequence variation within spores of an arbuscular mycorrhizal fungus, *Scutellospora* sp. Mol. Ecol. 8: 915- 921.

12. Clapp, J.P., Rodrigiues, A. and Dodd, J.C. (2001). Inter- and intra isolate rRNA large subunit variation in *Glomus cornatum* spores. New Phytol. 149: 539-554.

13. Clapp. J.P., Young, J.P.W., Merryweather, J.W. and Fitter, A.H. (1995). Diversity of fungal symbionts in arbuscular mycorrhizas from a natural community. New Phytol. 130:259–265.

14. Corradi, N., Kuhn, G .and Sanders, I.R. (2004). Monophyly of B-tubulin and H^+-ATPase gene Variants in *Glomus intraradices*: Consequences for molecular evolutionary studies of AM fungal species. Fun. Gen. Bio. 41: 262-273.

15. Daniell, T.J., Husband, R., Fitter, A.H. and Young, J.P.W. (2001). Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonising arable crops. FEMS Microbiol. Ecol. 36: 203–209.

16. Di Bonito, R, Elliott, M.L. and Des Jardin, E.A. (1995). Detection of an arbuscular mycorrhizal fungus in roots of different plant species with the PCR. Appl. Environ. Microbiol. 61:2809– 2810.

17. Dodd, J.C., Rosendahl, J., Giovannetti, M., Broome, A., Lanfranco, L. and Walker, C. (1996). Inter-and intergeneric variation within the morphological similar arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus mosseae* and *Glomus coronatum*. New Phytol. 133:113-122.

18. Douhan, G.W. and Rizzo, D.M. (2003). Amplified fragment length microsatellites (AFLM) might be used to develop microsatellite markers in organisms with limited amounts of DNA applied to arbuscular mycorrhizal (AM) fungi. Mycologia 95:368–373.

19. Douhan, G.W., Petersen, C., Bledsoe, C.S. and Rizzo, D.M. (2005). Contrasting root associated fungi of three common oak-woodland plant species based on molecular identification: host specificity or non-specific amplification? Mycorrhiza 15:365-372.

20. Edwards, S.G., Fitter, A.H. and Young, J.P.W. (1997). Quantification of an arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus mosseae* within plant roots by competitive polymerase chain reaction. Mycol. Res. 10:1440–1444.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.1.1.2]

21. Gardes, M. and Bruns, T.D. (1996). Community structure of ectomycorrhizal fungi in a *Pinus muricata* forest: Above- and below-ground views. Can. J. Bot. 74: 1572–1583.
22. Gerdemann, J.W. and Trappe, J.M. (1974). The Endogonaceae in the Pacific Northwest. Myco. Mem. 5: 1-76.
23. Giovannetti, M., Sbrana, C., Strani, P., Agnolucci, M., Rinauda, V. and Avio, L. (2003). Genetic diversityof isolates of *Glomus mosseae* fom different geographic areas detected by vegetative compatibility testing and biochemical molecular analysis. Appl. Environ. Microbiol. 69:616-624.
24. Giovannetti, M., Azzolini, D. and Citernesi, A.S. (1999). Anastomosis formation and nuclear and protoplasmic exchange in arbuscular mycorrhizal fungi. Appl. Environm. Microbiol. 65:5571–5575.
25. Griffin, D.H. (1992). Nucleic Acids and Nucleotides. Chapter 17 In: Arora DL, Elander RP and Mukerji KG (Eds.), Handbook of Applied Mycology. Dekker, New York, pp 445–473.
26. Harrier, L.A., Wright, F. and Horker, J.E. (1998). Isolation of the 3-phosphoglycerate kinase gene of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. Curr. Gen. 34:386-392.
27. Helgason, T., Fitter, A.H. and Young, J.P.W. (1999). Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonising Hyacinthoides non-scripta (bluebell) in a seminatural woodland. Molec. Ecol. 8: 659–666.
28. Helgason, T., Waston, I.J. and Young, J.P.W. (2003). Phyllogeny of the Glomerales and Diversisporales from actin and elongation factor 1- alpha sequences. FEMS Microbiol. Lett. 229:127-132.
29. Hempel, S., Renker, C. and Buscot, F. (2007). Differences in the species composition of arbuscular mycorrhizal fungi in spores, root and soil communities in grassland ecosystem. Environ. Microbiol. 9:1930-1938.
30. Hijri, M. and Sanders, I.R. (2004). The arbuscular mycorrhizal fungus Glomus intraradices is haploid and has a small genome size in the lower limit of eukaryotes. Fun. Gen. Biol. 41:253–261.
31. Hosny, M., Gianinazzi-Pearson, V. and Dulieu, H. (1998). Nuclear DNA contents of 11 fungal species in Glomales. Genome 41: 422–429.
32. Hosny, M., Higri, M., Passerieux, E. and Dulieu, H. (1999). rDNA units are highly polymorphic in *Scutellospora castanea* (Glomales, Zygomycetes). Gene 226: 61-71.
33. Hosny, M., Pais de Barros. J., Gianinazzi-Pearson, V. and Dulieu, H. (1997). Base comparison of DNA from Glomalean fungi; high amounts of methylated cytosine. Fun. Gen. Biol. 22:103–111.
34. INVAM web site, http://invam.caf.wvu.edu/
35. Jacquot, E., van Tuinen, D., Gianinazzi, S. and Gianinazzi- Pearson, V. (2000). Monitoring species of arbuscular mycorrhizal fungi in planta and in soil by nested PCR: application to the study of the impact of sewage sludge. Plant Soil 226:179 –188.
36. Jakobsen, I. and Rosendahl, I.L. (1990). Carbon flow into soil and external hyphae from roots of mycorrhizal cucumber roots. New Phytol. 115:77–83.
37. Jansa, J., Gryndler, M. and Matucha, M. (1999). Comparison of the lipid profiles of arbuscular mycorrhizal fungi and soil saprophytic fungi. Symbiosis 26:247-264.
38. Jansa, J., Mozafar, A., Anken, T., Ruh, R., Sanders, I.R. and Frossard, E. (2002). Diversity and structure of AMF communities as affected by tillage in a temperate soil. Mycorrhiza 12: 225–234.
39. Jumpponen, A., Trowbridge, J., Mandyam, K. and Johnson, L. (2005). Nitrogen enrichment causes minimal changes in arbuscular mycorrhizal colonization but shifts community composition – evidence from rDNA data. Biol. Fertil. Soils 41: 217–224.
40. Kirk, J.L., Beaudette, L.A., Hart, M., Moutoglis, P., Klironomos, J.N., Lee, H. and Trevors, J.T. (2004). Methods of studying soil microbial diversity. J. Microbiol. Methods 58:169-188.
41. Kjoller, R. and Rosendahl, S. (2001). Molecular diversity of Glomalean (arbuscular mycorrhizal) fungi determined as distinct *Glomus* specific DNA sequences from roots of field-grown peas. Mycol. Res. 105: 1027–1032.
42. Koufopanou, V., Burt, A. and Taylor, J.W. (1997). Concordance of gene genealogies reveals reproductive isolation in the pathogenic fungus *Coccidioides immitis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 5478–5482.
43. Krishna, K.R. (2005). Mycorrhiza, a molecular analysis. Science Publisher, Inc., NH, USA.
44. Kuhn, G., Hijri, M. and Sanders, I.R. (2001). Evidence for the evolution of multiple genomes in arbuscularmycorrhizal fungi. Nature 414: 745–748.
45. Lanfranco, L., Delpero, M. and Bonfante, P. (1999). Intrasporal variability of ribosomal sequences in the endomycorrhizal fungus Gigaspora margarita. Mol. Ecol. 8:37–45.
46. Larson, J., Olsson, P.A. and Jackobsen, I. (1998). The use of fatty acid signatures to study myceliel interactions between the arbuscular fungus *Glomus intraradices* and the saprophytic fungus *Fusarium culmorum* in roots free soil. Mycol. Res. 102:1491-1496.
47. Lloyd Macglip, S.A., Chambers, S.M., Dodd, J.C., Fitter, A.H., Walker, C. and Young, J.P.W. (1996). Diversity of the ribosomal internal transcribed spacers within and among isolates of *Glomus mosseae* and related mycorrhizal fungi. New Phytol. 133: 103–111.
48. Madan, R., Pankhurst, C., Hawke, B. and Smith, S. (2002). Use of fatty acids for identification of AM fungi and estimation of the biomass of AM spores in soil. Soil Biol. Biochem. 34:125-128.
49. Merryweather, J. and Fitter, A. (1998). The arbuscular mycorrhizal fungi of Hyacinthoides non-scripta: I. Diversity of fungal taxa. New Phytol. 138:117–129.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.1.1.2]

50. Morton, J.B. (1988). Taxonomy of VA mycorrhizal fungi: Classification, nomenclature, and identification. Mycotaxon 32: 267–324.
51. Morton, J.B. and Benny, G.L. (1990). Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): a new order, Glomales, two new suborders, Glomineae and Gigasporineae, and two new families, Acaulosporaceae and Gigasporaceae, with an emendation of Glomaceae. Mycotaxon 37: 471-491.
52. Morton, J.B. (1990). Species and clones of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales, Zygomycetes): their role in macro- and micro-evolution- ary processes. Mycotaxon 37: 493–515.
53. Morton, J.B. and Redecker, D. (2001). Two new families of Glomales, Archaeosporaceae and Paraglomaceae, with two new genera *Archaeospora* and *Paraglomus*, based on concordant molecular and morphological characters. Mycologia 93: 181–195.
54. Morton, J.B., Bentivenga, S.P. and Bever, J.D. (1994). Discovery, measurement, and interpretation of diversity in arbuscular endomycorrhizal fungi (*Glomales*, *Zygomycetes*). Can. J. Bot. 73:S25-S32.
55. Olsson, P.A., Thingstrup, I., Jakobsen, I. and Baath, E. (1999). Estimation of the biomass of arbuscular mycorrhizal fungi in a linseed field. Soil Biol. Biochem. 31:1879–1887.
56. Öpik, M., Moora, M., Liira, J., Kõljalg, U., Zobel, M. and Sen, R. (2003). Divergent arbuscular mycorrhizal fungal communities colonize roots of *Pulsatilla* spp. in boreal Scots pine forest and grassland soils. New Phytol. 160:581–593.
57. Raab, P.A. (2007). Development of new molecular markers for phylogeny and molecular identification of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). PhD thesis, University of Basel, Basel, Switzerland.
58. Reddy, S.M., Pindi, P.K. and Reddy, S.M. (2005). Molecular methods for research on arbuscular mycorrhizal fungi in India: problems and prospects. Cur. Sci. 89(10): 1966-1709.
59. Redecker, D. (2000). Specific PCR primers to identify arbuscular mycorrhizal fungi within colonized roots. Mycorrhiza,10: 73-80
60. Redecker, D. (2002 .)Molecular identification and phylogeny of arbuscular mycorrhizal fungi. Plant Soil 244: 67-73.
61. Redecker, D., Hijri, I. and Wiemken, A. (2003). Molecular identification of Arbuscular mycorrhizal fungi in roots: perspective and problems. Fol. Geobot. 38:113-124.
62. Redecker, D., Hijri, M., Dulieu, H. and Sanders, I.R. (1999). Phylogenetic analysis of a dataset of fungal 5.8S rDNA sequences shows that highly divergent copies of internal transcribed spacers reported from *Scutellospora castanea* are of ascomycete origin. Fun. Gen. Biol. 28:238–244.
63. Redecker, D., Morton, J.B. and Bruns, T.D. (2000). Ancestral lineages of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales). Mol. Phyl. Evol., 14 :276–284
64. Renker, C., Heinrichs, J., Kaldorf, M. and Buscot, F. (2003). Combining nested PCR and restriction digest of the internal transcribed spacer region to characterize arbuscular mycorrhizal fungi on roots from the field. Mycorrhiza 13:191–198.
65. Rosendahl, S. and Taylor, J.W. (1997). Development of multiple genetic markers for studies of genetic variation in arbuscular mycorrhizal fungi using AFLP. Mol. Ecol. 6: 821–829.
66. Sanders, I.R., Alt, M., Groppe, K., Boller, T. and Wiemken, A. (1995). Identification of ribosomal DNA polymorphism among and Within spores of the Glomales: application to studies on the genetic diversity of AMF communities. New Phytol. 130:419-427.
67. Schenck, N.C. and Perez, Y. (1990). Manual for the identification of VA mycorrhizal fungi .INVAM. Univ of Florida, Gainsville. 286 p.
68. Scheublin, T.R., Ridgway, K.P., Young, J.P.W. and van der Heijden, M.G.A. (2004). Nonlegumes, legumes, and root nodules harbor different arbuscular mycorrhizal fungal communities. Appl. Environ. Microbiol. 70:6240–6246.
69. Schussler, A., Schwarzott, D. and Walker, C. (2001). A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. Mycol. Res. 105: 1413-1421.
70. Schwarzott, D., Walker, C. and Schussler, A. (2001). *Glomus*, the largest genus of the arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales), is nonmonophyletic. Mol. Phyl. Evol. 12(2) :190-197.
71. Simon, L., Bousquet, J., Levesque, R.C. and Lalonde, M. (1993). Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. Nature 363: 67–69.
72. Simon, L., Levesque, R.C. and Lalonde, M. (1992). Identification of endomycorrhizal fungi colonizing roots by fluorescent single-strand conformation polymorphism–polymerase chain reaction. Appl. Environ. Microbiol. 59:4211–4215.
73. Taylor, J., Jacobson, D.J., Kroken, S., Kasugat, T., Geiser, D.M., Hibbett, D.S. and Fisher, M.C. (2000). Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. Fung. Gen. Biol. 31: 21–32.
74. Thingstrup, I., Rozycka, M., Jaffrin, P., Rosendahl, S. and Dodd, J.C. (1995). Detection of the arbuscular mycorrhizal fungus, *Scutellospora heterogama* within roots using polyclonal antisera. Myco. Res. 91:1232-1275.
75. van Tuinen, D., Jacquot, E., Zhao, B., Gollotte, A. and Gianinazzi- Pearson, V. (1998). Characterization of root colonization profiles by a microcosm community of arbuscular mycorrhizal fungi using 25S rDNA- targeted nested PCR. Mol. Ecol. 7:879-887.
76. Vandenkoornhuyse, P., Husband, R., Daniell, T.J., Watson, I.J., Duck, J.M., Fitter, A.M., Young, J.P.W. (2002). Arbuscular mycorrhizal community composition

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.1.1.2]

associated with two plant species in a grassland ecosystem. Mol. Eco. 11: 1555–1564.
77. Walker, C. (1992). Systematics and taxonomy of the arbuscular endomycorrhizal fungi (Glomales) - a possible way forward. Agronomie 12: 887-897.

78. Wang, B. and Qiu, Y.L. (2006). Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. Mycorrhiza 16: 299-363.

79. Wirsel, S.G.R. (2004). Homogenous stands of a wetland grass harbour diverse consortia of arbuscular mycorrhizal fungi. FEMS Microbiol. Ecol. 48:129–138.
80. Wostemeyer, J. and Burmester, A. (1986). Structural organization of the genome of the zygomycete Absidia glauca: evidence for high repetitive DNA content. Cur. Gen. 10: 903–907.
81. Wubet, T., Weiß, M., Kottke, I. and Oberwinkler, F. (2003). Morphology and molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in wild and cultivated yew (*Taxus baccata*). Can. J. Bot. 81:255–266.
82. Wubet, T., Weiß, M., Kottke, I. and Oberwinkler, F. (2004). Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in *Prunus africana*, an endangered medicinal tree species in dry Afromontane forests of Ethiopia. New Phytol. 161: 517–528.
83. Wyss, P. and Bonfante, P. (1993). Amplification of genomic DNA of arbuscular mycorrhizal fungi by PCR using short arbitrary primers. Mycol. Res. 97:1351–1357.
84. Xavier, L.J.C., Xavier, I.J. and Germedia, J.J. (2000). Potential of spore protein profiles as identification tools for arbuscular mycorrhizal fungi. Mycologia 92:1210-1213.
85. Zarei, M., Saleh-Rastin, N., Alikhani, H.A. and Aliasgharzadeh, N. (2006). Responses of lentil to co-inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi and phosphate solubilizing rhizobial strains. J. Plant Nut. 29(8):1509-1522.
86. Zarei, M., Saleh-Rastin, N., Salehi Jouzani, G.h., Savaghebi, G.h. and Buscot, F. (2008a). Arbuscular mycorrhizal abundance in contaminated soils around a zinc and lead deposit. Eur. J. Soil Biol. 44: 381–391.
87. Zarei, M., Koenig, S., Hempel, S., Khayam Nekouei, M., Savaghebi, G.h. and Buscot, F. (2008b). Community structure of arbuscular mycorrhizal fungi associated to *Veronica rechingeri* at the Anguran zinc and lead mining region, Environ. Pollut. 156 :1277–1283.

Zhu, Y.G. and Miller, R.M. (2003). Carbon cycling by arbuscular mycorrhizal fungi in soil-plant systems. Trends in plant sci. 8 (9): 407-509

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.1.1.2]