



دانشگاه گبید کاووس

نشریه "حفظ و زیست یوم گیاهان"

دوره هفتم، شماره چهاردهم

<http://pec.gonbad.ac.ir>

شناسایی قارچ‌های اکتو میکوریز در ختان راش (Fagus orientalis Lipsky) در راشستان- های بالابند جنگل‌های سنگده مازندران

حامد آقاجانی^{۱*}، سید محمد حجتی^۲، محمدرضا پور مجیدیان^۳، علی برهانی^۴

^۱دکتری تخصصی گروه جنگلداری، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری

^۲دانشیار گروه جنگلداری، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری

^۳دانشیار گروه گیاه‌پژوهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری

^۴استادیار مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان مازندران، ایستگاه تحقیقات جنگل و مرتع پاسند، بهشهر

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۴/۲۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۲/۰۱

چکیده

قارچ‌های اکتو میکوریز نقش مهمی در سلامت و پایداری جنگل و حفظ درختان در مقابل بیمارگرها در اکوسیستم جنگل دارند. در این تحقیق قارچ‌های اکتو میکوریز در راشستان‌های بالابند جنگل سنگده (استان مازندران) و بر اساس استخراج دی‌ان‌ای از ریشه‌ها و توالی‌یابی ناحیه ITS از دی‌ان‌ای ریبوزومی قارچ‌ها مورد شناسایی قرار گرفتند. برای این منظور در محدوده ارتفاعی ۱۵۰۰ تا ۲۱۰۰ متری از سطح دریا، تعداد ۳۰ قطعه نمونه و در هر قطعه نمونه یک درخت به‌طور تصادفی انتخاب و نمونه‌برداری از ریشه‌ها به عمق ۱۰ سانتی‌متری و با فاصله ۶۰ سانتی‌متر از تنه درخت انجام گرفت. عمل استخراج دی‌ان‌ای از نمونه‌های نوک ریشه طبقه‌بندی شده انجام گرفت. ناحیه ITS nrDNA با استفاده از زوج آغازگرهای ITS4 و ITS1F یا ITS4B یا ITS4 تکثیر و توالی‌یابی گردید. مقایسه توالی‌های به دست آمده با توالی‌های موجود در بانک داده‌های NCBI^۱ حضور ۱۵ گونه قارچ اکتو میکوریز را در ریشه‌های این گیاهان نشان داد. از بین گونه‌های شناسایی شده، ۱۲ گونه شامل *R. integriformis* *R. faginea* *R. brevipes*, *C. trivialis* *Russula chloroides* *Lactarius chrysorrheus* *L. hepaticus* *C. collinitus* *C. Cortinarius alpinus* *C. rigens* *Hebelomabulbiferum* *C. alboaggregatus* و *Russula* *Cortinarius* بیشترین نوع گونه‌ای را در منطقه موردمطالعه نشان دادند و جنس‌های *Inocybe* در رتبه‌های بعدی قرار گرفتند. با شناخت قارچ‌های اکتو میکوریز بومی در مناطق مختلف می‌توان با تلقیح برخی از آن‌ها به نهال‌های جنگلی، توانایی‌های آن‌ها در برنامه‌های احیا و مدیریت بهینه جنگل و جنگل‌کاری استفاده نمود.

^۱*نویسنده مسئول: Hamed_Aghajani@ut.ac.ir

مقدمه

جنگل‌های شمال کشور جزو جنگل‌های کهن دنیا و پهنه برگ خزان‌کننده هستند که از نظر تنوع گیاهی جزو جنگل‌های غنی دنیا و قدمت بیش از یک میلیون سال محسوب می‌باشد. درخت راش (Fagus orientalis Lipsky) مهم‌ترین گونه اقتصادی جنگل‌های هیرکانی ایران است (مروری مهاجر، ۱۳۹۰). نیازهای اکولوژیکی و شرایط خاص رویشگاهی راش مانند دامنه‌های مه‌گیر و مرطوب با خاک غنی شرایط مناسبی را برای رویش انواع مختلف قارچ‌ها فراهم می‌آورد، به طوری که در همه فصل‌ها گونه‌های متنوعی از قارچ‌ها در این جنگل‌ها مشاهده می‌شود. گیاهان برای بهبود رشد و عملکرد و نیز غلبه بر تنش‌های زنده و غیرزنده، ارتباطات همزیستی با قارچ‌ها را تشکیل می‌دهند که به نام قارچ‌ریشه (میکوریزا) خوانده شده‌اند (Lapeyrie et al., 1991; Hoffland et al., 2004). یک گروه مهم از این قارچ‌های همزیست، قارچ‌های اکتومیکوریز هستند که بیشتر با درختان جنگلی مناطق سرد، معتدل تا استوایی به خصوص درختان تیره Fagaceae همزیستی برقرار می‌کنند (Smith and Read, 2008; Morris et al., 2009; Courty et al., 2010). اکتومیکوریزها با افزایش جذب آب و موادغذایی از خاک به طور عمده باعث بهبود سلامت میزبان می‌شوند. علاوه بر این، قارچ‌های اکتومیکوریز می‌توانند سمیت فلزات سنگین را کاهش دهند و درختان را قادر به زیستن در خاک‌های آلوده به فلزات سنگین می‌کنند (Wilkinson and Dickinson, 1995; Meharg and Cairney, 2000).

مطالعات مختلفی در مورد شناسایی قارچ‌های اکتومیکوریز در جنگل‌های معتدل به خصوص روی جنس راش انجام گرفته است (Orlovich and Cairney, 2004; Buée et al., 2005; Grebenc and Kraigher, 2007; Gebhardt et al., 2007; Montoya et al., 2010; Pena et al., 2010; Nouhra et al., 2012; Nouhra et al., 2013). در برخی موارد تحقیق در جنگل‌های معتدل بر روی جنس راش، نتایج تحقیق اولویج و کارنی (Orlovich and Cairney, 2004) در نیوزلند بر روی درخت راش جنوبی (*Nothofagus*) بیشتر از هر میزبانی، میزبان انواع مختلف قارچ‌های اکتومیکوریزی شامل *Lactarius*, *Clavulina*, *Laccaria*, *Inocybe*, *Cortinarius*, *Hebeloma* و *Geophilum* بود. گریبنس و کریگر (Grebenc and Kraigher, 2007) در جنگل‌های راش در کشور اسلوونی پس از مطالعه مولکولی قارچ‌های اکتومیکوریز همزیست با راش (*Fagus sylvatica* L.) به این نتیجه رسیدند که قارچ *Cenococcum geophilum* در جنگل‌های راش بیشترین فراوانی را به طور معنی‌داری داشته است.

نوهرا و همکاران (Nouhra et al., 2012) در جنگل‌های معتدل پاتاگونیا آرژانتین به این نتیجه رسیدند که غنا و بیومس اندام بارده قارچ اکتمیکوریز نشان از تفاوت بین گونه‌های جنس راش *Nothofagus* و *Nothofagus pumilio* و *dombeyi* در گردایان ارتفاعی جنگل و میزان بارش بوده است. وانگ و همکاران (Wang et al., 2011) به مطالعه قارچ‌های اکتمیکوریز درختان *Castanopsis fargesii* ITS شناسایی کردند که ۱۴ گونه جنگل‌های چین پرداختند و ۱۷ گونه قارچ اکتمیکوریز در ناحیه ITS شناسایی کردند که ۱۴ گونه متعلق به بازیدیومیستها و سه گونه متعلق به آسکومیستها بودند. بیشترین فراوانی در خانواده‌های *Russula* sp.1، *Lactarius* sp.، *Thelephoraceae* و *Russulaceae* بوده است. آرایه‌های Lang et al., 2011 به ترتیب گونه‌های غالب بودند. لانگ و همکاران (Tomentella sp.2) غنای گونه‌ای و دامنه میزبانی قارچ‌های میکوریز را در جنگل‌های آمیخته پهنبه‌برگ اروپای مرکزی مطالعه کردند و به این نتیجه رسیدند که درختان جنس‌های افرا (*Acer*) و زبان‌گنجشک (*Fraxinus*) با قارچ‌های میکوریز آربوسکولار و درختان نمدار (*Tilia*)، ممرز (*Carpinus*) و راش (*Fagus*) با قارچ‌های اکتمیکوریز ارتباط همزیستی داشتند. فراوانی نسبی گونه‌ای در درختان راش، نمدار و ممرز به ترتیب کاهش داشته است. در جنگل‌های آرژانتین نوهرا و همکاران (Nouhra et al., 2013) به بررسی جوامع قارچ‌های اکتمیکوریز همزیست با گونه‌های راش (*Nothofagus*) پرداختند و به این نتیجه رسیدند که اختلاف معناداری بین تیپ‌های مختلف راش با تنوع زیستی قارچ‌ها وجود دارد و ارتفاع از سطح دریا تأثیر زیادی در ساختار قارچ‌های اکتمیکوریز همزیست با گونه‌های جنس راش (*Nothofagus spp.*) داشته است. در پژوهش انجام گرفته توسط بهرام و همکاران (Bahram et al., 2012) در جنگل‌های هیرکانی ایران (اسالم، نوشهر و سوادکوه) و بر اساس مطالعات مولکولی ناحیه ITS بیشترین فراوانی به ترتیب به آرایه‌های *Cenococcum geophilum*، *Inocybe*، *Clavulina*، *Tomentella*، *Cortinarius* و *Hydnnum* تعلق داشته است.

همچنین در مطالعه شناسایی قارچ‌های اکتمیکوریز همزیست با درختان بلوط در جنگل‌های بینشکی و خیروod مازندران، جنگل لوه و توسکستان گلستان و جنگل سیاهکل و شفارود گیلان، ۴۹ آرایه شناسایی شد که متعلق به ۱۳ جنس *Hebeloma*، *Cortinarius*، *Boletus*، *Amanita*، *Scleroderma*، *Russula*، *Lycoperdon*، *Lactarius*، *Laccaria*، *Inocybe*، *Hygrophorus*، *Russula*، *Lactarius* و *Tricholoma* بودند. در این مطالعه گونه‌های جنس‌های *Inocybe* غالبهای افت شده را شامل می‌شدند (زمانی، ۱۳۹۳). مطالعه و معرفی قارچ‌های اکتمیکوریز درختان راش در راشستان‌ها، می‌تواند در سلامت و پایداری جنگل و حفظ درختان در مقابل بیمارگرها در اکوسیستم جنگل و همچنین تولید نهال‌های مقاوم‌تر مؤثر باشد. با توجه به اینکه راش از لحاظ چوب گونه مهم اقتصادی و از لحاظ اکولوژیکی در توالی جنگل مهم است

و اطلاعات اندکی درباره قارچ‌های اکتو میکوریز درختان راش در جنگل‌های شمال ایران وجود دارد، بنابراین هدف این مطالعه شناسایی قارچ‌های اکتو میکوریز درختان راش در راشستان‌های بالابند جنگل‌های سنگده مازندران است.

مواد و روش‌ها

منطقه مورد مطالعه

این پژوهش در جنگل‌های سنگده مازندران، سری فلورد در قسمت جنوب شرقی شهر پل‌سفید مرکز شهرستان سوادکوه با مختصات طول جغرافیایی^۱ ۵۳°۷' و عرض جغرافیایی^۲ ۳۶°۵' تا ۳۶°۵' انجام شده است. ارتفاع از سطح دریا در این محدوده بین ۱۵۰۰ تا ۲۱۰۰ متر، متوسط بارش سالیانه آن ۸۵۸ میلی‌متر و مساحت سری فلورد ۹۲۹ هکتار می‌باشد. بر اساس روش آمیرزه منطقه مورد مطالعه دارای اقلیم سرد و مرطوب می‌باشد. جهت عمومی شیب در جنگل‌های سری فلورد، شمالی و شمال غربی است. میزان متوسط شیب حدود ۴۵٪ است که شیب حداقل منطقه ۵٪ و حداً کثر آن ۹۰٪ است. گونه‌های درختی اصلی این سری شامل راش، ممرز، گیلاس و حشی، بارانک، توسکا، پلت، نمدار، ملح، شیردار، بلندمازو، انجیلی می‌باشد و تیپ‌های جنگلی عمدۀ آن شامل راش، راش- ممرز، راش - انجیلی، ممرز بلوط می‌باشد. بیشترین درصد را راش به خود اختصاص می‌دهد و ۶۷٪ سطح را می- پوشاند و راشستان‌های منطقه سنگده از لحاظ کیفیت جزو راشستان‌های منحصر به فرد و معروف در ایران می‌باشند (بی‌نام، ۱۳۸۸).

روش نمونه‌برداری

طی سال‌های ۱۳۹۳ تا ۱۳۹۴، تعداد ۳۰ پلات و در هر پلات یک درخت به‌طور تصادفی در منطقه مورد مطالعه انتخاب شد. با توجه به اینکه بیشترین غالبیت و هم‌بیستی اکتو میکوریزها در این عمق می‌باشد، نمونه‌برداری از ریز ریشه‌ها به عمق ۱۰ سانتی‌متر و با فاصله ۶۰ سانتی‌متر از تنه درخت انجام گرفت (Bruns, 1995; Bakker et al., 2000; Ciu and Mu, 2016). خاک از سطح ریشه‌ها شسته شده و از هر سیستم ریشه‌ای تعداد ۱ تا ۸ نوک ریشه (Huang et al., 2014) بر اساس نوع رنگ سطحی، شکل و خصوصیات مورفولوژیکی شامل ساده (بدون شاخه و انشعاب)، باریک ریخت، هرمی (Nara et al., 2003; Ishida et al., 2007; Agere 1987-2012; Peterson et al., 2004) شکل(۱).



شکل ۱- جنگل موردمطالعه و نحوه نمونهبرداری و نوک ریشه‌ها

DNA استخراج

برای استخراج دیانای از بافت‌های گیاهی از روش زمانی (۱۳۹۳) و آقاجانی و همکاران (Aghajani et al., 2019A) به شرح زیر عمل گردید. عمل تخریب دیواره سلولی به‌منظور استخراج DNA توسط ساییدن بافت نوک ریشه درون میکروتیوب ۲ میلی‌لیتری با نیتروژن مایع صورت گرفت. سپس به هریک از نمونه‌ها مقدار ۶۰۰ میکرولیتر بافر CTAB [۱۰۰ میلی‌مولار تریس، ۲۰ میلی‌مولار EDTA و ۱/۴ مولار کلرید سدیم و وزن حجمی از CTAB دو درصد، (pH= 8)] افزوده شد. به‌منظور حذف پروتئین‌ها، پلی‌ساکاریدها و پلی‌فنول‌های ریشه گیاه که می‌توانند از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز ممانعت کنند، دو میلی‌گرم پلی‌وینیل پیرولیدین (PVP) دو درصد، ۱۰ میکرولیتر بتا-مرکاپتواتانول دو درصد و نیز ۵ میکرولیتر از پروتئیناز K (۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به هر نمونه افزوده شد و پس از ورتكس در حمام بن‌ماری با دمای ۶۵ درجه سلسیوس به مدت نیم ساعت نگهداری شدند. سپس هم‌حجم لوله‌ها محلول کلروفرم: ایزوامیل الکل (۲۴:۷:۱) اضافه شد و لوله‌ها به‌آرامی به مدت ۳ دقیقه

به منظور مخلوط شدن محتويات آن‌ها سر و ته شدند. اين لوله‌ها به مدت ۱۵ دقيقه در سانتريفيوژ با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقيقه سانتريفيوژ شدند و درنهایت لایه بالايی که حاوي DNA می‌باشد به ميكروتيب جديد منتقل گردید. رسوب‌دهی DNA با اضافه نمودن ۸٪ حجم ايزوپروپانول سرد، چندين مرتبه سر و ته کردن آرام لوله‌ها و درنهایت نگهداري به مدت حداقل دو ساعت در فريزر با دماي ۲۴-درجه سلسيوس صورت گرفت. سپس سانتريفيوژ نمونه‌ها به مدت ۲۴ دقيقه با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقيقه در دماي ۴ درجه سلسيوس انجام گرفت. مایع روبي دور ريخته شد و DNA رسوب کرده با افروden ۵۰۰ ميكروليلتر از اتانول ۷۰ درصد سرد شستشو داده شد. عمل سانتريفيوژ مجدداً به مدت ۳ دقيقه و با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقيقه انجام گرفت. اتانول روبي دور ريخته شد و ميكروتيب‌ها به طور وارونه روی دستمال کاغذی قرار گرفتند تا رسوب DNA در مجاورت هوا خشک گردد. سپس ۵۰ ميكروليلتر آب ديونيزه استريل به رسوب DNA اضافه شد. به محلول فوق يك ميكروليلتر RNase (۲۰ ميلي گرم بر ميلي ليلتر) اضافه شد و به مدت ۱۵ دقيقه در دماي ۲۴ درجه سلسيوس نگهداري گردد. ميكروتيب‌ها يك شب در يخچال نگهداري شدند تا DNA کاملاً در آب حل گردد و سپس در دماي ۸-۱۰ درجه سلسيوس نگهداري گردد.

واكنش زنجيره پلي مراز (PCR)

تکثیر DNA در حجمي معادل ۲۵ ميكروليلتر از مخلوط واكنش PCR master mix (PCR)، شامل ۱۸ ميكروليلتر آب ديونيزه، ۲ ميكروليلتر بافر ۱۰ PCR ۰/۶ غلظتی، ۰/۶ ميكروليلتر محلول حاوي ۵۰ ميلي مول $MgCl_2$ ، ۰/۴ ميكروليلتر از محلول ۱۰ ميلي مول dNTPs حاوي ۲/۵ ميلي مول از هربك ۱ ميكروليلتر dNTP، ۰/۵ ميكروليلتر محلول حاوي پنج واحد آنزيم Smart Taq DNA polymerase از آغازگر ITS1F، ۱ ميكروليلتر از محلول حاوي ۱۰ پيكومول ITS4 و ۱/۵ ميكروليلتر از آغازگر ITS4B (White et al., 1990; Gardes and Bruns, 1993) از آغازگر ITS4B يا ITS4 يا ۱۰ پيكومول از آغازگر ITS1F. كليه مواد بهكارفته در مخلوط PCR از شركت سيناژن تهيه شدند.

برنامه حرارتی برای واكنش PCR به صورت مرحله واسرتستگی مقدماتی (Initial denaturation) به مدت پنج دقيقه در دماي ۹۵ درجه سلسيوس (يک چرخه)؛ مرحله واسرتستگی (Denaturation) به مدت ۳۰ ثانية در دماي ۹۴ درجه سلسيوس، مرحله اتصال (Annealing) به مدت ۳۰ ثانية در دماي ۵۵ درجه سلسيوس، مرحله گسترش (Extension) به مدت يك دقيقه در دماي ۷۲ درجه سلسيوس

۳۵) چرخه) و مرحله گسترش نهایی (Final extension) به مدت ۵۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس بود (Gardes and Bruns 1993). پس از انجام واکنش، برای مشاهده محصول تکثیرشده PCR الکتروفورز در ژل آگارز ۱/۵ درصد انجام گرفت. محصولات تکثیرشده PCR برای تعیین توالی به شرکت تکاپوزیست ارسال شدند. توالی‌های به دست آمده بررسی شده و با نرمافزار Bio Edit نسخه (v7.1.9) (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>) اصلاح شدند. سپس با استفاده از برنامه جستجوی بلاست با توالی‌های ذخیره شده در بانک داده‌های ژنی مقایسه شدند. آن‌هایی که بیشترین شباهت را داشتند مشخص گردیدند. اسمی گونه‌ای به جدایه‌هایی داده شد که شباهت توالی ۹۰-۹۷ درصد یا مساوی ۹۸ درصد داشتند (Horton et al., 2013)، برای اسمی جنس، شباهت‌های ۹۰-۹۷ درصد و آن‌هایی که شباهت کمتر از ۹۰ درصد داشتند در حد خانواده نامیده شدند (Huang et al., 2014). توالی‌های به دست آمده در این مطالعه در بانک داده‌های ژنی ثبت و شماره دستیابی آن‌ها در جدول ۱ ذکر شده است.

نتایج

نتایج پژوهش حاضر از بررسی ۱۵۵ نوک ریشه درختان راش بررسی شده در جنگلهای سنگده استان مازندران، حضور ۳۰ آرایه قارچی اکتوミکوریز متعلق به جنس‌های *Cortinarius*, *Russula*, *Hebeloma* و *Lactarius*, *Inocybe* قارچ‌های شناسایی شده، جنس اکتوミکوریز *Cortinarius* بیشترین فراوانی را در منطقه موردمطالعه داشت. همچنین ۱۲ گونه قارچ اکتوミکوریز شامل *Cortinarius Russula chloroides*, *Cortinarius Russula integriformis*, *Russula faginea*, *Russula brevipes*, *trivialis Lactarius Lactarius hepaticus*, *Cortinarius collinitus*, *Cortinarius alpinus*, *ricens* ایران گزارش شدند. گونه‌هایی که برای ایران جدید بوده‌اند، با علامت ستاره در جدول ۱ مشخص شدند. همچنین نتایج شناسایی نشان داد که کمتر از ۵۰ درصد از خانواده *Cortinariaceae* هستند که بیشترین فراوانی بوده است و *Inocybaceae* با ۷ درصد کمترین فراوانی را داشته است.

جدول ۱- قارچ‌های اکتومیکوریز شناسایی شده از درختان راش

نطایق (%)	کد دسترسی ژن بانک	آرایه قارچ اکتومیکوریز	شماره پلات
100%	KU237246.1	<i>Russula chloroides</i> (Krombh.) Bres (1900) *	۱
99%	KX034107	<i>Cortinarius trivialis</i> J.E. Lange (1940) *	۲
96%	KX243305	<i>Cortinarius</i> sp.	۳
99%	KX263000	<i>Russula delica</i> Fr.,(1838) *	۴
89%	KX395724	Russulaceae	۵
83%	KX148082	Cortinariaceae	۶
91%	KX395716	<i>Cortinarius</i> sp.	۷
99%	KX263001	<i>Russula delica</i> Fr. (1838) *	۸
99%	KX263002	<i>Russula brevipes</i> Peck (1890) *	۹
99%	KX101232	<i>Russula faginea</i> Romagn (1967) *	۱۰
87%	KX395717	Cortinariaceae	۱۱
99%	KX263003	<i>Russula chloroides</i> (Krombh.) Bres (1900) *	۱۲
98%	KX263004	<i>Russula integriformis</i> Sarnari (1994) *	۱۳
90%	MG595231	<i>Cortinarius</i> sp.	۱۴
99%	KX263005	<i>Cortinarius rigens</i> (Pers.) Fr. (1838) *	۱۵
99%	KX263006	<i>Cortinarius alpinus</i> Boud (1895) *	۱۶
98%	KX263007	<i>Cortinarius collinitus</i> (Sowerby) Fr. (1838) *	۱۷
97%	KX263008	<i>Russula</i> sp.	۱۸
95%	KX395718	<i>Cortinarius</i> sp.	۱۹
97%	KX395719	<i>Cortinarius</i> sp.	۲۰
93%	KX395720	<i>Cortinarius</i> sp.	۲۱
99%	KX263009	<i>Inocybe adaequata</i> (Britzelm.) Sacc (1887)	۲۲
99%	KX263010	<i>Lactarius hepaticus</i> Plowr (1905) *	۲۳
100%	KX266252	<i>Lactarius chrysorrheus</i> Fr.(1838) *	۲۴
100%	KX395722	<i>Lactarius subdulcis</i> (Pers.) Gray (1821)	۲۵

ادامه جدول (۱)

نام و نویسنده	تعداد گونه	نام گونه	شماره پلاس
آرایه قارچ اکتومیکوریز	۲۶	<i>Lactarius</i> sp.	
KX395721	۹۲%		
Cortinarius sp.	۲۷	KX395723	۹۷%
<i>Inocybe</i> sp.	۲۸	KX423958	۹۱%
<i>Cortinarius alboaggregatus</i> Soop (2005) *	۲۹	KX266253	۱۰۰%
<i>Hebeloma bulbiferum</i> Maire (1937) *	۳۰	KX266254	۹۸%

بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه تعداد ۱۵ گونه متعلق به جنس‌های *Lactarius*, *Russula*, *Cortinarius* و *Hebeloma* در سطح جنس و گونه مشخص شدند. جنس *Russula* و *Cortinarius* با تعداد ۵ گونه و بعداز آن جنس *Lactarius* با ۳ گونه دارای بیشترین تنوع گونه‌ای بودند و جنس‌های *Inocybe* و *Hebeloma* با یک گونه کمترین تنوع گونه‌ای را دارا بودند. در مطالعه انجام گرفته روی قارچ‌های اکتومیکوریز درختان راش در جنگل‌های نیوزیلند، جنس *Cortinarius* و *Russula* به عنوان یکی از فراوان‌ترین جنس‌های قارچ‌های اکتومیکوریز شناسایی گردید (Dickie et al., 2009). در مطالعه دیگری در نیوزیلند، مشخص شد که درخت راش جنوبی (*Nothofagus*) بیش از هر میزان دیگری، تنوع قارچ‌های اکتومیکوریز شامل *Clavulina*, *Laccaria*, *Inocybe*, *Cortinarius*, *Hebeloma* و *Amanita* و برای دیگر جنس راش (*Fagus*), قارچ‌های اکتومیکوریز *Boletus* و *Lactarius* را دارا بودند (Orlovich and Cairney, 2004). اورکلی و همکاران (Urclay et al., 2017) در طول گرادیان ارتفاعی در جنگل‌های دست کاشت کاج (*Pinus elliottii*) به مطالعه قارچ‌های اکتومیکوریز پرداختند و به این نتیجه رسیدند که در ارتفاعات ۹۰۰، ۱۶۰۰ و ۲۲۰۰ قارچ اکتومیکوریز *Suillus granulatus* و در ارتفاعات پایین‌تر قارچ اکتومیکوریز *Rhizopogon pseudoroseolus* و *Thelephora terrestris* پراکنش داشتند. درواقع حضور قارچ‌های اکتومیکوریز در زون‌های ارتفاعی مختلف شرایط را برای کاج‌ها فراهم می‌کند. در مطالعه انجام گرفته برای شناسایی قارچ‌های اکتومیکوریز درختان راش، مشخص شد که بیشتر این قارچ‌ها متعلق به شاخه بازیدیومیکوتا و خانواده‌های *Tricholomataceae* و *Cortinariaceae* بودند. فاکتورهای سن گیاه، نوع فصل، مدیریت جنگل و تکنیک پرورش جنگل بر روی قارچ‌های اکتومیکوریز تأثیرگذار هستند و طبق مطالعات قبلی

برخی از قارچ‌های اکتومیکوریز می‌توانند با گونه‌های مختلف راش جنوبی *Nothofagus* همزیست شوند. بیشترین فراوانی در فصل پاییز مربوط به *Cortinarius* sp. 1 و *Tricholomataceae* بود و در فصل بهار⁶ 2 و *Cortinarius* sp. 2 بوده است. همچنین در این مطالعه جنس‌های *Clavulina*, *Hebeloma*, *Inocybe*, *Lactarius*, *Russula*, *Cortinarius* با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد (Fernández et al., 2015). در مقابل در جنگل‌های معتدله پاتاگونیا آرژانتین، غنای گونه‌ای با تیپ جنگل راش *Nothofagus dombeyi* و *Nothofaguspumilio* در ارتباط بود، در صورتی که زیست‌توده اندام‌های باردهی قارچ با عکس‌العمل‌های بین نوع فصل و تیپ جنگل در ارتباط بود. همچنین غنای گونه‌ای و زیست‌توده اندام‌های باردهی با میزان بارش همبستگی مثبت و با ارتفاع از سطح دریا همبستگی منفی داشته است (Nouhra et al., 2012).

نتایج این پژوهش نشان داد بیشترین فراوانی مربوط به خانواده *Cortinariaceae* و *Russulaceae* بوده است. در مطالعه قارچ‌های میکروسکوپی در توده‌های راش در جنگل مازندران قارچ‌های خانواده *Russulaceae* بیشترین فراوانی را داشته‌اند و ۱۲ گونه از خانواده *Russulaceae* و هشت گونه از خانواده *Cortinariaceae* گزارش شدند (برهانی و همکاران، ۱۳۹۳). در ایران تاکنون ۴۰ جنس و ۲۳۰ گونه از قارچ‌های اکتومیکوریز گزارش شده‌اند که بیشترین غنای گونه‌ای مربوط به جنس *Russula* با ۴۳ گونه است. همچنین ۱۸ گونه از جنس *Cortinarius*, ۱۷ گونه از جنس *Amanita*, ۱۰ گونه از جنس *Lactarius*, هشت گونه از جنس *Inocybe* و ۱۲ گونه از جنس *Boletus* گزارش شده‌اند (ارشاد، ۱۳۸۸). بعد از خانواده *Cortinariaceae* در این پژوهش خانواده *Russulaceae* بیشترین پراکنش را داشته است که قارچ‌های خانواده *Russulaceae* هم در جنگل‌های معتدله گزارش شده که یکی از خانواده اکتومیکوریزهاست که دارای پراکنش وسیع در جهان است (Mueller et al., 2007). قارچ *Cenococcum geophilum* در جنگل‌های راش (L.) (*Fagussylvatica*) اسلوونی بیشترین فراوانی را داشته است (Grebenc and Kraigher, 2007) که در این پژوهش شناسایی نشد. در واقع در مقیاس جهانی و منطقه‌ای، دما و میزان بارش تأثیر زیادی بر غنای گونه‌ای قارچ‌های اکتومیکوریز می‌گذارد (Tdersoo et al., 2012; Bahram et al., 2012; Aghajani, 2012). بنابراین تفاوت در نوع منطقه رویشگاهی، نوع گونه میزبان و توده گیاهی، باعث تفاوت در حضور یا عدم حضور بعضی از گونه‌های قارچ اکتومیکوریز می‌شود. عوامل متعددی در نوع، حضور و ترکیب قارچ‌های اکتومیکوریز نقش دارند. عوامل مختلف زنده و غیرزنده مانند شرایط رویشگاهی، تنوع گونه‌ای و ویژگی‌های خاک (Aghajani, 2012).

2019B (et al., 2012) گونه‌های میزبان (Kennedy, 2010)، رقابت (Tedesco et al., 2006)، پراکنش (Peay et al., 2007)، تراکم مواد مغذی خاک (Toljander et al., 2006) و آبوهوا (Bahram et al., 2012; Tedesco et al., 2012) در حضور و تنوع قارچ‌ها یاکتومیکوریز تأثیرگذار بوده است. تاسdale و همکاران (2013) نشان دادند که گونه‌های مختلف قارچ جنس *Nothofagus* با درختان راش *Cortinarius* همزیستی داشته‌اند که با نتایج این مطالعه همخوانی دارد. توصیف تنوع زیستی قارچ‌های اکتومیکوریز در اکوسیستم‌های جنگلی یک پیش‌نیاز برای تجزیه و تحلیل ساختار و نقش عملکردی آن‌ها است. در سال‌های قبل شناسایی گونه‌های قارچ‌های Straatsma et al., 2001; Smith et al., 2001؛ (al., 2002). تولید اندام بارده بستگی به شرایط محیطی مثل رطوبت و دما دارد و بعضی از قارچ‌ها هرسال اندام بارده تولید نمی‌کنند. بنابراین به هنگام توصیف جوامع قارچ‌های اکتومیکوریز، واضح است که باید خود قارچ‌های اکتومیکوریز مطالعه شوند تا قارچ‌هایی مشخص شوند که ارتباط فعالی باریشه‌های گیاهان داشته‌اند (Sakakibara et al., 2002). بنابراین نوک ریشه‌های اکتومیکوریزی می‌توانند با توصیف مورفو‌لوزیکی طبقه‌بندی مورفو‌تاپ شوند (Agerer, 2001). امروزه تکثیر DNA برای حل برخی مشکلات سیستماتیکی مرتبط با شناسایی موجودات زنده بکار گرفته شده است. قارچ شناسان، لوكوس ITS را به عنوان بارکد رسمی انتخاب کردند (Schoch et al., 2012)، اما در برخی گروه‌ها گونه‌های متفاوت توالی‌های يکسان داشتند، در حالی که در برخی گروه‌های دیگر چندین فرم ITS در داخل یک ژنوم واحد وجود داشته است (Hibbet, 2016). همچنین امروزه علاوه بر ناحیه ITS از لوكوس‌های متعددی غیر از ITS مثل ITS *cox*, *alpha-tub*, *beta-tub*, *mcm*, *rpb2*, *actin* و ... هم برای شناسایی استفاده می‌شود (Schoch et al., 2012). بنابراین با توجه به ثبت توالی در بانک NCBI و UNIT و موجود بودن اطلاعات، روش مولکولی امروزه کمک شایانی در جهت شناسایی برخی گونه‌ها را فراهم می‌کند. شناسایی و بررسی امکان تکثیر بعضی از این قارچ‌ها که نقش مهمی در رشد و مقاومت نهال‌های جنگلی دارد و می‌توان با تلقیح برخی از این قارچ‌ها با نهال‌های گلستانی در نهالستان، برای احیای جنگل‌های مخروبه در جنگل‌های طبیعی در فضای باز و نزدیک به توده جنگل، جنگل کاری کاربردی پیاده کرد.

منابع

- ارشاد، ج. ۱۳۸۸. قارچ‌های ایران. انتشارات موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی ایران. چاپ سوم. ۵۳۱ صفحه.
بی‌نام، ۱۳۸۸. طرح جنگلداری سری فلوره. اداره کل منابع طبیعی استان مازندران-ساری، ۲۱۰ صفحه.

- مروی مهاجر، م.ر. ۱۳۹۰. جنگل‌شناسی. انتشارات دانشگاه تهران، چاپ سوم، ۴۸۳ صفحه.
- برهانی، ع.، علی‌موسی‌زاده، س.، بدیلیان، س. ۱۳۹۳. معرفی قارچ‌های ماکروسکوپی در توده‌های راش استان مازندران. نشریه پژوهش‌های علوم و فناوری چوب و جنگل. ۲۰(۳): ۲۴-۴۰.
- زمانی، س.م. ۱۳۹۳. شناسایی قارچ‌های اکتومیکوریز درختان بلوط در برخی جنگل‌های ایران و بررسی پروفایل متابولیکی و ترانسکریپتومیکی ریشه‌های همزیست *Quercus castaneifolia*. رساله دکتری دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس. ۲۰۰ صفحه.
- Aghajani, H., Hojjati, S.M., Tajick-Ghanbari, M.A., Pourmajidian, M.R., Borhani, A. 2019A. Molecular Identification of Ectomycorrhizal Fungal Communities Associated with Oriental Beech Trees (*Fagus orientalis* Lipsky) in Hyrcanian Forest of Iran. Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science, 43:25-32.<https://doi.org/10.1007/s40995-017-0435-2>
- Aghajani, H., Hojjati, S.M., Tajick-Ghanbari, M.A., Pourmajidian, M.R., Borhani, A. 2019B. The relationship between Ectomycorrhizal fungi and some soil chemical properties in beech stands of Farim, Mazandaran province. Iranian Journal of Forest and Poplar Research, 26(4):459-470. 10.22092/ijfpr.2018.118577
- Agerer, R. 1987-2012. Colour Atlas of Ectomycorrhizae. München, 302 Einhorn-Verlag. Separate pagination.
- Agerer, R. 2001. Exploration types of ectomycorrhizae. Mycorrhiza, 11(2): 107-114.
- Bahram, M., Pöhlme, S., Köljalg, U., Zarre, S., Tedersoo, L. 2012. Regional and local patterns of ectomycorrhizal fungal diversity and community structure along an altitudinal gradient in the Hyrcanian forests of northern Iran. New Phytologist, 193(2): 465–473.
- Bakker, M.R., Garbaye, J.Nys, C. 2000. Effect of liming on the ectomycorrhizal status of oak. Forest Ecology and Management, 126(2):121–131.
- Brunns, T.D. 1995. Thoughts on the processes that maintain local species diversity of ectomycorrhizal fungi. Plant and Soil, 170(1): 63–73.
- Buée, M., Vairelles, D., Garbaye, J. 2005. Year-round monitoring of diversity and potential metabolic activity of the ectomycorrhizal community in a beech (*Fagus sylvatica*) forest subjected to two thinning regimes. Mycorrhiza, 15(4): 235–245.
- Cui, L., Mu, L.Q. 2016. Ectomycorrhizal communities associated with *Tilia amurensis* trees in natural versus urban forests of Heilongjiang in northeast China. Journal of Forestry Research, 27(2): 401-406.
- Courty, P.E., Buée, M. Diedhiou,A.G., Frey-Klett, P., Le Tacon, F. Rineau, F., Turpault, M.P., Uroz, S. Garbaye, J. 2010. The role of ectomycorrhizal

- communities in forest ecosystem processes: New perspectives and emerging concepts. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(5): 679-698.
- Dickie, I.A., Richardson, S.J. Wiser, S.K. 2009. Ectomycorrhizal fungal communities and soil chemistry in harvested and unharvested temperate *Nothofagus* rainforests. *Canadian Journal of Forest Research*, 39(6): 1069-1079.
- Fernández, N.V., Marchelli, P., Gherghel, F., Kost, G., Fontenla, S.B. 2015. Ectomycorrhizal fungal communities in *Nothofagus nervosa* (Raulí): a comparison between domesticated and naturally established specimens in a native forest of Patagonia, Argentina. *Fungal Ecology*, 18: 36-47.
- Gardes, M., Bruns, T.D. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 2(2): 113-118.
- Gebhardt, S., Neubert, K., Wöllecke, J., Münzenberger, B., Hüttl, R.F. 2007. Ectomycorrhiza communities of red oak (*Quercus rubra* L.) of different age in the Lusatian lignite mining district, East Germany. *Mycorrhiza*, 17(4): 279-290.
- Grebenc, T., Kraigher, H. 2007. Types of ectomycorrhiza of mature beech and spruce at ozone-fumigated and control forest plots. *Environmental Monitoring and Assessment*, 128(1-3): 47-59.
- Horton, B.M., Glen, M., Davidson, N.J., Ratkowsky, D., Close, D.C., Wardlaw, T.J., Mohammed, C. 2013. Temperate eucalypt forest decline is linked to altered ectomycorrhizal communities mediated by soil chemistry. *Forest Ecology and Management*, 302: 329-337.
- Huang, J., Nara, K., Zong, K., Wang, J., Xue, S., Peng, K., Sheng, Z.H., Lian, C. 2014. Ectomycorrhizal fungal communities associated with Masson pine (*Pinus massoniana*) and white oak (*Quercus fabri*) in a manganese mining region in Hunan Province, China. *Fungal Ecology*, 9: 1-10.
- Hibbett, D. 2016. The invisible dimension of fungal diversity. *Science*, 351(6278): 1150-1151.
- Hoffland, E., Kuyper, T.W., Wallander, H., Plassard, C., Gorbushina, A.A., Haselwandter, K., Holmström, S., Landeweert, R., Lundström, U.S., Rosling, A., Sen, R., Smits, M.M., van Hees, P.A.W., van Breemen, N. 2004. The role of fungi in weathering. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 2(5): 258-264.
- Ishida, T.A., Nara, K., Hogetsu, T. 2007. Host effects on ectomycorrhizal fungal communities: insight from eight host species in mixed conifer-broadleaf forests. *New Phytologist*, 174(2): 430-440.

- Kennedy, P. 2010. Ectomycorrhizal fungi and interspecific competition: species interactions, community structure, coexistence mechanisms, and future research directions. *New Phytologist*, 187(4): 895–910.
- Lapeyrie, F., Ranger, J., Vairelles, D. 1991. Phosphate solubilizing ability of ectomycorrhizal fungi in vitro. *Canadian Journal of Botany*, 69(2): 342-346.
- Lang, C., Seven, J., Polle, A. 2011. Host preferences and differential contributions of deciduous tree species shape mycorrhizal species richness in a mixed central European forest. *Mycorrhiza*, 21(4): 297-308.
- Orlovich, D.A., Cairney, J.W.G. 2004. Ectomycorrhizal fungi in New Zealand: current perspectives and future directions. *New Zealand Journal of Botany*, 42(5): 712–738.
- Meharg, A.A., Cairney, J.W.G. 2000. Co-evolution of mycorrhizal symbionts and their hosts to metal-contaminated environments. *Advances in Ecological Research*, 30: 69–112.
- Montoya, L., Haug, I., Bandala, V.M. 2010. Two *Lactarius* species associated with a relict *Fagus grandifolia* var. *mexicana* population in a Mexican montane cloud forest. *Mycologia*, 102(1): 153–162.
- Morris, M.H., Pérez-Pérez, M.A., Smith, M.E., Bledsoe, C.S. 2009. Influence of host species on ectomycorrhizal communities associated with two co-occurring oaks (*Quercus* spp.) in a tropical cloud forest. *FEMS Microbiology Ecology*, 69(2): 274-287.
- Mueller, G.M., Schmit, J.P., Leacock, P.R., Buyck, B., Cifuentes, J., Desjardin, D.E., Halling, R.E., Hjortstam, K., Iturriaga, T., Larsson, K.H., Lodge, D.J. 2007. Global diversity and distribution of macrofungi. *Biodiversity Conservation*, 16(1): 37-48.
- Nara, K., H. Nakaya, B. Wu, Z. Zhou, Hogetsu, T. 2003. Underground primary succession of ectomycorrhizal fungi in a volcanic desert on Mount Fuji. *New Phytologist*, 159(3): 743-756.
- Nouhra, E., Urcelay, C., Longo, S., Fontenla, S. 2012. Differential hypogeous sporocarp production from *Nothofagus dombeyi* and *N. pumilio* forests in southern Argentina. *Mycologia*, 104(1): 45–52.
- Nouhra, E., Urcelay, C., Longo, S., Tedersoo, L. 2013. Ectomycorrhizal fungal communities associated to *Nothofagus* species in northern Patagonia. *Mycorrhiza*, 23(6): 487-496.
- Pena, R., Offermann, C., Simon, J., Naumann, P.S., Geßler, A., Holst, J., Dannenmann, M., Mayer, H., Kögel-Knabner, I., Rennenberg, H., Polle, A. 2010. Girdling affects ectomycorrhizal diversity and reveals functional differences of EM community composition in a mature beech forest (*Fagus sylvatica*). *Applied and Environmental Microbiology*, 76(6): 1831–1841.

- Peay, K.G., Bruns,T.D., Kennedy,P.G.,Bergemann,S.E.,Garbelotto, M. 2007. A strong species-area relationship for eukaryotic soil microbes: island size matters for ectomycorrhizal fungi. *Ecology Letters*, 10(6): 470–480.
- Peterson, R.L., Massicotte, H.B.,Melville, L.H. 2004. Mycorrhizas: anatomy and cellbiology. NRC Research Press.
- Sakakibara, S.M., Jones,M.D.,Gillespie, M., Hagerman, S.M.,Forrest, M.E.,Simard, S.W.,Durall, D.M. 2002. A comparison of ectomycorrhiza identification based on morphotyping and PCR-RFLP analysis. *Mycological Research*, 106(08): 868-878.
- Schoch, C. L., Seifert,K.A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge,J.L., Levesque, C.A.,Chen,W., Miller, A.N. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(16): 6241-6246.
- Smith, J.E., Molina, R., Huso, M.M., Luoma, D.L., McKay, D., Castellano, M.A., Lebel, T. and Valachovic, Y.2002. Species richness, abundance, and composition of hypogeous and epigeous ectomycorrhizal fungal sporocarps in young, rotationage, and old-growth stands of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) in the Cascade Range of Oregon, U.S.A. *Canadian Journal of Botany*, 80: 186-204.
- Straatsma, G., Ayer,F., Egli, F. 2001. Species richness, abundance, and phenology of fungal fruit bodies over 21 years in a Swiss forest plot. *Mycological Research*, 105: 515-523.
- Smith, S., Read, D. 2008. *Mycorrhizal Symbiosis*, 3rd ed. Academic press, New York. 800pp.
- Teasdale, S.E., Beulke, A.K.,Guy, P.L.,Orlovich, D.A. 2013. Environmental barcoding of the ectomycorrhizal fungal genus *Cortinarius*. *Fungal Diversity*, 58(1): 299-310.
- Tedersoo L, Bahram, M., Toots, M., Diedhiou, A.G., Henkel, T.W., Kjøller, R., Morris, M.H., Nara, K., Nouhra, E., Peay, K.G., Polme, S., Ryberg, M.,Smith, M.E., Köljalg, U. 2012. Towards global patterns in the diversity and community structure of ectomycorrhizal fungi. *Molecular Ecology*,21(17):4160–4170.
- Toljander, J.F., Eberhardt,U., Toljander, Y.K.,Paul,L.R.,Taylor, A.F.S. 2006. Species composition of an ectomycorrhizal fungal community along a local nutrient gradient in a boreal forest. *New Phytologist*, 170(4): 873–884.
- White, T.J., Bruns, T.D.,Lee, S., Taylor, J. 1990. Analysis of phylogenetic relationships by amplification and direct sequencing of ribosomal RNA genes. In: Innis, M.A., D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, and T.J. White (Eds.), *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, New York, USA, pp 315–322.

- Wang, Q., Cheng, G., Liang-Dong, G. 2011. Ectomycorrhizae associated with *Castanopsis fargesii* (Fagaceae) in a subtropical forest, China. *Mycological Progress*, 10(3): 323-332.
- Wilkinson, D.M., Dickinson, N.M. 1995. Metal resistance in trees the role of mycorrhizae. *Oikos*, 72: 298-300