



نامه علمی

DOI: 10.22092/irm.2018.116432



تاریخ دریافت ۱۳۹۶/۰۸/۰۶
تاریخ پذیرش ۱۳۹۶/۱۱/۲۳

کاربرد بارکد گذاری DNA توسط مارکر ریبوزومی ITS در شناسایی و طبقه بندی مولکولی قارچ های اکتومیکوریز

سیده معصومه زمانی^{۱*}، ناصر صفایی^۲، ابراهیم محمدی گل تپه^۳ و محمدرضا عارفی پور^۴

چکیده

همزیستی اکتومیکوریزی، همزیستی گسترده میان قارچ های خاکزی و ریشه های درختان جنگلی است که در استقرار و عملکرد گیاهان در اکوسیستم های جنگلی نقش مهمی ایفا می کند. شناسایی قارچ های اکتومیکوریز، گام نخست تمام مطالعات مرتبط با این همزیستی بوده و برای بهره برداری از حداکثر ظرفیت آن در مدیریت جنگل امری ضروری است. در دهه اخیر، تکنیک های مولکولی آنالیز DNA برای حل چالش های تاکسونومی مرتبط با شناسایی قارچ های اکتومیکوریز در سطح نوک ریشه های به دست آمده از عرصه، به خصوص وقتی داده های ریخت شناسی متمایز کننده نبوده، استفاده شده است. تحقیق حاضر با هدف معرفی و تأیید کارایی آنالیز های مولکولی DNA و مطالعات فیلوژنی در شناسایی قارچ های اکتومیکوریز درختان بلوط (*Quercus sp.*) در جنگل های شمال کشور اجرا شد. در بازدید از این جنگل ها، نوک ریشه های اکتومیکوریزی درختان بلوط جمع آوری و برای شناسایی مولکولی قارچ ها ناحیه ITS۱-۵/۸S-ITS۲ با آغازگرهای گونه های قارچی، تکثیر و تعیین توالی شد. سپس تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی آنها به همراه توالی های موجود در پایگاه های معتبر با روش بیس (Bayesian method) صورت گرفت که نتیجه آن شناسایی ۴۹ تاکسون مختلف از قارچ های اکتومیکوریز متعلق به ۱۳ جنس بود. این بررسی نشان داد جمعیت متنوعی از قارچ های اکتومیکوریز در جنگل های هیرکانی همراه درختان بلوط وجود دارد و استفاده از توالی ناحیه ITS+DNA برای شناسایی این قارچ ها در عرصه های جنگلی ایران است.

واژه های کلیدی: تاکسونومی مولکولی، قارچ های اکتومیکوریز، جنگل های هیرکانی

The Application of DNA Barcoding Using Ribosomal ITS Marker for the Identification and Molecular Taxonomy of Ectomycorrhizal Fungi

S. M. Zamani^{1*}, N. Safaie², E. Mohammadi Goltape³ and M. R. Arefipoor⁴

Abstract

Ectomycorrhizal associations between soil fungi and the roots of forest trees are almost universal and play an important role in the establishment and function of these plants in forest ecosystems. Identification of ectomycorrhizal fungi is the first step of all studies related to this symbiosis and is essential to exploit its maximum potential in forest management. In the last decade, molecular DNA analysis techniques have been used to solve the systematic challenges associated with the identification of ectomycorrhizal fungi at root tips obtained from the ecosystems, especially when the morphological data are not distinctive. The present study was designed with the aim of using ITS rDNA sequences and their molecular phylogenetic analyses to identify the ectomycorrhizal fungi associating with oak trees (*Quercus sp.*) in the northern forests of Iran. In present study, ectomycorrhizal root tips of oak trees were collected for molecular identifications. Molecular analysis involved sequencing of ITS1-5.8S-ITS2 region and Bayesian phylogenetically analysis with other sequences on website databases. A total of 49 taxa of ectomycorrhizal fungi belonging to 13 genera were identified. This study documented high ectomycorrhizal diversity in Hyrcanian forests in association with oak trees, and confirmed ITS sequences have reliable divergence useful in ectomycorrhizal fungi delimitation in forests.

Keywords: Molecular taxonomy, Ectomycorrhizal fungi, Hyrcanian forests

*- نویسنده مسئول، پژوهشگر مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران، پست الکترونیک: zamani832003@yahoo.com
۲- دانشیار، گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۳- استاد، گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۴- پژوهشگر، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

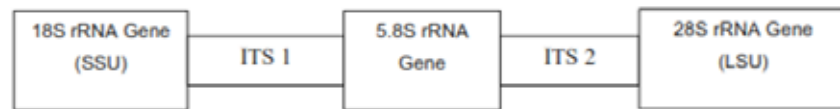
1*- Corresponding author, Research Expert, Research Institute of Forests and Rangelands, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran. E_mail: Zamani832003@yahoo.com
2- Associate Professor, Department of Plant Pathology, College Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
3- Professor, Department of Plant Pathology, College Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
4- Research Expert, Research Institute of Forests and Rangelands, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran

● مقدمه

شناسایی گونه قارچ‌های برقرارکننده همزیستی اکتومیکوریزی در تمام مطالعاتی که به بررسی جنبه‌های مختلف این همزیستی می‌پردازند، ضروری است. بیشتر شناسایی این قارچ‌ها از روی اسپوروکارپ‌های آنها صورت می‌گرفت؛ بدین صورت که ریخت‌شناسی اسپوروکارپ‌ها در سطح میکروسکوپی و ماکروسکوپی برای بسیاری از خانواده‌های قارچی در کلیدهای معتبر (van der Westhuizen & Eicker 1994; Brundrett et al., 1996; Courtecuisse 1999) توصیف شده و از این کلیدها برای شناسایی نمونه قارچی در سطح جنس و گونه استفاده می‌شود. اما باید توجه داشت فاکتورهای متعددی (نظیر میزان بارندگی و دما) تأثیر بسزایی روی تشکیل یا عدم تشکیل اسپوروکارپ این قارچ‌ها دارند؛ از سوی دیگر برخی از گونه‌ها اندام باردهی مشخصی را تولید نمی‌کنند یا به ندرت تولید می‌کنند (Jonsson et al., 1999). از این رو نبود اسپوروکارپ یک گونه قارچی، الزاماً نشان‌دهنده فقدان آن گونه در ریزوسفر نیست؛ بنابراین در این گونه مطالعات نمی‌توان تخمین درستی از تنوع و فراوانی جمعیت قارچ‌های اکتومیکوریز به دست آورد زیرا در آنها تنها به شناسایی قارچ‌هایی که در مرحله زایشی هستند پرداخته شده و از قارچ‌هایی که در مرحله رویشی بوده و با نوک‌ریشه‌های گیاهان همزیستی اکتومیکوریزی را تشکیل داده اما اسپوروکاری تولید نکرده‌اند، چشم‌پوشی می‌شود (Dahlberg 2001; Jonsson et al., 1999). به همین دلیل، به تدریج دانشمندان سعی کردند راه‌هایی برای شناسایی قارچ‌های اکتومیکوریز در سطح نوک‌ریشه بیابند. برای مثال آگر (Agerer, 1986-2006) و اینگلی و همکاران (Ingleby et al., 1990) به تعریف ویژگی‌های مختلفی نظیر ریخت‌شناسی و رنگ نوک‌ریشه‌های درگیر در همزیستی اکتومیکوریزی، نحوه انشعاب یافتگی آنها، ریخت‌شناسی هیف قارچ در درون

و سطح غلاف ماتل و نیز بافت غلاف، حضور یا فقدان ریزومرف در همزیستی‌های اکتومیکوریزی مختلف پرداختند تا بدین ترتیب امکان شناسایی همزیست قارچی حداقل تا سطح جنس فراهم شود. اما به‌کارگیری این روش‌های شناسایی وقتی با تعداد زیادی نمونه مواجه هستیم، چندان عملی نیست و علاوه بر این همیشه با به‌کارگیری این تکنیک‌های نه‌چندان دقیق و وقت‌گیر نمی‌توان قارچ همزیست را تا سطح گونه به‌درستی شناسایی کرد. اما به‌کارگیری تکنیک‌های مولکولی موجب رفع ابهامات تاکسونومیکی (White et al., 1990; Gardes & Bruns 1993; Weiß et al., 1998) و نیز بررسی دقیق ترکیب و تنوع جمعیت‌های

همزیستی اکتومیکوریزی، به‌خصوص شناسایی همزیستی‌های قارچی این همزیستی صورت نگرفته است. دلیل اصلی این مسئله، مشکل بودن شناسایی قارچ‌های دخیل در این همزیستی، به‌خصوص در سطح نوک‌ریشه است. در تحقیق حاضر، شناسایی قارچ‌های اکتومیکوریز همراه با درختان بلوط در برخی جنگل‌های شمال کشور از طریق تجزیه و تحلیل‌های مولکولی و فیلوژنتیکی صورت گرفت. برای این منظور تکثیر و تعیین توالی نواحی ITS این گونه‌های قارچی برای شناسایی دقیق نوک‌ریشه‌های اکتومیکوریزی جمع‌آوری شده به‌کار گرفته شد.



شکل ۱- نواحی مورد مطالعه در شناسایی مولکولی قارچ‌ها؛ ITS2 و ITS1 توسط ژن بسیار حفاظت شده 5.8S جدا شده و در دو طرف آنها ژن‌های 28S و 18S قرار گرفته است (Hawley, 2006)

شناسایی
گونه قارچ‌های
برقرارکننده همزیستی
اکتومیکوریزی در تمام مطالعاتی
که به بررسی جنبه‌های مختلف
این همزیستی می‌پردازند،
ضروری است.

● اقدام‌ها و یافته‌ها

در این تحقیق ریشه‌های اکتومیکوریزی درختان بلوط (سه گونه -*Quercus cas-taneifolia* C.A.Mey., *Q. macranthera* Fisch. & C.A.Mey و *Q. petraea* L.) از شش رویشگاه طبیعی در سه استان شمال کشور جمع‌آوری شد. این رویشگاه‌ها شامل جنگل‌های خیرود و بینشکی در استان مازندران، جنگل‌های سیاهکل و سفارود در استان گیلان و جنگل‌های لوه و توسکستان در استان گلستان بودند. به‌منظور شناسایی

قارچ‌های اکتومیکوریز (Burke et al., 2005) شده است؛ به‌خصوص زمانی که داده‌های ریخت‌شناسی قادر به تعیین دقیق مرز میان گونه‌های نزدیک به هم نیست. اغلب این تکنیک‌ها شامل استخراج DNA ریبوزومی و تکثیر ناحیه Internal Transcribed Spacer (ITS) هستند (شکل ۱؛ Hawley 2006). این ناحیه در نتیجه داشتن بخش‌های ترجمه‌نشده، بسیار ناهمگون است؛ این خصوصیت این ناحیه را به ابزار ارزشمندی برای تفکیک گونه‌های مرتبط و نزدیک تبدیل ساخته است (White et al., 1990). توالی نواحی رمزگردان RNA ریبوزومی زیرواحد کوچک و زیرواحد بزرگ بسیار حفاظت شده‌تر بوده و در شناسایی‌ها و گروه‌بندی‌هایی در سطوح بالاتر از گونه نیز سودمند و قابل استفاده هستند؛ به‌طور معمول از توالی این نواحی در مطالعات تاکسونومی در سطوح خانواده استفاده می‌شود (Gardes & Bruns, 1993). در ایران تاکنون مطالعات چندانی روی



قارچ‌های اکتومیکوریز همزیست با ریشه درختان بلوط، از هر رویشگاه حداقل ۱۰ پایه از درختان سالم و شاداب گونه‌(های) بلوط موجود با رعایت پراکنش مناسب (حداقل فاصله ۵۰ متری) به صورت تصادفی انتخاب شد. سپس از قسمت سایه‌انداز درخت (فاصله حدود نیم تا یک متری از قاعده درخت)، نمونه‌های ترکیبی از خاک به همراه ریشه از عمق صفر تا ۲۰-۳۰ سانتی متری ریزوسفر هر گیاه بلوط جمع‌آوری شده (شکل ۲) و در کوتاه‌ترین زمان ممکن با رعایت شرایط خنکی به آزمایشگاه منتقل شدند (Morris *et al.*, 2009).

پس از بررسی میکروسکوپی نمونه‌های گیاهی و گروه‌بندی نوک ریشه‌های اکتومیکوریزایی با خصوصیات ریخت‌شناسی مشابه (مانند رنگ ماتل، خصوصیات سطح ماتل، نحوه انشعاب‌یافتگی و غیره) به دسته‌های مشخص (شکل ۳)، برای

شناسایی مولکولی قارچ‌های همزیست، ناحیه ITS1-5.8S-ITS2 توسط آغازگرهای گونه‌های قارچی تکثیر و تعیین توالی شد. آغازگرهای مورد استفاده ITS1F (آغازگر پیشرو) و ITS4B یا ITS4 (آغازگرهای معکوس) بودند (White *et al.*, 1990; Gardes & Bruns, 1993). استخراج DNA و واکنش PCR مطابق روش‌های ذکر شده در منابع (Gardes 2006; Bruns 1993; Hawley 2006) انجام شد. پس از تکثیر، برای مشاهده محصول PCR و ردیابی قطعه DNA ریبوزومی تکثیر شده، الکتروفورز با ژل آگارز ۲ درصد صورت گرفت. باندهای تکی که از غلظت خوبی روی ژل برخوردار بودند، مورد توالی‌یابی قرار گرفتند. توالی‌های به دست آمده با توالی‌های قارچی موجود در پایگاه اطلاعاتی (GenBank Altschul., 1997 *et al.*) و (UNITE Kõljalg *et al.*, 2005) مورد مقایسه قرار گرفتند. توالی‌های به دست آمده در این مطالعه و توالی‌های

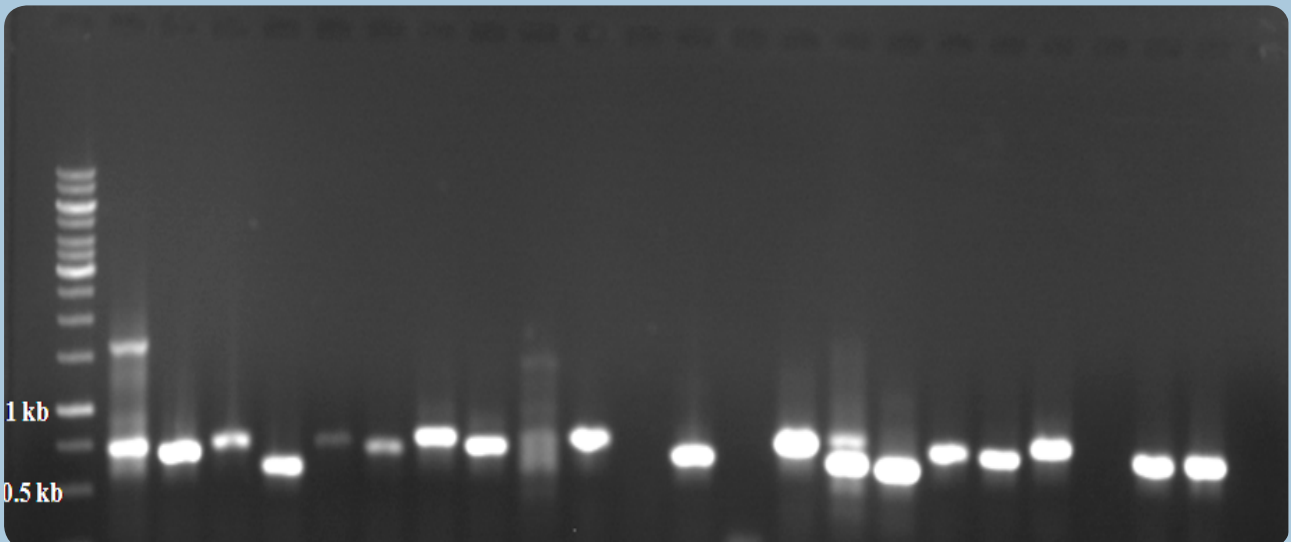
انتخاب شده از دو پایگاه ذکر شده قبل با استفاده از نرم‌افزار ClustalX هم‌ردیف شده (Thornhill *et al.*, 2006) و نقاط مهم به صورت چشمی ویرایش یا حذف شدند. مدل تکاملی مربوطه با استفاده از نرم‌افزارهای PAUP و MrModeltest2 انتخاب شد. تجزیه و تحلیل فیلوژنی و ترسیم درخت تبارشناسی مربوطه با روش بیس (Bayes) توسط نرم‌افزار MrBayes v. 3.12 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003) انجام شد (شرافتی و همکاران، ۱۳۹۳). مورفوتایپ‌هایی که براساس آنالیزهای اولیه متناسب به چند گونه درون یک جنس بودند توأمان هم‌ردیف و آنالیز شده، سپس روابط خویشاوندی آنها بررسی شد (Timling *et al.*, 2012). نظر به هدف اصلی این مقاله در معرفی و تأیید کارایی مطالعات مولکولی DNA به منظور شناسایی قارچ‌های اکتومیکوریز در سطح ریشه، درخت فیلوژنی ارائه نشده است.



شکل ۲- جمع‌آوری نمونه‌هایی از خاک به همراه ریشه از ریزوسفر درختان بلوط



شکل ۳- تعدادی از مورفوتایپ‌های مشاهده شده توسط استریومیکروسکوپ با بزرگ‌نمایی 40X



شکل ۴- محصول تکثیر ناحیه ITS از DNA قارچی استخراج شده از برخی نوک‌ریشه اکتومیکوریزایی بلوط روی ژل آگارز



در مجموع ۲۱۷ سیستم ریشه‌ای از رویشگاه‌های مورد مطالعه جمع‌آوری و با بررسی‌های میکروسکوپی مشخص شد در ۱۸۳ عدد از این نمونه‌های جمع‌آوری شده هم‌زیستی اکتومیکوریزی قابل تمایز وجود دارد. مورفوتایپ غالب از هر یک از ۱۸۳ نمونه به‌طور مجزا تحت مشاهدات میکروسکوپی جداسازی شد. پس از تلاش برای استخراج DNA از این نوک‌ریشه‌های جداسازی شده، ۵۶ عدد به‌طور موفقیت‌آمیزی توسط آغازگرهای اختصاصی قارچی تکثیر شد و توالی‌های DNA خالص که قابل هم‌ردیف کردن بودند، به‌دست آمد. در مورد سایر نوک‌ریشه‌ها، توسط هیچ‌یک از ترکیب‌های آغازگرها DNA تکثیر نشد؛ یا در برخی موارد چندین باند تکثیر شده روی ژل آگارز مشاهده شد که نشان‌دهنده وجود آلودگی (به قارچ‌های غیر اکتومیکوریزی یا تکثیر توأم اندوفیت‌های همراه ریشه یا دیگر گونه‌های قارچ‌های اکتومیکوریز) در نظر گرفته شد، که از این‌رو از چرخه آزمایش‌ها حذف شدند یا اینکه توالی‌هایی را ایجاد کردند که قابل هم‌ردیف کردن نبودند. در شکل ۴ نمونه‌ای از محصولات PCR تفکیک شده روی ژل آگارز، شامل باندهای تکی، باندهای چندگانه و DNAهای تکثیر نشده، آورده شده است.

از مجموع ۵۶ توالی به‌دست آمده، ۴۹ توالی با توالی‌های همان ناحیه از تاکسون‌های قارچ‌های اکتومیکوریز تشکیل‌دهنده رابطه هم‌زیستی مطابقت داشتند. تعداد هفت عدد از توالی‌ها نیز دارای توالی‌های مرتبط با قارچ‌های ساپروفیت یا قارچ‌هایی که اکتومیکوریز بودن آنها مبهم است، بودند. همچنین مشخص شد ۴۹ تاکسون اکتومیکوریز در مجموع به ۱۳ جنس شامل *Amanita*, *Boletus*, *Cortinarius*, *Hebeloma*, *Hydnum*, *Hygrophorus*, *Inocybe*, *Laccaria*, *Lactarius*, *Lycoperdon*, *Russula*, *Tricholoma* و *Scleroderma*

تعلق دارند (جدول ۱). پس از آنالیزهای فیلوژنتیکی امکان شناسایی دقیق ۱۷ تاکسون در سطح گونه و ۳۲ تاکسون در سطح جنس از قارچ‌های اکتومیکوریز هم‌زیست با گونه‌های بلوط هیرکانی فراهم شد (زمانی، ۱۳۹۳).

● نتیجه‌گیری نهایی و پیشنهادها

در سلسله قارچ‌ها، گونه‌ها از دیرباز براساس ساختارهای زایشی جنسی و غیرجنسی توصیف شده‌اند؛ اما افزایش مطالعات فیلوژنتیکی مولکولی راهکاری جدید را برای برطرف کردن دشواری‌های شناسایی گونه‌ها فراهم آورده است (Taylor et al., 2007). بنابراین، طیف وسیع و روزافزون تعداد توالی‌های DNA قارچی فرصت شناسایی گونه‌های مبهم و پرچالش را ایجاد کرده است. در همین راستا، شناسایی‌های مولکولی براساس مقایسه میان توالی‌های جدید و توالی‌های در دسترس در پایگاه داده‌ها در حال افزایش است؛ به‌خصوص این روش به اساس مطالعات تاکسونومی و جمعیت قارچ‌های اکتومیکوریز در سال‌های اخیر تبدیل شده است (Jargeat et al., 2010).

استفاده از توالی نواحی ITS rDNA برای شناسایی قارچ‌ها از نمونه‌های محیطی به‌طور قابل توجهی فراگیر شده است (Nilsson et al., 2008). بر همین اساس در تحقیق حاضر مشخص شد جمعیت متنوعی از قارچ‌های اکتومیکوریز در جنگل‌های هیرکانی به‌همراه درختان بلوط وجود دارد. مهم‌ترین گروه‌های تاکسونومیک یافت شده در این جنگل‌ها مشابه با گروه‌های گزارش شده در سایر کلیماهای معتدله بود. قارچ‌های متعلق به جنس‌های *Lactarius* (۱۰ جمعیت)، *Russula* (۹ جمعیت) و *Inocybe* (۸ جمعیت) از مهم‌ترین گروه‌های یافت شده در این تحقیق بودند که این گروه‌ها از مشخص‌ترین قارچ‌های گزارش شده از ریشه بلوط در اکوسیستم‌های معتدله مختلف هستند (Avis et al., 2003; Dickie & Reich 2005; Richard et al., 2005; Walker et al., 2005; Scattolina et al., 2014). تشابه کیفی دیگر جمعیت

اکتومیکوریزی گزارش شده در این تحقیق با جمعیت اکتومیکوریزی دیگر اکوسیستم‌های معتدله بلوط، در غالب بودن اکتومیکوریزهای بازیدیومیستی و پایین بودن جمعیت آسکومیستی یافت شده در این نواحی است (Avis et al., 2003; 2008; Walker et al., 2005). حالی‌که جمعیت اکتومیکوریزی گزارش شده روی خانواده Fagaceae در کلیماهای مدیترانه‌ای دارای غنا و تنوع بیشتری از آسکومیست‌های اکتومیکوریزی است (Smith et al., 2007; Morris et al., 2008).

در تحقیق حاضر تأیید شد که استفاده از توالی ناحیه ITS ابزاری مناسب برای شناسایی اکتومیکوریزهای جمع‌آوری شده

در سلسله قارچ‌ها، گونه‌ها از دیرباز براساس ساختارهای زایشی جنسی و غیرجنسی توصیف شده‌اند؛ اما افزایش مطالعات فیلوژنتیکی مولکولی راهکاری جدید را برای برطرف کردن دشواری‌های شناسایی گونه‌ها فراهم آورده است.

از عرصه‌های جنگلی ایران است. در واقع، مقایسه توالی‌های ITS به‌دست آمده در این تحقیق با توالی‌های موجود در پایگاه داده‌ها، در جایی که توالی‌های معتبر به تعداد مناسب و کافی وجود داشتند، روابط تاکسونومیک مورد نظر را به‌خوبی روشن کرد. همان‌طور که توسط یوتی و همکاران (lotti et al., 2005) نیز پیشنهاد شده است؛ قرار دادن توالی‌های ITS، حداقل متعلق به گونه‌های مهم یافت شده در مطالعات اکتومیکوریزی، توسط تمام محققان در پایگاه‌های داده عمومی، به‌طور چشمگیری فهرست گونه‌های اکتومیکوریز قابل مقایسه و در نتیجه احتمال شناسایی این گونه‌ها را در مطالعات آتی افزایش خواهد داد.

جدول ۱- نتایج شناسایی مولکولی قارچ‌های اکتومیکوریز همراه ریشه‌های بلوط براساس الگوریتم BLAST

کد دسترسی	درصد تشابه	بالاترین مشابهت	طول (bp)	رویشگاه	گونه میزبان	کد مورفوتاژ	ردیف
AM882951	98%	<i>Inocybe erubescens</i>	۷۶۵	شفارود	<i>Q. castaneifolia</i>	Cas-1-3	۱
EF417821	98%	<i>Hygrophorus</i> sp.	۷۳۰	شفارود	<i>Q. castaneifolia</i>	Cas-1-5	۲
FR852300	97%	<i>Hebeloma</i> sp.	۷۶۰	شفارود	<i>Q. castaneifolia</i>	Cas-1-11	۳
AM882976	99%	<i>Inocybe aff. grammata</i>	۷۸۶	شفارود	<i>Q. castaneifolia</i>	Cas-1-14	۴
JX425387	96%	<i>Russula</i> sp.	۸۰۴	شفارود	<i>Q. castaneifolia</i>	Cas-1-15	۵
JQ446087	99%	<i>Lactarius azonites</i>	۷۹۰	شفارود	<i>Q. castaneifolia</i>	Cas-1-16	۶
JX425387	97%	<i>Russula</i> sp.	۷۵۰	شفارود	<i>Q. castaneifolia</i>	Cas-1-24	۷
KF432981	99%	<i>Lactarius subumbonatus</i>	۷۰۵	سیاهکل	<i>Q. castaneifolia</i>	Cas-3-1	۸
AY228350	97%	<i>Russula cf. emetic</i>	۸۳۹	سیاهکل	<i>Q. castaneifolia</i>	Cas-3-6	۹
AM882964	99%	<i>Inocybe maculate</i>	۷۲۴	سیاهکل	<i>Q. castaneifolia</i>	Cas-3-11	۱۰
KF432981	99%	<i>Lactarius subumbonatus</i>	۶۹۸	سیاهکل	<i>Q. castaneifolia</i>	Cas-3-12	۱۱
GQ478005	100%	<i>Hebeloma</i> sp.	۶۸۱	سیاهکل	<i>Q. castaneifolia</i>	Cas-3-15	۱۲
FR852236	93%	<i>Inocybe</i> sp.	۸۱۹	سیاهکل	<i>Q. castaneifolia</i>	Cas-3-16	۱۳
FJ904175	99%	<i>Inocybe rhodiola</i>	۷۴۲	سیاهکل	<i>Q. castaneifolia</i>	Cas-3-18	۱۴
AF377247	98%	<i>Tricholoma acerbum</i>	۵۲۰	سیاهکل	<i>Q. castaneifolia</i>	Cas-3-20	۱۵
EU655684	99%	<i>Cortinarius aurantiorufus</i>	۸۲۰	سیاهکل	<i>Q. castaneifolia</i>	Cas-3-28	۱۶
AF377247	98%	<i>Tricholoma acerbum</i>	۵۹۸	بینشکی	<i>Q. castaneifolia</i>	Cas-4-4	۱۷
EU819429	97%	<i>Russula</i> sp.	۸۳۳	بینشکی	<i>Q. castaneifolia</i>	Cas-4-5	۱۸
AF377247	98%	<i>Tricholoma acerbum</i>	۵۹۲	بینشکی	<i>Q. castaneifolia</i>	Cas-4-11	۱۹
HQ586863	100%	<i>Inocybe fibrosoides</i>	۷۲۷	بینشکی	<i>Q. castaneifolia</i>	Cas-4-16	۲۰
AF377247	99%	<i>Tricholoma acerbum</i>	۶۷۲	بینشکی	<i>Q. castaneifolia</i>	Cas-4-20	۲۱
FR852034	98%	<i>Lactarius</i> sp.	۶۷۰	بینشکی	<i>Q. castaneifolia</i>	Cas-4-23	۲۲
KF432981	99%	<i>Lactarius subumbonatus</i>	۶۹۵	خیرود	<i>Q. castaneifolia</i>	Cas-2-2	۲۳
HE611086	97%	<i>Hydnum vesterholtii</i>	۶۰۹	خیرود	<i>Q. castaneifolia</i>	Cas-2-3	۲۴

JX625281	99%	<i>Inocybe</i> sp.	۷۳۰	خیرود	<i>Q. castaneifolia</i>	Cas-2-5	۲۵
KF432981	99%	<i>Lactarius subumbonatus</i>	۶۷۰	خیرود	<i>Q. castaneifolia</i>	Cas-2-7	۲۶
KJ705244	99%	<i>Tricholoma cingulatum</i>	۶۷۶	خیرود	<i>Q. castaneifolia</i>	Cas-2-12	۲۷
FR852027	99%	<i>Lactarius</i> sp.	۶۷۰	خیرود	<i>Q. castaneifolia</i>	Cas-2-17	۲۸
AJ889923	100%	<i>Amanita rubescens</i>	۶۵۱	خیرود	<i>Q. castaneifolia</i>	Cas-2-19	۲۹
KF668322	99%	<i>Lycoperdon perlatum</i>	۷۰۱	خیرود	<i>Q. castaneifolia</i>	Cas-2-21	۳۰
GQ406465	97%	<i>Laccaria laccata</i> var. <i>moelleri</i>	۶۷۴	خیرود	<i>Q. castaneifolia</i>	Cas-2-22	۳۱
KF432981	99%	<i>Lactarius subumbonatus</i>	۶۵۲	خیرود	<i>Q. castaneifolia</i>	Cas-2-24	۳۲
FR852019	100%	<i>Cortinarius</i> sp.	۶۳۶	خیرود	<i>Q. castaneifolia</i>	Cas-2-28	۳۳
KF432981	99%	<i>Lactarius subumbonatus</i>	۶۵۴	خیرود	<i>Q. petraea</i>	Pet-2-5	۳۴
KF432981	99%	<i>Lactarius subumbonatus</i>	۶۶۸	خیرود	<i>Q. petraea</i>	Pet-2-9	۳۵
GQ250407	99%	<i>Amanita phalloides</i>	۶۶۸	خیرود	<i>Q. petraea</i>	Pet-2-10	۳۶
FJ904159	96%	<i>Inocybe bulbosissima</i>	۷۷۱	لوه	<i>Q. castaneifolia</i>	Cas-5-2	۳۷
HE601889	100%	<i>Russula</i> sp.	۷۹۴	لوه	<i>Q. castaneifolia</i>	Cas-5-9	۳۸
EU718116	99%	<i>Scleroderma areolatum</i>	۷۶۱	لوه	<i>Q. castaneifolia</i>	Cas-5-11	۳۹
EU160589	98%	<i>Tricholoma sculpturatum</i>	۶۷۶	لوه	<i>Q. castaneifolia</i>	Cas-5-14	۴۰
EU486434	99%	<i>Laccaria montana</i>	۹۴۶	لوه	<i>Q. castaneifolia</i>	Cas-5-29	۴۱
HE601889	100%	<i>Russula</i> sp.	۷۷۷	لوه	<i>Q. petraea</i>	Pet-5-1	۴۲
AY061713	99%	<i>Russula risigallina</i>	۸۲۸	لوه	<i>Q. petraea</i>	Pet-5-8	۴۳
JF907762	97%	<i>Amanita oblongispora</i>	۷۰۹	لوه	<i>Q. petraea</i>	Pet-5-10	۴۴
JF908637	100%	<i>Russula vesca</i>	۷۲۰	توسکستان	<i>Q. macranthera</i>	Mac-6-9	۴۵
EF564167	99%	<i>Hebeloma cylindrosporum</i>	۷۶۷	توسکستان	<i>Q. macranthera</i>	Mac-6-15	۴۶
FM995552	98%	<i>Uncultured Boletaceae</i>	۸۱۶	توسکستان	<i>Q. macranthera</i>	Mac-6-16	۴۷
JF908637	100%	<i>Russula vesca</i>	۸۰۵	توسکستان	<i>Q. macranthera</i>	Mac-6-21	۴۸
FM995552	98%	<i>Uncultured Boletaceae</i>	۸۴۲	توسکستان	<i>Q. macranthera</i>	Mac-6-25	۴۹

- Selosse, M.A., 2005. Diversity and specificity of ectomycorrhizal fungi retrieved from an old-growth Mediterranean forest dominated by *Quercus ilex*. *New Phytologist*, 166: 1011–1023.
- Ronquist, F. and Huelsenbeck, J.P., 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19: 1572–1574.
- Scattolina, L., Lancellotti, E., Franceschini, A. and Montecchio, L., 2014. The ectomycorrhizal community in Mediterranean old-growth *Quercus ilex* forests along an altitudinal gradient. *Plant Biosystems*, 148(1): 74–82.
- Smith, M.E., Douhan, G.W. and Rizzo, D.M., 2007. Ectomycorrhizal community structure in a xeric *Quercus* woodland based on rDNA sequence analysis of sporocarps and pooled roots. *New Phytologist*, 174: 847–863.
- Taylor, J.W., Turner, E., Pringle, A., Dettman, J. and Johannesson, H., 2007. Fungal species: thoughts on their recognition, maintenance and selection. In: Gadd, G.M., Watkinson, S.C. and Dyer, P.S. (Eds.). *Fungi in the Environment*. Cambridge University Press, Cambridge. pp. 313–339.
- Thornhill, D.J., LaJeunesse, T.C., Kemp, D.W., Fitt, W.K. and Schmidt, G.W., 2006. Multi-year, seasonal genotypic surveys of coral-algal symbiosis reveal prevalent stability or post-bleaching reversion. *Molecular Biology and Evolution*, 148: 711–722.
- Timling, I., Dahlberg, A., Walker, D.A., Gardes, M., Charcosset, J.Y., Welker, J.M. and Taylor, D.L., 2012. Distribution and drivers of ectomycorrhizal fungal communities across the North American Arctic. *Ecosphere*, 3(11): Article 111
- van der Westhuizen, G.C.A. and Eicker, A., 1994. *Field Guide: Mushrooms of Southern Africa*. Struik Publishers, Cape Town, 207p.
- Walker, J.F., Miller, O.K. and Horton, J.L., 2005. Hyperdiversity of ectomycorrhizal fungus assemblages in mixed forests in the southern Appalachian Mountains. *Molecular Ecology*, 14: 829–838.
- Weiβ, M., Yang, Z.L. and Oberwinkler, F., 1998. Molecular phylogenetic studies in the genus *Amanita*. *Canadian Journal of Botany* 76: 1170–1179.
- White, T.J., Brun, S.T.D., Lee, S. and Taylor, J.W., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J. (Eds.) *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego. pp. 315–322.
- ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes— application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 2: 113–118.
- Hawley, G.L., 2006. Ectomycorrhizal characterisation, species diversity and community dynamics in *Pinus patula* plantations. PhD thesis, Rhodes University, 206p.
- Ingleby, K., Mason, P.A., Last, F.T. and Fleming, L.V., 1990. Identification of ectomycorrhizas. ITE Research Publication 5. Her Majesty's Stationary Office. London, UK, 112p.
- lotti, M., Barbieri, E., Stocchi, V. and Zambonelli, A., 2005. Morphological and molecular characterisation of mycelia of ectomycorrhizal fungi in pure culture. *Fungal Diversity*, 19: 51–68.
- Jargeat, P., Martos, F., Carriconde, F., Gryta, H., Moreau, P.A. and Gardes, M., 2010. Phylogenetic species delimitation in ectomycorrhizal fungi and implications for barcoding: the case of the *Tricholoma scalpturatum* complex (Basidiomycota). *Molecular Ecology*, 19: 5216–5230.
- Jonsson, L., Dahlberg, A., Nilsson, M., Zackrisson, O. and Karen, O., 1999. Ectomycorrhizal fungal communities in late-successional Swedish boreal forests, and their composition following wildfire. *Molecular Ecology*, 8: 205–215.
- Köljalg, U., Larsson, K.H., Abarenkov, K., Nilsson, R.H., Alexander, I.J., Eberhardt, U., Erland, S., Hoiland, K., Kjoller, R., Larsson, E., Pennanen, T., Sen, R., Taylor, A.F.S., Tedersoo, L., Vralstad, T. and Ursing, B.M., 2005. UNITE: a database providing web-based methods for the molecular identification of ectomycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 166: 1063–1068.
- Morris, M.H., Perez-Perez, M.A., Smith, M.E. and 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*, 69:274–287.
- Morris, M.H., Smith, M.E., Rizzo, D.M., Rejmánek, M. and Bledsoe, C.S., 2008. Contrasting ectomycorrhizal fungal communities on the roots of co-occurring oaks (*Quercus* spp.) in a California woodland. *New Phytologist*, 178: 167–176.
- Nilsson, R.H., Kristiansson, E., Ryberg, M., Hellenberg, N. and Larsson, K.H., 2008. Intraspecific ITS variability in the kingdom Fungi as expressed in the international sequence databases and its implications for molecular species identification. *Evolutionary Bioinformatics*, 4: 193–201.
- Richard, F., Millot, S., Gardes, M. and
- زمانی، س.م.، ۱۳۹۳. شناسایی قارچ‌های اکتومیکوریز درختان بلوط در برخی جنگل‌های ایران و بررسی پروفایل متابولیکی و ترنسکریپتومیکی ریشه‌های همزیست *Quercus castaneifolia*. رساله دکترا، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ۲۲۸ صفحه.
- شرافتی، م.، کاظم‌پور اوصالو، ش.، خوش‌سخن مظفر، م.، اسماعیل‌بگی، ش. و سعادت، ن.، ۱۳۹۳. تنباززایی جنس گل فراموشم‌مکن (*Myosotis*, Boraginaceae) براساس توالی هسته‌ای nrDNA ITS. *تاکسونومی و بیوسستماتیک*، ۶ (۱۹): ۸۵–۹۶.
- Agerer, R., 1986–2006. *Colour Atlas of Ectomycorrhizae*. Einhorn-Verlag Eduard Dietenberger, München.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman D., 1997. Gapped BLAST and PSIBLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25: 3389–3402.
- Avis, P.G., McLaughlin, C.J., Dentinger, B.C. and Reich, P.B., 2003. Longterm increase in nitrogen supply alters above- and belowground ectomycorrhizal communities and increases the dominance of *Russula* spp. in a temperate oak savanna. *New Phytologist*, 160: 239–253.
- Avis, P.G., Mueller, G.M. and Lussenhop, J., 2008. Ectomycorrhizal fungal communities in two North American oak forests respond to nitrogen addition. *New Phytologist*, 179: 472–483.
- Brundrett, M., Bougher, N., Dell, B., Grove, T. and Malajczuk, N., 1996. *Working with mycorrhizas in forestry and agriculture*. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra, 374p.
- Burke, D.J., Martin, K.J., Rygielwicz, P.T. and Topa, M.A., 2005. Relative abundance of ectomycorrhizas in a managed loblolly pine (*Pinus taeda*) genetics plantation as determined through terminal restriction fragment length polymorphism profiles. *Canadian Journal of Botany*, 84: 924–932.
- Courtecuisse, R., 1999. *Mushrooms of Britain and Europe*. Harper Collins, London, 960p.
- Dahlberg, A., 2001. Community ecology of ectomycorrhizal fungi: an advancing interdisciplinary field. *New Phytologist*, 150: 555–562.
- Dickie, I.A. and Reich, P.B., 2005. Ectomycorrhizal fungal communities at forest edges. *Journal of Ecology*, 93: 244–255.
- Gardes, M. and Bruns, T.D., 1993.