

## بررسی ارتباط همزیستی *Terfezia claveryi* با تعدادی از گونه‌های گیاهی چندساله از گل‌آفتابیان\*

دریافت: ۱۴۰۱/۱۱/۱۶ / پذیرش: ۱۴۰۲/۰۲/۰۹

مسعود شببانی: دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران  
 صمد جمالی✉: دانشیار قارچ‌شناسی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران (jamali454@yahoo.com)

### چکیده

دنبلان‌های صحرایی، قارچ‌های خوراکی زیرزمینی از گروه آسکومیست‌ها هستند که در مناطق خشک و نیمه‌خشک مناطق مدیترانه‌ای و خاورمیانه از جمله ایران رشد می‌کنند. این قارچ‌ها علاوه بر ارزش اقتصادی، از نظر بوم‌شناختی نیز با جلوگیری از فرسایش و بیابان‌زایی نقش مهمی در حفظ و نگهداری اکوسیستم مراتع دارند. در این بررسی، ارتباط همزیستی *Terfezia claveryi* با گونه‌های گیاهی چندساله از گل‌آفتابیان شامل *Helianthemum lippii*، *H. almeriense*، *Cistus laurifolius* و *C. ladanifer* مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این بررسی نشان داد که *T. claveryi* با هر چهار گونه گیاهی، ارتباط همزیستی از نوع خارجی-داخلی با درجات مختلفی از توسعه غلاف را ایجاد کرد. همچنین در این بررسی، گونه گیاهی *H. lippii* با ۸۷٪ کلونیزاسیون و وابستگی نسبی میکوریزی ۴۸/۱۸٪، میزبان گیاهی مناسبی برای *T. claveryi* تشخیص داده شد. گونه گیاهی *H. almeriense* از نظر درصد کلونیزاسیون (۸۰٪) و وابستگی نسبی میکوریزی (۱۷/۹۲٪) در مرتبه دوم قرار گرفت. در بررسی شاخص‌های رشدی شامل وزن و ارتفاع ریشه، وزن و ارتفاع اندام هوایی و وزن و ارتفاع بوته، بین گیاهان مایه‌زنی شده با *T. claveryi* و گیاهان شاهد اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده شد. ارتباط همزیستی *T. claveryi* با گونه‌های گیاهی مایه‌زنی شده، با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز تودرتو و جفت آغازگرهای اختصاصی طراحی شده از ناحیه نسخه‌برداری شده داخلی rDNA مورد تایید قرار گرفت.

واژه‌های کلیدی: آسکومیست‌ها، آغازگرهای اختصاصی، دنبلان‌های کوهی، قارچ‌ریشه خارجی-داخلی، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز تودرتو

### Mycorrhizal association of *Terfezia claveryi* with several *Cistaceae* plant species

Received: 05.02.2023 / Accepted: 29.04.2023

**Masoud Sheibani:** MSc Student, Department of Plant Protection, College of Agriculture, Razi University, Kermanshah, Iran

**Samad Jamali✉:** Associate Prof., Department of Plant Protection, College of Agriculture, Razi University, Kermanshah, Iran (jamali454@yahoo.com)

### Summary

Desert truffles are hypogeous edible fungi from the Ascomycetes group that grow in arid and semi-arid areas of the Mediterranean region, including Iran. In addition to the economic role, they also play an important role in preserving and maintaining the ecosystem of rangelands from an ecological point of view by preventing erosion and desertification. In this study, the mycorrhizal association between the *Terfezia claveryi* Chatin (*Cistaceae*) with the perennial plant species *Cistus ladanifer*, *C. laurifolius*, *Helianthemum lippii*, and *H. almeriense* was investigated. The results of this study showed the mycorrhizal association as ect-endo mycorrhization with varying degrees of sheath development among the four investigated plant species. Mycorrhization rate and the relative mycorrhizal dependency (RMD) for *T. claveryi*/*H. lippii* combination was 87% and 48.18%, followed *H. almeriense* with mycorrhization rate and relative mycorrhizal dependency 80% and 17.92%, respectively. Growth parameters of the inoculated plants including plant height and weight, root height and weight, and shoot height and weight were statistically significant compared to control plants. The mycorrhizal relationship of *T. claveryi* with inoculated plant species was confirmed using Nested-polymerase chain reaction and specific primer pairs designed for this species from the sequence of the internal transcribed space regions.

**Keywords:** Ascomycetes, deseret truffles, ect-endo mycorrhization, Nested-PCR, specific primers

\* مستخرج از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده نخست به راهنمایی دکتر صمد جمالی ارائه شده به دانشگاه رازی

## مقدمه

گیاهانی که تا کنون به عنوان گونه‌های تشکیل‌دهنده قارچ‌ریشه با دنبلان‌های بیابانی گزارش شده‌اند از گل‌آفتابیان، راشیان (*Fagaceae*)، باقلاییان (*Fabaceae*)، کاجیان (*Pinaceae*) و جگنیان می‌باشند (Kovacs et al. 2003, Sao) و جگنیان می‌باشند (Mai et al. 2012, Slama et al. 2021). اگرچه بیشتر گونه‌های گیاهی گزارش شده به عنوان یک گیاه میزبان برای آزمایش‌ها، گونه‌های یک- و چندساله جنس *Helianthemum* متعلق به گل‌آفتابیان است (Jamali & Banihashemi 2013a). گونه‌های *Helianthemum* (گل‌آفتابیان) به طیف وسیعی از خاک‌ها متحمل می‌باشند و به عنوان میزبان، برای هم‌زیستی با دنبلان‌های بیابانی مناسب می‌باشند، اگرچه شرایط اقلیمی احتمالاً فاکتور مهمی برای انتخاب یک گیاه میزبان برای یک منطقه خاص است. در نواحی بیابانی و مدیترانه‌ای جهان چندین گونه از *Terfezia*، در ارتباط با گونه‌های *Helianthemum* به وفور گزارش شده‌اند (کووکس و همکاران ۲۰۰۳). در یک بررسی، ارتباط هم‌زیستی *Terfezia claveryi* و *T. boudieri* با گونه‌های یک‌ساله *H. ledifolium* (L.) Mill. و *H. salicifolium* (L.) Mill. از نوع قارچ‌ریشه داخلی گزارش شده است (Awameh & Alsheikh 1979). هم‌زیستی *Terfezia* با اعضای گیاهی گل‌آفتابیان به ویژه گونه‌های *Helianthemum* در نواحی مدیترانه‌ای نیز گزارش شده است (Dexheimer et al. 1985, Fortas & Chevalier 1992). گونه *T. leptoderma* (Tul. & C.Tul.) Tul. & C.Tul. با *H. salicifolium* تشکیل قارچ‌ریشه خارجی با شبکه هارتیگ توسعه یافته و بدون غلاف می‌دهد و به دو صورت قارچ‌ریشه خارجی و داخلی دیده شده است (Dexheimer et al. 1985, Leduc et al. 1986). تشکیل هم‌زیستی بین گونه‌های *T. claveryi* و *T. Arenaria* (Moris) Trappe، با گیاهانی از جنس *Helianthemum* و *Cistus* نیز تایید شده است (Leduc et al. 1986, Fortas & Chevalier 1992). این قارچ‌ها تشکیل قارچ‌ریشه خارجی بدون مانتل می‌دهند، ولی بسته به میزان فسفر خاک، با یا بدون شبکه هارتیگ می‌باشند. در این مطالعات مشاهده شد که بسته به حاصلخیزی بستره، میکوریز تشکیل شده بین *H. guttatum* (L.) Mill. و *T. leptoderma* از نوع قارچ‌ریشه خارجی، خارجی-داخلی یا داخلی می‌تواند باشد (Fortas & Chevalier 1992). فُرتاس و شوالیر (۱۹۹۲) اثر فسفات بر سنتز میکوریز *H. guttatum* با *T. claveryi* و *T. arenaria* را نیز مطالعه و مشاهده کردند که در سطح بالای فسفات، دنبلان‌ها تشکیل قارچ‌ریشه خارجی با شبکه هارتیگ بدون غلاف می‌دهند. در سطح پایین فسفر، قارچ‌ریشه خارجی-داخلی با شبکه هارتیگ تشکیل

دنبلان‌های صحرایی، قارچ‌های خوراکی زیرزمینی از شاخه آسکومیست‌ها هستند که هم‌زیستی میکوریزی با گیاهان یک‌ساله و چندساله از اعضای گل‌آفتابیان (*Cistaceae*) ایجاد می‌کنند (Kagan-Zur et al. 2013). دنبلان‌های صحرایی و میزبان‌هایشان به اکوسیستم‌های خشک و نیمه‌خشک خاورمیانه و مناطق مدیترانه‌ای از جمله ایران سازگار شده‌اند. واژه آب و هوای خشک اشاره به مناطقی دارد که میزان تبخیر و ترقق سالانه آن‌ها بیشتر از میزان نزولات جوی سالانه است و به طور ساده با شاخص خشکی نشان داده می‌شود. بنابراین، براساس شاخص خشکی، تقسیم‌بندی به صورت خیلی خشک (شاخص خشکی کمتر از ۰/۳)، خشک (شاخص خشکی بین ۰/۲ و ۰/۳) و نیمه‌خشک (شاخص خشکی بین ۰/۲ تا ۰/۵) صورت می‌گیرد (UNEP 1992). به این ترتیب، بیشتر مراتع ایران بین دو شاخص خشک و نیمه‌خشک قرار می‌گیرند. در مراتع، دنبلان‌های بیابانی رابطه قارچ‌ریشه‌ای با گیاهان میزبان از جمله گیاهان گل‌آفتابیان و جگنیان (*Cyperacea*) و دارند (Díez et al. 2002, Ammarellou & Saremi 2008, Jamali 2016). دنبلان‌ها با جذب مواد مغذی و به ویژه فسفر از خاک‌های تحت تنش آبی، افزایش تحمل گیاه به تنش‌های محیطی مانند اسیدیته خاک، خشکی، فلزات سنگین و شوری و مقاومت در برابر بیماری‌ها، باعث بهبود و تسریع رشد گیاهان می‌شوند (Moreno et al. 2000, Morte et al. 2010, Jeffries & Barea 2017, Bouzadi et al. 2012). بنابراین، دنبلان‌های بیابانی برای بهره‌وری و تنوع اکوسیستم‌های گیاهی طبیعی، جلوگیری از فرسایش و بیابان‌زدایی و همچنین اهداف تجاری مورد توجه هستند. تاکنون دو گونه از دنبلان‌های بیابانی به طور مصنوعی در بستره‌های طبیعی کشت شده‌اند که عبارتند از *Terfezia claveryi* Chatin در اسپانیا (Honrubia et al. 2001, Morte et al. 2009) و *T. boudieri* Chatin در تونس و اسرائیل (Slama et al. 2010, Kagan-Zur et al. 2013). از زمان کشت نخستین گیاه قارچ‌ریشه‌ای با *T. claveryi* در سال ۱۹۹۹ در موریسیای اسپانیا، افزایش تقاضا برای این محصول نه تنها در آن کشور بلکه در سایر کشورها نیز افزایش پیدا کرد و محققان را بر آن داشت تا از آزمایش‌ها در سطح کوچک و آزمایشگاهی به سمت کشت در مقیاس بزرگ و در مزارع یا مراتع سوق داده شوند. نخستین مرحله در این فرایند، انتخاب گونه گیاهی مناسب و تولید گیاهچه‌های هم‌زیست با کیفیت و سازگاری بالا به مکان‌های مختلف با شرایط محیطی متفاوت می‌باشد.

می‌شود و ریشه‌های داخل سلولی به صورت مارپیچ بوده، ولی در این نوع میکوریز نیز غلاف تشکیل نشده است (Fortas & Chevalier 1992). گونه *H. almeriense* Pau که فراوانترین بوته گیاهی در نواحی نیمه‌خشک اسپانیا است با آسکومیست‌هایی مانند *Terfezia sp.* و *Balsamia sp.* تشکیل قارچ‌ریشه خارجی-داخلی می‌دهد (Morte et al. 1994). در میکوریز به دست آمده از *T. claveryi* با *H. almeriense* ریشه‌های بین سلولی تسبیح مانند و ریشه‌های داخل سلولی تشکیل مارپیچ می‌دهند که تمام فضای حفره سلولی را پر می‌کند (Morte et al. 1994). مطالعاتی نیز انجام شده که نشان داد *T. terfezioides* تأثیری در ویژگی‌های آناتومیکی ریشه‌های کلونیزه شده *H. ovatum* (Viv.) Dunal و *Robinia pseudoacacia* L. ندارد (کووکس و همکاران ۲۰۰۳). گوتییرز و همکاران (Gutierrez et al. 2003) در بررسی ویژگی‌های ریخت‌شناختی هم‌زیستی تشکیل شده بین *H. almeriense* و *T. claveryi*، چهار نوع سیستم میکوریزی متفاوت شامل تسبیحی (moniliform)، سرپهن (capitate)، چماقی (club-shaped) و منشعب (branched) مشاهده و توصیف کرده‌اند که تشکیل این نوع میکوریزها بستگی به شرایط کشت داشته و به گونه قارچی بستگی نداشته است. این گونه قارچی در شرایط طبیعی مزرعه با *H. almeriense* تشکیل قارچ‌ریشه داخلی، در کشت گلدانی، قارچ‌ریشه خارجی و خارجی-داخلی بدون غلاف و در شرایط آزمایشگاه قارچ‌ریشه خارجی با غلاف مشخص، شبکه هارتیگ تشکیل داده بود.

دنبلان‌های بیابانی در نواحی مرتعی خاصی از ایران یافت شده‌اند، اگرچه از نظر تاریخی بعضی از این مناطق توجه بیش‌تری به خودشان معطوف داشته‌اند. گونه‌هایی که تاکنون از ایران گزارش شده‌اند عبارتند از: *Terfezia boudieri* (Ammarellou & Saremi 2008)، *T. claveryi* (Maire)، *Tirmania pinoyi* (Maire)، *T. nivea* (Desf.) Trappe، Malencon، *Picoa juniper* Vittad.، *P. lefebvrei* (Pat.) Maire (Jamali & Banihashemi 2012). در سال‌های اخیر، برداشت انواع دنبلان‌ها در ایران و جهان به دلیل عوامل متعددی مانند باران اسیدی، جنگل‌زدایی، گرم شدن زمین، توسعه روستاها و شهرها و از بین رفتن گیاهان میزبان و برداشت بیش از حد کاهش یافته است (Hall et al. 2003, Jamali 2019). بنابراین، دنبلان‌های بیابانی در حال تبدیل شدن به یک محصول امیدوارکننده و جایگزین سایر محصولات با نیاز آبی بالا در مناطقی با آب و هوای گرم هستند، جایی که بیابان‌زدایی در زمین‌های خشک افزایش یافته است (Marqués-Gálvez et al. 2021). در ایران *T. claveryi* همراه با گونه‌های گیاهی *H. lippii*

در مرحله هم‌زیستی، شناسایی صحیح گونه‌های دنبلان بیابانی در گیاهان کلونیزه شده ضروری است. ویژگی‌های ریخت‌شناختی برای شناسایی دنبلان‌ها در ریشه گیاهان میزبان کافی نیست (Demir et al. 2011, Jamali & Banihashemi 2013a, Jamali & Banihashemi 2013b, Guevara-Guerrero et al. 2022). رویکردهای بیوفیزیکی، بیوشیمیایی، ایمنی‌شناسی و بویایی قبلاً به عنوان نشانگر برای شناسایی و مشخص کردن دنبلان‌ها استفاده شده‌اند (Papa et al. 1987, Pacioni & Pomponi 1989, Gandeboeuf et al. 1997, Neuner-Plattner et al. 1999). استفاده از این روش‌ها برای شناسایی و ردیابی در صورت کم بودن مقدار مواد بیولوژیکی، محدود می‌شوند. در مقابل، روش DNA مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمرز را می‌توان برای تشخیص اختصاصی اندام بارده، میسلیوم و قارچ‌ریشه خارجی یا داخلی با مقادیر بسیار کم بافت، استفاده کرد (Séjalón-Delmas et al. 2000, Jamali & Banihashemi 2013a). بیشتر مطالعات قبلی با هدف ردیابی دنبلان‌ها در ریشه درختان جنگلی و خاک بوده است و مطالعات کمی برای ردیابی دنبلان‌های بیابانی در ریشه کلونیزه شده با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز تودرتو (Nested-PCR) صورت گرفته است (Jamali & Banihashemi 2015, Jamali & Banihashemi 2013b, Jamali 2013a).

اهداف مطالعه حاضر، ارزیابی هم‌زیستی ایجاد شده بین چهار گونه گیاهی چندساله از گل‌آفتابیان با قارچ *T. claveryi* در شرایط گلخانه و توسعه یک روش ساده، سریع، اختصاصی و حساس مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای ردیابی *T. claveryi* در گیاهان مایه‌زنی شده بوده است.

## روش بررسی

- نمونه‌برداری

نمونه‌برداری از آسکوکارپ‌های دنبلان‌ها در فصل بهار سال‌های ۱۳۹۷ تا ۱۳۹۹ از نواحی جنوبی ایران شامل استان‌های فارس، هرمزگان، بوشهر و سیستان و بلوچستان صورت گرفت. خاک اطراف دنبلان‌ها برای مطالعه برخی از ویژگی‌های مهم

شد. محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز روی ژل آگارز ۱/۲٪ حاوی ۱۰ میکرولیتر بر لیتر DNA safe green (Sinaclon) در بافر 1×TAE (DenaZist Asia) توسط دستگاه عکس‌برداری از ژل تحت نور فرابنفش مشاهده و بررسی شدند. به منظور تعیین توالی محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز، نمونه‌ها به شرکت توپازژن کاوش (نماینده شرکت میکروسینس سوییس در ایران) ارسال شد. ترادف نمونه‌ها با استفاده از نرم‌افزار BioEdit ویرایش شد و در پایگاه داده NCBI ثبت و شماره دسترسی دریافت گردید. درخت تبارزایی نمونه‌های توالی‌یابی شده با استفاده از نرم‌افزار MEGA 7 و با روش بیشینه احتمال ترسیم شد.

- ارتباط هم‌زیستی

۱- تهیه بذور

برای بررسی ارتباط هم‌زیستی، در فروردین و اردیبهشت سال‌های ۹۸-۱۳۹۷ بذور گیاه *Helianthemum lippii* از میوه‌های رسیده حاوی بذور بالغ از مناطق نمونه‌برداری قارچ‌های دنبان از مراتع طبیعی استان فارس و جنوب کشور جمع‌آوری شد. بذور گیاهان *Helianthemum almeriense* *Cistus ladanifer* و *C. laurifolius* از شرکت اسپانیایی Semillas Cantueso خریداری شد. تمام بذور الک شده با استفاده از میکروسکوپ چشمی از نظر شکل ظاهری برای سالم بودن بررسی شدند. بذور سالم و نرمال از نظر ریخت‌شناسی، در پاکت‌های کاغذی در یخچال با دمای هفت درجه سلسیوس تا زمان استفاده نگهداری شدند.

۲- بررسی گلخانه‌ای

برای این منظور، ابتدا بذور چهار گونه گیاهی با کاغذ سمباده نرم خراش داده شدند و با محلول آب‌ژاول ۱۰٪ تجاری به مدت ۳۰ ثانیه تا یک دقیقه ضدعفونی سطحی صورت گرفت. سپس بذور در تشتک‌های پتری بین دو لایه کاغذ صافی مرطوب در دمای ۲۵ درجه سلسیوس تا جوانه‌زنی نگهداری گردیدند. بذور پس از جوانه‌زنی، به آرامی به گلدان‌های پر شده از پیت‌ماس-ورمیکولیت-ماسه سترون به نسبت حجمی ۱:۱:۲ منتقل شدند. برای هر گیاه، تعداد ۱۰۰ گلدان (تکرار) در قالب طرح کرت‌های کاملا تصادفی در نظر گرفته شد. گلدان‌ها در شرایط گلخانه (دما ۲۵ درجه سلسیوس و رطوبت ۶۰٪) نگهداری شدند (Morte *et al.* 2008). پس از گذشت دو ماه، زمانی که گیاه به اندازه کافی رشد کرده و سیستم ریشه‌ای گیاه کاملا توسعه یافته بود، مایه‌زنی با آسکوسپورها در قارچ در غلظت ۱۰<sup>۶</sup> هاگ در میلی‌لیتر (۱۰ گرم آسکوکارپ در یک لیتر آب سترون) به صورت تزریق با سرنگ

فیزیکوشیمیایی خاک از جمله اسیدیته، هدایت الکتریکی (EC)، بافت خاک، درصد کربن آلی و درصد آهک خاک جمع‌آوری و با ثبت مشخصات کامل به آزمایشگاه منتقل شد.

- ریخت‌شناسی

ویژگی‌های ریخت‌شناسی شامل شکل، اندازه، رنگ و آرایش سطح آسکوکارپ، شکل آسک و تعداد آسکوسپورها در هر آسک با استفاده از میکروسکوپ نوری لایتس مدل HM-LUX 3 (ساخت کشور پرتغال) انجام شد. برای مشاهده جزئیات سطح آسکوسپور از میکروسکوپ الکترونی روبشی Seron مدل AIS2300C (ساخت کره جنوبی) استفاده شد. برای این منظور، ابتدا لایه‌های خاک روی نمونه‌ها با استفاده از فرچه تمیز در جریان ملایم آب شیر شستشو و حذف گردیدند و سپس در دمای اتاق خشک شدند. برای چربی‌زدایی، نمونه‌هایی از بافت قارچ به مدت ۱۰ دقیقه در آمونیوم هیدروکسید ۳۰٪ قرار داده شدند. بعد از این مرحله، نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در اتانول ۷۰٪ و ۳۰ دقیقه در استون خالص غوطه‌ور و در نهایت در دمای اتاق خشک شدند (Moreno *et al.* 2000). برای مشاهده با استفاده از میکروسکوپ الکترونی، پوشش‌دهی نمونه‌ها با ذرات طلا انجام شد و پس از آن نمونه‌ها زیر میکروسکوپ بررسی و عکس‌برداری شدند.

- شناسایی مولکولی

به منظور استخراج DNA از بافت گلبای آسکوکارپ قارچ‌ها استفاده شد. DNA نمونه‌ها به روش هنریون استخراج گردید (Henrion *et al.* 1994). غلظت DNA با استفاده از دستگاه نانودراپ اندازه‌گیری شد. ناحیه ITS-rDNA با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز تکثیر گردید. جهت تکثیر ناحیه ITS-rDNA از آغازگرهای ITS1 (رفت) با ترادف 5-TCC GTA GGT GAA -3 CCT GCG G -3 و آغازگر ITS4 (برگشت) با ترادف 5-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC -3 استفاده شد (White *et al.* 1990). مخلوط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز شامل ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس (2 × Taq DNA polymerase Master Mix RED)، ۱۰ پیکومول از هر یک از آغازگرها و ۱۰ نانوگرم از DNA بود که حجم نهایی مخلوط واکنش با استفاده از آب سترون دیونیزه (Sinaclon) به مقدار ۲۵ میکرولیتر تنظیم شد. تکثیر نواحی ژنومی مورد نظر با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Biometra, Germany)، با حرارت ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۲۰ ثانیه جهت واسرشت اولیه و پیرو آن ۳۰ چرخه شامل ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه و ۵۵ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ ثانیه و ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۲۰ ثانیه و در نهایت گسترش نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت پنج دقیقه انجام

دمای ذوب، درصد سیتوزین گوانین، امکان تشکیل ساختار سنجاق‌سری و تشکیل پرایمر دایمر با استفاده از نرم‌افزار *Oligo Analyzer* بررسی شد. به منظور ارزیابی کارایی جفت آغازگر طراحی شده در تکثیر اختصاصی گونه *T. claveryi*، ابتدا DNA نمونه‌ها براساس داده‌های ترادف ناحیه ITS تکثیر شدند. راستی‌آزمایی آغازگر طراحی شده از طریق تکثیر DNA سایر گونه‌های دنبان ارزیابی گردید. به منظور ردیابی قارچ *T. claveryi* در ریشه گیاهان مایه‌زنی شده، به صورت تصادفی ده گیاه از هر گونه انتخاب شد و پس از شستشوی ریشه‌ها، DNA نمونه‌ها با روش هنریون (Henrion et al. 1994) استخراج گردید. با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز تودرتو در مرحله نخست با آغازگرهای عمومی و در مرحله دوم با آغازگرهای اختصاصی طراحی شده، ردیابی گونه *T. claveryi* در ریشه گیاهان مایه‌زنی شده انجام شد.

#### نتیجه

نتایج ارزیابی خاک مناطق مورد بررسی نشان داد که خاک مناطق رویشگاهی دنبان لومی، قلیایی، آهکی با مواد آلی کم و غیرشور می‌باشد. ارتفاع از سطح دریا در این مناطق بین ۱۲۰۰-۶۰۰ متر بود (جدول ۱). در این مطالعه، ۵۰ نمونه از *Terfezia* از مناطق مختلف جمع‌آوری شد (جدول ۱). در نمونه‌های مورد بررسی، آسکوکارپ زیرزمینی، به شکل‌های گرد و نیمه‌گرد تا شلغمی بودند. پریدیوم صاف تا مقداری چین و چروک‌دار بود و گاهی شکاف‌های سطحی تا نیمه‌عمیق در سطح پریدیوم وجود داشت (شکل ۱ a). بافت گلبا، گوشتی، جامد و به رنگ روشن بود که با رگه‌های قهوه‌ای تا نارنجی متمایز می‌شدند (شکل ۱ b). آسک‌ها شفاف، کروی تا بیضوی، تخم‌مرغی، گلابی شکل یا نیمه‌کروی و بیشتر هشت آسکوسپوری بودند. آسکوسپورها کروی، به رنگ قهوه‌ای روشن، مشبک، همراه با زگیل و به ابعاد ۱۶-۲۲ میکرومتر بودند (شکل ۱ c و d). براساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی، این نمونه‌ها به عنوان *T. claveryi* شناسایی شدند (Jamali & Trappe 1971, Trappe 1979, Banhashemi 2012).

نزدیک ریشه انجام گردید. در روش دیگر، ریشه‌ها به مدت ۳۰ ثانیه در سوسپانسیون هاگ (۱۰ گرم آسکوکارپ در یک لیتر آب سترون هموژنیزه به همراه ۵۰ گرم شکر برای چسبیدن هاگ‌ها به ریشه) غوطه‌ور و سپس در گلدان کشت و در گلخانه به مدت ۶-۹ ماه نگهداری شدند.

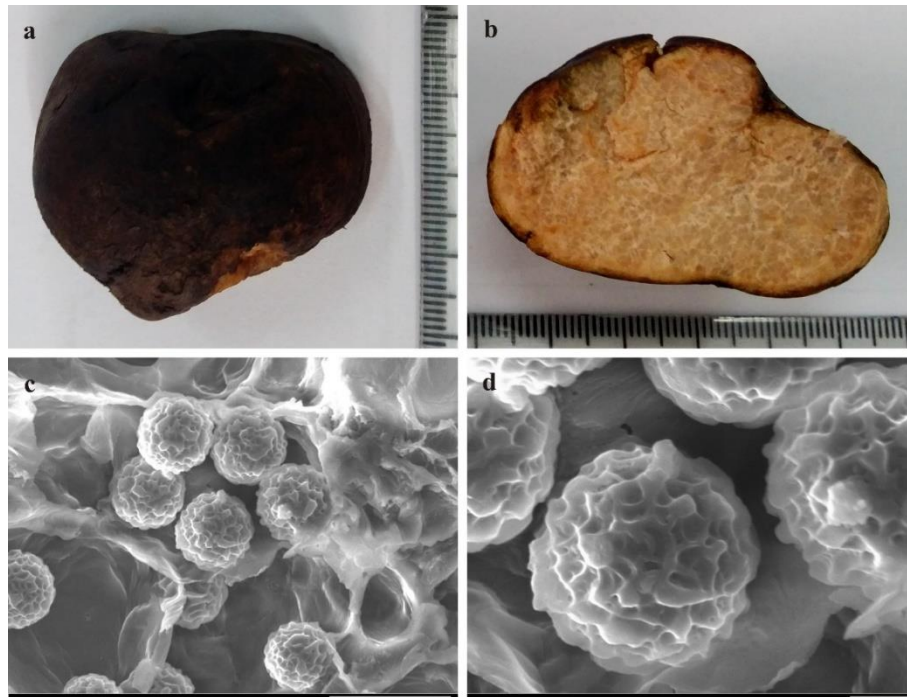
۳- بررسی حضور قارچ در ریشه گیاهان مایه‌زنی شده برای این منظور پس از گذشت ۶-۹ ماه، ریشه‌های مایه‌زنی شده چهار گونه گیاهی جمع‌آوری و پس از حذف بقایا، با آب روان شستشو و با استفاده از استریومیکروسکوپ دوچشمی مدل Luxeo 4Z (ساخت کمپانی LABOMED) برای تعیین حضور و الگوی سیستم میکوریزی مورد بررسی قرار گرفتند. ریشه گیاهان به قطعات یک سانتی‌متری تقسیم و با محلول هیدروکسیدپتاسیم ۱۰٪ به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۹۰-۶۰ درجه سلسیوس شفاف و رنگ‌بری گردیدند (Phillips & Hayman 1970). ریشه‌ها سپس با استفاده از آب مقطر شستشو و با محلول ۱٪ آنیلین بلو در اسیدلاکتیک رنگ‌آمیزی شدند (Grace & Stribley 1991). پنجاه قطعه ریشه رنگ‌آمیزی شده به طور تصادفی از هر گیاه تیمار شده با *T. claveryi* انتخاب و پس از غوطه‌ور کردن در لاکتوگلیسرول (v/v)، زیر میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفتند (Trouvelot et al. 1986). درصد کلونیزاسیون ریشه با استفاده از فرمول  $F = 100 N'/N$  تعیین شد که N تعداد قطعات مثبت ریشه از نظر تشکیل و وجود میکوریز و N تعداد کل قطعات ریشه مشاهده شده بود (Biermann & Linderman 1981). برای بررسی وابستگی نسبی میکوریزی (relative mycorrhizal dependency) از فرمول وزن خشک گیاه میکوریز شده منهای وزن خشک گیاه غیرمیکوریزی تقسیم بر وزن گیاه خشک میکوریزی استفاده شد (Plenchette et al. 1983).

۴- ردیابی مولکولی

برای طراحی آغازگر اختصاصی گونه *T. claveryi*، ابتدا ترادف‌های معتبر ناحیه ITS-rDNA گونه‌های *Terfezia* از بانک ژن دریافت شدند. پس از ردیف‌چینی چندگانه ترادف‌های مطالعه حاضر با سایر ترادف‌ها، یک جفت آغازگر اختصاصی با استفاده از نرم‌افزار *Oligo 7* طراحی شد. ویژگی‌های جفت آغازگر شامل

جدول ۱- مکان‌های جمع‌آوری *Terfezia claveryi* و خصوصیات فیزیکی‌وشیمیایی خاک در استان فارسTable 1. Locations of *Terfezia claveryi* and physico-chemical characteristics of soil in Fars province (Iran)

Locality	Latitude	Longitude	Elevation (m)	Host	OM%	CaCO3%	Clay%	Sand%	Silt%	EC	pH
Lozuyeh	27° 55' 95" N	53° 20' 78" E	709	<i>Helianthemum lippii</i>	2.3	47	21	29	50	0.43	8.2
Lamerd	27° 51' 95" N	53° 21' 78" E	701	<i>H. lippii</i> / <i>H. salicifolium</i>	1.9	48	8.5	54	37.5	0.42	7.9
Mohr	27° 52' 95" N	53° 20' 78" E	638	<i>H. lippii</i> / <i>H. salicifolium</i>	1.8	46	9.5	52	38.5	0.43	8.1
Beyram	27° 27' 82" N	53° 35' 71" E	1169	<i>H. lippii</i> / <i>H. salicifolium</i>	1.85	49	5.4	59.6	35	0.42	7.75
Beyram	27° 27' 72" N	53° 35' 60" E	1165	<i>H. lippii</i> / <i>H. salicifolium</i>	1.84	49	13.5	49	37.5	0.51	7.89
Chahvarz	27° 28' 02" N	53° 34' 69" E	1142	<i>H. lippii</i> / <i>H. salicifolium</i>	2.11	46	8.5	52	39.5	0.50	7.93
Agoseh	27° 49' 34" N	53° 25' 34" E	642	<i>H. lippii</i> / <i>H. salicifolium</i>	1.35	49	10.5	51	38.5	0.48	7.6
Arad	28° 43' 00" N	53° 58' 00" E	630	<i>H. lippii</i>	1.46	50	5.8	63.2	31	0.41	7.69
Ehsham	27° 27' 31" N	53° 19' 84" E	537	<i>H. salicifolium</i>	2.21	52	16.6	52.4	31	0.43	7.95
Beyram	27° 28' 64" N	53° 35' 29" E	989	<i>H. lippii</i>	1.78	54	1	68	31	0.446	7.78
Beyram	27° 28' 45" N	53° 35' 27" E	1084	<i>H. salicifolium</i>	2.35	48	7.46	65.31	27.23	0.451	7.8
Beyram	27° 28' 17" N	53° 35' 30" E	1091	<i>H. salicifolium</i>	1.31	63	7.8	63.2	29	0.4	7.85
Evaz	27° 47' 90" N	53° 49' 06" E	943	<i>H. lippii</i> / <i>H. salicifolium</i>	1.9	44	0.14	67.72	32.14	0.53	8.1
Evaz	27° 46' 43" N	53° 56' 95" E	1033	<i>H. lippii</i> / <i>H. salicifolium</i>	2.35	45	0.14	69.72	30.14	0.47	7.83
Kahnuyeh	27° 55' 97" N	53° 20' 79" E	706	<i>H. lippii</i>	0.44	58	24	26.6	49.4	0.40	7.69
Evaz	27° 46' 37" N	53° 48' 26" E	944	<i>H. lippii</i>	0.79	57	8.86	62.74	28.4	0.42	8.1
Evaz	27° 46' 64" N	53° 47' 85" E	937	<i>H. lippii</i>	2.21	49	2.14	68.72	29.14	0.47	7.98
Mohr	27° 28' 13" N	53° 35' 41" E	1136	<i>H. lippii</i>	1.60	51	4.7	67.2	28.1	0.46	7.68
Chahvarz	27° 28' 03" N	53° 31' 70" E	968	<i>H. lippii</i>	0.54	62	3.4	62.6	34	0.41	7.75



شکل ۱- *Terfezia claveryi*: a. آسکوکارپ، b. گلبا آسک، c. آسکوسپور، d. سطح آسکوسپور (مقیاس = 30 میکرومتر در c و 5 میکرومتر در d).

**Fig. 1.** *Terfezia claveryi*: a. Ascocarp, b. Section of ascocarp, c. Asci with ascospores, d. Surface of spores (SEM) (Bars = 30  $\mu$ m in c and 5  $\mu$ m in d).

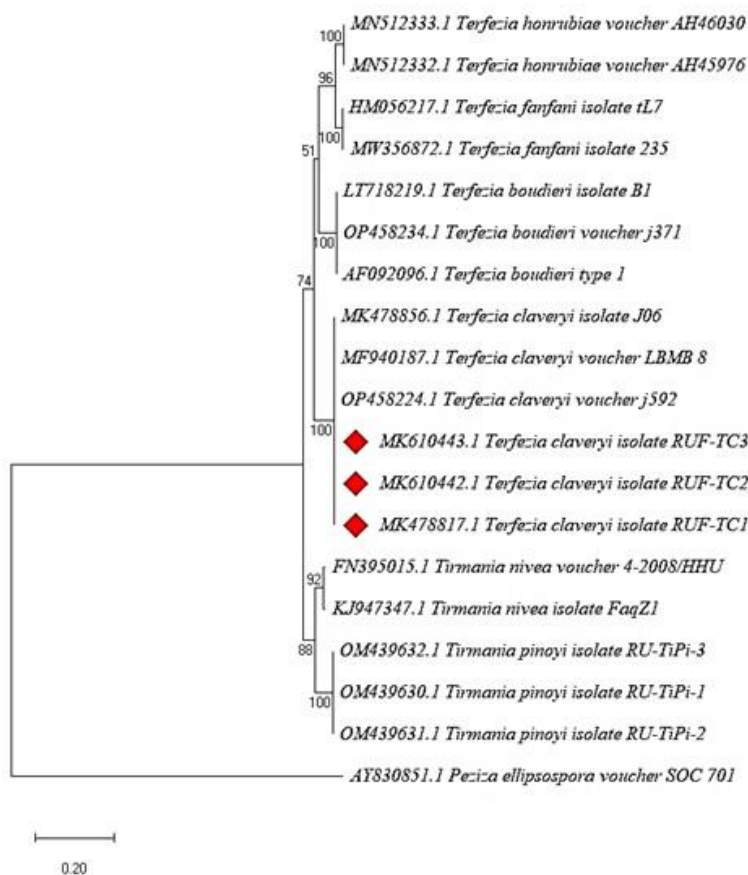


شکل ۲- ژل الکتروفورز محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز ناحیه ITS گونه *Terfezia claveryi* با آغازگرهای ITS1/ITS4. M: مارکر 100 جفت بازی. خطوط دیگر: نمونه‌های *T. claveryi*.

**Fig. 2.** Gel electrophoresis of PCR amplified products of *Terfezia claveryi* using primers ITS1/ITS4. Lane M: 100 bp DNA ladder. Other lanes: *T. claveryi* specimens.

توالی‌های ایجاد شده در این مطالعه با شماره‌های دسترسی MK610443، MK610442 و MK478817 (در شکل ۳ با ♦ مشخص شده‌اند)، با توالی‌های موجود برای *T. claveryi* در بانک ژن ۹۹/۸۹٪ شباهت دارند. در تجزیه و تحلیل فیلوژنی نیز نمونه‌های مطالعه شده به همراه سایر نمونه‌های معتبر موجود در بانک ژن از سایر کشورها در یک گروه تک‌نیایی قرار گرفتند (شکل ۳).

برای تایید شناسایی ریخت‌شناختی، ناحیه ITS-rDNA سه نمونه به عنوان نماینده با استفاده از جفت آغازگر ITS1 و ITS4 تکثیر و یک محصول PCR منفرد در حدود ۶۵۰-۶۰۰ جفت باز به دست آمد (شکل ۲). نتایج حاصل از مقایسه داده‌های توالی ایجاد شده با داده‌های توالی موجود در بانک ژن با استفاده از ابزار جستجوی BLASTn در پایگاه داده نوکلئوتیدی (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>)، نشان داد که



شکل ۳- درخت تبارزایی ترسیم شده با روش بیشینه احتمال با استفاده از نرم‌افزار MEGA 7 براساس ردیف‌چینی توالی ناحیه ITS نمونه‌های *Terfezia claveryi* همراه با توالی‌های اخذ شده از بانک ژن. ضریب اطمینان ۱۰۰۰ تکرار و توالی قارچ *Peziza ellipsospora* به عنوان گروه خارجی در نظر گرفته شده است.

**Fig. 3.** Maximum likelihood phylogram generated in MEGA 7 program from the alignment of internal transcribed spacer (ITS) sequences of the *Terfezia claveryi* specimens along with the sequences obtained from the GeneBank. The bootstrap value of 1000 repetitions was considered and *Peziza ellipsospora* was used as outgroup.

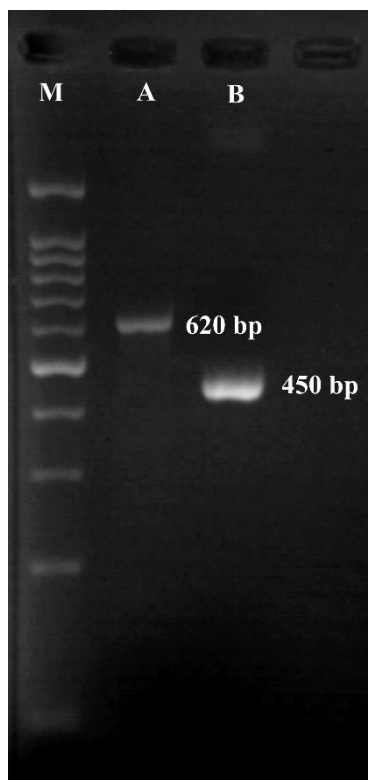
موقعیت نوکلئوتیدی ۵۲۲-۵۰۴ که طول قطعه مورد انتظار تکثیر حدود ۴۵۱ جفت باز بود، طراحی شد. جهت اطمینان از این که جفت آغازگر طراحی شده امکان تکثیر قطعه مورد انتظار از تمام نمونه‌های گونه *T. claveryi* را فراهم می‌کند، با استفاده از نرم‌افزار BioEdit یک فایل برآیند از داده‌های توالی نمونه‌های این گونه ایجاد و موقعیت جفت آغازگر طراحی شده روی فایل برآیند ارزیابی و قابلیت تکثیر از قطعه هدف، از تمامی نمونه‌های این

- طراحی آغازگر اختصاصی گونه ردیف‌چینی داده‌های توالی هم‌تراز ناحیه ITS-rDNA گونه‌های جنس *Terfezia* امکان طراحی آغازگر اختصاصی برای گونه *T. claveryi* را فراهم ساخت. یک جفت آغازگر شامل آغازگر رفت (FTeCl = 5'- TTCACCTTGTGTGGAACCCC -3') با موقعیت نوکلئوتیدی ۹۱-۷۲ و همچنین آغازگر برگشت (RTeCl = 5'- GAGGCAAGTACAATCAATC -3') با



آغازگر طراحی شده از کارایی لازم در شناسایی گونه هدف برخوردار می‌باشد، به این صورت که قطعه ۴۵۰ جفت بازی از DNA نمونه‌های تایید شده گونه *T. claveryi* براساس داده‌های توالی ناحیه ITS تکثیر گردید (شکل ۴).

گونه تایید گردید. ویژگی‌های جفت آغازگر شامل درصد گوانین سیتوزین، دمای ذوب، امکان تشکیل سنجاق سری و تشکیل پرایمر دایمر مشخص شده است (جدول ۲). ارزیابی الگوی بانندی تکثیر یافته طی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز روی ژل آگارز نشان داد، جفت

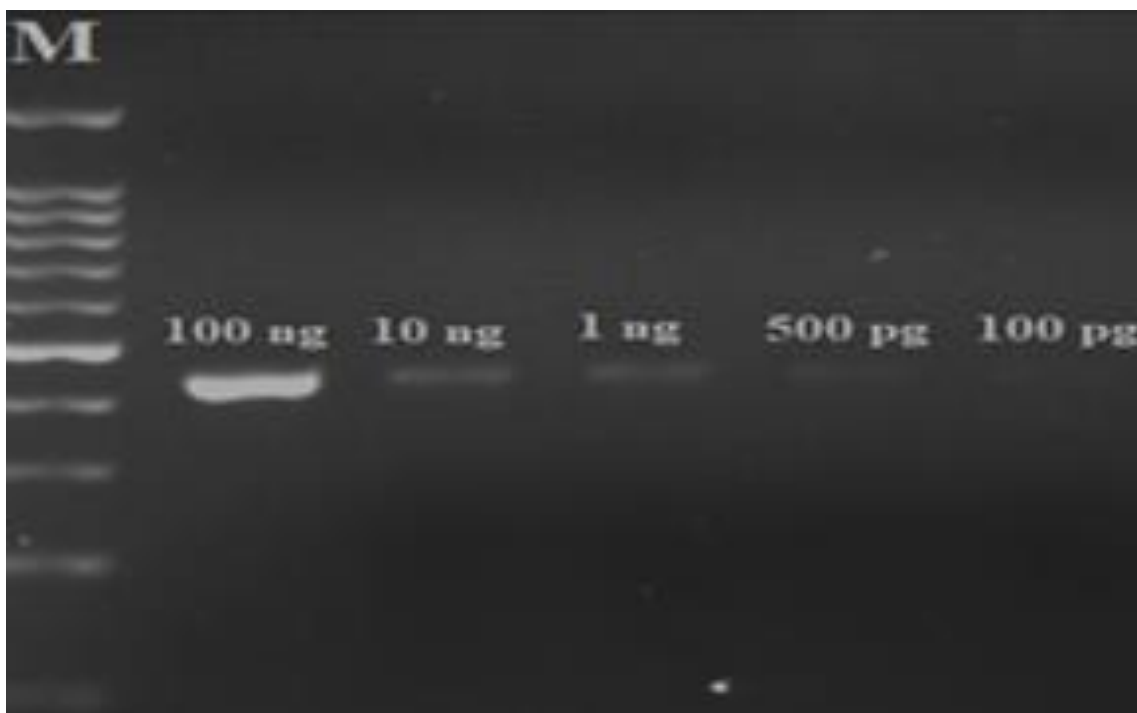


شکل ۴- ژل الکتروفورز محصول تکثیر شده با استفاده از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده FTeCl/RTeCl برای *Terfezia claveryi*. لاین M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی. لاین A: آغازگرهای عمومی ITS1/ITS4. لاین B: باند حاصل از آغازگرهای اختصاصی FTeCl/RTeCl طراحی شده برای *T. claveryi*.

**Fig. 4.** Gel electrophoresis of PCR-amplified product using *Terfezia claveryi* specific primers FTeCl/RTeCl. Lane M: 100 bp DNA ladder. Lane A: ITS1/ITS4 primer. Lane B: *T. claveryi* specific primers FTeCl/RTeCl.

طراحی شده FTeCl/RTeCl صورت گرفت. آنالیز محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز نشان داد که حد پایین برای ردیابی *T. claveryi* ۲۰ نانوگرم در مخلوط ۲۵ میکرولیتری از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز بود. برای افزایش حساسیت واکنش زنجیره‌ای پلیمرز تودرتو با استفاده از آغازگرهای عمومی ITS1/ITS4 و آغازگرهای طراحی شده FTeCl/RTeCl استفاده شد. این روش باعث افزایش حساسیت و ردیابی *T. claveryi* تا حدود ۱۰۰ پیکوگرم شد. بنابراین، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز تودرتو حد پایین ردیابی DNA ژنومی را از ۲۰ نانوگرم به ۱۰۰ پیکوگرم افزایش داد (شکل ۵).

- راستی‌آزمایی و ارزیابی حساسیت  
نتایج حاصل از راستی‌آزمایی آغازگرهای طراحی شده نشان داد که جفت آغازگر طراحی شده به طور اختصاصی قطعه ۴۵۰ جفت بازی را از نمونه‌های گونه *T. claveryi* تکثیر می‌نماید و تکثیری از DNA دیگر گونه‌های دنبلان که در این بررسی مطالعه گردید صورت نگرفت. حساسیت جفت آغازگر طراحی شده نیز با غلظت‌های مختلفی از DNA ژنومی *T. claveryi* در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز تودرتو بررسی شد. در مرحله نخست، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز استاندارد با استفاده از آغازگرهای اختصاصی



شکل ۵- آزمون حساسیت با آغازگرهای FTeCl/RTeCl با استفاده از غلظت‌های مختلف DNA اندام بارده *Terfezia claveryi*.  
M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی.

**Fig. 5.** Sensitivity of PCR with primers FTeCl/RTeCl using different concentrations of fruit body of *Terfezia claveryi* DNA. Lane M: 100 bp DNA ladder.

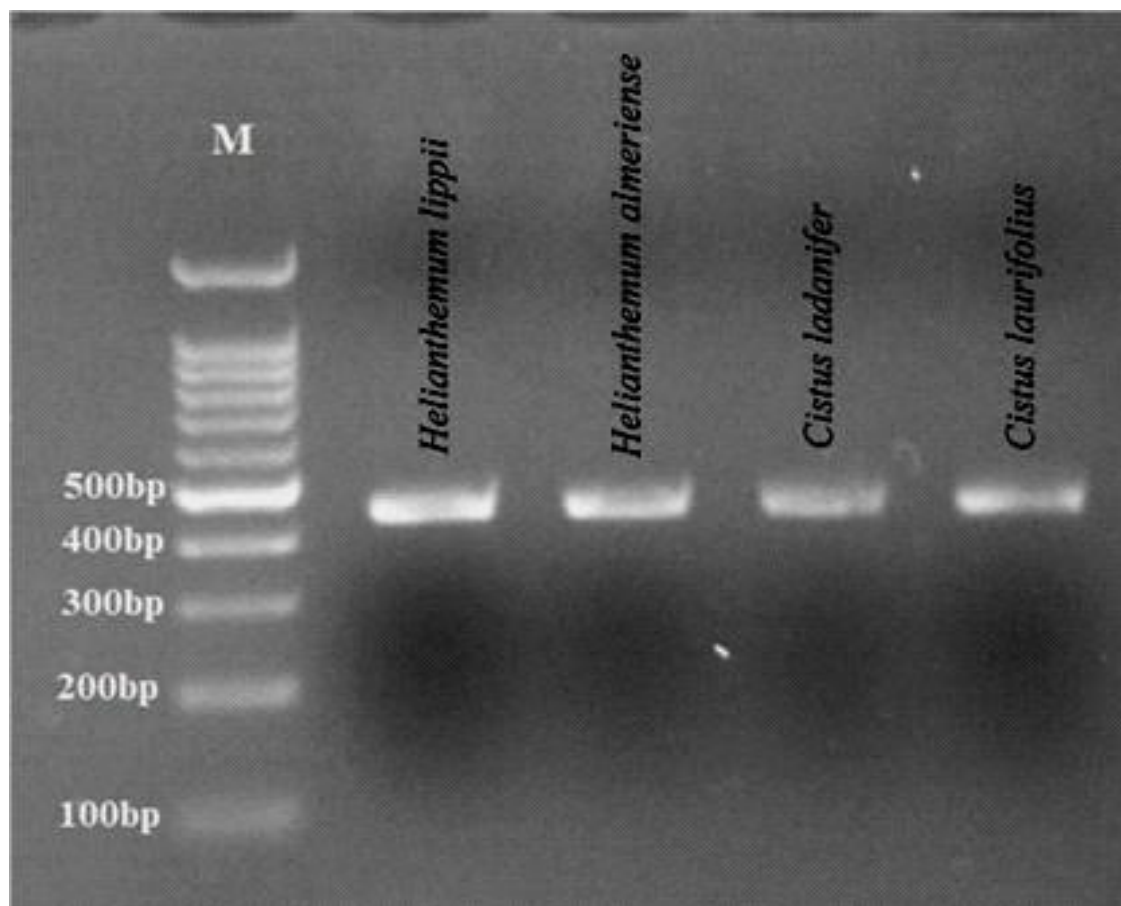
جدول ۲- ویژگی‌های جفت آغازگر طراحی شده در این مطالعه جهت ردیابی *Terfezia claveryi* در گیاهان مایه‌زنی شده

**Table 2.** Characteristics of primer pairs designed in this study to detect *Terfezia claveryi* in inoculated plants

Primer	Direction	GC%	Melting temperature	Length (bp)	Secondary structure	Dimer
FTeCl	Forward	50	59.35	20	No	No
RTeCl	Reverse	42.11	52.35	19	No	No

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز تودرتو قرار گرفتند. برای تمام گیاهان مایه‌زنی شده با *T. claveryi* یک باند ۴۵۰ جفت بازی روی ژل آگارز حاصل گردید، در صورتی که هیچ باندهایی برای گیاهان شاهد به دست نیامد (شکل ۶).

- ردیابی *Terfezia claveryi* در گیاهان مایه‌زنی شده واکنش زنجیره‌ای پلیمرز تودرتو برای ردیابی *T. claveryi* در گیاهان مایه‌زنی شده انجام شد. DNA ژنومی گیاهان مایه‌زنی شده با *T. claveryi* و گیاهان شاهد استخراج و مورد ارزیابی در

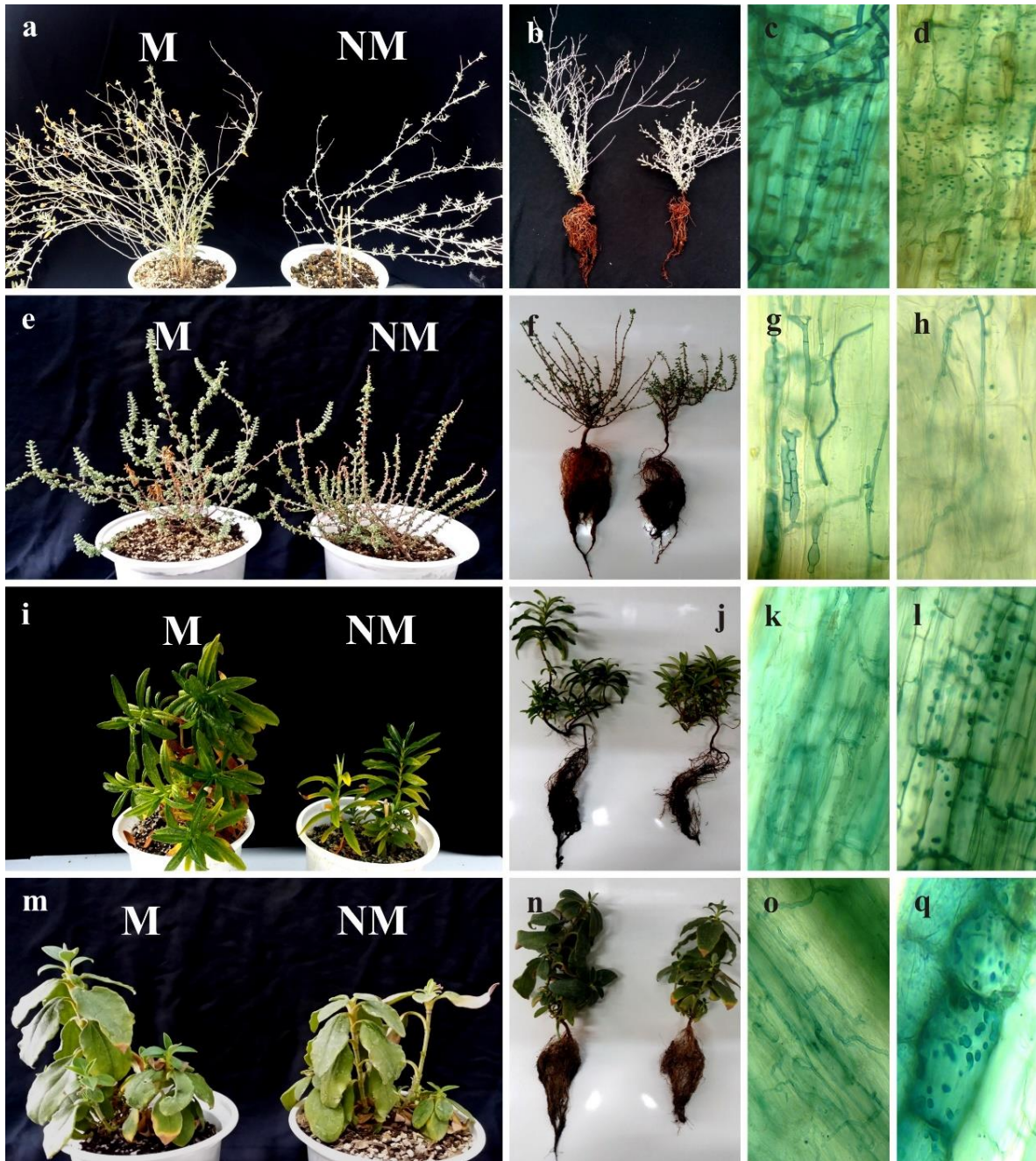


شکل ۶- باند حاصل از تکثیر DNA گیاهان مایه‌زنی شده با استفاده از آغازگرهای اختصاصی FTeCl/RTeCl. M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی.  
**Fig. 6.** Specific primer FTeCl/RTeCl amplified DNA of artificially inoculated plants. Lane M: 100 bp DNA ladder.

نه چندان متراکم داد (شکل ۷ e-h). ارتفاع بوته‌های مایه‌زنی شده، ارتفاع اندام هوایی، وزن تر ریشه و وزن تر اندام هوایی به طور معنی‌داری تحت تأثیر *T. claveryi* قرار گرفت، اما قارچ میکوریز تأثیر معنی‌داری بر وزن خشک و تر گیاه، وزن خشک ریشه و اندام هوایی و ارتفاع ریشه و مقدار کلروفیل نداشت (جدول ۳). در گونه گیاهی *C. laurifolius*، قارچ *T. claveryi* تشکیل قارچ‌ریشه خارجی-داخلی با تشکیل غیرمتراکم غلاف و نفوذ به داخل سلول‌های کورتکس ریشه داد (شکل ۷ i-l). ارتباط هم‌زیستی این دو تأثیر معنی‌داری بر وزن تر و خشک اندام هوایی، ارتفاع ساقه و ارتفاع گیاهان مایه‌زنی شده داشت به گونه‌ای که اختلاف معنی‌داری با گیاهان شاهد نشان داد (جدول ۳). در گونه گیاهی *C. ladanifer*، قارچ *T. claveryi* تشکیل قارچ‌ریشه خارجی داخلی با تشکیل غیرمتراکم غلاف و نفوذ به داخل سلول‌های کورتکس ریشه را داد (شکل ۷ m-p). در این ارتباط هم‌زیستی به جز وزن تر ریشه، ارتفاع اندام هوایی و مقدار کلروفیل، در سایر پارامترها نسبت به گیاهان شاهد تفاوت معنی‌داری مشاهده شد (جدول ۳).

- پارامترهای رشدی

بررسی میکروسکوپی قطعات ریشه نشان داد که *T. claveryi* با هر چهار گونه گیاهی (*C. ladanifer*، *C. laurifolius*، *H. almeriense* و *H. lippii*)، تشکیل قارچ‌ریشه خارجی-داخلی با درجات مختلفی از توسعه غلاف را می‌دهد. سیستم ریشه گیاهان مایه‌زنی شده *H. lippii* با *T. claveryi* به خوبی میکوریزه شده و علاوه بر تشکیل غلاف، نفوذ ریشه به داخل سلول‌های کورتکس مشاهده شد (شکل ۷ a-d). نتایج حاصل از ارتباط هم‌زیستی بین *T. claveryi* و *H. lippii* نشان داد که قارچ *T. claveryi* به طور قابل توجهی پارامترهای رشدی گیاهان مایه‌زنی شده را نسبت به گیاهان شاهد افزایش داده است. نتایج تجزیه واریانس برای رشد پارامترهای گیاهی، اثرات قابل توجه میکوریزاسیون را بر وزن تر و خشک کل گیاهان، وزن تر ریشه، وزن تر و خشک اندام هوایی، ارتفاع بوته، ریشه و ارتفاع اندام هوایی نشان داد (جدول ۳). در *H. almeriense*، گونه قارچی *T. claveryi* تشکیل قارچ‌ریشه خارجی-داخلی با نفوذ ریشه‌ها به داخل سلول‌های کورتکس ریشه و تشکیل غلاف با ریشه‌های



شکل ۷- عکس‌برداری توسط میکروسکوپ نوری از ریشه‌های گیاهان مایه‌زنی شده با *Terfezia claveryi* ( $\times 400$ ): گیاه *H. lippii* میکوریزی و غیرمیکوریزی (a, b)، غلاف و نفوذ ریشه به داخل سلول در ترکیب *H. lippii* / *T. claveryi* (c, d)، گیاه *H. almeriense* میکوریزی و غیرمیکوریزی (e, f)، غلاف و نفوذ ریشه به داخل سلول در ترکیب *H. almeriense* / *T. claveryi* (g, h)، گیاه *C. ladanifer* میکوریزی و غیرمیکوریزی (i, j)، غلاف و نفوذ ریشه به داخل سلول در ترکیب *T. claveryi* / *C. ladanifer* (k, l)، گیاه *C. laurifolius* میکوریزی و غیرمیکوریزی (m, n)، غلاف و نفوذ ریشه به داخل سلول در ترکیب *T. claveryi* / *C. laurifolius* (o, p).

**Fig. 7.** Light microphotographs of *Terfezia claveryi*-plant mycorrhizal roots (400  $\times$ ): (a, b) mycorrhizal and non-mycorrhizal *H. lippii*, (c, d) *T. claveryi*  $\times$  *H. lippii* root showing developed sheath, (e, f) mycorrhizal and non mycorrhizal *H. almeriense*, (g, h) *T. claveryi*  $\times$  *H. almeriense* root showing sheath, (i, j) mycorrhizal and non mycorrhizal *T. claveryi*  $\times$  *C. ladanifer*, (k, l) *T. claveryi*  $\times$  *C. ladanifer* root showing sheath, (m, n) mycorrhizal and non mycorrhizal *T. claveryi*  $\times$  *C. laurifolius*, (o, p) *T. claveryi*  $\times$  *C. laurifolius* root showing sheath.

جدول ۳- میانگین وزن تر و وزن خشک گیاه؛ وزن تر و وزن خشک ریشه؛ وزن تر و وزن خشک اندام هوایی؛ ارتفاع گیاه، ریشه و اندام هوایی و مقدار کلروفیل

Table 3. Mean plant fresh & dry weights; root fresh & dry weights; shoot fresh & dry weights; plant, root & shoot heights; and chlorophyll rate

Combination	Treatment	Fresh weight of entire plant (g)	Dry weight of entire plant (g)	Root fresh weight	Root dry weight	Shoot fresh weight	Shoot dry weight	Plant height	Root height	Shoot height	Chlorophyll content	F (%)	RMD (%)
<i>Helianthemum lippii</i>	M	27.535±1.12*	9.9±1.32*	10.43±1.1*	1.96±1.4 <sup>NS</sup>	17.42±1.03*	7.94±1.19*	56.50±1.05*	23.40±1.42*	32.60±1.28*	10.35±0.9 <sup>NS</sup>	87	48.18
<i>Terfezia claveryi</i>	NM	19.40±1.49*	5.13±1.19*	7.37±0.52*	1.59±0.16 <sup>NS</sup>	12.03±1.33*	3.54±1.14*	47.30±2.49*	17.90±1.26*	28.90±1.28*	10.20±0.61 <sup>NS</sup>	-	-
<i>H. almeriens/ T. claveryi</i>	M	20.51±0.55 <sup>NS</sup>	7.14±0.45 <sup>NS</sup>	10.38±0.36*	2.70±0.74 <sup>NS</sup>	10.13±1.1*	4.44±0.81 <sup>NS</sup>	42.90±1.9*	20.80±1.2 <sup>NS</sup>	21.60±1.32*	26.40±4.7 <sup>NS</sup>	80	17.92
	NM	17.69±1.39 <sup>NS</sup>	5.86±0.48 <sup>NS</sup>	8.76±0.89*	2.16±0.26 <sup>NS</sup>	9.15±0.66*	3.70±0.34 <sup>NS</sup>	34.90±2.27*	17.80±1.19 <sup>NS</sup>	16.60±1.11*	24.00±5.81 <sup>NS</sup>	-	-
<i>Cistus ladanifer/ T. claveryi</i>	M	21.94±0.43*	8.03±0.56*	5.38±0.42 <sup>NS</sup>	1.54±0.93*	17.00±0.63*	6.49±0.74*	35.20±1.75*	17.50±0.75*	17.40±1.2 <sup>NS</sup>	42.83±2.03 <sup>NS</sup>	65	21.79
	NM	18.45±0.88*	6.28±0.44*	5.47±0.23 <sup>NS</sup>	1.02±0.10*	12.58±0.7*	5.26±0.37*	28.38±1.58*	13.27±0.93*	14.61±1.07 <sup>NS</sup>	42.61±2.25 <sup>NS</sup>	-	-
<i>C. laurifolius/ T. claveryi</i>	M	30.84±1.32 <sup>NS</sup>	8.86±0.56 <sup>NS</sup>	9.94±0.75 <sup>NS</sup>	1.92±0.45 <sup>NS</sup>	20.9±0.23*	6.94±0.64*	35.20±0.54*	14.70±0.73 <sup>NS</sup>	20.00±0.32*	37.63±2.54 <sup>NS</sup>	40	11.6
	NM	27.23±1.68 <sup>NS</sup>	7.83±0.46 <sup>NS</sup>	9.93±0.75 <sup>NS</sup>	1.94±0.23 <sup>NS</sup>	16.87±1.11*	5.83±0.35*	32.10±0.99*	14.70±0.69 <sup>NS</sup>	16.90±0.65*	38.51±2.34 <sup>NS</sup>	-	-

آنالیز تجزیه واریانس یکطرفه؛ مقادیر شامل میانگین +/- خطای معیار، NS عدم معنی‌داری، M گیاه مایه‌زنی شده، NM کنترل، \*P < 0.05 سطح معنی‌داری



## بحث

در مطالعه حاضر، ارتباط همزیستی *T. claveryi* با چهار گونه گیاهی به اسامی *H. almeriense*، *H. lippii*، *Cistus laurifolius* و *C. ladanifer* در مخلوطی از پیت‌ماس-ورمیکولیت-ماسه سترون به نسبت حجمی ۱:۱:۲ با غلظت کم فسفر در شرایط گلخانه مورد بررسی قرار گرفت. تولید گیاهان چندساله همزیست از گل‌آفتابیان نخستین قدم برای کشت موفق دنبان‌ها در مزارع یا مراتع می‌باشد. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که *T. claveryi* با هر چهار گونه گیاهی ایجاد همزیستی از نوع خارجی-داخلی می‌نماید. غلاف در گیاهان مایه‌زنی شده به صورت ریشه‌هایی شل تا مترکم در سطح ریشه گیاهان مشاهده شد. آلودگی درون سلولی در کورتکس تمام گونه‌های گیاهی مشاهده شد. در نواحی بیابانی و مدیترانه‌ای، چندین گونه از جنس *Terfezia*، در ارتباط با گونه‌های *Helianthemum* به طور فراوان گزارش شده‌اند (کووکس و همکاران ۲۰۰۳). در یک بررسی، ارتباط گونه‌های *T. claveryi* و *T. boudieri* با گونه‌های یک‌ساله *H. ledifolium* و *H. salicifolium* از نوع قارچ‌ریشه داخلی گزارش شده است (Awameh & Alsheikh 1979). مورته و همکاران (Morte et al. 1994) ارتباط همزیستی گونه *H. almeriense* که فراوانترین بوته گیاهی در نواحی نیمه‌خشک اسپانیا است را با گونه‌هایی از *Terfezia* از نوع قارچ‌ریشه خارجی-داخلی گزارش کرده‌اند. همچنین، مانند به صورت ریشه‌هایی با تراکم کم در سطح ریشه مشاهده شده است و تنها آلودگی داخلی و بین سلولی در قسمت کورتکس ریشه گزارش گردیده و آلودگی اپیدرم، آندودرم و قسمت مرکزی مشاهده نشده است. در مطالعه حاضر نیز تنها آلودگی داخل و بین سلول‌های کورتکس مشاهده شد. در گزارش‌های دیگر بسته به حاصلخیزی خاک و میزان فسفر، ارتباط همزیستی گونه‌های مختلف *Terfezia* با گیاهان میزبان از نوع قارچ‌ریشه خارجی، داخلی یا خارجی-داخلی گزارش شده است (Leduc et al. 1986, Fortas & Chevalier 1992, Gutierrez et al. 2003). در رابطه همزیستی *T. terfezioides* و *Robinia pseudoacacia*، وجود ریشه‌های مارپیچ در سلول‌های کورتکس مشاهده گردید اما شبکه هارتیگ، مانند و ریشه‌های بین سلولی مشاهده نشد (Bratek et al. 1996). در این مطالعه، گیاهان مایه‌زنی شده بزرگتر بودند و زیست‌توده بیشتری نسبت به گیاهان شاهد تولید کردند. این گونه‌های گیاهی مایه‌زنی شده با دنبان‌ها را می‌توان برای احیای زمین‌های خشک تخریب شده و همچنین برای تولید دنبان به صورت مصنوعی استفاده کرد. در ایران، کشت این گونه می‌تواند در بیابان‌زدایی و همچنین منبع درآمد مردم محلی حایز اهمیت باشد. استفاده از گیاهان همزیست

در این بررسی، *Terfezia claveryi* همراه با گونه گیاهی چندساله *Helianthemum lippii* و یک‌ساله *H. salicifolium* از مناطق جنوبی ایران جمع‌آوری شد. این گونه قبلاً از استان‌های مختلف ایران از جمله فارس، هرمزگان، بوشهر، لرستان، آذربایجان غربی، کرمانشاه و کردستان گزارش شده بود (Jamali & Banihashemi 2012). در ایران، علاوه بر این گونه، یک گونه دیگر به نام *T. boudieri* توسط عمارلو و همکاران از استان‌های شمال غربی ایران از جمله زنجان گزارش شده است (Ammarellou & Saremi 2008). در سال ۱۸۹۷ براساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی، سه گونه از *Terfezia* به اسامی *T. aphroditis*، *T. hanotauxii* و *T. hafizi* از ایران گزارش شده (Esfandiari & Petrak 1950, Petrak 1949) که از آن گزارش‌های قدیمی تاکنون، وجود این سه گونه در ایران تایید نشده است. براساس مطالعات قبلی در ایران، گونه *T. claveryi* بیشترین پراکنش را در بین سایر دنبان‌های بیابانی در ایران دارد (جمالی و بنی‌هاشمی ۲۰۱۲). در این مطالعه نیز از بین گونه‌های *Terfezia* در استان‌های جنوبی، تنها *T. claveryi* جمع‌آوری و شناسایی گردید. در بیشتر گزارش‌ها، گیاه گل‌آفتاب (*Helianthemum spp.*) از گل‌آفتابیان و تعدادی از گیاهان جگنیان از جمله گونه *Carex stenophylla* در مجاورت با گونه *T. claveryi* شناسایی شده‌اند (Jamali & Banihashemi 2012, Jamali & Banihashemi 2007, Ammarellou et al. 2007). از بین گونه‌های گل‌آفتاب همراه با *T. claveryi*، گونه‌های *H. salicifolium* و *H. ledifolium* یک‌ساله و گونه *H. lippii* چندساله می‌باشد. گونه‌های دیگری از جنس *Helianthemum* مانند *H. guttatum* (Diez et al. 2002) نیز به عنوان میزبان معرفی شده است. در این مطالعه، گیاهان غالب در مناطق مورد بررسی *H. salicifolium* و *H. lippii* بودند، اما گیاهان جنس *Cistus* و *H. almeriense* یافت نشدند. خاک مناطق مورد بررسی در این مطالعه لومی، قلیایی، آهکی، با مواد آلی کم و غیرشور بود. در مطالعات قبلی، مناطقی که *T. claveryi* از آن‌ها گزارش شده بود، دارای خاک‌هایی شنی، شنی لومی، قلیایی، آهکی و با مواد آلی کم بودند (Alsheikh & Trappe 1983, Ravolanirina 1986, Diez et al. 2002). در مطالعاتی که قبلاً در ایران صورت گرفته نیز مشخص شد که الگوی پراکنش دنبان‌ها با بافت خاک، اسیدیته، EC و گیاه میزبان همبستگی داشته و بین *T. claveryi* و خاک‌های ماسه‌ای همبستگی مثبت وجود دارد (جمالی و بنی‌هاشمی ۲۰۱۲).

وجود ساختارهای میکوریزی از جمله غلاف، شواهد کافی برای تایید رابطه بین گیاه و دنبلان‌ها نیست. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی گونه، امکان ردیابی ریشه‌های قارچی موجود در ریشه گیاهان میزبان را بسیار بهبود بخشیده است. روش‌های مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، دقیق، حساس، سریع و اختصاصی هستند و بیشتر برای شناسایی معمول میکوریزها به کار می‌روند. در این مطالعه، از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز تودرتو به عنوان یک روش سریع و حساس برای تشخیص ردیابی *T. claveryi* استفاده شد. با استفاده از این روش، ردیابی *T. claveryi* در گیاهچه‌های مایه‌زنی شده در گلخانه به راحتی انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز تودرتو برای ردیابی و تشخیص ریشه گونه‌های مختلفی از قارچ‌ها در ریشه گیاهان میزبان استفاده شده است (Turnau et al. 2001, Zampieri et al. 2009, Jamali & Banihashemi 2012, Jamali & Banihashemi 2013a, 2013b, Jamali 2016). این روش می‌تواند در آینده برای نظارت و ارزیابی گیاهچه‌های همزیست در شرایط گلخانه و انتقال آن‌ها به مزارع یا مراتع مورد استفاده قرار گیرد.

### سپاسگزاری

تحقیق حاضر تحت حمایت مادی صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور (INSF) برگرفته شده از طرح شماره ۴۰۱۱۱۲ انجام شده که به این وسیله نگارندگان، مراتب قدردانی خود را ابراز می‌نمایند.

و مایه‌زنی شده در بیابان‌زدایی می‌تواند اثرات تغییرات آب و هوایی را نیز بهبود بخشد (Slama et al. 2021).

وابستگی نسبی همزیستی درجه‌ای از وابستگی یک گونه گیاهی برای رسیدن به حداکثر رشد در یک شرایط محیطی به یک ارتباط همزیستی بیان شده است (Plenchette et al. 1983). این شاخص امکان ارزیابی وابستگی یک گونه گیاهی به ارتباط همزیستی برای دستیابی به حداکثر رشد و نمو آن را فراهم می‌کند (Torres et al. 2021). در این مطالعه، بالاترین میزان وابستگی نسبی همزیستی در *H. lippii/T. claveryi* مشاهده شد. این وابستگی نسبی همزیستی با توجه به میزبان بودن این گونه گیاهی در مناطق خشک و نیمه‌خشک ایران کاملاً منطقی است. در این مطالعه، اگرچه هر چهار گونه گیاهی با *T. claveryi* تشکیل همزیستی دادند، اما نتایج تحقیق حاضر نشان داد که *H. lippii* گزینه بهتری نسبت به سایر میزبان‌ها برای تولید گیاهان همزیست می‌باشد. گونه گیاهی *H. almeriense* از نظر درجه کلونیزاسیون و وابستگی نسبی همزیستی بعد از *H. lippii* در مرتبه دوم قرار داشت. در اسپانیا، این گونه گیاهی در ارتباط همزیستی با *T. claveryi* به صورت تجاری کشت شده است (Honrubia et al. 2001, Morte et al. 2009). این گونه گیاهی در ایران وجود ندارد و می‌توان بجای آن از گونه گیاهی *H. lippii* استفاده یا آن را وارد کرد و به عنوان میزبان استفاده نمود، اما سازگاری و پایداری این گونه باید در مزارع یا مراتع بررسی شود. هر نوع تلاش برای تحقیقات مرتبط با کشت دنبلان‌ها، نیازمند ابزاری برای ردیابی آن‌ها در گیاهان مایه‌زنی شده است.

(*Termania nivea* et *T. pinoyi*) [variete de truffe].  
Annales de Phytopathologie 13: 21–29.

### References

- Alsheikh, A.M. & Trappe, J.M. 1983. Desert truffles: the genus *Tirmania*. Transactions of the British Mycological Society 81(1): 83–90.
- Ammarellou, A., Saremi, H. & Gučin, F. 2007. Evaluation of morphology, cytology and mycorrhizal relationships of desert truffles (*Terfezia boudieri*) in Iran. Pakistan Journal of Biological Sciences 10(9): 1486–1490.
- Ammarellou, A. & Saremi, H. 2008. Mycorrhiza between *Kobresia bellardii* (All.) Degel and *Terfezia boudieri* Chatin. Turkish Journal of Botany 32: 17–23.
- Awameh, M. & Alsheikh, A. 1979. Les caractéristiques et la germination des ascospores de la kame blanche (*Termania nivea* et *T. pinoyi*) [variete de truffe]. Annales de Phytopathologie 13: 21–29.
- Biermann, B. & Linderman, R. 1981. Quantifying vesicular-arbuscular mycorrhizae: a proposed method towards standardization. New Phytologist 87: 63–67.
- Bouzadi, M., Grebenc, T., Turunen, O., Kraigher, H., Taib, H., Alafai, A., Sbissi, I., Assad, M.E.H., Bedade, D. & Shamekh, S. 2017. Characterization of natural habitats and diversity of Libyan desert truffles. 3 Biotech 7(5): 1–10. Doi: 10.1007/s13205-017-0949-5.
- Bratek, Z., Jakucs, E., Bóka, K. & Szedlay, G., 1996. Mycorrhizae between black locust (*Robinia*

- pseudoacacia*) and *Terfezia terfezioides*. Mycorrhiza 6: 271–274.
- Demir, S., Sipahioglu, H.M., Kaya, I., Usta, M. & Savur, O.B. 2011. Detection of arbuscular mycorrhizal fungi within colonised roots of the Gramineae family members by Nested-polymerase chain reaction (PCR). Archives of Phytopathology and Plant Protection 44: 1061–1067.
- Dexheimer, J., Gerard, J., Leduc, J.P. & Chevalier, G. 1985. Étude ultrastructurale comparée des associations symbiotiques mycorrhiziennes *Helianthemum salicifolium*-*Terfezia claveryi* et *Helianthemum salicifolium*-*Terfezia leptoderma*. Canadian Journal of Botany 63(3): 582–591.
- Díez, J., Manjón, J.L. & Martin, F. 2002. Molecular phylogeny of the mycorrhizal desert truffles (*Terfezia* and *Tirmania*), host specificity and edaphic tolerance. Mycologia 94(2): 247–59.
- Esfandiari, E. & Petrak, F. 1950. Fungi from Iran. Sydowia 4: 1–6.
- Fortas, Z. & Chevalier, G. 1992. Effet des conditions de culture sur la mycorrhization de l' *Helianthemum guttatum* par trois espèces de terfez des genres *Terfezia* et *Tirmania* d'Algérie. Canadian Journal of Botany 70: 2453–2460.
- Gandebœuf, D., Dupré, C., Chevalier, G., Roedel-Drevet, P. & Nicolas, P. 1997. Grouping and identification of Tuber species using RAPD markers. Canadian Journal of Botany 75: 36–45.
- Grace, C. & Stribley, D.P. 1991. A safer procedure for routine staining of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. Mycological Research 95: 1160–1162.
- Guevara-Guerrero, G., Pacioni, G., Leonardi, M., Ocañas, F.G. & Hernández, R.G. 2022. Mycorrhizal synthesis of périgord black truffle (*Tuber melanosporum*) with Mexican oak species. Microbiology and Biotechnology Letters 50(1): 40–50.
- Gutiérrez, A., Morte, A. & Honrubia, M. 2003. Morphological characterization of the mycorrhiza formed by *Helianthemum almeriense* Pau with *Terfezia claveryi* Chatin and *Picoa lefebvrei* (Pat.) Maire. Mycorrhiza 13: 299–307.
- Hall, I.R., Yun, W. & Amicucci, A. 2003. Cultivation of edible ectomycorrhizal mushrooms. Trends in Biotechnology 21: 433–438.
- Henrion, B., Chevalier, G. & Martin, F. 1994. Typing truffle species by PCR amplification of the ribosomal DNA spacers. Mycological Research 98(1): 37–43.
- Honrubia, M., Gutiérrez, A. & Morte, A. 2001. Desert Truffle Plantation from Southeast Spain. 3rd International Conference on Mycorrhiza, Adelaide, Australia.
- Jamali, S. 2015. Specific PCR-primers for detection of *Picoa lefebvrei* desert truffle in *Carex stenophylla* roots. Rostaniha 16(2): 206–207.
- Jamali, S. & Banihashemi, Z. 2012. Hosts and distribution of desert truffles in Iran based on morphological and molecular criteria. Journal of Agricultural Science and Technology 14: 1379–1396.
- Jamali, S. & Banihashemi, Z. 2013a. Nested-PCR for detecting *Terfezia claveryi* in roots of *Helianthemum* species in field and greenhouse conditions. Journal of Agricultural Science and Technology 15: 377–387.
- Jamali, S. & Banihashemi, Z. 2013b. Species-specific ITS primers for the identification of *Picoa juniperi* and *P. lefebvrei* and using Nested-PCR for detection of *P. juniper* in planta. Molecular Biology Reports 40: 5701–5712.
- Jeffries, P. & Barea, J.M. 2012. Arbuscular Mycorrhiza: A Key Component of Sustainable Plant-Soil Ecosystems. Fungal Associations 51–75.
- Kagan-Zur, V., Roth-Bejerano, N., Sitrit, Y. & Morte, A. 2013. Desert truffles: phylogeny, physiology, distribution and domestication. Springer Science & Business Media.
- Kovacs, G.M., Vagvolgyi, C. & Oberwinkler, F. 2003. *In vitro* interaction of the truffle *Terfezia terfezioides* with *Robinia pseudoacacia* and *Helianthemum ovatum*. Folia Microbiologica 48(3): 369–378.



- Leduc, J., Dexheimer, J. & Chevalier, G. 1986. Etude Ultrastructurale Comparee des Associations de *Terfezia leptoderma* avec *Helianthemum salicifolium*, *Cistus albidus* et *C. salviaefolius*. Pp. 291–295. In: Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae. Proceedings of the 1st. European Symposium on Mycorrhizae, Dijon, 1–5 Jul. 1985.
- Marqués-Gálvez, J.E., Miyauchi, S., Paolocci, F., Navarro-Ródenas, A., Arenas, F., Pérez-Gilabert, M., Morin, E., Auer, L., Barry, K.W. & Kuo, A. 2021. Desert truffle genomes reveal their reproductive modes and new insights into plant-fungal interaction and ectendomycorrhizal lifestyle. *New Phytologist* 229: 2917–2932.
- Moreno, G., Diez, J. & Manjon, J. 2000. *Picoa lefebvrei* and *Tirmania nivea*, two rare hypogeous fungi from Spain. *Mycological Research* 104: 378–381.
- Morte, A., Navarro-Ródenas, A. & Nicolás, E. 2010. Physiological parameters of desert truffle mycorrhizal *Helianthemum almeriense* plants cultivated in orchards under water deficit conditions. *Symbiosis* 52: 133–139.
- Morte, A., Zamora, M., Gutiérrez, A. & Honrubia, M. 2009. Desert Truffle Cultivation in Semiarid Mediterranean Areas. Mycorrhizas-functional processes and ecological impact. Springer. Pp. 221–233.
- Morte, M.A., Cano, A., Honrubia, M. & Torres, P. 1994. In vitro mycorrhization of micropropagated *Helianthemum almeriense* plantlets with *Terfezia claveryi* (desert truffle). *Agricultural and Food Science* 3: 309–314.
- Neuner-Plattner, I., Grabher, T., Hall, I., Stöffler, G., Griffin, F. & Haselwandter, K. 1999. A comparison of immunological assays for the identification of *Tuber* spp. and other edible ectomycorrhizal fungi. *Mycological Research* 103: 403–412.
- Pacioni, G. & Pomponi, G. 1989. Chemotaxonomy of some Italian species of *Tuber*. *Micologia e Vegetazione Mediterranea* 4: 63–72.
- Papa, G., Balbi, P. & Audisio, G. 1987. Preliminary study of fungal spores by pyrolysis-gas chromatography. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 11: 539–548.
- Petrak, F. 1949. Beitrnge zur Pilzflora Irans. *Sydowia* 3: 268–332.
- Phillips, J.M. & Hayman, D.S. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society* 55(1): 158–IN18.
- Plenchette, C., Fortin, J.A. & Furlan, V. 1983. Growth responses of several plant species to mycorrhizae in a soil of moderate P-fertility. *Plant and Soil* 70(2): 199–209.
- Ravolanirina, F. 1986. Etude de l'influence de quelques facteurs sur la croissance mycelienne des terfez in vitro et synthese des mycorhizes. Mém. DEA, Univ. Clermont Ferrand, France, 72 pp.
- Sao Mai, D., Ngo, T.X., Au, V.T., Sandor, H. & Peter, S. 2012. Compare the Effect of *Terfezia* and *Tuber aestivum* on *Pinus caribaea* Development in Vietnam. 3rd International Conference on Biology, Environment and Chemistry. Thailand. Vol. 46. Doi: 10.7763/IPCBEei.
- Séjalon-Delmas, N., Roux, C., Martins, M., Kulifaj, M., Bécard, G. & Dargent, R. 2000. Molecular tools for the identification of *Tuber melanosporum* in agroindustry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 2608–2613.
- Slama, A., Fortas, Z., Boudabous, A. & Neffati, M. 2010. Cultivation of an edible desert truffle (*Terfezia boudieri* Chatin). *African Journal of Microbiology Research* 4: 2350–2356.
- Slama, A., Fkiri, S., Fortas, Z., Nasr, Z. & Khaldi, A. 2021. Morphological responses of *Quercus suber* L. and *Q. coccifera* L. seedlings to mycorrhization with desert truffle *Terfezia boudieri* Chatin. *Journal of Material and Environmental Science* 12(9): 1165–1175.

- Torres, N., Yu, R. & Kurtural, S.K. 2021. Arbuscular mycorrhizal fungi inoculation and applied water amounts modulate the response of young grapevines to mild water stress in a hyper-arid season. *Frontiers in Plant Science* 11: 622209. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.622209>.
- Trappe, J.M. 1971. A synopsis of the Carbotomycetaceae and Terfeziaceae (Tuberales). *Transactions of the British Mycological Society* 57(1): 85–92.
- Trappe, J.M. 1979. The orders, families and genera of hypogeous ascomycotina (truffles and their relatives). *Mycotaxon* 9(1): 297–340.
- Trouvelot, A., Kough, L. & Gianinazzi-Pearson, V. 1986. Mesure du taux de mycorrhization VA d'un systeme radicaire. Recherche de methodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. Pp. 217–221. *In: Gianinazzi-Pearson, V. & Gianinazzi, S. (eds), Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae*. INRA: Paris.
- Turnau, K., Ryszka, P., Gianinazzi-Pearson, V. & van Tuinen, D. 2001. Identification of arbuscular mycorrhizal fungi in soils and roots of plants colonizing zinc wastes in southern Poland. *Mycorrhiza* 10: 169–174.
- UNEP. 1992. *World Atlas of Desertification*, Edward Arnold, London, U.K.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* 18: 315–322.
- Zampieri, E., Mello, A., Bonfante, P. & Murat, C. 2009. PCR primers specific for the genus *Tuber* reveal the presence of several truffle species in a truffle-ground. *FEMS Microbiology Letters* 297(1): 67–72.