شناسایی قارچ‌های اکتومایکوریزا و بررسی تأثیرآن بر جذب فسفر در نهال‌های بلوط ایرانی (*Quercus brantii*)

بهناز یوسف شاهی [*۱]، مسعود بازگیر [۲]
۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه مهندسی آب و خاک، دانشگاه ایلام، ۲- استادیار گروه مهندسی آب و خاک، دانشگاه ایلام
Behnazyousefshahi@Gmail.com

چکیده

شناسایی قارچ‌های اکتومایکوریزا در اکوسیستم‌های مختلف از اهمیت خاصی برخوردار است. در این تحقیق شناسایی این قارچ‌ها به دو روش مولکولی و مورفولوژیکی انجام گردید که روش مولکولی تا حد زیادی دقیق تر می‌باشد. بدین منظور بازیدیوکارپ قارچ‌ها را از جنگل بلوط جمع‌آوری کرده و با روش مولکولی شناسایی نمودیم. بعد از شناسایی، اقدام به تولید مایه تلقیح و کشت قارچ در آزمایشگاه دانشگاه ایلام گردید سپس ریشه‌های نهال‌های بلوط با این قارچ‌ها مایه‌زنی شدند. بر اساس نتایج سه نوع قارچ اکتومایکوریزای *Amanita crocea, Boletus comptus, Inocybe rimosa* شناسایی شدند. همچنین اثر مایه-زنی قارچ‌های اکتومایکوریزا بر جذب فسفر در سطح یک درصد (α= 0.01) توسط نهال‌های بلوط معنی‌دار گردیدند. به‌طور کلی استفاده از قارچ‌های اکتومایکوریزا جهت زنده‌مانی نهال‌های درختان بلوط قویا توصیه می‌گردد.

واژه های کلیدی: قارچ اکتومایکوریزا، شناسایی مولکولی، بلوط ایرانی، مایه زنی

مقدمه

اکتومایکوریزا یک رابطه همزیستی mutualistic بین ریشه‌های گیاهان عالی با قارچ‌های خاصی در خاک است که هر دو طرف در آن سود میبرند (Itoo et al., 2013). قارچ‌های اکتومایکوریزا[۱] در سراسر جهان شامل ۳۴۳ جنس و ۱۱۹۵۰ گونه بوده که ۲۵۲ جنس متعلق به رده بازیدیومایکوتا، ۸۴ جنس متعلق به آسکومایکوتا و ۵ جنس متعلق به زیگومایکوتا می‌باشد (Rinaldi et al., 2008). مطالعات نشان داده‌اند که مایکوریزا می‌تواند تحمل گیاهان را به تنش‌های محیطی افزایش دهد و به بقا و رشد یک گیاه کمک کند (Sylvia and Williams, 1992). اکتومایکوریزاها تقریبا همیشه دارای یک شبکه هارتیگ متشکل از هیف‌های بسیار هستند که به طور کامل سلول‌های بیرونی پوست ریشه را احاطه کرده است. در خارج از ریشه این هیف‌های قارچی به شکل یک غلاف تجمع پیدا می‌کنند که (mantle) نامیده می‌شود که از هیف‌های بین سلول‌های پوستی منشا می‌گیرد. شبکه هارتیگ محل عظیمی برای انجام مبادلات دو طرفه مواد غذایی بین میزبان و قارچ می‌باشد در حالی که میزبان مقدار قابل توجهی از مواد فتوسنتز خود را در اختیار قارچ قرار می‌دهد (Smith and Read, 1997). شریک‌های قارچی تقریبا تمام متابولیسم آن‌ها را انجام می‌دهند و باعث رشد و شکل‌گیری fruit body قارچ‌ها می‌شوند و قارچ‌ها مواد غذای ضروری مانند P, N و K را در اختیار میزبان خود قرار می‌دهند (Read and Perez-Moreno, 2003). قارچ‌های ECM از طریق افزایش جذب و حرکت عناصر غذایی برای درختان میزبان همزیست خود مفید هستند. این قارچ‌ها با انحلال ذرات معدنی خاک مانند آپاتیت، فلدسپار، میکا و هورنبلند، عناصر غذایی و یون‌های معدنی مانند (K^+ , Fe^{3+} , Ca^{2+} ,Mg^{2+}, PO_4^{3-}) را از خاک به دست می‌آورند (Landeweert et al., 2001). بیشترین مقدار فسفر کل در خاک‌های جنگلی در مولکول‌های پیچیده مانند اینوزیتول فسفات، نوکلئوتیدها و فسفولیپیدها وجود دارد (Criquet etal., 2004). یون‌های اورتوفسفات تنها شکل از فسفر هستند که به وسیله میکروارگانیزم‌ها و گیاهان جذب می‌شود. که به عنوان نتیجه فعالیت‌های فسفات در محلول خاک آزاد می‌شود (Rao et al., 1996). این مطالعات فرضیه نقش فعال و اهمیت زیست محیطی هیف‌های قارچ‌های اکتومایکوریزا در جذب فسفر تحت شرایط کمبود فسفر را حمایت می‌کنند. بلوط (*Quercus*) نام یک جنس غالب از گیاهان در مناطق شمالی و مرکزی ایران است و از بسیاری از گونه‌ها تشکیل شده است. بلوطی که در مناطق جنگلی مرکزی ایران می‌روید یکی از مهم

[۱] ECM

ترین جنس‌های این گیاه با ۴۵ گونه است. گونه غالب آن *Quercus brantii* می‌باشد (Mosaddegh et al., 2012). با توجه به اهمیت همزیستی قارچ‌های اکتومایکوریزا با درخت بلوط و اینکه تاکنون در زمینه شناسایی و کشت این قارچ‌ها در ایران مطالعات بسیار اندکی انجام شده است. هدف از انجام این تحقیق کشت قارچ‌های اکتومایکوریزا در شرایط آزمایشگاهی برای اولین بار در کشور و فرآیند مایه‌زنی این قارچ‌ها به نهال‌های بلوط در شرایط کشت در خاک استریل انجام گردید و در مرحله آخر جذب فسفر از اندام برگ اندازه گیری شد.

مواد و روش‌ها

منطقه مورد مطالعه

این مطالعه در جنگل بیوره به مختصات جغرافیایی ۳۳ درجه و ۱۹ دقیقه و ۲۸ ثانیه عرضی و طول ۴۶ درجه و ۴۱ دقیقه و ۲۳ ثانیه و ۱۶۷۹ متر ارتفاع از سطح دریا، واقع در استان ایلام در اردیبهشت ۹۵ انجام شد. مساحت کل جنگل‌های بیوره ۴۴۱۷ هکتار است. پوشش غالب آن درختان بلوط است. متوسط بارش سالانه ۵۲۱/۵ میلی‌متر است و میانگین سالانه دما ۱۹/۴ درجه سانتی‌گراد است. اقلیم منطقه نیمه مرطوب می‌باشد. بازیدیوکارپ[۲] قارچ‌ها با فاصله ۳-۲ متر از تنه درختان جمع آوری شدند.

استخراج DNA از بازیدیوکارپ‌ها

استخراج DNA از حدود ۵ میلی‌گرم از بازیدیوکارپ بر اساس دستورالعمل (Doyle and Doyle, 1990) با کمی تغییرات انجام شد. نمونه‌ها در ازت مایع با استفاده از یک هاون چینی خورد شدند. سپس به هر کدام از آن‌ها ۷۰۰ میلی لیتر بافر استخراج (Tris-HCl، EDTA، NaCl و CTAB ۲٪ و مرکاپتواتانول[۳] ۲٪) اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در درجه حرارت ۶۵ درجه سانتی گراد قرار گرفت. سپس ۷۰۰ میکرولیتر کلروفورم/ایزوآمیل الکل به نسبت حجمی ۱/۲۴اضافه شد. ۲۰دقیقه در سانتریفیوژ دو فاز از هم جدا می‌شوند مایع رویی را جدا کرده سپس ۲ میکرولیتر RNase به هر ویال اضافه کرده و دوباره برای ۳۰ دقیقه در درجه حرارت ۳۷ درجه قرار گرفت. به هر کدام از ویال‌ها ۷۰میکرولیتر سدیم استات ۲/۵ مولار یا (پتاسیم استات) اضافه گردید. سپس ۴۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول اضافه و در دمای ۲۰- به مدت ۳۰دقیقه تا ۲۴ ساعت نگهداری می‌شود. بعد از این مرحله در طی سانتریفیوژ در ۱۰ دقیقه DNA به صورت پلیت در ته ویال قرار می‌گیرد فاز رویی را ریخته با اتانول ۷۰٪ شستشو داده و سانتریفیوژ به مدت ۱ دقیقه دوباره پلیت تشکیل می‌شود اتانول را ریخته و ویال در دمای اتاق به مدت چند ساعت خشک می‌شود. ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل اضافه کرده و در دمای ۴ درجه به مدت ۲۴ ساعت قرار می‌دهیم و در پایان ویال‌ها را در ۲۰- نگه می‌داریم. کیفیت DNA استخراج شده با ژل آگاروز ۰/۸ درصد و الکتروفورز و رنگ آمیزی با اتیدیوم برماید مشخص شد. پرایمرهای مورد استفاده عبارتند از (ITS1/1TS4) (White et al., 1990) در یک ویال استریل ۴ میکرولیتر از محلول DNA، ۱ میکرولیتر پرایمر Forward، ۱ میکرولیتر پرایمر Reverse، ۱۲/۵ میکرولیتر Master Mix و ۶/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل ریخته سپس ویال‌ها را در دستگاه PCR با دمای آنالینگ ۵۴/۳ قرا می‌دهیم. کیفیت باندها با ژل آگاروز ۱درصد و الکتروفورز و رنگ آمیزی با اتیدیوم برماید مشخص شد و به وسیله دستگاه ژل داک و نور ماوراء بنفش عکسبرداری شد و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. پس از استخراج DNA و تکثیر از منطقه ITS تعیین توالی توسط شرکت Macrogen کره انجام شد.

کاشت و نگهداری نهال‌های بلوط (*Quercus brantii*) و مایه زنی ریشه‌ها

جهت انجام آزمایش گلدان‌ها با مخلوط سترون حاوی نسبت مساوی خاک جنگلی، خاک برگ و شن پر شد. نهال‌های یکساله بلوط در این گلدان‌ها کشت شدند. در صورت نیاز به آب، آبیاری هر واحد آزمایشی جداگانه انجام گردید. کشت قارچ‌ها در محیط کشت جامد MS (Murashige and skoog, 1962) انجام شد. اینوکلوم قارچ تهیه گردید. سپس مایه زنی قارچ اکتومایکوریزا به اطراف ریشه نهال‌های بلوط صورت گرفت. نهال‌ها به مدت ۷ ماه در شرایط محیطی آزاد نگهداری شدند. به

[۲] Basidiocarp
[۳] Mercaptoethanol

منظور اندازه‌گیری جذب فسفر برگ نهال‌ها را جدا کرده سپس در آون جهت رسیدن به وزن ثابت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد خشک و به صورت پودر در آورده شدند. جهت انجام عمل هضم از مخلوط اسیدها (۱۸ میلی لیتر آب مقطر، ۱۰۰ میلی لیتر اسید سولفوریک و ۶ گرم اسید سالیسیلیک) استفاده کردیم. اندازه‌گیری فسفر به روش کالریمتری (رنگ زرد مولیبدات وانادات) صورت گرفت. و به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر با طول موج ۴۷۰ نانومتر خوانده شد.

طرح آزمایشی

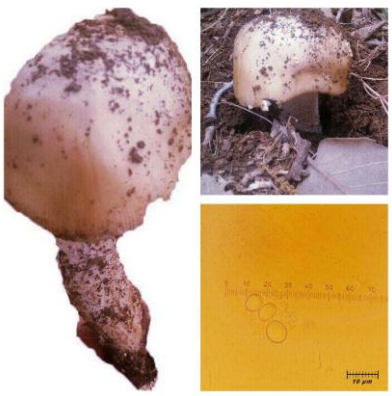
به‌منظور بررسی تأثیر مایه زنی قارچ اکتومایکوریزا بر جذب فسفر و رشد نهال‌های بلوط، آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تیمار آزمایشی شامل الف- سه نوع قارچ اکتومایکوریزا شامل *Amanita crocea, Boletus comptus, Inocybe rimosa* و ب- تیمار شاهد (بدون تلقیح قارچ) در سه تکرار انجام شد.

نتایج و بحث

جدول ۱- نتایج شناسایی مولکولی قارچ‌ها تا مرحله جنس و گونه

EMF taxon name	Accession	BLAST best match to vouchered specimen	Maximum ident. (%)	Base pairs used	Query coverage (%)	E value
1:Amanitaceae	MF278764	*Amanita crocea*	80%	600	99%	1E-105
2:Amanitaceae	MF278765	*Amanita crocea*	91%	600	93%	0.0
23: Amanitaceae	MF278766	*Amanita crocea*	80%	600	88%	1E-81
24: Inocybaceae	MF278770	*Inocybe rimosa*	99%	625	99%	0.0
25: Amanitaceae	MF278767	*Amanita crocea*	99%	600	99%	0.0
26: Amanitaceae	MF278768	*Amanita crocea*	99%	600	97%	0.0
30:Boletaceae	MF278769	*Boletus comptus*	97%	600	79%	0.0

نتایج بدست آمده از نرم افزار Blast n توالی‌های که بیشترین درصد شباهت با توالی مورد نظر ما و هم چنین کم ترین مقدار E value را داشته باشند را نمایش می دهد. E value صفر ایده آل ترین حالت ممکن است و در غیر این صورت هر چه به صفر نزدیک تر باشد اطمینان ما به نتایج به دست آمده بیشتر می‌شود. بنابراین توالی‌های که بر اساس این دو شاخص مشخص می شوند توالی هایی هستند که اطمینان ما در شباهت آن‌ها به توالی الگوی مورد نظرمان بیشتر است. با استفاده از نرم افزار Blast و مقایسه توالی‌های بدست آمده با تمام توالی‌های بانک ژنی، قارچ‌های اکتومایکوریزا تا مرحله جنس و گونه شناسایی شدند. هم چنین توالی‌های بدست آمده در بانک ژن ثبت شدند که در جدول ۱ با شماره دسترسی (Accession) مشخص شده است. قارچ‌های شناسایی شده عبارتند از: *Amanita crocea, Boletus comptus ,Inocybe rimosa* که از شاخه بازیدیومایکوتا می‌باشند. شکل های ۳-۱ مشخصات مورفولوژیکی این قارچ‌ها را نشان می‌دهد.



شکل۱- *Amanita crocea*

شکل۲- *Boletus comptus*

شکل۳- *Inocybe rimosa*

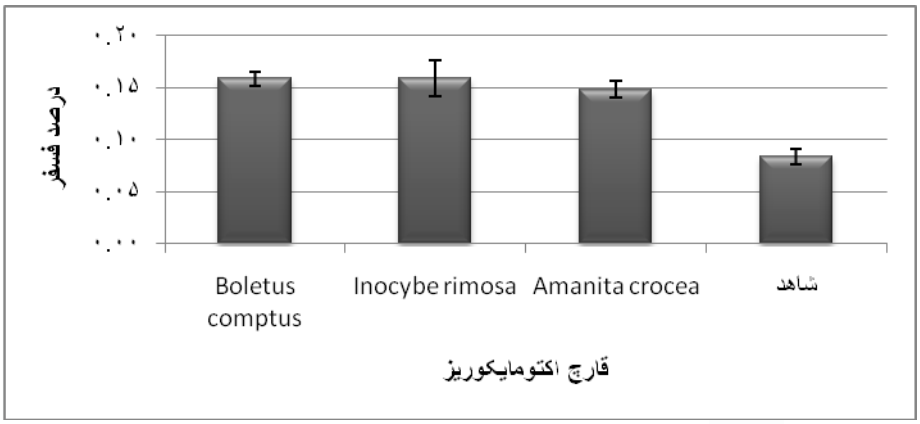
هر واحد مقیاس برابر µm ۱ است.

گونه *Amanita* (شکل ۱) با تنوع گسترده ای از میزبان‌های گیاهی به ویژه (بلوط، راش و سوزنی برگان) همزیستی اکتومایکوریزای دارد (Pande et al., 2004). به طور گسترده در شمال امریکا و اروپا وجود دارد. قارچ اکتومایکوریزای *Amanita crocea* شناسایی شده دارای کلاهک به رنگ کرم پرنگ و اندازه ساقه۱۲۰-۹۰×۲۵-۱۵ میلی‌متر به رنگ کرم است. اندازه اسپور µm ۹/۵-۷-۱۲×۸ رنگ اسپور سفید و گرد می‌باشد. (Bahram et al., 2006) نیز این قارچ را از ایران شناسایی و گزارش کردن و به نتایج مشابهی دست یافتند. زیستگاه قارچ *Boletus comptus* (شکل ۲) معمولا جنگل‌های گرم پهن برگ و به صورت همزیستی اکتومایکوریزایی با درختان بلوط (*Quercus*) دیده می‌شود (Estadès et al., 2004). در اروپا در منطقه مدیترانه (ایتالیا، مونته نگرو و اسپانیا) گزارش شده است. با اندازه کلاهک ۱۰cm-۸ و ته رنگ صورتی تا قهوه ای کمرنگ، اندازه ساقه ۹cm-۷ ×۴-۳و به رنگ زرد، در انتهای ساقه حباب شکل و ریشه ها در انتهای ساقه مشاهده شد. رنگ اسپور قهوه ای و اندازه آن µm ۱۴-۱۰×۷-۶ است. این قارچ خوراکی نمی‌باشد (Simonini, 1992 , 1998). خانواده *Inocybaceae* (شکل ۳) معمولا در سراسر جهان همزیستی اکتومایکوریزایی با تعداد زیادی از خانواده نهاندانگان و بازدانگان تشکیل می دهند (Kirk et al. 2008). بسیاری از گونه‌های *Inocybe* و جنس *rimosa* معمولا در خاک‌های غنی، و اغلب بر روی زمین‌های آهکی یافت می‌شوند. این قارچها معمولا با طیف گسترده‌ای از درختان میزبان به ویژه سوزنی برگان و توسکا، بلوط و غیره همزیستی اکتومایکوریزای تشکیل می‌دهند (Jacobsson 2008). معمولا به طور گسترده در شمال آمریکا و کالیفرنیا یافت می‌شوند. کلاهک‌ها معمولا کوچک به صورت مخروطی تا زنگی شکل و اندازه cm ۸-۲ به رنگ زرد تا قهوه ای کم رنگ مشاهده شد. اندازه ساقه mm ۶۰-۴۰×۹-۷ به رنگ سفید تا زرد و رنگ اسپور قهوه ای به صورت بیضی و صاف µm ۱۲-۹×۷-۴/۵ مشاهده شد. گونه‌های Inocybe معمولا برای خوردن مناسب نیستند (Atkinson, 1918, Cripps, 1997).

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس جذب فسفر توسط برگ‌های نهال‌های مایه زنی شده با قارچ اکتومایکوریزا

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
		فسفر
تیمار	۵	**۰/۰۰۴۴
خطای آزمایشی	۱۲	۰/۰۰۰۲۶
ضریب تغییرات	۱۰/۸۳	

ns، * و ** به ترتیب غیر معنی‌دار، معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد و ۱ درصد می‌باشد.



شکل۴- اثر مایه زنی نهال های بلوط با قارچ اکتومایکوریزا بر جذب فسفر

نتایج جدول تجزیه واریانس نشان می دهد که اثر مایه زنی با قارچ های اکتومایکوریزا بر جذب فسفر در سطح احتمال ۰/۰۱ معنی دار شده است. که نشان دهنده این موضوع است که مایه زنی نهال‌های بلوط بوسیله قارچ‌های اکتومایکوریزا توانسته اثر معنی‌داری بر جذب فسفر توسط گیاه بلوط داشته باشد. و همچنین مقایسه میانگین بین تیمارها به روش LSD نشان می‌دهد که تیمارهای که با قارچ های اکتومایکوریزای *Boletus comptus, Inocybe rimosa, Amanita crocea* مایه زنی شده‌اند از لحاظ آماری در یک گروه قرار می‌گیرند و با هم اختلاف معنی‌داری ندارند. اما با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری دارند. نتایج حاصل از تجزیه برگ نهال‌های بلوط، درصد فسفر را در تمام تیمارهای آزمایشی مطابق شکل ۴ نشان داد. بیشترین درصد فسفر مربوط به تیمار مایه زنی شده با قارچ *Boletus comptus* می‌باشد. و کم ترین درصد فسفر مربوط به تیمار مایه زنی شده با قارچ *Amanita crocea* می‌باشد. در مقایسه با تیمار شاهد قارچ اکتومایکوریزای *Boletus comptus* درصد جذب فسفر را در حدود ۲ برابر افزایش داده و قارچ اکتومایکوریزای *Amanita crocea* درصد جذب فسفر را به میزان ۱/۷ برابر افزایش داده است. بوگر و همکاران در سال ۱۹۹۰ جذب فسفر را در نهال‌های *Eucalyptus diversicolor* مورد مطالعه قرار دادند. در رابطه با عرضه فسفر نهال‌ها با قارچ‌های اکتومایکوریزا تلقیح شدند. نویسندگان گزارش دادند که همه چهار نوع قارچ اکتومایکوریزا مورد مطالعه سطح فسفر بافت‌های گیاهی را افزایش دادند. که نتایج بدست آمده در این پژوهش را تایید می‌کند. قارچ‌های اکتومایکوریزا با افزایش کارایی جذب مواد مغذی ضروری به ویژه عناصر با تحرک کم در خاک، مانند فسفر و عناصر کم مصرف نقش بسیار مهمی در طبیعت دارند.

منابع

Atkinson G. F. 1918. "Some new species of Inocybe". American Journal of Botany.

Bahram M., Asef M. R., Zarre Sh. M., Abbasi S., Reidl .2006. "Addition to the knowledge of Amanita (Agaricales, Pluteaceae) from Iran". Rostaniha. 7 (2): 107–119.

Bougher N. L., Grove T. S. and Malajczuk N. 1990. Growth and phosphorus acquisition of karri (Eucalyptus diversicolor F. Muell.) seedlings inoculated with ectomycorrhizal fungi in relation to phosphorus supply. New Phytologist 114: 77–85.

Buée M., Vairelles D. and 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: 235– 245.

Burns G. B. and Dick R. P. 2002. Enzymes in the environment; Activity, ecology and applications. NY, Marcel Dekker, New York.

Cripps C. L. 1997."The genus Inocybe in Montana aspen stands". Mycologia. 89 (4): 670–688.

Criquet S., Ferre E., Farnet A. M. and Petit J. Le. 2004. Annual dynamics of phosphatase activities in an evergreen oak litter influence of biotic and abiotic factors. Soil Biology & Biochemistry 36: 1111–1118.

Doyle J. J. and Doyle J. L.1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus. Vol.12: 13-15.

Estadès A. and Lannoy G. 2004. Les bolets européens. – Bulletin Mycologique et Botanique Dauphiné-Savoie 44(3): 3–79.

Itoo ZA., Reshi ZA .2013. The multifunctional role of ectomycorrhizal associations in forest ecosystem processes. Bot Rev. doi:10.1007/s12229-013-9126-7.

Jacobsson S. 2008. Key to Inocybe. In: Knudsen H, Vesterholt J (eds), Funga Nordica. Agaricoid, boletoid and cyphelloid genera: 868 –906. Nordsvamp, Copenhagen.

Kirk P., Cannon P.F.,Minter D.W., Stalpers J.A .2008. Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi, 10th edn. CAB International, Wallingford.

Landeweert R., Hoffland E., Finlay R. D., Kuyper T. and van Breemen N. 2001. L ink ing plants to rocks. Ectomycorrhizal fungi mobilize nutrients from minerals. Trends in Ecology and Evolution 16: 248–254.

Leake J. R., Miles W. 1996. Phosphodiesters as mycorrhizal P sources I. Phosphodiesterase production and the utilisation of DNA as a phosphorous source by the ericoid mycorrhizal fungus Hymenoscyphus ericae. New Phytologist 132: 435–443..

Mosaddegh M., Naghibi F., Moazzeni H., Pirani A. and Esmaeili S. 2012.Ethnobotanical survey of herbal remedies traditionally used in Kohghiluyeh va Boyer Ahmad province of Iran. J. Ethnopharmacol. 141: 80-95.

Murashige T., Skoog F. 1962."A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures". Physiologia Plantarum. 15 (3): 473–497.

Pande V., Palni U.T., Singh S.P. 2004. Species diversity of ectomycorrhizal fungi associated with temperate forest of Western Himalaya: a preliminary assessment. Curr Sci 86:1619–1623.

Paul E. A. and Clark F. E. 1989. Soil microbiology and biochemistry. Academic Press, London.

Rao M. A., Gianfreda L., Palmiero F. and Violante A. 1996. Interaction of acid phosphatase with clays, organic molecules and organic mineral complexes. Soil Science 161: 751 –760.

Read D. J. and Perez-Moreno J. 2003. Mycorrhizas and nutrient cycling in ecosystems-a journey towards relevance, New Phytologist 157: 475–492.

Rinaldi A.C., Comandini O., Kuper T.W. 2008. Ectomycorrhizal fungal diversity separating wheat from the chaff, Fungal Divers 33:1–45.

Simonini G. 1992. Boletus comptus sp. nov. – Rivista di Micologia 35(3): 195–208.

Simonini G. 1998. Qualche specie rara o poco conosciuta della famiglia Boletaceae. – In: Fungi non delineati. Vol. 6. Pp. 1–56. Libreria Mykoflora, Alassio.

Smith S. E. and Read D. J. 1997. Mycorrhizal Symbiosis. Academic Press, San Diego, CA.

Sylvia D.M., Williams S.E. 1992. Vesicular–arbuscular mycorrhizae and environmental stress. In: Linderman RG, Bethlenfalvay GJ (eds) Mycorrhizae in sustainable agriculture. American Society of Agronomy, Madison, Wisc, Special Publication no. 54. pp 101–124.

White T. J., L Bruns T., Lee S. and Taylor j. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfaud DH, Sninsky JJ, White TJ, eds. PCR protocols. A guide to methods and applications. San Diego: Academic Press, 315-322.

Identification of ectomycorrhizal fungi and its effect on phosphorous uptake by Iranian oak seedling (*Quercus brantii*)

B. Yousefshahi [1*], M. Bazgir [2]

1. MSc. Student of soil biology, Dept. of Water and Soil Engineering, Ilam university. Behnazyousefshahi@Gmail.com*
2. Assist. Prof., Dept. of Water and Soil Engineering, Ilam University. m.bazgir@ilam.ac.ir .

Abstract

Identification of ectomycorrhizal fungi in different ecosystems has special important. In this research we used two methods to identity of ectomycorrhizal fungi including morphological and molecular method that the latter is more precise. We collected basidiocarp fungi and identified by molecular methods from oak forest. After identification, inoculum production and fungi culture carried out and oak roots seedling inoculated in the Ilam university laboratory. According to results, we recognized three kinds of ectomycorrhizal fungi including *Amanita crocea*, *Boletus comptus*, *Inocybe rimosa*. Inoculum of these fungi affected significantly ($\alpha = 0.01$) on phosphorous uptake by oak tree seedlings. Generally application of ectomycorrhizal fungi to survive oak tree seedlings in Ilam forest strongly recommended.

Keywords: ectomycorrhizal fungi, molecular identification, Iranian oak, inoculum