مجلهٔ جنگل ایران، انجمن جنگلبانی ایران
سال چهاردهم، شمارهٔ ۴، زمستان ۱۴۰۱
ص ۴۰۷-۴۲۴
مقاله پژوهشی

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22034/ijf.2022.333059.1860
شناسه دیجیتال (DOR): 20.1001.1.20086113.1401.14.4.4.6

تنوع و ساختار جمعیت قارچ‌های اکتومیکوریز در رویشگاه جنگلی ترافل سیاه تابستانه (*Tuber aestivum* Vittad.)

سیده معصومه زمانی[1*]، فرزانه کازرانی[2]، حجت‌اله ربانی‌نسب[3]، صدیقه غنائی[4] و ریحانه غلامی قوام‌آباد[5]

[1] استادیار، مؤسسهٔ تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران
[2] استادیار، مؤسسهٔ تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران
[3] استادیار، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی گلستان، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، گرگان، ایران
[4] مربی، دانشگاه پیام نور، شاهرود، ایران
[5] پژوهشگر، مؤسسهٔ تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۲/۲۴؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۲/۱۴)

چکیده

کشت ترافل سیاه تابستانه، *Tuber aestivum* را می‌توان از فعالیت‌های جدید کشاورزی دانست که به‌ویژه برای اقتصاد روستایی سودمندتر از کشاورزی متعارف است و در کنار آن احیای جنگل‌ها و همچنین پایداری کاربری اراضی را ترویج می‌دهد. براساس نمونه‌هایی از فرانسه، ایتالیا، مجارستان و اسپانیا، کشت ترافل توسعهٔ اقتصادی و اجتماعی جوامع کوچک و روستایی را القا می‌کند. ازآنجا که متأسفانه سنت ایجاد باغ‌های ترافل در ایران وجود ندارد، دانش ما دربارهٔ عوامل محیطی القاکنندهٔ تشکیل اندام‌های باردهٔ *T. aestivum* محدود است. از زمان تأسیس اولین مزارع قارچ ترافل در جهان، پژوهش‌های متعددی برای ارتقای بهره‌وری و پایداری آنها انجام گرفته است. موفقیت در تداوم کشت قارچ‌های ترافل به‌طور مشخص به وضعیت میکوریزایی درختان میزبان در طول سال‌ها، از نهال‌های تلقیح‌شده تا درختان تولیدکنندهٔ ترافل بستگی دارد. بنابراین پایش وضعیت قارچ‌های اکتومیکوریز در رویشگاه‌های طبیعی قارچ‌های ترافل و افزایش دانش در مورد جوامع اکتومیکوریزایی گونه‌های میزبان *T. aestivum* برای اطمینان از تولید موفق ترافل سیاه تابستانه در باغ‌های ترافل بسیار مهم است. در این تحقیق حضور اکتومیکوریز *T. aestivum* روی ریشهٔ بلوط بلندمازو (*Quercus castaneifolia*) و فراوانی آن در رویشگاه‌های طبیعی قارچ‌های ترافل در سه سایت منتخب واقع در استان گلستان بررسی شد و تنوع و ساختار دیگر قارچ‌های اکتومیکوریز همراه آن ارزیابی شد. در انتخاب سایت‌ها تفاوت در حدود ارتفاعی، جهت جغرافیایی غالب و گیاهان موجود در مناطق در نظر گرفته شد. نتایج تحقیق نشان داد که اگرچه ترکیب گونه‌ها بیش از ۵۰ درصد میان سایت‌ها مشابه بود، اما تعداد، تنوع و غنای گونه‌های قارچی در میان سایت‌های با پوشش گیاهی مختلف با سایت یکنواخت و دارای فقط یک میزبان (بلوط) متفاوت بود.

واژه‌های کلیدی: اکتومیکوریزا، بلوط، ترافل بورگاندی، تنوع زیستی.

مقدمه

همزیستی اکتومیکوریزایی رابطه‌ای متقابل بین میسلیوم قارچ و ریشه های گیاه میزبان را تشکیل می‌دهد (Smith & Read, 2008). به نظر می‌رسد همهٔ گونه‌های قارچی در جنس *Tuber*، (Ascomycota, Tuberaceae) همزیستی اکتومیکوریزا را با بازدانگان و نهاندانگان چوبی، بدون ارجحیت برای گروه تاکسونومیکی از میزبانی خاص ایجاد می‌کنند (Agerer, 1987–2008; Hall et al., 2007). گونه‌های *Tuber* spp. آسکوکارپ‌های خوراکی

* نویسندهٔ مسئول
شمارهٔ تماس: ۰۲۱۴۴۷۸۷۲۸۵
ایمیل: mzamani@rifr-ac.ir

زیرزمینی تولید می‌کنند که به‌دلیل طعم عالی و عطر متمایز خود بسیار مدنظر قرار گرفته‌اند و با نام ترافل[1] شناخته می‌شوند.

طی چند دههٔ اخیر تولید برخی از گونه‌های ترافل در رویشگاه‌های طبیعی به‌سرعت کاهش یافته است که دلیل اصلی آن، بهره‌برداری بیش از حد و اختلال در زیستگاه طبیعی آنها بوده است (Hall et al., 2003). همچنین پژوهش‌ها نشان داده که با تخریب جنگل‌های شمال ایران و کاهش تراکم درختان، عوامل کنترل‌کنندهٔ چرخهٔ عناصر غذایی و پویایی رویشگاه‌ها از جمله عناصر میکروبی خاک کاهش معنی‌داری دارند (Azizi Mehr et al., 2020). مهم‌ترین راهکار برای غلبه بر این کاهش ایجاد باغ‌های تخصصی ترافل است. چندین گونه ترافل از شناخته‌شده‌ترین قارچ‌های اکتومیکوریز برای کشت در باغ‌های تازه‌تأسیس هستند. برای پرورش ترافل، نهال‌ها باید با قارچ ترافل تلقیح شوند. به‌طور معمول از اسپورهای قارچ برای تلقیح استفاده شده (Benucci et al., 2011) یا به‌ندرت از میسلیوم از کشت خالص قارچ استفاده می‌شود (Sisti et al., 1998). نهال‌های تلقیح‌شده پس از استقرار کامل همزیستی اکتومیکوریزایی، به مزرعهٔ مناسبی منتقل می‌شود که با توجه به شرایط اکولوژیکی (خاک، آب‌وهوا و غیره) دقیق که براساس ترکیب قارچ- میزبان خاص بهینه شده است (Benucci et al., 2011).

این روش کشت اکنون برای *Tuber melanosporum* Vittad. که ترافل سیاه شناخته می‌شود، *Tuber borchii* Vittad. و *Tuber aestivum* Vittad. که مترادف *Tuber uncinatum* Chatin در نظر گرفته می‌شود (Wed´en et al., 2004) و ترافل تابستانی، ترافل پاییزی یا ترافل بورگاندی نیز شناخته می‌شود) امکان‌پذیر است (Benucci et al., 2011). با این‌حال هنوز امکان استفاده از این روش برای *Tuber magnatum* Pico (ترافل سفید) وجود ندارد. این اغلب به این دلیل است که به دست آوردن گیاهان آلوده به *T. magnatum* که به گونه‌های دیگر اکتومیکوریز آلوده نیستند، مانند *Tuber maculatum* Vittad.، *T. borchii*، *Sphaerosporella brunnea* (Alb. & Schwein.) Svrček & Kubička و *Pulvinula constellation* (Berk. & Broome) Boud. دشوار است (Bertini et al., 2005).

ترافل سیاه تابستانه (*T. aestivum*) قارچ اکتومیکوریزی است که اندام بارده آن به‌صورت آسکوکارپ‌های خوراکی در زیر خاک تشکیل می‌شود و ارزش تغذیه‌ای و اقتصادی زیادی دارد. در تحقیقات دربارهٔ این قارچ مستند شده است که *T. aestivum* همزیستی اکتومیکوریزی با درختان مختلف و درختچه‌های متعلق به جنس‌هایی مانند *Carpinus*، *Fagus*، *Tilia*، *Populus*، *Quercus* و *Corylus* تشکیل می‌دهد (Hilszczańska et al., 2016). پرورش این قارچ در فرانسه، ایتالیا و دیگر نقاط جهان آغاز شده و به‌سرعت در حال پیشرفت است و جایگزینی امیدوارکننده برای زراعت جنگلی برای روستاییان حاشیهٔ جنگل است. در دههٔ گذشته، داده‌های جدیدی در مورد پراکنش *T. aestivum* و دیگر گونه‌های ترافل از برخی کشورهای اروپای مرکزی، شرقی و شمالی گزارش شده است (Zambonelli et al., 2016). دربارهٔ وجود ترافل‌ها، به‌ویژه گونهٔ *T. aestivum* که توسط سرآشپزهای هتل‌ها و رستوران‌های معروف جهان به‌دلیل رایحه و طعم آن ستایش می‌شود، در رویشگاه‌های طبیعی ایران نیز گزارش‌هایی وجود دارد (Arefipour & Zamani, 2019).

امروزه کشت *T. aestivum* به چند دلیل علاقهٔ فزایندهٔ کشاورزان را به خود جلب کرده است: ۱- نوعی ترافل مهم اقتصادی است، بازار پررونقی دارد و در سراسر جهان به فروش می‌رسد (Hall et al., 2007)؛ ۲- در سراسر اروپا، شمال آفریقا و نواحی از آسیا پراکنش دارد (Jeandroz et al., 2008)؛ ۳- نسبت به *T. melanosporum* به‌راحتی با دامنهٔ

1. Truffles

وسیع‌تری از شرایط آب‌وهوایی و ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک سازگار می‌شود (Hall et al., 2007)؛ ۴- کشت و زراعت نهال‌های *T. aestivum* تلقیح‌شده امکان‌پذیر است؛ ۵- برخلاف *T. melanosporum* و *T. magnatum*، گونهٔ *T. aestivum* مشتمل بر دو چرخهٔ متمایز رشد و باردهی است که هر دو چرخه هم در توده‌های جنگلی بسته (بالغ) و هم در زیستگاه‌های کاملاً باز رخ می‌دهد (Benucci et al., 2011).

همان‌گونه که متغیرهای محیطی بر خصوصیات پوشش گیاهی رویشگاه‌ها تأثیرگذارند (Pourbabaei et al., 2021)، مشخص شده است که این متغیرها در استقرار قارچ‌های اکتومیکوریز در زیستگاه و برقراری ارتباط آنها با میزبان گیاهی‌شان نیز اثر مهمی دارند (Parad et al., 2020). از این‌رو به‌منظور تولید موفق ترافل، بررسی و درک شرایطی که باردهی ترافل را بهینه می‌کند و مدیریت این شرایط در رویشگاه‌های طبیعی یا باغ‌های ترافل، گامی اساسی است (Benucci et al., 2011). بیشتر اطلاعات دربارهٔ بیولوژی ترافل، اکولوژی، توزیع و جامعهٔ اکتومیکوریزایی همراه ترافل، از مناطق مدیترانه‌ای دنیا سرچشمه می‌گیرد. از نظر جوامع اکتومیکوریزایی، حضور دیگر گونه‌های اکتومیکوریز در رویشگاه‌های ترافل شاخص زیستی مهمی برای نشان دادن مناسب بودن مکان‌های خاص و سازگاری میزبان گیاهی-قارچ است. از سوی دیگر، بقیهٔ قارچ‌های اکتومیکوریز همراه *Tuber aestivum* می‌توانند رقیبی برای ریشهٔ گیاه و مواد مغذی خاک باشند (Hall et al., 2007). افزون‌بر اینکه رقابت بین قارچ‌ها از مهم‌ترین عوامل مستقیم تعیین‌کنندهٔ تنوع اکتومیکوریزای محلی است (Bruns, 1995)، شناسایی گونه‌های دارای توانایی رقابت با ترافل‌های معرفی‌شده و مشخص کردن فعل و انفعالات آنها، برای شناخت شرایطی که باردهی ترافل را القا و تصمیم‌گیری را برای انتخاب زمین مناسب هدایت می‌کند، ضروری است (Baciarelli Falini et al., 2006; Pruett et al., 2008). بنابراین، پایش وضعیت قارچ‌های اکتومیکوریز در رویشگاه‌های طبیعی ترافل و افزایش دانش دربارهٔ تنوع کلی جوامع اکتومیکوریزایی و حضور رقبای بالقوهٔ *T. aestivum* برای اطمینان از تولید موفق ترافل سیاه تابستانه در باغ‌های ترافل بسیار مهم است.

تا کنون پژوهشی دربارهٔ جوامع اکتومیکوریز از سایت‌های طبیعی ترافل در ایران صورت نگرفته و دانش در زمینهٔ تنوع زیستگاه ترافل در ایران به‌طور کلی ضعیف است. از این‌رو این تحقیق با هدف بررسی جوامع اکتومیکوریزایی در رویشگاه‌های طبیعی *Tuber aestivum* و در ریشهٔ میزبان بلوط بلندمازو (*Quercus castaneifolia* C. A. Mey) در استان گلستان صورت گرفت. به این منظور حضور و فراوانی قارچ اکتومیکوریز *T. aestivum* در نمونه‌های خاک با حجم استاندارد که به‌طور مستقیم از رویشگاه‌های طبیعی ترافل جمع‌آوری شده بود، بررسی و حضور دیگر قارچ‌های اکتومیکوریز در همان نمونه‌های خاک ارزیابی شد.

مواد و روش

منطقهٔ پژوهش

این پژوهش در سال‌های ۱۳۹۸ و ۱۳۹۹ در طرح جنگلداری لوه (گالیکش) در بخش شرقی رشته‌کوه البرز در استان گلستان (′۳۵°۵۵ تا ′۴۳°۵۵ طول شرقی و ′ ۱۷°۳۷ تا ′۱۹°۳۷ عرض شمالی در ارتفاع ۴۰۰ تا ۱۸۰۰ متر از سطح دریا) انجام گرفت. مساحت کل جنگل ۱۲۰۰۰ هکتار و خاک آن از نوع قهوه‌ای جنگلی، عمیق و دارای رطوبت متعادل و اسیدیتهٔ بین ۶/۱ تا ۷/۸ است. آب‌وهوای منطقه، مرطوب معتدل با میانگین بارندگی سالانهٔ ۵۲۴ میلی‌متر و میانگین دمای سالانهٔ ۱۲/۲ درجهٔ سانتی‌گراد است (Natural Resources and Watershed Management Office at Golestan province, 2001).

شیوهٔ اجرای پژوهش

برای انتخاب نقاط نمونه‌برداری از شواهد مربوط به برداشت‌های قبلی قارچ ترافل *T. aestivum* استفاده

شد. برای بررسی قارچ‌های اکتومیکوریزِ همراه ترافل *T. aestivum*، در منطقهٔ پژوهش سه سایت (واحد اکولوژیک) انتخاب شد. در انتخاب سایت ها افزون‌بر شرط حضور قارچ ترافل، معیارهای تفاوت در حدود ارتفاعی، جهت جغرافیایی اصلی (غالب) و گیاهان موجود مدنظر قرار گرفت. موقعیت جغرافیایی و خصوصیات واحدهای اکولوژیک در منطقهٔ پژوهش در جدول ۱ آمده است.

خواص شیمیایی خاک در این مناطق در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول ۱- مشخصات واحدهای اکولوژیک در منطقهٔ پژوهش

Table 1. Characteristics of ecological units in the study area

واحد اکولوژیک ecological unit	گیاه میزبان host plant	گیاهان همراه companion plants	ارتفاع (متر) Height (Meter)	مختصات جغرافیایی Geographic coordinates	جهت غالب dominant direction	شیب غالب (٪) Dominant slope (%)
1	بلوط (Oak)	ممرز (Hornbeam)، آلوکک (Sweet cherry)، افرا (Maple)، توسکا (Alder)، ولیک (Vellik)، ازگیل (Medlar)، آلوچه (Cherry plum)، ون (Ash)	1135	N 37 19 29.5 E 55 40 39.8	جنوبی (Southern)	16
2	بلوط (Oak)	ممرز (Hornbeam)، آلوکک (Sweet cherry)، افرا (Maple)، نمدار (Lindens)، ولیک (Vellik)، ازگیل (Medlar)	1225	N 37 19 15.5 E 55 40 23	شمالی (Northern)	20
3	بلوط (Oak)	بلوط (Oak)	1376	N 37 18 42.7 E 55 40 29	شرقی (Eastern)	25

جدول ۲- خصوصیات شیمیایی خاک در سایت‌های تحت بررسی

Table 2. Chemical properties of soil in the studied sites

واحد اکولوژیک ecological unit / خصوصیات خاک properties of soil	منطقهٔ ۱ Site1	منطقهٔ ۲ Site2	منطقهٔ ۳ Site3
Soil pH	7.27	7.18	7.53
Calcium carbonate(%)	11.7	12.6	15.6
Phosphorus(mg/kg)	46.2	44.1	31.3
Calcium(mg/L)	17.58	14.7	15.42
Magnesium(mg/L)	3.94	3.82	1.19
Potassium(mg/L)	0.55	0.63	0.45
Organic Matter(%)	5.6	6.0	5.1
Nitrogen(%)	0.38	0.50	0.35
Carbon/nitrogen	11.4	12.4	15.2

نمونه‌برداری، تجزیه‌وتحلیل مورفولوژیکی و مولکولی ریشه‌های همزیست

با توجه به هدف تحقیق، برای تجزیه‌وتحلیل مورفوتیپ‌های اکتومیکوریزای موجود در نوک ریشه، پانزده درخت در هر قطعه به‌طور تصادفی از بین درختان مولد ترافل براساس شواهد مربوط به برداشت‌های قبلی انتخاب شد. در انتخاب درختان به ویژگی سلامت و شادابی و حفظ فواصل حداقل ۵۰ تا ۱۰۰ متر از یکدیگر توجه شد. از قسمت سایه‌انداز درختان انتخاب‌شده (فاصلهٔ حدود ۰/۵ متری از قاعده)، نمونه های خاک به‌همراه ریشهٔ از عمقی بین صفر تا ۳۰ سانتی‌متری ریزوسفر هر گیاه جمع‌آوری شد. نمونه های جمع‌آوری‌شده تا زمان بررسی‌های آزمایشگاهی در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شدند.

در آزمایشگاه برای بررسی همزیستی اکتومیکوریزایی در سطح نوک ریشه، هر نمونه به‌صورت جداگانه یک شب در آب لوله‌کشی خیس شده و روی الک ۱ میلی‌متری شسته شد تا قطعات ریشه و اکتومیکوریزا (ECM) از خاک جدا شود. ریشه‌هایی که در نمونه‌ها وجود داشت در ظروف پتری شیشه‌ای استریل حاوی آب مقطر شناور شدند (Avis et al., 2003). فقط ریشه‌های زندهٔ اکتومیکوریزایی (به‌صورت متورم، بدون ریشه‌های مویین یا پوشیده از غلاف قارچی شناخته می‌شوند) ریشه‌های کلونیزه‌شده با قارچ‌های اکتومیکوریز در نظر گرفته شدند. انواع مختلف اکتومیکوریزاهای یافت‌شده در هر نمونه با استفاده از استریومیکروسکوپ و میکروسکوپ نوری، با ویژگی های آناتومی- مورفولوژیکی توصیف‌شده توسط Agerer (۱۹۸۷-۲۰۱۲) و دو پایگاه دادهٔ آنلاین قارچ‌های اکتومیکوریز، EctoMycorrhizal Community DataBase (Lancellotti et al., 2011) و DEEMY (Agerer & Rambold, 2004–2013) از نظر مورفولوژیکی از یکدیگر تفکیک (مورفوتیپ) شدند.

مورفوتیپ‌ها براساس رنگ و شکل سیستم میکوریزا، ویژگی‌های سطح غلاف، نحوهٔ انشعاب، حضور و ساختار ریزومورف‌ها، هیف‌های ساطع‌شده و دیگر ویژگی‌ها دسته‌بندی و از هم تفکیک شدند. اکتومیکوریز تشکیل‌شده توسط قارچ *Tuber* در سطح ریشه، براساس رنگ قهوه‌ای اخرایی و بلوطی آن و با حضور نوک ریشه‌های متورمی که اغلب به‌صورت دوتایی تعبیه شده‌اند، شناسایی و تفکیک شد. تعداد میکوریزاهای زندهٔ هر مورفوتیپ به طور جداگانه برای هر نمونه ثبت شد. برای هر نمونه، ریشه ها به قطعات ۲ سانتی‌متری بریده شدند که ۱۰۰ عدد از آنها به‌طور تصادفی انتخاب و بررسی شد.

از هر نمونه مورفوتیپ، پنج تا ده نمونه از نوک ریشه‌های همان مورفوتیپ در لوله‌های میکروفیوژ ۱/۵ میلی‌لیتری با یک قطره آب دیونیزه قرار داده شده و در دمای ۷۰- درجهٔ سانتی‌گراد برای تجزیه‌وتحلیل مولکولی بعدی ذخیره شد.

استخراج DNA از نوک ریشه‌های اکتومیکوریزی توسط پروتکل بهینه‌سازی‌شدهٔ CTAB انجام گرفت (Gardes & Bruns, 1993). برای واکنش PCR و تکثیر ناحیهٔ Internal Transcribed Spacers(ITS)1، ITS2 و S 5.8 از DNA ریبوزومی قارچ‌های اکتومیکوریز، آغازگرهای مورد استفاده ITS1F و ITS4 یا ITS4B بودند (White et al., 1990; Gardes & Bruns, 1993).

تکثیر ناحیهٔ ITS مورفوتیپ مربوط به قارچ توبر با استفاده از آغازگرهای ITS5 و ITS7 انجام گرفت (Bertini et al., 1999). برای مشاهدهٔ قطعهٔ DNA ریبوزومی تکثیرشده، الکتروفورز با ژل آگارز ۲ درصد انجام گرفت. باندهای DNA دوتایی که گاهی روی ژل مشاهده می‌شدند، به‌عنوان آلودگی قارچ‌های غیراکتومیکوریزی یا تکثیر توأم اندوفیت‌های همراه ریشه یا دیگر گونه های قارچ های اکتومیکوریز در نظر گرفته شده و از چرخهٔ آزمایش خارج شدند. باندهای تک و مشخص روی ژل تعیین توالی شدند. توالی‌ها براساس آنالیز مقایسه ای آنها با توالی‌های نوکلئوتیدی ثبت‌شده در پایگاه دادهٔ Genbank شناسایی شد.

توالی‌های به‌دست‌آمده از باندهای منفرد و مشخص با استفاده از الگوریتم BLAST با توالی‌های نوکلئوتیدی ثبت‌شده در پایگاه اطلاعاتی Genbank و UNITE مقایسه شد تا امکان شناسایی بالقوه مورفوتیپ‌ها فراهم شود. مقادیر score bit، e-value و sequence similarity توالی‌های هم‌ردیف‌شده برای نتیجه‌گیری دربارهٔ بهترین تطابق‌ها در نظر گرفته شد. e-value صفر به‌همراه ارزش بالای score bit (حداقل ۸۰۰) مطلوب‌ترین حالت بود که به‌عنوان تطابق قوی در نظر گرفته شد و در صورتی که این شرایط همراه با تشابه توالی بیش از ۹۷ درصد بود، معرفی مورفوتیپ مربوط در سطح تاکسون گونه میسر می‌شد (Smith

et al., 2007). ارزش مورد انتظارهای[1] غیر از صفر، تطابق ضعیف در نظر گرفته شدند که نشان می‌داد توالی بازیابی‌شده از پایگاه داده (بسته به درصد تشابه توالی) تنها نسبت نزدیکی با مورفوتیپ مورد نظر دارد؛ در پژوهش های تشابه توالی بین ۹۷-۹۳ درصد، کمتر از ۹۳ درصد و کمتر از ۸۳ درصد به‌ترتیب برای نسبت دادن مورفوتیپ در سطح جنس، خانواده و راسته به‌کار گرفته شده است (Timling et al., 2012).

پژوهش‌های تنوع و غنای گونه‌ای

بررسی ساختار جامعه

فراوانی نسبی هر مورفوتیپ (تعداد نوک ریشهٔ هر مورفوتیپ / تعداد کل میکوریزا) به طور جداگانه برای هر نمونه محاسبه شد. با استفاده از روش طبقه‌بندی هیدمن (Weigmann, 1973) ساختار غالب ترکیب گونه‌ای ارزیابی شد. در این روش گونه‌های با فراوانی بیش از ۳۰ درصدِ جامعه فراغالب[2]؛ گونه‌های با فراوانی بین ۳۰-۱۰ درصد غالب[3]، گونه‌های با فراوانی بین ۱۰-۵ درصد نسبتاً غالب[4]، گونه های با فراوانی بین ۵-۱ درصد باشد کمیاب[5] و گونه‌های با فراوانی کمتر از ۱ درصد بسیار نادر[6] در نظر گرفته می‌شوند.

شاخص شباهت زیستگاه‌ها (Similarity index)

برای بررسی حد شباهت زیستگاه‌های مختلف از شاخص شباهت سورنسون استفاده شد که از قدیمی‌ترین و شناخته‌شده‌ترین شاخص‌های تعیین شباهت است (رابطهٔ ۱).

رابطهٔ ۱ $$S_s = \frac{2_a}{2_a + b + c}$$

Ss شاخص تشابه سورنسون، a تعداد گونه‌های مشترک موجود در مناطق A و B، b تعداد گونه‌های موجود در منطقهٔ A که در منطقهٔ B وجود ندارد و c تعداد گونه‌های موجود در منطقهٔ B که در منطقهٔ A وجود ندارد است. این شاخص وقتی مجموع گونه‌های دو زیستگاه کاملاً یکسان باشد برابر ۱ خواهد بود.

غنای گونه‌ای

عمومی‌ترین معیار برای ارزیابی غنای گونه ای جوامع، تعداد گونه‌هاست.

Richness = (S) تعداد کل گونه‌های موجود در قطعه نمونه است.

از روش Rarefaction برای مقایسهٔ غنای گونه‌ای در مناطق مختلف استفاده شد. برای برآورد غنا با استفاده از روش Rarefaction از رابطهٔ ۲ استفاده می‌شود.

رابطهٔ ۲ $$E(S_n) = \sum_{i=1}^{s}\left[1 - \frac{\binom{n-ni}{n}}{\binom{N}{n}}\right]$$

که در آن E (Sn) تعداد گونه‌های مورد انتظار در نمونه‌ای که به‌طور تصادفی و با n فرد انتخاب شده است، S مجموع تعداد گونه‌هایی که در کل نمونه‌ها جمع‌آوری شده‌اند، Ni تعداد افراد گونهٔ i ام، N تعداد کل افراد جمع‌آوری‌شده یا مجموع Ni، و n ارزش اندازهٔ نمونه‌هایی (تعداد افرادی) است که برای استاندارد شدن انتخاب شده‌اند ($n \leq N$).

شاخص Shannon-Wiener

تابع Shannon-Wiener متداول‌ترین شاخص اندازه‌گیری تنوع گونه‌ای است و از رابطهٔ ۳ محاسبه می‌شود. مقدار این شاخص برای داده‌های اکولوژیک به‌طور معمول بین ۱/۵ و ۳/۵ و به‌ندرت ۴/۵ قرار دارد. هرچه مقدار این شاخص بیشتر باشد نشان‌دهندهٔ تنوع بیشتر است.

رابطهٔ ۳ $$H = -\sum_{i-1}^{S} p_i \log_e p$$

H شاخص تنوع Shannon، Pi فراوانی نسبی هر یک از گونه‌ها یعنی نسبت افراد هر گونه به کل افراد آن جامعه و S تعداد گونه‌ها در جامعه است.

1. e-value
2. Eudominant
3. Dominant
4. Subdominant
5. Rare
6. Sub rare

شاخص Simpson

این شاخص احتمال این را که دو فرد کـه بـه‌طـور تصادفی انتخاب شده‌انـد بـه یـک گونـه تعلـق داشـته باشند بیان می‌کنـد (رابطـهٔ ۴). عکـس ایـن شـاخص احتمال این را که دو فرد که به‌طور تصـادفی انتخـاب شده‌اند، به دو گونهٔ مختلف تعلق داشـته باشـند بیـان می‌کند (رابطه ۵).

رابطهٔ ۴ $$D=\frac{1}{C}\rightarrow C=\sum_{i}^{S}p_i^2$$

رابطهٔ ۵ $$P_i^2=\left(\frac{N_i}{N_t}\right)^2\rightarrow p_i^2=\frac{N_i\left(N_i-1\right)}{N_t\left(N_t-1\right)}$$

S تعداد گونه‌های مشاهده‌شده، Ni تعداد افراد در گونهٔ i ام، Nt کل افراد در نمونه و D شاخص تنوع سیمپسون است.

شاخص سیمپسـون (D) دامنـه‌ای از صـفر (تنـوع کم) تا تقریباً ۱ و عکس شاخص سیمپسـون ($D=^1/_C$) دامنه‌ای از ۱ تا s (تعـداد گونـه‌هـا در پـلات‌هـا) دارد. شاخص سیمپسون منعکس‌کنندهٔ غالبیت اسـت، زیـرا در مقایسه با گونه‌های نادر نسبت به گونه‌هایی با وفور زیاد حساس‌تر است.

شاخص‌های یکنواختی گونه‌ها[1]

شاخص یکنواختی چگونگی توزیع فراوانی افـراد را بین گونه‌ها نشان می‌دهد. به‌عبارت دیگر جامعه‌ای که یکنواخت‌تر (توزیع یکسان افراد بین گونه‌هـا) باشـد از تنوع بیشتری برخوردار است. برای بررسی یکنـواختی گونه‌ها از شاخص‌های زیر استفاده شد:

شاخص Pielou J

در محاسـبهٔ ایـن شـاخص از شـاخص Shannon-Wiener اسـتفاده مـی‌شـود. بیشـترین مقـدار ایـن شاخص مساوی با log(S) اسـت. مقـدار ایـن شـاخص بین ۱-۰ است و هنگامی که این مقدار بـه ۱ نزدیـک شود به این معناست که یکنواختی گونه‌ها زیاد بوده و در نتیجه تنوع گونه‌ای منطقه بیشتر است (رابطهٔ ۶).

رابطهٔ ۶ $$J=H/\log(S)$$

H شـاخص تنـوع گونـه‌ای Shannon-wiener و S تعداد گونه‌هاست.

منحنی رتبه- فراوانی [2]

یکی از روش‌های نمایش اطلاعات تنوع یا داده‌های مربوط بـه فراوانـی گونـه‌ای اسـت. در ایـن نمودارهـا، فراوانی نسبی گونه‌ها در یک نمونـه براسـاس مقیـاس لگـاریتمی در مقابـل رتبـهٔ فراوانـی گونـه‌هـا یعنـی از بیشترین فراوانی به کمترین فراوانی رسم می‌شوند که نتیجهٔ آن ایجاد یک خط یـا منحنـی اسـت کـه از آن به‌منظور توصیف یکنواختی توزیع گونـه‌ای و چیرگـی (غالبیت) نسبی در یک جامعه اسـتفاده مـی‌شـود. در منحنی رتبهٔ فراوانی، طول خط منعکس‌کننـدهٔ غنـای گونه‌ای و شیب خط نشـان‌دهنـدهٔ یکنـواختی جامعـه است. به‌عبارت دیگر، شکل منحنی و شـیب آن، نحـوهٔ توزیع افراد را در جامعه نشان می‌دهد. در این نمـودار هر چه شیب کمتر باشد یعنی یکنواختی جامعه بیشتر و فراوانی گونه‌ها نزدیک به هم است.

محاسبهٔ همهٔ شـاخص‌هـا بـا اسـتفاده از نـرم‌افـزار SDR V4.1.2 [3] انجـام گرفـت (Seaby & Henderson, 2006).

نتایج

در همـهٔ نمونـه‌هـای ریشـهٔ بلـوط آزمـایش‌شـده، کلونیزاسیون میکـوریزا نزدیـک بـه ۱۰۰ درصـد بـود. نسبت‌های بسیار کمی از نوک‌ریشه‌های خراب‌شده در آنالیز آزمایشگاهی حذف شـد. بـراسـاس مشـاهدات و بررسی‌های مورفولوژیکی در مجموع ۱۶ مورفوتیـپ از ۲۳۲۶ فرد مختلف تشخیص داده شد که تحت آنـالیز ITS قرار گرفتند (جدول ۳).

1. Species Evenness

2. Rank abundance
3. Species Diversity & Richness

از این تعداد، دو مورد در سطح خانواده (*Pezizaceae* و *Thelephoraceae*) و هفت مورد در سطح جنس (*Peziza* sp.، *Inocybe* sp.، *Hebeloma* sp.، *Boletus* sp.، *Tricholoma* sp. و *Tomentella* sp.، *Russula* sp.) تشخیص داده شد و شناسایی شش مورد در سطح گونه (*Cenococcum geophilum* Fr.، *Inocybe oblectabilis* (Britzelm.) Sacc.، *Lactarius fulvissimus* Romagn.، *Russula bicolor* Burl.، غالب *Scleroderma verrucosum* (Bull.) Pers.، *Tomentella atramentaria* Rostr. و *Tuber aestivum*) میسر شد.

در این تحقیق، همزیستی اکتومیکوریزایی گونهٔ *T. aestivum* در سطح نوک ریشهٔ رختان بلوط در هر سه واحد اکولوژیک یافت شد. درصد فراوانی گونه‌ها در هر سه منطقه در جدول ۳ نشان داده شده است.

جدول ۳- نتایج شناسایی مولکولی قارچ‌های اکتومیکوریز همراه ترافل سیاه تابستانه در ریشه‌های درختان بلوط در مناطق بررسی‌شده توسط الگوریتم BLAST و فراوانی نسبی گونه‌ها

Table 3. The results of molecular identification of ectomycorrhizal fungi along with summer truffle (*Tuber aestivum*) on the roots of oak trees in the studied sites by BLAST analysis and the relative abundance of species

شمارهٔ مورفوتیپ Morphotype number	شناسایی براساس بلاست BLAST identifier	کد دسترسی Accession number	حداکثر تشابه (٪) Maximum identity(%)	شناسایی نهایی Final identification	فراوانی (درصد) Frequency (%)		
					Site1	Site2	Site3
1	*Hortiboletus rubellus*	KX907539.1	96.56	*Boletus* sp.	-	5.9	-
2	*Cenococcum geophilum*	MT431587	100	*Cenococcum geophilum*	15.1	14.73	9.31
3	Uncultured *Hebeloma* clone	HQ204660	98.04	*Hebeloma* sp.	-	-	8.97
4	*Inocybe* cf. *rimosa*	FJ904153	93.18	*Inocybe* sp.	4.80	9.92	-
5	*Inocybe oblectabilis*	MH310744	97.17	*Inocybe oblectabilis*	5.92	-	-
6	*Lactarius fulvissimus*	MZ410713	99.70	*Lactarius fulvissimus*	6.25	-	-
7	Uncultured *Pezizaceae*	KU238900	100	*Pezizaceae*	3.08	-	-
8	*Peziza* sp.	MH794942	99.52	*Peziza* sp	3.95	2.79	-
9	*Russula bicolor*	KY681462	98.10	*Russula bicolor*	-	-	11.6
10	Uncultured *Russula* clone	KJ769295	99.17	*Russula* sp.	2.46	-	-
11	*Scleroderma verrucosum*	EU784416	100	*Scleroderma verrucosum*	5.30	4.19	12.10
12	Uncultured *Thelephoraceae* clone	KP403049	99.70	*Thelephoraceae*	-	4.49	-
13	*Tomentella* sp.	DQ974782	100	*Tomentella* sp	10.73	11	2.53
14	*Tomentella atramentaria*	KC152246	99.85	*Tomentella atramentaria*	-	8.22	-
15	Uncultured ectomycorrhiza (*Tricholoma*) clone	EU563478	100	*Tricholoma* sp.	4.56	3.41	1.01
16	*Tuber aestivum*	EU326689	99.2	*Tuber aestivum*	37.85	35.35	54.48

براساس طبقه بندی هیدمن در هر سه منطقه، بیشترین فراوانی مربوط به گونهٔ فراغالب *T. aestivum* و پس از آن گونهٔ غالب *Cenococcum geophilum* در منطقهٔ ۱ (۱۵/۱۰ درصد) و ۲ (۱۴/۷۳ درصد) و گونهٔ غالب *Scleroderma verrucosum* (۱۲/۱۰ درصد) در منطقهٔ ۳ است. براساس نتایج به‌دست‌آمده گونه‌های *Russula* sp. (۲/۴۶ درصد) و *Pezizaceae* (۳/۰۸ درصد) به‌عنوان گونه‌های کمیاب و با جمعیت کم فقط از منطقهٔ ۱ جمع‌آوری شدند. گونهٔ *Tomentella* sp. در مناطق ۱ و ۲ به‌ترتیب با فراوانی ۱۰/۷۳ و ۱۱ درصد گونهٔ غالب و برعکس در منطقهٔ ۳ با فراوانی ۲/۵۳ گونهٔ کمیاب است.

به‌طور کلی از مناطق ۱، ۲ و ۳ به‌ترتیب یازده، ده و هفت گونه جمع‌آوری و شناسایی شد (جدول ۴). براساس شاخص شباهت، مطابق نتایج به‌دست‌آمده حداقل شباهت بین مناطق ۱ و ۳ (۵۵ درصد) و نیز مناطق ۲ و ۳ (۵۷ درصد) و حداکثر شباهت بین مناطق ۱ و ۲ (۶۷ درصد) مشاهده شد که نشان می‌دهد تعداد گونه‌های مشترک بیشتری بین مناطق ۱ و ۲ وجود دارد. براساس نتایج (جدول ۴) دربارهٔ شاخص‌های تنوع گونه‌ای Shannon-Wiener و Simpson و همچنین شاخص یکنواختی Pielo J، بین مناطق ۱ و ۲ در سطح ۵ درصد تفاوت معنی‌داری وجود نداشت ($P>0.05$)، ولی بین مناطق ۱ و ۲ با منطقهٔ ۳ در سطح ۵ درصد تفاوت معنی‌دار وجود داشت ($P<0.05$). به‌عبارت دیگر منطقهٔ ۳ از تنوع گونه ای کمتری نسبت به مناطق ۱ و ۲ برخوردار است.

در نمودار Rarefaction (شکل ۱)، مشاهده می‌شود اگر ۵۰ فرد در نمونه‌برداری جمع‌آوری شوند پیش‌بینی می‌شود که در منطقهٔ ۱ متعلق به ۱۰ گونه، در منطقهٔ ۲ به ۹ گونه و در منطقهٔ ۳ به ۶ گونه خواهند بود. بنابراین منطقهٔ ۳ دارای غنای گونه‌ای کمتری از مناطق ۱ و ۲ است.

در منحنی رتبه– فراوانی در مناطق ۱ و ۲ (شکل ۲)، نقطهٔ شروع نمودار در محور فراوانی (Y)، پایین‌تر از منطقهٔ ۳ بوده و با درصد شیب کمتری به‌سمت محور رتبه (X) میل کرده است. بنابراین مناطق ۱ و ۲ یکنواختی بیشتری داشته و به‌عبارت دیگر تنوع بیشتری دارند.

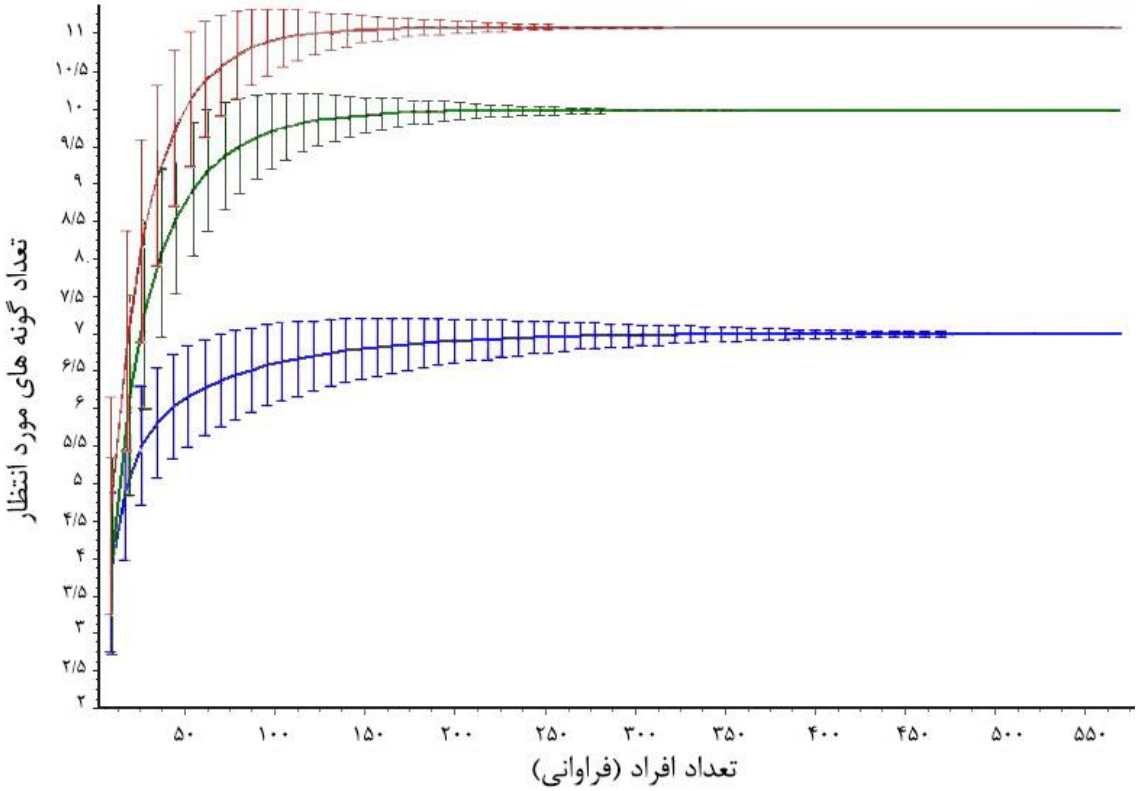
جدول ۴- شاخص‌های تنوع زیستی گونه‌های قارچ‌های اکتومیکوریز همراه ترافل سیاه تابستانه در ریشه‌های درختان بلوط در مناطق تحت بررسی

Table 4. Biodiversity indices of ectomycorrhizal fungi along with summer truffle (*Tuber aestivum*) on the roots of oak trees in the studied sites

شاخص‌های تنوع زیستی [1] Biodiversity Index [1]	منطقهٔ ۱ Site 1	منطقهٔ ۲ Site 2	منطقهٔ ۳ Site 3
Species number	11	10	7
Shannon-Weiner diversity index	2.01 [a]	1.98 [a]	1.41 [b]
Simpson's diversity Index	5.14 [a]	5.45 [a]	1.92 [b]
Pielou's evenness index	0.72 [a]	0.71 [a]	0.50 [b]

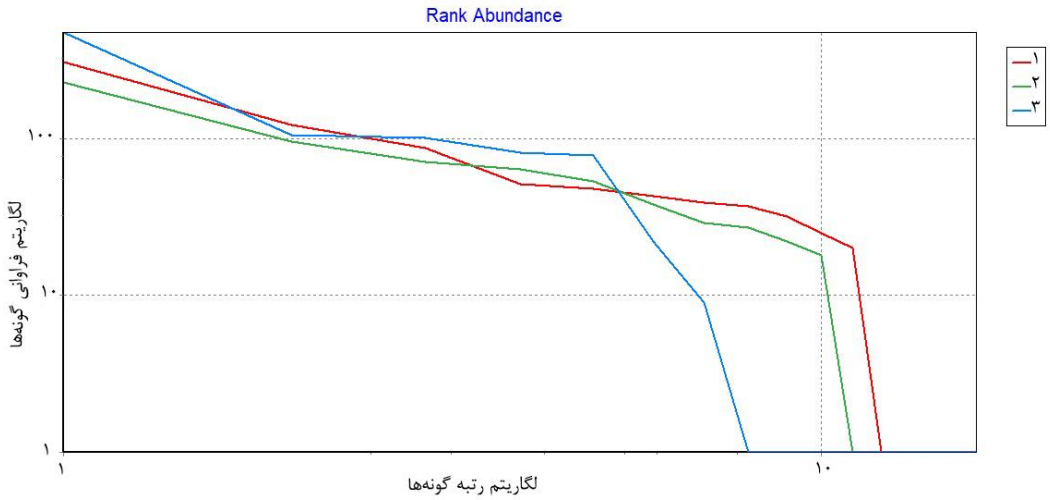
۱ حروف غیرمشابه در هر سطر نشان‌دهندهٔ تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد است.

[1] Different lower-case letters (i.e. a, b) in the rows mean significant difference ($P<0.05$).



شکل ۱- منحنی Rarefraction قارچ‌های اکتومیکوریز همراه ترافل سیاه تابستانه در ریشه‌های درختان بلوط در مناطق تحت بررسی

Figure 1. Rarefaction curves of ectomycorrhizal fungi along with summer truffle (*Tuber aestivum*) on the roots of oak trees in the studied sites



شکل ۲- منحنی رتبه- فراوانی قارچ‌های اکتومیکوریز همراه ترافل سیاه تابستانه در ریشه‌های درختان بلوط در مناطق تحت بررسی

Figure 2. Rank - abundance curves of ectomycorrhizal fungi along with summer truffle (*Tuber aestivum*) on the roots of oak trees in the studied sites

بحث

این تحقیق اولین بررسی دربارهٔ جوامع اکتومیکوریزایی مربوط به رویشگاه‌های طبیعی *T. aestivum* در ایران است. جامعهٔ اکتومیکوریزایی در عرصه‌های طبیعی ترافل در ایران تا قبل از این تحقیق کاملاً ناشناخته بود و دانشی در زمینهٔ تنوع این قارچ‌ها در رویشگاه‌های مذکور وجود نداشت. تا کنون جوامع اکتومیکوریزا در سطح نوک ریشه‌های درختان میزبان هم در رویشگاه‌های طبیعی و هم مزارع کشت‌شده ترافل در منطقهٔ مدیترانه به‌طور گسترده بررسی شده است (مانند Murat et al., 2005; Baciarelli Falini et al., 2006; Iotti et al., 2010; Benucci et al., 2011; Garcia-Barreda et al., 2012; Leonardi et al., 2013; Hilszczańska et al., 2016). با درک جوامع قارچی اکتومیکوریزا که در رویشگاه‌های قارچ‌های ترافل ساکن‌اند، می‌توان اطلاعات ارزشمندی دربارهٔ پویایی ترافل‌های موجود به‌دست آورد و امکان شناسایی گونه‌های قارچی میکوریزی را که شاخص‌های خوبی از مزارع موفق ترافل هستند فراهم کرد.

با انتخاب سایت‌های *T. aestivum* با ویژگی‌های ارتفاعی و میزبانی متفاوت، تلاش شد که تأثیر این ویژگی‌ها در تنوع و غنای قارچ‌های اکتومیکوریز همراه با ترافل مشخص شود. تا کنون وجود همزیستی اکتومیکوریزایی *Tuber aestivum* در چند میزبان درختی و درختچه‌ای شناخته شده است (Agerer & Rambold, 2004-2013). در ایران نیز این همزیستی گذشته از بلوط از درختان ممرز و ... نیز گزارش شده است (Zamani et al., 2021).

براساس نتایج به‌دست‌آمده از مناطق ۱، ۲ و ۳ به‌ترتیب یازده، ده و هفت گونه قارچ اکتومیکوریز جمع‌آوری و شناسایی شد. پژوهش‌های پیشین نشان داده‌اند که ارتفاعِ مناطق، مؤلفهٔ اصلی در ایجاد تغییر در ترکیب جامعهٔ قارچی اکتومیکوریزا در صورت تغییر نکردن پوشش گیاهی میزبان است و این الگو مشخصاً با متغیرهای اقلیمی مرتبط است (Jarvis et al., 2015). در پژوهش حاضر اگرچه ارتفاع سایت‌های مورد نمونه‌برداری با یکدیگر متفاوت بود، بین فاکتورهای مختلف خاک در مناطق، اختلاف معنی‌داری وجود نداشت و مؤلفه‌های خاک با مؤلفه‌های ضروری در رویشگاه‌های طبیعی مولد ترافل مشابهت و تطابق کامل داشتند (Zamani et al., 2021)، از این‌رو به نظر می‌رسد که اختلاف در ترکیب جوامع قارچی و تنوع گونه‌ای آنها در این مناطق بیشتر با تفاوت در نوع پوشش گیاهی و گونه‌های همراه میزبان بلوط مرتبط بوده است، به‌طوری که در مناطق ۱ و ۲ با توجه به پوشش گیاهی متنوع تنوع نیز به نسبت منطقهٔ ۳ با پوشش گیاهی یکنواخت (فقط بلوط) زیاد است. در منطقهٔ ۳ با توجه به افزایش ارتفاع، تنوع پوشش گیاهی و در نتیجه تنوع قارچ‌ها کاهش یافته است که می‌توان نتیجه گرفت تنوع گونه‌ای در جوامع قارچ‌های بررسی‌شده در این تحقیق با ارتفاع رابطهٔ عکس دارد.

برخی از پژوهش‌های قبلی نشان داده‌اند که غنای گونه‌ای قارچ‌های اکتومیکوریز در ارتفاعات بالا کاهش می‌یابد (Kernaghan & Harper, 2001; Bahram et al., 2012)، اما این الگویِ تأثیر ارتفاع در غنای گونه‌ای قارچ‌های میکوریز در برخی از دیگر پژوهش‌ها تأیید نشده است (Jarvis et al., 2015). جالب آنکه Coince et al. (2014) نیز هیچ ارتباطی بین تنوع و ارتفاع در تحقیق خود در جوامع قارچی یک گونهٔ میزبان پیدا نکردند و بیان کردند که تغییرات غنای گونه‌ای با تنوع گیاه میزبان مرتبط است.

یکنواختی بیشتر جمعیت قارچ‌های اکتومیکوریز در سایت‌های ۱ و ۲ نسبت به سایت ۳ و به‌عبارت دیگر تنوع بیشتر در این دو سایت، با در نظر گرفتن اختلاف ترکیب گونه گیاهی در میان سایت‌های تحت بررسی، دور از انتظار نیست. براساس گزارش‌های دیگر محققان هم نوع میزبان گیاهی می‌تواند از طریق تأثیر بر خصوصیات خاک، توزیع و ترکیب تاکسون‌های اکتومیکوریزایی را تغییر دهد (Wardle, 2002). همبستگی میان متغیرهای خاک تشخیص اثرهای

انفرادی هر یک از فاکتورهای خاک را با مشکل مواجه می‌کند. فاکتورهای غیرقابل اندازه‌گیری خاک نیز ممکن است جمعیت اکتومیکوریزایی را متأثر کند. شیمی بقایای برگی میان گونه های گیاهی مختلف متفاوت است و در نتیجه می‌تواند قارچ‌های اکتومیکوریز خاک را تحت تأثیر قرار دهد (Conn & Dighton, 2000). همچنین کیفیت بقایا و لاشهٔ برگ‌ها می‌توانند شیمی خاک را متأثر کنند و از این طریق قارچ ها ممکن است پاسخ های متفاوتی به متابولیت‌های ثانویه موجود در بقایای برگی ارائه دهند (Jonsson et al., 2006). در همین زمینه، در این بررسی تفاوت در کیفیت لاشه برگ‌ها میان سایت‌های ۱ و ۲ (شامل گونه‌های گیاهی مختلف همراه بلوط) نسبت به سایت ۳ (شامل فقط گونهٔ بلوط) می‌تواند توضیحی برای تفاوت در تنوع بیشتر همزیستی اکتومیکوریز در دو سایت مذکور باشد. افزون‌بر این، فنولوژی درختان می‌تواند ترکیب جمعیت و نیز فعالیت متابولیکی قارچ‌های اکتومیکوریز را متأثر کند (Courty et al., 2007). برخی جوامع گیاهی، مانند زبان‌گنجشک یا ون (*Fraxinus excelsior*) تهویهٔ مناسبی از هوا در خاک را تشکیل می‌دهند که موجب تحریک تشکیل همزیستی اکتومیکوریزایی و نیز رشد ترافل‌ها می‌شود (Hilszczańska et al., 2016). براساس گزارش Wedèn و همکاران (۲۰۰۴)، گیاه زبان‌گنجشک دارای ساختاری با سایه‌انداز (کانوپی) ویژه‌ای است که تأثیر مثبت بر دمای خاک دارد، درحالی که برخی دیگر از جوامع گیاهی مانند گیاهان ولیک (*Crataegus* spp.) بر محتوای هوا در خاک تأثیر مثبت دارند.

علی‌رغم نمونه‌برداری از خاکِ در مجاورت اسپوروکارپ‌های ترافل بالغ برای تجزیه‌وتحلیل جوامع اکتومیکوریزایی، قارچ *T. aestivum* در همهٔ نمونه‌های خاک مشاهده نشد. مشابه با این یافته، محققان دیگر نیز گزارش کرده‌اند (Urbančič et al., 1999; Bzdyk et al., 2019) که این گونه به‌ندرت در سطح نوک ریشه قابل ردیابی است و این نشان می‌دهد که توزیع این گونه در سیستم ریشهٔ گیاه میزبان به‌صورت موضعی است.

با مقایسهٔ جوامع اکتومیکوریزایی از عرصه های مولد *T. aestivum*، در رویشگاه‌های طبیعی و در مزارع ترافل، انتظار می‌رود که تفاوت‌هایی در ساختار این جوامع در بین مزارع و توده‌های طبیعی وجود داشته باشد. با بررسی یافته‌های Benucci et al. (2011) در مزارع بیست‌وپنج‌سالهٔ ترافل در ایتالیا مشخص شد که *T. aestivum* در کل نمونهٔ ریشه‌های برداشت‌شده از درختان مزرعه یافت شد؛ درحالی که در این تحقیق در توده‌های طبیعی این پدیده وجود نداشت. این مشاهدات را می‌توان با رقابت بسیار کمتر و حتی نادر در میان قارچ‌های اکتومیکوریز برای جایگزین شدن روی ریشه‌های میزبان در مزارعی که به‌طور هدفمند برای نگهداری گونه های ترافل خاص مدیریت می‌شوند توضیح داد (Chevalier & Frochot 1997; Benucci, 2011).

اگرچه انواع مختلف همزیستی اکتومیکوریزایی در توده های طبیعی و مزارع ترافل (بدون توجه به شریک قارچی اکتومیکوریزا) به چشم می‌خورد، ترکیب جوامع اکتومیکوریزایی در میان عرصه‌های طبیعی و دست‌کاشت ترافل یکسان نیست. تعداد گونه‌های اکتومیکوریز *Tomentella* و *Thelephoaceae* در عرصه‌های کاشته‌شده بیشتر از توده‌های طبیعی است (Benucci et al., 2011)، گونه‌هایی مانند *Sebacina* spp.، *Pseudomentella* spp.، و انواع مختلف *Tuber* spp. (مانند *T. brumale* Vitt.، *T. rufum* Pico و *T. rapaeodorum* Tul. & C. Tul.) در رویشگاه‌های طبیعی ترافل ثبت نشده‌اند که نشان‌دهندهٔ وجود تفاوت‌های اساسی در ساختار جوامع اکتومیکوریز در دو عرصهٔ طبیعی و دست‌کاشت است. در نهایت *C. geophilum* در باغ‌های ترافل گزارش نشده، درحالی که همواره گونه‌ای معمول در توده‌های طبیعی، به‌ویژه در رویشگاه‌های بلوط است (Agueda et al., 2010). در این تحقیق *C. geophilum* به‌عنوان گونه‌ای فراوان

در هر یک از سایت‌های تحت بررسی حضور داشت. گونهٔ *C. geophilum* نوعی قارچ اکتومیکوریز همه‌جازی است که در گسترهٔ وسیعی از شرایط محیطی قادر به زندگی است (Jany et al., 2002) و در رویشگاه‌های ترافل نیز بسیار فراوان است (Agueda et al., 2010). حضور فراوان‌تر این قارچ در سایت‌های ۱ و ۲ را می‌توان به فراوان‌تر بودن حضور ریشه‌های درختان میزبان در این مناطق جنگلی مرتبط دانست (Sanchez, 2008).

نتایج تحقیقات یافته‌های Sanchez (2012) نشان می‌دهد که خاک‌ورزی می‌تواند حضور قارچ اکتومیکوریز *Scleroderma* sp. و نیز دیگر اکتومیکوریزاهای دارای میسلیوم‌های خارج ریشه‌ای بسیار طویل و دارای ریزومورف را کاهش دهد، چراکه این بافت‌ها در فرایند خاک‌ورزی شکسته می‌شوند؛ از این‌رو این نوع قارچ‌ها را اغلب می‌توان همراه با ترافل‌های رشدیافته در عرصه‌های طبیعی مشاهده کرد و نه در باغ‌های ترافل خاک‌ورزی‌شده. با این‌حال مشخص شده است که وجود گونه‌های *Scleroderma* هیچ آسیبی به ترافل‌ها وارد نکرده و از بارور شدن آنها جلوگیری نمی‌کند (De Miguel et al., 2014). قارچ *S. verrucosum* از گونه‌های با فراوانی زیاد به‌ویژه در سایت سوم تحقیق حاضر بود.

همچنین گونه‌های اکتومیکوریز متعلق به جنس‌های *Inocybe* و *Lactarius* که در جوامع مختلف گیاهی (Buée et al., 2011) و در محیط‌های تولید ترافل به‌نسبت رایج‌اند (Salerni et al., 2011)؛ از جمله گونه‌های با فراوانی زیاد در تحقیق حاضر بودند.

گونه‌های *Thelephoraceae* نیز که از دیگر مورفوتیپ‌های رایج در نوک ریشهٔ درختان میزبان در جنگل‌های شمالی به‌شمار می‌روند (Salerni et al., 2011) و همواره از عرصه‌های تولید ترافل گزارش شده‌اند (Iotti et al., 2010; Leonardi et al., 2013; Belfiori et al., 2012; Benucci et al., 2011) از دیگر گونه‌های مهم شناخته‌شده در تحقیق حاضر بودند. گفته می‌شود حضور این قارچ‌ها اختلالی در فرایند توسعهٔ اسپوروکارپ قارچ‌های ترافل ایجاد نمی‌کنند (De Miguel et al., 2014).

قارچ *Hebeloma* sp. از اکتومیکوریزاهای با فراوانی زیاد در سایت سوم این تحقیق بود. گفته می‌شود که حضور گونه‌های این قارچ در رویشگاه‌های دست‌کاشت ترافل می‌توانند از رشد صحیح ترافل و تکمیل چرخهٔ زندگی آن جلوگیری کنند (González-Armada et al., 2010). جنس *Hebeloma* یکی از جنس‌هایی است که می‌تواند تولید ترافل را به‌دلیل قدرت رقابت زیاد در باغ‌ها به خطر بیندازد. گونه های این جنس اغلب دارای گسترهٔ میزبانی وسیع و پراکندگی گسترده در جنگل‌های معتدل‌اند. Marmeisse et al. (1999) جنس *Hebeloma* را جنسی با گسترهٔ جهانی می‌دانند که در مراحل اولیه و اواخر کاشت ترافل ظاهر می‌شود و احتمالاً فضاهای باز ایجادشده در زمان مدیریت باغ‌ها برای توسعهٔ این قارچ مناسب است. حضور این قارچ فقط در سایت سوم نیز ممکن است به‌دلیل حضور بلوط به‌منزلهٔ تک‌میزبان در این سایت و در نتیجه تراکم کمتر گیاهان در سایت مذکور باشد.

از سوی دیگر با توجه به اینکه گونه‌های متعلق به جنس *Russula* اغلب با عرصه‌های ترافل غیرمولد (De Miguel et al., 2014) مرتبط بوده‌اند، حضور آنها در سایت‌های تحقیق حاضر ممکن است هشداری دیگر برای به مخاطره افتادن میوه‌دهی *T. aestivum* در این رویشگاه‌های طبیعی ارزشمند کشور ایران باشد. از عواملی که این نتیجه‌گیری را توجیه می‌کند برداشت‌های بی‌رویه و غیرحرفه‌ای ترافل از رویشگاه‌های آن است؛ برداشت‌هایی که با آسیب رساندن به ریشهٔ گیاهان میزبان و نیز در معرض قرار دادن میسلیوم‌های قارچ ترافل، نشان از تولید ضعیف آتی اندام بارده قارچ در این عرصه‌های طبیعی دارند. وجود گونهٔ *T. aestivum* در ایران به‌منزلهٔ غالب‌ترین ترافل جنگلی با تنوع ژنتیکی زیاد در میان جدایه‌ها، منبعی بسیار باارزش برای کشور است و بقای این گونهٔ ارزشمند نیازمند اتخاذ راهبردهای حفاظتی است (Arefipour & Zamani, 2019).

References

Agerer, R., & Rambold, G. (2004-2013). DEEMY– an information system for characterization and determination of ectomycorrhizae. München, Germany. http://www.deemy.de.

Agerer, R., (1987-2012). *Colour atlas of ectomycorrhizae*. 1st-15th delivery, Einhorn, Schwäbisch Gmünd.

Agueda, B., Fernández-Toirán, L.M., De Miguel, A.M., & Martínez-Peña, F. (2010). Ectomycorrhizal status of a mature *productive black truffle plantation. Forest Systems, 19(1), 89-97.*

Natural Resources and Watershed Management Office at Golestan province (2001). Forest Management Plan, Loveh Forest, District No. *1*, 780p.

Arefipour, M.R., & Zamani, S.M. (2019). The survival of summer truffle (*Tuber aestivum* Vittad.) requires conservation strategies. *Iran Nature, 4*(5), 29-33.

Avis, P.G., McLaughlin, D.J., Dentinger, B.C., & Reich, P.B. (2003). Long-term 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*(1), 239-253.

Azizi Mehr, M., Kooch, Y., & Hosseini, S.M. (2020). The effect of forest degradation intensity on the dynamics of soil microbial activities and biochemical in the plain region of Noshahr. *Iranian Journal of Forest, 12*(2), 175-188.

Baciarelli Falini, L., Rubini, A., Riccioni, C., & Paolocci, F. (2006). Morphological and molecular analyses of ectomycorrhizal diversity in a man-made *T. melanosporum* plantation: description of novel truffle-like morphotypes. *Mycorrhiza, 16*, 475–484.

Bahram, M., Põlme, S., Kõljalg, U., Zarre, S., & Tedersoo, L. (2012). Regional and local patterns of ectomycorrhizal fungal diversity and community structure along an altitudinal gradient in the Hyrcanian forests of northern Iran. *New Phytologist, 193*, 465– 473.

Belfiori, B., Riccioni, C., Tempesta, S., Pasqualetti, M., & Paolocci, F. (2012). Comparison of ectomycorrhizal communities in natural and cultivated *Tuber melanosporum* truffle grounds. *FEMS Microbiology Ecology, 81*, 547-561.

Benucci, G.M.N., Raggi, L., Albertini, E., Grebenc, T., Bencivenga, M., Falcinelli, M., & Di Massimo, G. (2011). Ectomycorrhizal communities in a productive *Tuber aestivum* Vittad. Orchard: composition, host influence and species replacement. *FEMS Microbiology Ecology,76*, 170-184.

Bertini, L., Amicucci, A., Agostini, D., Polidori, E., Potenza, L., Guidi, C., & Stocchi, V. (1999). A new pair of primers designed for amplification of the ITS region in *Tuber* species. *FEMS Microbiology Letters, 173*, 239–245.

Bertini, L., Rossi, I., Zambonelli, A., Amicucci, A., Sacchi, A., Cecchini, M., Gregori, G., & Stocchi, V. (2005). Molecular identification of *Tuber magnatum* ectomycorrhizae in the field. *Microbiological Research, 161*, 59–64.

Bruns, T.D. (1995) Thoughts on the processes that maintain local species diversity of ectomycorrhizal fungi. *Plant Soil, 170*, 63–73.

Buée, M., Maurice, J.P., Zeller, B., Andrianarisoa, S., Ranger, J., Courtecuisse, R., Marçais, B., & Le Tacon, F. (2011). Influence of tree species on richness and diversity of epigeous fungal communities in a French temperate forest stand. *Fungal Ecology, 4*, 22-31.

Bzdyk, R.M., Olchowik, J., Studnicki, M., Nowakowska, J.A., Oszako, T., Urban, A., & Hilszczańska, D. (2019). Ectomycorrhizal Colonisation in Declining Oak Stands on the Krotoszyn Plateau, Poland. *Forests, 10*, 30. https://doi.org/10.3390/f10010030

Chevalier, G., & Frochot, H. (1997). La truffe de Bourgogne (*Tuber uncinatum* Chatin) Edition P´etrarque, Levallois-Perret, France.

Coince, A., Cordier, T., Lengellé, J., Defossez, E., Vacher, C., Robin, C., Buée, M., & Marçais, B. (2014). Leaf and root-associated fungal assemblages do not follow similar elevational diversity patterns. *PLoS One, 9*, e100668. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100668

Conn, C., & Dighton, J. (2000). Litter quality influences on decomposition, ectomycorrhizal community structure and mycorrhizal root surface acid phosphatase activity. *Soil Biology and Biochemistry, 32(4)*, 489-496.

Courty, P.E., Breda, N., & Garbaye, J. (2007). Relation between oak tree phenology and the secretion of organic matter degrading enzymes by *Lactarius quietus* ectomycorrhizas before and during bud break. *Soil Biology and Biochemistry, 39*, 1655–1663.

De Miguel, A.M., Agueda, B., Sánchez, S., & Parladé, J. (2014). Ectomycorrhizal fungus diversity and community structure with natural and cultivated truffle hosts: applying lessons learned to future truffle culture. *Mycorrhiza, 24*(1), 5–18.

Garcia-Barreda, S., & Reyna, S. (2012). Below ground ectomycorrhizal community in natural *Tuber melanosporum* truffle grounds and dynamics after canopy opening. *Mycorrhiza, 22*, 361-369.

Gardes, M., & Bruns, T.D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology, 2*, 113–118.

González-Armada, B., De Miguel, M., & Cavero, R. (2010). Ectomycorrhizae and vascular plants growing in brulés as indicators of below and above ground microecology of black truffle production areas in Navarra (Northern Spain). *Biodiversity and Conservation, 19*(14), 3861-3891.

Hall, I., Brown, G., & Zambonelli, A. (2007). *Taming the Truffle.* The History, Lore, and Science of the Ultimate Mushroom. Timber Press, Oregon.

Hall, I.R., Wang, Y., & Amicucci, A. (2003). Cultivation of edible ectomycorrhizal mushrooms. *Trends in Biotechnology, 21*, 433–438.

Hilszczańska, D., Szmidla, H., Horak, J., & Rosa-Gruszecka, A. (2016). Ectomycorrhizal communities in a *Tuber aestivum* Vittad. Orchard in Poland. *Open Life Sciences, 11*, 348–357.

Iotti, M., Lancellotti, E., Hall, I., & Zambonelli, A. (2010). The ectomycorrhizal community in natural *Tuber borchii* grounds. *FEMS Microbiology Ecology, 72*, 250–260.

Jany, J., Garbaye, J., & Martin, F. (2002). *Cenococcum geophilum* populations show a high degree of genetic diversity in beech forests. *New Phytologist, 154*, 651-659.

Jarvis, S.G., Woodward, S., & Taylor, A. (2015). Strong altitudinal partitioning in the distributions of ectomycorrhizal fungi along a short (300 m) elevation gradient. *New Phytologist, 206*(3), 1145-1155.

Jeandroz, S., Murat, C., Wang, Y., Bonfante, P., & Le Tacon, F. (2008). Molecular phylogeny and historical biogeography of the genus *Tuber*, the 'true truffles'. *Journal of Biogeography, 35*, 815–829.

Jonsson, L.M., Dighton, J., Lussenhop, J., & Koide, R.T. (2006). The effect of mixing ground leaf litters to soil on the development of pitch pine ectomycorrhizal and soil arthropod communities in natural soil microcosm systems. *Soil Biology and Biochemistry, 38*, 134–144.

Kernaghan, G., & Harper, K.A. (2001). Community structure of ectomycorrhizal fungi across an alpine/subalpine ecotone. *Ecography, 24*, 181– 188.

Lancellotti, E., Iotti, M., Meli, A., Zambonelli, A., & Franceschini, A. (2011). eMyCo-Ectomycorrizhal Community Database. *Micologia Italiana, 40*(3), 23-30.

Leonardi, M., Iotti, M., Oddis, M., Lalli, G., Pacioni, G., Leonardi, P., Maccherini, S., Perini, C., Salerni, E., & Zambonelli, A. (2013). Assessment of ectomycorrhizal fungal communities in the natural habitats of *Tuber magnatum* (Ascomycota, Pezizales). *Mycorrhiza, 23*, 349-358.

Marmeisse, H., Gryta, P., Jargeat, P., Fraissinet-Tachet, L., Gay, G., & Debaud, J.C. (1999). Hebeloma. In J.W.G. Cairney & S.M. Chambers (Eds.), Ectomycorrhizal fungi. Key genera in profile (pp. 89–128). Springer-Verlag, Berlin.

Murat, C., Vizzini, A., Bonfante, P., & Mello, A. (2005). Morphological and molecular typing of the below-ground fungal community in a natural *Tuber magnatum* truffle ground. *FEMS Microbiology Letters, 245*, 307-313.

Parad, Gh.A., Tabari Kouchaksaraei, M., Ghobad-Nejhad, M., Esmailzadeh, M., & Yousefzadeh, H. (2020). Environmental factors affecting the presence of Edible Zarde-Kija mushroom (*Cantharellus alborufescens*) in plain forest of Noor (Mazandaran). *Iranian Journal of Forest, 12*(1), 1-15.

Pourbabaei, H., Salehi, A., Sadat Ebrahimi, S., & Khodaparast, F. (2021). The effects of altitude and the most important soil components on vegetation characteristics (Asalem watershed). *Iranian Journal of Forest, 13*(3), 285-304.

Pruett, G., Bruhm, J., & Mihail, J. (2008). Temporal dynamics of ectomycorrhizal community composition on root systems of oak seedlings infected with Bugundy truffle. *Mycological Research, 112*, 1344–1354.

Salerni, E., Iotti, M., Leonardi, P., Zambonelli, A., & Perini, C. (2011). Fungal biodiversity in a natural truffiére of Tuber magnatum. Proceedings of the XVI Congress of European Mycologists, Thessaloniki, 152-153.

Sanchez, S. (2008). Determinación de la flora ectomicorrícica y evaluación del estado de micorrización de 30 plantaciones truferas de las provincias de Huesca y Zaragoza. Trabajo de investigación (inédito). Departamento de Agricultura y Economía Agraria, Universidad de Zaragoza.

Sanchez, S. (2012). Ectomicorrizas en el cultivo de trufa negra: ecología, diversidad y gestión. PhD thesis, Universidad de Zaragoza, Zagroza, Spain.

Seaby, R.M., & Henderson, P.A. (2006). Species Diversity and Richness. Pisces Conservation Ltd., Lymington, England.

Sisti, D., Zambonelli, A., Giomaro, G., Rossi, I., Citterio, B., Benedetti, P.A., & Stocchi, V. (1998). *In vitro* mycorrhizal synthesis of micropropagated *Tilia platyphyllos* Scop. Plantlets with *Tuber borchii* Vittad. mycelium in pure culture. *Acta Horticulture, 457*, 379-384.

Smith, M.E., Douhan, G.W., & 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.

Smith, S.E., & Read, D.J. (2008). Mycorrhizal Symbiosis, Third ed. Academic Press, London, UK.

Timling, I., Dahlberg, A., Walker, D.A., Gardes, M., Charcosset, J.Y., Welker, J.M., & Taylor, D.L. (2012). Distribution and drivers of ectomycorrhizal fungal communities across the North American Arctic. *Ecosphere, 3*(11), 1-25.

Urbančič, M., Ferlin, F., & Kutnar, L. (1999).Investigation of diversity and productivity of forest sites in the Sezana-Komen Karst region. *Zbornik gozdarstva in lesarstva, 58*, 5-45.

Wardle, D.A. (2002). Communities and Ecosystems: Linking Aboveground and Belowground Components. Princeton, NJ: Princeton University Press.

Wedén, C., Chevalier, G., & Danell, E. (2004). *Tuber aestivum* (syn. *T. uncinatum*) biotopes and their history on Gotland, Sweden. *Mycological Research, 108*, 3, 304-310.

Weigmann, G. (1973). Zur Okologie der Collembolen und Oribatiden im Grenzbereich Land-Meer (Collembola, Insecta Oribatei, Acari). *Zeitschrift fur wissenschartliche Zoologie, 3–4*, 295–391.

White, T.J., Bruns, T.D., Lee, S.B., & Taylor, J.W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In M.A., Gelfand , D.H., Sninsky, J.J. & T.J. White

(Eds.), PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (pp. 315–322). San Diego, CA. Academic Press.

Zamani, S.M., Gholami Ghavam abad, R., Karimidoost, A., & Zeinali, S. (2021). Soil Properties in Natural Truffle (*Tuber* spp.) Habits in Golestan Province. *Iranian Journal of Forest and Range Protection Research, 18(2)*, 274-286.

Zambonelli, A., Iotti, M., & Murat, C. (2016). True Truffle (Tuber spp.) in the World. Soil Biology 47. Cham, Switzerland, Springer International Publishing.

Iranian Journal of Forest
Vol. 14, No. 4, Winter 2023
pp. 407-424

Research Article

Diversity and population structure of ectomycorrhizal fungi in forest habitats of summer truffle (*Tuber aestivum* Vittad.)

S.M. Zamani[1]*, F. Kazerani[2], H. Rabbani nasab[3], S. Ghanaei[4] , and R. Gholami Ghavam abad[5]

[1]Assistant Prof., Research Institute of Forests and Rangeland, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran
[2] Assistant Prof., Research Institute of Forests and Rangeland, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran
[3] Golestan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Gorgan, Iran
[4] Senior Research Expert, Payame Noor University, Shahrood, Iran
[5] Research Expert, Research Institute of Forests and Rangelands, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran

(Received: 15 March 2022; Accepted: 4 May 2022)

Abstract

Cultivation of the summer truffle, *Tuber aestivum* Vittad., has become as a new agricultural activity that for rural economies is often considerably more beneficial than conventional agriculture and also promotes reforestation, as well as land use sustainability. Considering examples from Italy, Hungary, Spain and France, truffle cultivation induces the economic and social development of small and rural communities. Because there is no tradition of creating truffle gardens in Iran, knowledge of environmental factors regulating the formation of *T. aestivum* fruiting bodies is limited. Since the establishment of truffle plantations in the world, several studies have been conducted to improve their productivity and stability. Success in the continuation of truffle plantations depends clearly on the mycorrhizal status of the host trees over the years, from inoculated seedlings to truffle producing trees. Therefore, monitoring the status of ectomycorrhizal fungi in the natural habitats of truffles and increasing knowledge about ectomycorrhizal communities of *T. aestivum* host species is crucial to ensure the successful production of summer truffles in truffle orchards. In this study, the presence of *T. aestivum* ectomycorrhizae on roots of oak (*Quercus castaneifolia*) and its abundance in natural habitats of truffle fungi in three selected sites in Golestan province was investigated and the diversity and structure of other ectomycorrhizal fungi were evaluated. In selecting the studied sites, differences in altitude, dominant geographical direction and plant species in the regions were considered. The results showed that although the species composition was up to 70% similar between sites, but the number of fungal species, diversity and species richness of fungi were different among sites with different host plants and the site with only oak.

Keywords: Biodiversiy, Burgundy truffle, ectomycorrhizae, oak.

*Corresponding author Tel: +982144787285 Email: mzamani@rifr-ac.ir