DOI: http://dx.doi.org/10.22092/ijfrpr.2016.106023

دو فصلنامه علمی- پژوهشی تحقیقات حمایت و حفاظت جنگلها و مراتع ایران

جلد ۱۳ شماره ۲، صفحه ۱۶۰- ۱۷۰، (۱۳۹۴)

تأثیر همزیستی اکتومیکوریزایی بر رشد و فیزیولوژی گیاهچه‌های بلندمازو (*Quercus castaneifolia* C. A. Mey.)

سیده معصومه زمانی[۱]، ابراهیم محمدی گل‌تپه[۲]*، ناصر صفایی[۳] و میترا امام[۴]

۱- دانش‌آموخته دکترا، گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، و مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

۲*- نویسنده مسئول، استاد، گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران، پست الکترونیک: emgoltapeh@modares.ac.ir

۳- دانشیار، گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۴- استادیار پژوهش، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۹۴/۰۶/۳۱ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۲/۱۱

چکیده

بلندمازو (*Quercus castaneifolia*) از درختان مهم و صنعتی جنگل‌های شمال ایران بوده که به‌دلیل بهره‌برداری‌های بی‌رویه به‌شدت مورد تخریب قرار گرفته است. ازآنجاکه همزیستی اکتومیکوریزایی نقش مهمی در فیزیولوژی، اکولوژی، مقاومت، تکثیر و زادآوری درختان میزبان و اکوسیستم‌های جنگلی ایفا می‌کند؛ در میان راهکارهای موجود برای بهبود زنده‌مانی و استقرار، همزیستی میکوریزایی القاء شده (مصنوعی) و تلقیح گیاهچه‌ها با استرین‌های قارچی منتخب، به‌عنوان روشی کارآمد و دوستدار محیط‌زیست و نیز جایگزینی برای کودهای شیمیایی و دیگر تیمارهای بهبودبخشی خاک معرفی شده است. در این تحقیق همزیستی اکتومیکوریزایی روی ریزقلمه‌های بلندمازو برقرار شد تا میزان سازگاری آن با قارچ همزیست مورد استفاده و نیز امکان بهبود خصوصیات فیزیولوژیکی و رویشی آن ارزیابی شود. گیاهچه‌های بلوط از طریق کشت بافت تکثیر شدند، سپس برقراری همزیستی با قارچ *Hebeloma sinapizans* انجام شد. اندازه‌گیری برخی ویژگی‌های فیزیولوژیکی، رشدی و نیز وضعیت آبی گیاهچه‌های تلقیح شده در مقایسه با گیاهچه‌های شاهد انجام گردید. نتایج نشان داد که برقراری همزیستی اکتومیکوریزایی روی گیاهچه‌های بلوط، بیومس، سطح و کلروفیل برگ، بیومس ساقه و نیز محتوای آبی گیاهچه‌ها را افزایش داده است. بنابراین با توجه به بهبود وضعیت آبی، افزایش رشد و بیومس و اصلاح خصوصیات فیزیولوژیکی گیاه تلقیح شده با قارچ میکوریز در مقایسه با شاهد، می‌توان برقراری این تعامل اکتومیکوریزایی را راهکاری نوین برای افزایش موفقیت نهال‌کاری در برنامه‌های احیایی جنگل‌های بلندمازو معرفی کرد.

واژه‌های کلیدی: بلندمازو، ویژگی‌های رشد، ویژگی‌های فیزیولوژیک، همزیستی اکتومیکوریزایی

مقدمه

جنگلهای طبیعی اساس و رکن زیربنایی توسعه پایدار و ذخیرگاه ارزشمند ژنتیکی هر کشور در سطح جهان محسوب می‌شوند. امروزه با توجه به نیاز روزافزون جوامع به چوب و کاهش سطح جنگلهای طبیعی به علت بهره‌برداریهای بی‌رویه، نیاز به پژوهش در زمینه بهینه‌سازی کشت گونه‌های درختی و اطلاع از روشهای اصلاح درختان در جهت حفظ و توسعه این سرمایه در حال تخریب، بیش از پیش احساس می‌شود (Parhizkar *et al.*, 2002).

تولید نهال‌های با همزیستی اکتومیکوریزاییِ توسعه یافته راهبرد نویدبخشی برای کاستن از شوک ابتداییِ انتقال نهال به عرصه و افزایش بقا و رشد نهال‌ها در طی اولین سال نهال‌کاری، که مهمترین مرحله استقرار نهال است، می‌باشد. تلقیح میکوریزایی نه تنها می‌تواند به‌عنوان بهبوددهنده رشد نهال‌ها عمل کند، قادر است وضعیت فیزیولوژیکی آنها را از طریق افزایش قابلیت فتوسنتز و افزایش برداشت آب و عناصر غذایی و انتقال آنها به بافت‌های نهال بهینه نماید (Fini *et al.*, 2011; Sebastiana *et al.*, 2013). همچنین، در حال حاضر حدود یک‌سوم از اراضی زمین بدلیل خشک بودن شدید برای رشد گیاهان و تولیدات آنها مناسب نیستند و نیز پیش‌بینی می‌شود گرم شدن همه‌گیر زمین گسترش خشکی را افزایش دهد (Schar *et al.*, 2004)، در این شرایط افزایش مرگ و میر درختان ناشی از گرما و خشکی در اکوسیستم‌های جنگلی دور از انتظار نخواهد بود (Allen *et al.*, 2010). بنابراین بکارگیری راهبردهای سازگارسازی با تغییرات آب و هوایی (نظیر همزیستی میکوریزایی) می‌تواند بقا و رشد درختان را در اکوسیستم‌های تخریب شده بهبود بخشیده و موجب جنگل‌کاری‌های سریع این نواحی و احیای آنها شود (Smith & Read, 2008; Sebastiana *et al.*, 2013).

در میان گونه‌های جنس بلوط در دنیا، بلندمازو یکی از گونه‌های صنعتی و با ارزش جنگلهای شمال ایران است که پراکنش وسیعی در ناحیه هیرکانی و قفقاز داشته و در ارتفاعات ساحلی پایین‌بند تـا ارتفاعات میان‌بند و فوقانی جنگل‌های این نواحی دیده می‌شود (Sabeti, 1976). متأسـفانه، در سال‌های اخیر به دلایـل مختلـف حجـم ایـن گونـه در رویشگاه‌های طبیعی در حال کاهش است. با توجه به اهمیت اکولوژیکی و نیز ارزش بالای اقتصادی و محیط زیستی آن لازم است در کنار احیای مناطق مخروبه، به افزایش کیفی نهال‌های مورد استفاده در این مناطق نیز توجه شود. برقراری همزیستی اکتومیکوریزایی در این گیاه از مهمترین راهکارها برای بهینه‌سازی رشد و افزایش مقاومت آنها به تنش‌های مختلف محیطی می‌باشد. مطالعات نشان داده‌اند که تلقیح گونه‌های مختلف جنس بلوط با قارچ‌های اکتومیکوریز توانسته است تأثیر مثبتی در رشد گیاه و پاسخ‌های فیزیولوژیکی آن داشته باشد، به‌طوری‌که گیاهان اکتومیکوریزایی رشد، تثبیت کربن، دریافت عناصر غذایی و وضعیت آبی بسیار بهتری نسبت به گیاهان شاهد داشته‌اند (Dominguez Nunez *et al.*, 2006, 2008; Southworth *et al.*, 2009). هرچند، در برخی گونه‌های بلوط نیز مشخص شده تلقیح میکوریزایی تأثیری روی بیومس گیاه، هضم کربن و یا بازدهی استفاده از آب نداشته است (Fini *et al.*, 2011). با وجود درک اهمیت درختان بلوط، تاکنون هیچ مطالعه‌ای در مورد تأثیر (مثبت یا منفی) تلقیح میکوریزایی کنترل شده روی رشد و فیزیولوژی گیاهان بلوط ایران انجام نشده است.

در این تحقیق، همزیستی اکتومیکوریزایی روی گیاهچه‌های بلندمازو مستقر شده و میزان سودمندی این تعامل در رشد، نمو و وضعیت فیزیولوژیکی میزبان از طریق ارائه نتایج حاصل از تجزیه عوامل ساختاری و فیزیولوژیکی در مقایسه با گیاهچه‌های شاهد ارزیابی شد. نتایج این تحقیق علاوه بر ارائه راهکاری نوین به‌منظور حفاظت و احیاء این ذخیره ژنتیکی ارزشمند جنگلهای هیرکانی، می‌تواند تحولی اساسی در مدیریت جنگل‌کاری با اندیشه‌ای نو مبتنی بر حفاظت اصولی از گونه‌های مهم گیاهی ایجاد کرده و کاربرد فراوانی در برنامه‌های احیایی مناطق تخریب‌یافته داشته باشد.

مواد و روش‌ها

تلقیح گیاهچه‌های بلندمازو با قارچ اکتومیکوریز

تکثیر گیاهچه‌های بلندمازو از طریق کشت بافت انجام شد (Zamani *et al.*, 2012). جدایه قارچی مورد استفاده *Hebeloma sinapizans* (Paulet) Gillet (strain 410) بود که از جناب آقای دکتر محمدی (دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده کشاورزی) دریافت شد.

برای برقراری همزیستی اکتومیکوریزایی از انتقال گیاهچه‌های ریشه‌دار و هم اندازه بلوط به ظروف پلی‌اتیلنی (Magentea^{TM}) ۲۵۰ میلی‌لیتری دارای سوبسترای پیت-ورمیکولیت (۱: ۴) استفاده شد. سوبسترا قبلاً تا حد ظرفیت زراعی توسط محیط مایع MMN (Modified Melin Norkrans) (Marx, 1969) (با غلظت نصف شده از عناصر فسفر و نیتروژن و ۰/۲ درصد گلوکز؛ [pH= 5.6]) مرطوب و بعد توسط میسلیوم‌های قارچی که در محیط مایع MMN در دمای ۲۳ درجه سلسیوس به مدت ۴ هفته رشد کرده، با آب مقطر استریل شستشو داده شده و پس از قطعه قطعه شدن توسط تیغه‌های استریل دوباره در آب مقطر استریل (نسبت آب مقطر به سوبسترا: ۱ به ۴) سوسپانسیون شده بودند، تلقیح شد. میسلیوم به سمت درون سوبسترا رشد کرده و پس از ۶ هفته نگهداری در دمای ۲۳ درجه سلسیوس کاملاً آن را کلونیزه کرد (Duponnois & Garbaye, 1991; Oh *et al.*, 1995). در ظروف شاهد در این مرحله فقط آب مقطر استریل (بدون قارچ تلقیح و با همان نسبت آب مقطر به سوبسترا: ۱ به ۴) افزوده شد. گیاهچه‌های تیمار و شاهد پس از انتقال، در اتاقک‌های رشد با دوره نوری ۱۶ ساعت نور (۵۰۰۰ – ۳۰۰۰ لوکس) در دمای ۲۳ درجه سلسیوس و ۸ ساعت تاریکی با دمای ۱۹ درجه سلسیوس به مدت ۱۴ هفته نگهداری شدند (Martins *et al.*, 1996; Repac, 2010).

شایان ذکر است که در بررسی‌های اولیه کارآیی روش‌های دیگری نیز برای برقراری همزیستی اکتومیکوریزایی روی گیاهچه‌های بلندمازو ارزیابی شد؛ که شامل تلقیح گیاهچه‌های ریشه‌دار شده درون محیط همزیستی (محیطی جامدی که گیاه و قارچ بطور توأم در آن کشت می‌شدند) در ظروف شیشه‌ای (Oliveira *et al.*, 2003) و استفاده از روش ساندویچی کلونیزاسیون ریشه‌های گیاهچه‌های بلوط درون ظروف پتری‌دیش (Herrmann *et al.*, 1998) بود.

بررسی تأثیر همزیستی روی خصوصیات رویشی و فیزیولوژیکی گیاهچه‌های بلندمازو

به‌منظور آزمون آماری گیاهچه‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو تیمار تلقیح با قارچ اکتومیکوریز و عدم تلقیح کشت شدند. چهارده هفته پس از تلقیح، ۱۵ گیاهچه از هر تیمار (اکتومیکوریزایی و شاهد) بطور تصادفی انتخاب و شاخ و برگ نهال‌ها برای ارزیابی‌های مختلف مورد استفاده قرار گرفت (Dominguez Nunez *et al.*, 2008; Sebastiana *et al.*, 2013). طول شاخه و تعداد برگ‌ها در هر گیاه ارزیابی شد، برای اندازه‌گیری میزان کلروفیل برگ و سطح برگ به‌ترتیب از دستگاه اندازه‌گیری مقدار کلروفیل (Chlorophyll Content Meter) ساخت شرکت Hansatech مدل CL- 01 و دستگاه اندازه‌گیری سطح برگ (Leaf Aerea Meter) ساخت شرکت Gatehouse مدل CICHT- 230r استفاده شد و برای اندازه‌گیری وزن خشک شاخه، بافت به مدت ۴۸ ساعت در آون ۶۰ درجه سلسیوس قرار داده شد (Dominguez Nunez *et al.* 2008). همچنین وضعیت آبی گیاهان با اندازه‌گیری محتوای نسبی آب برگ (Leaf Relative Water Content) بر اساس فرمول زیر تخمین زده شد (Catsky, 1960).

درصد محتوای نسبی آب برگ= (وزن تر برگ – وزن خشک برگ)/ (وزن تورژسانسی برگ – وزن خشک برگ)×۱۰۰

به‌منظور تعیین وزن تورژسانسی یا آماسی، برگ‌ها به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی (برای آنکه کاهش وزنی در اثر فعالیت تنفسی رخ ندهد) در فالکون داخل آب مقطر قرار داده شده و پس از اندازه‌گیری وزن برگ‌ها در این شرایط، برگ‌ها به مدت ۴۸ ساعت در آون ۶۰ درجه سلسیوس قرار گرفته و وزن خشک آنها نیز اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری وزن‌ها از ترازوی دقیق ۰/۰۰۱ گرم استفاده شد.

توزیع نرمال داده‌ها توسط آزمون کولموگروف-اسمیرنف (Kolmogorov Smirnov Tests) (P=0.05) تأیید شد. مقایسه میانگین‌های دو تیمار تلقیح شده و شاهد با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون *t* برای دو نمونه مستقل (Independent-Samples T Test) برای هر متغیر در سطح ۰/۰۱ یا ۰/۰۵ انجام شد.

نتایج

تلقیح گیاهچه‌های بلندمازو با قارچ اکتومیکوریز

در این تحقیق از روش‌های مختلفی به‌منظور برقراری همزیستی اکتومیکوریزایی روی گیاهچه‌های بلوط استفاده شد تا تکنیکی که با آن بالاترین میزان کلونیزاسیون ریشه توسط قارچ اکتومیکوریز بدست می‌آید، یافت شود. براساس نتایج، در روش کشت توأم گیاه و قارچ و نیز روش ساندویچی ایجاد همزیستی میسر نشد. در حالی‌که بهترین روش، سنتز این همزیستی در محیط هیدروپونیک با استفاده از پیت و ورمیکولیت به‌عنوان سوبسترا بود و برقراری همزیستی اکتومیکوریزایی در این روش بر اساس تشکیل ریشه‌های جانبی اکتومیکوریزایی و عدم حضور ریشه‌های مویین مورد تأیید قرار گرفت (شکل ۱). همچنین در نتایج این تحقیق مشخص شد که استفاده از کشت مایع، بصورت قطعات میسلیومی، برای تلقیح قارچ اکتومیکوریز به سیستم سنتز همزیستی بسیار مناسب‌تر از انتقال کشت آگار به اطراف ریشه‌های میزبان است.

شکل ۱- همزیستی میان گیاهچه‌های ***Quercus castaneifolia*** و قارچ اکتومیکوریز ***Hebeloma sinapizans***

بررسی تأثیر همزیستی روی خصوصیات رویشی و فیزیولوژیکی گیاهچه‌های بلندمازو

تحلیل داده‌های مربوط به تأثیر برقراری همزیستی میکوریزایی روی ویژگی‌های رویشی گیاهچه‌های میزبان نشان داد که تلقیح ریشه‌های گیاهچه‌های بلندمازو توسط *H. sinapizans* تأثیر مثبتی روی توسعه و رشد این گیاهچه‌ها در مقایسه با گیاهچه‌های غیرمیکوریزایی داشته است (جدول ۱ و شکل ۲).

جدول ۱– تأثیر قارچ اکتومیکوریز *Hebeloma sinapizans* روی خصوصیات رویشی گیاهچه‌های *Quercus castaneifolia*، ۱۴ هفته پس از تلقیح

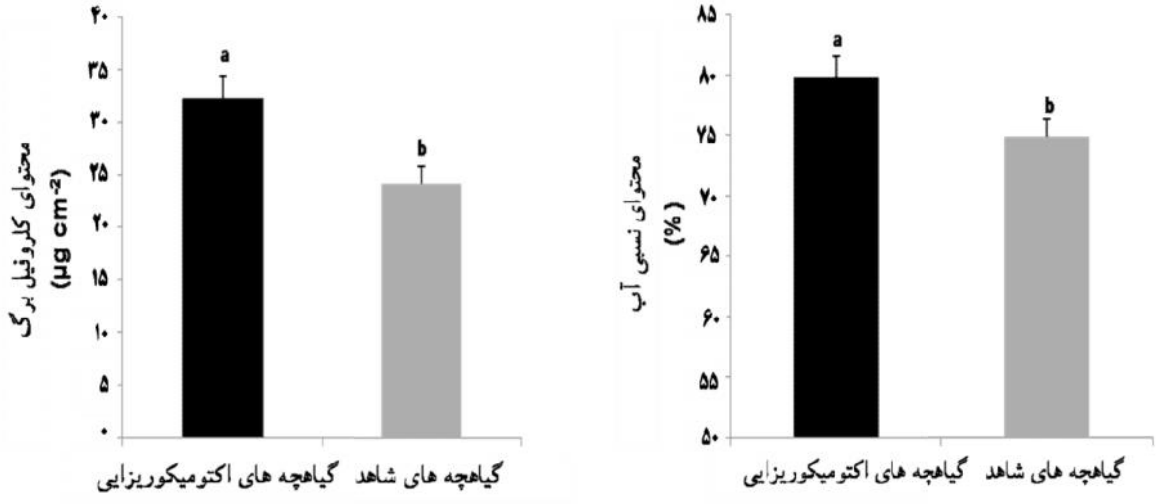
تیمار	تعداد برگ	سطح برگ (cm^2)	بیومس برگ (mg)	ارتفاع ساقه (cm)	بیومس ساقه (mg)
گیاهچه میکوریزایی	۱۳/۳±۲/۳ [a]	۳/۱۲±۰/۳۸ [a]	۲۷/۴۶±۱/۵۲ [a]	۵/۷±۰/۴۱ [a]	۸۷/۴۳±۳/۷۱ [a]
گیاهچه شاهد	۱۱/۶±۲/۰۱ [a]	۱/۹۲±۰/۱۶ [b]	۱۹/۳۶±۲/۲۲ [b]	۵/۰۳±۰/۵۶ [a]	۶۸/۲۶±۲/۰۹ [b]
t value	۰/۶۱۸	۰/۰۴۶	۰/۰۴۰	۰/۳۹۴	۰/۰۱۱

حروف غیرمشابه در هر ستون بیانگر اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون ***t*** می‌باشد. هر داده مشتمل بر میانگین **(±)** انحراف معیار میانگین است. تعداد = ۱۵.

البته سطح برگ و وزن خشک شاخ و برگ گیاهچه‌های بلندمازو تلقیح شده نسبت به گیاهچه‌های شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد. طول ساقه و تعداد برگ نیز در گیاهان میکوریزایی بیشتر از گیاهان غیرمیکوریزایی بود، اگرچه این افزایش میان تیمارها معنی‌دار نشد (جدول ۱).

شکل ۲– گیاهچه‌های *Quercus castaneifolia* شاهد (سمت راست) و تلقیح شده با قارچ اکتومیکوریز *Hebeloma sinapizans* (سمت چپ)، ۱۴ هفته پس از تلقیح

تحلیل داده‌های مربوط به تأثیر برقراری همزیستی میکوریزایی روی فیزیولوژی گیاهچه‌های بلندمازو نشان داد که تیمار میکوریز تأثیر معنی‌داری روی محتوای کلروفیل برگ داشته است، به‌طوری‌که این رنگدانه‌های فتوسنتزی در گیاهچه‌های میکوریزایی نسبت به گیاهچه‌های شاهد بطور معنی‌دار افزایش یافتند (شکل ۳). همچنین پس از جمع‌آوری داده‌های مربوط به میزان نسبی آب گیاهچه‌های تلقیح شده و شاهد مشخص شد که همزیستی میکوریزایی اثر معنی‌داری روی محتوای نسبی آب در گیاهچه‌ها داشته است و میانگین محتوای نسبی آب برگ در گیاهچه‌های تلقیح شده با قارچ میکوریز بطور معنی‌داری بیشتر از گیاهچه‌های غیرمیکوریزایی بود (شکل ۳).



شکل ۳- میزان کلروفیل و محتوای نسبی آب در گیاهچه‌های *Quercus castaneifolia* شاهد و تلقیح شده با قارچ اکتومیکوریز *Hebeloma sinapizans*، ۱۴ هفته پس از تلقیح. حروف غیرمشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار (P=0.05) بر اساس آزمون *t* می‌باشد. تعداد = ۱۵

بحث

تلقیح گیاهچه‌های بلندمازو با قارچ اکتومیکوریز

برقراری همزیستی اکتومیکوریزایی روی گیاهچه‌های بلوط با مشکلات متعددی همراه است و می‌توان گفت بازدهی بسیار پایینی دارد. دلیل اصلی این مسئله، توسعه اندک ریشه‌ها در ریز قلمه‌های بلوط و سرعت پایین رشد این ریشه‌ها در مراحل اولیه استقرار این گیاهچه‌هاست، به‌طوری‌که مشخص شده است در مقایسه با بسیاری از گونه‌های درختی دیگر، گیاهچه‌های بلوط در طی سالهای ابتدایی استقرار خود رشد بسیار کندتری دارند (Johnson *et al.*, 2002). به همین دلیل در این تحقیق روش‌های مختلفی برای برقراری همزیستی اکتومیکوریزایی روی گیاهچه‌های بلوط مورد استفاده قرار گرفت تا بهترین تکنیکی که توسط آن بالاترین میزان کلونیزاسیون ریشه توسط قارچ اکتومیکوریز بدست می‌آید شناسایی و معرفی شود. براساس نتایج بدست آمده، در روش کشت توأم گیاه و قارچ در محیط همزیستی (Oliveira *et al.*, 2003)؛ به دلیل کند رشد بودن ریشه‌های بلوط، قبل از گسترش یافتن ریشه درون محیط، محیط لزج شده و همزیستی مقدور نشد. در روش ساندویچی نیز که طی آن گیاه و قارچ در سیستم پتری‌دیش در تعامل قرار می‌گیرند (Herrmann *et al.*, 1998)، دوباره به دلیل کند رشدی، شاخه‌های بلوط خارج از پتری‌دیش در طول هفته‌های نگهداری

خشکیده شده و ایجاد همزیستی میسر نشد. بنابراین بهترین روش برای سنتز همزیستی اکتومیکوریزایی روی گیاهچه‌های بلوط، استفاده از محیط هیدروپونیکِ حاوی پیت و ورمیکولیت به‌عنوان سوبسترا بود که به برقراری همزیستی اکتومیکوریزایی بر اساس تشکیل ریشه‌های کوتاه اکتومیکوریزایی (یا همان ریشه‌های جانبی که نوعاً کوتاه‌تر و ضخیم‌تر بوده)، حضور هیف‌های سفید، شل و مجعد در اطراف ریشه‌های جانبی *Q. castaneifolia* که از خصوصیات غلاف قارچی جنس *Hebeloma* است و عدم حضور ریشه‌های مویین است منجر شد (Oh *et al.*, 1995; Brundrett *et al.*, 1996; Qu *et al.*, 2003) (شکل ۱). مناسب بودن محیط هیدروپونیک نسبت به محیط‌های آگاردار، برای برقراری همزیستی اکتومیکوریزایی در مطالعات دیگری نیز مشخص و گزارش شده است که این نوع سیستم سنتز همزیستی امکان توسعه طبیعی ریشه‌ها و تشکیل ریشه‌های جانبیِ محل استقرار قارچ اکتومیکوریز را فراهم می‌آورد (Qu *et al.*, 2003; Repac, 2010). ورمیکولیت، پیت و بخصوص ترکیب آنها از مهمترین سوبستراهای مورد استفاده در این سیستم سنتز همزیستی است و برتری آنها در داشتن بازدهی بالاترِ ساخت همزیستی نسبت به دیگر سیستم‌ها مشخص و اثبات شده است (Duponnois & Garbay, 1991). به‌عنوان مثال Martin-Pinto و همکاران (۲۰۰۶) از انتقال گیاهچه‌های کاج سیاه (*Pinus nigra* Arn.) به فلاسک‌های استریل ۴۵ میلی‌لیتری دارای ۳۰ میلی‌لیتر سوبسترا (محیط MMN، پیت و ورمیکولیت) کلونیزه شده توسط قارچ‌های اکتومیکوریز استفاده کرده و بهترین سوبسترا برای سنتز همزیستی را ترکیب پیت-ورمیکولیت معرفی کردند.

بعلاوه در نتایج این تحقیق مشخص شد که برای تلقیح قارچ اکتومیکوریز *H. sinapizans* به سیستم سنتز همزیستی استفاده از کشت مایع (بصورت قطعات میسلیومی) به دلیل کلونیزاسیون سریع و یکنواخت سوبسترای همزیستی توسط قطعات میسلیومی بسیار مناسب‌تر از انتقال کشت آگار به اطراف ریشه‌های میزبان می‌باشد.

بررسی تأثیر همزیستی روی خصوصیات رویشی و فیزیولوژیکی گیاهچه‌های بلندمازو

نتایج این تحقیق نشان داد که تلقیح ریشه‌های بلندمازو توسط قارچ اکتومیکوریز *H. sinapizans* بطور مثبتی روی توسعه و رشد این گیاهچه‌ها تأثیرگذار بوده است (جدول ۱ و شکل ۲). این یافته مطابق با نتایج مطالعات انجام شده روی دیگر گونه‌های گیاهی، ازجمله *Pinus radiata* D. Don (Dunabeitia *et al.*, 2004)، *Pinus halepnsis* Mill. و *Quercus. faginea* Lamk. و *Q. petraea* Liebl. (Dominguez Nunez *et al.*, 2008) و *Quercus suber* L (Sebastiana *et al.*, 2013) است که نشان‌دهنده تأثیرات سودمند کلونیزاسیون اکتومیکوریزایی، شامل افزایش رشد، افزایش قابلیت فتوسنتز و بهبود تغذیه گیاه می‌باشند.

افزایش معنی‌دار سطح برگ و وزن خشک شاخ و برگ گیاهچه‌های بلندمازو تلقیح شده اثبات کننده سودمند بودن قارچ *H. sinapizans* برای رشد این گیاهان بود. اگرچه طول ساقه و تعداد برگ در گیاهان میکوریزایی بیشتر از گیاهان غیرمیکوریزایی بود اما این افزایش میان تیمارها معنی‌دار نشد (جدول ۱). با توجه به یافته‌های دیگر محققان این نتیجه چندان دور از انتظار نیست، زیرا گزارش‌های متعددی وجود دارند که نشان می‌دهند بهبود رشد گیاهان در اثر تلقیح همزیستی اکتومیکوریزایی ممکن است در مراحل آغازین همزیستی به دلیل وجود ذخایر کربنی و عناصر غذایی خود گیاه قابل تشخیص نباشد (Dominguez Nunez *et al.*, 2006, 2008; Southworth *et al.*, 2009; Fini *et al.*, 2011). به‌عنوان مثال، Dominguez Nunez و همکاران (۲۰۰۸) پس از برقرارسازی همزیستی اکتومیکوریزایی *Tuber melanosporum* Vitt. روی گیاهان بلوط *Q. faginea* Lamk. و *Q. petraea* Liebl. و کاج *Pinus halepnsis* Mill. گزارش کردند که تأثیر این همزیستی روی افزایش رشد

گیاهچه‌های بلوط برخلاف کاج در هفته‌های اول معنی‌دار نیست. آنان این پدیده را اینگونه تفسیر کردند که تأثیر بالاتر همزیستی اکتومیکوریزایی روی گیاهچه‌های کاج می‌تواند مربوط به این واقعیت باشد که در مراحل اولیه رشد، گیاهچه‌های کاج نسبت به گیاهچه‌های بلوط دارای ذخیره غذایی کمتری می‌باشند و این مسئله موجب وابستگی غذایی بالاتر آنها به قارچ‌های میکوریز می‌شود. از سوی دیگر افزایش رشد گیاه میزبان تحت همزیستی اکتومیکوریزایی مربوط به افزایش سطح تماس ریشه با خاک توسط توسعه میسلیوم قارچ‌های اکتومیکوریز در نتیجه افزایش تعداد فرم‌های غذایی در دسترس، به‌ویژه نیتروژن و فسفر و افزایش معدنی‌سازی خاک می‌باشد (Chalot & Brun, 1998; Smith & Read, 2008)، درحالی‌که در این تحقیق گیاهچه‌های بلوط در ظروف پلی‌اتیلنی با ظرفیت محدود بودند که از توسعه بیش از حد میسلیوم قارچی و ریشه‌های اکتومیکوریزایی ممانعت می‌کردند، درحالی‌که در شرایط طبیعی این محدودیت‌ها وجود ندارد.

سنجش محتوای کلروفیل برگ، به‌عنوان یک شاخص فیزیولوژیک مهم برای سنجش میزان فتوسنتز (Kumar *et al.*, 2010)، نشان‌دهنده افزایش معنی‌دار این رنگدانه‌های فتوسنتزی در گیاهچه‌های میکوریزایی نسبت به گیاهچه‌های شاهد بود (شکل ۳). بطور مسلم این مسئله موجب جذب فعال‌تر نور و میزان بالاتر فتوسنتز در گیاهچه‌های تلقیح شده می‌گردد؛ که تجلی آن افزایش معنی‌دار سطح برگ و وزن خشک شاخ و برگ اندازه‌گیری شده در این آزمایش‌ها بود (جدول ۱). گزارش‌های دیگری هم دال بر افزایش محتوای کلروفیل و فتوسنتز در گیاهان همزیست با قارچ‌های اکتومیکوریز در مقایسه با گیاهان شاهد وجود دارد (Martins *et al.*, 1996; Martins, 2008; Turgeman *et al.*, 2011) اما اینکه چطور قارچ‌های اکتومیکوریز موجب القای این تغییر در محتوای رنگدانه گیاهان میکوریزایی شده و در نتیجه مزیت اکولوژیکی جذب بالاتر نور را به این گیاهان اعطا می‌کنند، در حال حاضر ناشناخته است (Sebastiana *et al.*, 2013). افزایش محتوای کلروفیل و در نتیجه فعالیت فتوسنتزی در گیاهان تلقیح شده می‌تواند توسط افزایش جذب عناصر غذایی مانند نیتروژن و فسفر در گیاهان میزبان همزیستی (Nutritional Effect Concept) و یا درخواست بالای کربن از جانب قارچ در ریشه‌های کلونیزه شده (Source Sink Concept) توجیه گردد (Martins, 2008). در واقع سودمندی همزیستی اکتومیکوریزایی برای گیاه میزبان زمانی حاصل می‌شود که میان درخواست قارچ برای انرژی و نیاز گیاه برای عناصر غذایی و آب تعادل برقرار گردد. در برخی مطالعات مشاهده شده است که قارچ‌های اکتومیکوریز مورد بررسی موجب کاهش رشد گیاهان میزبان شده‌اند که این مسئله مربوط به عدم تعادل میان ارسال کربن به قارچ و دریافت عناصر غذایی از قارچ می‌باشد. در واقع در این وضعیت ارسال کربن به بافت‌های همزیست زیرزمینی برای رشد قارچ انجام می‌شود؛ درحالی‌که در پاسخ به دلیل نگهداری و ابقای عناصر غذایی در میسلیوم قارچی، افزایشی در فتوسنتز میزبان دیده نمی‌شود (Colpaert *et al.*, 1996; Correa *et al.*, 2006; Baum *et al.*, 2009).

اما در این بررسی مشخص شد که پس از کلونیزاسیون ریشه *Q. castaneifolia* توسط قارچ *H. sinapizans* تعادل میان انتقال کربن و دریافت عناصر غذایی برقرار شده و این همزیستی تنها به منزله دریافت یکطرفه کربن از گیاه میزبان برای قارچ نیست، زیرا افزایش در سطح برگ، وزن خشک شاخ و برگ، تعداد برگ و طول ساقه و نه وقوع کاهش در بیومس شاخ و برگ (یا غلظت کربن و دیگر عناصر) هوایی گیاه در مقایسه با گیاهان کنترل مشاهده شد (جدول ۱). این یافته نشان می‌دهد که افزایش محتوای کلروفیل و در مقابل میزان فتوسنتز در گیاهچه‌های بلوط تلقیح شده، در واقع تنظیمی برای منبع فروبرنده کربن افزایش یافته یا همان قارچ کلونیزه کننده ریشه است که در پاسخ موجب انتقال عناصر غذایی به گیاه می‌گردد و تجلی این افزایش عناصر غذایی در گیاه، بیشتر شدن سطح و بیومس اندام‌های هوایی گیاه می‌باشد. همچنین افزایش محتوای نسبی آب در گیاهچه‌های بلوط (شکل ۳) دلیل دیگری برای اثبات این تعادل میان تعاملات قارچ و گیاه است، در مجموع

این نتایج نشان‌دهنده سازگاری بالا میان گیاه *Q. castaneifolia* و قارچ *H. sinapizans* می‌باشد.

از سوی دیگر، گزارش شده است که تلقیح همزیستی اکتومیکوریزایی روی بلوط *Q. ellipsoidalis* E.J. Hill (Dickie *et al.*, 2007)، *Q. petraea* (Dominguez Nunez *et al.* 2008) و *Q. suber* L. (Sebastiana *et al.*, 2013) موجب افزایش معنی‌دار غلظت نیتروژن در شاخ و برگ در مقایسه با گیاهان غیرمیکوریزایی می‌گردد. با تعمیم‌دهی نتایج این تحقیقات می‌توان چنین استنباط کرد که تلقیح اکتومیکوریزایی گیاهچه‌های بلندمازو در محیط کشتی که نیتروژن در دسترس آن تقلیل یافته موجب بهبود جذب نیتروژن، از طریق افزایش جذب نیتروژن موجود در محیط و نیز در دسترس قرار دادن نیتروژن موجود در ترکیبات آلی پیت (خاک پیت تنها دارای ترکیبات آلی است و ترکیبات نیتروژنی در آن نیز عمدتاً در پیوند با این ترکیبات آلی می‌باشند، بنابراین بسهولت در دسترس گیاه قرار نمی‌گیرند (Sarjala & Potila, 2005)) و افزایش استفاده از نیتروژن جذب شده برای تولید بیومس (احتمالاً به دلیل اختصاص بالاتر نیتروژن به بخش فتوسنتزی گیاه می‌باشد) در مقایسه با گیاهچه‌های رشد یافته بصورت منفرد در محیط مشابه می‌گردد (شکل ۲). بعلاوه، این تغذیه کافی موجب افزایش کارآیی و بازدهی دستگاه فتوسنتزی می‌شود که در بازگشت در صورت ثابت ماندن میزان تعرق، بازدهی استفاده از آب (Water Use Efficiency) افزایش خواهد یافت (Lehto & Zwiazek 2011; Sebastiana *et al.*, 2013) و همین پدیده احتمالاً موجب افزایش معنی‌دار محتوای نسبی آب در گیاهچه‌های اکتومیکوریزایی بلندمازو در این تحقیق شده است (شکل ۳).

در مجموع، نتایج این آزمایش‌ها نشان می‌دهد که قارچ *H. sinapizans* گزینه مناسبی برای تشکیل همزیستی اکتومیکوریزایی سازگار با خصوصیات اکولوژیکی زیستگاه بلندمازو (یعنی جنگل‌های معتدله هیرکانی) و در دسترس قرار دادن عناصر غذایی به‌ویژه نیتروژن از خاک آلی این جنگل‌ها می‌باشد. بعلاوه ازآنجاکه گونه‌های جنس *Hebeloma* قادر به بهبودبخشی قابلیت جذب عناصر غذایی و عملکرد بهتر میزبان بوده و همزیستی میکوریزایی را با طیف وسیعی از درختان بازدانه و نهان‌دانه ازجمله *Salix*، *Fagus*، *Alnus*، *Betula*، *Populus* و *Pinus* تشکیل می‌دهند (Molina *et al.*, 1992; Marmeisse *et al.*, 1999; Müller *et al.*, 2007; Beker *et al.*, 2010) و نیز عمدتاً این گونه‌ها دارای گسترش جهانی و ساکن زیستگاه‌های گوناگون هستند (Vesterholt, 2005; Nuutinen *et al.*, 2012)، از این‌رو تولید نهال‌های سازگار و همزیست با این قارچ‌های اکتومیکوریز، راهبرد امیدبخشی برای به حداقل رساندن شوک ابتدایی و در نتیجه خشکیدگی نهال‌های بکار گرفته شده در احیای جنگل‌ها (به دلیل شوک و تنش کاشت) بوده، بنابراین موجب تضمین رشد و بقای گیاه در سال اول کاشت (که کلیدی‌ترین و مهمترین سال می‌باشد) و بهبود وضعیت فیزیولوژیکی میزبان در طی جنگل‌کاریها و احیای مناطق آسیب دیده می‌گردد.

سپاسگزاری

این تحقیق در گروه مستقل تحقیقات زیست‌فناوری منابع طبیعی مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور انجام شد؛ از این‌رو از مسئولان محترم مؤسسه و گروه مذکور که در این پژوهش ما را یاری کردند، سپاسگزاریم.

منابع مورد استفاده

- Allen C.D., Macalady, A.K., Chenchouni, H., Bachelet, D., McDowell, N., Vennetier, M., Kizberger, T., Rigling, A., Breshears, D.D., Hogg, E.H., Gonzalez, P., Fensham, R., Zhang, Z., Castro, J., Demidova, N., Lim J.H., Allard, G., Running, S.W., Semerci, A. and Cobb, N. 2010. A global overview of drought and heat-induced tree mortality reveals emerging climate change risks for forests. Forest Ecology and Management 259: 660–684.
- Baum, C., Toljander, Y.K., Eckhardt, K.U., Weih, M. 2009. The significance of host-fungus combinations in ectomycorrhizal symbioses for the chemical quality of willow foliage. Plant and Soil, 323: 213–224..

- Beker HJ, Eberhardt U, Vesterholt J. 2010. *Hebeloma hiemale* Bres. in artic/alpine habitats. North American Fungi, 5: 51-65. .
- Brundrett, M., Bougher, N., Dell, B., Grove, T. and Malajczuk, N. 1996. Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra. 374 p.
- Catsky J. 1960. Determination of water deficit in discs cut out from leaf blades. Plant Biology 2,76–77.
- Chalot, M. and Brun, A. 1998. Physiology of organic nitrogen acquisition by ectomycorrhizal fungi and ectomycorrhizas. FEMS Microbiology Reviews 22: 21–44.
- Colpaert, J.V., Van Laere and A., Van Assche J.A. 1996. Carbon and nitrogen allocation in ectomycorrhizal and non-mycorrhizal *Pinus sylvestris* L. seedlings. Tree Physiology 16: 787–793.
- Correa, A., Strasser, R. and Martins-Loucao, M. 2006. Are mycorrhiza always beneficial? Plant Soil 279: 65-73.
- Dickie, I.A., Montgomery, R.A., Reich, P.B. and Schnitzer, SA. 2007. Physiological and phenological responses of oak seedlings to oak forest soil in the absence of trees. Tree Physiology 27: 133–140.
- Dominguez Nunez, J.A., Gonzalez, R.P., Rodriguez, Barreal, J.A. and de Omenaca Gonzalez, J.A.S. 2008. The effect of *Tuber melanosporum* Vitt. mycorrhization on growth, nutrition, and water relations of *Quercus petraea* Liebl., *Quercus faginea* Lamk. and *Pinus halepensis* Mill. seedlings. New Forests 35 (2): 159-171.
- Dominguez Nunez, J.A., Selva Serrano, J., Rodriguez, Barreal, J.A. and de Omenaca Gonzalez, J.A.S.
2006. The influence of mycorrhization with *Tuber melanosporum* in the afforestation of a Mediterranean site with *Quercus ilex* and *Quercus faginea*. Forest Ecology and Management, 231: 226–233.
- Dunabeitia, M.K., Hormilla, S., Garcia-Plazaola, J.I., Txarterina, K., Arteche, U. and Becerril, J.M. 2004. Differential responses of three fungal species to environmental factors and their role in the mycorrhization of *Pinus radiata* D. Don. Mycorrhiza, 14: 11–18.
- Duponnois, R. and Garbaye J. 1991. Techniques for controlled synthesis of Douglas-fir–*Laccaria laccata* ectomycorrhizal symbiosis. Annals of Forest Science, 48: 641–650.
- Fini, A., Frangi, P., Amoroso, G., Piatti, R., Faoro, M., Bellasio, C. and Ferrini, F. 2011. Effect of controlled inoculation with specific mycorrhizal fungi from the urban environment on growth and physiology of containerized shade tree species growing under different water regimes. Mycorrhiza, 21: 703–719.
- Herrmann, S., Munch, J.C. and Buscot, F. 1998. A gnotobiotic culture system with oak microcutiings to study specific effects of mycobionts on plant morphology before, and in the early phase of, ectomycorrhiza formation by *Paxillus involutus* and *Piloderma croceum*. New Phytologist, 138: 203–212.
- Johnson, P.S., Shifley, S.R. and Rogers, R. 2002. The ecology and silviculture of oaks. CABI Publishing, New York, NY, 503 p.
- Kumar, A., Sharma, S. and Mishra, S. 2010. Influence of AM fungi and salinity on seedling growth, solute accumulation and mycorrhizal dependency of *Jatropha curcas* L. Plant Growth Regulation, 29: 297-306.
- Lehto, T. and Zwiazek, J.J. 2011. Ectomycorrhizas and water relations of trees: a review. Mycorrhiza, 2: 71–90.
- Marmeisse, R., Gryta, H., Jargeat, P., Fraissinet-Tachet, L., Gay, G.. and Debaud, J.C. 1999. *Hebeloma*. In: Cairney JWG, Chambers SM. (Eds.). Ectomycorrhizal fungi: key genera in profile. Berlin, Springer-Verlag. pp. 89-127.
- Martin-Pinto, P., Pajares, J. and Diez, J. 2006. *In vitro* effects of four ectomycorrhizal fungi, *Boletus edulis*, *Rhizopogon roseolus*, *Laccaria laccata* and *Lactarius deliciosus* on *Fusarium* damping off in *Pinus nigra* seedlings. New Forests, 32: 323–334.
- Martins, A., Barroso, J. and Pais, M.S. 1996. Effect of ectomycorrhizal fungi on survival and growth of micropropagated plants and seedlings of *Castanea sativa* Mill. Mycorrhiza, 6: 265–270.
- Martins, A. 2008. *In vitro* Mycorrhization of Micropropagated Plants: Studies on *Castanea sativa* Mill. Siddiqui Z.A., Akhtar M.S. and Futai K. (Eds.). Mycorrhizae: Sustainable Agriculture and Forestry. Springer, Dordrecht, The Netherlands. pp. 319-334.
- Marx, D.H. 1969. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. Phytopathology, 59:153–163.
- Molina R, Massicotte H and Trappe JM. 1992. Specificity phenomena in mycorrhizal symbioses: community-ecological consequences and practical implications. In: Allen MF. (Ed.). Mycorrhizal functioning. London, UK, Chapman & Hall. pp. 357–423.
- Müller, T., Avolio, M., Olivi, M., Benjdia, M., Rikirsch, E., Kasaras, A., Fitz, M., Chalot, M. and

and the growth of Scots pine seedlings in natural peat. Plant and Soil, 269 (2): 171-180.
- Schar, C., Vidale, P.L., Luthi, D., Frei, C., Haberli, C., Mark, A., Liniger, M.A. and Appenzeller, C. 2004. The role of increasing temperature variability in European summer heat waves. Nature, 427: 332–336.
- Sebastiana, M., Pereira, V.T., Alcantara, A., Pais, M.S. and Silva, A.B. 2013. Ectomycorrhizal inoculation with *Pisolithus tinctorius* increases the performance of *Quercus suber* L. (cork oak) nursery and field seedlings. New Forests, 44: 937-949.
- Smith, S.E. and Read, D.J. 2008. Mycorrhizal Symbiosis, third ed. Academic Press, San Diego,CA. 787 p.
- Southworth, D., Carrington, E.M., Frank, J.L., Gould, P., Harrington, C.A. and Devine, W.D. 2009. Mycorrhizas on nursery and field seedlings of *Quercus garryana*. Mycorrhiza, 19: 149–158.
- Turgeman, T., Asher, J.B., Roth-Bejerano, N., Kagan-Zur, V., Kapulnik, Y. and Sitrit, Y. 2011. Mycorrhizal association between the desert truffle *Terfezia boudieri* and *Helianthemum sessiliflorum* alters plant physiology and fitness to arid conditions. Mycorrhiza, 21: 623–630.
- Vesterholt, J. 2005. The genus *Hebeloma*. Fungi of Northern Europe, vol. 3. Copenhagen, Denmark: Danish Mycological Society. 146 p.
- Zamani, S.M., Emam, M., Mohammadi Goltapeh, E., Safaei, N., Ghamari Zare, A. and Farsi, M.J. 2012. *In vitro* propagation of *Quercus castaneifolia*. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 20 (40): 240-252.
Wipf, D. 2007. Nitrogen transport in the ectomycorrhiza association: The *Hebeloma cylindrosporum–Pinus pinaster* model. Phytochemistry, 68 (1): 41-51.
- Nuutinen, J., Marttinen, E., Soliymani, R., Hilden, K. and Timonen, S. 2012. L-amino acid oxidase of the fungus *Hebeloma cylindrosporum* displays substrate preference towards glutamate. Microbiology, 158, 272-283.
- Oh, K.I., Melville, L.H., Peterson, R.L. 1995. Comparative structural study of *Quercus serrata* and *Q. acutissima* formed by *Pisolithus tinctorius* and *Hebeloma cylindrosporum*. Trees, 9 (3): 171-179.
- Oliveira, P., Barriga, J., Cavaleiro, C., Peixe, A. and Potes, A.Z. 2003. Sustained *in vitro* root development obtained in *Pinus pinea* inoculated with ectomycorrhizal fungi. Forestry, 76: 579-587.
- Parhizkar, P., Ali Ahmad Korori, S. and Moraghebi, F. 2002. Peroxidase enzyme in order to lookoing for resistance individuals. Pajouhesh and Sazandegi Journal, 56: 44-47.
- Qu, L., Quoreshi, A.M., Iwase, K., Tamai, Y., Funada, R. and Koike, T. 2003. *In vitro* ectomycorrhiza formation on two larch species of seedling with six different fungal species. Eurasian Journal of Forest Research, 6(1): 65-73.
- Repac, I. 2010. Ectomycorrhizal inoculum and inoculation techniques. In: Rai R, Varma A. (Eds.) Diversity and biotechnology of ectomycorrhizae. Soil biology series. Springer, Berlin, pp 43-63.
- Sabeti, H. 1976. Forests, trees and shrubs of Iran. Publication of Ministry of Agricultural and Natural Resources of Iran, Tehran, 876 p.
- Sarjala, T. and Potila, H. 2005. Effect of ectomycorrhizal fungi on nitrogen mineralisation