

شناسایی و تلقیح دو گونه قارچ میکوریز همزیست تادار (*Celtis caucasica* L.) در شرایط گلخانه‌ای

طوبی سپهوند^{۱*}، وحید اعتماد^۲، محمد متینی‌زاده^۳، انوشیروان شیروانی^۲ و قوام‌الدین زاهدی امیری^۴

*- نویسنده مسئول، دانشجوی دکتری، گروه جنگل‌داری و اقتصاد جنگل، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

پست الکترونیک: t.sepahvand@ut.ac.ir

۲- دانشیار، گروه جنگل‌داری و اقتصاد جنگل، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

۳- دانشیار، مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

۴- استاد، گروه جنگل‌داری و اقتصاد جنگل، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۵/۲۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۷/۲۹

چکیده

با توجه به ضرورت جنگل‌کاری در جنگل‌های زاگرس با گونه‌های بومی و استفاده از قارچ‌های میکوریزی همزیست بومی هر گونه، پژوهشی با موضوع تولید نهال‌های میکوریزی تلقیح‌شده با قارچ‌های همزیست درخت تادار (*Celtis caucasica* L.) انجام شد. نمونه‌های بذر و خاک ریزوسفر تادار از رویشگاه چهارطاق اردل در استان چهارمحال و بختیاری تهیه شدند. در آزمایشگاه مشخص شد که دو گونه قارچ میکوریز *Funneliformis geosporum* و *Claroideoglomus etunicatum* فراوانی مناسبی در خاک ناحیه ریزوسفر داشتند. پس از جداسازی اسپورها با استفاده از ال‌ک مرطوب و براساس صفاتی مانند اندازه و رنگ اسپور، ریشه متصل به اسپور و لایه‌های دیواره سلولی اسپور، قارچ‌ها به‌کمک میکروسکوپ نوری و استریومیکروسکوپ شناسایی شدند و برای اولین بار از ریزوسفر درخت تادار در ایران گزارش شدند. سپس، اسپور این دو گونه قارچ میکوریزی با گیاه ذرت در گلخانه به‌صورت گلدانی تکثیر شد. پس از انبوه‌سازی، اسپورها با بذر تادار به‌صورت تیمارهای جداگانه و تیمار ترکیبی دو گونه تلقیح شدند. پس از رشد نهال‌ها به‌مدت شش ماه، صفات رویشی و کلنیزاسیون ریشه تادار بررسی شد. نتایج نشان داد که قارچ‌های میکوریزی بر تمامی صفات ریخت‌شناسی نهال‌ها، اثری مثبت و معنی‌دار داشتند. در اغلب صفات اندازه‌گیری‌شده، بیشترین اثر مربوط به تیمار ترکیب دو قارچ بود. به‌طور کلی در این پژوهش، مقدار شاخص‌های رویشی نهال‌های میکوریزی نسبت به نهال‌های شاهد بیشتر بود، بنابراین می‌توان گفت استفاده از نهال‌های میکوریزی راهکاری مناسب و مقرون‌به‌صرفه برای افزایش شانس موفقیت در جنگل‌کاری‌ها و نیز احیاء مناطق تخریب‌شده است.

واژه‌های کلیدی: اردل، صفات ریخت‌شناسی، قارچ میکوریز آربوسکولار، همزیستی.

مقدمه

احداث و احیای جنگل در مناطق تخریب‌شده ازجمله مسائل مهم در مدیریت پایدار منابع طبیعی محسوب می‌شود (Lamb et al., 2005). در این مناطق، تخریب خاک همگام با تخریب پوشش گیاهی اتفاق می‌افتد که در نتیجه آن، فقر

عناصر غذایی و شرایط نامساعد خرداقلیم باعث محدودیت در استقرار و تجدید حیات طبیعی عناصر رویشی موجود می‌شود (Macedo et al., 2008). به‌منظور مقابله با این مشکلات، راهکارهایی لازم است تا توانایی درختان و نهال‌ها در برابر تنش‌های محیطی از طریق بهبود جذب آب

نتایج پژوهش Mirzaei و همکاران (۲۰۱۱) نشان داد که *Glomus fasciculatum* در رویشگاه‌های ایلام بیشترین همزیستی را با خنجوک دارد. Danielsen و Polle (۲۰۱۴) گزارش کردند که تلقیح نهال‌های صنوبر (*Populus × canescens*) تحت تنش خشکی با اکتومیکوریزا (*Paxillus involutus*) باعث افزایش هدایت روزنه‌ای در نهال‌های میکوریزی و نیز کاهش مرگ‌ومیر ریشه در این نهال‌ها در مقایسه با نهال‌های شاهد می‌شود. Caravaca و همکاران (۲۰۰۳) اثر قارچ میکوریزی *Glomus claroideum* را بر استقرار نهال‌های *Olea europaea subsp. sylvestris* L.، *Retama sphaerocarpa* L.، *Pistacia lentiscus* L. و *Rhamnus lycioides* L. در مناطق نیمه‌خشک مدیترانه‌ای بررسی کردند که نتایج آن‌ها حاکی از آن بود که مقدار زی‌توده در نهال‌های همزیست با میکوریز نسبت به نهال‌های شاهد افزایش معنی‌داری دارد. در ایران، پژوهش‌هایی برای شناسایی قارچ‌های همزیست با درختان و درختچه‌های جنگلی انجام شده است (Ali Ahmad, 2011; Korouri et al., 2002; Mirzaei et al., 2011) اما تاکنون در مورد شناسایی قارچ‌های میکوریزی همزیست با تادار و ارزیابی امکان تولید نهال میکوریزی از طریق آن‌ها گزارشی ارائه نشده است. از این‌رو، با توجه به اثرات مفید قارچ‌های همزیست ریشه و شرایط کنونی بوم‌سازگان زاگرس و نیز استفاده از گونه‌های بومی متحمل برای احیا، پژوهشی به‌منظور شناسایی قارچ‌های بومی همزیست با درخت تادار و استفاده از آن‌ها برای تولید نهال‌های میکوریزی تحت شرایط گلخانه‌ای اجرا شد. سپس، مقدار کلنیزاسیون ریشه و اثر آن بر صفات رویشی نهال‌ها ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری بذر

به‌منظور تولید نهال میکوریزی تادار، بذرها و نمونه‌های خاک ریزوسفر از پنج پایه درخت مادری تادار (با قطر متوسط ۲۰ سانتی‌متر) در رویشگاه چهارطاق اردل از توابع شهرکرد جمع‌آوری شد. این منطقه با عرض جغرافیایی

و مواد غذایی افزایش یابد (de-Bashan et al., 2012). ازجمله این راهکارها، استفاده از گونه‌های بومی هر منطقه است که می‌تواند موفقیت جنگل‌کاری‌ها را افزایش دهد (Urgiles et al., 2009). درخت تادار (*Celtis caucasica* L.) گونه‌ای بپهن‌برگ متعلق به خانواده *Celtidaceae* است. این گونه در مقایسه با بسیاری از گونه‌های جنگلی مورد استفاده در جنگل‌کاری‌ها، رشد قابل ملاحظه‌ای دارد و می‌تواند برای بازسازی مناطق تخریب‌یافته استفاده شود (Sattarian, 2006). تادار از مهم‌ترین گونه‌ها برای جنگل‌کاری در مناطق خشک و نیمه‌خشک به‌حساب می‌آید. این گونه به بافت خاک حساسیت ندارد و در انواع خاک‌ها مستقر می‌شود. تادار به‌دلیل حفاظت خاک و سازگاری زیاد در برابر خشکی برای جنگل‌کاری حائز اهمیت است. همچنین T این گونه به‌علت داشتن چوب ریزبافت، اهمیت اقتصادی در صنایع چوب دارد (Keneshloo et al., 2016).

احیاء مناطق خشک و تخریب‌شده با گونه‌های بومی به‌همراه تلقیح با قارچ‌های میکوریزی، به‌دلیل سازگاری و تنوع زیستی بیشتر یکی از راهکارهای مناسب برای اصلاح پوشش گیاهی این مناطق محسوب می‌شود (Benhiba et al., 2015). قارچ‌های میکوریزی باعث افزایش سطح جذب آب و عناصر غذایی به‌ویژه فسفر و نیتروژن در گیاه میزبان می‌شوند. در مقابل، گیاه نیز کربن و انرژی مورد نیاز قارچ‌ها را در اختیار آن‌ها قرار می‌دهد (Holste & Kobe, 2017). همچنین، این قارچ‌ها می‌توانند توانایی گیاهان میزبان را در مقابله با تنش‌های مهمی ازجمله خشکی، شوری، درجه حرارت زیاد و عناصر سنگین افزایش دهند که این مسئله به‌دلیل تأثیر مستقیم و غیرمستقیم آن‌ها در فرآیندهای فیزیولوژیک گیاهان است (Ormeño et al., 2016). قارچ‌های میکوریزی با شبکه میسلیومی گسترده خود، مواد مغذی و آب را برای گیاه تأمین می‌کنند، به‌طوری‌که افزایش شاخص‌های رشدی گیاه و محتوای نسبی آب در گیاهان تلقیح‌شده با قارچ میکوریزی مشاهده شده است (Ortiz et al., 2015).

الکل (PVLG) و پلی‌وینیل الکل با ملتزر (PVLG_Meltzer) تهیه شد. پس از جهت‌دهی و مستقر کردن مناسب اسپورها در جایگاه خود، لاملی با زاویه ۴۵ درجه روی آن گذاشته شد. سپس، کمی فشار بر لامل وارد شد تا اسپورها به آرامی بشکنند. این کار به دلیل بررسی دقیق تر لایه‌های مختلف دیواره‌های هاگ‌ها انجام می‌شود، زیرا برخی لایه‌ها به معرف ملتزر واکنش نشان می‌دهند و رنگشان عوض می‌شود. اساس شناسایی قارچ‌های میکوریزی از طریق ویژگی‌های ریخت‌شناسی مثل وجود یا عدم وجود اسپوروکارب، ابعاد، رنگ، شکل و طرح روی اسپور و تعداد لایه‌های دیواره اسپور بود (Schenck & Pérez, 1990). سپس، شناسایی با استفاده از کلیدهای مختلف شناسایی موجود در وبگاه‌های <http://invam.caf.wvu.edu> (INVAM, 2018) و <http://www.zor.zut.edu.pl> انجام شد.

تکثیر قارچ‌های میکوریزی

به منظور تکثیر دو گونه قارچ شناسایی شده، ۱۰۰ عدد اسپور از هر گونه در گلدان‌های حاوی خاک استریل شده با بذر ذرت (*Zea mays L.*) در فصل پاییز ۱۳۹۳ تلقیح شدند و به مدت چهار ماه گلدان‌ها در حد ظرفیت زراعی آبیاری شدند. سپس به منظور اسپورزایی بیشتر، گلدان‌ها به مدت دو ماه تحت تنش خشکی (بدون آبیاری) قرار گرفتند. در این بازه زمانی، هم‌زمان بذره‌های تادار با آب ژاول ۱۰ درصد، استریل شدند. سپس در ماسه استریل شده به مدت سه ماه تحت تیمار سرما قرار گرفتند. به منظور آلوده کردن بذره‌های تادار با قارچ‌های مورد نظر، حدود ۱۰۰ گرم مایه تلقیح از خاک ریزوسفر ذرت (حاوی حدود ۲۰۰ عدد اسپور و اندام‌های مختلف قارچ از هر دو گونه) در اطراف بذرها قرار داده شد. همچنین، مخلوطی از دو گونه قارچ (F&C) نیز به عنوان یک تیمار با بذر تادار تلقیح شدند. مشخصات خاک مورد استفاده در این پژوهش، رس ۲۲ درصد، سیلت ۳۷/۱۲ درصد، شن ۴۰/۸۸ درصد و pH برابر با ۸/۲۲ بود.

۵۰° ۵۱' ۳۳" شمالی، طول جغرافیایی ۳۱° ۴۹' ۲۹" شرقی و ارتفاع ۲۴۰۰ متر از سطح دریا در شهرستان اردل قرار دارد. میانگین بارش سالانه منطقه معادل ۵۳۰ میلی‌متر، کمینه دمای مطلق ۱۹/۵- و بیشینه آن ۳۵ درجه سانتیگراد است (Anonymous, 2013).

آزمایش گلخانه‌ای و جداسازی اسپور

پژوهش پیش‌رو در گلخانه تحقیقات میکوریز آریسکولار مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور با میانگین دما و رطوبت روزانه به ترتیب $21/4 \pm 3/7$ درجه سانتیگراد و $34/44 \pm 10/1$ درصد و میانگین دما و رطوبت شبانه به ترتیب $17/23 \pm 2/1$ درجه سانتیگراد و $45/27 \pm 9/79$ استفاده از روش الک مرطوب انجام شد (Gerdemann & Nicolson, 1968). برای این منظور، نمونه خاک در یک بشر ۵۰۰ میلی‌لیتری با ۲۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر سوسپانسیون شد و پس از یک دقیقه هم‌زدن در همزن برقی با دور زیاد، از الک‌هایی با قطر منافذ به ترتیب ۴۰۰ و ۴۵ میکرومتر عبور داده شد. محتویات سطح الک ۴۵ میکرومتری به طور مساوی در دو لوله سانتیفریژ ریخته شدند و به مدت پنج دقیقه با ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتیفریژ شدند. مایع رویی حاوی اسپورها روی یک کاغذ صافی شطرنجی جمع‌آوری شد و در زیر باینوکولار با درشت‌نمایی ۳۰ برابر با سوزن مخصوص جداسازی شدند.

شناسایی قارچ‌های میکوریزی

بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی، دو گونه قارچ میکوریز آریسکولار شامل *Funneliformis geosporum* و *Claroideoglossum etunicatum* که فراوانی بیشتری در خاک ناحیه ریزوسفر تادار داشتند، جداسازی شدند. اسپور این دو گونه قارچ میکوریزی در ریزوسفر تادار به صورت غالب وجود داشتند. به دلیل فراوانی مناسب، دو گونه مذکور انتخاب و پس از شناسایی، تکثیر شدند. بر اساس شیوه‌نامه Schenck و Pérez (۱۹۹۰)، اسلاید اسپورها با پلی‌وینیل

تیمارهای آزمایشی

دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده شد.

این پژوهش در فروردین ۱۳۹۴ با چهار تیمار شامل نهال‌های تلقیح‌شده با *F. geosporum* و *C. etunicatum*، ترکیب این دو گونه (F&C) و نهال شاهد (بدون تلقیح میکوریزی) در ۱۰ تکرار و در گلدان‌های پلاستیکی انجام شد. تا زمان استقرار کامل نهال‌ها، به مدت شش ماه، گلدان‌ها تحت آبیاری در حد ظرفیت زراعی قرار گرفتند. سپس، از نظر صفات رویشی، وزن تر و خشک برگ، وزن تر و خشک ساقه، وزن تر و خشک ریشه، ارتفاع، قطر طوقه، سطح برگ، تعداد برگ، قطر ریشه، طول ریشه و تعداد ریشه‌های فرعی در پاییز ۱۳۹۴ بررسی شدند.

اندازه‌گیری درصد کلنیزاسیون ریشه

برای اندازه‌گیری درصد کلنیزاسیون ریشه، پس از انتقال ریشه‌ها به آزمایشگاه شسته شدند. سپس، ریشه‌های نازک و مناسب رنگ‌آمیزی جدا شدند و در محلول تثبیت‌کننده (FAA) نگهداری شدند. برای رنگ‌آمیزی ریشه‌ها، ابتدا ریشه‌ها با آب مقطر شسته شدند. سپس رنگ‌آمیزی به روش Phillips و Hayman (۱۹۷۰) انجام شد. در ادامه، برای بررسی ساختارهای میکوریزی در ریشه‌ها و تعیین درصد کلنیزاسیون براساس روش خطوط متقاطع، از میکروسکوپ با بزرگ‌نمایی ۱۰، ۴۰ و ۱۰۰ براساس رابطه ۱ استفاده شد (Brundrett et al., 1996).

رابطه (۱)

درصد کلنیزاسیون = (تعداد قطعات میکوریزی شده / تعداد کل قطعات مشاهده‌شده) × ۱۰۰

تجزیه و تحلیل داده‌ها

به منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها، ابتدا توسط آزمون‌های کولموگروف-سمیرنوف و لون، نرمال بودن و همگنی واریانس داده‌ها بررسی شد. برای مقایسه میانگین‌ها از طرح کامل تصادفی با نرم‌افزار آماری SAS ver. 9.2 و از آزمون

نتایج

شناسایی قارچ‌های میکوریزی

قارچ میکوریزی *F. geosporum*

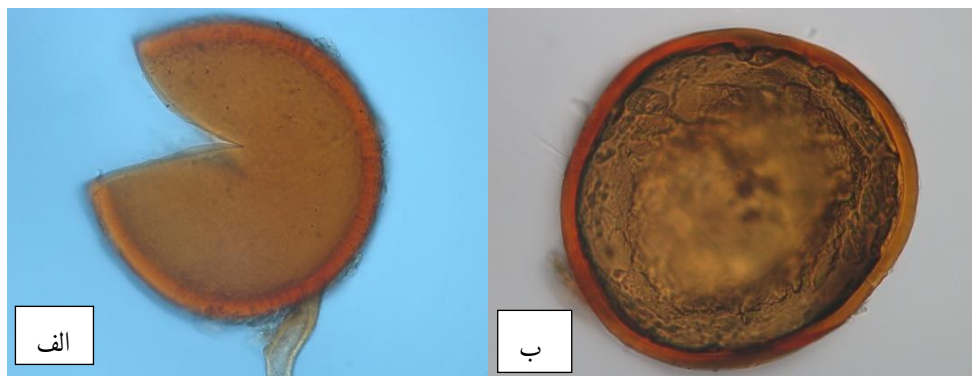
اسپورهای قارچ مذکور به شکل کروی تا نیمه‌کروی بودند و تا ۲۴۰ میکرومتر قطر داشتند. همچنین، این اسپورها به رنگ زرد قهوه‌ای بودند و سه لایه داشتند که در مجموع ضخامت آن‌ها هشت تا ۱۶ میکرومتر بود (شکل ۱-الف). دیواره اول با معرف ملتزر واکنش نداد، یک تا سه میکرومتر ضخامت داشت، شفاف بود و پس از تجزیه به حالت دانه‌دانه درآمد. لایه دوم ورقه‌ای، زرد قهوه‌ای تا نارنجی قهوه‌ای بود که رنگ آن به تدریج از بیرون به داخل تیره‌تر می‌شد و تا ۱۰ میکرومتر ضخامت داشت. لایه سوم با ضخامت یک تا سه میکرومتر، به نسبت سخت بود که به رنگ تیره‌تری نسبت به لایه‌های بیرونی مشاهده شد و به فضای داخل ریشه متصل‌کننده می‌شد تا یک سپتوم پایدار ایجاد کند. ریشه متصل، صاف تا کمی خمیده بود، ۱۶ تا ۳۲ میکرومتر ضخامت داشت و کمی در بیرون به حالت متسع درمی‌آمد. همچنین، این ریشه دو لایه بود که لایه خارجی در امتداد لایه خارجی اسپور بود.

قارچ میکوریزی *C. etunicatum*

اسپورهای این قارچ، کروی تا نیمه‌کروی، نارنجی تا قهوه‌ای قرمز بودند و قطر ۶۰ تا ۸۰ میکرومتر داشتند. دیواره اسپور از دو لایه تشکیل می‌شد. لایه اول هم در دیواره اسپور و هم در دیواره ریشه متصل، ژله‌ای (تا حدی قابل انعطاف) بود و به رنگ صورتی تا قرمز ارغوانی در معرف ملتزر درمی‌آمد. این لایه در اسپورهای جوان تا سه میکرومتر قطر داشت (شکل ۱-ب). لایه مذکور در اسپورهای مسن‌تر به شکل تجزیه‌شده و دانه‌دانه دیده شد. لایه دوم ورقه‌ای با سطحی صاف و به رنگ نارنجی قهوه‌ای تا قرمز قهوه‌ای بود و تا پنج

اسپور توسط سپتومی که از داخلی‌ترین زیرلایه دیواره اسپور تشکیل شده بود، به وجود می‌آمد. ریشه متصل توسط سپتومی منحنی‌شکل در فاصله صفر تا ۳۰ میکرومتری از اسپور بسته می‌شد.

میکرومتر ضخامت داشت. ریشه متصل، صاف تا خمیده و استوانه‌ای تا کمی دهانه‌گشاد بود و در محل اتصال به اسپور تا ده میکرومتر قطر داشت. دیواره ریشه متصل از دو لایه که در امتداد با لایه‌های دیواره اسپور بود، ساخته شده بود. روزن

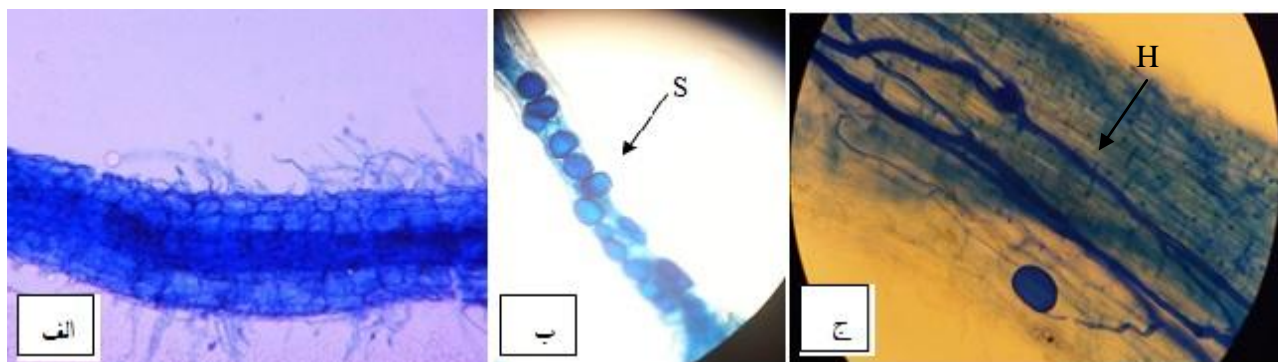


شکل ۱- اسپور قارچ‌های همزیست با درخت تادار، الف) *Funneliformis geosporum* (ب) *Claroideoglo mus etunicatum*

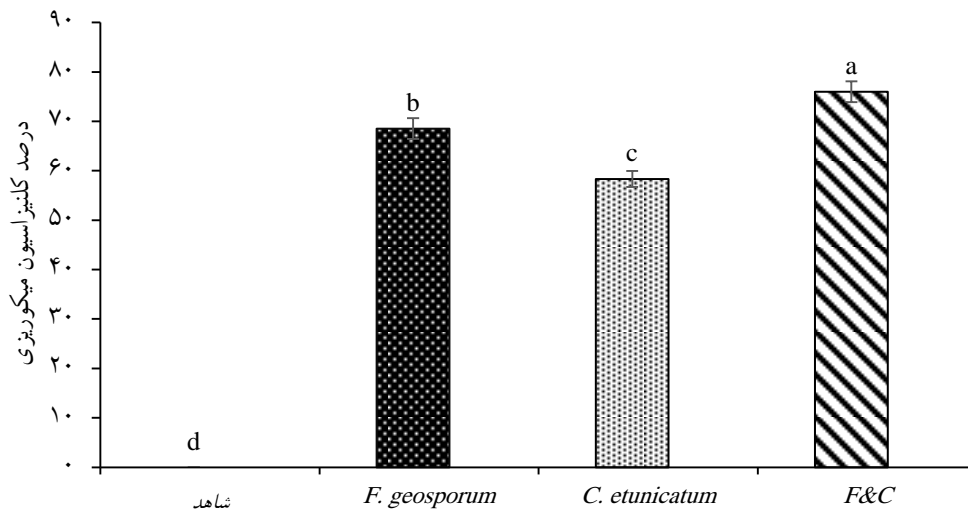
(شکل‌های ۲- ب و ج). بیشترین درصد کلنیزاسیون (۷۶ درصد) مربوط به تیمار ترکیب دو قارچ *F. geosporum* و *C. etunicatum* (F&C) بود. مقدار کلنیزاسیون ریشه نهال‌های تلقیح‌شده با *F. geosporum* و *C. etunicatum* به ترتیب ۶۸/۵۳ و ۵۸/۳۳ درصد بود (شکل ۳).

درصد کلنیزاسیون ریشه

براساس نتایج رنگ‌آمیزی ریشه، هیچ اثری از ساختارهای میکوریزی مانند میسیلیوم، هیف، اسپور، آربوسکول و وزیکول در ریشه نهال‌های شاهد مشاهده نشد (شکل ۲- الف)، اما تیمارهای مختلف میکوریزی، نرخ همزیستی متفاوتی را در ریشه نهال تادار نشان دادند



شکل ۲- کلنیزاسیون میکوریزی ریشه نهال تادار، الف) ریشه نهال شاهد بدون اندام‌های قارچی، ب) اسپور قارچ‌های میکوریزی درون ریشه نهال تادار، ج) هیف قارچ‌های میکوریزی درون ریشه نهال تادار



شکل ۳- درصد کلنیزاسیون میکوریزی ریشه نهال تادار تلقیح شده با *F. geosporum*، *C. etunicatum*

و ترکیب دو قارچ (F&C) در مقایسه با شاهد

نهال‌های تلقیح شده با *F. geosporum* و *C. etunicatum* و ترکیب آن‌ها تفاوتی معنی‌دار مشاهده نشد (جدول ۱). در بیشتر صفات، تأثیر ترکیبی دو قارچ مذکور به مراتب بیشتر از تلقیح آن‌ها به صورت منفرد بود، اما این تفاوت معنی‌دار نبود.

صفات رویشی اندام هوایی تلقیح میکوریزی با قارچ‌های *F. geosporum* و *C. etunicatum* و ترکیب آن‌ها (F&C)، به طور معنی‌داری باعث افزایش صفات رویشی اندام هوایی نهال‌های تادار نسبت به تیمار شاهد شد (جدول ۱)، اما از این نظر بین

جدول ۱- تأثیر قارچ‌های میکوریزی بر صفات رویشی اندام هوایی نونهال تادار (Mean ± SE)

تیمار	وزن تر برگ (g)	وزن خشک برگ (g)	وزن تر ساقه (g)	وزن خشک ساقه (g)	ارتفاع (cm)	سطح برگ (cm ²)	تعداد برگ	قطر یقه (mm)
شاهد	۱/۰۸±۰/۴۳ b	۰/۰۸۶±۰/۰۲ b	۰/۶۹±۰/۰۳ b	۰/۳۹±۰/۰۱۷ b	۲۰±۲/۰۸ b	۶/۱۷±۰/۹۷ c	۱۱±۲/۰۸ b	۳/۱۳±۰/۳۴ b
<i>F. geosporum</i>	۳/۹۲±۰/۲ a	۰/۹۱±۰/۱ a	۲/۹۴±۰/۲۳ a	۱/۶۳±۰/۲۴ a	۶۳±۴/۳۵ a	۱۶±۱/۳۳ a	۲۱/۳۳±۱/۴۵ a	۴/۶۵±۰/۰۸ a
<i>C. etunicatum</i>	۳/۳۲±۰/۰۸ a	۰/۷۷±۰/۰۴ a	۲/۶۶±۰/۳۳ a	۱/۵۵±۰/۱۸ a	۶۴/۵±۱/۸۹ a	۱۵/۶۴±۲/۰۸ a	۲۲/۳۳±۰/۳۳ a	۴/۳±۰/۲۲ a
F&C	۴/۲۱±۰/۶۴ a	۱/۰۸±۰/۲۶ a	۲/۹۷±۰/۴۵ a	۱/۷±۰/۲۹ a	۵۹/۸۳±۱/۵۸ a	۱۰/۹۵±۰/۳۳ b	۲۱/۳۳±۱/۷۶ a	۴/۹±۰/۲۲ a

بر اساس نتایج آزمون دانکن، تیمارهای با حروف مشترک در هر ستون فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵ درصد هستند.

اثرگذار بود (جدول ۲). تلقیح با تیمار ترکیب قارچی در صفات وزن تر و خشک ریشه، تعداد ریشه‌های فرعی و قطر ریشه، تأثیر بیشتری نسبت به تلقیح منفرد هر کدام از دو

ریخت‌شناسی ریشه نتایج بررسی‌های مربوط به شاخص‌های ریخت‌شناسی ریشه نشان داد که تلقیح میکوریزی بر تمام این ویژگی‌ها

قارچ داشت. همچنین، آن‌ها اختلاف معنی‌داری نسبت به قارچ *F. geosporum* مشاهده شد، هرچند که اختلاف آن با شاهد داشتند. درمورد طول ریشه، بیشترین مقدار در تلقیح با شاهد و ترکیب قارچی معنی‌دار نبود.

جدول ۲- تأثیر قارچ‌های میکوریزی بر ریخت‌شناسی ریشه نهال تادار (Mean ± SE)

تیمار	وزن تر ریشه (g)	وزن خشک ریشه (g)	طول ریشه (cm)	تعداد ریشه‌های فرعی	قطر ریشه (mm)
شاهد	۱/۱۷±۰/۳۴ b	۰/۵۶±۰/۱۲ b	۴۰/۱۷±۷/۶ ab	۲۹/۳۳±۳/۸۴ c	۳/۳۵±۰/۵ c
<i>F. geosporum</i>	۴/۶۶±۰/۶ a	۲/۶±۰/۲۶ a	۵۶/۶۷±۷/۲۱ a	۴۸±۳ ab	۴/۳۷±۰/۳۸ bc
<i>C. etunicatum</i>	۳/۴۷±۰/۶۷ ab	۱/۹±۰/۳۱ a	۳۵/۶۷±۳/۹۲ b	۴۰/۳۳±۱/۴۵ b	۴/۶۶±۰/۲۲ b
F&C	۵/۷۵±۱/۰۴ a	۲/۷۷±۰/۶۶ a	۴۴/۳۳±۳/۸۴ ab	۵۶/۳۳±۳/۸۴ a	۶/۰۶±۰/۳۵ a

براساس نتایج آزمون دانکن، تیمارهای با حروف مشترک در هر ستون فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵ درصد هستند.

همبستگی

جدول ۴ نشان می‌دهد، کاربرد تیمار قارچی میکوریزی باعث بهبود صفات رویشی شد، به طوری که نتایج همبستگی نیز حاکی از اثرات مثبت این قارچ‌ها بود. همبستگی مثبت و معنی‌داری نیز بین مقدار کلنیزاسیون و صفات ریشه‌ای نهال‌های تادار به‌غیر از طول ریشه مشاهده شد (جدول ۴). همچنین، بیشترین همبستگی مثبت و معنی‌دار بین کلنیزاسیون و وزن خشک ریشه وجود داشت ($r=0/79$).

براساس نتایج همبستگی پیرسون مشخص شد که بین مقدار کلنیزاسیون و صفات رویشی اندام هوایی، همبستگی مثبت و معنی‌دار وجود داشت (جدول ۳). بیشترین همبستگی بین درصد کلنیزاسیون و وزن خشک ساقه و نیز ارتفاع نهال مشاهده شد ($r=0/87$)، هرچند که همبستگی بین مقدار کلنیزاسیون با صفات دیگر اندام هوایی نیز مثبت و در سطح اطمینان ۹۹ درصد معنی‌دار بود. همان‌طور که

جدول ۳- همبستگی پیرسون بین درصد کلنیزاسیون و صفات رویشی اندام هوایی نهال تادار

صفت	وزن تر برگ	وزن خشک برگ	وزن تر ساقه	وزن خشک ساقه	سطح برگ	ارتفاع	قطر	تعداد برگ
کلنیزاسیون								
ضریب همبستگی	۰/۸۳**	۰/۸۳**	۰/۸۷**	۰/۸۶**	۰/۷۷**	۰/۸۷**	۰/۸۶**	۰/۸۱**
معنی‌داری	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۴	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۲

جدول ۴- همبستگی پیرسون بین درصد کلنیزاسیون و صفات ریشه‌ای نهال تادار

صفت	طول ریشه	تعداد ریشه فرعی	قطر ریشه	وزن تر ریشه	وزن خشک ریشه
کلنیزاسیون					
ضریب همبستگی	۰/۳۶	۰/۷۶**	۰/۷۳**	۰/۷۶**	۰/۷۹**
معنی‌داری	۰/۲۵۴	۰/۰۰۴	۰/۰۰۷	۰/۰۰۴	۰/۰۰۲

بحث

امروزه در مجامع علمی، مباحث مربوط به استفاده از قارچ‌های میکوریزی و اقدامات عملی برای تولید نهال به منظور تولید نهال برای مناطق تخریب‌شده، بسیار گسترده است. با این وجود، استفاده از قارچ‌های بومی همزیست با درختان، به دلیل نیاز به تجهیزات آزمایشگاهی برای تولید و تکثیر چندان مورد توجه قرار نمی‌گیرد و از قارچ‌های تجاری موجود استفاده می‌شود. پژوهش‌های زیادی برای شناسایی قارچ‌های بومی هر گونه انجام شده است. در پژوهش پیش‌رو نیز دو گونه قارچ همزیست *F. geosporum* و *C. etunicatum* در ریزوسفر تادار شناسایی شدند که پس از شمارش اسپور، مشخص شد که این دو گونه در حدود ۹۰ درصد از قارچ‌های موجود در ریزوسفر تادار را تشکیل می‌دادند. این مسئله نشان می‌دهد که درخت تادار، ارتباطی تنگاتنگ و موفق با این دو گونه قارچ میکوریزی در رویشگاه چهارطاق اردل داشت. غالب بودن برخی گونه‌های قارچ میکوریزی حاکی از سازگاری با شرایط محیطی آن منطقه و قدرت رقابت بیشتر در مقایسه با دیگر اسپورها است (Oliveira et al., 2005).

قارچ *F. geosporum* در ایران توسط Mirzaei و همکاران (۲۰۱۷) از ریزوسفر بادام کوهی، Rokni و همکاران (۲۰۱۰) از ریزوسفر نیشکر، Zangeneh و همکاران (۲۰۰۵) از ریزوسفر یرتقال و Rezaee Danesh (۲۰۱۳) از ریزوسفر جو گزارش شده است. همچنین، Zangeneh و همکاران (۲۰۰۵) و Rezaee Danesh (۲۰۱۳) را در ایران گزارش کردند.

دو قارچ مذکور همزیستی زیادی با ریشه نهال‌های تادار نشان دادند. نتایج به دست آمده از درصد کلنیزاسیون ریشه با این دو قارچ و بهبود صفات رویشی نهال‌ها حاکی از تأثیر مثبت قارچ‌های میکوریزی بومی تادار بر رشد این گونه ارزشمند است. در پژوهش‌های دیگر نیز گزارش شد که قارچ‌های بومی جداشده از ریزوسفر گونه‌ها، اثرات مثبت بیشتری بر رشد و زنده‌مانی نهال‌ها داشتند (Estrada et al., 2013). تأثیر مثبت قارچ‌های میکوریزی بر نهال‌های

Alsophila firma (Baker) نیز در پژوهش Lara-Pérez و همکاران (۲۰۱۴) مشاهده شد. در مناطق زاگرس و نواحی خشک به دلیل افزایش یون‌های کربنات کلسیم، کمبود فسفر و عناصر ضروری دیگر، استقرار نهال‌ها با مشکل مواجه است. قارچ‌های میکوریزی باعث ایجاد تعادل مناسب بین عناصر موجود در خاک و جذب آن توسط گیاه می‌شوند. همچنین، در شرایط سخت بوم‌شناختی که با تنش‌های مختلف همراه است، این قارچ‌ها باعث افزایش توانایی گیاهان میزبان می‌شوند (Jiménez-Leyva et al., 2017). Haghghatnia و همکاران (۲۰۱۳) نیز اثرات مثبت و معنی‌دار این قارچ‌ها را بر ویژگی‌های ریشه و اندام هوایی نهال‌های *Citrus aurantifolia* تحت شرایط خشکی گزارش کردند. در مناطق خشک و نیمه‌خشک به دلیل قلیایی بودن خاک، کمبود رطوبت و نیز شکل ترکیبی عناصر، امکان تبادل و استفاده از مواد مغذی برای درختان محدود است. قارچ‌های میکوریزی با ترشح آنزیم‌ها مقدار ازت، فسفر، پتاسیم و عناصر کم‌مصرف مس و آهن را برای گیاه قابل تبادل می‌کنند. در نتیجه با در دسترس قرار گرفتن عناصر پر مصرف، رشد گیاه میزبان بهبود می‌یابد و با افزایش سطح پهنک برگ، مقدار فتوسنتز بیشتر می‌شود (Salehi et al., 2012). در پژوهش پیش‌رو نیز همبستگی مثبت و معنی‌داری بین مقدار کلنیزاسیون و صفات رویشی نهال‌های تادار به جز طول ریشه مشاهده شد. قارچ‌های میکوریزی *F. geosporum* و *C. etunicatum* سبب افزایش وزن تر و خشک برگ، وزن تر و خشک ساقه، ارتفاع، سطح برگ، تعداد برگ، قطر طوقه، وزن تر و خشک ریشه، تعداد ریشه فرعی و قطر ریشه شدند. پژوهشگران مختلف کاهش پتانسیل آب خاک به دلیل افزایش فشار اسمزی در گیاهان میکوریزی نسبت به گیاهان شاهد را گزارش کردند (Silva et al., 2015)، بنابراین در نهال‌های میکوریزی، فشار اسمزی بیشتری نسبت به نهال‌های شاهد ایجاد می‌شود. از سوی دیگر، توسعه ریشه در خاک افزایش می‌یابد. در نتیجه آن، جذب آب و عناصر غذایی برای مراحل بعدی رشد نهال‌ها بیشتر خواهد بود.

- mycorrhizal fungi. *Applied Soil Ecology*, 22(2): 103-111.
- Danielsen, L. and Polle, A., 2014. Poplar nutrition under drought as affected by ectomycorrhizal colonization. *Environmental and Experimental Botany*, 108: 89-98.
 - de-Bashan, L.E., Hernandez, J.P. and Bashan, Y., 2012. The potential contribution of plant growth-promoting bacteria to reduce environmental degradation – A comprehensive evaluation. *Applied Soil Ecology*, 61: 171-189.
 - Estrada, B., Aroca, R., Barea, J.M. and Ruiz-Lozano, J.M., 2013. Native arbuscular mycorrhizal fungi isolated from a saline habitat improved maize antioxidant systems and plant tolerance to salinity. *Plant Science*, 201-202: 42-51.
 - Gerdemann, J.W. and Nicolson, T.H., 1963. Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological Society*, 46(2): 235-244.
 - Haghghatnia, H., Nadian, H., Rajali, F. and Tavakoli, A.R., 2013. Effect of two species of arbuscular-mycorrhizal fungi on vegetative growth and phosphorous uptake of Mexican lime rootstock (*Citrus aurantifolia*) under drought stress conditions. *Seed and Plant Production*, 28(4): 403-417 (In Persian).
 - Holste, E.K. and Kobe, R.K., 2017. Tree species and soil nutrients drive tropical reforestation more than associations with mycorrhizal fungi. *Plant and Soil*, 410(1-2): 283-297.
 - INVAM, 2018. International Culture Collection of (Vesicular) Arbuscular Mycorrhizal Fungi. West Virginia University, Morgantown, West Virginia. Available at: <http://invam.wvu.edu/the-fungi>.
 - Jiménez-Leyva, J.A., Gutiérrez, A., Orozco, J.A., Vargas, G., Esqueda, M., Gardea, A., González-Hernández, V., Sánchez, E. and Muñoz, E., 2017. Phenological and ecophysiological responses of *Capsicum annum* var. *glabriusculum* to native arbuscular mycorrhizal fungi and phosphorus availability. *Environmental and Experimental Botany*, 138: 193-202.
 - Keneshloo, H., 2016. Forest Plantation in Arid Zones, Volume 2: Introducing Appropriate Species Irano-Turanian Region. Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, 512p (In Persian).
 - Lamb, D., Erskine, P.D. and Parrotta, J.A., 2005. Restoration of degraded tropical forest landscapes. *Science*, 310(5754): 1628-1632.
 - Lara-Pérez, L.A., Noa-Carrazana, J.C., Hernández-González, S., Alarcón-Gutiérrez, E., Sánchez-Velásquez, L.R., Zulueta-Rodríguez, R., Lara-

به‌طور کلی، پژوهش پیش‌رو اثرات مثبت قارچ‌های میکوریزی بر رشد نهال‌های تادار را تأیید کرد. اگرچه در بیشتر صفات اندازه‌گیری‌شده، تفاوت معنی‌داری بین قارچ‌های میکوریزی مشاهده نشد، با این وجود استفاده از ترکیب قارچی به‌مراتب تأثیری بیشتر و بهتر نسبت به استفاده منفرد داشت. چنانچه در طبیعت نیز قارچ‌ها به‌صورت ترکیبی وجود دارند. واضح است که همزیستی میکوریزی باعث بهبود شاخص‌های رویشی، افزایش توان نهال‌ها برای جذب آب و عناصر غذایی و نیز فتوسنتز بیشتر می‌شود. قارچ‌های بومی هر گونه درختی در شرایط بوم‌شناختی خاص منطقه، گاهی بسیار اختصاصی عمل می‌کنند، بنابراین شناسایی و استفاده از قارچ‌های بومی هر گونه برای تولید نهال، منطقی‌تر به‌نظر می‌رسد. در این پژوهش مشخص شد که معرفی گونه‌های بومی گیاهان در ارتباط با تولید نهال‌های میکوریزی متحمل به تنش‌های محیطی، یک ابزار موفقیت‌آمیز برای کمک به بهبود بوم‌سازگان‌های تخریب‌شده است، اما لازم است که نهال‌های میکوریزی در عرصه نیز بررسی شوند تا از نتایج به‌دست‌آمده اطمینان حاصل کرد.

References

- Ali Ahmad Korouri, S., Matinizadeh, M., Teymouri M. and Khoshnevis, M., 2002. Recognition of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi in *Taxus baccata* from Vaz forest. *Pajouhesh & Sazandegi*, 15(2): 30-35 (In Persian).
- Anonymous, 2013. Meteorological Organization of Iran.
- Benhiba, L., Fouad, M.O., Essahibi, A., Ghoulam, C. and Qaddoury, A., 2015. Arbuscular mycorrhizal symbiosis enhanced growth and antioxidant metabolism in date palm subjected to long-term drought. *Trees*, 29(6): 1725-1733.
- Brundrett, M., Bougher, N., Dell, B., Grove, T. and Malajczuk, N., 1996. Working with Mycorrhizas in Forestry and Agriculture. ACIAR Monograph 32. Australian Center for International Agricultural Research, Canberra, Australia, 374p.
- Caravaca, F., Barea, J.M., Palenzuela, J., Figueroa, D., Alguacil, M.M. and Roldán, A., 2003. Establishment of shrub species in a degraded semiarid site after inoculation with native or allochthonous arbuscular

- Rezaee Danesh, Y., 2013. Study on status of arbuscular mycorrhizal fungi associated with barley in Damghan region, Iran. *Journal of Plant Protection*, 26(4): 437-449 (in Persian).
- Rokni, N., Goltapeh, M.E. and Alizadeh, A., 2010. Some new recorded species of arbuscular mycorrhizal fungi associated with sugarcane crop in Iran. *Journal of Agricultural Technology*, 6(1): 67-78.
- Salehi, A., Matinizadeh, M. and Tamjidi, J., 2012. Investigation on effect of forest plantation of *Alnus glutinosa* L. (Gaertn.) and *Pinus taeda* L. on soil microbial activity and biomass (case study: Geisom site, west of Guilan province, Iran). *Iranian Journal of Forest and Poplar Research*, 20(2): 334-345 (In Persian).
- Sattarian, A., 2006. Contribution to the biosystematics of *Celtis* L. (Celtidaceae) with special emphasis on the African species. Ph.D. thesis, Department of Plant Sciences, Wageningen University, Wageningen, 142p.
- Schenck, N.C. and Pérez, Y., 1990. Manual for the Identification of VA Mycorrhizal Fungi (INVAM). Synergistic Publications, University of Florida, Gainesville, 286p.
- Silva, E.M., Maia, L.C., Menezes, K.M.S., Braga, M.B., Melo, N.F. and Yano-Melo, A.M., 2015. Water availability and formation of propagules of arbuscular mycorrhizal fungi associated with sorghum. *Applied Soil Ecology*, 94: 15-20.
- Urgiles, N., Loján, P., Aguirre, N., Blaschke, H., Günter, S., Stimm, B. and Kottke, I., 2009. Application of mycorrhizal roots improves growth of tropical tree seedlings in the nursery: a step towards reforestation with native species in the Andes of Ecuador. *New Forests*, 38(3): 229-239.
- Zangeneh, S., Shirvani, A.B., Alian, Y.M., Najafi Nia, M., Karampur, F. and Ghale Dezdani, H., 2005. Introduction of some new arbuscular-mycorrhizal fungi (AMF) from citrus rhizosphere of Iran. *Rostaniha*, 6(1): 77-90.
- Capistrán, L. and Andrade-Torres, A., 2014. Diversity and colonization of arbuscular mycorrhizal fungi in the tree fern *Alsophila firma* in rainy and dry season. *Symbiosis*, 62(3): 143-150.
- Macedo, M.O., Resende, A.S., Garcia, P.C., Boddey, R.M., Jantalia, C.P., Urquiaga, S., Campello, E.F.C. and Franco, A.A., 2008. Changes in soil C and N stocks and nutrient dynamics 13 years after recovery of degraded land using leguminous nitrogen-fixing trees. *Forest Ecology and Management*, 255(5-6): 1516-1524.
- Mirzaei, J., Akbarinia, M., Mohamadi Goltapeh, A., Sharifi, M. and Rezaei Danesh, Y., 2011. Effect of arbuscular mycorrhizae fungi on morphological and physiological characteristics of *Pistacia khinjuk* under drought stress. *Iranian Journal of Forest and Poplar Research*, 19(2): 291-300 (In Persian).
- Mirzaei, J. and Moradi, M., 2017. Biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi in *Amygdalus scoparia* Spach plantations and a natural stand. *Journal of Forestry Research*, 28(6): 1209-1217.
- Oliveira, R.S., Vosátka, M., Dodd, J.C. and Castro, P.M.L., 2005. Studies on the diversity of arbuscular mycorrhizal fungi and the efficacy of two native isolates in a highly alkaline anthropogenic sediment. *Mycorrhiza*, 16(1): 23-31.
- Ormeño, M.S., Hervás, S., Amorós, J.Á., Navarro, F.J.G., Gallego, J.C., and Pérez-de-los-Reyes, C., 2016. Soil protection in solar photovoltaic farms by revegetation with mycorrhizal native species. *Soil Research*, 54(2): 237-241.
- Ortiz, N., Armada, E., Duque, E., Roldán, A. and Azcón, R., 2015. Contribution of arbuscular mycorrhizal fungi and/or bacteria to enhancing plant drought tolerance under natural soil conditions: Effectiveness of autochthonous or allochthonous strains. *Journal of Plant Physiology*, 174: 87-96.
- Phillips, J.M. and Hayman, D.S., 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society*, 55(1): 158-161.

Identification and inoculation of mycorrhizal fungi symbiosis to Caucasian hackberry (*Celtis Caucasica* L.) under greenhouse conditions

T. Sepahvand^{1*}, V. Etemad², M. Matinizadeh³, A. Shirvani² and Gh. Zahedi Amiri⁴

1*- Corresponding author, Ph.D. Student, Department of Forestry and Forest Economics, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. E-mail: t.sepahvand@ut.ac.ir

2- Associate Prof., Department of Forestry and Forest Economics, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

3- Associate Prof., Research Institute of Forests and Rangelands, Agriculture Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran

4- Prof., Department of Forestry and Forest Economics, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

Received: 13.07.2017

Accepted: 21.10.2017

Abstract

Motivated by the general necessity of reforestation in the Zagros forest using native species under limited water resources, this study was conducted on the production of mycorrhizal inoculated-seedlings of Caucasian hackberry (*Celtis Caucasica* L). Seed samples and rhizosphere were selected from a site in the Chahartagh Ardal of the Chaharmahal and Bakhtiari Province. Two species of mycorrhizal fungi, namely *Funneliformis geosporum* and *Claroideoglomus etunicatum*, showed high frequencies in the rhizosphere of *C. Caucasica* sites. Following isolation by wet sieve method, identification was done according to morphological properties such as spore size and color, spore-attached ridge, and spore cell wall layers, which led to their first-ever description from rhizospheres of *C. caucasica* in Iran. Next step was to use trap culture method for culturing spores of mycorrhizal fungus in the greenhouse. After propagation of the species, they were inoculated with *C. Caucasica* seeds. Growth characteristics and root colonization of the seedlings were then assessed during a period of 6 months. The results demonstrated a significant and positive effect of the mycorrhizal fungi on all traits. For most of the measured traits, the highest value was observed in the combined fungus treatment. Therefore, mycorrhizal seedlings were concluded to be advantageous compared with control seedlings. In addition, the use of mycorrhizal seedlings is concluded as a suitable and cost-effective solution to increase the success rates of afforestation as well as the restoration of degraded areas.

Keywords: Arbuscular mycorrhizal, Ardal, morphological traits, symbiosis.