فصلنامه علمی - پژوهشی تحقیقات جنگل و صنوبر ایران
شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ijfpr.2017.113886
جلد ۲۵ شماره ۴، صفحه ۶۸۵-۶۷۵، (۱۳۹۶)

فرآیند مایه‌زنی نهال‌های بلوط ایرانی (*Quercus brantii* Lindl.) با قارچ اکتومایکوریزا در شرایط کشت هیدروپونیک

بهناز یوسف‌شاهی [۱] و مسعود بازگیر [۲*]

۱- کارشناس ارشد بیولوژی خاک، گروه مهندسی آب و خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران

۲*- نویسنده مسئول، استادیار، گروه مهندسی آب و خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران. پست الکترونیک: m.bazgir@ilam.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۶/۰۵/۰۳ تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۸/۰۶

چکیده

همزیستی مایکوریزایی باعث افزایش جذب عناصر غذایی پرمصرف به‌ویژه فسفر و همچنین عناصر کم مصرف می‌شود. نوعی از این همزیستی مایکوریزایی، همزیستی اکتومایکوریزایی نام دارد که در شرایط طبیعی بین ریشه برخی درختان جنگلی و قارچ‌های اکتومایکوریزا برقرار است. در این زندگی، انرژی از گیاه به قارچ و عناصر غذایی از قارچ به سمت گیاه حرکت می‌کند. در این پژوهش، به‌منظور بررسی مقدار جذب فسفر در برگ‌ها از طریق همزیستی قارچ اکتومایکوریزا با ریشه نهال‌های بلوط ایرانی (*Quercus brantii* Lindl.) به‌ترتیب اقدام به کشت نهال‌های یک‌ساله بلوط در سیستم کشت هیدروپونیک مایع (محلول کامل جانسون) و مایه‌زنی این نهال‌ها با قارچ‌های اکتومایکوریزایی (Bull.) *Inocybe rimosa*، (Quél.) Singer *Amanita crocea*، *Boletus comptus* Simonini و *Tricholoma* sp. شد. بر اساس نتایج، پس از همزیستی، ساختار و شکل ریشه‌های همزیست به‌صورت کوتاه، ضخیم و در شکل‌های متفاوتی مشاهده شد. همچنین، اثر مایه‌زنی قارچ اکتومایکوریزا بر جذب فسفر توسط نهال‌های بلوط در سطح اطمینان ۹۹ درصد معنی‌دار شد. مقایسه میانگین در تیمارهای مایه‌زنی شده با قارچ‌های اکتومایکوریزا نسبت به تیمار شاهد نشان داد که جذب فسفر بین ۲/۵ تا ۴/۴ برابر افزایش یافته بود. به‌طور کلی، استفاده از قارچ‌های اکتومایکوریزا (کود زیستی) با کمک به ریشه درختان در افزایش جذب آب و عناصر غذایی می‌توانند زنده‌مانی نهال‌های بلوط را در عرصه‌های جنگلی افزایش دهد.

واژه‌های کلیدی: جذب فسفر، جنگل‌های زاگرس، همزیستی مایکوریزایی.

مقدمه

اکتومایکوریزا یک رابطه همزیستی دوجانبه بین ریشه های گیاهان عالی با قارچ‌های خاصی در خاک است که هر دو طرف از آن سود می‌برند (Itoo & Reshi, 2013). قارچ‌های اکتومایکوریزا به فراوانی در جنگل‌های معتدل و جنگل‌های شمالی یا تایگا یافت می‌شوند. جایی‌که خاک دارای قارچ‌هایی مثل *Truffles*، *Boletes*، *Amanitas* و *Chanterelles*باشد، آن‌ها با ریشه درختانی مانند بلوط، کاج، توس، اکالیپتوس و پیسه‌آ همزیست می‌شوند (Smith & Read, 2008). تاریخچه این همزیستی به ۱۲۰ میلیون سال پیش برمی‌گردد (Brundrett, 2002). قارچ‌های اکتومایکوریزا به‌ویژه برای سلامت و رشد درختان جنگلی ضروری هستند. آن‌ها به چند دلیل برای درختان جنگلی مفید هستند که مهم‌ترین آن بهبود جذب عناصر غذایی از خاک به‌ویژه برای عناصر با تحرک کم در خاک مانند فسفر و عناصر کم‌مصرف (Smith & Read, 2008) است.

روش‌های مختلفی از جمله آزمایش‌های گلدانی (Rutto *et al*., 2002)، ورمی‌کولایت و پیت‌ماس (Duponnois & Plenchette, 2003) و کشت‌های نیمه‌هیدروپونیک (Heim *et al*., 2001) برای کشت قارچ‌های اکتومایکوریزا ارائه شده است.

در جنگل‌های ایران، جنس بلوط متنوع‌ترین جنس خانواده Fagaceae محسوب می‌شود. گونه‌های مختلف این جنس در جنگل‌های هیرکانی، ارسباران و زاگرس پراکنش دارند و بیشترین حضور آن‌ها در منطقه رویشی زاگرس است. بلوط ایرانی (*Quercus brantii* Lindl.) در کلیه استان‌های زاگرسی انتشار داشته و در زاگرس جنوبی به‌عنوان گونه غالب بلوط محسوب می‌شود (Sagheb Talebi *et al*., 2014). استفاده از تکنیک کشت هیدروپونیک مایع یکی از روش‌های علمی برای مطالعه همزیستی اکتومایکوریزایی است. هدف از انجام این پژوهش بررسی امکان تشکیل فرآیند همزیستی بین قارچ‌های اکتومایکوریزای *Amanita crocea* (Quél.) Singer، *Inocybe rimosa* (Bull.)، *Boletus comptus* Simonini و *Tricholoma* sp. با ریشه نهال‌های بلوط ایرانی در شرایط کشت هیدروپونیک کاملاً مایع بود.

مواد و روش‌ها

منطقه نمونه‌برداری

منطقه نمونه‌برداری جنگل بیوره شهرستان ملکشاهی در استان ایلام با مختصات عرض جغرافیایی ۳۳°۱۹′ شمالی و طول ۴۶°۴۱′ شرقی بود. بارندگی سالانه منطقه طی دوره آماری ۳۰ ساله اخیر، ۵۹۲/۵ میلی‌متر است. میانگین دما و رطوبت نسبی سالانه در دوره آماری بلندمدت ۱۹/۴ °C و ۳۹ درصد بوده است. تیپ غالب جنگل منطقه بلوط ایرانی است. نوع اقلیم منطقه به روش آمبرژه نیمه‌مرطوب معتدل می‌باشد. بازیدیوکارپ‌ها از فاصله ۳-۲ متری از تنه درختان بلوط ایرانی، روی سطح خاک جمع‌آوری شدند.

کاشت نهال‌های بلوط در سیستم کشت هیدروپونیک مایع

برای انجام این طرح یک آزمایش گلخانه‌ای با استفاده از نهال‌های یک‌ساله بلوط ایرانی طراحی شد. نهال‌ها در سیستم کشت هیدروپونیک کاملاً مایع مطابق جدول ۱ (Johnson *et al*., 1957) کشت شدند. در طول دوره آزمایش اکسیژن‌دهی به نهال‌ها توسط پمپ هوا انجام شد و هر هفته محلول غذایی مورد استفاده تعویض و جایگزین شد. دوره آزمایش به مدت ۷ ماه از اوایل مهر ۱۳۹۵ تا اردیبهشت ۱۳۹۶ در شرایط کنترل شده گلخانه انجام شد. درطول دوره رشد، نهال‌ها از ۱۲ ساعت روشنایی و دمای روز و شب ۲۳ و ۱۷ درجه سانتیگراد استفاده کردند (شکل ۱).

جدول ۱- ترکیبات تشکیل‌دهنده محلول غذایی مورد استفاده برای کشت هیدروپونیک

ترکیب	وزن ملکولی	غلظت M.	غلظت g/L	محلول پایه ml/L	عناصر پرمصرف: عنصر	غلظت نهایی µmol/L	غلظت نهایی ppm
KNO_3	۱۰۱/۱۰	۱/۰	۱۰۱/۱۰	۶/۰	N	۱۶۰۰۰	۲۲۴
$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	۲۳۶/۱۶	۱/۰	۲۳۶/۱۶	۴/۰	K	۶۰۰۰	۲۳۵
$NH_4H_2PO_4$	۱۰۵/۰۸	۱/۰	۱۱۵/۰۸	۲/۰	Ca	۴۰۰۰	۱۶۰
$MgSO_4.7H_2O$	۲۴۶/۴۹	۰/۵	۱۲۳/۲۵	۲/۰	P	۲۰۰۰	۶۲
					S	۱۰۰۰	۳۲
					Mg	۱۰۰۰	۲۴

ترکیب	وزن ملکولی	عنصر	محلول پایه ml/L	عناصر کم‌مصرف غلظت g/l	غلظت mM.	غلظت نهایی ppm	غلظت نهایی µmol/L
KCl	۷۴/۵۵	Cl	۱/۰	۳/۷۲۸	۵۰	۱/۷۷	۵۰
H_3BO_3	۶۱/۸۴	B	۱/۰	۱/۵۴۶	۲۵	۰/۲۷	۲۵
$MnSO_4.H_2O$	۱۶۹/۰۱	Mn	۱/۰	۰/۳۳۸	۲/۰	۰/۱۱	۲
$ZnSO_4.7H_2O$	۲۸۷/۵۵	Zn	۱/۰	۰/۵۷۵	۲/۰	۰/۱۳۱	۲
$CuSO_4.5H_2O$	۲۴۹/۷۱	Cu	۱/۰	۰/۱۲۵	۰/۵	۰/۰۳۲	۰/۵
$H_2MoO_4(85\%MoO_3)$	۱۶۱/۹۷	Mo	۱/۰	۰/۰۸۱	۰/۵	۰/۰۵	۰/۵
Fe-EDTA	۳۴۶/۰۸	Fe	۱/۰	۲۱/۵۳۸	۵۰	۲/۸۰	۵۰

شکل ۱- کاشت نهال‌های بلوط در سیستم کشت هیدروپونیک مایع

شناسایی ملکولی قارچ‌های اکتومایکوریزا

استخراج DNA از بازیدیوکارپ قارچ‌ها به روش C-TAB بر اساس شیوه‌نامه Doyle و Doyle (۱۹۹۰) با کمی تغییرات انجام شد. در بررسی ملکولی، از مارکر نواحی یگانه نسخه‌برداری شده داخلی علاوه‌بر ژن S ۵/۸ برای شناسایی استفاده شد. کیفیت نمونه‌های DNA با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز با غلظت ۰/۸ درصد تعیین شد. توالی آغازگرهای مورد استفاده عبارت بودند از: Forward ITS1 (5′…TCCGTAGGTGAACCTGCGG…3′) و ITS4 Reverse (5′…TCCTCCGCTTATTGATATGC…3′) (Pushpa *et al*., 2014).

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از دستگاه ترموسایکلر اپندورف انجام شد. اجزاء واکنش عبارت بودند از: $MgCl_2$ (۲۰ میلی‌مولار) ۳/۵ میکرولیتر، dNTPs (یک میلی‌مولار) ۳/۵ میکرولیتر، DNA ژنومی (۱۰۰ پیکومول بر میکرولیتر) ۳ میکرولیتر، آغازگر رفت (۱۰۰ پیکومول بر میکرولیتر) ۰/۵ میکرولیتر، آغازگر برگشت (۱۰۰ پیکومول بر میکرولیتر) ۰/۵ میکرولیتر، آنزیم Tag DNA polymerase (۵U) ۰/۳ میکرولیتر، بافر PCR (۱۰x) ۳/۵ میکرولیتر، آب مقطر استریل ۱۳/۲ میکرولیتر، حجم نهایی واکنش ۲۵ میکرولیتر.

چرخه‌های حرارتی واکنش زنجیره پلیمراز

واسرشت سازی اولیه °C ۹۵ (۱۸۰ ثانیه)، واسرشت سازی ثانویه °C ۹۴ (۶۰ ثانیه)، دمای اتصال آغازگر °C ۵۴/۳ (۶۰ ثانیه)، دمای تکثیر و بسط رشته °C ۷۲ (۹۰ ثانیه)، دمای تکثیر و بسط نهایی °C ۷۲ (۳۰۰ ثانیه)، دمای نگهداری °C ۴ بود. تعیین کیفیت محصول PCR با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز با غلظت ۱/۲ درصد تعیین شد. پس از توالی‌یابی و مشخص شدن توالی ژن قارچ‌های مورد بررسی، برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزارهای

BLAST و BioEdit استفاده شد.

کشت قارچ‌های اکتومایکوریزا و مایه‌زنی نهال‌های بلوط

برای کشت قارچ از بافت بین تیغه‌های زیر کلاهک استفاده شد. این بافت‌ها به محیط کشت جامد MS SIGMA-ALDRICH منتقل و در نهایت کشت قارچ‌های اکتومایکوریزا در محیط کشت مایع MS انجام شد. برای تهیه یک لیتر محیط کشت مایع MS، مقدار ۴/۴ گرم محیط کشت MS و ۳۰ گرم ساکاروز در یک لیتر آب مقطر حل شد و سپس در دمای ۱۲۱ °C اتوکلاو انجام شد. در هر ۲۵۰ میلی‌لیتر از محیط کشت مایع چند تکه یک سانتی‌متری از قارچ مورد نظر کشت شد. پس از تشکیل میسلیوم‌ها، ارلن‌ها به مدت دو هفته در انکباتور در دمای ۲۵ °C نگهداری شدند و سپس مواد داخل ارلن با هم‌زن سترون مخلوط شده تا برای مایه‌زنی آماده شود. سپس، به هر یک از ظرف‌های کشت هیدروپونیک حاوی نهال‌های بلوط، ۱۰ میلی‌لیتر از این سوسپانسیون میسیلیومی اضافه شد. تیمارهای شاهد نیز بدون تلقیح با قارچ در سه تکرار درنظر گرفته شد. قارچ‌های اکتومایکوریزا مورد استفاده برای مایه‌زنی عبارت بودند از: *A. crocea*، *I. rimosa*، *B. comptus* و *Tricholoma* sp.. برای مشاهده قارچ-ریشه‌ها از بینوکولار مدل Olympus SZH-ILLD با بزرگنمایی ۴۰ استفاده شد.

آماده‌سازی نمونه‌های برگ بلوط برای اندازه‌گیری فسفر

برگ‌های سبز به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۷۰ °C در آون خشک و سپس پودر شدند. برای تعیین فسفر از هر نمونه برگ، ۰/۳ گرم استفاده شد. برای عمل هضم از مخلوط اسیدها (آب‌مقطر، اسید سولفوریک ۹۶٪ و اسید سالیسیلیک) استفاده شد. اندازه‌گیری فسفر به روش کالریمتری (رنگ زرد مولیبدات وانادات) انجام شد و به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر با طول موج ۴۷۰ نانومتر خوانده شد (Emami, 1996).

طرح آزمایش

به‌منظور بررسی تأثیر مایه‌زنی قارچ اکتومایکوریزا بر جذب فسفر و رشد نهال‌های بلوط در محیط کشت هیدروپونیک، آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی با پنج تیمار آزمایشی (چهار نوع قارچ اکتومایکوریزای مورد استفاده برای مایه‌زنی و یک تیمار شاهد بدون تلقیح قارچ) در سه تکرار در شرایط گلخانه‌ای انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها به‌وسیله نرم‌افزار SAS و مقایسه میانگین‌ها به روش LSD انجام شد.

نتایج

جدول ۲ مشخصات کامل هم‌ردیفی توالی‌های نمونه‌ها با توالی‌های یافت شده در پایگاه اطلاعاتی NCBI را نشان می‌دهد. معناداری توالی داده‌شده با توالی پیداشده با مقدار E اندازه‌گیری شد. مقدار صفر برای E ایده‌آل‌ترین حالت ممکن است. همچنین، توالی‌های نمونه‌ها در بانک ژن ثبت شدند که در جدول ۲ با شماره دسترسی (Accession) مشخص شده است. در مورد توالی *Tricholoma* sp. به‌دلیل درصد هم‌پوشانی کم با توالی پیدا شده در پایگاه اطلاعاتی NCBI، این توالی در بانک ژن ثبت نشد. بر اساس نتایج کلی هم‌ردیفی توالی‌های نوکلئوتیدی، درمجموع چهار نوع قارچ اکتومایکوریزا شناسایی شد.

جدول ۲- نتایج شناسایی ملکولی قارچ‌ها تا مرحله جنس و گونه

خانواده	کد دسترسی	نتایج بلاست	حداکثر تشابه (٪)	طول قطعه توالی‌یابی شده	هم‌پوشانی	مقدار E
Inocybaceae	MF278770	*Inocybe rimosa*	۹۹	۶۲۵	۹۹	۰/۰
Amanitaceae	MF278767	*Amanita crocea*	۹۹	۶۰۰	۹۹	۰/۰
Boletaceae	MF278769	*Boletus comptus*	۹۷	۶۰۰	۷۹	۰/۰
Tricholomataceae	---	*Tricholoma* sp.	۸۹	۶۰۰	۳۰	۴۵E-۱

مشخصات مورفولوژیکی قارچ‌های شناسایی شده

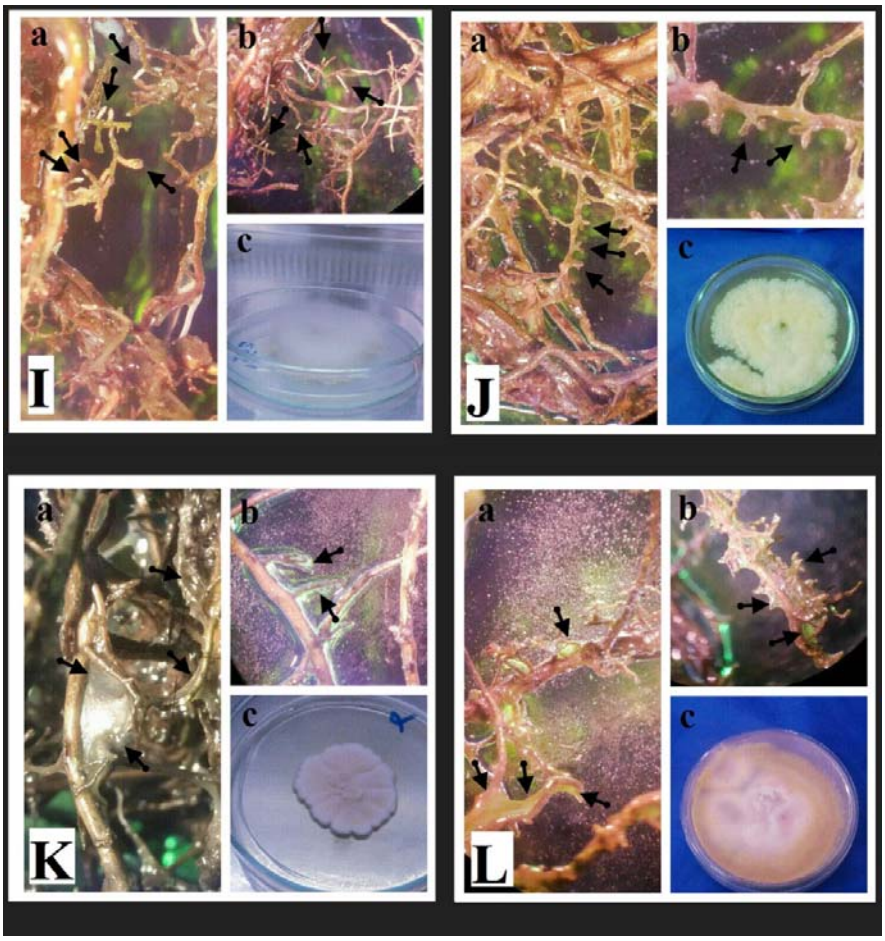
قارچ *A. crocea* (شکل ۲E) دارای همزیستی اکتومایکوریزایی بود. این قارچ دارای کلاهکی به‌رنگ کرم پررنگ و اندازه ساقه ۱۲۰–۹۰×۲۵–۱۵ میلی‌متر به رنگ کرم، اندازه اسپور ۹/۵–۷×۱۲–۸ میکرومتر، گرد و سفید رنگ بود. قارچ *I. rimosa* (شکل ۲F) دارای همزیستی اکتومایکوریزایی بود. کلاهک‌های این قارچ کوچک به‌صورت مخروطی تا زنگی شکل به اندازه ۸–۲ سانتی‌متر، رنگ زرد تا قهوه‌ای کم‌رنگ، اندازه ساقه ۶۰–۴۰×۹–۷ میلی‌متر به رنگ سفید تا زرد، اسپور قهوه‌ای رنگ به‌صورت بیضی و صاف به ابعاد ۱۲–۹×۷–۴/۵ میکرومتر بود. قارچ *B. comptus* (شکل ۲G) دارای همزیستی اکتومایکوریزایی بود. اندازه کلاهک این قارچ ۱۰–۸ سانتی‌متر، صورتی کم‌رنگ تا خاکستری کم‌رنگ، اندازه ساقه ۹–۷ ×۴–۳ سانتی‌متر، به‌رنگ زرد، انتهای ساقه حبابی شکل، ریشه‌ها در انتهای ساقه، رنگ اسپور قهوه‌ای و اندازه آن ۱۴–۱۰×۷–۶ میکرومتر بود. جنس *Tricholoma* (شکل ۲H) قارچ اکتومایکوریزا بود. کلاهک این قارچ محدب، به‌رنگ سفید و صاف، ژیل‌ها موجی شکل، اندازه کلاهک ۱۱–۵ سانتی‌متر، ساقه به‌صورت مرکزی و سفید رنگ به‌اندازه ۱۰–۵ × ۵–۳ سانتی‌متر، اسپور سفید، صاف و تخم‌مرغی به‌اندازه ۱۰–۸ × ۷–۶ میکرومتر بود.

شکل ۲- کلاهک قارچ‌های اکتومایکوریزا (**a** و **b**)؛ اسپور (**c**)

بررسی ریخت‌شناسی قارچ- ریشه‌ها

پس از مایه‌زنی نهال‌های بلوط و ایجاد همزیستی، قارچ- ریشه‌های موجود در نهال‌های بلوط در شکل‌های مختلفی مشاهده شدند (شکل ۳). در همزیستی بین قارچ *A. crocea* و ریشه نهال‌های بلوط، شکل قارچ- ریشه به‌صورت الگوی ساده (Simple) یا غیرمنشعب (Unramified) و سفیدرنگ در سراسر ریشه بود (شکل ۳I). در همزیستی بین قارچ *I. rimosa* و ریشه نهال‌های بلوط، شکل قارچ- ریشه به‌صورت الگوی دوشاخه (Dichotomous) و زرد کم‌رنگ تا کرم‌رنگ مشاهده شد (شکل ۳J). در همزیستی بین قارچ *B. comptus* و ریشه نهال‌های بلوط، شکل قارچ- ریشه به‌صورت الگوی پرمانند

نامنظم (Irregularly pinnate) و به رنگ شفاف مشاهده شد (شکل ۳K). در همزیستی بین قارچ *Tricholoma* sp. و ریشه نهال‌های بلوط، شکل قارچ- ریشه به‌صورت الگوی پرمانند نامنظم و کرم‌رنگ مشاهده شد (شکل ۳L).



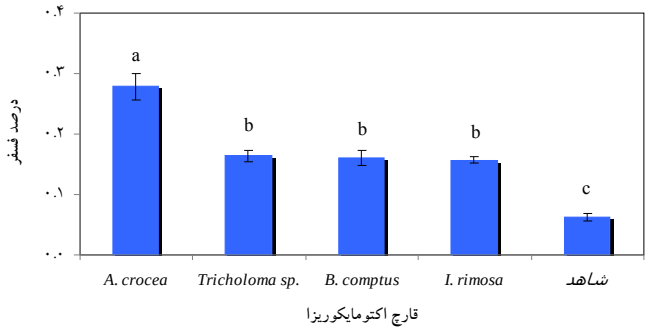
شکل ۳- ریشه‌های همزیست با قارچ‌های اکتومایکوریزا، بزرگنمایی ۴۰x (a و b)

کشت خالص قارچ اکتومایکوریزا در پتری روی محیط کشت MS (c)

ساختارهای اسکلروتیای (Sclerotia) مشاهده شده در دو قارچ *A. crocea* و *B. comptus* در شکل ۴ نشان داده شده است.

بر اساس نتایج تجزیه واریانس، اثر مایه‌زنی قارچ‌های اکتومایکوریزا بر جذب فسفر در نهال‌های بلوط در سطح اطمینان ۹۹ درصد معنی‌دار بود و نشان داد که مایه‌زنی با قارچ‌های اکتومایکوریزا اثر معنی‌داری بر جذب فسفر برگ در بین تیمارها داشته است. مقایسه میانگین تیمارها (شکل ۵) نشان داد که تیمارهایی که با قارچ‌های اکتومایکوریزای *Tricholoma* sp.، *B. comptus* و *I. rimosa* مایه‌زنی شده بودند، با هم اختلاف معنی‌داری نداشتند، اما با تیماری که با قارچ *A. crocea* مایه‌زنی شده بود و تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری داشتند. بر این اساس، بیشترین جذب فسفر مربوط به تیمار مایه‌زنی‌شده با قارچ *A. crocea* بود که جذب فسفر را ۴/۴ برابر نسبت به تیمار شاهد افزایش داد. کمترین جذب فسفر نیز مربوط به تیمار مایه‌زنی شده با قارچ *I. rimosa* بود که درصد جذب فسفر را ۲/۵ برابر نسبت به شاهد افزایش داده بود.

شکل ۴- ساختار اسکلروتیا در قارچ اکتومایکوریزای ***A. crocea*** (**A**) و ***B. comptus*** (**B**)، بزرگنمایی **۴۰x**



شکل ۵- اثر مایه‌زنی نهال‌های بلوط با قارچ‌های اکتومایکوریزا بر جذب فسفر

بحث

بر اساس نتایج به‌دست آمده از پژوهش پیش‌رو و پس از شناسایی ملکولی و ریخت‌شناسی، چهار نوع قارچ اکتومایکوریزا شناسایی شد. جنس *Amanita* (شکل ۲E) با تنوع گسترده‌ای از میزبان‌های گیاهی به‌ویژه بلوط، راش و سوزنی‌برگان همزیستی اکتومایکوریزایی دارد (Pande *et al.*, 2004). این قارچ پیشتر در ایران شناسایی شده و ویژگی‌های ریخت‌شناسی قارچ *A. crocea* گزارش شده است (Bahram *et al.*, 2006) که با نتایج این پژوهش مطابقت دارد. جنس *Inocybe* و گونه *rimosa* (شکل ۲F) به‌طور معمول با طیف گسترده‌ای از درختان میزبان به‌ویژه درختان سوزنی برگ، توسکا، بلوط و غیره همزیستی اکتومایکوریزای تشکیل می‌دهد (Jacobsson, 2008). نتایج شناسایی ریخت‌شناسی *I. rimosa* با نتایج سایر پژوهشگران مطابقت دارد (Cripps, 1997). زیستگاه قارچ *B. comptus* (شکل ۲G) جنگل‌های گرم پهن‌برگ بوده و به‌صورت همزیستی اکتومایکوریزایی با درختان بلوط دیده می‌شود (Estadès & *Lanno*, 2004). نتایج شناسایی ریخت‌شناسی قارچ *B. comptus* با نتایج ارائه‌شده توسط سایر پژوهشگران (Simonini, 1998) مطابقت دارد. جنس *Tricholoma* (شکل ۲H) به‌طور معمول قارچ‌های اکتومایکوریزا هستند که رابطه همزیستی با گونه‌های مختلف درختان پهن‌برگ و سوزنی‌برگ دارند. در پژوهش مشابهی در رابطه با خصوصیات ریخت‌شناسی این قارچ (Kim *et al.*, 1998) نتایج مشابهی به‌دست آمد.

پس از کشت قارچ‌های اکتومایکوریزا و انجام مایه‌زنی در مراحل اولیه همزیستی بین قارچ‌های اکتومایکوریزا و ریشه نهال‌های بلوط، ریخت‌شناسی ریشه تغییر شکل پیدا

کرد و به شکل‌ها و رنگ‌های مختلفی مشاهده شد. Agerer (۱۹۸۶) ویژگی‌های مشخصی از ریشه‌های اکتومایکوریزایی را که برای شناسایی همزیستی قارچ استفاده می‌شود، بیان کرد و ذکر کرد که به‌طور معمول تفاوت ریشه‌های همزیست با قارچ اکتومایکوریزا با ریشه‌های غیرهمزیست در رنگ، ضخامت، بافت و انشعاباتی است که تشکیل می‌دهند. ریشه‌های اکتومایکوریزایی با تغییر ضخامت و تغییر شکل ریشه‌های میزبان و کاهش طول ریشه میزبان قابل تشخیص هستند. ریشه‌های مخروطیان مانند کاج با اکتومایکوریزا الگوهای انشعابات دوشاخه ای تشکیل می‌دهند (Chung *et al.*, 2003)، درحالی‌که به‌طور معمول نهاندانگان در ریشه‌های جانبی انشعاباتی نابرابر دارند که به‌صورت عمود بر روی شاخه جانبی قرار می‌گیرد. اندازه، رنگ، بافت و الگوهای انشعابات ریشه‌های اکتومایکوریزایی با توجه به میزبان قارچ متفاوت است (Brundrett, 2002). در این پژوهش تشکیل الگوی انشعابات دوبخشی در تمام تیمارهایی که با قارچ اکتومایکوریزای *I. rimosa* مایه‌زنی شده بود، مشاهده شد (شکل ۳J) و نشان داد که ریشه‌ها با این قارچ همزیست شده و به‌تدریج این میسیلیوم‌ها بر روی سطح ریشه جذب شده و ریخت‌شناسی ریشه توسط این قارچ تغییر پیدا کرده است. در برخی موارد مانند قارچ *A. crocea*، به‌صورت ساده یا غیرمنشعب (Simple) روی ریشه‌های جانبی نهال‌های بلوط مشاهده شد (شکل ۳I). در شکل‌های ۳K و ۳L مربوط به قارچ‌های *B. comptus* و *Tricholoma* sp. شکل قارچ- ریشه‌ها به صورت پرمانند نامنظم دیده شد. تمام الگوهای مشاهده شده برای قارچ- ریشه‌های نهال‌های بلوط مطابق با کلیدهای قابل استفاده برای تشخیص گونه‌های قارچی مرتبط با ریشه بود که توسط Agerer (۲۰۰۲ و ۱۹۸۷) و Ingleby و همکاران (۱۹۹۰) ارائه شده است. Chung و همکاران (۲۰۰۳) با مشاهده تشکیل اشکال مختلف اکتومایکوریزا بر روی ریشه چند گونه کاج به این نتیجه رسیدند که تشکیل اکتومایکوریزا بر روی ریشه، با توجه به گونه گیاهی و نوع قارچ متفاوت است. همان‌طور که در شکل ۳ نشان داده شد، همزیستی اکتومایکوریزا از یک سیستم میسیلیومی تشکیل می‌شود که به‌طور معمول روی ریشه‌های جانبی میزبان تشکیل می‌شود و به‌طور نامنظم در سرتاسر خاک پخش می‌شوند (Harvey *et al.*, 1976). اکثر ریشه‌های اکتومایکوریزایی از نظر شکل ظاهری الگوهای خاصی دارند. این الگوها متشکل از ریشه‌های جانبی کوتاه مایکوریزایی هستند که در طول شبکه‌ای از ریشه‌های طولانی وجود دارند. این ریشه‌های کوتاه و بلند در سیستم ریشه‌ای تکرار می‌شوند. ریشه‌های کوتاه به‌طور معمول رشد بسیار کندتری نسبت به ریشه‌های بلند دارند، به این دلیل که به تشکیل همزیستی کمک کنند (Kubikova, 1967).

در شکل ۴ ساختارهای اسکلروتیای مشاهده شده در دو قارچ *A. crocea* و *B. comptus* نشان داده شد. اسکلروتیا ساختارهای ذخیره‌ای مقاوم و به‌نسبت بزرگتری نسبت به میسیلیوم‌ها هستند که ممکن است در برخی از گونه‌ها تولید شوند. وظیفه اسکلروتیا کسب مواد غذایی برای تولید مثل قارچ و یا تبادل مایکوریزایی است و به‌عنوان پروپاگول برای بقا و گسترش قارچ به‌کار می‌رود (Agerer, 1995). در این پژوهش مشاهده شد که فرآیند همزیستی بین قارچ‌های اکتومایکوریزا و ریشه‌های نهال‌های بلوط در چند روز اول مایه‌زنی انجام شد. Piche و همکاران (۱۹۸۳) گزارش کردند که اتصال هیف روی سطح ریشه ۲-۱ روز پس از اولین تماس با ریشه انجام می‌شود و غلاف و شبکه هارتیگ پس از ۴-۲ روز تشکیل می‌شوند.

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۳) نشان داد که اثر مایه‌زنی با قارچ‌های اکتومایکوریزا بر جذب فسفر در سطح اطمینان ۹۹ درصد معنی‌دار بود. این موضوع بیانگر این است که مایه‌زنی نهال‌های بلوط به‌وسیله قارچ‌های اکتومایکوریزا توانسته اثر معنی‌داری بر جذب فسفر توسط بلوط داشته باشد. Bougher و همکاران (۱۹۹۰) جذب فسفر را در نهال‌های *Eucalyptus diversicolor* مورد مطالعه قرار دادند. در این پژوهش نهال‌ها با قارچ‌های اکتومایکوریزا مایه‌زنی شدند و مشخص شد که همه قارچ‌های مورد استفاده با نام *Pisolithus* (pers.) Coker & Couch

tinctorius و دو نمونه از قارچ *Descolea maculate* Bougher و *Laccaria laccata* (scop.) Cooke سطح فسفر بافت‌های گیاهی را افزایش دادند که نتایج به‌دست آمده در پژوهش پیش‌رو را تأیید می‌کند. این مطالعات اهمیت نقش فعال و زیست‌محیطی قارچ‌های اکتومایکوریزا را برای جذب فسفر تحت شرایط کمبود فسفر نشان می‌دهد (Smith & Read, 2008). دامنه حد کمبود عنصر فسفر بر اساس مطالعات Stefan (۱۹۹۷) از یک تا ۱/۵ میلی‌گرم بر گرم است که بر این اساس در پژوهش پیش‌رو نه‌تنها هیچ کمبودی در مقدار این عنصر مشاهده نشد، بلکه قارچ‌های اکتومایکوریزای استفاده شده باعث افزایش کارایی جذب فسفر در نهال‌های بلوط شدند.

در مجموع، نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که قارچ‌های اکتومایکوریزای *A. crocea*، *I. rimosa*، *B. comptus* و *Tricholoma* sp. گزینه‌های مناسبی برای تشکیل همزیستی اکتومایکوریزایی سازگار با ویژگی‌های اکولوژیکی بلوط ایرانی و در دسترس قرار دادن عناصر غذایی به‌ویژه فسفر هستند. در این پژوهش، کشت قارچ‌های اکتومایکوریزا در شرایط آزمایشگاهی انجام شد و برای اولین بار در ایران مایه تلقیح قارچ‌های اکتومایکوریزا تهیه شد. ریشه مهم‌ترین اندام در هر گیاهی شناخته می‌شود. همزیستی قارچ‌های اکتومایکوریزا با ریشه نهال‌ها قادر به تولید این اندام گیاهی است (میسیلیوم‌ها قادر به گسترش و توسعه سیستم ریشه‌ای هستند). همزیستی ریشه برخی درختان با قارچ‌های اکتومایکوریزا به‌طور معمول در شرایط طبیعی و در خاک رخ می‌دهد و مطالعات انجام شده بیشتر در محیط طبیعی خاک است. از سوی دیگر، یکی از روش‌های علمی برای مطالعه این گونه همزیستی‌ها استفاده از تکنیک هیدروپونیک است. در این پژوهش برای اولین بار در ایران از این تکنیک برای مطالعه نحوه زندگی همزیستی بین این قارچ‌ها و نهال‌های بلوط استفاده شد. با وجود بیش از ۱۰ میلیون هکتار پوشش جنگلی در کشور، تا کنون مطالعات بسیار اندکی برای بررسی همزیستی اکتومایکوریزایی و کشت این قارچ‌ها انجام شده است، بنابراین با توجه به اهمیت نقش قارچ‌های اکتومایکوریزا در عرصه‌های جنگلی لزوم مطالعات گسترده در این زمینه احساس می‌شود.

References

- Agerer, R., 1986. Studies on ectomycorrhizae. II: Introducing remarks on characterization identification. Mycotaxon, 26: 473-492.
- Agerer, R., 1995. Anatomical characteristics of identified ectomycorrhizas: an attempt towards a natural classification: 685-734. In: Varma, A. and Hock, B. (Eds.). Mycorrhiza. Springer, 749p.
- Agerer, R., 1997-2002. Color Atlas of Ectomycorrhizae. Einhorn-Verlag Eduard Dietenberger GmbH, Munchen, 345p.
- Bahram, M., Asef, M.R., Zarre, S.H., Abbasi, M. and Reidl, S., 2006. Addition to the knowledge of Amanita (Agaricales, Pluteaceae) from Iran. Rostaniha, 7(2): 107-119.
- Bougher, N.L., Grove, T.S. and Malajczuk, N., 1990. Growth and phosphorus acquisition of karri (Eucalyptus diversicolor F. Muell.) seedlings inoculated with ectomycorrhizal fungi in relation to phosphorus supply. New Phytologist, 114(1): 77-85.
- Brundrett, M.C., 2002. Coevoluti on of roots and mycorrhizas of land plants. New Phytologist, 154(2): 275-304.
- Chung, H.C., Kim, D.H., Cho, N.S. and Lee, S.S., 2003. Observation and Distribution of Ectomycorrhizal Fungi in Pinus Roots. Mycobiology, 31(1): 1-8.
- Cripps, C.L., 1997. The genus Inocybe in Montana aspen stands. Mycologia, 89: 670-688.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L., 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus, 12: 13-15.
- Duponnois, R. and Plenchette, C., 2003. A mycorrhiza helper bacterium enhances ectomycorrhizal and endomycorrhizal symbiosis of Australian Acacia species. Mycorrhiza, 13(2): 85-91.
- Emami, A., 1996. Plant Analysis Methods (Volume 1). Agricultural Research and Education Organization, Tehran, 195p (In Persian).
- Estadès, A. and Lannoy, G., 2004. Les bolets européens. Bulletin Mycologique et Botanique Dauphiné-Savoie, 44(3): 3-79.
- Harvey, A.E., Larsen, M.J. and Jurgensen, M.F., 1976. Distribution of ectomycorrhizae in a

Species diversity of ectomycorrhizal fungi associated with temperate forest of western Himalaya: a preliminary assessment. Current Science, 86(12): 1619-1623.
- Piche, Y., Peterson, R.L. and Ackerley, C.A., 1983. Early development of ectomycorrhizal short roots of pine. Scanning Electron Microscopy, 3: 1467-1474.
- Pushpa, H., Purushothama, K.B. and Ramesh Thirumalesh D.H., 2014. Taxonomic studies and molecular characterisation of Tricholoma giganteum and Calocybe indica isolates from Bangalore. Journal of Biochemical Technology, 3(5): 218-220.
- Rutto, K.L., Mizutani, F. and Kadoya, K., 2002. Effect of root-zone flooding on mycorrhizal and non-mycorrhizal peach (Prunus persica Batsch) seedlings. Scientia horticulturae, 94(3): 285-295.
- Sagheb Talebi, Kh., Sajedi, T. and Pourhashemi, M., 2014. Forests of Iran: A Treasure from the Past, A Hope for the Future. Springer, 152p.
- Simonini, G., 1998. Qualche specie rara o poco conosciuta della famiglia Boletaceae- In: Fungi non delineati. University of Michigan Press, Michigan, 56p.
- Smith, S.E. and Read, D.J., 2008. Mycorrhizal Symbiosis. Third edition, Academic Press, London, 605p.
- Stefan, K., Furst, A., Hacker, R. and Bartels, U., 1997. Forest foliar condition in Europe- results of large-scale foliar chemistry surveys. EC-UNECE, Austrian Federal Forest Research Centre, Brussels, 207p.
mature douglas-fir/larch soil in western Montana. Forest Science, 22(4): 393-633.
- Heim, A., Brunner, I., Frey, B., Frossard, E. and Luster, J., 2001. Root exudation, organic acids, and element distribution in roots of Norway spruce seedlings treated with aluminum in hydroponics. Journal of Plant Nutrition and Soil Science, 164(5): 519-526.
- Ingleby, K., Mason, P.A., Last, F.T. and Fleming, L.V., 1990. Identification of Ectomycorrhizas. HMSO, London, 112p.
- Itoo, Z.A. and Reshi, Z.A., 2013. The multifunctional role of ectomycorrhizal associations in forest ecosystem processes. The Botanical Review, 79(3): 371-400.
- Jacobsson, S., 2008. Key to Inocybe. In: Knudsen H, Vesterholt J (Eds), Funga Nordica. Agaricoid, boletoid and cyphelloid genera: 868 -906. Nordsvamp, Copenhagen.
- Johnson, C.M., Stout, P.R., Broyer, T.C. and Carlton, A.B., 1957. Comparative chlorine requirements of different plant species. Plant and Soil, 8(4): 337-353.
- Kim, H.K., Kim, Y.S., Seok, S.J., Kim, G.P. and Cha, D.Y., 1998. Artificial cultivation of Tricholoma giganteum collected in Korea (I)- Morphological charateristics of fruitbody and environmental condition in habitat of T. giganteum. The Korean Journal of Mycology, 26(2): 182-186.
- Kubikova, J., 1967. Contribution to the classification of root systems of woody plants. Preslia, 39: 236-243.
- Pande, V., Palni, U.T. and Singh, S.P., 2004.

Inoculation process for Brant`s oak (*Quercus brantii* Lindl.) seedling with Ectomycorrhizal fungi in hydroponic culture condition

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

1- M.Sc. Soil Biology, Department of Water and Soil Engineering, Faculty of Agriculture, Ilam University, Ilam, Iran
2*- Corresponding author, Assistant Prof., Department of Water and Soil Engineering, Faculty of Agriculture, Ilam University, Ilam, Iran. E-mail: m.bazgir@ilam.ac.ir

Received: 25.07.2017 Accepted: 28.10.2017

Abstract

Mycorrhizal symbiosis increases micro and macronutrients especially phosphorous. Ectomycorrhizal symbiosis is kind of mycorrhizal symbiosis, which occur between the roots of some forest trees and ectomycorrhiza fungi. In this symbiosis, energy transfers from plant to fungus and nutrient elements from fungus to plant. In order to study the amount of phosphorous uptake in leaves through the symbiosis of ectomycorrhizal fungi with Brant`s oak (*Quercus brantii* Lindl.) seedling roots, we plant one year oak seedling in hydroponic culture system (Johnson complete solution) and then inoculate these seedlings with ectomycorrhizal fungi of *Inocybe rimosa* (Bull.), *Amanita crocea* (Quél.) Singer, *Boletus comptus* Simonini, *Tricholoma* sp. According to the results, after symbiosis the structure and shape of the symbiotic roots changed into the short, thick and different shapes. Inoculum of these fungi affected significantly ($\alpha = 0.01$) on phosphorous uptake by oak seedlings. Mean comparison showed that phosphorus uptake has increased 2.5 and 4.4 times in inoculum treatments than control treatment. Application of ectomycorrhizal fungi (biological fertilizer) can help tree roots by increasing water and nutrient elements uptake resulting from increasing oak seedlings survival in forest ecosystem.

Keywords: Ectomycorrhizal fungi, phosphorous uptake, Zagros forests**.**