جنگل و فرآورده‌های چوب، مجلهٔ منابع طبیعی ایران
دورهٔ ۷۴، شمارهٔ ۳، پاییز ۱۴۰۰
ص ۳۳۱-۳۴۳ (پژوهشی)
DOI: 10.22059/jfwp.2021.313092.1140

بررسی وضعیت همزیستی میکوریزایی درختان بلوط (*Quercus* sp.) در جنگل‌های شمال ایران

سیده معصومه زمانی[1*]، محمد متینی‌زاده[2]

۱. استادیار پژوهش، مؤسسهٔ تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران
۲. دانشیار، مؤسسهٔ تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۸/۰۴، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۲/۲۸

چکیده

نظر به جایگاه ویژهٔ قارچ‌های میکوریز در بهبود فیزیولوژی گیاهان میزبان و افزایش مقاومت آنها به تنش‌های محیطی، این تحقیق با هدف روشن ساختن وضعیت همزیستی میکوریزایی درختان بلوط (*Quercus* sp.) در رویشگاه‌های جنگلی شمال کشور و تأثیرات زیستی آنها بر بلوط بلندمازو (*Q. castaneifolia*) در شرایط آزمایشگاهی اجرا شد. به‌منظور شناسایی قارچ‌های میکوریزِ همراه درختان بلوط، نوک‌ریشه‌های میکوریزایی درختان جمع‌آوری و ناحیهٔ ریبوزومی قارچی تکثیر و تعیین توالی شد. تجزیه‌وتحلیل فیلوژنتیکی توالی‌ها صورت گرفت. در مجموع ۲۱۷ سیستم ریشه‌ای از شش رویشگاه تحت بررسی جمع‌آوری و ۴۹ تاکسون از قارچ‌های اکتومیکوریز (شامل سیزده جنس *Amanita*، *Boletus*، *Cortinarius*، *Hebeloma*، *Hydnum*، *Hygrophorus*، *Inocybe*، *Laccaria*، *Lactarius*، *Lycoperdon*، *Russula*، *Scleroderma* و *Tricholoma*) و چهار تاکسون از قارچ‌های میکوریز آرباسکولار (شامل دو جنس *Acaulospora* و *Glomus*) در میان آنها شناسایی شد. در گام بعدی، همزیستی ریزقلمه‌های *Q. castaneifolia* با قارچ میکوریز آرباسکولار *Glomus mosseae* و اکتومیکوریز *Hebeloma sinapizans* انجام گرفت. اندازه‌گیری ویژگی‌های فیزیولوژیک، رشد و نیز وضعیت آبی گیاه تلقیح‌شده در مقایسه با گیاه شاهد نشان داد که توسعهٔ همزیستی اکتومیکوریزایی روی گیاهچه‌های بلوط موجب افزایش معنی‌دار زیست‌توده ساقه، زیست‌توده ، سطح و کلروفیل برگ و نیز بهبود محتوای آبی گیاهچه‌ها شد؛ درحالی که شواهدی از تأثیر مثبت معنی‌دار تلقیح قارچ میکوریز آرباسکولار به گیاهچه‌های بلندمازو به‌دست نیامد. بنابراین با توجه به بهبود وضعیت آبی، افزایش رشد و زیست‌توده و اصلاح خصوصیات فیزیولوژیکی گیاه تلقیح‌شده با قارچ اکتومیکوریز، می‌توان برقراری این تعامل را راهکاری مناسب‌تر برای افزایش موفقیت نهالکاری در برنامه‌های احیای جنگل‌های بلندمازو معرفی کرد.

واژه‌های کلیدی: اکتومیکوریزا، بلوط، رشد، فیزیولوژی، میکوریز آرباسکولار.

مقدمه

تعامل میکوریزایی، رابطهٔ همزیستی میان ریشه‌های گیاهان آوندی و گروه ویژه‌ای از قارچ‌های خاک است. این رابطهٔ همزیستی، پدیده‌ای بسیار گسترده است که در بیش از ۸۰ درصد گونه‌های گیاهی زمینی رخ می‌دهد و در راستای سازگارسازی گیاهان با اکوسیستم‌های خشکی، بهینه‌سازی تغذیه گیاه و کیفیت خاک تکامل یافته است [۱، ۲]. در حال حاضر یک‌سوم از اراضی زمین به‌دلیل خشک بودن شدید برای رشد گیاهان و تولیدات آنها مناسب نیستند و پیش‌بینی می‌شود که گرم شدن همه‌گیر زمین گسترش خشکی را افزایش خواهد داد [۳]؛ از این‌رو تلاش برای یافتن راهبردهای سازگارسازی با تغییرات اقلیمی که

* نویسندهٔ مسئول، تلفن: ۰۲۱۴۴۷۸۷۲۸۵
Email: mzamani@rifr-ac.ir

می‌تواند بقا و رشد درختان را در اکوسیستم‌های تخریب‌شده بهبود ببخشد و موجب جنگلکاری‌های سریع این نواحی و احیای آنها شود در سراسر جهان در حال اجراست. از جمله راهکارهای تخفیف تأثیرات تغییرات فراگیر اقلیمی می‌تواند تا حدودی از طریق ریزش کربن در خاک به‌دست آید. همزیستی میکوریزایی ممکن است اثر مهمی در انتقال کربن به خاک داشته باشد، چراکه بخش اساسی از محصول هضم کربن توسط گیاهان میکوریزایی به درون خاک، یعنی محل حضور زیست‌توده شریک قارچی ارسال می‌شود.

گونه‌های بلوط (*Quercus sp.*) از مهم‌ترین و فراوان‌ترین درختان پهن‌برگ اکوسیستم‌های جنگلی، از جمله جنگل‌های ایران‌اند که از نظر اقتصادی و اکولوژیکی اهمیت بسیار زیادی دارند. این جنس در نواحی شمالی البرز و در رشته‌کوه زاگرس در غرب ایران گسترش دارد. بلوط بلندمازو (*Q. castaneifolia* C.A.Mey.) از گونه‌های درختی مهم در شمال ایران است و پراکنش وسیعی در جنگل‌های هیرکانی دارد. این گونه در صنایع مختلف نیز کاربردهای فراوانی دارد [۴] و با توجه به اهمیت اکولوژیکی و نیز ارزش زیاد اقتصادی و زیست‌محیطی آن، باید در کنار احیای مناطق مخروبه، به افزایش کیفی نهال‌های استفاده‌شده در این مناطق نیز توجه شود. برقراری همزیستی میکوریزایی در این گیاه از مهم‌ترین راهکارها برای بهینه‌سازی رشد و افزایش مقاومت آنها به تنش‌های مختلف محیطی است. با وجود درک اهمیت درختان بلوط، تاکنون تحقیق چندانی در خصوص تأثیر (مثبت یا منفی) تلقیح میکوریزایی کنترل‌شده بر رشد و فیزیولوژی گیاهان بلوط ایران صورت نگرفته است.

در این تحقیق، افزون‌بر شناسایی و معرفی برخی قارچ‌های میکوریزِ همراه درختان بلوط جنگل‌های شمال کشور، همزیستی میکوریزایی آرباسکولار و نیز اکتومیکوریزایی روی گیاهچه‌های کشت‌بافتی بلوط بلندمازو تلقیح شده و امکان استقرار این همزیستی‌ها و نیز میزان سودمندی این تعاملات در رشد، نمو و وضعیت فیزیولوژیکی میزبان در مقایسه با گیاهچه‌های شاهد گزارش شد.

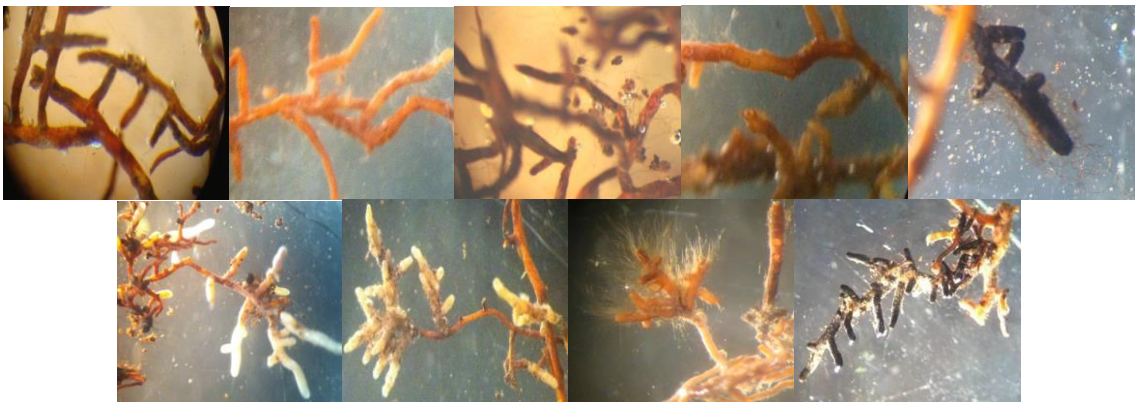
مواد و روش‌ها

شناسایی گونه‌هایی از قارچ‌های میکوریز درختان بلوط در جنگل‌های شمال ایران

ریشه‌های درختان بلوط هیرکانی (*Q. castaneifolia*، *Q. macranthera* Fisch. & C.A.Mey. و Q. petraea L.) از شش رویشگاه بلوط شامل جنگل‌های خیرود و بینشکی در استان مازندران، سیاهکل و شفارود در استان گیلان و لوه و توسکستان در استان گلستان جمع‌آوری شد. از هر رویشگاه از ده پایه از درختان گونه(های) بلوط موجود با رعایت پراکنش مناسب (حداقل ۵۰ متر) به‌صورت تصادفی انتخاب و از قسمت سایه‌انداز درخت، نمونه‌هایی از خاک به‌همراه ریشه از ریزوسفر هر گیاه بلوط جمع‌آوری شد. تحت مشاهدات میکروسکوپی، نوک‌ریشه‌های میکوریزایی با خصوصیات مورفولوژیکی مشابه (مانند رنگ، خصوصیات سطح، نحوهٔ انشعاب‌یافتگی و غیره) به دسته‌های مشخص (مورفوتایپ) تقسیم (شکل ۱) و از مورفوتایپ غالب هر نمونه تعدادی نوک‌ریشه (دست‌کم پنج عدد) برای استخراج DNA و تشخیص مولکولی قارچ‌های همزیست به‌کار گرفته شد.

استخراج DNA توسط پروتکل CTAB (Cethyl Three methyl Amonium Bromide) صورت گرفت [۵]. برای تکثیر ناحیهٔ ITS از DNA ریبوزومی قارچ‌های تشکیل‌دهندهٔ غلاف (اکتومیکوریزا)، آغازگرهای مورد استفاده ITS1F و ITS4 بودند [۵]. تکنیک PCR آشیانه‌ای برای تکثیر ناحیهٔ ITS از DNA ریبوزومی قارچ‌های میکوریز آرباسکولار (قارچ‌های بدون غلاف) توسط

آغازگرهای LSU-Glom1 و SSU-Glom1 (در PCR I) و ITS5 و ITS4 (در PCR II) انجام گرفت [۶]. الکتروفورز با ژل آگارز ۲ درصد انجام گرفت و باندهای تکی و مشخص تعیین توالی شدند.



شکل ۱. برخی مورفوتایپ‌های مشاهده‌شده از ریشه‌های درختان بلوط تحت مشاهدات میکروسکوپی

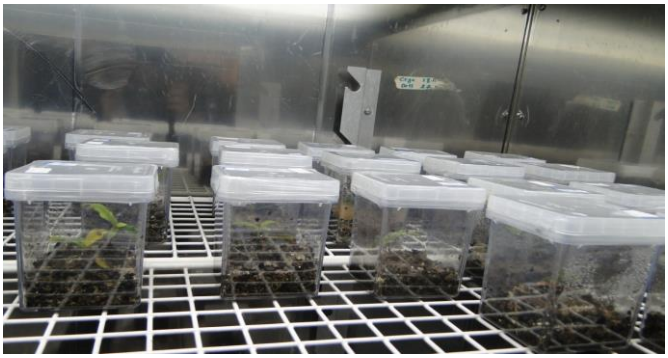
توالی‌های به‌دست‌آمده با الگوریتم BLASTN با توالی‌های نوکلئوتیدی پایگاه GenBank مقایسه و نزدیک‌ترین توالی به‌عنوان توالی مرجع انتخاب شد. به‌منظور یافتن جایگاه تاکسونومیکی توالی‌ها، درخت تشابه برای هر یک از آنها ترسیم شد. توالی‌های نوکلئوتیدی هر نمونه به‌همراه مشابه‌ترین توالی‌های پایگاه داده با برنامهٔ ClustalX هم‌ردیف و تنظیم شدند. مدل تکاملی مربوط با استفاده از نرم‌افزارهای PAUP و MrModeltes2 انتخاب شد. آنالیز فیلوژنی و ترسیم درخت تبارشناسی مربوط با روش بیس (Bayes) توسط نرم‌افزار MrBayes v. 3.12 انجام گرفت.

برقرار کردن همزیستی میکوریزایی روی گیاهچه‌های کشت بافتی *Quercus castaneifolia*

تلقیح گیاهچه‌های *Quercus castaneifolia* توسط قارچ میکوریز

تکثیر گیاهچه‌های *Quercus castaneifolia* از طریق کشت بافت صورت گرفت. برای شاخه‌زایی گیاهچه‌ها از محیط WPM (Woody Plant Medium) حاوی mg/lit ۰/۳ از سیتوکینین BAP (6-Benzylaminopurine) استفاده شد. به‌منظور ریشه‌زایی، شاخه‌های تولیدشده به محیط WPM با غلظت نصف از املاح نیترات و عناصر ماکرو و حاوی هورمون ریشه‌زایی اکسین (۰/۱ mg/l از NAA :Naphthalene Acetic Acid) و (۰/۳ mg/l از IBA :3-Indolebutyric acid) منتقل و پس از دو هفته ریشه‌دار شدند. نگهداری کشت‌ها در اتاقک‌های رشد تحت دمای ۲۵-۲۳ درجهٔ سانتی‌گراد و دورهٔ نوری ۱۶ ساعت نور (۵۰۰۰ -۳۰۰۰ لوکس) و ۸ ساعت تاریکی صورت گرفت.

برای برقراری همزیستی میکوریزایی آرباسکولار از انتقال گیاهچه‌های ریشه‌دارشده و هم‌اندازهٔ بلوط به ظروف پلی‌اتیلنی (Magentea) حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر سوبسترای پیت- ورمیکولیت (۱: ۲) استفاده شد (شکل ۲) که تا حد ظرفیت زراعی (حدود ۵۰ تا ۶۰ میلی‌لیتر) توسط محلول غذایی Long Ashton مرطوب شده بودند [۷]. مایهٔ تلقیح قارچی *Glomus mosseae* (T. H. Nicolson & Gerd.) Gerd. & Trappe (=Funneliformis mosseae) (تهیه‌شده از شرکت زیست فناور توران شاهرود) به‌مقدار ۲۵ گرم به خاک اطراف ریشهٔ گیاهچه‌های بلوط اضافه شد. در ظروف شاهد ۲۵ گرم از نمونهٔ قارچ که سه بار اتوکلاو شده بود استفاده شد [۷، ۸].



شکل ۲. برقرارسازی همزیستی میکوریزایی آرباسکولار روی *Quercus castaneifolia* در آزمایشگاه

برای برقراری همزیستی اکتومیکوریزایی قارچ *Hebeloma sinapizans* (Paulet) Gillet نیز از انتقال گیاهچه‌های ریشه‌دار و هم‌اندازهٔ بلوط به ظروف پلی‌اتیلنی Magentea حاوی سوبسترای پیت- ورمیکولیت (با نسبت ۱: ۴) استفاده شد (شکل ۳) که توسط محیط مایع MMN مرطوب و توسط قارچ اکتومیکوریز به‌مدت شش هفته کاملاً کلونیزه شده بودند [۹]. گیاهچه‌ها با شرایط ذکرشده به‌مدت چهارده هفته نگهداری شدند [۱۰].

شکل ۳. برقرارسازی همزیستی اکتومیکوریزایی روی *Quercus castaneifolia* در آزمایشگاه

روش دیگر برای برقراری همزیستی آرباسکولار روی گیاهچه‌های بلندمازو شامل انتقال گیاهچه‌های ریشه‌دار به گلدان‌های محتوی مخلوط خاک و ماسه سترون (۲:۱) و تلقیح ریشه با قارچ *G. mosseae* به‌مقدار ۵۰ گرم بود (شکل ۴). گیاهچه‌ها به‌همراه گلدان‌های مربوط در داخل کیسه‌های پلاستیکی شفاف برای حفظ رطوبت در گلخانه نگهداری شدند و بعد از گذشت دو هفته از زمان انتقال، سازگاری با هوادهی روزانه به‌تدریج شروع شد [۷، ۸].

شکل ۴. برقرارسازی همزیستی میکوریزایی آرباسکولار روی *Quercus castaneifolia* در گلخانه

بررسی تأثیر همزیستی میکوریزایی بر خصوصیات فیزیولوژیکی و رویشی *Quercus castaneifolia*

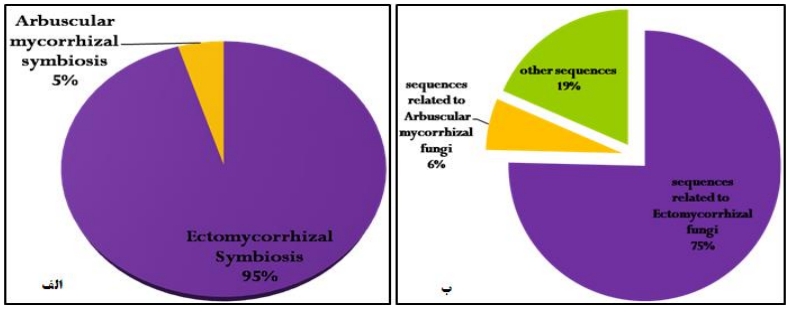
گیاهچه‌ها در طرح کاملاً تصادفی با دو تیمار، تلقیح با قارچ میکوریز (قارچ *G. mosseae* و *H. sinapizans*) و عدم تلقیح کشت شدند. چهارده هفته پس از تلقیح پانزده گیاهچه از هر تیمار به‌طور تصادفی انتخاب و با قیچی به دو قسمت شاخوبرگ و ریشه تقسیم شدند. برای مشاهدات میکروسکوپی (بزرگنمایی ۴۰X) رنگ‌آمیزی ریشه‌ها به روش فیلیپس و هایمن انجام گرفت. شاخوبرگ نهال‌ها برای ارزیابی رشد شاخوبرگ و نیز پارامترهای فیزیولوژیکی و ساختاری برگ استفاده شد که برای مورد اخیر از هر گیاه داده‌های مربوط به جوان‌ترین و گسترش‌یافته‌ترین برگ یادداشت شد [۲]. طول شاخه و تعداد برگ‌ها در هر گیاه ارزیابی شد. جهت اندازه‌گیری میزان کلروفیل و سطح برگ به ترتیب از دستگاه کلروفیل‌متر (Chlorophyll Content Meter) و دستگاه اندازه‌گیری سطح برگ (Leaf Aerea Meter) استفاده شد. برای اندازه‌گیری وزن خشک شاخه، بافت به‌مدت ۴۸ ساعت در آون ۶۰ درجهٔ سلسیوس قرار داده شد. وضعیت آبی گیاهان با اندازه‌گیری محتوای نسبی آب برگ (Leaf Relative Water Content) تخمین زده شد [۲]. توزیع نرمال داده‌ها با آزمون کولموگروف- اسمیرنوف ($P=0.05$) تأیید شد. نتایج با نرم‌افزار SPSS و در قالب طرح آزمایش فاکتوریل GLM برپایهٔ طرح کاملاً تصادفی تجزیه شد و مقایسهٔ میانگین‌ها به روش آزمون چنددامنه‌ای دانکن برای هر متغیر در سطح ۰/۰۱ انجام گرفت.

نتایج و بحث

شناسایی گونه‌هایی از قارچ‌های میکوریز درختان بلوط در جنگل‌های شمال ایران

در مجموع ۲۱۷ سیستم ریشه‌ای از رویشگاه‌های تحت مطالعه جمع‌آوری شد. ۱۸۳ عدد دارای همزیستی اکتومیکوریزایی قابل تمایز و ۹ عدد محتمل به شرکت در همزیستی آرباسکولار بودند. پس از استخراج DNA از مورفوتایپ غالب این ریشه‌ها، ۶۵ عدد توسط پرایمرهای قارچی تکثیر شدند و توالی‌های DNA خالص تولید کردند. پس از مطابقت دادن این توالی‌ها با توالی‌های پایگاه داده GenBank و UNITE با استفاده از آنالیز بلاست، مشخص شد که ۴۹ عدد با تاکسون‌های قارچ‌های اکتومیکوریز [۱۱] و ۴ عدد با تاکسون‌هایی از قارچ‌های اندومیکوریز مطابقت داشتند و ۱۲ عدد هم دارای توالی‌های مرتبط با قارچ‌های ساپروفیت، پارازیت یا قارچ‌هایی که میکوریز بودن آنها در ابهام است بودند. این نتایج در شکل ۵ خلاصه شده است.

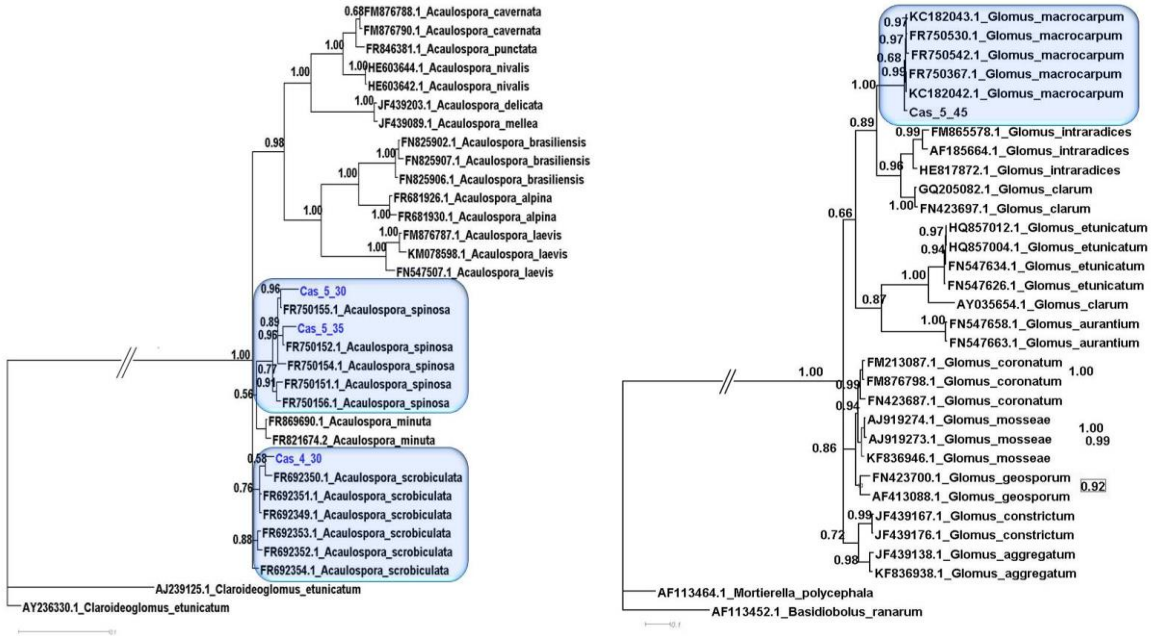
مشخص شد که ۴۹ تاکسون اکتومیکوریز به سیزده جنس (*Amanita*، *Boletus*، *Cortinarius*، *Hebeloma*، *Hydnum*، *Hygrophorus*، *Inocybe*، *Laccaria*، *Lactarius*، *Lycoperdon*، *Russula*، *Scleroderma* و *Tricholoma*) [۱۱] و چهار تاکسون اندومیکوریز به دو جنس تعلق دارند (جدول ۱).



شکل ۵. نسبت همزیستی اکتومیکوریزایی و همزیستی آرباسکولار در مجموع سیستم ریشه‌ای تحت مطالعه (الف) و نتایج حاصل از شناسایی مولکولی قارچ‌های همزیست ریشه بلوط بلندمازو (ب)

جدول ۱. نتایج شناسایی مولکولی قارچ‌های میکوریز آرباسکولار همراه ریشه‌های بلوط جنگل‌های شمال ایران

ردیف	گونهٔ بلوط	رویشگاه	کد مورفوتایپ	طول (bp)	بیشترین مشابهت	کد دسترسی	درصد تشابه
۱	*Q. castaneifolia*	بینشکی	Cas-4-30	609	*Acaulospora scrobiculata*	FR692351	98%
۲	*Q. castaneifolia*	لوه	Cas-5-30	652	*Acaulospora spinosa*	FR750155	99%
۳	*Q. castaneifolia*	لوه	Cas-5-35	596	*Acaulospora spinosa*	FR750152	100%
۴	*Q. castaneifolia*	لوه	Cas-5-45	617	*Glomus macrocarpum*	FR750530	99%



شکل ۶. درخت فیلوژنی حاصل از آنالیز داده‌های مربوط به ناحیهٔ ITS جنس *Acaulospora* و *Glomus* به روش *Bayesian* (اعداد کنار شاخه به احتمال پسین بیزین (BPP) مربوط هستند)

درخت‌های فیلوژنتیکی هریک از جنس‌ها به‌همراه موقعیت تاکسونومیکی هریک از تاکسون‌ها در شکل ۶ آمده است.

شناسایی مولکولی قارچ‌های میکوریز در مناطق مختلفی از جهان با اهداف اقتصادی یا اکولوژیکی در حال اجراست. به‌خصوص در دو دههٔ اخیر، تکنیک‌های مولکولی تکثیرِ DNA برای حل چالش‌های اکولوژیکی و سیستماتیکی مرتبط با شناسایی ارگانیسم‌های با قرابت نزدیک، به‌خصوص وقتی داده‌های مورفولوژیکی کمک‌کننده یا به‌قدر کافی متمایزکننده نبوده، به‌کار گرفته شده است [۱۲]. در تحقیق حاضر نیز استفاده از توالی ناحیهٔ ITS rDNA به‌عنوان ابزاری دقیق و ارزشمند برای شناسایی قارچ‌های میکوریز در عرصه‌های جنگلی ایران تأیید شد.

در آنالیزهای بلاست مقدماتی این تحقیق مشخص شد که توالی ناحیهٔ ITS قارچی تکثیرشده از سه مورفوتایپ مرتبط با اعضای جنس *Acaulospora* است. پس از آنالیزهای فیلوژنتیکی این تحقیق، رابطهٔ نزدیک مورفوتایپ Cas-4-30 با گونهٔ تیپ *A. scrobiculata* با کد FR692350 مشخص شد. این نمونه تیپ در سال ۲۰۱۱ توسط Oehl و همکاران آنالیز فیلوژنتیکی شده [۱۳] و توالی ناحیهٔ ITS آن در پایگاه دادهٔ NCBI قرار داده شده است. مورفوتایپ Cas-4-30 با این گونهٔ تیپ کلاد مونوفایلتیکی را ایجاد کرد که به لحاظ معتبر بودن آن

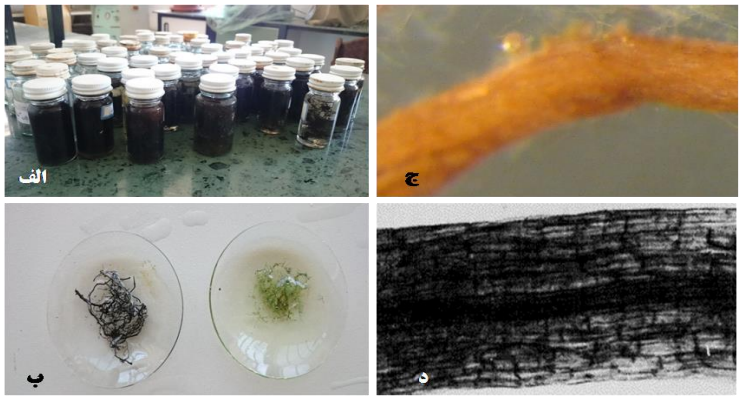
موجب شناسایی این مورفوتایپ به‌عنوان گونهٔ *A. scrobiculata* شد. مورفوتایپ Cas-5-30 با تاکسون *Acaulospora spinosa* (FR750155) و Cas-4-35 نیز با تاکسون *A. spinosa* (FR750152) معرفی‌شده توسط Kruger و همکاران [۱۴]، گروهی مونوفایلتیک با حمایت زیاد ایجاد کرد که موجب تأیید شناسایی این مورفوتایپ‌ها به‌عنوان گونهٔ *Acaulospora spinosa* شد. همچنین در میان نوک‌ریشه‌های میکوریزایی بلوط، قارچ میکوریز یک مورفوتایپ با کد Cas-5-45 بیشترین تشابه (۹۹ درصد) را با گونهٔ *Glomus macrocarpum* با کد دسترسی FR750530 که توسط Kruger و همکاران [۱۴] براساس داده‌های مولکولی معرفی شده داشت. این مورفوتایپ پس از آنالیزهای فیلوژنتیکی گروهی مونوفایلتیک با حمایت ۹۹ درصد را با نمونه‌های Kruger و همکاران [۱۴] و نیز دیگر نمونه‌هایی از این گونه ایجاد کرد و بدین ترتیب شناسایی آن به‌عنوان گونهٔ *G. macrocarpum* میسر شد.

به این ترتیب این بررسی نشان داد که مشابه گروه‌های گزارش‌شده در دیگر اقلیم‌ها معتدل [۱۲]، در کنار جمعیت متنوعی از قارچ‌های اکتومیکوریز در جنگل‌های هیرکانی به‌همراه درختان بلوط [۱۱] جمعیت‌هایی از قارچ‌های میکوریز آرباسکولار نیز در این جنگل‌ها قابل ردیابی است. همچنین مشخص شد که گونهٔ گیاهی بلوط یا زیستگاه موجب بروز تغییراتی در توزیع قارچ‌های میکوریز در سطح ریشه‌ها شده‌اند. برای مثال برخلاف قارچ‌های اکتومیکوریز که از روی هر سه گونه بلوط یافت شدند [۱۱]، قارچ‌های میکوریز آرباسکولار ترجیح مشخصی را در کلونیزه کردن گونهٔ بلوط *Q. castaneifolia* نشان دادند؛ اگرچه به‌دلیل استقرار و گسترش گونه‌های مختلف بلوط در زیستگاه‌های مختلف و حتی ارتفاعات مختلف یک زیستگاه، امکان تمایز تأثیر جداگانهٔ نوع میزبان گیاهی و نوع زیستگاه بر تنوع جمعیت قارچ‌های میکوریز میسر نبود. طبق گزارش‌های به‌دست‌آمده از دیگر محققان، هم نوع زیستگاه و خصوصیات خاک آن و هم نوع میزبان گیاهی می‌تواند توزیع تاکسون‌های میکوریزایی را تغییر دهد [۱۲]. برای کامل شدن این تحقیق، بررسی‌های بیشتری لازم است تا تأثیر جایگاه تاکسونومیکی، توزیع جغرافیایی و تفاوت اکولوژیکی درختان بلوط را در اختصاصیت میزبانی میکوریزایی بهتر تفکیک کند.

برقرار کردن همزیستی میکوریزایی روی گیاهچه‌های کشت بافتی *Quercus castaneifolia*

تلقیح گیاهچه‌های *Quercus castaneifolia* توسط قارچ میکوریز

پس از برقراری همزیستی آرباسکولار روی گیاهچه‌های بلوط، استخراج و رنگ‌آمیزی ریشه‌های تلقیح‌شده (شکل ۷، الف و ب) مشخص شد، در روش Wang و همکاران [۷] که در آن گیاه و قارچ میکوریز آرباسکولار در محیط پیت: پرلیت در ظروف Magentea کشت می‌شدند و همچنین در کشت گلخانه‌ای همزیستی میکوریزایی آرباسکولار، ساختار آرباسکول در سیستم ریشه‌ای میزبان پس از رنگ‌آمیزی مشاهده نشد (شکل ۷ د)، اما در مشاهدات صورت‌گرفته با استریومیکروسکوپ از ریشهٔ نهال *Q. castaneifolia* در هر دو روش کشت همزیستی، هیف‌های VAM (Vesicular Arbuscular Mycorrhizal) ناشی از جوانه‌زنی اسپور دیده شد (شکل ۷، ج).



شکل ۷. همزیستی گیاهچه‌های *Quercus castaneifolia* و قارچ *Glomus mossae*.

الف: استخراج ریشه‌های مورد تلقیح؛ ب: رنگ‌آمیزی ریشه‌ها؛ ج: مشاهده ریشه‌ها با استریومیکروسکوپ؛ د: مشاهدهٔ ریشه‌ها با میکروسکوپ

در بیشتر تحقیقات و توصیف‌های دیگر محققان از برقراری همزیستی میکوریزایی آرباسکولار روی گونه‌های بلوط نیز آرباسکول مشاهده نشد (تحقیق Dickie و همکاران [۱۵] روی نهال‌های *Q. rubra*) یا به میزان بسیار کمی تشکیل شد (مطالعهٔ Watson و همکاران [۱۶] روی نهال‌های *Q. rubra* و *Q. palustris*). همچنین Rothwell و همکاران [۱۷] گزارش کردند که وزیکول‌ها و هیف‌های *Glomus* sp. موجب تلقیح بلوط *Q. imbricaria* می‌شوند، اما آرباسکول‌ها پیچیدگی‌های هیفی را مشاهده نکردند و همانند آنچه در تحقیق حاضر مشاهده شد، تنها مقداری از هیف‌های میکوریزایی و اسپورها در اطراف ریشه قابل مشاهده بودند. به‌طور مشابه Ocampo [۱۸] تلقیح میکوریزایی آرباسکولار را به‌طور معمول در گیاهان غیرمیکوتروف مشاهده کرد، اما تنها هیف‌ها و اسپورها را یافت. نبود آرباسکول‌ها ممکن است بیان‌کنندهٔ نبود پاسخ‌های رشدی و تغذیه‌ای گیاهچه‌های بلندمازو به همزیستی میکوریزایی آرباسکولار باشد. توضیح اینکه همزیستی میکوریزایی آرباسکولار به‌صورت مرحله به مرحله و در حضور سیگنال‌های مشتق‌شده میزبان گیاهی مناسب برقرار می‌شود [۱۹]. در قارچ‌های میکوریزایی آرباسکولار، چندین مرتبه متوالی جوانه‌زنی اسپور و پس‌گیری هسته‌ها و سیتوپلاسم ممکن است اتفاق بیفتد؛ بدین ترتیب که جوانه‌زنی اسپور به‌طور خودبه‌خود در غیاب میزبان گیاهی مناسب اتفاق می‌افتد، اما اگر قارچ ریشهٔ میزبان را به‌منظور کلونیزه کردن آن حس نکند، کل لولهٔ تندشی دیواره‌دار شده و محتوای آن به داخل کشیده می‌شود و اسپور به حالت غیرفعال بازمی‌گردد. گفته شده است که ژنی به نام *GmGIN1* کدکنندهٔ یک پروتئین دارای همولوژی با پروتئین‌های هیج‌هاگ (hedgehog) با فعالیت GTPase در این مرگ سلولی برنامه‌ریزی‌شدهٔ هیفی دخیل است و این ممکن است به‌دلیل نبود ترکیبات میزبانی محرک یا آزاد شدن ترکیبات بازدارنده در حضور ریشه‌های غیرمیزبان اتفاق بیفتد [۱۹].

اما برخلاف همزیستی میکوریزایی آرباسکولار مشاهده شد که ساختارهای مرتبط با همزیستی اکتومیکوریزایی در محیط هیدروپونیک با استفاده از پیت و ورمیکولیت به‌عنوان سوبسترا به‌خوبی تشکیل شدند (شکل ۸). برقراری همزیستی اکتومیکوریزایی در این روش براساس تشکیل ریشه‌های کوتاه اکتومیکوریزایی (یا همان ریشه‌های جانبی) که کوتاه‌تر و ضخیم‌ترند، حضور هیف‌های سفید-کرم، شل و مجعد در اطراف ریشه‌های جانبی *Q. castaneifolia* که از خصوصیات غلاف قارچی جنس *Hebeloma* است و نبود ریشه‌های مویین تأیید شد [۹].

شکل ۸. همزیستی میان گیاهچه‌های *Quercus castaneifolia* و قارچ اکتومیکوریز *Hebeloma sinapizans*
الف: استخراج ریشه‌های مورد تلقیح؛ ب: مشاهده ریشه‌ها با استریومیکروسکوپ

بررسی تأثیر همزیستی میکوریزایی بر خصوصیات فیزیولوژیکی و رویشی *Quercus castaneifolia*

تلقیح اکتومیکوریزایی گیاهچه‌های بلندمازو تأثیر مثبتی بر رشد گیاهچه‌ها در مقایسه با گیاهچه‌های غیرمیکوریزایی داشت (جدول ۲). این یافته مطابق با نتایج تحقیقات روی دیگر گونه‌های گیاهی است که نشان‌دهندهٔ تأثیرات سودمند کلونیزاسیون اکتومیکوریزایی شامل افزایش رشد، افزایش پتانسیل فتوسنتز و بهبود تغذیهٔ گیاه است [۲]. اما شواهدی از تأثیر مثبت معنی‌دار تلقیح قارچ میکوریز آرباسکولار به گیاهچه‌های بلندمازو به‌دست نیامد (جدول ۲ و شکل ۹). با توجه به مشاهده نشدن ساختارهای آرباسکول درون ریشهٔ میزبان این نتیجه دور از انتظار نبود؛ چراکه آرباسکول‌ها اصلی‌ترین سایت‌های تبادل غذایی میان قارچ‌های میکوریز آرباسکولار و میزبان‌های گیاهی‌اند [۱]. نتایج پژوهش‌های Dickie و همکاران [۱۵] در برقراری همزیستی میکوریزایی آرباسکولار روی بلوط *Q. rubra* نیز نشان‌دهندهٔ تأثیرات مثبت اندکی در جذب مواد غذایی و رشد نهال‌های میزبان گیاهی است.

جدول ۲. تأثیر قارچ میکوریز آرباسکولار *Glomus mossae* و اکتومیکوریز *Hebeloma sinapizans* روی خصوصیات فیزیولوژیکی و رویشی گیاهچه‌های *Quercus castaneifolia*؛ چهارده هفته پس از تلقیح

تیمار	تعداد برگ	سطح برگ (cm2)	زیست‌توده برگ (mg)	ارتفاع ساقه (cm)	زیست‌توده ساقه (mg)	کلروفیل (μg cm^{-2})	محتوای نسبی آب (٪)
گیاه اکتومیکوریزایی	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}	۳۲/۳±۲/۱۲ ^{a}	۷۹/۸±۱/۶۱ ^{a}
گیاه اندومیکوریزایی	۱۰/۳±۲/۰۲ ^{a}	۲/۲۴±۰/۱۳ ^{b}	۲۱/۶۶±۱/۵۸ ^{b}	۴/۸۳±۰/۳۱ ^{a}	۷۰/۸±۳/۲۶ ^{b}	۲۲/۵۳±۱/۳۹ ^{b}	۷۵/۷±۱/۵۶ ^{b}
گیاه 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}	۲۴/۲۳±۱/۶۹ ^{b}	۷۴/۸±۱/۴۴ ^{b}

حروف نامشابه در هر ستون بیانگر اختلاف معنی‌دار است.

شکل ۹. گیاهچه‌های *Quercus castaneifolia* شاهد (راست)، تلقیح‌شده با قارچ اکتومیکوریز *Hebeloma sinapizans* (وسط) و تلقیح‌شده با قارچ میکوریز آرباسکولار *Glomus mossae* (چپ)؛ چهارده هفته پس از تلقیح

اندازه‌گیری محتوای کلروفیل برگ (به‌عنوان شاخص سنجش میزان فتوسنتز) نشان‌دهندهٔ افزایش معنی‌دار این رنگدانه‌های فتوسنتزی در گیاهچه‌های اکتومیکوریزایی نسبت به گیاهچه‌های شاهد بود (جدول ۲) که این مسئله موجب جذب فعال‌تر نور و فتوسنتز بیشتر در گیاهچه‌های تلقیح‌شده می‌شود که تجلی آن افزایش معنی‌دار سطح برگ و وزن خشک شاخ و برگ اندازه‌گیری‌شده در این آزمایش‌ها بود. درحالی که در مورد گیاهچه‌های تلقیح‌شده با قارچ میکوریز آرباسکولار، محتوای کلروفیل برگ کمتر از گیاهان غیرمیکوریزایی بود. افزایش کلروفیل و در نتیجه فعالیت فتوسنتزی در گیاهان تلقیح‌شده توسط افزایش جذب عناصر غذایی مانند نیتروژن و فسفر در گیاهان میزبان همزیستی یا درخواست زیاد کربن از جانب قارچ در ریشه‌های کلونیزه‌شده توجیه‌پذیر است. در واقع سودمندی همزیستی میکوریزایی برای گیاه میزبان زمانی حاصل می‌شود که میان درخواست قارچ برای انرژی و نیاز گیاه برای عناصر غذایی و آب تعادل برقرار شود. درحالی که در تحقیق حاضر و نیز برخی دیگر پژوهش‌ها مشاهده شده است که قارچ‌های میکوریز تحت بررسی موجب کاهش رشد گیاهان میزبان شده‌اند. برای مثال در این تحقیق، تلقیح همزیستی میکوریزایی آرباسکولار موجب کاهش تعداد برگ و نیز ارتفاع ساقه شد که این مسئله مربوط به نبود تعادل بین ارسال کربن به قارچ و دریافت عناصر غذایی از قارچ است. در واقع در این وضعیت ممکن است ارسال کربن به بافت‌های همزیست زیرزمینی برای رشد قارچ صورت گیرد، درحالی که در پاسخ به‌دلیل نگهداری و ابقای عناصر غذایی در میسلیوم قارچی، افزایشی در فتوسنتز میزبان رخ نمی‌دهد [۲۰].

برخلاف آنچه در مورد همزیستی میکوریزایی آرباسکولار ذکر شد، در این بررسی مشخص شد که پس از کلونیزاسیون ریشهٔ *Q. castaneifolia* توسط قارچ *H. sinapizans* تعادل میان انتقال کربن و دریافت عناصر غذایی برقرار شده و این همزیستی تنها به‌منزلهٔ دریافت یکطرفهٔ کربن از گیاه میزبان برای قارچ نیست، چراکه افزایش سطح برگ، وزن خشک شاخ و برگ، تعداد برگ و طول ساقه و نه کاهش در زیست‌توده (یا غلظت کربن و دیگر عناصر) هوایی گیاه در مقایسه با گیاهان کنترل مشاهده شد. همچنین افزایش معنی‌دار محتوای نسبی آب در گیاهچه‌های بلوط اکتومیکوریزایی دلیل دیگری برای اثبات این تعادل میان تعاملات قارچ و گیاه است، چراکه تغذیهٔ کافی گیاهان میزبان موجب افزایش کارایی و بازده دستگاه فتوسنتزی می‌شود که در بازگشت در صورت ثابت ماندن نرخ تعرق، بازده استفاده از آب (water use efficiency) افزایش خواهد یافت.

نتیجه‌گیری کلی

در تحقیق حاضر به‌کارگیری توالی ناحیهٔ ITS rDNA به‌مثابهٔ راهکاری ارزشمند برای شناسایی قارچ‌های میکوریز همزیست با درختان در عرصه‌های جنگلی کشور تأیید شد. براساس این روشِ شناساییِ قارچ‌های همزیست، مشخص شد که در کنار جمعیت متنوعی که از قارچ‌های اکتومیکوریز در جنگل‌های هیرکانی به همراه درختان بلوط وجود دارد، جمعیت‌هایی از قارچ‌های میکوریز آرباسکولار نیز در این جنگل‌ها همراه بلوط قابل ردیابی است. توجه به این گروه از موجودات همزیست که با میزبان گیاهی و نیز با محیط خود در حالت تعادل به سر می‌برند و از عناصر اصلی اکوسیستم‌های جنگلی محسوب می‌شوند، برای رسیدن به توسعهٔ پایدار در جنگل‌ها ضروری است و تنها با بهره‌برداری برنامه‌ریزی‌شده و اصولی از آنها می‌توان به توسعهٔ پایدار دست یافت.

همچنین نتایج آزمایش‌های این تحقیق نشان داد که در مقایسهٔ دو نوع همزیستی میکوریزایی (آرباسکولار میکوریزا و اکتومیکوریزا)، میان گیاه *Q. castaneifolia* و قارچ

اکتومکیوریز *H. sinapizans* تعاملات و در نتیجه سازگاری بیشتری وجود دارد و می‌توان از این همزیستی اکتومیکوریزایی برای بهبود وضعیت فیزیولوژیکی میزبان در طی جنگل‌کاری‌ها و احیای مناطق آسیب‌دیده استفاده کرد.

References

[1]. Spatafora, J. W., Chang, Y., Benny, G. L., Lazarus, K., Smith, M. E., Berbee, M. L., Bonito, G., Corradi, N., Grigoriev, I., Gryganskyi, A., James, T. Y., O'Donnell, K., Roberson, R. W., Taylor, T. N., Uehling, J., Vilgalys, R., White, M. M., and Stajich, J. E. (2016). A phylum-level phylogenetic classification of Zygomycete fungi based on genome-scale data. Mycologia, 108(5): 1028-1046.

[2]. Domínguez Núñez, J. A., Planelles González, R., Rodríguez Barreal, J. A., and Saiz de Omeñaca González, J. A. (2008). 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.

[3]. 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.

[4]. Sabeti, H. (1994). *Forests, trees and shrubs of Iran*. University of Yazd, Iran, p 810. (In Persian).

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

[6]. Renker, C., Heinrichs, J., Kaldorf M., and Buscot F. (2003). Combining nested PCR and restriction digest of the internal transcribed spacer region to characterize arbuscular mycorrhizal fungi on roots from the field. Mycorrhiza, 13: 191–198.

[7]. Wang, H., Parent, S., Gosselin, A., and Desjardins, Y. (1993). Vesicular-arbuscular mycorrhizal peat-based substrates enhance symbiosis establishment and growth of three micropropagated species. Journal of the American Society for Horticultural Science, 118(6): 896-901.

[8]. Kapoor, R., Sharma, D., and Bhatnagar, A. K. (2008). Arbuscular mycorrhizae in micropropagation systems and their potential applications. Scientia Horticulturae, 116: 227-239.

[9]. Oh, K.I., Melville, L.H., and 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.

[10]. Repac, I. (2011). Ectomycorrhizal inoculum and inoculation techniques. In: Rai, R., and Varma, A. (Eds.), Diversity and biotechnology of ectomycorrhizae. Soil Biology Series. Springer, Berlin, pp 43-63.

[11]. Zamani, S.M., Mohammadi Goltapeh, M., Safaei N., and Pedram, M. (2018). Diversity of ectomycorrhizal fungi recovered from the roots of oak trees in northern forests of Iran. Iranian Journal of Forest and Poplar Research, 26(3): 291-305.

[12]. Toju, H., Yamamoto, S., Sato, H., Tanabe, A., Gilbert, G., and Kadowaki, K. (2013). Community composition of root-associated fungi in a Quercus-dominated temperate forest: "codominance" of mycorrhizal and root-endophytic fungi. Ecology and Evolution, 3:1281–1293.

[13]. Oehl, F., Sykorova, Z., Blaszkowski, J., Sanchez-Castro, I., Coyne, D., Tchabi, A. Lawouin, L., Hountondji, F.C.C., and DaSilva, G.A. (2011). *Acaulospora sieverdingii*, an ecologically diverse new fungus in the Glomeromycota, described from lowland temperate Europe and tropical West Africa. Journal of Applied Botany and Food Quality, 84 (1): 47-53.

[14]. Kruger, M., Krüger, C., Walker, C., Stockinger, H., and Schüßler, A. (2012). Phylogenetic reference data for systematics and phylotaxonomy of arbuscular mycorrhizal fungi from phylum to species-level. New Phytologist, 193: 970-984.

[15]. Dickie, I.A., Koide, R.T., and Fayish, A.C. (2001). Vesicular–arbuscular mycorrhizal infection of *Quercus rubra* seedlings. New Phytologist, 151: 257–264.

[16]. Watson, G.W., von der Heide-Spavka, K.G., and Howe, V.K. (1990). Ecological significance of endo-ectomycorrhiza in the oak sub-genus *Erythrobalanus*. Arboriculture Journal, 14: 107–116.

[17]. Rothwell, F.M., Hacskaylo, E., and Fisher, D. (1983). Ecto- and endomycorrhizal fungus associations with *Quercus imbricaria* L. Plant and Soil, 71: 309–312.

[18]. Ocampo, J.A., Martin, J., and Hayman, D.S. (1980). Influence of plant interactions on vesicular–arbuscular mycorrhizal infections. I. Host and nonhost plants grown together. New Phytologist, 84: 27 –35.

[19]. Harrison, M.J. (2005). Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. Annual Review of Microbiology, 59: 19–42.

[20]. Correa, A., Strasser, R., and Martins-Loucao, M. (2006). Are mycorrhiza always beneficial? Plant Soil, 279: 65-73.

Investigation of mycorrhizal symbiosis of oak trees (*Quertcus* sp.) in the northern forests of Iran

S. M. Zamani∗; Assist., Prof., Research Institute of Forests and Rangelands, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, I.R. Iran

M. Matinizadeh; Assoc., Prof., Research Institute of Forests and Rangelands, Agriculture Research Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, I.R. Iran

(Received: 25 October 2020, Accepted: 18 March 2021)

ABSTRACT

Due to the special position of mycorrhizal fungi in improving the physiological status of host plants and increasing their resistance to environmental stresses, this study was conducted to explain the mycorrhizal symbiosis of oak trees (*Quercus* sp.) in northern forest of Iran and their biological effects on *Q. castaneifolia*. In order to identify mycorrhizal fungi associated with oak trees, mycorrhizal root tips of hosts were collected and then the fungal internal transcribed spacer (ITS) regions were amplified and sequenced. Phylogenetic analysis of sequences was performed by Bayesian method. A total of 217 root systems were collected from the studied habitats and 49 taxa from ectomycorrhizal fungi (including 13 genera of *Amanita*, *Boletus*, *Cortinarius*, *Hebeloma*, *Hydnum*, *Hygrophorus*, *Inocybe*, *Laccaria*, *Lactarius*, *Lycoperdon*, *Russula*, *Scleroderma* and *Tricholoma*) and 4 taxa of Arbuscular mycorrhizal fungi (including *Acaulospora* and *Glomus*) were identified among them. In the next step, the symbiosis of *Q. castaneifolia* plantlets with Arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* and *Hebeloma sinapizans* ectomycrrhizal fungus were performed. Measurement of physiological characteristics, growth and water status of the inoculated plant in comparison with the control plant showed that the development of ectomycorrhizal symbiosis on oak plantlets significantly increased stem biomass, leaf biomass, leaf area and chlorophyll and also improved seedlings water content; However, there was no evidence of a significant positive effect of inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi on *Q. castaneifolia* plantlets. Therefore, considering the improvement of water status, increase of growth and biomass and modification of physiological characteristics of the plant inoculated with ectomycorrhizal fungus, establishing this symbiosis can be introduced as a more appropriate approach to increase the success of planting in *Q. castaneifolia* forests restoration programs.

Keywords: Arbuscular mycorrhizal symbiosis, Ectomycorrhizas, Growth, Oak, Physiology.

∗ Corresponding author: Tel; 02144787285 , Email: mzamani@rifr-ac.ir