دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی
جلد بیست و هفتم، شماره سوم، ۱۳۹۹
۲٤۹-۲٦٤
http://jopp.gau.ac.ir
DOI: 10.22069/jopp.2020.16777.2537

اثر همزیستی سه نوع قارچ اکتومیکوریز و باکتری کمک‌کننده همزیست (*Bacillus cereus*) بر جذب عناصر غذایی و رشد در کاج سیاه (*Pinus nigra*)

شنو امینی[۱]، *معظم حسن‌پور اصیل[۲]، جمالعلی الفتی جیرانی[۳] و صدیقه موسی‌نژاد[۴]

[۱]دانشجوی دکتری گیاهان زینتی، گروه باغبانی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران،
[۲]استاد گروه باغبانی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران،
[۳]دانشیار گروه باغبانی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران،
[۴]استادیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۳/۲۵؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۵/۲۱

چکیده

سابقه و هدف: میکوریزا از رایج‌ترین و قدیمی‌ترین ارتباط‌های همزیستی در سلسله گیاهی است. امروزه مشخص شده است که قارچ‌های میکوریز به روش‌های مستقیم، مانند بهبود تغذیه گیاه از طریق جذب عناصر غذایی و هم‌چنین افزایش جذب آب توسط گیاه و غیرمستقیم، مانند کاهش تنش‌های زیستی و غیرزیستی سبب افزایش رشد گیاه میزبان می‌گردند. درختان کاج از محبوب‌ترین درختان در فضای سبز و جنگل‌ها هستند که دارای همزیستی اجباری با اکتومیکوریزاها می‌باشند. هدف از پژوهش حاضر، بررسی همزیستی سه نوع قارچ خوراکی اکتومیکوریز (*Cantharellus cibarius, Amanita caesarea, Boletus edulis*) و باکتری (*Bacillus cereus*) با کاج سیاه می باشد.

مواد و روش‌ها: این آزمایش به‌صورت طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. تیمارها عبارت بودند از: شاهد، باکتری باسیلوس سرئوس، قارچ‌های اکتومیکوریز چنترلا، بولتوس و آمانیتا و تیمارهای ترکیبی (قارچ+باکتری). دانهال‌های ٦۰ روزه کاج سیاه توسط قارچ و باکتری تلقیح شدند و بعد از ۱۵ ماه بررسی صفات مورد نظر انجام شد. صفات مورد بررسی عبارت از درصد میکوریزاسیون ریشه، ارتفاع بوته، قطر ساقه، وزن خشک ساقه و ریشه، میزان کلروفیل و درصد جذب عناصر نیتروژن، فسفر، پتاسیم و کلسیم بودند.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که درصد میکوریزاسیون به‌طور معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد تحت‌تأثیر تیمارها قرار گرفت. بیش‌ترین (٦۱/۳۲ درصد) و کم‌ترین (١٤ درصد) درصد میکوریزاسیون به‌ترتیب توسط بولتوس+باسیلوس و قارچ چنترلا به‌دست آمد. جذب عناصر پتاسیم، نیتروژن و فسفر، کلروفیل a و کل، ارتفاع بوته و وزن خشک ساقه و ریشه به‌طور معنی‌داری تحت‌تأثیر تیمارها قرار گرفتند؛ درحالی‌که تفاوت چشمگیری از لحاظ قطر ساقه، جذب کلسیم و کلروفیل b در بین تیمارها مشاهده نشد. تمامی تیمارهای ترکیبی (باکتری+قارچ) به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای ارتفاع بوته، وزن خشک ساقه، کلروفیل کل و جذب عناصر نیتروژن و پتاسیم را نسبت به شاهد افزایش دادند. هم‌چنین تیمارهای ترکیبی بولتوس+باسیلوس و آمانیتا+باسیلوس تأثیر

* مسئول مکاتبه: hassanpour1@gmail.com

مثبتی در افزایش جذب فسفر، میزان کلروفیل a و وزن خشک ریشه داشتند. در خصوص تیمارهای جداگانه، نتایج نشان داد که فقط قارچ بولتوس در افزایش وزن خشک ساقه و جذب پتاسیم و فسفر مؤثر بود. در سایر موارد تفاوت معنی‌داری بین تیمارها و شاهد مشاهده نشد. بیش‌ترین و کم‌ترین مقدار صفات مورد ارزیابی نیز به‌ترتیب توسط تیمار بولتوس+باسیلوس و شاهد به‌دست آمد.

نتیجه‌گیری: یافته‌های این پژوهش نشان داد که هر سه نوع قارچ اکتومیکوریز به‌خصوص قارچ بولتوس با گیاهچه‌های کاج سیاه، همزیستی داشتند. این همزیستی توسط باکتری کمک‌کننده همزیستی باسیلوس بهبود یافت و تلقیح کمکی باکتری باسیلوس با قارچ‌های مورد مطالعه بیش‌ترین تأثیر را در افزایش میکوریزاسیون، جذب عناصر و رشد کاج سیاه داشتند.

واژه‌های کلیدی: آمانیتا، بولتوس، چنترلا، درصد میکوریزاسیون، کلروفیل

مقدمه

میکوریزا از رایج‌ترین و قدیمی‌ترین ارتباط‌های همزیستی در سلسله گیاهی است به‌طوری‌که بیش‌تر گیاهان آوندی (حدود ۸۶ درصد) حداقل یکی از گونه‌های میکوریزایی را دارا هستند (۸). قارچ‌های میکوریز قادر هستند که با ریشه اغلب گیاهان خشکی‌زی همزیستی مسالمت‌آمیزی برقرار نمایند. بر اثر این همزیستی هر دو طرف قارچ و گیاه منتفع شده و به رشد و زندگی یکدیگر کمک می‌کنند (۵). برخی از باکتری‌ها موجب تسریع شکل‌گیری ساختار میکوریزایی می‌شوند که به آن‌ها باکتری کمک‌کننده همزیستی[1] گفته می‌شود (۲۷). باکتری‌ها از دو طریق می‌توانند موجب افزایش رابطه همزیستی شوند: ۱- با افزایش ساختار میکوریزایی و ۲- با تسریع تشکیل ساختار میکوریزایی (۱۵). جنس‌ها و گونه‌های بسیاری از باکتری‌ها به‌عنوان کمک کننده همزیستی اندو و اکتومیکوریزایی گزارش شده‌اند (۱۳). قارچ زرد خوراکی *Cantharellus cibarius* یک قارچ قیفی طلایی رنگ است که در شمال‌شرقی آمریکا، کالیفرنیا و شمال‌غربی اقیانوس آرام به‌طور طبیعی رشد می‌کند و دارای ارتباط همزیستی با گیاهان می‌باشد و هم‌چنین یکی از مهم‌ترین قارچ‌های خوراکی وحشی در شمال ایران است که در بهار در جنگل‌های کاج و بلوط دیده می‌شوند (۲۹). در سال ۱۹۹۷ برای اولین بار همزیستی این نوع قارچ با کاج گلدانی اسکاتلندی[2] در گلخانه مورد بررسی قرار گرفت ولی تلاش‌های بعدی برای ایجاد این نوع همزیستی ناموفق بود (۱۸). جنس *Amanita spp.* در سراسر جهان بیش از ۵۰۰ گونه دارد که به‌صورت همزیستی با تعدادی از گیاهان از جمله کاجیان (کاج، سدر، نوئل و نراد) به زندگی خود ادامه می‌دهند و این جنس نیز یکی از مهم‌ترین قارچ‌های خوراکی وحشی در شمال ایران است که در جنگل‌های مخروطیان (سوزنی‌برگان[3]) و بلوط در شمال ایران دیده شده است (۲۹). این جنس توسط اندام‌های بشقابی زرد کم‌رنگ که بدون ساقه هستند و اسپورهای سفید رنگ شناسایی می‌شوند (٤٤). *Boletus edulis* نیز یکی از مهم‌ترین گروه‌های قارچی به‌دلیل اهمیت اقتصادی و زیست‌محیطی است (۳۵). این گروه از قارچ‌ها نیز دارای همزیستی اکتومیکوریزایی با چند خانواده گیاهی از جمله کاج‌سانان می‌باشد و در سراسر جهان به‌عنوان قارچ خوراکی وحشی شناخته شده است (۱۰ و ۱۱). همزیستی این نوع قارچ نیز با

1- Mycorrhiza helper bacteria(MHB)

2- *Pinus sylvestris*

3- Conifers

گیاهان به نوبه خود می‌تواند موجب بهبود رشد در گیاهان شود. در مطالعه‌ای که به بررسی تأثیر همزیستی قارچ‌های اکتومیکوریزای بولتوس بر جذب مواد مغذی و رشد کاج سیاه ژاپنی پرداختند به این نتایج پی بردند که، این نوع همزیستی موجب افزایش جذب فسفر و پتاسیم توسط گیاه میزبان شد و هم‌چنین صفات ریخت‌شناسی مانند: طول ساقه، قطر ساقه و زیست توده به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (٤٢).

سوزنی‌برگان، در رده بازدانگان[1] قرار دارند و به گیاهانی که دارای برگ‌های سوزنی‌شکل و چوبی نرم بوده و اکثراً همیشه سبز می‌باشند اطلاق می‌شود (٢٨). درختان کاج[2] از محبوب‌ترین درختان در فضای سبز و جنگل‌ها هستند که دارای همزیستی اجباری با اکتومیکوریزاها می‌باشند و برای رشد، استمرار و استقرار مدیون همین اکتومیکوریزاها هستند (٦). درختان و درختچه‌های زینتی فضای شهری به‌دلیل ارزش زیبایی، تفریحی و اقتصادی از جایگاه ویژه‌ای برخوردار می‌باشند. مطالعات مربوط به بررسی اهمیت میکوریزا در فضای سبز شهری بسیار محدود است، اما این احتمال وجود دارد که این نوع قارچ‌ها و این نوع همزیستی برای سلامت و رشد درختان زینتی فضای شهری و از جمله سوزنی‌برگان بسیار ضروری باشد (٣١).

کاج سیاه[3] یا کاج اتریش یکی از گیاهان راسته سوزنی برگان و از جنس‌های مهم خانواده کاجیان می‌باشد که به‌طور گسترده به‌منظور گیاه زینتی و جنگل‌کاری کاشته می‌شود (١٤). طی پژوهش‌هایی که در فوق به آن‌ها اشاره شد، کاج سیاه از همزیستی مسالمت‌آمیزی با برخی از میکوریزاها برخوردار است.

1- Gymnosphermae
2- *Pinuss spp*
3- *Pinus nigra*

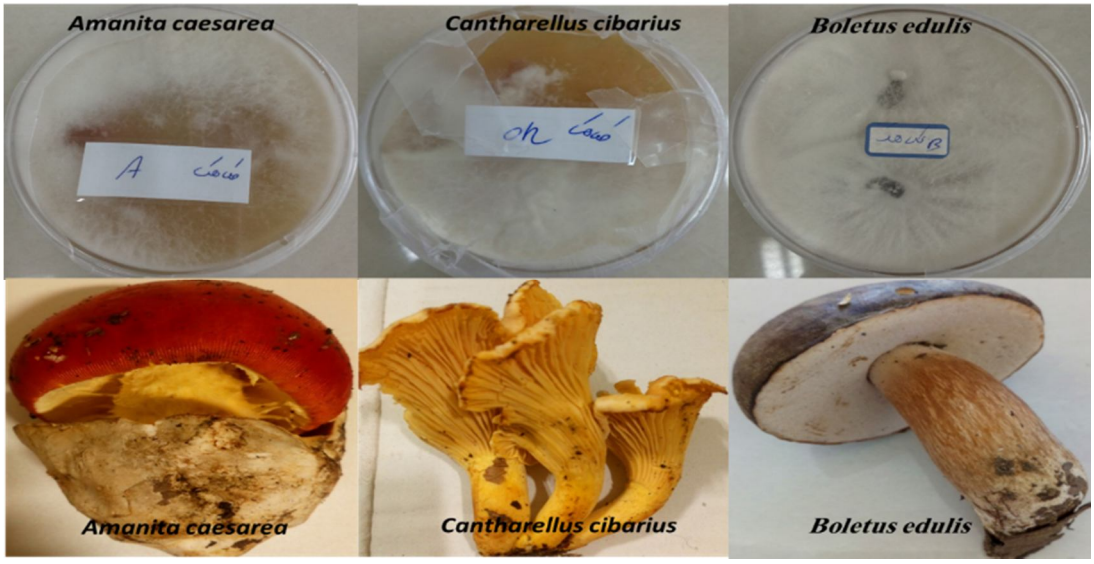
تاکنون هیچ مطالعه‌ای در خصوص همزیستی کاج سیاه با قارچ‌های اکتومیکوریزای وحشی خوراکی مثل قارچ زرد خوراکی و آمانیتا صورت نگرفته است. بنابراین هدف از انجام این پژوهش بررسی اثر همزیستی قارچ‌های اکتومیکوریز بولتوس، چنترلا و آمانیتا و باکتری کمک‌کننده همزیستی *Bacillus cereus* بر جذب عناصر غذایی و رشد در کاج سیاه می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این آزمایش به‌منظور اثر همزیستی سه نوع قارچ اکتومیکوریز و باکتری کمک‌کننده همزیستی بر جذب عناصر غذایی و رشد کاج سیاه در طی سال‌های ١٣٩٦ تا ١٣٩٨ انجام شد. تیمارهای اعمال شده عبارت بودند از: شاهد (بدون تیمار)، یک تیمار باکتری (باسیلوس)، سه تیمار قارچ (آمانیتا، بولتوس و چنترلا) و سه تیمار ترکیبی (آمانیتا+باسیلوس، بولتوس+باسیلوس و چنترلا+باسیلوس). برای هر واحد آزمایشی چهار گلدان و در مجموع ٩٦ گلدان در نظر گرفته شد.

جمع‌آوری قارچ‌های اکتومیکوریز: در تاریخ ٢٣ مهر ماه سال ١٣٩٦ نمونه‌های زنده قارچ‌های بولتوس، آمانیتا و کانترلیوس (چنترلا) از جنگل‌های سراوان و لاکان رشت، استان گیلان جمع‌آوری شدند و بلافاصله به آزمایشگاه انتقال داده شدند. ابتدا در آزمایشگاه توسط اتانول ٧٠ درصد ضدعفونی سطحی گردیدند و از لایه داخلی محل اتصال کلاهک و پایه چند تکه (٢ تا ٧ میلی‌متر) تهیه گردید و روی محیط کشت جامد MMN[4] کشت شدند (٢٣) و جهت رشد میسلیوم (شکل ١) به‌مدت دو هفته در انکوباتور با دمای ٢٥ درجه سانتی‌گراد و تاریکی قرار داده شدند (٢٠ و ٢١).

4- Modified Melin Norkrans



شکل ۱- میسلیوم‌های رشدیافته در محیط کشت MMN. بالا؛ قارچ‌های اکتو میکوریز ؛پایین.

Fig. 1.; growsed mycelium in MMN medium, Up; Ectomycorrhizal fungi, Down.

تهیه مایه تلقیح: جهت تهیه مایه تلقیح قارچ، ابتدا سوبسترایی از ورمیکولیت[1]، پیت[2] و پوست پنبه دانه[3] (به نسبت ٤:١:١) تهیه گردید، سپس سوبسترای آماده شده با محیط کشت مایع MMN مرطوب شد (به نسبت ٢:١) و در ظرف‌های شیشه‌ای توزیع شد. هر شیشه حاوی ١٥٠ سی‌سی از بستر موردنظر بود که در اتوکلاو در دمای ١٢١ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ٩٠ دقیقه استریل گردید. سپس در هر شیشه، سه تکه ٥ میلی‌متری از میسیلیوم قارچ‌ها به‌صورت جداگانه قرار داده شد و شیشه‌ها در تاریکی و دمای ٢٥ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ١٠ روز نگهداری شدند (٤٢).

آماده‌سازی باکتری کمک کننده همزیستی: باکتری کمک‌کننده همزیستی (*B.cereus* ATCC 11778) به‌صورت لیوفیلیزه، از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد. سپس باکتری در شرایط کاملاً استریل روی محیط کشت NA[4] فعال و در محیط مایع عصاره گوشت کشت شدند (٤٢).

آماده‌سازی بستر کشت: بستر کشت حاوی ترکیب خاکی ورمیکولیت، ماسه و خاک باغچه با نسبت ٩:٢:١ بود که به‌مدت ٩٠ دقیقه با اتوکلاو در دمای ١٢١ درجه سانتی‌گراد استریل شد. برخی از خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک عبارت بودند از: بافت لومی شنی، اسیدیته ٦/٨٥، کربن آلی ٠/٧٨ درصد، میزان نیتروژن کل ٧/٥ گرم بر کیلوگرم، فسفر کل ٤/٢ گرم بر کیلوگرم، پتاسیم کل ٩/١ گرم بر کیلوگرم و درصد هدایت الکتریکی ٠/٢٩ دسی‌زیمنس بر متر بود. گلدان‌های مورد استفاده در شرایط دمایی ١٢١ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ٩٠ دقیقه اتوکلاو شد.

جوانه‌زنی بذر: بذور کاج سیاه از مرکز تحقیقات کشاورزی مازندران تهیه و توسط محلول آب اکسیژنه ١٠ درصد به‌مدت ٣٠ دقیقه ضدعفونی و بعد از شستشو با آب مقطر در گلدان‌های حاوی خاک استریل کشت شدند. گلدان‌ها به‌مدت ٦٠ روز در اتاقک رشد با شرایط دمایی ٢٥ درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ٦٠ درصد و شرایط نوری ١٢ ساعت روشنایی و ١٢ ساعت تاریکی جهت جوانه‌زنی قرار گرفتند.

1- Vermiculite
2- Peat
3- Seed cotton– shells
4- Nutrient Agar

تلقیح با باکتری و قارچ اکتومیکوریز: گیاهچه‌های ٦٠ روزه توسط تیمارهای باکتری و یا قارچ تلقیح شدند. در هر گلدان یک گیاهچه نگهداری شد و در محل ریشه به نسبت ۱ به ۱۰ وزنی از مایه تلقیح قارچ قرار گرفت، سپس ۵ میلی‌لیتر محلول باکتری با غلظت 10^{7} cfu/ml[1] در اطراف گیاهچه تزریق شدند (٤٢). گلدان‌ها در اتاقک رشد با شرایط نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ٦٠ درصد به‌مدت دو ماه نگه‌داری و سپس به گلخانه منتقل شد.

صفات مورد بررسی

درصد کلونیزاسیون ریشه: ۱۵ ماه بعد از کشت گیاه و تلقیح با قارچ و باکتری بررسی صفات انجام شد. برای ارزیابی درصد کلونیزاسیون ریشه از روش وو و همکاران (۲۰۱۲) استفاده شد. بدین‌منظور ابتدا ریشه‌ها با آب معمولی و سپس با آب مقطر به‌طور کامل شستشو داده شدند. ریشه‌های شسته‌شده به قطعاتی به طول یک سانتی‌متر برش داده شدند و ۱۰۰ قطعه از آن‌ها در زیر میکروسکوپ برای ارزیابی کلونیزاسیون ریشه‌ها مورد بررسی قرار گرفتند. در نهایت درصد کلونیزاسیون ریشه‌ها مطابق رابطه زیر محاسبه شد (٤٢).

$$\text{درصد کلونیزاسیون ریشه} = \frac{\text{تعداد ریشه‌های کلونیزه شده}}{\text{کل قطعات ریشه}} \times 100 \qquad (۱)$$

میزان کلروفیل برگ: برای محاسبه غلظت کلروفیل a، b و کل از روش آرنون استفاده شد (۳). سپس مقدار کلروفیل a، b و کل با استفاده از رابطه‌های زیر برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن‌تر بافت محاسبه شد.

جذب عناصر غذایی توسط گیاه: به‌منظور اندازه‌گیری درصد جذب عناصر غذایی توسط گیاه، ابتدا اندام‌های هوایی و زیرزمینی از هم جدا شدند و به‌مدت ۷۲ ساعت جهت خشک کردن در آون با دمای ٦٠ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. اندام‌های هوایی توسط آسیاب خورد و جهت سوزاندن و به‌دست آوردن خاکستر در دمای ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس نمونه‌های خاکستر با استفاده از کلریدریک اسید ۱۵ درصد عصاره‌گیری شدند (۱). برای تعیین مقدار عناصر به‌جز نیتروژن، از این عصاره استفاده شد. مقدار فسفر در عصاره‌ها به روش رنگ‌سنجی و با کمک دستگاه اسپکتروفتومتر (۳۰) اندازه‌گیری و به‌صورت میلی‌گرم در گرم وزن خشک بیان شد. میزان پتاسیم و کلسیم نیز به کمک دستگاه فلیم‌فتومتر اندازه‌گیری و به‌صورت میلی‌گرم در گرم وزن خشک ثبت شد. میزان نیتروژن با استفاده از دستگاه کجلدال و با هضم توسط سولفوریک اسید و سولفات پتاسیم اندازه‌گیری و در نهایت به‌صورت درصد ثبت گردید (٤٢).

صفات ریخت‌شناسی: ۱۵ ماه پس از کشت، گیاهچه‌ها از گلدان خارج و صفات ریخت‌شناسی مانند: ارتفاع ساقه، قطر ساقه، وزن خشک ریشه و وزن خشک ساقه اندازه‌گیری شد. اندازه گیری ارتفاع با خط‌کش و اندازه‌گیری قطر ساقه با کولیس دیجیتالی انجام شد. جهت اندازه‌گیری وزن خشک ریشه و اندام هوایی، اندام‌های مذکور در انکوباتور در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ٤٨ ساعت خشک شدند و سپس وزن خشک آن‌ها با ترازوی دیجیتالی با دقت یک صدم اندازه‌گیری و برحسب گرم ثبت شد (۱۹).

تجزیه و تحلیل داده‌ها: این آزمایش به‌صورت طرح کاملاً تصادفی با هشت تیمار، سه تکرار و ٢٤ واحد آزمایشی انجام شد. داده‌های آزمایشی با استفاده از نرم‌افزار SAS تجزیه و تحلیل شدند و برای مقایسه

1- Colony-forming unit

میانگین‌ها از آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد استفاده شد. برای رسم نمودارها از نرم‌افزار اکسل استفاده شد.

نتایج و بحث

درصد میکوریزاسیون ریشه: نتایج جدول تجزیه واریانس نشان می‌دهد بین قارچ‌های مختلف از لحاظ درصد میکوریزاسیون ریشه کاج سیاه تفاوت معنی‌داری وجود دارد (جدول ۱). نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بیش‌ترین میزان میکوریزاسیون (۶۱/۳۳ درصد) مربوط به تیمار ترکیبی بولتوس+باسیلوس و بعد از آن (۵۳/۶۷ درصد) مربوط به قارچ بولتوس بود. کم‌ترین میزان میکوریزاسیون (۱۴ درصد) نیز در تلقیح با قارچ چنترلا مشاهده شد (شکل ۲). در هر سه نوع قارچ مورد مطالعه، تلقیح ترکیبی با باکتری موجب بهبود درصد میکوریزاسیون شد. بیش‌ترین تأثیر باکتری در ترکیب با قارچ چنترلا دیده شد و به‌طور چشمگیری میزان میکوریزاسیون را نسبت به تیمار این قارچ به تنهایی افزایش داد. در سایر گزارش‌ها نیز تأثیر مثبت باکتری‌های کمک‌کننده همزیستی بر افزایش همزیستی قارچ‌های اکتومیکوریز مورد مطالعه در گونه‌های مختلف کاج گزارش شده است (۲، ۱۶ و ۴۲). برخی از باکتری‌های خاکزی می‌توانند همزیستی میکوریزایی را تحت‌تأثیر قرار دهند، باکتری‌های گرم مثبت خاک مانند *B. cereus*، موجب بهبود همزیستی میکوریزایی می‌شوند (۳۴ و ۲۶). در این پژوهش نشان داده شد که فعالیت میکوریزایی قارچ توسط باکتری باسیلوس تحریک می‌شود. این احتمال وجود دارد که باکتری باسیلوس به‌عنوان یک ریزوباکتر تسریع‌کننده رشد گیاه، از طریق ترشح هورمون، موجب افزایش رشد ریشه‌های میکوریزایی شود (۴۲). رقابت بین باکتری و قارچ بر سر کلونیزه کردن بستر می‌تواند بر درصد میکوریزاسیون تأثیر داشته باشد (۴). به‌نظر می‌رسد که باکتری‌های کمک‌کننده همزیستی، در مراحل اولیه عمل می‌کنند و قبل از تشکیل میکوریزاسیون، موجب بهبود قدرت پذیرش قارچ توسط گیاه می‌شوند (۴).

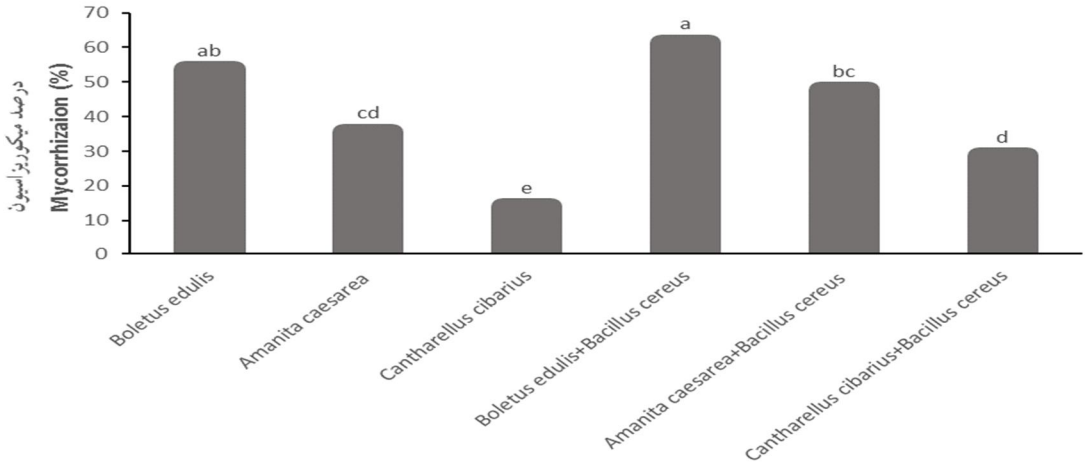
جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس اثر قارچ‌های اکتومیکوریز بر میزان میکوریزاسیون در کاج سیاه بر اساس میانگین مربعات.

Table 1. Results of analysis of variance of the effect of ectomycorrhizal fungus on the amount of mycorrhization in black pine based on means squares (MS).

منبع تغییرات S.O.V.	درجه آزادی df	میانگین مربعات MS
تیمار Treatment	5	914.23**
خطا Error	12	58.44
کل Total	17	-
ضریب تغییرات (درصد) C.V (%)	-	19.03

** اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد.

** Significant difference at 1% Probability level.



شکل ۲- نتایج مقایسه میانگین اثر قارچ‌های اکتومیکوریز بر درصد میکوریزاسیون کاج سیاه. میانگین‌های با حروف مشترک تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD ندارند.

Fig. 2. Results of means comparison of the effect of ectomycorrhizal fungus on the amount of mycorrhization in black pine. Means followed by the same letter are not significantly different by LSD test (P<0.05).

جذب عناصر غذایی

فسفر: نتایج تجزیه واریانس میزان جذب عنصر فسفر در اندام هوایی گیاهچه‌های کاج سیاه نشان داد بین تیمارهای مختلف از لحاظ جذب عنصر فسفر در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری وجود دارد (جدول ۲). نتایج مقایسه میانگین‌ها بیانگر آن است که بیش‌ترین میزان جذب فسفر (۲/۳۷ میلی‌گرم بر گرم)، مربوط به تیمار ترکیبی بولتوس+باسیلوس است و کم‌ترین (۱/۷۵ میلی‌گرم بر گرم) نیز در تیمار شاهد مشاهده شد (جدول ۳). تیمارهای ترکیبی قارچ‌های بلوتوس و یا آمانیتا همراه با باکتری و هم‌چنین تیمار بلوتوس به تنهایی، به‌طور چشمگیری میزان جذب فسفر را نسبت به شاهد و هم‌چنین نسبت به تیمار باکتری به تنهایی افزایش دادند. تلقیح ترکیبی باکتری کمک کننده همزیستی با قارچ‌های مورد مطالعه اگرچه میزان جذب فسفر را افزایش نمود ولی تفاوت چشمگیری در این خصوص بین تیمارهای ترکیبی و قارچ‌ها به تنهایی وجود نداشت.

پتاسیم: در مورد عنصر پتاسیم، بین تیمارهای مختلف در سطح احتمال ۱ درصد تفاوت معنی‌دار می‌باشد (جدول ۲). نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد تیمارهای ترکیبی باکتری به همراه هر یک از قارچ‌ها و هم‌چنین تیمارهای قارچ بولتوس به تنهایی میزان جذب پتاسیم را به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش دادند. تیمارهای ترکیبی نسبت به تیمارهای تکی قارچ‌ها موجب افزایش جذب پتاسیم شدند ولی تفاوت معنی‌داری در این خصوص بین آن‌ها وجود نداشت. بیش‌ترین میزان جذب پتاسیم (۱۱/۳۰ میلی گرم بر گرم) در اثر تیمار ترکیبی بولتوس+باسیلوس و کم‌ترین مقدار آن نیز (۸/۳۰ میلی گرم بر گرم) توسط تیمار شاهد به‌دست آمد (جدول ۳).

نیتروژن: جذب عنصر نیتروژن به‌طور معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد تحت‌تأثیر تیمارها قرار گرفت (جدول ۲). نتایج مقایسه میانگین‌ها در این خصوص نشان داد که تمامی تیمارهای ترکیبی قارچ و باکتری

میزان جذب نیتروژن را به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش دادند. کاربرد ترکیبی باکتری با قارچ بلوتوس نسبت به کاربرد جداگانه قارچ و یا باکتری و تیمار ترکیبی باکتری با قارچ چنترلا نسبت به کاربرد جداگانه باکتری به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای جذب نیتروژن را در گیاهچه‌های کاج سیاه افزایش دادند. بیش‌ترین میزان جذب نیتروژن (۱/۳۱ درصد) توسط تیمار ترکیبی بولتوس+باسیلوس و کم‌ترین مقدار آن نیز (۰/۹۷ درصد) توسط تیمار شاهد به‌دست آمد (جدول ۳).

کلسیم: در رابطه با عنصر کلسیم، اثر تیمارهای مختلف بر میزان کلسیم گیاهچه‌های کاج سیاه در سطوح مختلف معنی‌دار نشد (جدول ۲). تمامی تیمارهای اعمال شده به‌غیر از تیمار باکتری (٤/٥٧ میلی‌گرم بر گرم)، میزان جذب کلسیم را به مقدار اندکی نسبت به شاهد (٤/٦٥ درصد) افزایش دادند ولی تفاوت قابل‌ملاحظه‌ای در این خصوص بین تیمارها مشاهده نشد (جدول ۳).

هر سه نوع قارچ اکتومیکوریز مورد مطالعه باعث افزایش جذب عناصر غذایی نیتروژن، فسفر و پتاسیم در گیاهچه‌های کاج سیاه شدند و افزایش جذب عناصر غذایی در غالب موارد توسط باکتری کمک‌کننده همزیستی بهبود یافت. تلقیح گیاه با دو یا سه میکروارگانیسم، موجب بهبود رابطه همزیستی و در نتیجه افزایش جذب عناصر غذایی می‌شود. این نتایج توسط یافته‌های پژوهشگران دیگری هم به اثبات رسیده است (٤٢ و ٢٣). قارچ‌های اکتومیکوریز موجب افزایش حلالیت عناصر غذایی غیرقابل‌دسترس و افزایش حضور عناصر در سطح جذب ریشه می‌شوند (۲). این قارچ‌ها هیدرولیز فسفر غیرآلی را کاتالیز می‌کنند و میزان جذب این عنصر را افزایش می‌دهند و همچنین ارگانیک اسیدهای ترشح‌شده توسط قارچ‌های اکتومیکوریز را با کاهش اسیدیته خاک و کم کردن یون‌های فلزی موجب آزادسازی فسفر از فرم آلی و غیرآلی می‌شود (۲). بیان آنزیم‌های فسفومونواسترازها[1] و فسفودی استرازها[2] توسط میکوریزا و قارچ اکتومیکوریز، نشان‌دهنده یک راهبرد مهم برای افزایش میزان فسفر قابل دسترس در یک رابطه همزیستی است (٤٠). تورک و همکاران (٢٠٠٦) بیان نمودند، نقش اصلی قارچ‌های میکوریزی تأمین فسفر برای ریشه گیاه است، زیرا فسفر در خاک عنصری فوق‌العاده کم تحرک است. حتی در صورتی که فسفر به شکل محلول به خاک اضافه شود، به سرعت به شکل فسفات کلسیم یا دیگر شکلهای تثبیت شده و به‌صورت غیرمتحرک در می‌آید. قارچ‌های اکتومیکوریز از دو طریق می‌توانند موجب افزایش جذب فسفر شوند: ۱. هیف‌ها، به‌طور مستقیم فسفر را از خاک جذب می‌کنند و آن را به گیاه میزبان خود می‌دهند، ۲. تلقیح، باعث تغییر شکل و خصوصیات زیست‌شیمیایی ریشه گیاه میزبان شده و در نتیجه جذب را بهبود می‌نماید (۳۷). هم‌چنین، نتایج پژوهش‌ها نشان داده است که گیاهان میکوریزایی، جذب نیتروژن را مانند فسفر افزایش می‌دهند، این افزایش جذب در گیاهان میکوریزایی حتی در شرایطی که فسفر خاک زیاد باشد، نیز دیده شده است (۱۷).

1- Phosphomonoesterases
2- Phosphodiesterases

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس اثر قارچ‌های اکتومیکوریز و باکتری کمک‌کننده همزیستی بر جذب عناصر غذایی در اندام هوایی کاج سیاه بر اساس میانگین مربعات.

Table 2. Results of analysis of variance of the effect of ectomycorrhizal fungus and mycorrhiza helper bacteria on nutrients uptake in aboveground of black pine based on means squares (MS).

کلسیم Ca	نیتروژن N	پتاسیم K	فسفر P	درجه آزادی df	منبع تغییرات S.O.V.
0.06^{ns}	0.04**	2.96**	0.17*	7	تیمار Treatment
0.09	0.01	0.56	0.06	16	خطا Error
-	-	-	-	23	کل Total
6.35	8.83	7.57	11.95	-	ضریب تغییرات (درصد) CV (%)

*، ** و ^{ns} به‌ترتیب نشان‌دهنده تفاوت معنی‌داری در سطوح احتمال ۵ درصد و ۱ درصد و غیرمعنی‌دار می‌باشند.

*, ** and ^{ns} respectively are significant difference at 5% and 1% Probability levels and not significant.

جدول ۳- نتایج مقایسه میانگین اثر قارچ‌های اکتومیکوریز و باکتری کمک‌کننده همزیستی، بر جذب عناصر غذایی در اندام هوایی کاج سیاه.

Table 3. Result of means comparison of the effect of ectomycorrhizal fungus and mycorrhiza helper bacteria on nutrients uptake in aboveground of black pine.

کلسیم (میلی‌گرم/گرم) Ca (mg/gr)	نیتروژن (درصد) N (%)	پتاسیم (میلی‌گرم/گرم) K (mg/gr)	فسفر (میلی‌گرم/گرم) P (mg/gr)	تیمارها Treatments
4.65^{a}	0.97^{d}	8.30^{d}	1.75^{c}	شاهد Control
4.57^{a}	0.99^{cd}	8.83^{cd}	1.77^{c}	*B. cereus*
4.84^{a}	1.14^{bcd}	10.17^{ab}	2.23^{ab}	*B. edulis*
4.77^{a}	1.13^{bcd}	9.53^{bcd}	2.05^{abc}	*A. caesarea*
4.75^{a}	1.14^{bcd}	9.6^{bcd}	1.93^{bc}	*C. cibarius*
4.97^{a}	1.31^{a}	11.30^{a}	2.37^{a}	*B. edulis+B. cereus*
5^{a}	1.16^{abc}	10.7^{ab}	2.34^{ab}	*A. caesarea+B. cereus*
4.84^{a}	1.28^{ab}	10.47^{ab}	2.03^{abc}	*C. cibarius+B. cereus*
0.53	0.17	1.29	0.43	LSD

میانگین‌هایی که در هر ستون و برای هر صفت دارای حروف مشابه هستند بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

Mean in each column and for each factor, followed by similar letters are not significant at 5% level of probability using LSD test.

همزیستی اکتومیکوریزایی موجب افزایش دسترسی گیاه به نیتروژن خاک می‌شود که این عمل از طریق شبکه میسیلیومی قارچ انجام می‌شود. تحریک جذب مواد غذایی توسط باکتری‌ها شاید با فعالیت کانی‌سازی آن‌ها در منطقه ریزوسفر ارتباط داشته باشد (۲). باکتری‌های کمک‌کننده رشد گیاهان دیازوتروف‌هایی

هستند که به‌صورت آزاد زندگی می‌کنند و می‌توانند توسط آنزیم نیتروژناز، نیتروژن مولکولی را به آمونیاک تبدیل کنند (۳۲). هم‌چنین قارچ‌های اکتومیکوریز بسیاری از آنزیم‌های هیدرولیتیک مختلف مانندپروتئاز، کیتیناز و گلوکوزیداز را تولید می‌کنند که این آنزیم‌ها به مواد آلی خاک حمله می‌کنند و میزان نیتروژن در دسترس گیاهان را افزایش می‌دهند (۹).

کلروفیل: نتایج تجزیه واریانس نشان داد که کلروفیل a و کل تحت‌تأثیر تیمارها قرار گرفتند، در صورتی‌که از لحاظ کلروفیل b بین تیمارها تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ٤). تیمارهای ترکیبی قارچ‌های بلوتوس و یا آمانیتا همراه با باکتری به‌طور چشمگیری میزان کلروفیل a و هم‌چنین تیمار تلفیقی باکتری با هر کدام از قارچ‌ها میزان کلروفیل کل را نسبت به شاهد افزایش نمودند. در هر سه نوع قارچ مورد مطالعه، تلقیح ترکیبی باکتری با قارچ موجب افزایش میزان کلروفیل a و کل شد، که بیش‌ترین تأثیر باکتری در ترکیب با قارچ آمانیتا مشاهده شد و به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای میزان کلروفیل را نسبت به تیمار جداگانه قارچ افزایش داد. کم‌ترین میزان کلروفیل a و کل توسط تیمار شاهد و بیش‌ترین میزان آن نیز در اثر تیمار ترکیبی بلوتوس+باکتری به‌دست آمد (جدول ۵).

در سایر مطالعات نیز افزایش میزان کلروفیل در گیاهان همزیست با قارچ‌های اکتومیکوریز گزارش شده است که با نتایج به‌دست آمده در این پژوهش مطابقت دارد (۲۵، ۳۸، ٤۱ و ٤۳). بهبود شرایط تغذیه‌ای و محیطی باعث افزایش توان گیاه در تولید کلروفیل می‌شود، هم‌چنین افزایش میزان کلروفیل در گیاهچه‌های تلقیح‌شده با قارچ‌های اکتومیکوریز می‌تواند ناشی از جذب فسفر از خاک توسط گیاه باشد (۳٦). نیتروژن جزو ساختار کلروفیل می‌باشد و نقش مهمی در تولید کلروفیل دارد (۱۲). افزایش میزان کلروفیل را می‌توان به افزایش جذب عناصر غذایی به‌خصوص عنصر نیتروژن مربوط دانست، که این مهم مطابق با نتایج به‌دست آمده در این پژوهش مبنی بر افزایش جذب عناصر غذایی توسط قارچ‌های اکتو میکوریز است.

جدول ٤- نتایج تجزیه واریانس اثر قارچ‌های اکتومیکوریز و باکتری کمک‌کننده همزیستی بر میزان کلروفیل برگ کاج سیاه بر اساس میانگین مربعات.

Table 4. Results of analysis of variance of the effect of ectomycorrhizal fungus and mycorrhiza helper bacteria on chlorophyll in black pine needles based on the means squares (MS).

منبع تغییرات S.O.V.	درجه آزادی df	کلروفیل a Chlorophyll a	کلروفیل b Chlorophyll b	کلروفیل کل Total chlorophyll
تیمار Treatment	7	0.009*	0.0008^{ns}	0.014**
خطا Error	16	0.003	0.0006	0.003
کل Total	23	-	-	-
ضریب تغییرات (درصد) CV (%)	-	8.216	11.25	6.122

*، ** و ^{ns} به‌ترتیب نشان‌دهنده تفاوت معنی‌داری در سطوح احتمال ۵ درصد و ۱ درصد و غیرمعنی‌دار می‌باشند.

*, ** and ^{ns} respectively are significant difference at 5% and 1% Probability levels and not significant.

جدول ۵- نتایج مقایسه میانگین اثر قارچ‌های اکتومیکوریز و باکتری کمک‌کننده همزیستی بر میزان کلروفیل برگ کاج سیاه.

Table 5. Results of means comparison of the effect of ectomycorrhizal fungus and mycorrhiza helper bacteria on chlorophyll in black pine needles.

کلروفیل کل (میلی‌گرم بر گرم) Total chlorophyll (mg/gr)	کلروفیل b (میلی‌گرم بر گرم) Chlorophyll b (mg/gr)	کلروفیل a (میلی‌گرم بر گرم) Chlorophyll a (mg/gr)	تیمارها Treatments
0.850[c]	0.206[a]	0.643[c]	شاهد Control
0.882[bc]	0.207[a]	0.675[bc]	*B.cereus*
0.940[abc]	0.214[a]	0.726[abc]	*B. edulis*
0.866[bc]	0.205[a]	0.661[c]	*A. caesarea*
0.892[bc]	0.239[a]	0.653[c]	*C. cibarius*
1.037[a]	0.247[a]	0.791[a]	*B. edulis+B. cereus*
1.004[a]	0.238[a]	0.766[ab]	*A. caesarea+B. cereus*
0.950[ab]	0.217[a]	0.733[abc]	*C. cibarius+B. cereus*
0.98	0.043	0.100	LSD

میانگین‌هایی که در هر ستون و برای هر صفت دارای حروف مشابه هستند بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

Mean in each column and for each factor, followed by similar letters are not significant at 5% level of probability using LSD test.

صفات ریخت‌شناسی

ارتفاع گیاهچه: نتایج حاصل از پژوهش حاضر در ارتباط با ارتفاع گیاهچه‌های کاج سیاه نشان می‌دهد که بین تیمارهای مختلف در سطح احتمال ۱ درصد تفاوت معنی‌داری وجود دارد (جدول ٦). بیش‌ترین ارتفاع گیاهچه (۱۱/۳۵ سانتی‌متر) مربوط به تیمار ترکیبی بولتوس+باسیلوس و کم‌ترین (۸/۹٤ سانتی‌متر) مربوط به شاهد است (جدول ۷). هم‌چنین کاربرد ترکیبی باکتری با قارچ بلوتوس و یا چنترلا نسبت به کاربرد جداگانه قارچ و یا باکتری و شاهد و تیمار ترکیبی باکتری با قارچ آمانیتا نسبت به کاربرد جداگانه باکتری و شاهد به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای میزان ارتفاع گیاهچه را افزایش داد (جدول ۷).

قطر ساقه: نتایج جدول تجزیه واریانس قطر ساقه نشان داد صفت مذکور از لحاظ آماری تحت‌تأثیر تیمارها قرار نگرفت (جدول ٦). لازم به ذکر است که تمامی تیمارها، میزان قطر ساقه را به مقدار جزئی نسبت به شاهد افزایش دادند ولی این افزایش معنی‌دار نبود (جدول ۷).

وزن خشک ساقه و ریشه: نتایج حاصل از پژوهش حاضر در ارتباط با وزن خشک ساقه و ریشه نشان داد بین تیمارهای مختلف تفاوت معنی¬داری در سطح احتمال ۵ درصد وجود دارد (جدول ٦). کم‌ترین میزان وزن خشک ریشه (۰/٤۲ گرم) و ساقه (۰/٦ گرم) مربوط به شاهد و بیش‌ترین میزان وزن خشک ریشه (۰/۷ گرم) و ساقه (۱/۰۷ گرم) به‌ترتیب مربوط به تیمارهای ترکیبی آمانیتا+باسیلوس و بولتوس+باسیلوس بود (جدول ۷). در خصوص وزن خشک ریشه نتایج مشخص کرد که تیمار تلفیقی باکتری کمک‌کننده همزیستی با قارچ بلوتوس و یا

آمانیتا به‌طور چشمگیری وزن خشک ریشه را نسبت به کاربرد جداگانه قارچ و یا باکتری و شاهد افزایش داده است. در رابطه با وزن خشک ساقه، تمامی تیمارهای ترکیبی (قارچ+باکتری) و تیمار قارچ بولتوس به تنهایی، میزان وزن خشک ساقه را نسبت به شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش دادند. هم‌چنین نتایج نشان داد که تیمار ترکیبی آمانیتا+باسیلوس در مقایسه با تیمار جداگانه قارچ و یا باکتری و هم‌چنین تیمار ترکیبی قارچ بولتوس+باکتری نسبت به کاربرد جداگانه باکتری، میزان وزن خشک ساقه را به‌طور چشمگیری افزایش داد؛ در صورتی‌که تیمار تلفیقی قارچ چنترلا+باکتری نسبت به تیمارهای جداگانه قارچ و یا باکتری تأثیر معنی‌داری در افزایش وزن خشک ساقه نداشت (جدول ۷).

چنان‌چه در نتایج ذکر شد تلقیح کاج سیاه با قارچ‌های اکتومیکوریز و یا باکتری موجب بهبود پارامترهای رشد مانند ارتفاع گیاهچه و وزن خشک ساقه و ریشه شد. اگرچه در برخی موارد کاربرد جداگانه قارچ و یا باکتری تأثیر معنی‌داری در افزایش پارامترهای رشد نداشت ولی کاربرد ترکیبی باکتری کمک‌کننده همزیستی همراه با قارچ‌های اکتومیکوریز، به‌طور چشمگیری صفات مذکور را افزایش نمود. در سایر پژوهش‌ها، وو و همکاران (۲۰۱۲)، با بررسی اثر همزیستی قارچ بولتوس و باکتری باسیلوس بر رشد گیاهچه‌های *Pinus thunbergii*، افزایش ارتفاع گیاهچه و زیست‌توده را در اثر کاربرد جداگانه و یا تلفیقی قارچ و باکتری گزارش نمودند و به این نتیجه رسیدند که تیمار تلفیقی بولتوس+باکتری به‌طور چشمگیری در افزایش صفات اندازه‌گیری شده مؤثر بود. هم‌چنین تلقیح گیاهچه‌های *Pinus wallichiana* با تیمارهای جداگانه و یا ترکیبی قارچ‌های اکتومیکوریز *Laccaria laccata* و *Trichoderma harzianum* و باکتری *Pseudomonas fluorescens* موجب افزایش ارتفاع گیاهچه، وزن خشک گیاهچه و طول ریشه شد، به‌نحوی‌که تیمارهای ترکیبی بیش‌ترین تأثیر را در افزایش صفات مذکور داشتند (۲). علاوه‌براین، اثر قارچ بولتوس بر میزان وزن خشک ریشه و ساقه گیاهچه‌های *Pinus tabulaeformis* نسبت به شاهد معنی‌دار نبود (۲۳).

افزایش صفات رشد در این پژوهش را می‌توان به نقش قارچ‌های اکتومیکوریز و باکتری کمک‌کننده همزیستی در افزایش جذب عناصر غذایی و هم‌چنین افزایش میزان کلروفیل مربوط دانست. در این خصوص نتایج به‌دست آمده تأییدکننده نقش قارچ‌ها و باکتری مورد مطالعه در بهبود شاخص‌های مذکور می‌باشد. افزایش کلروفیل موجب جذب بیش‌تر نور و میزان بالاتر فتوسنتز شده که در کل موجب افزایش رشد و وزن خشک گیاهچه‌های تلقیح شده می‌شود. نیتروژن یک عنصر ضروری در ساختار اسیدهای نوکلئیک، پروتئین، فسفولیپیدها و سایر اجزای گیاهی است (۲٤). هم‌چنین این عنصر نقش مهمی در سنتز کلروفیل دارد و افزایش جذب نیتروژن توسط گیاه، باعث افزایش میزان فتوسنتز و افزایش تولید کربوهیدرات و در نتیجه بهبود رشد می‌شود (۱۲).

جدول ٦- نتایج تجزیه واریانس اثر قارچ‌های اکتومیکوریز و باکتری کمک‌کننده همزیستی بر صفات ریخت‌شناسی کاج سیاه بر اساس میانگین مربعات.

Table 6. Results of analysis of variance of the effect of ectomycorrhizal fungus and mycorrhiza helper bacteria on morphological traits in black pine based on the means squares (MS).

منبع تغییرات S.O.V.	درجه آزادی df	ارتفاع گیاهچه Plant height	قطر ساقه Shoot diameter	وزن خشک ریشه Root dry weight	وزن خشک ساقه Shoot dry weight
تیمار Treatment	7	2.15**	0.12^{ns}	0.08*	0.03*
خطا Error	16	0.48	0.07	0.02	0.01
کل Total	23	-	-	-	-
ضریب تغییرات (درصد) CV (%)	–	6.93	10.84	18.83	18.24

*، ** و ^{ns} به‌ترتیب نشان‌دهنده تفاوت معنی‌داری در سطوح احتمال ۵ درصد و ۱ درصد و غیرمعنی‌دار می‌باشند.

*, ** and ^{ns} respectively are significant difference at 5% and 1% probability levels and not significant.

جدول ۷- نتایج مقایسه میانگین تلقیح قارچ‌های اکتومیکوریز و باکتری کمک‌کننده همزیستی، بر صفات ریخت‌شناسی کاج سیاه.

Table 7. Results of mean comparison of the effect of ectomycorrhizal fungus and mycorrhiza helper bacteria on morphological traits in black pine.

تیمارها Treatments	ارتفاع گیاهچه (سانتی‌متر) Plant height (cm)	قطر ساقه (میلی‌متر) Shoot diameter (mm)	وزن خشک ساقه (گرم) Root dry weight (gr)	وزن خشک ساقه (گرم) Shoot dry weight (gr)
شاهد Control	8.94^{c}	2.16^{a}	0.42^{c}	0.6^{c}
B.cereus	9.27^{c}	2.17^{a}	0.46^{c}	0.75^{bc}
B. edulis	9.72^{c}	2.54^{a}	0.48^{c}	0.9^{ab}
A. caesarea	9.98^{bc}	2.41^{a}	0.51^{bc}	0.68^{bc}
C. cibarius	9.43^{c}	2.17^{a}	0.46^{c}	0.84^{abc}
B. edulis+B. cereus	11.35^{a}	2.60^{a}	0.67^{ab}	1.07^{a}
A. caesarea+B. cereus	10.65^{ab}	2.58^{a}	0.7^{a}	1.02^{a}
C. cibarius+B. cereus	10.85^{ab}	2.57^{a}	0.59^{abc}	0.94^{ab}
LSD	0.53	0.45	0.17	0.27

میانگین‌هایی که در هر ستون و برای هر صفت دارای حروف مشابه هستند بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

Mean in each column and for each factor, followed by similar letters are not significant at 5% level of probability using LSD test.

افزایش شاخص‌های رشد در گیاهان تلقیح‌شده با قارچ‌های اکتومیکوریز می‌تواند به‌دلیل ترشح مواد تسریع‌کننده رشد توسط قارچ‌ها باشد یا این‌که به‌طور غیرمستقیم با تغییر در فیزیولوژی ریشه موجب افزایش جذب مواد غذایی شوند (۲۲). در این پژوهش باکتری کمک‌کننده همزیستی در تلفیق با

قارچ‌های اکتومیکوریز به‌طور چشمگیری میزان کلونیزاسیون، جذب عناصر غذایی و رشد گیاهچه‌های کاج سیاه را افزایش داد. این موارد می‌تواند مربوط به تشدید کلونیزاسیون ریشه‌ها توسط باکتری‌ها باشد، که باعث افزایش ترشح ترکیبات تسریع‌کننده رشد و فراوانی بیش‌تر عناصر غذایی در محیط ریشه می‌شوند (۷ و ۳۳). در این خصوص نقش برخی از باکتری‌ها به‌عنوان تسریع شکل‌گیری ساختار میکوریزایی به اثبات رسیده است (۲۷). هم‌چنین افزایش درصد کلونیزاسیون، جذب عناصر غذایی و بهبود رشد در اثر کاربرد تلفیقی باکتری کمک‌کننده همزیستی در تلفیق با قارچ‌های اکتومیکوریز مورد مطالعه در کاج، گزارش شده است (۲ و ٤۲).

باکتری باسیلوس اگرچه به‌عنوان یک کمک‌کننده همزیستی موجب بهبود رشد در گیاهان می‌شود، ولی شاید این همزیستی بین باکتری باسیلوس و سایر قارچ‌های اکتومیکوریز زیاد قابل‌ملاحظه نباشد. نتایج حاصل از این پژوهش و پژوهش‌های دیگر به وضوح نشان می‌دهد که باکتری باسیلوس با قارچ بولتوس دارای همزیستی مسالمت‌آمیزی است و موجب بهبود رابطه همزیستی قارچ بولتوس با گیاهچه‌های کاج می‌شود. تأثیر زیاد قارچ‌های اکتومیکوریز روی گیاهچه‌های کاج می‌تواند مربوط به این واقعیت باشد که در مراحل اولیه رشد، گیاهچه‌های کاج، دارای ذخیره غذایی کم‌تر هستند و این مسأله موجب وابستگی غذایی بیش‌تر آن‌ها به قارچ‌های میکوریز می‌شود (۳٦).

نتیجه‌گیری کلی

نتایج یافته‌ها نشان داد که هر سه نوع قارچ اکتومیکوریز مورد بررسی (چنترلا، بولتوس و آمانیتا) با گیاهچه‌های کاج سیاه، از همزیستی مسالمت‌آمیزی برخوردار بودند و قارچ بولتوس، بیش‌ترین میزان همزیستی را به خود اختصاص داد. باکتری باسیلوس به‌عنوان یک کمک‌کننده همزیستی، موجب افزایش درصد میکوریزاسیون ریشه‌های کاج سیاه با قارچ‌های اکتومیکوریز شد و در نتیجه بهبود رشد و جذب عناصر غذایی را به‌دنبال داشت. بنابراین این پژوهش می‌تواند گامی مؤثر در راستای شروع مطالعات جامع‌تری در راستای بهینه سازی کاربرد قارچ‌های اکتومیکوریز به‌عنوان عامل محرک رشد زیستی و سازگار با کشاورزی پایدار باشد.

منابع

1. Aghababaei, F., Raiesi, F. and Nadian, H. 2011. Influence of mycorrhizal symbiosis on the uptake of nutrients in some commercial genotypes of almond in a sandy loam soil. Iran. J. Soil Res. 25: 2. 137-147. (In Persian)
2. Ahangar, M.A., Dar, G.H. and Bhat, Z.A. 2012. Growth response and nutrient uptake of blue pine (*Pinus wallichiana*) seedlings inoculated with rhizosphere microorganisms under temperate nursery conditions. Ann. Sci. 55: 2. 217-227.
3. Arnon, D. 1956. Photosynthesis by isolated chloroplast. Arch. Biochem. Biophys. 20: 3. 449-461.
4. Aspray, T.J., Frey-Klett, P., Jones, J.E., Whipps, J.M., Garbaye, J. and Bending, G.D. 2006. Mycorrhization helper bacteria: a case of specificity for altering ectomycorrhiza architecture but not ectomycorrhiza formation. Mycorrhiza. 16: 8. 533-541.
5. Bago, B., Pfeffer, P.E. and Shachar-Hill, Y. 2000. Carbon metabolism and transport in *Arbuscular mycorrhizas*. Plant Physiol. 124: 3. 949-958.
6. Berg, B. and Mclaugherty, C. 2004. Plant litter: decomposition, humus formation, carbon sequestration. Springer Verlag, Berlin. Plant Physiol. 161. 10. 1185-1188.

7.Bertrand, H., Plassard, C., Pinochet, X., Touraine, B., Normand, P. and Cleyet Marcel, J.C. 2000. Stimulation of the conic transport system in *Brassica napus* by a plant growth promoting rhizobacterium (*Achromobacter* sp.). Can. J. Microbiol. 46: 3. 229-236.
8.Brundrett, M.C. 2009. Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants; understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis. Plant Soil. 320: 1-2. 37-77.
9.Brzostek, E.R., Greco, A., Drake, J.E. and Finzi, A.C. 2013. Root carbon inputs to the rhizospher estimulate extra cellular enzyme activity and increase nitrogen availability in temperate forest soils. Biogeochemistry. 115: 1-3. 65-76.
10.Cui, Y.Y., Feng, B., Wu, G., Xu, J. and Yang, Zh. 2016. Porcini mushrooms (Boletus sect. Boletus) from China. Fungal Divers. 81: 1. 189-212.
11.Dentinger, B.T. and Suz, L.M. 2014. What's for dinner? Undescribed species of porcini in a commercial packet. Peer J. DOI: 10.7717/peerj.570.
12.Dong, C., Hu, D., Fu, Y., Wang, M. and Liu, H. 2014. Analysis and optimization of the effect of light and nutrient solution on wheat growth and development using an inverse system model strategy. Comput. Electron. Agric. 109: 3. 221-231.
13.Duponnois, R. and Plenchette, C. 2003. A mycorrhiza helper bacterium enhances ectomycorrhizal and endomycorrhizal symbiosis of Australian Acacia species. Mycorrhiza. 13: 2. 85-91.
14.Farahmand, H. 2015. Trees and ornamental shrubs (Gymnosperms). Mashhad University Press. 459p. (In Persian)
15.Frey-Klett, P., Garbaye, J. and Tarkka, M. 2007. The mycorrhiza helper bacteria revisited. New Phytol. 176: 1. 22-36.
16.Garbay, J. and Duponnois, R. 1992. Specifi city and function of mycorrhization helper bacteria (MHB) associated with the Pseudotsuga menziesii-*Lacacria laccata* symbiosis. Symbiosis. 14: 1. 335-344.
17.Hamel, C.A. and Smith, D.L. 1991. Interspecific N-transfer and plant development in mycorrhiza field-grown moisture. Soil Biol. Biochem. 23: 1. 661-665.
18.Hill, D. 2012. Truffles and other edible mycorrhiza mushrooms. Reported by College of Agriculture, Food and Environment of University of Kentucky. https://www.uky.edu/Ag/CCD/introsheets/truffles.pdf.
19.Kafi, M., Daneshvar Hakimi Meybodi, N., Nikbakht, A., Rejali, F. and Daneshkhah, M. 2013. Effect of humic acid and mycorrhiza fungi on some characteristics of "Speedy green" perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). greenhouse cultivation. Sci and Techno greenhouse cult. 4: 13. 49-58. (In Persian)
20.Kayama, M. and Yamanaka, T. 2016. Growth characteristics of ectomycorrhizal seedlings of *Quercus glauca*, *Quercus salicina*, *Quercus myrsinaefolia*, and *Castanopsis cuspidata* planted in calcareous Soil. Forests. 7: 11. 266.
21.Laiye, Q.U., Quoreshi, A.M., Iwase, K., Tamai, Y., Funada, R. and Koike, T. 2003. *In vitro* ectomycorrhizal formation on two larch species of seedlings with six different fungal species. Eurasiana. Eurasian J. For. Res. 6: 1. 65-73.
22.Leyval, C. and Berthelin, J. 1990. Influence of acid producing agrobacterium and *Laccaria laccata* on pine and beech growth, nutrient uptake and exudation. Agric. Ecosyst. Environ. 28: 1-4. 313-319.
23.Lu, N., Yu, M., Cui, M., Luo, Z., Feng, Y., Cao, S., Sun, Y. and Li, Y. 2016. Effects of different ectomycorrhizal fungal inoculates on the growth of *Pinus tabulaeformis* seedlings under greenhouse conditions. Forests. 7: 12. 316.
24.Martin, T., Oswald, O. and Graham, I.A. 2002. Arabidopsis seedling growth, storage lipid mobilization and photosynthetic gene expression are regulated by carbon: Nitrogen availability. Plant Physiol. 128: 2. 472-481.

25. Martins, A. 2008. In vitro mycorrhization of micropropagated plants: Studies on castanea sativa mill. Siddiqui Z.A., Akhtar M.S. and Futai K. (Eds.). Mycorrhiza: J. Sust. Agric. Springer. pp. 319-334.
26. Mcpartland, J.M., Robert, C.C. and Watson, D.P. 2000. Hemp diseases and pests: management and biological control: an advanced treatise. CABI Publishing, Wallingford, 506p.
27. Mediavilla, O., Olaizola, J., Santos-del-Blanco, L., Oria-de-Rueda, J.A. and Martín-Pinto, P. 2016. Mycorrhization between *Cistus ladanifer* L. and *Boletus edulis* Bull is enhanced by the mycorrhiza helper bacteria pseudomonas *fluorescens Migula*. Mycorrhiza. 26: 2. 161-168.
28. Mozaffarian, V. 2004. Trees and shrubs of Iran, Farhang-e-Moaser Publishing. 214p. (In Persian)
29. Olfati, J., Peyvast, Gh. and Mami, Y. 2009. Identification and chemical properties of popular wild edible mushrooms from northern Iran. J. Hortic. For. 1: 3. 48-51.
30. Olsen S.R. and Sommers, L.E. 1982. Methods of soil analysis, part 2, chemical and microbiological properties. Soil Sci. Soc. pp. 403-430.
31. Polanco, M.C., Zwiazek, J.J. and Voicu, M.C. 2008. Responses of ectomycorrhizal American Elm (*Ulmus americana*) seedlings to salinity and soil compaction. Plant Soil. 308: 1. 189-200.
32. Postgate, J.R. 1982. Biological nitrogen fixation: fundamentals. Philos. Trans. R Soc. Lond B Biol. Sci. 296: 375-385.
33. Sadaghiani, M.R., Gharemaleki, T., Besharati, H. and Tavasolee, A. 2011. Effects of PGPR and AM fungi on growth and Zn uptake by Corn Plant in a Zn- contaminated Soil. Water Soil Sci. 21: 2. 136-147. (In Persian)
34. Sheng, J.M., Wu, X.Q., Hou, L.L. and Ying, C.X. 2010. Isolation and identification of a MHB strain from the rhizosphere soil of *Pinus thunbergi* inoculated with *Boletus edulis* Environ. Biol. 16: 5. 701-704.
35. Sitta, N. and Davoli, P. 2012. Edible ectomycorrhizal mushrooms: international markets and regulations. Edible ectomycorrhizal mushrooms. Springer. Soil Biol. 34: 355-380.
36. Smith, S.E. and Read, D.J. 2008. Mycorrhizal symbiosis, thirded. Academic Press, London, UK. 800p.
37. Smith, S.E. 2003. Mycorrhizal fungi can dominate phosphate supply to plants irrespective of growth responses. Plant Physiol. 133: 1. 16-20.
38. Turgeman, T., Asher, J.B., Roth-Bejerano, N., KaganZur, 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.
39. Turk, M.A., Assaf, T.A., Hameed, K.M. and Tawaha, A.M. 2006. Significance of mycorrhizae. World. Agric. Sci. 2: 1. 16-20.
40. Van Aarle, I.M., Olsson, P.A. and Soderstrom, B. 2001. Microscopic detection of phosphatase activity of saprophytic and arbuscular mycorrhizal fungi using a fluorogenic substrate. Mycol Iran. 93: 1. 17-24.
41. Vodnik, D. and Gogala, N. 1994. Seasonal fluctuations of photosynthesis and its pigments in 1-year mycorrhized spruce seedlings. Mycorrhiza. 4: 6. 277-281.
42. Wu, X.Q., Hou, L.L., Sheng, J.M., Ren, J.H., Zheng, L., Chen, D. and Ye, J.R. 2012. Effects of ectomycorrhizal fungus *Boletus edulis* and mycorrhiza helper *Bacillus cereus* on the growth and nutrient uptake by *Pinus thunbergii*. Biol Fertil Soil. 48: 4. 385-391.
43. Zamani, S.M., Mohamadi Goltapeh, E., Safaey, N. and Emam, M. 2015. Effect of ectomycorrhizal symbiosis on the growth and physiology of *Quercus castaneifolia* C. A. Mey. plantlets. Iran. J. Forest. Range Protec. Res. 13: 2. 160-170. (In Persian)
44. Zhang, L., Yang, J. and Yang, Z. 2004. Molecular phylogeny of eastern Asian species of Amanita (Agaricales, Basidiomycota): taxonomic and biogeographic implications. Fungal Divers. 17: 219-238.