بررسی اثر کاربرد کرم خاکی *Eisenia fetida* و قارچ میکوریزا آربوسکولار *Funneliformis mosseae* بر برخی از خصوصیات میکروبی خاک و جذب نیتروژن و فسفر توسط ذرت *Zea mays*

حمید دهقانیان، اکرم حلاج‌نیا[1]، امیر لکزیان و علیرضا آستارایی

دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد؛ **dehghanianhamid@yahoo.com**

استادیار گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد؛ **halajnia@um.ac.ir**

استاد گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد؛ **alakzian@um.ac.ir**

دانشیار گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد؛ **astaraei@um.ac.ir**

دریافت: **95/8/19** و پذیرش: **96/4/12**

چکیده

فعالیت کرم‌های خاکی و قارچ‌های میکوریزی در خاک، بر جذب آب و عناصر غذایی و عملکرد گیاه تأثیرگذار است. لذا، به‌منظور بررسی تأثیر کرم خاکی (*Eisenia fetida*) و قارچ میکوریزا (*Funneliformis mossea*) بر کلونیزاسیون ریشه، وزن خشک اندام هوایی، جذب عناصر فسفر و نیتروژن، کربن آلی و کربن زیست‌توده میکروبی خاک، آزمایشی گلخانه‌ای در ایستگاه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار مورد بررسی قرار گرفت. تیمارهای این آزمایش شامل شاهد (C)، کاربرد کرم خاکی (Ew)، کاربرد میکوریزا (AMF) و کاربرد تلفیقی کرم خاکی به‌همراه میکوریزا (AMF×Ew) بودند. نتایج نشان داد که کاربرد میکوریزا (تیمارهای میکوریزا و کرم خاکی به همراه میکوریزا) موجب تفاوت معنی‌دار در درصد کلونیزه‌شدن ریشه نسبت به تیمار شاهد شد. تیمار تلفیقی کرم خاکی به‌همراه میکوریزا به ترتیب باعث افزایش 105 و 79 درصدی غلظت فسفر و نیتروژن در اندام هوایی گیاه ذرت نسبت به تیمار شاهد شدند. تأثیر میکوریزا بر افزایش جذب فسفر و درنتیجه کاهش نسبت N/P و تأثیر کرم خاکی بر افزایش جذب نیتروژن از دو منبع معدنی و آلی و در نتیجه افزایش نسبت N/P در گیاه معنی‌دار بود. تیمارهای آزمایش به طور معنی‌داری موجب افزایش کربن زیست‌توده میکروبی خاک شدند. علاوه بر این کربن آلی خاک در حضور کرم‌های خاکی به طور معنی‌داری افزایش یافت. از این رو، در راستای کشاورزی پایدار استفاده از کرم‌های خاکی و قارچ میکوریزا آربوسکولار به‌عنوان کود زیستی می‌تواند موجب کاهش مصرف کودهای شیمیایی فسفری و نیتروژنی و افزایش راندمان مصرف این کودها شود.

واژه‌های کلیدی: کلونیزاسیون ریشه، کربن زیست‌توده میکروبی خاک، کود زیستی، کربن آلی خاک، معدنی شدن نیتروژن

---

[1]. نویسنده مسئول، آدرس: مشهد، دانشگاه فردوسی مشهد-دانشکده کشاورزی، گروه مهندسی علوم خاک

مقدمه

افزایش مصرف بی‌رویه کودهای شیمیایی و کاهش شدید مصرف مواد آلی باعث تخریب هر چه بیشتر ساختمان خاک، تراکم و فشردگی خاک‌های زراعی و کاهش نفوذپذیری شده است (ملکوتی، 1374). یکی از راه‌های دستیابی به اهداف کشاورزی پایدار، استفاده از جاندارانی است که نقش مهمی در تأمین نیازهای غذایی گیاهان دارند. کودهای زیستی منحصراً به مواد آلی حاصل از کودهای دامی، پسماندهای گیاهی و غیره اطلاق نمی‌شود بلکه تولیدات حاصل از فعالیت جاندارانی که در ارتباط با تثبیت ازت و یا فراهمی فسفر و سایر عناصر غذایی در خاک فعالیت می‌کنند را نیز شامل می‌شوند (صالح راستین، 1377). امروزه کاربرد کودهای زیستی به‌عنوان یک گزینه مناسب در جهت افزایش حاصلخیزی خاک و تولید محصول در کشاورزی پایدار محسوب می‌شوند (ویو و همکاران، 2005). از مهم‌ترین مزایای این کودها می‌توان به تأمین عناصر غذایی، کمک به تنوع زیستی، تشدید فعالیت‌های حیاتی، بهبود کیفیت و حفظ سلامت محیط‌زیست اشاره نمود (صالح راستین، 1380).

ریشه گیاه با ریز جانداران مختلف خاک مانند قارچ و باکتری‌های مختلف تثبیت‌کننده نیتروژن در ارتباط است که می‌تواند جهت و جریان آب و مواد غذایی را بین گیاه و خاک تحت تأثیر قرار دهد (واردل، 2002). درشت جانداران خاک مانند کرم‌های خاکی و موریانه‌ها نیز از اجزای مهمی هستند که اکوسیستم خاک را از طریق تغییر و تبدیل ترکیبات آلی و معدنی تحت تأثیر قرار می‌دهند (بروسارد و همکاران، 2007). بیشتر تحقیقات با تمرکز بر گروه خاصی از موجودات زنده خاک انجام شده است درحالی‌که مطالعه برهمکنش فعل و انفعالات ریز جانداران مختلف و درشت جانداران خاک محدود شده است (برادفورد و همکاران، 2002). کرم‌های خاکی و قارچ‌های میکوریزا آربوسکولار (AM[1]) از اجزای مهم درشت جانداران و ریز جانداران ریزوسفر[2]خاک هستند. قارچ میکوریزا آربوسکولار با دو-سوم گونه‌های گیاهی همزیستی دارد (اسمیت و رید، 2008). این قارچ‌ها می‌توانند رشد و فیزیولوژی بسیاری از گیاهان را تحت تأثیر قرار دهند (رید و اسمیت، 2008). به‌عنوان‌مثال، آن‌ها با گسترش میسلیوم‌ها در حجم خاک باعث افزایش ظرفیت جذب مواد غذایی می‌شوند (تافن و همکاران، 2002). کرم‌های خاکی می‌توانند از طریق مخلوط کردن بستر خاک، ساختار خاک و پایداری خاکدانه‌ها، نفوذ آب و هوادهی به لایه‌های عمیق خاک، افزایش زیست‌توده میکروبی و معدنی کردن عناصر غذایی سیستم خاک را تحت تأثیر قرار دهند (ادوارد و بوهلن، 1996). مطالعات قبلی، نتایج متناقضی از اثرات متقابل کرم‌های خاکی و قارچ میکوریزا آربوسکولار را نشان داده‌اند. در خصوص برهمکنش‌های بی‌اثر به نتایج ورست و همکاران (2004) و ایزن هاور و همکاران (2009)، برهمکنش مثبت به پژوهش زارعی و همکاران (2009) و برهمکنش منفی به مطالعه پاتینسون و همکاران (1997) می‌توان اشاره کرد. کاهش اثر میکوریزا ممکن است به کاهش آلودگی ریشه توسط میکوریزا (لوسن هپ، 1996) و یا به اختلال فیزیکی خاک با حفاری و به هم ریختن خاک (چیو، 1987) و یا تغذیه انتخابی از هیف (بانکوسکی و همکاران، 2000) توسط کرم‌های خاکی نسبت داده شود. از سوی دیگر، افزایش اثر قارچ ممکن است به دلیل هورمون‌های گیاهی تولیدشده توسط کرم‌های خاکی و ریز جانداران باشد که می‌تواند باعث تحریک آلودگی قارچی[3] شود (آزکون و همکاران، 1978). اثرات مثبت کرم‌های خاکی بر فعالیت قارچ‌های میکوریزا ممکن است در خاک‌های فقیر از مواد غذایی رخ دهد که در آن فعالیت کرم‌های خاکی می‌تواند فراهمی مواد غذایی را افزایش دهد (مکلین و همکاران، 2006). با این حال اثرات کرم‌های خاکی و میکوریزا بر تولید گیاه ممکن است وابسته به حضور عناصر غذایی محدودکننده مانند فسفر و نیتروژن باشد (میلرت و همکاران، 2009). بنابراین مدیریت اثرات متقابل کرم‌های خاکی و میکوریزا می‌تواند در تغذیه گیاه و حاصلخیزی خاک حائز اهمیت باشد. بر این اساس، هدف از این تحقیق بررسی اثر کاربرد کرم‌های خاکی و قارچ میکوریزا آربوسکولار بر رشد گیاه، جذب عناصر غذایی فسفر و نیتروژن به‌وسیله گیاه ذرت،کربن زیست‌توده میکروبی و کربن آلی خاک (SOC[4]) تحت شرایط گلخانه‌ای بود.

مواد و روش‌ها

به‌منظور تأثیر کرم خاکی و قارچ میکوریزا آربوسکولار (AM) بر کلونیزاسیون ریشه، کربن آلی خاک، کربن زیست‌توده میکروبی خاک و جذب فسفر و نیتروژن به‌وسیله گیاه ذرت و زیست‌توده گیاه ذرت، آزمایشی در قالب طرح آماری کاملاً تصادفی با چهار تیمار و سه تکرار انجام پذیرفت. تیمارهای آزمایشی شامل شاهد (C)، کاربرد کرم خاکی (Ew)، کاربرد میکوریزا (AMF) و

1. Arbuscular mycorrhizal
2. Rhizosphere
3. Fungal infection
4. SoilOrganic Carbon

کاربرد تلفیقی کرم خاکی به‌همراه میکوریزا (AMF×Ew) بودند. ماده تلقیحی میکوریزا (*Funneliformis mosseae*) مورد استفاده در این آزمایش حاوی محیط کشت، ریشه‌های میکوریزایی گیاه شبدر، اسپور قارچی و هیف‌های خارجی قارچ میکوریزا از شرکت زیست فناور توران (پارک علم و فناوری استان سمنان) تهیه شد. کرم‌های خاکی (*Eisenia fetida*) نیز از شرکت زیست فناوری صبا مشهد تهیه شد. در این تحقیق، ابتدا60 کیلوگرم خاک از منطقه پردیس دانشگاه فردوسی مشهد جمع‌آوری و بخشی از خاک برای انجام آنالیزهای اولیه هوا خشک و از الک 2 میلی‌متری عبور داده شد. در آزمایشگاه pH خاک با استفاده از دستگاه pH متر در گل اشباع، قابلیت هدایت الکتریکی در عصاره گل اشباع توسط دستگاه هدایت سنج، کربن آلی به روش والکلی-بلاک (1934)، نیتروژن کل به روش کجلدال (برنمر و مولوانی، 1982)، فسفر قابل‌دسترس خاک به روش اولسن و سامرز (1982)، پتاسیم قابل‌دسترس به روش استات آمونیوم (چاپمن، 1965)، کربنات کلسیم معادل به روش تیتراسیون برگشتی (لوپرت و سوارز، 1996)، رطوبت ظرفیت مزرعه به روش گلدانی و بافت خاک به روش هیدرومتری (گی و همکاران، 1986) مورد ارزیابی قرار گرفت.

برخی از ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک مورد مطالعه در جدول 1 آورده شده است. مطابق جدول خاک مورد مطالعه یک خاک آهکی با بافت لوم سیلتی و فقیر از نظر عناصر غذایی پرمصرف بود. بر اساس توصیه کودی برای گیاه ذرت (ملکوتی و طهرانی، 1384) نیتروژن از منبع اوره (0/750 گرم در گلدان) و پتاسیم از منبع سولفات پتاسیم (0/38 گرم در گلدان) به خاک اضافه شد. ازآنجاکه فعالیت قارچ میکوریزا آربوسکولار در خاک از میزان فسفر خاک متأثر می‌شود، فسفر به مقدار یک‌سوم توصیه کودی (ملکوتی و طهرانی، 1384) از منبع سوپر فسفات تریپل (0/1 گرم در گلدان) تأمین شد.

جدول 1- برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک مورد مطالعه

کلاس بافت خاک	کربن آلی	نیتروژن کل	آهک	pH	مس	منگنز	روی	آهن	فسفر قابل‌جذب	پتاسیم قابل‌جذب	هدایت الکتریکی
	درصد				میلی‌گرم بر کیلوگرم						دسی زیمنس بر متر
CL	0/35	0/05	13	7/6	1/21	24/44	0/61	1/8	7	151	2/12

به منظور از بین بردن آلودگی احتمالی قارچی و یا باکتریایی، خاک مورداستفاده توسط اتوکلاو در دمای 121 درجه سلسیوس به مدت 2 ساعت در دو مرحله و با فاصله 72 ساعت استریل گردید (لی و همکاران، 2012). گلدان‌ها نیز پس از شستشو با آب معمولی، به‌وسیله الکل ضدعفونی و در داخل هر گلدان 5 کیلوگرم خاک استریل شده ریخته شد. به گلدان‌های حاوی تیمار میکوریزا، مقدار 50 گرم از زادمایه قارچ (*Funneliformis mossea*) در هر گلدان در عمق 5 سانتی‌متری از سطح خاک پخش گردید و روی آن مقدار کافی خاک ریخته، به‌طوری‌که زادمایه قارچ در عمق یک سانتی‌متری زیر بذر قرار گرفت. به تیمارهای فاقد میکوریزا 50 گرم خاک حاوی زادمایه قارچی استریل شده افزوده شد (لی و همکاران، 2012). به تیمارهای کرم خاکی، 10 عدد کرم خاکی (*Eisenia fetida*) اضافه گردید. کرم‌های خاکی بالغ با کمربند تناسلی مناسب و وزن تازه (5 ± 0/06 g، مقادیر میانگین برای 10 عدد) و طول مشابه (6 ± 0/74 cm، مقادیر میانگین برای 10 عدد) انتخاب شدند. کرم‌های خاکی انتخاب شده با آب مقطر شسته شده و به مدت 24 ساعت جهت به حداقل رساندن هر گونه آلودگی طبیعی قارچی بر روی سطح یا درون روده کرم، در ظروف شیشه‌ای سترون شده نگه داشته شدند (لی و همکاران، 2012). مقدار 50 گرم کود گاوی استریل شده جهت ایجاد بستر مناسب برای فعالیت کرم‌های خاکی به همه گلدان‌ها اضافه شد. به‌منظور رفع هر گونه آلودگی، ابتدا 4 عدد بذر سالم و یکنواخت ذرت سینگل کراس رقم 260 به مدت سه دقیقه درون محلول سه درصد هیپوکلرید سدیم ضدعفونی شدند. پس از کاشت بذور و اطمینان از سبز شدن، دو گیاه در هر گلدان نگه‌داشته شد. گلدان‌ها به طور تصادفی در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه فردوسی مشهد مرتب شده و با محاسبه درصد رطوبت ظرفیت زراعی خاک به روش وزنی، در طول دوره آزمایش با وزن کردن گلدان‌ها، رطوبت خاک در حد 70 درصد ظرفیت زراعی با آب مقطر تنظیم شد. در طول آزمایش، جهت ایجاد

شرایط محیطی کاملاً یکسان، محل قرارگیری گلدان‌ها در گلخانه هر 3 روز به طور تصادفی تغییر داده شد. وضعیت آب و هوایی در طول آزمایش شامل دمای روز و شب به ترتیب 25 و 19 درجه سلسیوس و دوره نوری شامل 16 ساعت روشنایی و 8 ساعت تاریکی و رطوبت نسبی 35 درصد بود. گیاهان پس از یک دوره رشد 60 روزه قبل از شروع مرحله زایشی برداشت و وزن تر و خشک اندام هوایی و ارتفاع گیاهان نیز به‌وسیله خط‌کش اندازه‌گیری شد. بعد از برداشت گیاه، میزان زنده‌مانی کرم‌های خاکی در تیمارهای حاوی کرم خاکی اندازه‌گیری شد. غلظت فسفر گیاه به روش هضم خشک و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری (مدل *UV/VIS S* 2000 ساخت کشور انگلستان) و مقدار نیتروژن کل گیاه با دستگاه کجلدال اندازه‌گیری شد. آمونیوم و نیترات خاک به روش عصاره گیری با کلرور پتاسیم دو نرمال (کنی و نیلسون، 1982) و با استفاده از دستگاه کجلدال تعیین گردید. جذب نیتروژن و فسفر از حاصل‌ضرب غلظت این عناصر در ماده خشک اندام هوایی گیاه محاسبه گردید (ئین و واین، 2005).

رنگ‌آمیزی ریشه‌های برداشت شده با استفاده از روش کرومانیک و همکاران (1980) صورت گرفت و سپس از روش خطوط متقاطع جهت تعیین درصد کلونیزاسیون استفاده گردید. در این روش ریشه رنگ‌آمیزی شده، به‌صورت قطعات یک سانتی‌متری جدا و به‌صورت تصادفی درون پتری دیش قرار داده شدند (50 قطعه)، سپس یک صفحه شطرنجی به ابعاد یک سانتی‌متر (1×1) تهیه و در زیر پتری دیش قرار گرفت. جهت مشاهده و شمارش ریشه‌ای آلوده و غیرآلوده از بینکولار[1] استفاده گردید. ریشه‌ای آلوده و غیرآلوده که با خطوط عمودی و افقی صفحه شطرنجی تقاطعی را ایجاد کرده بودند، هر کدام به‌طور جداگانه شمارش شدند. از تقسیم مجموع ریشه‌ای آلوده به‌دست‌آمده از خطوط عمودی و افقی به مجموع ریشه‌ای غیر آلوده به‌دست‌آمده از خطوط عمودی و افقی ریشه‌ای ضربدر 100، درصد کلونیزاسیون ریشه تعیین گردید. کربن زیست‌توده میکروبی خاک (MBC[2]) نیز به روش تدخین-انکوباسیون نمونه تدخین شده با کلروفرم تعیین شد (هاروات و پوئال، 1994). در پایان تجزیه آماری داده‌ها با نرم‌افزار JUMP[3] و مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون توکی در سطح احتمال یک و پنج درصد و رسم نمودارها در محیط Excel انجام گرفت.

1. Binocular
2. Soil Microbial Biomass Carbon
3. JMP.Statistical.Discovery. version 8.0

نتایج و بحث

درصد کلونیزاسیون ریشه

نتایج جدول تجزیه واریانس نشان داد که تیمارهای آزمایش تأثیر معنی‌داری ($p \leq 0/01$) بر درصد کلونیزاسیون ریشه داشت (جدول 2).

اگرچه کاربرد زادمایه میکوریزا در افزایش درصد کلونیزاسیون ریشه از نظر آماری در سطح یک درصد ($p \leq 0/01$) نسبت به تیمارهای کرم خاکی و شاهد معنی-دار بود با این حال کاربرد کرم خاکی به‌همراه میکوریزا، موجب تغییر معنی‌داری ($p > 0/05$) در درصد کلونیزاسیون ریشه[4] نشد (شکل 1). لازم به ذکر است که زنده‌مانی کرم‌های خاکی در تیمارهای حاوی کرم خاکی نیز در حدود 90-70 درصد بود. بیشترین میزان کلونیزاسیون ریشه به میزان 59/66 درصد در تیمار میکوریزا بدست آمد. تیمار تلفیق کرم خاکی به‌همراه میکوریزا نیز سبب کلونیزه‌شدن 52 درصدی ریشه شد (شکل 1). ریشه گیاهان در تیمارهای بدون میکوریزا یعنی شاهد و کرم خاکی به ترتیب 2 و 3/66 درصد کلونیزه شده بودند که این مقدار آلودگی ریشه به دلیل استریل نبودن محیط آزمایش در طول دوره کاشت دور از انتظار نبود (شکل 1).

تأثیر کرم‌های خاکی بر کلونیزاسیون ریشه به‌وسیله میکوریزا به مقدار و کیفیت تغذیه کرم خاکی در سیستم خاک وابسته است. اورتیز-سبالوس و همکاران (2007) گزارش کردند که کرم‌های خاکی زمانی تأثیر مفیدی بر رشد گیاه و کلونیزاسیون ریشه توسط میکوریزا می‌گذارند که یک منبع غذایی مانند مالچ نرم وجود داشته باشد. بدون حضور منبع غذایی مناسب، اضافه کردن کرم خاکی بر کلونیزاسیون ریشه تأثیر نداشته و یا باعث کاهش کلونیزاسیون ریشه می‌شود. ورست و همکاران (2004) گزارش کردند که درصد کلونیزاسیون ریشه توسط میکوریزا با اضافه کردن کرم خاکی تغییری پیدا ننمود. علاوه بر تأثیر منبع غذایی، گزارش شده است که تأثیر کرم خاکی بر کلونیزاسیون ریشه توسط میکوریزا وابسته به تراکم کرم‌های خاکی نیز می‌باشد و تعداد زیاد کرم‌های خاکی از طریق اختلال فیزیکی خاک باعث کاهش کلونیزاسیون ریشه می‌شود (پاتینسون و همکاران، 1997). در این مطالعه احتمالاً اضافه کردن کود گاوی به خاک به‌عنوان یک منبع غذایی مناسب برای کرم‌های خاکی باعث شد تا آسیب آن‌ها به هیف‌های قارچ به حداقل برسد. همچنین ممکن است کرم‌های خاکی با مخلوط

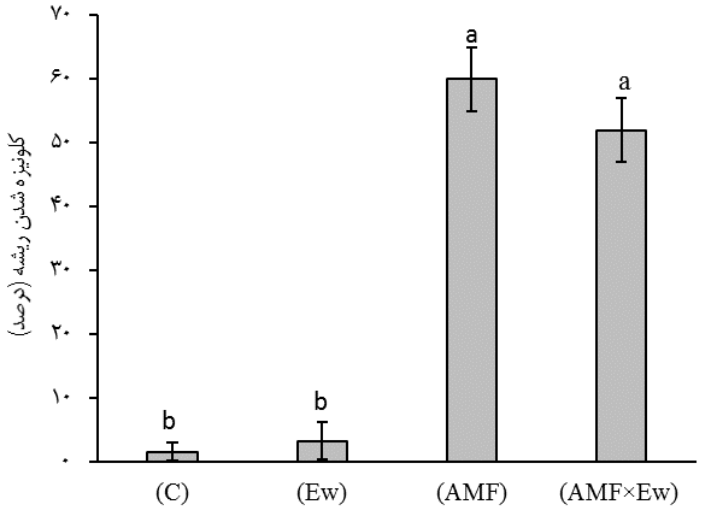
4. root colonization

کردن خاک، اثر مثبتی روی ارتباط هیف‌های قارچ میکوریزا و ریشه گیاه داشته باشد (اورتیز - سبالوس و همکاران، 2007). اثرات مثبت کرم‌های خاکی بر قارچ‌های میکوریزی ممکن است در خاک فقیر از مواد مغذی رخ دهد که در آن فعالیت کرم خاکی می‌تواند در دسترس بودن مواد مغذی را افزایش دهد (مکلین و همکاران 2006).

جدول 2- نتایج تجزیه واریانس (میانگین مربعات) اثر تیمارهای آزمایش بر برخی صفات مورد مطالعه

منابع تغییر	درجه آزادی	وزن خشک اندام هوایی (گرم در گلدان)	ارتفاع گیاه (سانتی‌متر)	کلونیزاسیون ریشه (درصد)
تیمار	3	37/80**	210/29**	2839/78**
خطا	8	1/18	8/04	8/17
کل	11			

**، * و ns به ترتیب نشان‌دهنده معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد، پنج درصد و غیر معنی‌داری می‌باشد.



شکل 1- اثر تیمارهای آزمایش بر درصد کلونیزاسیون ریشه (شاهد (C)، کرم خاکی (Ew)، میکوریزا (AMF) و کرم خاکی به همراه میکوریزا (AMF×Ew))

ارتفاع و وزن خشک اندام هوایی ذرت

نتایج جدول تجزیه واریانس نشان داد که تیمارهای آزمایش تأثیر معنی‌داری ($p \leq 0/01$) بر ارتفاع و وزن خشک اندام هوایی گیاه داشتند (جدول 2). بیشترین افزایش ارتفاع به میزان 89/16 سانتی‌متر در تیمار میکوریزا مشاهده شد (جدول 3). میکوریزایی کردن موجب افزایش حدود 26 درصدی ارتفاع گیاه نسبت به تیمار شاهد شد (جدول 3). همچنین تیمار میکوریزا بیشترین تأثیر را در افزایش وزن خشک اندام هوایی داشت (جدول 3). تیمارهای میکوریزا، کرم خاکی و تلفیق کرم خاکی به‌همراه میکوریزا به ترتیب موجب افزایش معنی‌دار 1/5، 1/4 و 1/4برابری وزن خشک اندام‌های هوایی گیاه در مقایسه با تیمار شاهد شدند. اگرچه تفاوت معنی‌داری بین این تیمارها مشاهده نشد (جدول 3). قارچ‌های میکوریز دارای روابط همزیستی با ریشه اغلب گیاهان زراعی بوده و از طریق افزایش جذب عناصر غذایی مثل فسفر و برخی عناصر کم‌مصرف، افزایش جذب آب، کاهش تأثیر منفی تنش‌های محیطی و افزایش مقاومت در برابر عوامل بیماری‌زا، سبب بهبود در رشد و عملکرد گیاهان میزبان در سیستم‌های کشاورزی پایدار می‌شوند (شارما، 2002). اورتاز (1996) نیز در پژوهشی بیان کرد که افزایش

عملکرد گیاه در نتیجه تأثیر مثبت میکوریزا بر افزایش سطح جذب ریشه‌ها و دسترسی گیاه میزبان به سطح بیشتری از خاک و انتقال آب و مواد غذایی به اندام‌های هوایی گیاه می‌باشد. کرم‌های خاکی نیز می‌توانند رشد گیاه را با تغییر فرم قابل‌دسترس نیتروژن، فسفر و کربن تحت تأثیر قرار دهند (ایزن هاور و همکاران، 2009). بنابراین، کرم‌های خاکی و میکوریزا آربوسکولار می‌توانند با مکانیسم‌های مختلفی موجب افزایش قابلیت دسترسی عناصر مغذی شده و در نتیجه رشد گیاه را تحت تأثیر قرار دهند (ایزن هاور و همکاران، 2009). به طور مشابهی، لی و همکاران (2012) نیز در پژوهشی بیان داشتند که حضور کرم خاکی و میکوریزا به طور معنی‌داری موجب افزایش وزن خشک اندام هوایی گیاه ذرت گردید.

جدول 3- مقایسه میانگین اثر تیمارهای آزمایش بر برخی صفات مورد مطالعه

تیمار تلقیح	ارتفاع گیاه	وزن خشک اندام هوایی	غلظت فسفر	غلظت نیتروژن	جذب فسفر	جذب نیتروژن	نسبت N/P
	(سانتی متر)	(گرم در گلدان)	(درصد)		(میلی‌گرم در گلدان)		
شاهد	c71/5	b14/40	c0/11	d1/14	c 16/58	c165/10	a9/75
کرم خاکی	b 84/3	a21/05	b0/18	b1/83	b38/81	ab386/41	a9/97
میکوریزا	a89/16	a22/36	a0/25	c1/54	a56/66	b344/20	c6/06
کرم خاکی به‌همراه میکوریزا	ab88/1	a20/85	a0/24	a2/04	a50/61	a427/63	b8/44

در هر ستون میانگین‌هایی که در هر قسمت حداقل دارای یک حرف مشترک هستند بر اساس آزمون توکی در سطح احتمال پنج درصد فاقد اختلاف معنی‌دار می‌باشند.

غلظت فسفر و نیتروژن اندام هوایی

نتایج جدول تجزیه واریانس نشان داد که تیمارهای آزمایش تأثیر معنی‌داری ($p \leq 0/01$) بر غلظت نیتروژن و فسفر اندام هوایی گیاه و جذب آن‌ها داشتند (جدول 4).

جدول 4- نتایج تجزیه واریانس (میانگین مربعات) اثر تیمارهای آزمایش بر برخی صفات مورد مطالعه

منابع تغییر	درجه آزادی	غلظت فسفر	غلظت نیتروژن	جذب فسفر	جذب نیتروژن	نسبت N/P
		(درصد)		(میلی‌گرم در گلدان)		
تیمار	3	0/011**	0/46**	920/24**	40109/40**	9/65**
خطا	8	0/000	0/001	6/83	455/60	0/19
کل	11					

**، * و ns به ترتیب نشان‌دهنده معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد، پنج درصد و غیر معنی‌داری می‌باشد.

غلظت نیتروژن اندام هوایی گیاه با کاربرد کرم خاکی به طور قابل‌توجهی افزایش پیدا کرد. تیمارهای تلفیقی کرم خاکی به‌همراه میکوریزا، کرم خاکی و میکوریزا به ترتیب باعث افزایش 1/78، 1/60 و 1/34 برابری غلظت نیتروژن نسبت به تیمار شاهد شدند (جدول 3). از آنجا که نیتروژن با توجه به نیاز گیاه به‌صورت کود به خاک اضافه شده بود، افزایش معنی‌دار غلظت نیتروژن در تیمار تلفیق کرم خاکی به‌همراه میکوریزا نشان‌دهنده تأثیر متقابل مثبت این موجودات بر افزایش جذب نیتروژن معدنی افزوده‌شده به‌صورت کود و استفاده از نیتروژن آلی افزوده‌شده به خاک به‌صورت کود دامی می‌باشد. به‌ویژه تأثیر کرم خاکی بر معدنی شدن

نیتروژن آلی می‌تواند قابل توجه باشد. کرم‌های خاکی می‌توانند با تغییر خواص فیزیکی و شیمیایی خاک، باعث افزایش معدنی شدن مواد آلی، افزایش فراهمی عناصر غذایی به‌ویژه نیتروژن و ایجاد ثبات در چرخه عناصر غذایی خاک شوند (پارکین و بری، 1999). همچنین نتایج ادوارد و بوهلن (1996) نشان داد که حضور کرم‌های خاکی باعث افزایش میزان نیتروژن معدنی در خاک و جذب آن توسط گیاه می‌شود. در مورد تأثیر میکوریزا بر جذب نیتروژن توسط گیاه، هودگ و همکاران (2001) گزارش کردند که یکی از اثرات این ریزجانداران بالا بردن افزایش جذب نیتروژن در گیاه میزبان می‌باشد.

بیشترین افزایش غلظت فسفر اندام هوایی در تیمار میکوریزا مشاهده شد (جدول 3). به‌طوری‌که غلظت فسفر در تیمار میکوریزا، تلفیق کرم خاکی به‌همراه میکوریزا و کرم خاکی به ترتیب 2/16، 2/06 و 1/56 برابر نسبت به تیمار شاهد افزایش پیدا کرد (جدول 3). از آنجا که نقش میکوریزا در افزایش جذب فسفر از منابع کمتر قابل‌دسترس فسفر در خاک کاملاً شناخته شده است و تفاوت معنی‌داری بین درصد کلونیزاسیون تیمارهای میکوریزا و تلفیق کرم خاکی به‌همراه میکوریزا وجود نداشت، تأثیر مثبت میکوریزا بر غلظت فسفر در گیاه نسبت به تیمارهای کرم خاکی و شاهد دور از انتظار نبود. با توجه به افزایش بیش از دو برابری غلظت فسفر در تیمارهای میکوریزایی شده در خاکی که یک‌سوم نیاز کودی فسفر دریافت کرده است تأثیر مثبت این همزیستی در کاهش چشمگیر کاربرد کودهای فسفر تأیید می‌گردد (جدول 3). به‌عبارت‌دیگر، در خاک‌هایی با فسفر قابل‌دسترس پائین، قارچ میکوریزا می‌تواند تأثیر عمده‌ای بر بهبود جذب فسفر به‌وسیله گیاه داشته باشد (ورست و همکاران، 2004).

قارچ میکوریزا آربوسکولار با افزایش سطح جذب و کاهش آستانه غلظت موردنیاز برای جذب فسفر، افزایش فعالیت برخی از آنزیم‌ها مانند فسفاتاز و کاتالاز در توده خاک و فسفاتاز و اوره‌آز در ریزوسفر خاک موجب افزایش جذب فسفر و رشد گیاه می‌گردد (ژانگ و همکاران، 2011). مشابه با این تحقیق، لی و همکاران (2012) نیز در پژوهش خود نشان دادند که مقدار فسفر و نیتروژن اندام هوایی گیاه ذرت در حضور کرم خاکی و میکوریزا به طور معنی‌داری افزایش یافت. اورتیز-سبالوس و همکاران (2007) نیز در بررسی تأثیر کرم خاکی و میکوریزا بر جذب نیتروژن در گیاه ذرت گزارش کردند که حضور کرم‌های خاکی در خاک باعث افزایش 20 درصدی غلظت نیتروژن در ریشه و اندام هوایی گیاه شد و علت آن را افزایش معدنی شدن نیتروژن توسط کرم خاکی دانستند. بسیاری از پژوهشگران افزایش رشد گیاه در حضور کرم خاکی و میکوریزا را به علت فراهمی عناصر دانسته‌اند، به‌عنوان‌مثال میکوریزا می‌تواند سبب فراهمی فسفر و کرم خاکی سبب فراهمی نیتروژن برای گیاه شود که تأمین این دو عنصر ضروری باعث بهبود رشد گیاه می‌شود (ورست و همکاران، 2004). بنابراین در شرایط مناسب خاک، کرم‌های خاکی و میکوریزا می‌توانند با مکانیسم‌های مختلف، عرضه مواد غذایی را برای گیاه افزایش داده و در نتیجه اثر هم‌افزایی بر جذب عناصر غذایی توسط گیاه داشته باشند (ایزن هاور و همکاران، 2009).

نسبت نیتروژن به فسفر (N/P) اندام هوایی گیاه ذرت

نسبت نیتروژن به فسفر (N/P) در اندام هوایی گیاه اغلب برای ارزیابی اینکه آیا نیتروژن عنصر محدودکننده رشد گیاه است یا فسفر، مورد استفاده قرار می‌گیرد (کورسلمان و مولمان، 1996). کورسلمان و مولمان (1996) پیشنهاد کردند که نسبت N/P بزرگ‌تر از 16 نشانه‌ای از محدودیت فسفر، درحالی‌که N/P کمتر از 14 نشان‌دهنده محدودیت نیتروژن می‌باشد. کرم‌های خاکی می‌توانند یک نقش مهمی در افزایش معدنی شدن نیتروژن در شرایط محدودیت نیتروژن ایفا کنند. نتایج مقایسه میانگین‌ها، محدودیت نیتروژن را علی‌رغم افزودن نیتروژن به‌صورت کود به خاک نشان داد (جدول 3). بیشترین محدودیت نیتروژن در تیمار میکوریزا با نسبت N/P برابر 6 و کمترین آن در تیمار کرم خاکی با 9/97 مشاهده شد (جدول 3). این نتایج تأییدکننده تأثیر قابل‌توجه میکوریزا بر افزایش جذب فسفر و درنتیجه کاهش نسبت N/P و تأثیر قابل‌توجه کرم خاکی بر افزایش جذب نیتروژن از دو منبع معدنی و آلی خاکی و در نتیجه افزایش نسبت N/P است. با اضافه کردن کرم خاکی به تیمار میکوریزا، افزایش 39 درصدی نسبت N/P مشاهده شد (جدول 3). وورست و همکاران (2004) نیز در پژوهشی با بررسی اثرات ترکیبی کرم خاکی و قارچ میکوریزا آربوسکولار بر عملکرد گیاه، محدودیت نیتروژن را با نسبت N/P کمتر از 14 مشاهده کردند.

فسفر قابل‌دسترس، غلظت نیترات و آمونیوم خاک، کربن زیست‌توده میکروبی و کربن آلی خاک

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که تیمارهای آزمایش تأثیر معنی‌داری در سطح یک درصد ($p \leq 0/01$) بر فسفر قابل‌دسترس، غلظت نیترات خاک، کربن زیست‌توده میکروبی و کربن آلی خاک و در سطح پنج

درصد (p ≤0/05) بر غلظت آمونیوم خاک داشتند (جدول 5).

جدول 5- نتایج تجزیه واریانس (میانگین مربعات) اثر تیمارهای آزمایش بر برخی صفات مورد مطالعه

منابع تغییر	درجه آزادی	کربن آلی خاک	فسفر قابل‌دسترس	کربن زیست‌توده میکروبی	آمونیوم	نیترات
		(درصد)	(میلی‌گرم بر کیلوگرم)			
تیمار	3	0/044**	25/49**	19889/60**	134/90*	779/21**
خطا	8	0/000	0/17	126/20	9/52	15/32
کل	11					

**، * و ns به ترتیب نشان دهنده معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد، پنج درصد و غیر معنی‌داری می‌باشد.

در مقایسه با تیمار شاهد، تیمارهای میکوریزا و تلفیق کرم خاکی به‌همراه میکوریزا به طور معنی‌داری در سطح یک درصد (p≤0/01) باعث کاهش فسفر قابل‌دسترس خاک شدند (جدول 6). کمترین مقدار فسفر قابل‌دسترس خاک در تیمار میکوریزا با 13/81میلی‌گرم بر کیلوگرم و بیشترین آن در تیمار شاهد با 20/14 میلی‌گرم بر کیلوگرم مشاهده شد (جدول 6). به طور مشابه، نیترات خاک به طور معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد (p ≤0/01) در تیمارهای کرم خاکی، میکوریزا و تلفیق کرم خاکی به‌همراه میکوریزا نسبت به شاهد کاهش یافت (جدول 5). کمترین مقدار نیترات در تیمار تلفیقی کرم خاکی به‌همراه میکوریزا با 9/78 میلی‌گرم بر کیلوگرم مشاهده شد که از لحاظ آماری نسبت به سایر تیمارها معنی‌دار بود (جدول 6). همچنین نتایج تجزیه واریانس نشان داد که تیمارهای کاربردی تفاوت معنی‌داری در سطح پنج درصد (p ≤0/05) در مقدار آمونیوم خاک ایجاد نمودند (جدول 5). به‌طوری‌که تیمارهای کرم خاکی، تلفیق کرم خاکی به‌همراه میکوریزا و میکوریزا به ترتیب باعث کاهش 13، 10 و 7 درصدی غلظت آمونیوم خاک نسبت به تیمار شاهد شدند (جدول 6). به نظر می‌رسد که تیمارهای آزمایش با افزایش جذب فسفر و نیتروژن به‌وسیله گیاه موجب کاهش فرم فراهم آن‌ها در خاک شده‌اند. به طور مشابهی، لی و همکاران (2012) اظهار داشتند که حضور میکوریزا به طور معنی‌داری (p ≤0/05) موجب کاهش فراهمی فسفر خاک شد. همچنین بیان کردند که تیمارهای کرم خاکی، میکوریزا و تلفیق کرم خاکی به‌همراه میکوریزا موجب کاهش معنی‌دار مقدار نیترات خاک نسبت به تیمار شاهد شدند.

جدول 6- مقایسه میانگین اثر تیمارهای آزمایش بر برخی صفات مورد مطالعه

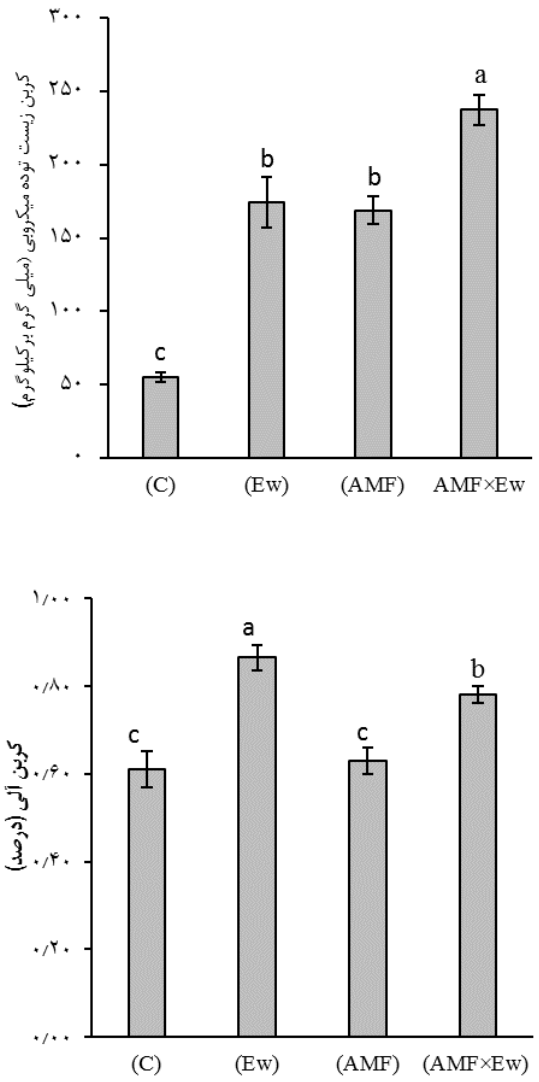
تیمار تلقیح	فسفر قابل‌دسترس	نیترات	آمونیوم
	(میلی‌گرم بر کیلوگرم)		
شاهد	20/14 a	49/01 a	121/31 a
کرم خاکی	17/62 b	27/64 b	105/93 b
میکوریزا	13/81 c	25/64 b	112/02 b
کرم خاکی به همراه میکوریزا	14/57 c	9/78 c	108/63 b

در هر ستون میانگین‌هایی که در هر قسمت حداقل دارای یک حرف مشترک هستند بر اساس آزمون توکی در سطح احتمال پنج درصد فاقد اختلاف معنی‌دار می‌باشند.

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده، تیمارهای آزمایشی به طور معنی‌داری موجب افزایش کربن زیست‌توده میکروبی خاک در سطح احتمال یک درصد (p ≤0/01) نسبت به تیمار شاهد شدند (جدول 5). بیشترین کربن زیست‌توده میکروبی خاک در تیمار تلفیق کرم خاکی به‌همراه میکوریزا بدست آمد. تیمارهای تلفیق کرم خاکی

به‌همراه میکوریزا، کرم خاکی و میکوریزا به ترتیب موجب افزایش 4/3، 3/1 و 3 برابری کربن زیست‌توده میکروبی خاک نسبت به شاهد شدند (شکل 2). لی و همکاران (2012) نیز در پژوهشی نشان دادند که تفاوت معنی‌داری در کربن زیست‌توده میکروبی بین تیمار شاهد و سایر تیمارها (تیمارهای کرم خاکی به‌همراه میکوریزا، کرم خاکی و میکوریزا) وجود دارد.

افزایش کربن زیست‌توده میکروبی در زمان مشارکت میکوریزا مربوط به آزادسازی ترکیبات حاوی کربن است که منشأ آن می‌تواند از ترشحات فتوسنتزی ریشه و رشد گیاه میزبان باشد (جانسون و همکاران، 2004). همچنین وان‌ارل و همکاران (2003)، افزایش در زیست‌توده میکروبی و فعالیت میکروبی را در حضور میکوریزا در یک خاک دارای سنگ آهک گزارش دادند. کرم‌های خاکی نیز تأثیر زیادی بر جامعه میکروبی خاک دارند و با عبور ذرات خاک از روده خود باعث افزایش جامعه میکروبی خاک می‌شوند همچنین کرم‌های خاکی به‌صورت انتخابی از ریز جانداران خاک تغذیه می‌کنند که باعث تغییر در اندازه و ساختار جامعه میکروبی خاک می‌شود (براون و همکاران، 2004).



شکل 2- اثر تیمارهای آزمایش بر کربن زیست‌توده میکروبی و کربن آلی خاک (شاهد (C)، کرم خاکی (Ew)، میکوریزا (AMF) و کرم خاکی به‌همراه میکوریزا (AMF×Ew))

نتایج به‌دست‌آمده از این پژوهش نشان داد که تأثیر تیمارهای آزمایش بر درصد کربن آلی خاک معنی‌دار ($p \leq 0/01$) شد (جدول 5). بیشترین مقدار کربن آلی خاک با 0/86 درصد در تیمار کرم خاکی بدست آمد. به‌طوری‌که افزایش 41 درصدی کربن آلی خاک را نسبت به تیمار شاهد نشان داد (شکل 2). نتایج این تحقیق با نتایج ژانگ و همکاران (2007) مطابقت دارد ولی با نتایج آقابابایی و رئیسی (1392) مطابقت ندارد. آقابابایی و رئیسی (1392) بیان کردند که همزیستی گیاه با قارچ میکوریزا، ترشح ترکیبات آلی از ریشه گیاه را کاهش می‌دهد. ژانگ و همکاران (2007) گزارش کردند که کرم‌های خاکی به طور غیرمستقیم باعث افزایش رشد گیاه و به دنبال آن با افزایش ترشحات ریشه‌ای سبب افزایش کربن آلی خاک می‌شوند اما با توجه به این‌که در این آزمایش وزن خشک اندام هوایی گیاه در تیمارهای کرم خاکی، کرم خاکی به‌همراه میکوریزا و میکوریزا تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشتند. افزایش رشد گیاه و بنابراین افزایش ترشحات ریشه نمی‌تواند عامل افزایش کربن آلی خاک باشد. به نظر می‌رسد که کرم‌های خاکی با مکانیسم دیگری موجب افزایش کربن آلی خاک می‌شوند. یکی از دلایل افزایش کربن آلی خاک در حضور کرم خاکی می‌تواند مصرف مواد آلی و اختلاط آن‌ها با ذرات معدنی و مخاط دستگاه گوارش کرم و سپس دفع آن‌ها باشد (ادوارد و بوهلن، 1996). همچنین هاینز و فرایزر (1998) بیان کردند کرم خاکی به‌صورت انتخابی از ذرات آلی تغذیه می‌کند و محتویات روده‌ای آن‌ها غنی از مواد آلی و عناصر غذایی است و باعث افزایش فعالیت میکروبی خاک و کربن آلی خاک می‌گردد.

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که حضور کرم‌های خاکی و میکوریزا به طور معنی‌داری موجب افزایش زیست‌توده اندام هوایی، مقدار نیتروژن و فسفر اندام هوایی، کربن آلی و کربن زیست‌توده میکروبی خاک به‌عنوان شاخصی از افزایش فعالیت‌های زیستی خاک شد. بیشترین کربن زیست‌توده میکروبی و کربن آلی محلول خاک به ترتیب در تیمارهای میکوریزا و کرم خاکی مشاهده گردید. میکوریزا با تأثیر بیشتر بر افزایش جمعیت میکروبی و کرم‌های خاکی با تأثیر بیشتر بر افزایش معدنی شدن مواد آلی بر فراهمی نیتروژن و فسفر خاک مؤثر می‌باشند. بهبود در زیست‌توده اندام هوایی و جذب فسفر و نیتروژن اندام هوایی ممکن است به‌عنوان یک نتیجه از افزایش فراهمی فسفر توسط میکوریزا و افزایش کارایی جذب نیتروژن از دو منبع معدنی و آلی در حضور کرم خاکی باشد. بیشترین جذب نیتروژن به‌وسیله ذرت در تیمار تلفیق کرم خاکی به‌همراه میکوریزا حاصل شد. نتایج این تحقیق نشان داد مصرف تلفیقی کرم خاکی و میکوریزا می‌تواند به‌عنوان یک روش زیستی در کاهش مصرف و افزایش راندمان مصرف کودهای شیمیایی فسفر و نیتروژن مؤثر باشد.

فهرست منابع:

1. آقابابایی، ف.، رئیسی، ف.، حسین پور، ع. ر. 1392. اثر کرم خاکی و میکوریزا بر زیست توده میکروبی و فعالیت آنزیمی در خاک‌های آلوده به کادمیم در کشت آفتابگردان. نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی). جلد 27، شماره 5، 949 تا 962.
2. صالح راستین، ن.1380. کودهای بیولوژیک و نقش آن در راستای نیل به کشاورزی پایدار. ضرورت تولید صنعتی کودهای بیولوژیک در کشور. نشر آموزش کشاورزی، وزارت جهاد کشاورزی، کرج. ایران. 78-65.
3. صالح راستین، ن. 1377. کودهای بیولوژیک. محله خاک و آب، جلد 12، شماره3 ، صفحات 36-1.
4. ملکوتی، م.ج. 1374. بررسی وضعیت تعادل عناصر غذایی در خاک های ایران و جلوگیری از مصرف بیرویهکودهای شیمیایی. ماهنامه آب، خاک، ماشین. سال دوم. شماره10. صفحات 17-12..
5. ملکوتی، م.ج.، طهرانی، م.م. 1384. نقش عناصر ریزمغذی در افزایش کّمی و کیفی محصولات کشاورزی و ارتقای سلامت جامعه «عناصر خرد با تأثیر کلان». موسسه تحقیقات خاک و آب (مشترک با دانشگاه تربیت مدرس تهران). 450 صفحه.

6. Azcon, R., Aguilar, C. A. G., and Barea, J. M. 1978. Effects of plant hormones present in bacterial cultures on the formation and responses to VA endomycorrhiza. *New Phytologist*, 80 (2): 359-364.
7. Bonkowski, M., Griffiths, B. S., and Ritz, K. 2000. Food preferences of earthworms for soil fungi. Pedobiologia, 44 (6): 666-676.
8. Bradford, M. A., Jones, T. H., Bardgett, R. D., Black, H. I., Boag, B., Bonkowski, M., and Kandeler, E. 2002. Impacts of soil faunal community composition on model grassland ecosystems. Science, 298 (5593): 615-618.
9. Bremner, J. M., and Mulvaney, C. S. 1982. Nitrogen—total. Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties, (methodsofsoilan2), 595-624.
10. Brown, G. G., Barois, I., and Lavelle, P. 2000. Regulation of soil organic matter dynamics and microbial activityin the drilosphere and the role of interactionswith other edaphic functional domains. *European Journal of Soil Biology*, 36 (3), 177-198.
11. Brown, G. G., Edwards, C. A., and Brussaard, L. 2004. How earthworms affect plant growth: burrowing into the mechanisms. *Earthworm ecology*, 2, 13-49.
12. Brussaard, L., Pulleman, M. M., Ouédraogo, É. Mando, A., and Six, J. 2007. Soil fauna and soil function in the fabric of the food web. *Pedobiologia*, 50 (6), 447-462.
13. Chapman, H. D. 1965. Total exchangeable bases.Methods of soil analysis.Part 2.Chemical and microbiological properties, *(methodsofsoilanb)*, 902-904.
14. Edwards, C. A., and Bohlen, P. J. 1996. Biology and ecology of earthworms (Vol. 3). *Springer Science and Business Media*.
15. Eisenhauer, N., König, S., Sabais, A. C., Renker, C., Buscot, F., and Scheu, S. 2009. Impacts of earthworms and arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomus intraradices*) on plant performance are not interrelated. *Soil Biology and Biochemistry*, 41 (3), 561-567.
16. Gee, G. W., Bauder, J. W., and Klute, A. 1986. Particle-size analysis. P. 383- 411. In Klute, A (ed.) Methods of soil analysis. Part 1. Physical and mineralogical methods. 2nd ed. *American Society of Agronomy, Inc*.
17. Haynes, R. J., and Fraser, P. M. 1998. A comparison of aggregate stability and biological activity in earthworm casts and uningested soil as affected by amendment with wheat or lucerne straw. *European Journal of Soil Science*, 49 (4): 629-636.
18. Horwath, W. R., and Paul, E. A. 1994. Microbial biomass. Methods of Soil Analysis: Part 2—Microbiological and Biochemical Properties, (*methodsofsoilan2*), 753-773.
19. Hodge, A., Campbell, C.D. and Fitter, A.H. 2001. An arbuscular mycorrhizal fungus accelerates decomposition and acquires nitrogen directly from organic material. *Nature*, 413 (6853), pp.297-299.
20. Johansson, J. F., Paul, L. R., and Finlay, R. D. 2004. Microbial interactions in the mycorrhizosphere and their significance for sustainable agriculture. *FEMS microbiology ecology*, 48 (1), 1-13.
21. Keeney, D. R. A., and Nelson, D. 1982. Nitrogen—inorganic forms. *Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties*, (methodsofsoilan2), 643-698.
22. Koerselman, W., and Meuleman, A. F. 1996. The vegetation N: P ratio: a new tool to detect the nature of nutrient limitation. *Journal of applied Ecology*, 1441-1450.
23. Kormanik, P. P., Bryan, W. C., and Schultz, R. C. 1980. Procedures and equipment for staining large numbers of plant root samples for endomycorrhizal assay. *Canadian Journal of Microbiology*, 26 (4), 536-538.
24. Ll, H., Li, X., Dou, Z., Zhang, J. and Wang, C. 2012. Earthworm (*Aporrectodea trapezoides*)–mycorrhiza (*Glomus intraradices*) interaction and nitrogen and phosphorus uptake by maize. *Biology and Fertility of Soils*, 48 (1), pp.75-85.
25. Loeppert, R. H., and Suarez, D. L. 1996. Carbonate and Gypsum, Methods of Soil Analysis. Part 3. Chemical Methods. *Soil Science Society of America, Madison*.

26. Lussenhop, J. 1996. Collembola as mediators of microbial symbiont effects upon soybean. *Soil Biology and Biochemistry*, 28 (3), 363-369.
27. McLean, M. A., Migge-Kleian, S., and Parkinson, D. 2006. Earthworm invasions of ecosystems devoid of earthworms: effects on soil microbes. *Biological Invasions*, 8 (6), 1257-1273.
28. Milleret, R., Le Bayon, R. C., and Gobat, J. M. 2009. Root, mycorrhiza and earthworm interactions: their effects on soil structuring processes, plant and soil nutrient concentration and plant biomass. *Plant and soil*, 316 (1-2), 1-12.
29. Olsen, S. R., Sommers, L. E., and Page, A. L. 1982. Methods of soil analysis. Part 2. *Chemical and microbiological properties of Phosphorus*. ASA Monograph, (9), 403-430.
30. Ortas, I., Harris, P.J. and Rowell, D.L. 1996. Enhanced uptake of phosphorus by mycorrhizal sorghum plants as influenced by forms of nitrogen. *Plant and soil*, 184(2), 255-264.
31. Ortiz-Ceballos, A. I., Peña-Cabriales, J. J., Fragoso, C., and Brown, G. G. 2007. Mycorrhizal colonization and nitrogen uptake by maize: combined effect of tropical earthworms and velvetbean mulch. *Biology and Fertility of Soils*, 44 (1), 181-186.
32. Parkin, T. B., and Berry, E. C. 1999. Microbial nitrogen transformations in earthworm burrows. *Soil Biology and Biochemistry*, 31 (13), 1765-1771.
33. Pattinson, G. S., Smith, S. E., and Doube, B. M. 1997. Earthworm Aporrectodea trapezoides had no effect on the dispersal of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi, *Glomus intraradices*. *Soil Biology and Biochemistry*, 29 (7), 1079-1088.
34. Scheu, S.1987. Microbial activity and nutrient dynamics in earthworm casts (*Lumbricidae*). *Biology and fertility of soils*, 5 (3), 230-234.
35. Sharma, A.K., 2002. *Biofertilizers for sustainable agriculture* (Vol. 12, 319-324). India.: Agrobios.
36. Smith SE, Read DJ. 2008. Mycorrhizal symbiosis. Academic, San Diego Soils Laboratory Staff, Royal Tropical Institute (1984) Analytical methods of the service laboratory for soil, plant and water analysis. Part 1: methods for soil analysis. Royal Tropical Institute, Amsterdam.
37. Tuffen, F., Eason, W. R., and Scullion, J. 2002. The effect of earthworms and arbuscular mycorrhizal fungi on growth of and 32 P transfer between Allium porrum plants. *Soil Biology and Biochemistry*, 34 (7), 1027-1036.
38. Van Aarle, I. M., Söderström, B., and Olsson, P. A. 2003. Growth and interactions of arbuscular mycorrhizal fungi in soils from limestone and acid rock habitats. *Soil Biology and Biochemistry*, 35 (12), 1557-1564.
39. Walkley, A., and Black, I. A. 1934. An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil science*, 37 (1), 29-38.
40. Wardle, D. A. 2006. The influence of biotic interactions on soil biodiversity. *Ecology letters*, 9 (7), 870-886.
41. Wu, S. C., Cao, Z. H., Li, Z. G., Cheung, K. C., and Wong, M. H. 2005. Effects of biofertilizer containing N-fixer, P and K solubilizers and AM fungi on maize growth: a greenhouse trial. *Geoderma*, 125 (1), 155-166.
42. Wurst, S., Dugassa-Gobena, D., Langel, R., Bonkowski, M., and Scheu, S. 2004. Combined effects of earthworms and vesicular–arbuscular mycorrhizas on plant and aphid performance. *New Phytologist*, 163 (1), 169-176.
43. Yin, X. and Vyn, T.J. 2005. Relationships of isoflavone, oil, and protein in seed with yield of soybean. *Agronomy Journal*, 97 (5), pp.1314-1321.

44. Zarea, M. J., Ghalavand, A., Goltapeh, E. M., Rejali, F., and Zamaniyan, M. 2009. Effects of mixed cropping, earthworms (*Pheretima sp*.), and arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomus mosseae*) on plant yield, mycorrhizal colonization rate, soil microbial biomass, and nitrogenase activity of free-living rhizosphere bacteria. *Pedobiologia*, 52 (4), 223-235.
45. Zhang J., Song C. and Wang S. 2007. Dynamics of soil organic carbon and its fractions after abandonment of cultivated wetlands in northeast China, *Soil and Tillage Research*, 96: 350–360.
46. Zhang, H., Wu, X., Li, G., and Qin, P. 2011. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and phosphate-solubilizing fungus (*Mortierella sp*.) and their effects on Kostelelzkya virginica growth and enzyme activities of rhizosphere and bulk soils at different salinities. *Biology and Fertility of Soils*, 47 (5), 543-554.

Effect of earthworm (*Eisenia fetida*) and arbuscular mycorrhiza fungi (*Funneliformis mosseae)* on soil microbial characteristics and Nitrogen and Phosphorus uptake by corn (*Zea mays*)

H. Dehghanian, A. Halajnia[1], A. Lakzian, and A. R. Astaraei
M.Sc. Student, Department of Soil Science, Agricultural College, Ferdowsi University of Mashhad; E-mail: dehghanianhamid@yahoo.com
Assistant Professor, Department of Soil Science, Agricultural College, Ferdowsi University of Mashhad; E-mail: halajnia@um.ac.ir
Professor, Department of Soil Science, Agricultural College, Ferdowsi University of Mashhad; E-mail: lakzian@um.ac.ir
Associate professor, Department of Soil Science, Agricultural College, Ferdowsi University of Mashhad; E-mail: astaraei@um.ac.ir
Received: October, 2016 & Accepted: July, 2017

Abstract

The activities of earthworms and mycorrhiza affect on water and nutrient uptake and crop yield. The aim of this study was to evaluate the effect of earthworm (*Eisenia fetida*) and arbuscular mycorrhiza fungi (AMF, *Funneliformis mosseae)* on root colonization, shoot dry weight, phosphorus and nitrogen uptake, organic carbon and soil microbial biomass C. In this regard, a greenhouse experiment was conducted in a completely randomized design (CRD) with three replications in Agricultural Research Station of Ferdowsi University of Mashhad. The experimental treatments consisted of control, single and integrated treatments of earthworm and mycorrhiza. The results showed that inoculated treatments with arbuscular mycorrhizal fungi significantly increased the amount of root colonization. The same trend was observed in combined treatments with mycorrhizal fungi and earthworm. The results also revealed that the integrated application of earthworm and mycorrhiza treatment increased the concentration of P and N in shoot by 105% and 79% ,respectively, compared to control treatment ($p<0.05$). The effect of mycorrhiza on decreasing N/P and also the effect of earthworm on increasing N/P were significant. The experimental treatments significantly increased the soil microbial biomass C ($p<0.05$). In addition, soil organic C significantly enhanced in the presence of earthworms. Hence, using earthworms and arbuscular mycorrhizal fungi as bio-fertilizer can reduce the consumption of nitrogen and phosphorus fertilizer and increase their use efficiency in the sustainable agriculture.

Keywords: Biological fertilizer, N mineralization, Root colonization, Soil microbial biomass C, Soil organic C

[1.] Corresponding author: Department of Soil Science, Agricultural College, Ferdowsi University of Mashhad