

معرفی جعبه پایش ریشه (Rhizotron) برای ارزیابی رشد و توسعه ریشه گیاهان تحت تأثیر تیمارهای مختلف خاکی

جواد زمانی بابهگری^{۱*} و محمدعلی حاج عباسی^۲

۱- استادیار گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه جیرفت، جیرفت، ایران
۲- استاد گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران

تاریخچه مقاله	چکیده
دریافت: ۱۳۹۶/۰۸/۰۲ پذیرش نهایی: ۱۳۹۷/۰۴/۰۴	درک ما از سیستم ریشه - خاک، به دلیل دشواری‌هایی که در مشاهده رشد و فعالیت ریشه‌ها درون خاک وجود دارد، محدود می‌باشد. به منظور معرفی جعبه پایش ریشه در ارزیابی و مطالعه درجای رشد و توسعه ریشه‌ها در خاک، از داده‌های یک مطالعه‌ای که در آن تأثیر تلقیح گیاه ذرت با قارچ <i>Piriformospora indica</i> و حضور یک لایه آلوده به نفت بر رشد و توسعه ریشه‌های این گیاه مورد ارزیابی قرار گرفته بود استفاده شد. نتایج نشان داد که با استفاده از جعبه پایش ریشه می‌توان تأثیر تیمارهای مورد مطالعه را بر طول ریشه، عمق توسعه ریشه و تعداد نوک ریشه‌های گیاه مورد مطالعه قرار داد. در مطالعه مذکور وجود لایه آلوده به مواد نفتی در خاک، رشد طولی و توسعه عمقی ریشه‌ها را به طور معنی‌داری کاهش داده و تلقیح گیاه با قارچ سبب کاهش اثر منفی حضور این لایه آلوده شد که این موضوع با استفاده از جعبه طراحی شده به خوبی قابل مطالعه بود. تعداد نوک ریشه‌های گیاه ذرت نیز که نشان دهنده توسعه و گسترش جانبی ریشه‌ها و حضور ریشه‌های فرعی و موئین در خاک می‌باشند روندی مشابه با رشد طولی ریشه‌ها نشان داد و این پارامتر در گیاهان تلقیح شده با قارچ به مقدار قابل توجهی بیشتر از گیاهان بدون تلقیح بود. همچنین، نتایج نشان داد اثر تلقیح گیاه بر عملکرد ریشه ذرت بیش از اندام هوایی بود.
کلمات کلیدی: ریزوترون، قارچ اندوفیت، گیاه پالایی، ImageJ SmartRoot	
* عهده‌دار مکاتبات Email: ja.zamani@yahoo.com	

زمین می‌باشند (۱۳) و درک ما از سیستم ریشه - خاک، به دلیل دشواری‌هایی که در مشاهده رشد و فعالیت آن درون خاک وجود دارد، بسیار محدود می‌باشد.

اگر چه دانشمندان در سال‌های اخیر پژوهش‌های زیادی در زمینه محیط‌های متخلخل به صورت دست‌نخورده انجام داده‌اند، اما در حال حاضر در

مقدمه

ریشه گیاهان در یک محیط ناهمگن، متخلخل، نیمه فشرده و سه فازی یعنی خاک رشد می‌کند که لذا بررسی رشد و توسعه آن کار دشواری می‌باشد. درحالت معمول بررسی ریشه‌ها بدون به هم خوردگی سیستم خاک - ریشه کاری بسیار دشوار خواهد بود (۱۷). ریشه‌ها نیمه‌ی پنهان گیاهان موجود در کره

مطالعه‌ی رشد و فعالیت ریشه گیاهان روش‌ها و ابزارهای کمی برای توصیف خاک به صورت دست‌نخورده وجود دارد (۴). در این بین روش‌های غیرتخریبی می‌توانند به طور ایده‌آلی به عنوان روش‌هایی مفید برای تعیین برخی ویژگی‌های سیستم خاک - ریشه بدون به هم زدن آن مد نظر قرار گیرند. برای اهداف کاربردی روش‌های غیرتخریبی در پژوهش‌های مرتبط با علوم خاک به عنوان روش‌هایی در نظر گرفته می‌شوند که نمونه خاک به صورت دست‌نخورده باشد یا اندازه‌گیری‌ها به صورت درجا انجام شود و ویژگی‌ها و ساختمان سیستم در طول انجام آزمایش ثابت باقی بمانند (۴).

در حال حاضر ارزیابی درجای رشد ریشه گیاهان با پیشرفت‌های به وجود آمده در تکنیک‌های عکس‌برداری امکان‌پذیر می‌باشد (۳، ۱۵). از این روش‌ها می‌توان به استفاده از نوترون رادیوگرافی و توموگرافی^۱ و نیز استفاده از عکس‌برداری با اشعه ایکس^۲ اشاره کرد (۱۳، ۱۴) که البته در حال حاضر در ایران، کاربرد این روش‌ها در مطالعات ریشه بسیار هزینه‌بر خواهد بود. در این بین استفاده از جعبه پایش ریشه یا همان ریزوترون^۳ نیز می‌تواند یکی از روش‌های کاربردی و با صرفه در این زمینه باشد. ریزوترون در واقع یک جعبه با ضخامت نازک می‌باشد که یک سمت آن شفاف است و از آن برای مطالعه ریشه توسط عکس‌برداری با دوربین عکاسی مناسب یا رسم کردن ریشه‌ها روی ورق‌های استاتی شفاف استفاده می‌شود (۹).

وقتی گیاه در گلدان‌های معمولی کشت می‌شود برای بررسی ویژگی‌های ریشه مانند قطر و طول ریشه، سیستم خاک - ریشه به هم خورده و تخریب می‌شود اما جعبه پایش ریشه این امکان را می‌دهد تا بدون

تخریب و به هم خوردگی خاک تاثیر پارامترهای مختلف مانند وجود آب و اکسیژن، عناصر غذایی، تراکم، آلودگی و پارامترهای مشابهی که بر رشد ریشه تاثیر می‌گذارد مورد بررسی قرار گیرد (۹). جعبه پایش ریشه در واقع نوعی جعبه جهت رشد ریشه می‌باشد که امکان مطالعه دو بعدی سیستم ریشه را امکان‌پذیر می‌نماید (۱۹). طول و عرض این جعبه بسته به نوع مطالعه می‌تواند متفاوت باشد. اما عمق آن که در واقع محل توسعه ریشه است، معمولاً کم انتخاب می‌شود تا بتوان ریشه گیاه را در یک محیط محدود محبوس کرد و مشاهده آنرا آسان‌تر نمود. عمق این جعبه معمولاً یک الی ۲/۵ سانتی‌متر در نظر گرفته می‌شود. جنس چارچوب اصلی جعبه پایش ریشه معمولاً از پلکسی گلاس تیره می‌باشد اما بسته به امکانات موجود و نیز بسته به نوع مطالعه می‌توان از مواد دیگری نظیر پی‌وی‌سی، آلومینیوم و حتی چوب استفاده نمود. برای بخش جلویی این جعبه که محل مشاهده و دیده‌بانی ریشه می‌باشد باید از پلکسی گلاس شفاف یا شیشه استفاده کرد تا بتوان به راحتی رشد و توسعه ریشه‌ها را با عکس‌برداری و یا رسم آنها بر روی ورق‌های استاتی شفاف مورد ارزیابی قرار داد. برای مشاهده بهتر ریشه در بخش جلویی جعبه، بعد از کشت گیاه، خاک داخل جعبه‌ها باید با زاویه مشخصی نسبت به سطح زمین قرار داده شود تا ریشه‌های گیاه تحت فشار ریشه‌ای در قسمت جلویی این جعبه رشد کرده و مشاهده آن‌ها راحت‌تر و دقیق‌تر انجام شود (۸).

زاویه استفاده شده در مطالعات مختلف متفاوت بوده است؛ این زاویه از ۳۵ تا ۹۰ درجه و بسته به نوع مطالعه مورد استفاده قرار گرفته است (۸، ۱۸، ۱۹). هرچه زاویه سطح خاک داخل جعبه با سطح افق بیشتر باشد رشد ریشه و گیاه بیشتر از حالت طبیعی خارج می‌شود (۱۶) و در این مورد زاویه حدود ۳۵ تا ۴۵ درجه مناسب می‌باشد. برای قرار دادن جعبه‌های پایش

1- Neutron Radiography or Tomography
2- X-Ray Imaging
3- Rhizotron

جعبه پایش ریشه، نحوه استفاده از این جعبه به اختصار توضیح داده شده است.

مواد و روش‌ها

الف) ساخت جعبه پایش ریشه

شکل ۱ شمایی کلی از جعبه پایش ریشه مورد نظر در این مطالعه را به همراه ابعاد آن نشان می‌دهد. برای ساخت چارچوب اصلی از چوب و برای بخش جلویی این جعبه از شیشه با ضخامت ۴ میلی‌متر استفاده شد. بهتر است که برای تهیه بخش پشتی از جنس پی‌وی‌سی و برای تهیه بخش جلویی شفاف از ورق‌های نازک پلکسی‌گلاس استفاده شود.

این جعبه دارای دو بخش اصلی بود که قسمت جلویی آن توسط چهار پیچ به چارچوب اصلی متصل می‌شد. این حالت امکان تامین چگالی‌های متفاوت از یک خاک را جهت مطالعه تاثیر تراکم و نیز امکان استفاده از خاک‌های متفاوت و لایه‌بندی‌های مختلف خاک را آسان‌تر می‌کند. در واقع بعد از محاسبه مقدار خاک (بسته به چگالی مورد نیاز) برای هر جعبه توزین شده و در چارچوب اصلی این جعبه قرار داده می‌شود و سپس قسمت جلویی به راحتی با پیچ به چارچوب اصلی آن متصل می‌شود.

جهت ساخت بخش پشتی که چارچوب اصلی قرارگیری خاک و ریشه می‌باشد، از چوب نجاری و تخته سه‌لایه استفاده شد و جنس بخش جلویی آن شیشه شفاف به ضخامت ۴ میلی‌متر بود. قطعات چوبی مورد نظر با ابعاد مشخص برش داده شد و با چسب و میخ به یکدیگر متصل شدند. شیشه‌ها با دقت و در ابعاد مشخص برش داده شد و سوراخ‌هایی جهت عبور پیچ و اتصال این بخش به بخش پشتی جعبه نیز در نظر گرفته شد. مراحل کلی ساخت جعبه پایش ریشه به صورت تصویری در شکل ۲ آورده شده است.

ریشه می‌توان از چارچوب‌هایی که بتوانند جعبه‌ها را با زاویه مورد نظر نگه دارند استفاده کرد. همچنین به منظور مقابله با فرایند نورگرایی منفی در ریشه، قسمت جلویی جعبه پایش ریشه باید با استفاده از پلاستیک مشکی یا ورقه نازک آلومینیومی پوشانده شود (۸).

کچاوورزی و همکاران (۲۰۰۷)^۱ مطالعه‌ای در زمینه بررسی توسعه و استقرار ریشه گیاه لولیوم با استفاده از جعبه پایش ریشه انجام دادند که نتایج آن‌ها به خوبی کارکرد مناسب این جعبه را جهت بررسی ریشه در حضور لایه‌های آلوده و نیز روش‌های آبیاری نشان داد. این پژوهشگران در مطالعه خود از یک جعبه چوبی با ابعاد $35 \times 25 \times 2/5$ سانتی‌متری استفاده کردند که یک سمت آن را با استفاده از پلکسی‌گلاس شفاف پوشانده بودند و توسعه ریشه را با بررسی ریشه‌های ظاهر شده در بخش شفاف جلویی جعبه و با ترسیم آن‌ها روی ورق‌های استاتی شفاف انجام دادند (۸).

جعبه‌های پایش ریشه را می‌توان با ابزارهای دیگری نظیر میله‌های رطوبت سنج TDR و یا سیستم آبیاری تحت مکش مجهز نمود تا مطالعات لازم با دقت بیشتری انجام شود. در این باره تسوتسومی و همکاران (۲۰۰۳)^۲ در مطالعه خود از یک جعبه پایش ریشه با ابعاد $30 \times 30 \times 2$ سانتی‌متر استفاده کردند. این جعبه‌ها به گونه‌ای طراحی شده بود که بتوان از بخش‌های مختلف جعبه آب را تحت مکش مشخص (حداکثر ۲۵ سانتی‌متر) وارد آن نمود و نیز با داشتن سوراخ‌هایی در قسمت جلویی آن با استفاده از TDR رطوبت خاک را به صورت درجا در نقاط مختلف مورد ارزیابی قرار داد (۱۹).

هدف اصلی مقاله حاضر معرفی اجمالی این روش جهت مطالعه درجای رشد ریشه در خاک بود که در ادامه با ارائه یک مطالعه در زمینه استفاده از این

1- Kechavarzi et al.
2- Tsutsumi et al.

ب) اجرای آزمایش

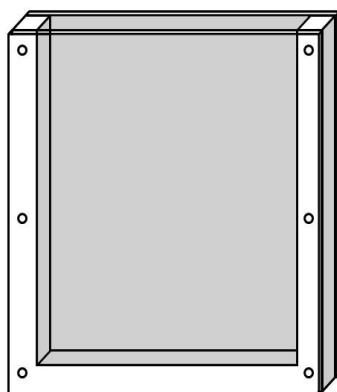
به منظور بررسی نحوه استفاده از جعبه پایش ریشه، از داده‌هایی مقاله‌ای که برای اجرای آن از این جعبه برای ارزیابی تاثیر تلقیح گیاه ذرت توسط قارچ *Piriformospora indica* بر رشد و توسعه ریشه این گیاه در خاک استفاده شده بود، استفاده شد (۲۲). قارچ *P. indica* یک سویه از قارچ‌های اندوفایت می‌باشد که به تازگی کشف شده و می‌تواند با حضور در ریشه بسیاری از گیاهان تاثیرات مفید زیادی به گیاه میزبان خود انتقال دهد (۲۰).

تیمارهایی با یک لایه از خاک آلوده به مواد نفتی با ضخامت ۲/۵ سانتی‌متر در مسیر رشد ریشه قرار داده شد. شمایی کلی از تیمارهای مورد مطالعه در این پژوهش و نحوه قرارگیری لایه آلوده به مواد نفتی در شکل ۳ نشان داده شده است. زاویه قرارگیری جعبه‌ها نسبت به افق با قرار گرفتن روی یک پایه فلزی در حدود ۴۵ درجه در نظر گرفته شد.

مایه تلقیح قارچ *P. indica* در آزمایشگاه بیولوژی خاک دانشگاه صنعتی اصفهان آماده شد و به بذرهای جوانه‌دار شده تلقیح شد (۲۱).

به منظور اجرای این آزمایش از یک خاک با بافت شن لومی (Loamy sand) که از اطراف پالایشگاه شهید هاشمی نژاد خانگیران (سرخس) جمع -

آوری شده بود استفاده شد. خاک آلوده نیز از محلی نزدیک به همین منطقه و در محیطی آلوده به مواد نفتی برداشته شد. برخی از ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی این خاک‌ها در جدول ۱ آورده شده است. در این مطالعه در مجموع ۱۲ جعبه برای کشت گیاه وجود داشت. ابتدا بذرها با قرار گرفتن در اتانول ۷۰ درصد به مدت ۳۰ ثانیه و محلول ۵ درصد هیپوکلریت سدیم (NaOCl) به مدت ۵ دقیقه استریل شدند و بعد از جوانه‌دار شدن با استفاده از مایه تلقیح آماده شده، تلقیح شدند. سپس در هر جعبه یک بذر جوانه‌دار شده دقیقاً در مرکز آن با استفاده از پنس استریل در عمق ۱/۵ سانتی‌متری خاک قرار داده شد. در این مرحله، در انتخاب نوع بذر یکسان بودن طول ریشه‌چه و اندازه بذر مورد نظر مد نظر بود تا شرایط از لحاظ نوع بذر نیز یکسان باشد. این آزمایش در سه تکرار و به صورت گلخانه‌ای انجام شده بود. طول دوره روشنایی در دوره آزمایش ۱۳ ساعت و بیشینه دما روزانه ۳۱ درجه سانتی‌گراد و دمای شبانه ۱۵/۵ درجه سانتی‌گراد ثبت شد و همچنین متوسط مقدار رطوبت نسبی در این دوره ۶۶ درصد و طول دوره آزمایش ۴۵ روز بود.

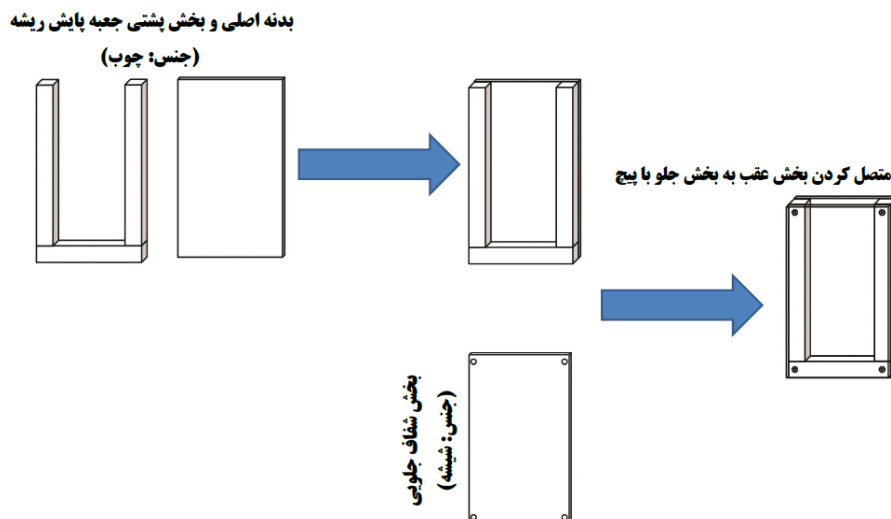


ابعاد (میلی‌متر)

	طول	عرض	ضخامت
بیرونی	320	235	23
داخلی	310	205	15

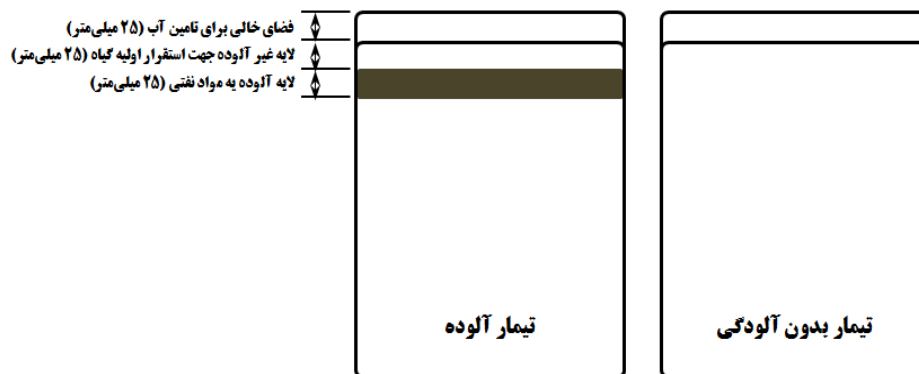
شکل (۱) شمایی کلی از جعبه پایش ریشه مورد استفاده در این مطالعه و ابعاد آن

Figure (1) Schematic view of used Rhizotron and its dimensions



شکل (۲) مراحل ساخت جعبه پایش ریشه مورد مطالعه به صورت تصویری

Figure (2) Step by step of Rhizotron creating



شکل (۳) شمایی کلی از نحوه قرارگیری لایه آلوده در خاک (تیمار آلوده) و تیمار شاهد

Figure (3) Schematic view of treatments and how the polluted layer is sandwiched in the soil

در آنالیز تصاویر بدست آماده بعد از اسکن، می‌توان از نرم‌افزارهایی که توانایی آنالیز تصاویر ریشه را دارند نظیر WinRhizo (۶، ۷)، EzRhizo (۱)، Rootedge (۶، ۸)، DART (۱۰)، ImageJ (۱۱)، GiaRoot (۵) و نیـــــــز نرم‌افزاری مانند MATLAB (۲) استفاده کرد. در این مطالعه تصاویر بدست آمده از ریشه‌ها در هر جعبه و در هر دوره از آزمایش را درون نرم‌افزار ImageJ وارد کرده و با استفاده از پلاگین SmartRoot برای بررسی طول کل ریشه‌ها، عمق توسعه ریشه‌ها و نیز تعداد نوک ریشه‌های گیاه مورد آنالیز قرار گرفته بود. نرم‌افزار ImageJ یک نرم‌افزار کاملاً رایگان جهت آنالیز تصاویر است که پلاگین SmartRoot در این نرم‌افزار نیز رایگان می‌باشد و به صورت نیمه اتوماتیک توانایی آنالیز تصاویر بدست آماده از جعبه پایش ریشه را

(ج) پایش ریشه و آنالیز تصاویر بدست آمده

در طول دوره آزمایش ریشه‌های ظاهر شده در قسمت جلویی جعبه پایش ریشه با استفاده از مازیک ریز بر روی ورق‌های استاتی شفاف ثبت شد (۸، ۱۸). تصاویر رسم شده بر روی این ورق‌ها با استفاده از اسکنر به صورت 300dpi اسکن شدند و برای مرحله بعدی جهت رسم ریشه از همان ورق-های استاتی مرحله قبل برای ترسیم ادامه رشد ریشه‌ها استفاده شد. در طول دوره آزمایش ۶ مرتبه ریشه‌های رشد یافته در قسمت جلویی هر کدام از جعبه‌های پایش ریشه رسم شد و جهت آنالیز مورد استفاده قرار گرفت. جدول ۲ زمان‌بندی دوره آزمایش از کشت بذور جوانه‌دار شده تا پایان دوره آزمایش را نشان می‌دهد.

داشته‌اند. شکل ۴ به خوبی نشان می‌دهد که گیاهان تلقیح شده، ریشه‌های فرعی بیشتری نسبت به گیاهان بدون تلقیح داشته‌اند. همچنین با بررسی دقیق‌تر تصاویر اسکن شده از ریشه‌ها، در حضور لایه آلوده به مواد نفتی، مشاهده شد که حضور لایه آلوده در خاک سبب کاهش ریشه‌های فرعی در این ناحیه شده است اما ریشه‌های فرعی در این ناحیه در ریشه ذرت‌های تلقیح شده با *P. indica* نسبت به ذرت‌های تلقیح نشده بیشتر بود.

دارد و در این زمینه دقت کافی به ویژه برای پارامترهای مربوط به یک بعد را دارا می‌باشد (۱۱).

نتایج و بحث

الف) بررسی توزیع دو بعدی ریشه‌های ذرت

شکل ۴ توزیع دو بعدی ریشه‌های ذرت در تیمارهای مورد مطالعه در طول آزمایش را نشان می‌دهد. بررسی‌های انجام شده روی تصاویر نشان داد که حضور لایه آلوده به مواد نفتی در خاک سبب کاهش رشد و توزیع ریشه درون خاک شده است. اما گیاهان تلقیح شده با اندوفایت رشد و گسترش ریشه‌های بیشتری نسبت به گیاهان بدون اندوفایت

جدول (۱) برخی از ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک مورد مطالعه

Table (1) Selected chemical properties of polluted and unpolluted soil

مقدار		واحد	ویژگی
خاک آلوده	خاک غیر آلوده		
۸۱	۸۶	%	شن
۱۱	۶	"	سیلت
۸	۸	"	رس
Loamy sand	Loamy sand	---	بافت خاک
7.4	7.2	---	pH
1.25	1.28	dS m ⁻¹	EC
2.95	0.67	%	کربن آلی
200	135	mg kg ⁻¹	ازت کل
11.0	31.2	"	فسفر قابل جذب
9.2	32.9	cmol+ kg ⁻¹	CEC
21.6	nd*	mg g ⁻¹	TPH خاک آلوده

* non-detected

جدول (۲) چارچوب زمانی آزمایش از زمان تلقیح بذرهای جوانه‌دار شده با قارچ تا پایان دوره آزمایش

Table (2) Time frame of experiment from start (incubation of seedlings with *P. indica*) to the end (plant harvesting)

ردیف	زمان (روز)	نوع فعالیت
1	صفر	تلقیح بذرهای جوانه‌دار شده با اسپور قارچ و کشت بذرهای در جعبه‌ها
2	12	اولین ترسیم ریشه‌ها
3	16	دومین ترسیم ریشه‌ها
4	22	سومین ترسیم ریشه‌ها
5	26	چهارمین ترسیم ریشه‌ها
6	33	پنجمین ترسیم ریشه‌ها
7	45	ششمین ترسیم ریشه‌ها (پایان آزمایش)

ب) طول و عمق توسعه ریشه‌ها

در این مطالعه طول ریشه در واقع مجموع کل طول ریشه‌های اصلی و فرعی گیاه می‌باشد که در قسمت جلویی جعبه پایش ریشه قابل مشاهده بود و عمق توسعه ریشه نیز فاصله عمودی بین بالاترین قسمت تا عمیق‌ترین بخش ریشه می‌باشد که هر دو این پارامترها در ۶ زمان مختلف در طول دوره رشد گیاه مورد ارزیابی قرار گرفت.

حضور لایه آلوده به مواد نفتی در مسیر رشد ریشه سبب کاهش معنی‌دار طول ریشه در این مطالعه شد (شکل ۵-الف) اما تلقیح بذور ذرت با قارچ اندوفایت *P. indica* سبب کاهش اثر منفی حضور این لایه در خاک شده بود. یکی از نتایج جالب و قابل توجه در این پژوهش افزایش رشد طولی ریشه‌های ذرت تلقیح شده با اندوفایت در حضور لایه آلوده به مواد نفتی در مقایسه با تیمار بدون آلودگی و بدون تلقیح بود. در حقیقت نتایج این پژوهش نشان داد که رشد طولی ریشه‌های گیاه ذرت در حضور مواد آلوده نفتی زمانی که با قارچ اندوفایت *P. indica* تلقیح شده‌اند به طور معنی‌داری بیش از تیمار شاهد و بدون تلقیح با قارچ اندوفایت خواهد بود. رشد طولی ریشه‌های گیاهان تلقیح شده با قارچ اندوفایت در انتهای دوره آزمایش (۴۵ روز بعد از شروع) در تیمارهای آلوده به مواد نفتی به طور معنی‌داری یعنی حدود ۴۵ درصد بیش از گیاهان بدون تلقیح در این تیمار و حدود ۱۵ درصد بیشتر از گیاهان بدون تلقیح در تیمار بدون آلودگی بوده است.

هر چند وجود لایه آلوده در خاک سبب کاهش معنی‌دار توسعه عمقی ریشه‌ها در اوایل دوره رشد (تا زمان سومین ترسیم ریشه‌ها - ۲۲ روز بعد از شروع آزمایش) شده بود (شکل ۵-ب) اما در زمان‌های بعدی این تفاوت در تیمارهای مورد مطالعه معنی‌دار نبود. به طور کلی ریشه گیاه ذرت در تیمارهای مختلف تقریباً عمق توسعه نهایی یکسان و در حدود $26/2 \pm 0/5$ در انتهای دوره آزمایش داشت. این نتایج نشان می‌دهد که

در ابتدای دوره رشد، نفوذ عمقی ریشه گیاه به دلیل حضور لایه آلوده در مسیر آن، تا حدودی محدود شده است و بعد از عبور ریشه‌ها از لایه آلوده و تا رسیدن به ناحیه غیر آلوده روند رشد ریشه‌ها به حالت معمول خود برگشته است.

ج) تعداد نوک ریشه‌ها^۱

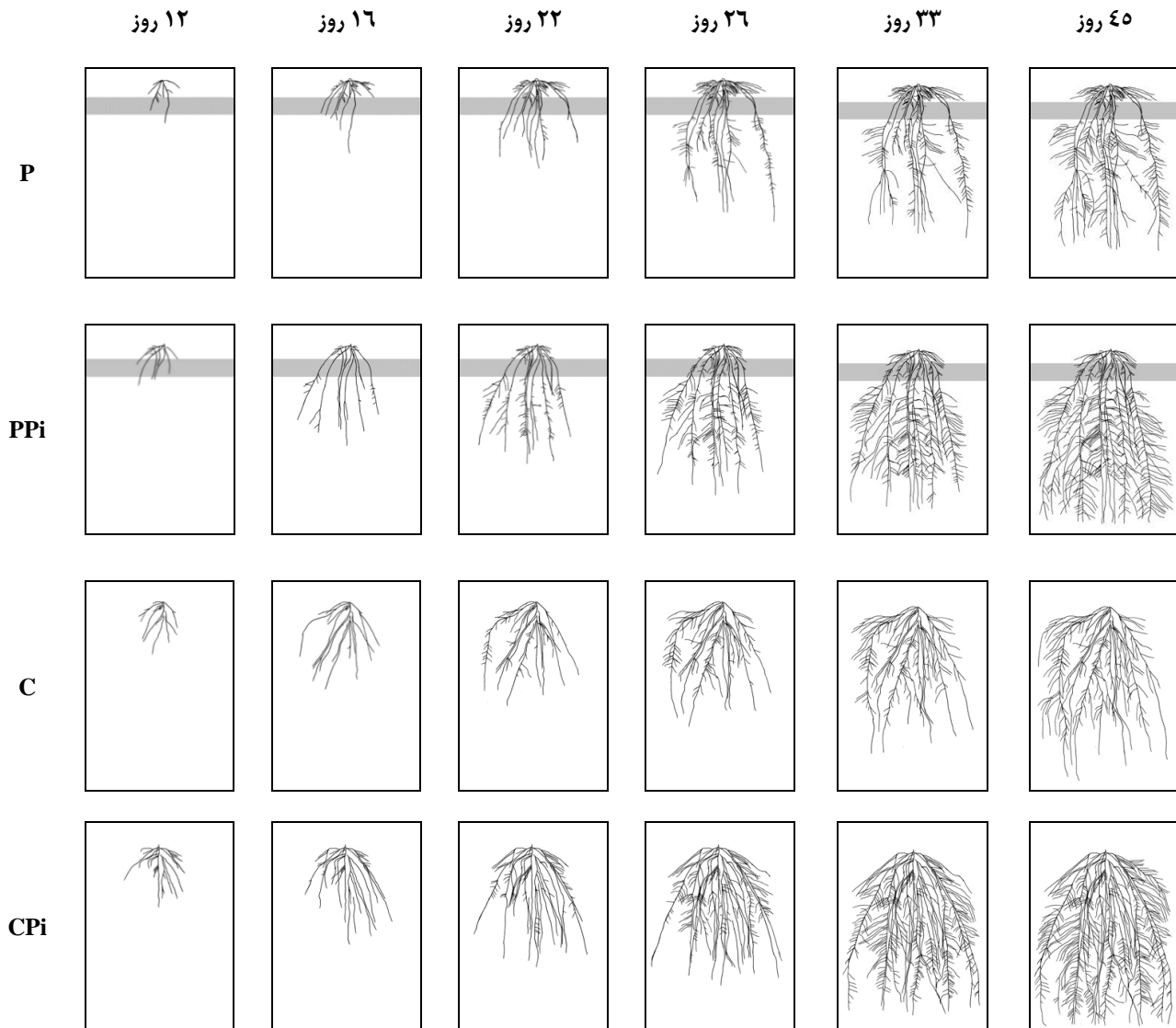
هر چه تعداد نوک ریشه‌ها در یک گیاه بیشتر باشد توسعه جانبی ریشه‌های آن گیاه و تعداد ریشه‌های فرعی بیشتر خواهد بود (۱۲). این پارامتر به سادگی و با شمارش تعداد ریشه‌های رسم شده در پلاگین SmartRoot نرم‌افزار ImageJ قابل اندازه‌گیری می‌باشد. همانطور که شکل ۵-ج نشان می‌دهد، تاثیر تیمارهای مختلف بر تعداد نوک ریشه‌ها روندی مشابه با طول ریشه‌ها داشت. هر چند حضور لایه آلوده به مواد نفتی در خاک سبب کاهش معنی‌دار تعداد نوک ریشه‌ها در گیاه شده بود اما تلقیح این گیاه با قارچ *P. indica* موجب افزایش قابل ملاحظه تعداد نوک ریشه‌ها در این گیاه شد. بنابراین می‌توان چنین نتیجه گرفت که تلقیح گیاه ذرت با قارچ *P. indica* موجب افزایش جانبی ریشه‌های گیاه و نیز افزایش رشد ریشه‌های فرعی این گیاه شده است که این موضوع به خوبی و با استفاده از جعبه پایش ریشه در این مطالعه قابل مشاهده و بررسی بود و توزیع دو بعدی ریشه‌های ذرت در تیمارهای مورد مطالعه در شکل ۴ نیز این موضوع را به خوبی نشان می‌دهد. همبستگی مثبت و معنی‌دار بین تعداد نوک ریشه‌ها و طول ریشه‌ها (شکل ۵) نیز نشان می‌دهد که مهم‌ترین دلیل افزایش طول ریشه‌ها در این مطالعه رشد و توسعه جانبی و افزایش ریشه‌های فرعی و موئین در گیاه بوده است.

د) وزن اندام هوایی و ریشه

هر چند حضور لایه آلوده در خاک سبب کاهش وزن اندام هوایی گیاه ذرت شده بود (شکل ۷) و از طرفی گیاهان تلقیح شده با قارچ *P. indica* نیز وزن اندام هوایی بیشتری نسبت به گیاهان بدون تلقیح داشتند اما این

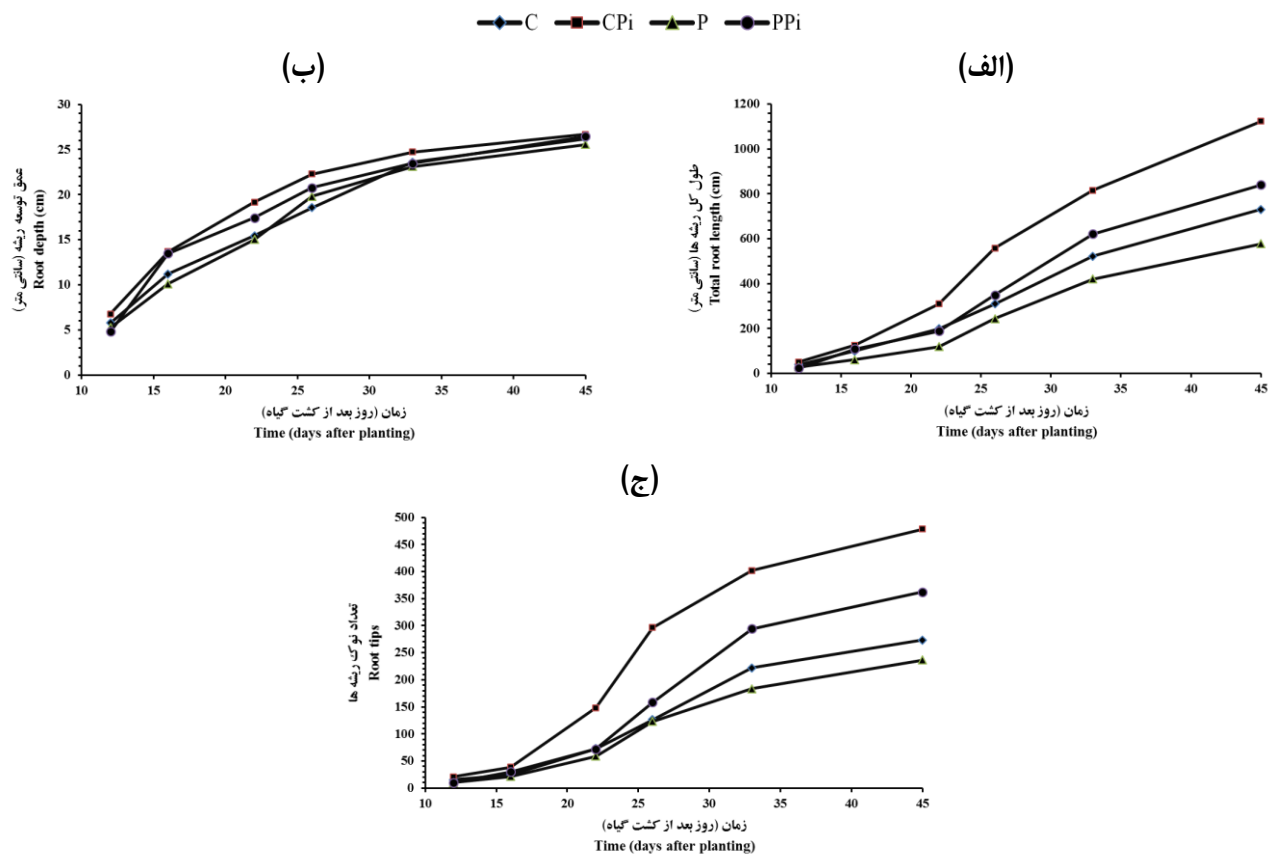
هوایی گیاه می‌باشد و این موضوع می‌تواند یکی از پارامترهای مهم برای استفاده از این قارچ در فرایند گیاه-پالایی خاک‌های آلوده به مواد آلی و معدنی محسوب شود.

تفاوت‌ها معنی‌دار نبود. در مقابل تلقیح گیاه موجب افزایش معنی‌دار وزن ریشه گیاه ذرت در هر دو تیمار مورد مطالعه شده بود. این نتایج نشان می‌دهد که تاثیر تلقیح گیاه با قارچ اندوفایت بر رشد ریشه‌ها بیشتر از اندام



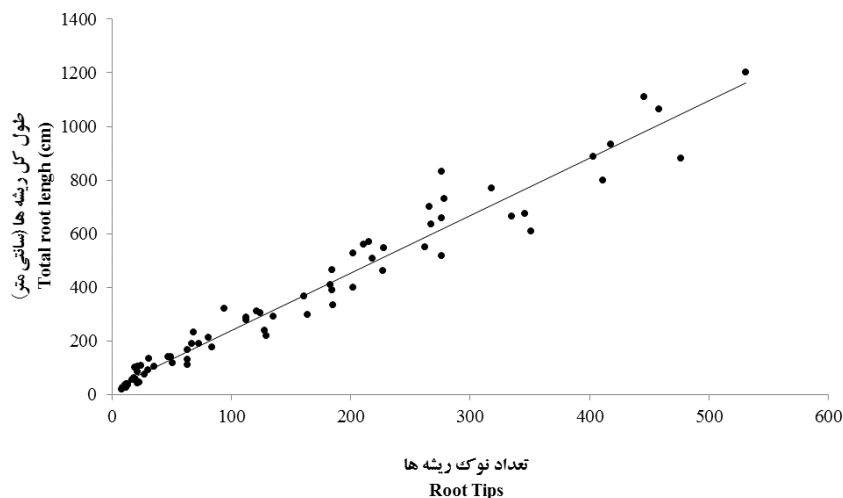
شکل (۴) توزیع دو بعدی ریشه‌های ذرت (*Zea mays L.*) در تیمارهای مورد مطالعه در زمان‌های ۱۲، ۱۶، ۲۲، ۲۶، ۳۳ و ۴۵ روز بعد از کشت در ریزوترون‌ها (C: تیمار غیر آلوده و بدون اندوفایت؛ CPi: تیمار غیر آلوده با اندوفایت؛ P: تیمار آلوده و بدون اندوفایت؛ PPi: تیمار آلوده با اندوفایت)

Figure (4) Distribution of roots of maize (*Zea mays L.*) in the treatments in 12, 16, 22, 26, 33, and 45 days after planting in the rhizotrons (C: unpolluted without fungus inoculation; CPi: unpolluted with fungus inoculation; P: polluted without fungus inoculation; PPi: polluted with fungus inoculation)

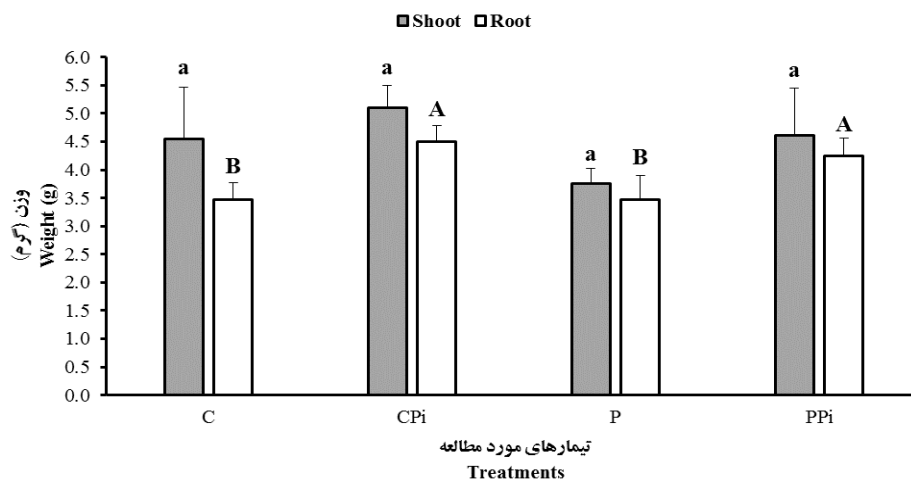


شکل (۵) تاثیر تیمارهای مورد مطالعه بر طول کل ریشه (الف)، عمق توسعه ریشه (ب) و تعداد نوک ریشه‌ها (ج) در گیاه ذرت (*Zea mays* L.) تیمار غیر آلوده و بدون اندوفایت؛ C: تیمار غیر آلوده و بدون اندوفایت؛ CPi: تیمار غیر آلوده با اندوفایت؛ P: تیمار آلوده و بدون اندوفایت؛ PPi: تیمار آلوده با اندوفایت

Figure (5) Total root length, root depth, and root tips of *Zea mays* L. as affected by different treatments (C: unpolluted without fungus inoculation; CPi: unpolluted with fungus inoculation; P: polluted without fungus inoculation; PPi: polluted with fungus inoculation)



شکل (۶) همبستگی بین تعداد نوک ریشه‌ها و طول کل ریشه‌ها در پایان دوره آزمایش
Figure (7) Correlation between root tips and root length at the final of experiment



شکل (۷) تاثیر تیمارهای مختلف بر وزن تر ریشه و اندام هوایی ذرت (*Zea mays L.*) (C: تیمار غیر آلوده و بدون اندوفایت؛ CPi: تیمار غیر آلوده با اندوفایت؛ P: تیمار آلوده و بدون اندوفایت؛ PPi: تیمار آلوده با اندوفایت)
Figure (7) Effects of different treatments on root and shoot of maize (*Zea mays L.*) (C: unpolluted without fungus inoculation; CPi: unpolluted with fungus inoculation; P: polluted without fungus inoculation; PPi: polluted with fungus inoculation)

رشد و توسعه ریشه‌های ذرت گشته اما در مقابل تلقیح گیاه با اندوفایت موجب افزایش پارامترهای مورد بررسی می‌شود. به گونه‌ای که رشد و توسعه ریشه‌ها در تیمار آلوده به مواد نفتی در گیاهان تلقیح شده با اندوفایت بیش از تیمارهای بدون تلقیح و بدون آلودگی بود. این موضوع نشان می‌دهد که جعبه پایش ریشه می‌تواند به عنوان یک وسیله کاربردی در ارزیابی تاثیر برخی پارامترهای مختلف نظیر انواع تنش‌ها نظیر تنش حضور مواد آلاینده در خاک موجود در مسیر ریشه بر رشد و توسعه آن و نیز مطالعه دو بعدی توزیع ریشه در خاک مورد استفاده قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

بررسی و مطالعه در جای رشد و گسترش ریشه تحت تاثیر تیمارهای مختلف کاری دشوار می‌باشد و لذا درک ما از سیستم ریشه - خاک، محدود می‌باشد اما نتایج این پژوهش در معرفی جعبه پایش ریشه نشان داد که این جعبه به خوبی می‌تواند برخی از نیازهای پژوهشگران در زمینه مطالعه ریشه و بررسی پارامترهای مختلف بر رشد و توسعه ریشه را برآورده کند. در این مطالعه با استفاده از جعبه پایش ریشه رشد طولی، توسعه عمقی و نیز تعداد نوک ریشه‌های گیاه ذرت را تحت تاثیر فاکتور حضور لایه آلوده به مواد نفتی در مسیر ریشه در گیاه ذرت با و بدون تلقیح قارچ اندوفایت *P. indica* مورد ارزیابی قرار گرفته بود که نتایج نشان داد، حضور لایه آلوده به مواد نفتی در خاک سبب کاهش معنی‌دار

منابع

1. Armengaud, P., Zambaux, K., Hills, A., Sulpice, R., Pattison, R.J., Blatt, M.R., and Amtmann A. 2009. EZ-Rhizo: integrated software for the fast and accurate measurement of root system architecture. *The Plant Journal*, 57: 945-956.

2. Banerjee, K., Jasrai, Y.T., and Jain, N.K. 2012. An accessible and accurate image analysis for root length and leaf area estimation: a case application to *azadirachta indica* seedlings. American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences, 12 (1): 64-76.
3. Carminati, A., Vetterlein, D., Weller, U., Vogel, H-J., and Oswald, S.E. 2009. When Roots Lose Contact. Vadose Zone Journal, 8: 805-809.
4. Crestana, S., and Vaz, C.M.P. 1998. Non-invasive instrumentation opportunities for characterizing soil porous systems. Soil and Tillage Research, 47: 19-26.
5. Galkovskyi, T., Mileyko, Y., Bucksch, A., Moore, B., Symonova, O., Price, C.A., Topp, C.N., Iyer-Pascuzzi, A.S., Zurek, P., Fang S., Harer, J., Benfey, P.N., and Weitz, J.S. 2012. GiA roots: Software for the high throughput analysis of plant root system architecture. BMC Plant Biology, 12 :116, <http://www.biomedcentral.com/1471-2229/12/116>.
6. Himmelbauer, M.L., Loiskandl, W., and Kastanek, F. 2004. Estimating length, average diameter and surface area of roots using two different image analyses systems. Plant and Soil, 260: 111–120.
7. Kay, B.D., Hajabbasi, M.A., and Tollenaar, M. 2006. Optimum versus non-limiting water contents for root growth, biomass accumulation, gas exchange and the rate of development of maize (*Zea mays* L.). Soil and Tillage Research, 88: 42–54.
8. Kechavarzi, C., Pettersson, P., Leeds-Harrison, P., Ritchie, L., and Ledin, S. 2007. Root establishment of perennial ryegrass (*L. perenne*) in diesel contaminated subsurface soil layers. Environmental Pollution, 145: 68-74.
9. Kuchenbuch, R.O., and Ingram, K.T. 2002. Image analysis for non-destructive and non-invasive quantification of root growth and soil water content in rhizotrons. Journal of Plant Nutrition and Soil Science, 165: 573-581.
10. Le Bot, J., Serra, V., Fabre, J., Draye, X., Adamowicz, S., and Pagès, L. 2010. DART: A software to analyse root system architecture and development from captured images. Plant and Soil, 326: 261–273.
11. Lobet, G., Pages, L., and Draye, X. 2011. A novel image-analysis toolbox enabling quantitative analysis of root system architecture. Plant Physiology, 157: 29–39.
12. Mahmood, T., Mehnaz, S., Fleischmann, F., Ali, R., Hashmi, Z.H., and Iqbal, Z. 2014. Soil sterilization effects on root growth and formation of rhizosheaths in wheat seedlings. Pedobiologia, 57: 123–130.
13. Menon, M., Robinson, B., Oswald, S.E., Kaestner, A., Abbaspour, K.C., Lehmann, E., and Schulin, R. 2006. Visualization of root growth in heterogeneously contaminated soil using neutron radiography. European Journal of Soil Science, 58: 802–808.
14. Moradi, A.B., Conesa, H.M., Robinson, B., Lehmann, E., Kuehne, G., Kaestner, A., Oswald, S., and Schulin, R. 2009. Neutron radiography as a tool for revealing root development in soil: capabilities and limitations. Plant and Soil, 318: 243–255.

15. Moran, C.J., Pierret, A., and Stevenson, A.W. 2000. X-ray absorption and phase contrast imaging to study the interplay between plant roots and soil structure. *Plant and Soil*, 223: 99–115.
16. Pettersson, K. 2006. Root development of *lolium perenne* in diesel contaminated soil. A master thesis. Cranfield university at silsoe and swedish university of agricultural sciences.
17. Pierret, A. 2008. Multi-spectral imaging of rhizobox systems: new perspectives for the observation and discrimination of rhizosphere components. *Plant and Soil*, 310: 263–268.
18. Schwartz, C., Morel, J.L., Saumier, S., Whiting, S.N., and Baker, A.J.M. 1999. Root development of the Zinc-hyperaccumulator plant *Thlaspi caerulescens* as affected by metal origin, content and localization in soil. *Plant and Soil*, 208: 103–115.
19. Tsutsumi, D., Kosugi, K., and Mizuyama, T. 2003. Effect of hydrotropism on root system development in soybean (*Glycine max*): Growth experiments and a model simulation. *Journal of Plant Growth Regulation*, 21: 441–458.
20. Varma, A., Verma, S., Sudha, Sahay, N., Bütehorn, B., and Franken, P. 1999. *Piriformospora indica*, a cultivable plant-growth-promoting root endophyte. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(6): 2741–2744.
21. Zamani, J., Hajabbasi, M.A., Alaie, E., Sepehri, M., Leuchtmann, A., and Schulin, R. 2016. The effect of *Piriformospora indica* on the root development of maize (*Zea mays* L.) and remediation of petroleum contaminated soil. *International Journal of Phytoremediation*, 18:3, 278-287.