Archive of SID

شناسایی قارچ‌های میکوریز اطراف ریزوسفر *Thymus daenensis* و میکوریزاسیون این گونه گیاه در شرایط گلخانه‌ای با *Glomus intraradices*

طیبه احمدی[1*]، فرانسواز برنارد[1]، سیما زنگنه[2] و فرهاد رجالی[3]

[1] تهران، دانشگاه شهید بهشتی، دانشکده علوم زیستی، گروه علوم گیاهی

[2] تهران، موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور

[3] کرج، موسسه خاک و آب کشور

تاریخ دریافت: ۹۲/۷/۱۰ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۱/۲

چکیده

قارچ‌های میکوریزی از اجزای ضروری سیستم‌های کشاورزی بوده و نقش مهمی در بهبود رشد گیاهان دارند. در این بررسی قارچ‌های میکوریز اطراف ریزوسفر آویشن دنائی در مناطق ایوان و تهران که از رویشگاه‌های طبیعی این گونه‌ی گیاهی ارزشمند و بومی ایران می‌باشند، شناسائی گردیدند. درکل ۹ گونه قارچ میکوریز که متعلق به جنس‌های *Glomus* و *Scutellospora* بودند در اطراف ریزوسفر این گونه‌ی گیاهی مشاهده شد. از طرفی بمنظور بررسی اثر کلونیزاسیون قارچ *G. intraradices* بر روی ارتفاع ساقه، وزن تر و خشک اندام هوائی، میزان ازت و پلی‌آمین‌ها، ماده تلقیحی حاوی اسپورها و ریشه‌های کلونیزه شده با این قارچ میکوریزی در شرایط گلخانه‌ای به گیاهان رشد کرده در این شرایط اضافه شد. کلونیزاسیون با قارچ مورد نظر تفاوتی از نظر ارتفاع ساقه، وزن خشک اندام هوائی و میزان پوترسین باند شده ایجاد نکرد ولی سبب کاهش وزن تر اندام هوائی، میزان ازت و پوترسین کونژوگه در گیاهان تیمار نسبت به کنترل‌ها شده بود.

واژه های کلیدی: *Thymus daenensis*، قارچ میکوریز، میزان ازت، میزان پلی‌آمین‌ها

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۳۶۷۰۵۶۲۲۸، پست الکترونیکی: t_ahmadi88@yahoo.com

مقدمه

قارچ میکوریزای آربوسکولار جزء ضروری در سیستم‌های کشاورزی هستند زیرا این موجودات زنده می‌توانند رشد گیاه، توانایی تکثیر گیاه، مقاومت گیاه به تنش آبی و سلامتی گیاه از طریق اثرات آنتاگونیستی و رقابتی روی آفت‌ها و پاتوژن‌ها را بالا ببرند. مهاجرت گیاه توسط قارچ میکوریز مقاومت گیاه را به تنش‌های زیستی و غیر زیستی افزایش می‌دهد. چنین نقش‌های اکولوژیکی‌ای درمدیریت سیستم‌های مزرعه‌ایی با ورود پایین اهمیت زیادی دارد زیرا این سیستم‌ها به چرخه‌های تغذیه‌ایی طبیعی برای فراهم کردن مواد غذایی مورد نیاز گیاه تکیه کرده‌اند (۲۶).

Thymus daenensis یا آویشن دنائی گونه‌ایی‌است از آویشن که بومی ایران می‌باشد. این گونه بدلیل انحصاری بودن، بازده بالای اسانس و بالا بودن مقدار ترکیبات موثره آن یعنی تیمول و کارواکرول در چندین سال اخیر مورد توجه قرار گرفته است. میکوریزیشن یکی از جالب‌ترین پدیده‌ها در جهان همزیستی است. امروزه این حقیقت یکی از اهداف مهم برای داشتن کشت‌های بهتر و تولیدات بیشتر گیاهی می‌باشد. یکی از انواع میکوریزیشن تلقیح پروپاگول‌های قارچ‌های میکوریز به گیاهچه‌ها در شرایط گلخانه‌ای و بررسی اثرات این پدیده روی خصوصیات موفولوژیکی و فیزیولوژیکی گیاه میزبان می‌باشد که این‌کار

www.SID.ir

Archive of SID

درباره بسیاری از هم خانواده‌ایی‌های *T. daenensis* مانند نعنا، پونه کوهی، کاکوتی، ریحان انجام شده و اثرات مفیدی روی مقدار روغن‌های ضروری در این گونه‌های گیاهی، فعالیت آنزیم‌هایی چون نیترات ردوکتاز، گلوتاتیون سنتاز داشته و در برخی رشد را هم بهبود بخشیده و در برخی از این گیاهان مقادیر ازت و فسفر را در بافت گیاه هم افزایش داده است (۲۲،۱۶،۱۵،۱۳،۹). هدف این بررسی شناسایی قارچ‌های میکوریزی اطراف ریزوسفر این گونه‌ی گیاهی در دو تا از مناطقی است که این گیاه به صورت طبیعی رویش می‌یابد و سپس بررسی اثر کلونیزاسیون قارچ *Glomus intraradices* بر برخی پارامترها بر این گونه در شرایط گلخانه‌ای می‌باشد.

مواد و روشها

مواد لازم برای شناسایی قارچ‌های میکوریزی اطراف ریزوسفر آویشن دنائی در مناطق تهران و ایوان: بمنظور شناسائی اسپورهای موجود در ریزوسفر این گونه گیاهی ابتدا نمونه برداری خاک از مناطق مورد نظر انجام شد. سپس با روش کشت گلدانی ماده تلقیحی حاوی اسپورهای سالم و جوان جهت انجام شناسائی اسپورها تهیه گردید.

نمونه‌برداری خاک از ریزوسفر آویشن دنائی: نمونه‌برداری خاک از اطراف ریزوسفر آویشن‌های طبیعی در دو منطقه ایوان(که یکی از شهرستان‌های استان ایلام است و این شهرستان در موقعیت جغرافیایی ۴۶/۱۹ طول شرقی و ۳۳/۵۰ عرض شمالی قرار گرفته است. ارتفاع آن از سطح دریا ۱۱۷۰ متر است) و تهران (که این شهرستان از نظر جغرافیایی در ۵۱ درجه و ۸ دقیقه تا ۵۱ درجه و ۳۷ دقیقه طول شرقی و ۳۵ درجه و ۳۴ دقیقه تا ۳۵ درجه و ۵۰ دقیقه عرض شمالی قرار گرفته است. ارتفاع آن از سطح دریا ۱۷۰۰ متر در شمال به ۱۲۰۰ متر در مرکز و ۱۱۰۰ متر در جنوب می‌رسد) انجام شد. از هر منطقه ۳ نقطه بطور تصادفی انتخاب شد. نمونه‌های خاک از عمق ۰-۳۰ سانتیمتر منطقه فراریشه برداشت شد، با یکدیگر مخلوط شده و به آزمایشگاه منتقل شدند. نمونه‌های خاک در آزمایشگاه تا زمان جداسازی و شناسایی اسپور در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

برقراری همزیستی دوگانه بین ذرت و قارچ‌های میکوریز: بمنظور تولید مایه تلقیحی مناسب از قارچ‌های میکوریزایی که حاوی تعداد مناسبی از اسپورهای سالم و جوان باشند تا از آنها برای شناسائی اسپورهای موجود در اطراف ریزوسفر آویشن دنائی استفاده شوند. ابتدا بذرهای گیاه ذرت (*Zea mays*) با هیپوکلریت سدیم ۲٪ به مدت ۵-۶ دقیقه استریل سطحی شده سپس چند بار با آب آنها را شسته و مدت یک شبانه‌روز در آب خیسانده تا معلوم شود بذرها قابلیت جوانه‌زنی دارند یا خیر. سپس ۱۰۰ گرم از مخلوط ریشه و خاک هر منطقه به ماسه سترون ریخته شده در گلدان‌های پلاستیکی به قطر ۱۵ سانتیمتر افزوده شد، سپس بذرهای ذرتی ضد عفونی شده سطحی بودند، در گلدان‌ها کاشته شد و با ماسه سترون روی آنها پوشیده شد. گیاهان در گلخانه در دمای ۲۲-۲۸ درجه سانتیگراد و با رژیم ۱۲ ساعت نور در شبانه روز به مدت ۴ ماه نگهداری شدند و هفته‌ای ۲ بار با محلول غذایی (اصلاح شده هوگلند و آرنون، ۱۹۳۸) آبیاری شدند. در این محلول غذایی سهم عناصر ماکرو اصلی برای پتاسیم(K) : فسفر(P): نیتروژن (N) به ترتیب ۳/۳۵: ۰/۸۵: ۱ و با غلظت ($N\ 83\ mg/m^3$ و $P\ 31\ mg/m^3$ ،$K\ 232\ mg/m^3$) تهیه شد. بمنظور وارد کردن تنش خشکی به گیاهان و وادار کردن قارچ‌ها به اسپورزایی، پس از مدت چهار ماه آبیاری قطع شد تا ذرت‌ها به‌تدریج خشک شوند پس از گذشت دو هفته اندام هوایی از محل طوقه قطع گردید و محتویات گلدان‌ها برای هوادهی از گلدان خارج و بر سطح سترونی گسترانده شد.

بررسی وجود اسپورهای قارچ‌های میکوریز در خاک ریزوسفر و تهیه اسلاید میکروسکوپی: بمنظور بررسی

www.SID.ir

Archive of SID

وجود اسپور در نمونه‌های خاک، اسپورها به روش الک مرطوب (۱۱) و سپس سانتریفوژ کردن در محلول سوکروز (۲۵) جداسازی شده و برای شناسائی آنها اسلاید میکروسکوپی با قرار دادن اسپورها با سوزن روی لامی که حاوی یک قطره چسب PVLG + یک قطره معرف ملزر (Melzer) است، تهیه شد. پس از جهت دهی و مستقر کردن مناسب اسپورها در جایگاه خود لاملی با زاویه ۴۵ درجه روی آن گذاشته می‌شود. این اسلاید به همان حالت افقی قرار داده شده تا لامل بطور خوبخود در محل قرار بگیرد سپس بر لامل کمی فشار وارد کرده تا اسپورها به آرامی بشکنند. این کار بدلیل بررسی دقیق‌تر لایه‌های مختلف دیواره‌های هاگ‌ها انجام می‌شود چرا که برخی لایه‌ها به معرف ملزر واکنش نشان داده رنگشان عوض می‌شود.

شناسائی قارچ‌های میکوریزی: این قارچ‌ها بر اساس صفات مربوط به اندازه و رنگ اسپور، ریسه متصل به اسپور، لایه‌های دیواره سلولی اسپور و اسپوروکارپ (در صورت وجود)، به کمک میکروسکوپ نوری و استریو میکروسکوپ شناسایی شدند. برای شناسایی از کلیدهای مختلف موجود در سایت‌های اینترنتی (http://invam.caf.wvu.edu) و (http://www.zor.zut.edu.pl/Glomeromycota) استفاده شد.

مواد لازم جهت کلونیزاسیون آویشن دنائی در شرایط گلخانه‌ای:

مواد گیاهی: آزمایش در زمستان سال ۱۳۸۹ در گلخانه دانشکده علوم زیستی دانشگاه شهید بهشتی تهران انجام شد. بذرهای*T. daenensis* از پژوهشکده گیاهان داروئی این دانشگاه تهیه گردید. ابتدا این بذرها در دو گلدان گلی که دو سوم آن با خاک استریل پر شده بود کاشته شدند و روی بذرها با مقدار کمی از همان خاک که سترون شده بود پوشیده شد. از این گلدان‌ها بعنوان مخزن گیاهی برای مرحله بعد استفاده شد. ضمنا هر روز با آب پاش بصورت افشانه‌ای طوری که گیاهان آسیب نبینند به آنها آب داده شد و بخاطر اینکه شدت نور در گلخانه بدلیل فصل انجام آزمایش کم بود جهت افزایش آن از چراغ مطالعه استفاده شد.

تهیه ماده تلقیح کننده: ماده تلقیح کننده شامل خاک حاوی پروپاگول‌های قارچ میکوریزایی و ریشه‌های کلونیزه شده با *G. intraradices* بود که از بخش بیولوژی خاک موسسه تحقیقات خاک و آب کشور تحویل گرفته شد.

برقراری همزیستی: دو هفته بعد از کاشتن بذرهای آویشن در گلدان مخزن وقتی گیاهان به مرحله ۳ یا ۴ برگی رسیدند آنها به گلدان‌های پلاستیکی استریل شده با الکل ۷۰ ٪ به قطر ۱۱ سانتیمتر که حاوی ماسه : پیت استریل به نسبت (۲ : ۱) بود، منتقل شدند. برای اینکار ابتدا حدود دو سوم گلدان مخلوط ماسه:پیت ریخته سپس در گلدان‌های تیمار مقدار ۵۰ گرم از خاک حاوی پروپاگول‌های قارچی ریخته سپس در هر گلدان تعداد ۵ گیاهچه‌ی ریشه دار آویشن گذاشته و در اطراف آنها مقدار کمی دوباره از مخلوط ماسه و پیت ریخته می‌شود. در گلدان‌های کنترل همین مراحل انجام شده فقط دیگر ماده تلقیح کننده‌ی حاوی پروپاگول‌های قارچی به گلدان‌ها اضافه نشد. تعداد تکرار برای تیمار و کنترل ۵ بود.

اندازه‌گیری چند خصوصیت: ۴ ماه بعد برداشت گیاهان تیمار و کنترل انجام شد و خصوصیاتی مثل ارتفاع ساقه، وزن تر و خشک اندام هوائی اندازه گیری شد. اندازه‌گیری وزن تر و خشک با ترازوی مخصوص اندازه‌گیری وزن تر و خشک (Sartorius MA40 – 000v2) انجام شد.

آنالیز ازت و پلی‌آمین‌ها: جهت اندازه‌گیری میزان ازت بعد از اندازه‌گیری وزن خشک اندام هوائی گیاه با بوته چینی، اندام هوائی خشک شده آسیاب می‌شود. سپس با روش پرسولفات میزان ازت را می‌سنجیم (۲۱،۱۸). اما

www.SID.ir

Archive of SID

برای اندازه گیری میزان پلی‌آمین‌ها ابتدا ۲/. گرم از بافت تازه گیاه را با ازت مایع فیکس کرده و سپس با ترکیب روش‌های Slocum & Galston (۱۹۹۵)، Reggiani et al, (۱۹۸۹)، Jang et al, (۲۰۰۶) که توسط Hassannejad et al, (۲۰۱۲) توصیف شده بود، میزان پلی‌آمین اندازه‌گیری گردید.

تخمین درصد کلونیزاسیون ریشه: بمنظور رنگ آمیزی ریشه‌ها از روش Phillips & Hayman (۱۹۷۰) (۲۰) و برای تعیین درصد کلونیزاسیون آنها از روش McGonigle et al, استفاده گردید (۱۷).

آنالیز آماری: تجزیه و تحلیل آماری داده ها با نرم افزار SPSS 14 در سطح احتمال $p\leq.05$ درصد و Excell 2010 صورت گرفت.

نتایج

توصیف گونه‌های قارچ میکوریزای شناسایی شده همزیست با آویشن دنایی طبیعی: با بررسی صفات و مشخصات هاگ‌های آماده شده در اسلایدهای میکروسکوپی و به کمک کلیدهای شناسایی ۹ گونه قارچ اندومیکوریزایی تشخیص داده شد. این قارچ‌ها متعلق به جنس گلوموس (*Glomus*) و اسکوتلوسپورا (*Scuttelospora*) بودند. بطوریکه گونه‌های تشخیص داده شده در مناطق مورد بررسی ایوان و تهران شامل: *Glomus aggregatum*، *G. fasciculatum*، *G. etunicatum*، *G. intraradices*، *G. mosseae*، *G. occultum*، *G. diaphanum*، *G. geosporum* و *Scutellospora callospora* بودند (شکل ۱).

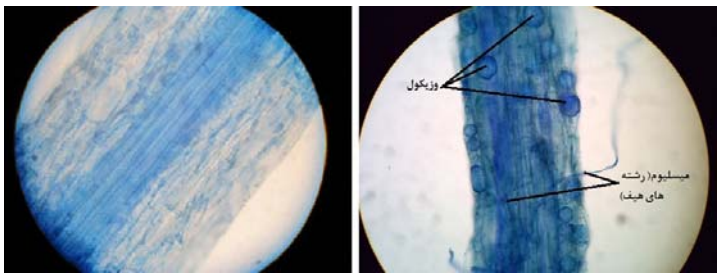
شکل ۱- گونه‌های قارچ آربسکولار میکوریزای شناسائی شده در ریزوسفر آویشن دنائی: a) *Glomus aggregatum*، b) *G. diaphanum*، c) *G. etunicatim*، d) *G. fasciculatum*، e) *G. geosporum*، f) *G. intraradices*، g) *G. mosseae*، h) *G. occultum*، i) *Scutellospora callospora* (— و — = 10 µm)

www.SID.ir

Archive of SID

اندازه گیری درصد کلونیزاسیون ریشه: ابتدا رنگ‌آمیزی ریشه‌های آویشن کاشته شده در گلدان که مدت سه ماه با ماده تلقیحی حاوی اسپورها و ریشه‌هایی کلونیزه شده با قارچ *G. intraradices* تلقیح شده بودند، نشان داد که ریشه‌ها با قارچ مورد نظر توانسته بودند کلونیزه شوند. میزان درصد همزیستی ریشه‌ها، ۴۷/۷۱ درصد بود که یک مقدار متوسط می‌باشد. در حالی که آثاری از پروپاگول‌های قارچی در ریشه‌ی آویشن‌های کنترل دیده نشد (شکل ۲).

ارتفاع ساقه: ایجاد رابطه همزیستی میکوریزی گیاهچه‌های آویشن رشد کرده در گلدان با ماده تلقیحی حاوی اسپورها و ریشه‌هایی کلونیزه شده با قارچ *G. intraradices* در شرایط آزمایشی که در این تحقیق انجام شد، نشان داد که ایجاد رابطه همزیستی میکوریزی نتوانسته بود از نظر ارتفاع ساقه بین گیاهچه‌های تیمار و کنترل در سطح احتمال $p\leq0.05$ تفاوت معنی‌داری ایجاد کند (sig=0.1) (جدول۲).



شکل۲- ریشه‌های آویشن که در گلدان با ماده تلقیحی حاوی اسپورها و ریشه‌های میکوریزایی شده با *G. intaradices* تلقیح شده بودند (راست = تیمار، چپ = کنترل)

جدول۲- مقایسه اثر کلونیزاسیون با قارچ *G. intraradices* در میانگین طول ساقه، وزن تر و خشک اندام هوائی آویشن دنائی (*: در سطح احتمال 0.05درصد معنی‌دار. (n=25)).

	میانگین طول ساقه (cm)	میانگین وزن تر اندام هوائی(g)	میانگین وزن خشک اندام هوائی(g)
تیمار	22.9286±1.56354	*0.1086±.01216	0.0213±.00432
کنترل	26.1429±1.13804	0.1697±.02166	0.0210±.005350

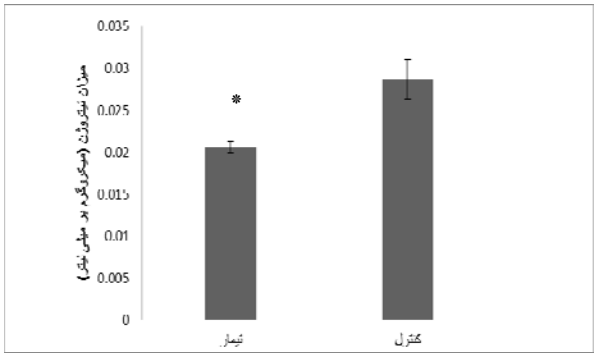
وزن تر و خشک اندام هوائی: کلونیزاسیون ریشه‌ها با قارچ مورد نظر در شرایط ذکر شده توانسته بود از نظر وزن تر بین گیاهان تیمار و کنترل تفاوت معنی‌دار در $p\leq0.05$ ایجاد کند ($sig= 0.021 , p\leq0.05$)(جدول ۲). به عبارتی دیگر کلونیزاسیون سبب کاهش میزان وزن تر اندام هوائی در گیاهان تیمار شده بود. اما از لحاظ وزن خشک اندام هوائی کلونیزاسیون تفاوت معنی‌داری بین تیمار و کنترل ایجاد نکرده بود ($sig= 0.96, p\leq0.05$)(جدول ۲).

میزان ازت: ابتدا میزان ازت در گیاهچه‌های کلونیزه شده و کنترل‌ها اندازه‌گیری شد. برای فهم معنی‌دار بودن یا نبودن میزان ازت بین گیاهان تیمار و کنترل از One- Sample t-test در سطح احتمال $p\leq0.05$ درصد استفاده گردید. بین گیاهان کنترل و تیمار از این نظر تفاوت معنی‌داری وجود داشت، بطوریکه در گیاهان کنترل میانگین میزان ازت نسبت به گیاهان تیمار بالاتر بود ($sig= 0.03, p\leq0.05$)(شکل ۳).

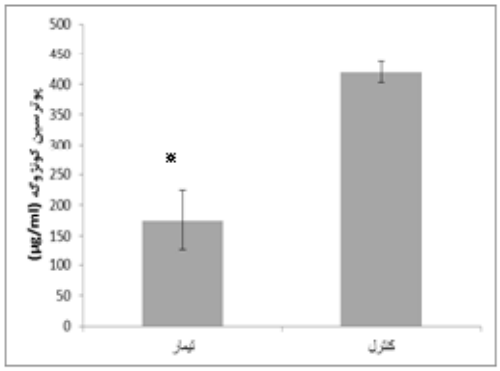
www.SID.ir

Archive of SID

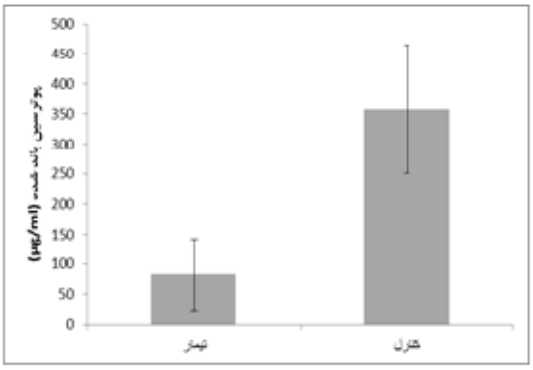
میزان پلی‌آمین‌ها: سه ماه بعد از تلقیح، وقتی در گیاهچه‌های آویشن دنائی همزیست شده در شرایط گلدانی میزان پلی‌آمین موجود اندازه‌گیری گردید، از نظر پلی‌آمین آزاد از سه گونه پلی‌آمین‌ها هیچ‌کدام از آنها مشاهده نشدند. اما از بین پلی‌آمین‌های گونژوگه و باند شده آنچه قابل اندازه‌گیری بود تنها پلی‌آمین پوترسین بود زیرا میزان دو نوع دیگر یعنی اسپرمیدین و اسپرمین آنقدر کم بود که قابل اندازه گیری نبود. از طرفی در برخی از نمونه‌ها هم اسپرمین و اسپرمیدین اصلا مشاهده نشد ولی پلی‌آمین پوترسین در همه‌ی نمونه‌ها موجود بود. بین گیاهان تیمار و کنترل از نظر میزان پوترسین کونژوگه بین گیاهان تیمار شده با میکوریز و کنترل تفاوت معنی‌داری وجود داشت ($p\leq0.05$, sig= 0.01) یعنی اینکه میزان پوترسین کونژوگه در گیاهان کنترل بالاتر از تیماربود به عبارتی ایجاد رابطه همزیستی سبب کاهش میزان پوترسین کونژوگه شده بود (شکل ۴). ولی از نظر میزان پوترسین باند شده این تفاوت معنی‌دار نبود یعنی می‌توان گفت ایجاد رابطه همزیستی بر میزان پوترسین باند شده اثر نداشته است ($p\leq0.05$, sig= 0.06)(شکل ۵).



شکل۳ – اثر تلقیح با *G.intraradices* بر میانگین میزان ازت اندام هوائی(* : در سطح احتمال 0.05 درصد معنی‌دار) (n=25)



شکل۴– اثر تلقیح گیاهچه‌های آویشن گلدانی با مایه تلقیحی حاوی قارچ *G. intraradices* بر روی میزان پوترسین کونژوگه (*: در سطح احتمال 0.05 درصد معنی دار. (n=25)



شکل۵– اثر تلقیح گیاهچه‌های آویشن گلدانی با مایه تلقیحی حاوی قارچ *G. intraradices* بر روی میزان پوترسین باند شده (n= 25)

www.SID.ir

Archive of SID

بحث و نتیجه‌گیری نهائی

نتایج به دست آمده از بررسی خاک ریزوسفر و ریشه‌های *T. daenensis* نشان داد که این گیاه دارای همزیستی میکوریزایی از نوع آربوسکولار میکوریزا با قارچ‌های متنوعی از راسته‌های Glomerales و Diversisporales می‌باشد. در بررسی میرزایی و همکارانش (۱۳۹۲) نیز گونه‌های میکوریز همزیست با بنه و خنجوک را از گونه‌های جنس *Glomus* و بویژه *Glomus fasciculatum* در رویشگاه‌های این گیاهان در استان ایلام معرفی نمودند (۱).

Bagyaraj (۱۹۹۱) معتقد است در مناطقی که از نظر تغذیه معدنی وضعیت مطلوبی ندارند قابلیت ایجاد همزیستی میکوریزایی یک توانایی بسیار مهم برای گیاه محسوب می‌شود (۸). مثلا در مورد دو گونه آویشن که در خاک‌های حاوی سطوح بالای منیزیوم و کلسیم رشد داده شده بودند، استقرار میکوریزای آربوسوکولار سبب افزایش تولید زیست توده و کاهش میزان کلسیم و منیزیوم در ساقه این دو گونه گردید (۱۹) بنابراین می‌توان گفت از آنجائی که اکوسیستم‌هایی که آویشن دنائی در این دو منطقه در آنها رویش می‌یابد مناطقی هستند که اغلب کوهستانی بوده و شرایط سخت اکولوژیک در آنها حاکم می‌باشد، از عواملی که سبب رشد و حیات این گیاه در این مناطق می‌شود می تواند همین قارچ‌های میکوریزی باشد.

همانطور که در قسمت نتایج بیان شد در این دو منطقه در مجموع ۹ گونه قارچ میکوریز شناسائی شد که متعلق به جنس‌های *Glomus* و *Scutellospora* بودند، اما شناسائی گونه‌های قارچ میکوریز در ریزوسفر آویشن (*Thymus kotschyanus* var. eriophorus) در منطقه خراسان شمالی (رئین) معلوم کرد که ۴ گونه قارچ به نام‌های *Acaulospora myriocarpa* و *Entrophospora schenckii* از خانواده Acaulosporaceae، گونه *Scutellospora pellucida* از خانواده Gigasporaceae و *Glomus pallidum* از خانواده Glomaceae در این منطقه با این گیاه همزیست می‌باشند (۵). لذا در مناطق مختلف گونه‌های مختلف قارچ‌های میکوریز می‌توانند با گونه‌های مختلف جنس آویشن، همزیست باشند. اهمیت شناسائی اسپورها در اینست که اگر زمانی خواسته شد در رابطه با میکوریزاسیون و بررسی اثر این قارچ‌ها بر روی گیاه آویشن و هم‌خانواده‌ایی‌های آن در زمینه تحقیقاتی انجام شود، این گونه‌های شناسائی شده بخاطر قطعی شدن ایجاد همزیستی‌شان با این گونه‌ی گیاهی، در اولویت امر قرار داشته باشند. زیرا با نامعلوم بودن اینها انتخاب گونه‌ی مناسب سخت‌تر خواهد بود. رنگ‌آمیزی ریشه‌های گیاهچه‌ها، یک و چهار ماه بعد از تلقیح و مشاهده وزیکول و آربوسکول در این ریشه‌ها نشان داد که این قارچ و گیاه قادرند با یکدیگر ایجاد همزیستی نمایند. *G. intraradices* روی خصوصیات موفولوژیکی ذرت علوفه‌ایی هم اثرات مثبتی داشته است (۲). در بررسی دیگری که توسط برین و همکارانش در سال ۱۳۸۶ روی گیاه گندم با دو گونه قارچ میکوریز یعنی *G. intraradices* و *G. etunicatum*انجام شده، مشخص شد که گیاهان تیمار شده با گونه *G. etunicatum* در مقابل گیاهان تیمار شده با *G. intraradices*مقدار فسفر بیشتری داشتند و افزایش بهتری را در رشد نشان دادند، چنین تفاوتی ممکن است بدلیل تفاوت در قدرت گونه‌های قارچ‌های میکوریزی در جذب عناصر باشد، همچنین ممکن است بدلیل درصد بالاتر کلونیزاسیون قارچ *G. etunicatum* در ریشه‌ها بوده که موجب افزایش بهبود رشد گیاه شده است (۳). میکوریزاسیون این گونه‌ی گیاهی با قارچ *G. intraradices* سبب کاهش در وزن تر اندام هوائی، میزان ازت و پلی‌آمین پوترسین کونژوگه در گیاهان تیمار، شده بود. در اکثر آزمایشات، میکوریزاسیون بخاطر اثر قارچ‌های میکوریز در جذب عناصری چون ازت و فسفر سبب افزایش میزان ازت در بافت گیاه و حتی موجب بهبود شرایط رشد برای گیاه شده بود (۷،۱۵،۱۶)، ولی همانطور که مشاهده شد در

www.SID.ir

Archive of SID

این آزمایش میزان ازت در گیاهچه‌های کنترل نسبت به تیمارها بالاتر بود. هر چند که درصد کلونیزاسیون بدست آمده ۴۷/۷۱ درصد بود که مقدار قابل قبولی می‌باشد. اما از علت‌های ناکارآمدی ماده تلقیحی حاوی پروپاگول‌های *G. intraradices* در هم‌کشتی با *T. daenensis* در شرایط آزمایش فوق می‌تواند تفاوت در عملکرد گونه‌های میکوریزی در جذب عناصر باشد (۳) یعنی این گونه‌ی میکوریز که در این آزمایش استفاده شده است شاید در جذب عناصر در برهمکنش با آویشن دنائی خیلی توانا نباشد. هر چند در برخی تحقیقات از میکوریز بعنوان کود زیستی برای جایگزینی کودهای شیمیایی ازته و فسفاته، بخاطر اثر مثبت قارچ‌های میکوریزی در افزایش جذب ازت و فسفر و بالا بردن این عناصر در بافت‌های گیاهی، استفاده شده است (۶). از طرفی چون این آزمون در فصل زمستان انجام شد شاید شرایط نوری برای فتوسنتز گیاه مناسب نبوده باشد لذا میکوریزاسیون هم نتوانسته که سبب افزایش رشد گیاه شود که آزمایش حاجی بلندی و همکاران (۱۳۸۹) هم موید این مطلب می‌باشد. در نهایت حاجی بلندی و همکاران اعلام کردند که تاثیر مثبت همزیستی میکوریزی در جذب عناصر به گونه قارچ، رقم گیاه و وضعیت تغذیه‌ایی بستگی دارد (۴).

پلی‌آمین‌ها که اغلب شامل پوترسین دی‌آمین (Put)، اسپرمیدین تری‌آمین (Spd) و اسپرمین تراآمین (Spm) پلی کاتیون‌هایی با جرم ملکولی پایین بوده که در همه موجودات زنده یافت می‌شوند. در گیاهان عالی در دسته‌ی تنظیم کننده‌های رشد دسته‌بندی می‌شوند که در فرایندهای زیستی مثل رشد، نمو و پاسخ به تنش‌ها درگیرند (۲۷). El Ghachtouli و همکارانش (۱۹۹۵) مشاهده کردند که پلی‌آمین‌هایی که به صورت اگزوژن اضافه می‌کردند میزان کلونیزاسیون میکوریزایی و نقاط ورود را در ردیف‌های نخود Myc^{+} بالا می‌برند. بطوریکه Put بیش از Spm، Spm هم بیشتر از Spd این کار را می‌کند (۲۸،۱۰).

پلی‌آمین‌ها در روابط قارچ میکوریزای آربوسکولار و گیاه میزبان ممکن است بعنوان عوامل تنظیمی عمل کنند اما باز هم دانش درباره‌ی نقش اینها در این روابط اندک است (۲۷). در مطالعه‌ایی که توسط Wu و همکارانش در سال ۲۰۱۰ انجام شد، استعمال Put و Spm بصورت خارجی روی دانه‌رست‌های *Citrus tangerine* که با *G. mosseae* کلونیزه شده بودند سبب شد تا تعداد آربوسکولها بالا برود و کاربرد Put و Spd تعداد وزیکولها را بالا برد. بنظر می‌رسد که پلی‌آمین‌ها ممکن است نمو میکوریزایی را تنظیم یا تشکیل میکوریز و رشد هیف را تحریک کنند (۲۸). اما در منابع، تحقیقی که در آن اثر میکوریزاسیون را روی میزان پلی‌آمین‌ها سنجیده شده باشد مشاهده نگردید. در تحقیق حاضر اثر میکوریزاسیون گیاهچه‌های *T. daenensis* با ماده تلقیحی حاوی اسپورها و ریشه‌های میکوریزایی شده با *G. intraradices* مورد بررسی قرار گرفت. همانطور که دیده شد ایجاد رابطه همزیستی میکوریزی سبب کاهش میزان پلی‌آمین پوترسین کونژوگه در گیاهان تیمار، شده بود ولی بر میزان پلی‌آمین پوترسین باند شده اثر نگذاشته بود. از آنجائی که قارچ‌های میکوریزی در ابتدا برای ورود به گیاه میزبان ممکن است مثل یک تنش برای گیاه محسوب شوند لذا بمنظور تسهیل در ورود خود به میزبان یکسری ترکیبات را در گیاه کاهش می‌دهند تا سیستم دفاعی گیاه را تضعیف کرده و وارد گیاه میزبان شده و شروع به پخش آلودگی کنند. به همین دلیل شاید کاهش در میزان پوترسین کونژوگه در گیاه هم به این خاطر باشد.

منابع

۱. اسمعیل نژادخیاوی، ن. و خارا، ج. ۱۳۹۳. تاثیر قارچ میکوریزای آربوسکولار *Glomus fasciculatum* بر روی رشد و برخی

www.SID.ir

Archive of SID

پارامترهای فیزیولوژیک در گیاه کدوی خورشتی تحت سمیت علف کش متری بوزین. مجله پژوهشهای گیاهی (مجله زیست شناسی ایران)، جلد ۳۷، شماره ۱، ۵۲-۶۰.

۲. امیرآبادی، م.، رجالی، ف.، اردکانی، م.ر. و برجی، م. ۱۳۸۸. تاثیر کاربرد مایه تلقیح ازتو باکتر و قارچ میکوریزی بر جذب برخی عناصر معدنی توسط ذرت علوفه‌ای (رقم سینگل کراس۷۰۴) در سطوح مختلف فسفر. مجله پژوهشهای خاک(علوم خاک و آب)، جلد ۲۳، ۱۰۷-۱۱۵.

۳. برین، م.، علی اصغرزاده، ن. و صمدی، ع. ۱۳۸۵. بررسی اثر تلقیح قارچ میکوریز آربوسکولار در گیاه گندم تحت استرس خشکی. دهمین کنگره علوم خاک ایران.

۴. حاجی بلندی، ر.، علی اصغرزاده، ن. و برزگر، ر. ۱۳۸۹. تاثیر تلقیح گیاه برنج با دو گونه قارچ میکوریز آربوسکولار بر رشد، جذب فسفر و پتاسیم و تغییر pH ریزوسفر. علوم خاک و آب، جلد ۱، ۱۱۱-۱۲۰.

۵. طبسی، ا.، ذکایی، م.، واعظی، ج. و جعفری، آ. ۱۳۸۹. شناسایی قارچ های میکوریز همزیست در ریزوسفرآویشن (*Thymus kotschyanus* var. *eriophorus*) از خراسان شمالی(رئین). شانزدهمین کنفرانس سراسری و چهارمین کنفرانس بین المللی زیست شناسی ایران.

۶. علیزاده، ا.، علیزاده، ا. و آریانا، ل. ۱۳۸۸. بهینه‌سازی مصرف نیتروژن و فسفر در زراعت پایدار ذرت با استفاده از میکوریزا و ورمی‌کمپوست. یافته‌های نوین کشاورزی، سال سوم، شماره ۳. ۳۰۳-۳۱۶.

۷. میرزایی، ج.، اکبری نیا، م.، محمدی گل‌تپه، ا.، شریفی، م. و رضایی دانش، ی. ۱۳۹۲. رسته‌بندی رویشگاه‌های بنه (*Pistacia atlantica*) و خنجوک (*Pistacia khunjuk*) استان ایلان براساس عوامل محیطی و قارچهای میکوریزای آربسکولار. مجله پژوهشهای گیاهی (مجله زیست شناسی ایران)، جلد ۲۶، شماره ۳. ۳۴۱-۳۵۱.

8. Bagyaraj, D. J. 1991. Ecology of vesicular-arbuscular mycorrhizae. Pp. 3-34. In: D. K. Arora, B. Rai, K. G. Mukerji, and G. R. Knudsen. Marcel Dekker, Inc (eds). Handbook of applied mycology: Soil and plants, Vol.1, New York. New York.

9. Copetta, A., Lingua, G. and Berta, G. 2006. Effects of three AM fungi on growth, distribution of glandular hairs, and essential oil production in *Ocimum basilicum L. var. Genovese.* Mycorrhiza. 16:485–494.

10. El Ghachtouli, N., M. Paynot, D. Morandi, J. Martin-Tanguy and Gianinazzi, S. 1995. The effect of polyamines on endomycorrhizal infection of wild-type *Pisum sativum,* cv Frisson (nod^+myc^+) and two mutants (nod^-myc^+ and nod^-myc^-). Mycorrhiza. 5:189-192.

11. Gerdeman, J. W. and T. H. Nicolson. 1963. Spores of mycorrhiza. Endogene species extracted from soil by wet sieving and decanting. Mycol. Soc. 46:235-244.

12. Gupta, M. L., Prasad, A., Ram, M. and Kumar, S. 2002. Effects of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus (VAM) *Glomus fasciculatum* on the essential oil yield related characters and nutrition acquisition in the crops different cultivares of menthol mint (*Mentha arvensis*) under field conditions. Bioresource Technol. 81:77-79.

13. Hassannejad, S., Bernard, F., Mirzajani, F. and Gholami, M. 2012. SA improvement of hyperhidricity reversion in *Thymus daenensis* shoots culture may be associated with polyamines changes. Plant Phisiol. Biochem. 51:40-46.

14. Jang, S.J. Cho, H.W. Park, K.Y. and Kim, Y.B. 2006. Changes in cellular polyamine contents and activities of their biosynthetic enzymes at each phase of the cell cycle in by-2 cells. J. Plant Bio. 49:153-159.

15. Mathur, N. and Vyas, A. 1996. Biochemical changes in *Ziziphus xylopyrus* by VA mycorrhizae. Bot. Bull. Acad. Sin. 37:209-212.

16. Mathur, N. and Vyas, A. 2007. Arbuscular Mycorrhiza on Root-Organ Cultures. Am. J. Plant Physiol. 2:122-138.

17. Mcgonigle, T.P., Miller, M.H., Evans, D.G., Fairchild, G.S. and Swan, J.A. 1990. A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular arbuscular mycorrhizal fungi. New Phytol. 115:495-501.

18. Mir, S.A. 2008. A rapid technique for determination of nitrate and nitric acid by acid reduction and diazotization at elevated temperature. Anal. Chim. Acta. 620:183–189.

19. Navarro-Fernández, C.M., Aroca, R. and Barea, J.M. 2011. Influence of arbuscular mycorrhizal fungi and water regime of the development of endemic *Thymus* species in dolomitic soils. Appl. Soil Ecol. 48:31-37.

20. Phillips, J. M. and D. S. Hayman. 1970. Improved procedures for clearing roots and

www.SID.ir

Archive of SID

staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. Trans. Br. Trans. Br. Mycol. Soc. 55:159-161.

21. Purcell, L.C. and King, C.A. 1996. Total nitrogen determination in plant material by persulfate digestion. Agron. J. 88:111-113.

22. Ramezani, S., Rezaie, Mohammad Reza. and Sutoudehnia, P. 2009. Improved Growth, Yield and Essential Oil Content of Basil Grown under Different Levels of Phosphorus Sprays in the Field. J. Appl. Biol. Sci. 3:96-101.

23. Reggiani, R. and Hochkoeppler A. and Bertani A. 1989. Polyamines in rice seedlings under oxygen-deficit stress. Plant Physiol. 91:1197-1201.

24. Slocum, D. and Galston W. 1985. Changes in Polyamine Biosynthesis Associated with post fertilization growth and development in *Tobacco* ovary tissues. Plant Physiol. 79:336-343.

25. Tommerup, I. C. and D. K. Kidaby. 1979. Preservation of spores of (Vesicular-) arbuscular endophytes by L-drying. Appl. Environ. Microbiol. 37:831-835.

26. 2008. Mycorrhizal Fungi: What We Know and What Should We Know? Mycorrhiza Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Berlin.

27. Wu, Q.Sh. and Zou, Y.N. 2009. The effect of Dual Application of Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Polyamines upon Growth and Nutrient Uptake on Trifoliate Orange (*Poncirus trifoliata*) Seedlings. Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj. 37:95-98.

28. Wu, Q.Sh., Peng, Y.H., Zou, Y.N. and Liu, Ch.Y. 2010. Exogenous polyamines affect mycorrhizal development of *Glomus mosseae* colonized citrus (*Citrus tangerine*) seedlings. Science Asia. 36:254–258.

Identification of mycorrhizal fungi in the rhizospher of *Thymus daenensis* and mycorrhization of this species with *Glomus intraradices* in green house conditions

Ahmadi T.[1], Bernard F.[2], Zangeneh S.[3] and Rejali F.[4]

[1] Faculty of Science, Shahid Beheshti University, Tehran, I.R. of Iran

[2] Iranian Research Institute of Plant Protection, Tehran, I.R. of Iran

[3] Soil and Water Research Institute, Karaj, I.R. of Iran

Abstract

Mycorrhizal fungi were from essential elements of agricultural systems and have important role in improvement of plant growth. In this research, first, was recognized mycorrhizal fungi in rhizosphere of *Thymus daenensis* in Tehran and Eyvan ereas. In total, was seen nine species of this fungi that were belong to *Glomus* and *Scutellospora* genuses. In second, for the study the effect of *Gloums intraradices* on shoot height, fresh and dry weight, nitrogen and polyamines content, inoculum containing spores and colonized roots with the fungi was introduces to plants that were grown in green house conditions. The percent of root length colonization was 47.71. No significant difference between control and treatment shoot dry weight and stem height were detected. But in terms of shoot fresh weight and nitrogen levels, this difference was significant and conjugated putrecine in treatments was decreased.

Key words: *Thymus daenensis*, Mycorrhizal Fungi, Nitrogen Content, Polyamine Content

www.SID.ir