پانزدهمین کنگره علوم خاک ایران

۶ تا ۸ شهریور ۱۳۹۶ محور مقاله: بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک

اثر خاک و بیوچار بر روی جمعیت قارچ‌های میکوریز آربسکولار در ریشه *Andropogon gerardii*

زهرا پیمانه[۱] و مهدی سرچشمه پور[۲]

[۱]دانشجوی دکتری گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی شهید باهنر کرمان، [۲]عضو هیئت علمی گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی شهید باهنر کرمان

چکیده

در این مطالعه تاثیر اصلاح خاک قلیایی(pH=۷/۹) و خاک اسیدی (pH=۵/۶) با دو نوع بیوچار (خام یا فعال) بر روی ترکیب جمعیت قارچ میکوریز در ریشه گیاه *Andropogon gerardii* تلقیح شده با مخلوط قارچ‌های میکوریز با استفاده از real-time PCR کمی‌سازی گردید. فراوانی قارچ *Funneliformismosseae* در خاک قلیایی بیشتر از خاک اسیدی و فراوانی قارچ *Claroideoglomusclaroideum* در خاک اسیدی بیشتر از خاک قلیایی بود. قارچ *Rhizophagusirregularis* هیچ ترجیحی در انتخاب خاک نداشت. اثر بیوچار بر روی جمعیت قارچها کمتر محسوس بود، بجز در قارچ *C. claroideum* که اثر بیوچار خام نسبت به خاک محسوس‌تر بود. تلقیح قارچ میکوریز عملکرد گیاه را نسبت به گیاهان بدون قارچ افزایش داد، بجز در خاک اسیدی بدون بیوچارکه مقدار عملکرد در گیاهان بدون میکوریز بیشتر ازگیاهان تلقیح شده بود. بیوچار اثر مثبتی بر روی رشد گیاهان نشان نداد.

واژه های کلیدی: میکوریز آربسکولار، زیرواحد بزرگ ریبوزوم، Real-time PCR، *Andropogon gerardii*

مقدمه

قارچ‌های میکوریز در ابتدا در سال ۱۸۴۲ بوسیله نگلی معرفی شدند. اما آنچه که نگلی کشیده بود تنها شباهت کمی به قارچ‌های میکوریز داشت(Trappe and Berch, 1985; Rayner, 1926–1927). در دوره ۱۸۷۵ تا ۱۸۹۵ مشاهداتی را از قارچ‌های میکوریز مستند کردند. در اوایل ۱۸۸۹ Schlicht ارتباط بین قارچ میکوریز و بافت‌های گیاهان را مشاهده کرد. Janse (1897)اسپورهای داخلی را ویزیکول نامید و وجود دیگر اندام‌ها را تعیین کرد که Gallaud (1905) آن را اربسکول نامید و در کورتکس داخلی قرار داشتند. در این رابطه همزیستی قارچ میکوریز مبادله عناصر معدنی را با کربن با گیاه انجام می‌دهد و اثر قابل توجهی بر روی تولید گیاه دارد. گیاه برای حمایت این قارچ در سلول‌های کورتیکال خود تغییرات قابل توجهی را از جمله ایجاد غشای جدید در فضای اپوپلاستی جایی که قارچ میکوریز سکونت دارد، بوجود می آورد. این سطح مشترک محل تبادل عناصر غذایی بین گیاه و قارچ است و نقش بحرانی برای این همزیستی دارد (Koide and Mosse, 2004). روش‌های مختلفی برای کمی‌سازی قارچ میکوریز در ریشه گیاه میزبان وجود دارد، کمی‌سازی قارچ میکوریز همواره یک مشکل بوده و در روش‌های پیشین شامل روش‌های میکروسکوپی مانند شمارش اسپور، هیف و بررسی تراکم آنها در خاک، کلنیزاسیون ریشه و روش‌های بیوشیمیایی مانند بررسی اسیدهای چرب و کیتین بوده است(Gamper et al., 2008) . Real-time PCR یک ابزار مناسب برای بررسی تغییرات جمعیت قارچ میکوریز و کمی‌سازی آن می‌باشد. در این روش از کاوشگرهای فلوروسنس (هیبریدیزاسیون یا خارج نکلوتیدی مانند TaqMan) یا رنگ استفاده می‌شود. اساس ان مقدار سیگنال‌های فلورسنت دریافت شده است که متناسب با میزان تکثیر DNA در طول فرایند PCR می‌باشند زمانی که رنگ فلورسنت به اندازه کافی تجمع پیدا کرد و قابل تشخیص از زمینه شد، آن چرخه به عنوان چرخه آستانه ثبت می‌شود و با مقایسه این چرخه با نمودار استاندار می‌توان میزان DNA را بدست آورد (Thonar et al, 2012). با توجه به نیاز کمی‌سازی دقیق قارچ میکوریز در ریشه گیاهان، این آزمایش به منظور مطالعه اثر نوع خاک و افزایش ماده آلی بیوچار بر رشد و تغییر جمعیت قارچ میکوریز انجام شد.

مواد روش‌ها

این آزمایش به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۵ تکرار انجام شد. فاکتورها شامل دو نوع خاک(اسیدی با پ هاش ۵/۶ و قلیایی با پ هاش ۷/۹) و دو نوع بیوچار(فعال به مقدار ۴ درصد، غیرفعال به مقدار ۴ درصد و یک تیمار بدون بیوچار) و دو تیمار قارچ میکوریز(با میکوریز و بدون میکوریز) بود. برای استریل کردن خاک از اشعه گاما استفاده شد. مایه تلقیح استفاده شده در این آزمایش مخلوطی از ۵ قارچ میکوریز از کشت‌های خالص این قارچها بود. قبل از آماده‌سازی گلدان‌ها برداشت شد و ریشه‌ها به قطعات یک سانتی‌متری بریده شد و به صورت کامل با خاک مخلوط شد. برای آماده‌سازی مایه تلقیح مقدارهای ۱۸۰۰ گرم *Racocetrapellucida*، ۱۸۰۰ گرم *Gigaspora margarita*، ۱۸۰۰ گرم *Claroideoglomus*، ۹۰۰ گرم *Rhizophagus* ۳۰۰ گرم *Funneliformis* از هر کدام از قارچها با هم مخلوط شد و سپس مایه تلقیح به دو بخش تقسیم شد. یک بخش اتوکلاو و برای گلدان‌های بدون تلقیح استفاده شد و یک بخش برای تلقیح گلدان‌های دارای قارچ نگه‌داری شد. فعال‌سازی بیوچار در دو مرحله انجام شد. مرحله اول فعال‌سازی با بخار توسط اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه و استراحت در دمای اتاق به مدت ۷ روز، مرحله دوم فعال‌سازی با پراکسید هیدروژن ۱۰ درصد و سپس سه مرتبه شستشو با آب مقطر و خشک کردن در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ روز صورت گرفت. برای آماده‌سازی گلدان‌ها خاک و مایه تلقیح و بیوچار(درگلدان‌های حاوی بیوچار) باهم مخلوط شد و به مقدار یک کیلوگرم به هر گلدان اضافه شد و تا هنگام کشت گلدان‌ها با کاغذ صافی استریل پوشانده شد. برای کشت، از بذرهای *Andropogon gerardii* استفاده شد و به مدت ۳ ماه و بصورت روزانه با آب مقطر آبیاری شد. بعد از این زمان گیاهان برداشت و ریشه‌ها به خوبی شسته و در آون خشک شد و برای استخراج DNA از کیت(NucleoSpin® Soil) استفاده شد و مطابق دستور کار آن استخراج انجام گرفت. برای کمی‌سازی قارچ میکوریز و بدست آوردن تعداد کپی‌های زیر واحد بزرگ ریبوزمی در گرم ریشه گیاه اندروپگون از روش تونار و همکاران(۲۰۱۲)استفاده شد(Thonar et al., 2012). نتایج داده‌ها با نرم افزار SAS و نمودارهابا EXCEL رسم شدند.

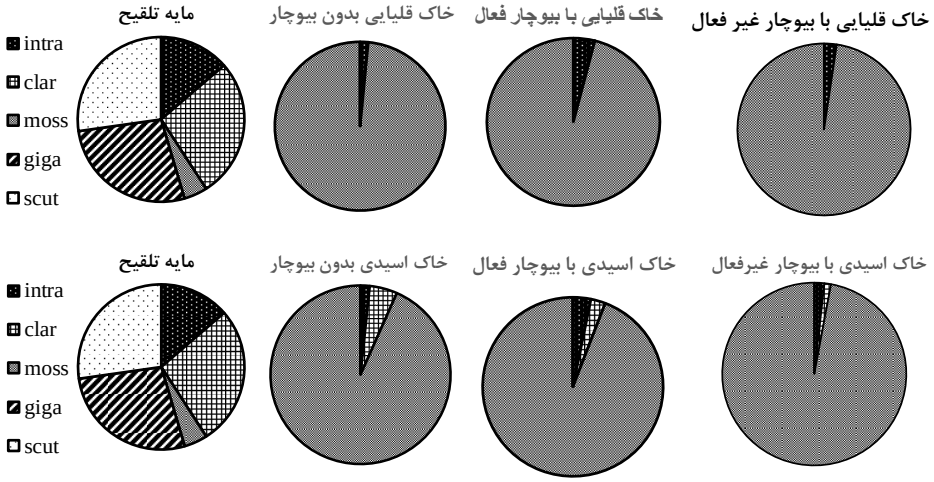
نتایج و بحث

جدول تجزیه واریانس تعداد کپی‌های زیر واحد بزرگ ریبوزومی(LSU) توسط Real-time PCR را در ریشه گیاه اندروپگون نشان می‌دهد. اثر نوع خاک در قارچهای میکوریز کلاریدیوم و فنول فورمیس معنی‌دار بوده است. اثر سایر فاکتورها معنی‌دار نبوده است (جدول ۱). همچنین شکل ۱ نشان می‌دهد در تمام تیمارها بیشتر از ۹۰ درصد تعداد کپی‌های LSU در گرم وزن ریشه را قارچ فنولفورمیس تشکیل داده است. در خاک قلیایی بین ۱تا ۴ درصد از بیومس را قارچ اینترارادیسز تشکیل داده است و در خاک اسیدی علاوه بر قارچ فنول فومیس و اینترارادیسز وجود قارچ کلاریدیوم هم مشاهده شد که سهم آن از قارچ اینترارادیسز بیشتر بوده است(شکل۱). در این آزمایش با وجود تلقیح دو قارچ جایگاسپورا و سکتلوسپورا، هیچ سیگنالی از این دو قارچ مشاهده نشد. Jansa و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند قارچ گلوموس موسه‌ای می‌تواند سریعتر نسبت به سایر قارچها ریشه گیاه میزبان را کلنیزه کنید و تعداد کپی‌ها LSU آن در گرم ریشه بیشتر از سایر قارچها است. بصورت گسترده اثبات شده است که خصوصیات خاک بر روی جمعیت میکروبی خاک به شدت اثر دارد. خاک به عنوان یک فیلتر می‌تواند سبب تغییر جمعیت میکروبی شود. میزان ماده آلی، بافت، پ هاش و میزان عناصر غذایی از جمله خصوصیات خاک هستند که بر روی تغییر جمعیت میکروبی اثر دارند. همان طور که از نتایج بررسی نوع خاک بر روی تعداد کپی‌های LSU قارچ میکوریز مشخص می‌شود در خاک قلیایی میزان تنوع کمتر بوده است و سیگنال مربوط به وجود قارچ کلاریدیوم در خاک اسیدی مشاهده شد می‌توان پیشنهاد کرد قارچ کلاریدیوم بیشتر به شرایط اسیدی سازگارتر است تا شرایط قلیایی.

جدول ۱- تجزیه واریانس تعداد کپی‌های LSU در ریشه گیاه اندروپگون

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		Rhizophagus	*Claroideoglomus*	*Funneliformis*
خاک	۱	ns	***	*
بیوچار	۲	ns	ns	ns
خاک × بیوچار	۲	ns	ns	ns

***، ** و * به ترتیب در سطح ۰/۱، ۱ و ۵ درصد معنی‌دار است. ns از لحاظ آماری معنی‌دار نیست.



شکل۱- مقدار نسبی کپی‌های LSU ۵ قارچ میکوریز در گرم ریشه گیاه اندروپوگون

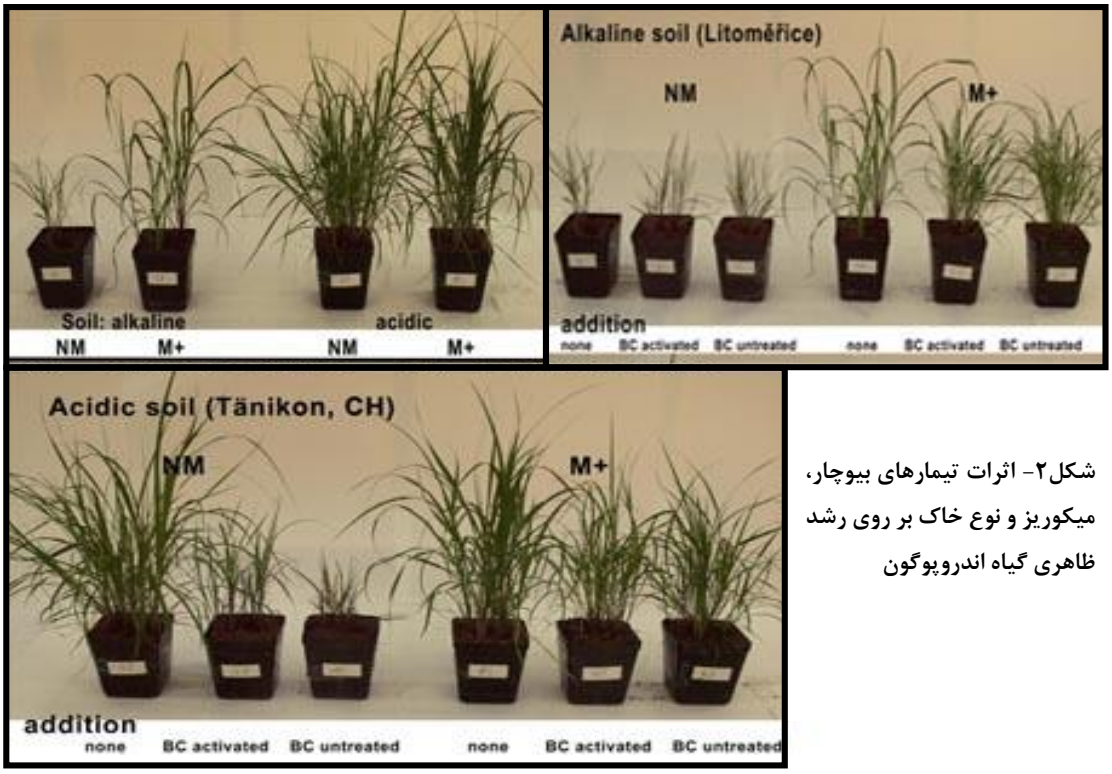
جدول تجزیه واریانس اثر بیوچار و نوع خاک بر روی زیست توده گیاه اندروپگون نشان می‌دهد که اثر قارچ، نوع خاک و بیوچار بر روی وزن خشک ریشه و اندام هوایی معنی‌دار بوده است در حالی که بر روی نسبت ریشه به اندام هوایی تنها اثر قارچ معنی‌دار بوده است. بررسی اثرات متقابل نشان می‌دهد که تمام برهمکنش‌ها بر وزن خشک ریشه معنی‌دار بوده است و در وزن خشک اندام هوایی اثر قارچ و خاک توام و اثر قارچ و بیوچار توام معنی‌دار نبوده است سایر اثرات معنی‌دار بوده است(جدول ۲). بیشترین وزن خشک اندام هوایی در تیمارهای خاک اسیدی و بدون بیوچار بوده است و بین تیمار با قارچ میکوریز و بدون قارچ میکوریز تفاوت معنی‌دار وجود نداشت. هرچند که در تیمار بدون قارچ میکوریز وزن خشک بیشتر از تیمار با قارچ بوده است در سایر تیمارها میزان وزن خشک در اندام هوایی و ریشه در تیمار با قارچ میکوریز بیشتر از تیمار بدون قارچ میکوریز است و بین تیمارهای با قارچ میکوریز و تیمار بدون قارچ میکوریز تفاوت معنی‌دار وجود دارد. بررسی اثر بیوچار نشان می‌دهد میزان وزن خشک در تیمارهای بدون بیوچار بیشتر از تیمارهای دارای بیوچار بوده است. در هر دو خاک اسیدی و قلیایی این روند قابل مشاهده است. وزن خشک در خاک اسیدی بیشتر از خاک قلیایی بوده است(شکل‌های ۲ و ۳). به دلیل قلیایی بودن و افزایش pH خاک بیوچار باعث کاهش جذب عناصر غذایی در گیاهان شده است که در علائم ظاهری گیاه بوضوح قابل مشاهده است ابریشم کش و همکاران(۲۰۱۵) اثبات کردند که افزایش بیوچار به خاک‌های قلیایی سبب کاهش میزان فسفر قابل دسترس برای گیاه می‌شود. در این پژوهش در تیمارهای دارای قارچ میکوریز در خاک قلیایی علائم ظاهری کمبود فسفر مشاهده نشد Hammer و همکاران (۲۰۱۴) نشان دادند قارچ میکوریز با نفوذ به داخل ساختار بیوچار به طور مستقیم می‌تواند فسفر را از سطوح بیوچار جذب گیاه کند و همچنین هیف‌ها می‌توانند به منافذ داخلی بیوچار رفته و عناصر را جذب و به گیاه منتقل کنند آنها اثبات کردند قطر هیف‌هایی که به داخل منافذ بیوچار نفوذ می‌کنند از قطر هیف‌هایی که در سطح بیوچار رشد می‌کنند

کمتر است. تحقیقات بسیاری از نقش میکوریز در جذب عناصر غذایی توسط هیف‌های خارج ریشه‌ای انجام شده است بسیاری از محققین اثبات کرده‌اند قارچ میکوریز بوسیله هیف‌های خارج ریشه‌ای می‌تواند به داخل خاکدانه‌ها نفوذ کند و عناصر غذایی را با جذب مستقیم یا توسط فعالیت‌های آنزیمی به گیاه منتقل کند و سبب رشد گیاهان شود.

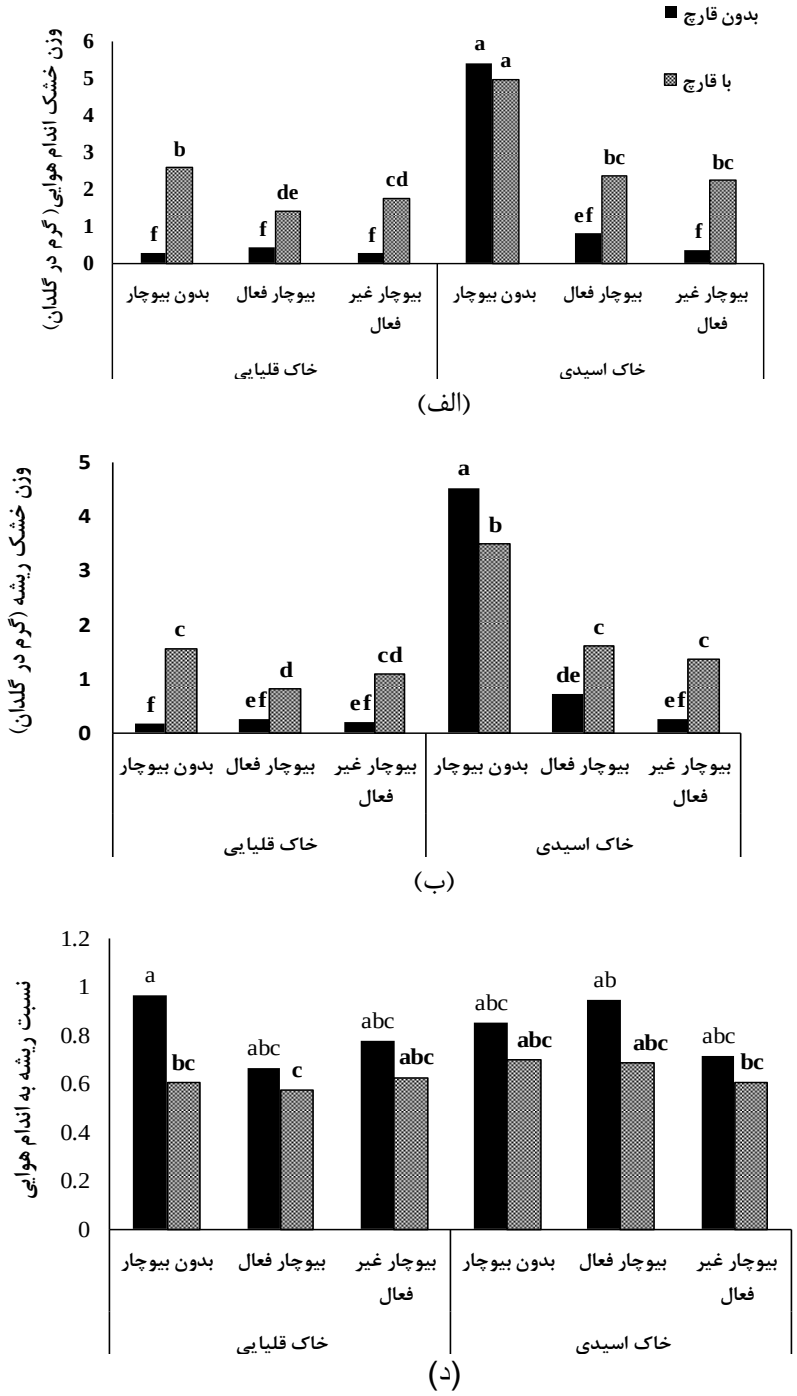
جدول ۲- تجزیه واریانس زیست توده گیاه

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		وزن خشک هوایی	وزن خشک ریشه	نسبت وزن خشک ریشه به اندام هوایی
خاک	۱	***	***	ns
بیوچار	۱	***	***	ns
قارچ	۲	***	***	*
خاک × قارچ	۱	ns	**	ns
خاک × بیوچار	۲	***	***	ns
قارچ × بیوچار	۲	ns	*	ns
خاک ×قارچ ×بیوچار	۲	***	***	ns

***، ** و * به ترتیب در سطح ۰/۱، ۱ و ۵ درصد معنی‌دار است. ns از لحاظ آماری معنی‌دار نیست.



شکل۲- اثرات تیمارهای بیوچار، میکوریز و نوع خاک بر روی رشد ظاهری گیاه اندروپوگون



شکل۳- اثر بیوچار، قارچ میکوریز و نوع خاک برروی (الف) وزن خشک اندام هوایی (ب) وزن خشک ریشه (د) نسبت ریشه به اندام هوایی در گیاه اندروپوگون

منابع

Abrishamkesh S., Gorji M., Asadi H., Bagheri-Marandi G.H. and Pourbabaee A.A. 2015. Effects of rice husk biochar application on the properties of alkaline soil and lentil growth. Plant Soil Environt, 61(11): 475-482.

Gallaud J. 1905. Etude sur les mycorrhizes endotrophes. Rev Gen Bot, 17: 5-48, 66-83, 123-136, 223-249, 313-325, 425-433, 479-500.

Gamper H.A., Young J.P.W., Jones D.L. and Hodge A. 2008. Real-time PCR and microscopy: Are the two methods measuring the same unit of arbuscular mycorrhizal fungal abundance?. Fungal Genetics and Biology, 45: 581-596.

Hammer E.C., Balogh-Brunstad Z., Jakobsen I., Olsson P.A., Stipp S.L.S. and Rillig M.C. 2014. A mycorrhizal fungus grows on biochar and captures phosphorus from its surfaces. Soil Biology and Biochemistry, 77: 252-260.

Jansa J., Smith F. A. and Smith S.E. 2007. Are there benefits of simultaneous root colonization by different arbuscular mycorrhizal fungi?. New Phytologist, 177(3): 779-89.

Janse J.M. 1897. Les endophytes radicaux de quelques plantes Javanaises. Ann. Jard. Bot. Buitenzorg., 14:53-201.

Koide R.T. and Mosse B. 2004. A history of research on arbuscular mycorrhiza. Mycorrhiza, 14: 145-163.

Ngeli C. 1842. PilzeimInnern von Zellen. Linnaea, 16:278–285

Rayner M.C. 1926–1927. Mycorrhiza. New Phytol 25: 1-50, 65-108, 171-190, 248-263, 338-372, 26: 22-45, 85-114.

Schlicht A. 1889. Beitragzur Kenntniss der Verbreitung und Bedeutung der Mycorhizen. LandwirtschaftlicheJahrb_cher 18: 478-506

Thonar C., Erb A. and Jansa J. 2012. Real-time PCR to quantify composition of arbuscular mycorrhizal fungal communities-marker design, verification, calibration and field validation. Molecular Ecology Resources, 12: 219-232.

Trappe J.M. and Berch S.M. 1985. The prehistory of mycorrhizae: A.B. Frank's predecessors. In: Proceedings of the 6th North American conference on mycorrhizae. Forest Research.

Soil and biochar effects on arbuscular mycorrhizal fungal communities in *Andropogon gerardii* roots

Z. Paymaneh[1], M. Sarcheshmehpour[1]

[1]Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

Abstract

We tested whether biochar (crude or activated) amendment to alkaline (pH 7.9) or acidic (pH 5.6) soil affected the composition of arbuscular mycorrhizal fungal (AMF) communities in *Andropogon gerardii* roots inoculated with synthetic AMF mixture, using quantitative real-time PCR targeting the individual AMF species contained in the inoculum. Whereas *Funneliformismosseae* was more abundant in alkaline than in acidic soils, *Claroideoglomusclaroideum* was more abundant in acidic as compared to alkaline soils. No soil preferences were noted for *Rhizophagusirregularis*. The influence of biochar amendment on the AMF was less prominent than that of soil, with only *C. claroideum* abundance in the roots being affected (suppressed) by crude biochar amendment to the soils. Whereas mycorrhizal inoculation generally increased plant biomass (except in acidic soil without biochar), biochar itself did not have any positive effect on growth of the plants.

Keywords: arbuscular mycorrhiza, LSU, Quantitative real-time PCR, *Andropogon gerardii*