تأثیر عناصر خاک بر کلنیزاسیون قارچ‌های میکوریزا آربسکولار همزیست با ریشه گیاه دارویی کاکوتی (*Ziziphora clinopodioides* Lam.)

پروین رامک[۱] و محمد متینی زاده[۲]
[۱] بخش تحقیقات منابع طبیعی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان لرستان،[۲] بخش تحقیقات جنگل، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، تهران

چکیده:
در این تحقیق تأثیر عناصر غذایی خاک بر درصد کلنیزاسیون و تعداد اسپور قارچ‌های میکوریز آربسکولار موجود در ریزوسفر گیاه دارویی کاکوتی (*Ziziphora clinopodioides*) طی دو سال در فصل‌های بهار و پائیز در حوزه آبخیز نوژیان، بررسی شد. گیاهان به روش تصادفی انتخاب، از ریشه‌های نازک نمونه‌برداری و نمونه خاک از عمق ۳۰-۰ سانتیمتری در محدوده سایه انداز هر گیاه برداشته شد. آنالیز خاک با روش‌های متداول آزمایشگاهی انجام شد. اسپور قارچ‌های میکوریزی با استفاده از شیب ساکاروزی جداسازی شدند و تعداد اسپورها در هر گرم خاک محاسبه شد. نتایج نشان داد که منیزیوم خاک با تعداد اسپور های خاک (۰/۷۳+) و کلنیزاسیون ریشه (۰/۵۱+)، همبستگی مثبت داشت اما فسفر، پتاسیم و ازت با تعداد اسپور های خاک و کلنیزاسیون ریشه همبستگی منفی نشان دادند. شناخت تعامل عناصر غذایی خاک با همزیستی قارچ‌های میکوریز آربسکولار می‌تواند در برنامه‌های استقرار و توسعه گیاهان دارویی در اکوسیستم‌های زراعی کاربرد داشته باشد.
واژه‌های کلیدی: عناصر خاک ، کاکوتی (*Ziziphora clinopodioides*)، همزیستی میکوریزا آربسکولار

مقدمه:

همزیستی میکوریزایی نقش بسیار مهمی در ایجاد، نگه داری، پایداری و توسعه جوامع گیاهان ایفا می‌کند. قارچ‌های همزیست میکوریزای اثر کیفی مثبت در رشد و تغذیه گیاه میزبان دارند. میکوریزاهاجذب عناصر N، P، S، K، Mg، Ca، Mn و Fe را افزایش می‌دهد (Marschner, 2012). همزیستی میکوریزایی نقش بسیار زیادی در ایجاد، نگه‌داری، پایداری و توسعه جوامع گیاهان دارویی به خصوص در مناطقی با فشارهای گوناگون فیزیکی و اکولوژیکی همچون؛ اکوسیستم‌های نیمه استپی، خشک و کوهستانی و مناطق کویری، ایفا می‌کند (اسماعیل زاده و همکاران، ۱۳۸۴; خانپور و همکاران، ۱۳۸۷).

کاکوتی (*Ziziphora clinopodioides* Lam) یکی از گیاهان معطر و دارویی خانواده لابیاته در ایران است. اسانس این گونه حاوی پولگون است و از آن به‌عنوان آرام‌بخش، مقوی معده، درمان سرماخوردگی، افسردگی، اسهال، سرفه، میگرن، تب و به‌عنوان ضدعفونی کننده استفاده می‌شود (دهقان و همکاران، ۱۳۹۳). در سال های اخیر، افزایش تقاضا برای مصرف گیاهان دارویی و فراورده های آنها از یک طرف و کمیاب شدن این گیاهان به دلیل برداشت های بی رویه از طرفی دیگر، از جمله چالش هایی هستند که تحقیقات حفظ و احیاء اکوسیستم های طبیعی و تکثیر و توسعه کشت گیاهان دارویی در اکوسیستم های زراعی را اجتناب ناپذیر کرده اند. مستندات علمی نشان داده‌اند که همزیستی میکوریزایی نقش مهمی در پایداری و توسعه جوامع گیاهان دارویی در اکوسیستم های نیمه استپی، خشک و کوهستانی و مناطق کویری که فشارهای گوناگون فیزیکی و اکولوژیکی بر آنها حاکم است ، ایفا می کنند (Barea et al., 2011).

آبخیز نوژیان با مساحت ۳۴۰۰۰ کیلومتر مربع در جنوب شرقی شهرستان خرم آباد قرار دارد و یکی از عمده‌ترین رویشگاه‌های کاکوتی در استان لرستان است. از آنجائیکه کاکوتی یکی از پرمصرف ترین گیاهان دارویی می باشد لذا متأسفانه به دلیل برداشت بی‌رویه بیشتر رویشگاه‌های این گیاه به شدت تهدید شده‌اند (مهرنیا و رامک، ۱۳۹۳). یکی از مهمترین محدودیت های حاکم بر زراعت گیاهان دارویی شناخت بیولوژی خاک و ایجاد شرایط بهینه کاشت می باشد (Lombini *et al.* 1999)، لذا شناخت فیزیولوژی همزیستی میکروارگانیسم‌ها در ریزوسفر ریشه گیاهان دارویی می تواند در استقرار و گسترش

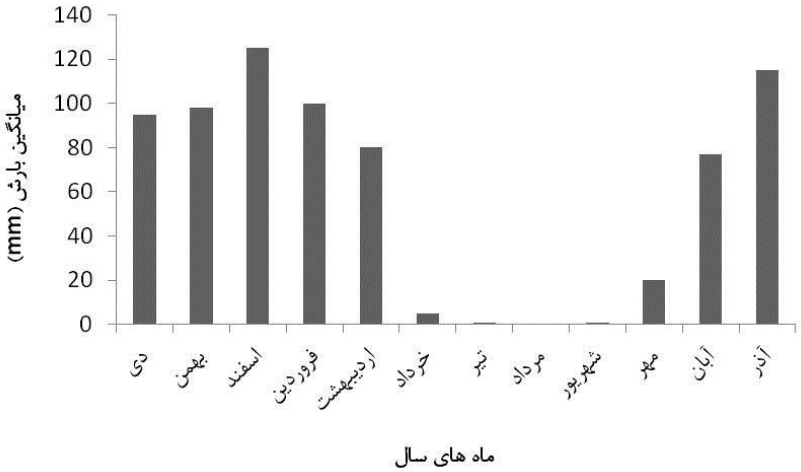
کشت گیاهان دارویی به کار گرفته شود. این تحقیق به منظور شناخت تأثیر عناصر غذایی خاک بر همزیستی قارچ‌های میکوریزایی موجود در ریزوسفر گیاه دارویی *Ziziphora clinopodioides* صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

منطقه نمونه‌برداری

منطقه نوژیان بین طول جغرافیاییَ ۲۳ °۴۸ تاَ ۴۰ ° ۴۸ و عرض جغرافیاییَ ۱۷ °۳۳ تاَ ۶۰ °۳۳ در استان لرستان در حوزه آبریز سد دز واقع شده است. بلندترین نقطه حوزه ۳۰۱۲ متر و کمترین ارتفاع ۷۷۰ متر می باشد ارتفاع متوسط حوزه ۱۶۴۸ متر می باشد و شیب متوسط حوزه برابر ۲۹ درجه است.

میانگین بارندگی سالیانه در آبخیز نوژیان ۸۹۶/۲ میلی‌متر و حداکثر میزان بارندگی در بهمن ماه با ۱۶۸/۵ میلی‌متر و حداقل آن در خرداد و مرداد به میزان صفر می باشد (شکل ۱). دامنه نوسان درجه حرارت در این حوزه به ۵۰ °C می‌رسد و از ۲۰ °C- در زمستان تا ۳۲ °C در تابستان تغییر می‌کند.



شکل ۱- میانگین بارش ماهانه در ارتفاع متوسط حوزه آبخیز نوژیان

نمونه‌برداری از خاک و ریشه

نمونه برداری از ریشه‌های نازک با قطر حدود یک میلی‌متر و خاک اطراف ریشه گیاهان (عمق ۳۰-۰ سانتی‌متر) طی دو سال متوالی (۱۳۹۴-۱۳۹۳)، در دو فصل بهار و پائیز به روش سیستماتیک تصادفی در طول ترانسکت های ۱۰۰ متری در پنج تکرار انجام شد. ریشه‌های نازک مربوط به هر گیاه در محل نمونه‌برداری جدا شده، در قوطی فیلم‌های محتوی فیکساتور (فرمالدئید-الکل اتیلیک-اسید استیک) قرار گرفته و به آزمایشگاه منتقل شدند.

آنالیزهای خاک‌شناسی

برای اندازه‌گیری اسیدیته خاک از دستگاه pH متر (مدل 744، شرکت متروهم، سویس) و برای اندازه گیری شوری خاک از دستگاه کنداکتومتر (مدل HI2030، شرکت هانا، آمریکا) استفاده شد (زرین کفش، ۱۳۷۲). فسفر قابل جذب به روش اولسون و منیزیوم به روش تیترومتری سنجیده شدند. برای اندازه‌گیری ماده آلی از روش والکی ولک و درصد آهک خاک با روش تیتراسیون تعیین گردید. درصد ازت کل خاک با روش هضم کجلدال و میزان پتاسیم قابل جذب به وسیله دستگاه فلیم فتومتر (مدل FP8800، شرکت کروز، آلمان) سنجیده شدند. بافت خاک به روش هیدرومتری سنجش شد (جعفری حقیقی، ۱۳۸۲).

استخراج اسپور قارچ‌های میکوریز آربسکولار از نمونه‌های خاک

برای جداسازی اسپورها، از روش الک مرطوب و سانتریفوژ با شیب غلظت ساکارز استفاده شد. اسپورها در زیر بینوکولر با درشت نمایی ۵۰-۳۰ برابر شمارش شدند و میانگین تعداد اسپورهای مربوط به ۴ تکرار برای هر نمونه خاک محاسبه شد. (فریتز و همکاران، ۲۰۰۶).

تعیین درصد کلنیزاسیون ریشه

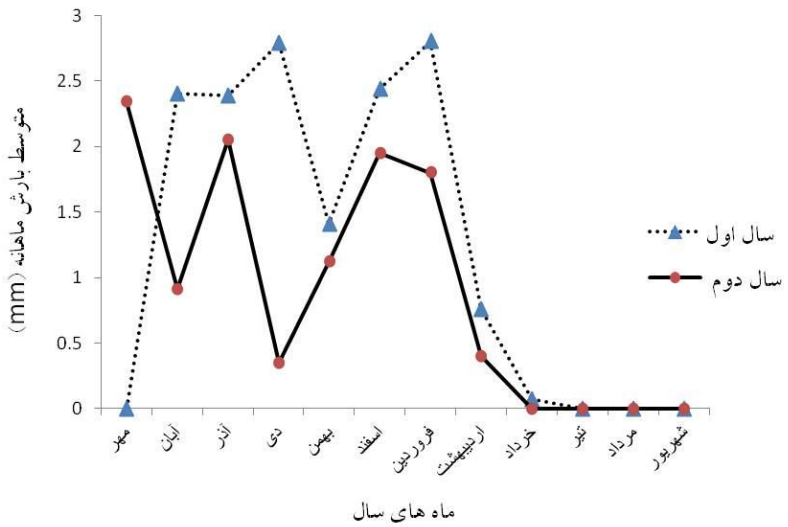
ریشه‌های نازک با استفاده از محلول هیدروکسید پتاسیم (KOH) ۱۰٪ و آب اکسیژنه قلیایی (H_2O_2) ابتدا بی رنگ شده و سپس با لاکتوفنل- کاتن بلو رنگ آمیزی شدند. درصد آلودگی ریشه به قارچ‌های میکوریز آربسکولار بر اساس وجود یا عدم وجود ساختمان‌های میکوریزی (هیف، آربسکول، وزیکول و یا اسپورهای داخلی) در صد قطعه از هر نمونه و در پنج تکرار به صورت درصد محاسبه و متوسط آن گزارش شد (Phillips and Hayman, 19970).

تحلیل آماری

تجزیه واریانس داده‌ها بر اساس طرح پایه بلوک‌های کاملاً تصادفی در چهار تکرار با استفاده از نرم افزار SPSS var. 18 انجام شد. میانگین‌ها به روش دانکن در p=0/05 مقایسه و ضریب همبستگی پیرسون محاسبه شد.

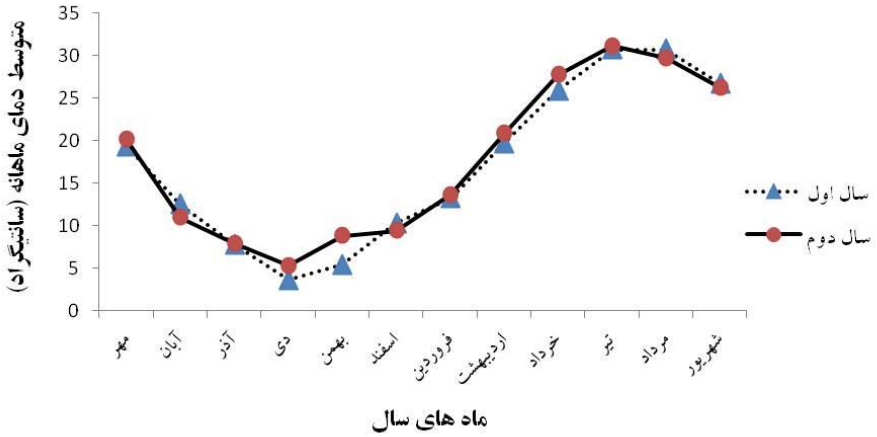
نتایج و بحث

به منظور تحلیل اثر آب و هوا بر میزان همزیستی قارچ‌های میکوریزآربسکولار (AMF) با گیاهان مورد مطالعه، آمار مربوط به دما و میزان بارندگی طی سال‌های ۱۳۹۳ و ۱۳۹۴ از ایستگاه هواشناسی خرم آباد گرفته شد. بررسی آمارهای هواشناسی طی دو سال ۱۳۹۳ و ۱۳۹۴ نشان داد که میانگین ماهانه بارش در سال اول (۱۳۹۳) بیشتر از سال دوم (۱۳۹۴) نمونه برداری بوده است (شکل ۲).



شکل ۲- متوسط بارش ماهانه در سال‌های ۱۳۹۳ و ۱۳۹۴

متوسط دمای ماهانه در سال دوم (۱۳۹۴) بیشتر از سال اول (۱۳۹۳) بود (شکل ۳).



شکل ۳- متوسط دمای روزانه در سال‌های ۱۳۹۳ و ۱۳۹۴

آمار متوسط بارش‌ها و دمای ماهانه در منطقه نوژیان نشان می‌دهد که سال دوم در مقایسه با سال اول از میزان بارش کمتر و متوسط دمای ماهانه بیشتری برخوردار است یعنی سال دوم به مراتب گرمتر و خشک تر از سال اول نمونه برداری در منطقه نوژیان لرستان است.

بررسی ها نشان داد تعداد اسپور و درصد کلنیزاسیون در گیاه دارویی کاکوتی در سال دوم (۱۳۹۴) از متوسط بالاتری برخوردار بود اما این تفاوت به لحاظ آماری معنی دار نبود (جدول ۱). اگرچه اظهار نظر علمی و مستند مستلزم نمونه برداری و بررسی‌های بیشتر است اما به نظر می‌رسد میل به همزیستی طی سال دوم که گرم و خشک تر بوده، بیشتر است. گزارش‌هایی وجود دارد که نشان میدهد که قارچ‌های آربسکولار توانایی گیاهان را برای استقرار و مقاومت در برابر شرایط تنش‌زا مانند خشکی را افزایش می‌دهد. این امر از طریق توسعه شبکه‌های هیف قارچ در ریزوسفر گیاه و تشکیل یک سیستم جذبی مکمل برای سیستم ریشه گیاه، صورت می‌پذیرد (Degens *et al*., 1996).

جدول ۱- مقایسه میانگین اثر سال و فصل بر تعداد اسپور و درصد کلنیزاسیون AMF در گیاه کاکوتی (*Ziziphora clinopodioides*)

سال	فصل	تعداد اسپور	کلنیزاسیون (٪)
سال اول	بهار	^{a}۱۰۰/۴	^{bc}۷۷/۴
	پاییز	^{b}۸۰	^{e}۵۹
سال دوم	بهار	^{a}۹۹	^{c}۷۲
	پاییز	^{b}۸۴/۸	^{d}۶۵/۲

میانگین‌های دارای حرف مشترک در هر تیمار تفاوت معنی دار ندارند (آزمون دانکن سطح احتمال ۵٪).

دو فصل بهار و پاییز تفاوت معنی داری بر درصد مواد آلی خاک داشتند (جدول ۲). اگر چه ماده آلی خاک همبستگی معنی‌داری با درصد کلنیزاسیون AMF و تعداد اسپورهای موجود در خاک اطراف ریشه گیاهان نشان نداد (جدول ۳). این نتایج با گزارش فیضی کمره و همکاران (۱۳۹۰) و Lingfei و همکاران (2005) مطابقت دارند. ماده آلی یا کربن خاک یک عنصر حیاتی است که مواد آلی ضروری برای اجزای سیمان خاک را شکل می‌دهد. رشد ریشه گیاهان و ریسه‌های خارجی

قارچ‌های میکوریزآربسکولار به درون خاک به ساختار خاک در ایجاد یک ساختار اسکلتی کمک می‌کند که اجزای خاک را در کنار هم نگه می‌دارد (Marschner, 2012).

جدول ۲ - مقایسه میانگین ویژگی های خاک شناسی ریزوسفر کاکوتی (*Ziziphora clinopodioides*)

متغیر		مواد آلی (٪)	فسفر (ppm)	پتاسیم (ppm)	نیتروژن کل (٪)	منیزیوم (٪)	آهک (٪)	اسیدیته (pH)	شوری (dsm^{-1})	رس (٪)	سیلت (٪)	شن (٪)
سال	فصل											
۱۳۹۳	بهار	bc۰/۸۱	a۱۰	a۲۸۰	a۰/۵۴	b۰/۴۵	ab۳۶	ab۷/۹	a۰/۸۱	a۲۹	b۲۳	ab۴۸
	پاییز	d۰/۶۴	a۱۰	b۲۷۲	b۰/۴۵	b۰/۴۲	a۳۸	a۸/۱	a۰/۸۴	a۲۶	b۲۳	a۵۱
۱۳۹۴	بهار	a۱/۲۱	b۶/۹	c۲۰۱	c۰/۲۳	a۰/۵۷	b۳۱	b۷/۶	b۰/۶۲	a۲۳	a۳۴	b۴۳
	پاییز	c۰/۷۶	ab۸/۳	bc۲۰۵	c۰/۲۱	a۰/۶۵	a۳۹	ab۷/۸	b۰/۶۵	a۲۹	c۲۲	a۴۹

میانگین‌های دارای حرف مشترک در هر تیمار تفاوت معنی دار ندارند (آزمون دانکن سطح احتمال ۵٪).

جدول ۳- ضریب همبستگی ویژگی های خاک با تعداد اسپور و درصدکلنیزاسیون قارچ‌های میکوریزا آربسکولار با ریشه *Ziziphora clinopodioides*

گونه	مواد آلی خاک	فسفر	پتاسیم	ازت	منیزیوم	آهک	pH	شوری	رس	سیلت	شن
تعداد اسپور خاک	^{ns}۰/۳۵	**-۰/۶۵	*-۰/۵۱	**-۰/۶۵	**۰/۷۳	^{ns}۰/۰۳	*-۰/۴۸	**-۰/۶۵	^{ns}-۰/۲۱	^{ns}۰/۰۱	^{ns}۰/۳۳
کلنیزاسیون ریشه	^{ns}۰/۳۸	**-۰/۷۸	*-۰/۸۷	**-۰/۷۲	*۰/۵۱	^{ns}۰/۰۴	*-۰/۴۱	**-۰/۶۱	^{ns}۰/۰۵	^{ns}۰/۰۶	^{ns}۰/۲۲

** در سطح ۱٪ معنی دار است، * در سطح ۵٪ معنی دار است، ^{ns} معنی دار نیست

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که بین فسفر قابل جذب و درصد کلنیزاسیون AMF با ریشه گیاهان مورد مطالعه همبستگی منفی به میزان ۰/۷۶- وجود دارد (جدول ۳). نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که با کاهش میزان فسفر در خاک اطراف ریشه گیاه دارویی کاکوتی بر میزان کلنیزاسیون و همزیستی AMF با ریشه این گیاه دارویی افزوده می‌شود. نتایج این تحقیق با گزارش‌های Hetrick و همکاران (۱۹۹۴)؛ خانپور و همکاران (۱۳۸۷) و Habibzadeh (۲۰۱۵) مطابقت دارد.

براساس نتایج این تحقیق، ضریب همبستگی منفی بین پتاسیم قابل جذب با درصد کلنیزاسیون AMF و تعداد اسپورهای موجود در خاک اطراف ریشه گیاهان مورد مطالعه وجود داشت. تأثیر فصل بر میزان رشد و تنش‌های فیزیولوژیک مانند نزدیک شدن به دوره بذردهی در فصل پاییز، می‌تواند میزان جذب پتاسیم و همزیستی و کلنیزاسیون AMF را تحت تأثیر خود قرار دهد (Vinichuk *et al*., 2010).

منیزیوم خاک همبستگی مثبت معنی‌داری با درصد کلنیزاسیون AMF و تعداد اسپورهای موجود در خاک اطراف ریشه گیاهان مورد مطالعه نشان داد اما میزان آهک (کلسیم) خاک همبستگی معنی‌داری با درصد کلنیزاسیون AMF و تعداد اسپورهای موجود در خاک اطراف ریشه گیاهان نشان نداد.

در یک نتیجه گیری کلی می‌توان گفت؛ ویژگی‌های شیمیایی و فیزیکی ریزوسفر موجود در اطراف ریشه گیاه دارویی کاکوتی بر تعداد اسپور و میزان همزیستی AMF با ریشه این گیاه دارویی مؤثر بوده اما نقش هر عنصر متفاوت از عنصر دیگر است و این تعامل تحت تأثیر شرایط محیطی قرار داشته و در شرایط اقلیمی و فصلی متغییر است.

منابع

اسماعیل زاده، ص.، زارع مایوان، ح. و قناتی، ف. ۱۳۸۴. همزیستی میکوریز وزیکولار آربوسکولار در گیاهان دارویی پارک ملی تندوره . مجله ی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران، جلد ۴، شماره‌ی ۲۱، صفحه‌های ۴۸۹ تا ۵۰۴.

جعفری حقیقی، مجتبی. ۱۳۸۲. روش‌های تجزیه خاک؛ نمونه برداری و تجزیه‌های مهم فیزیکی و شیمیایی با تأکید بر اصول تئوری و کاربردی. انتشارات ندای ضحی.

خانپور، ن.، زارع مایوان، ح. و قناتی، ف. ۱۳۸۷. پراکنش گیاهان دارویی و وضعیت میکوریزایی آنها در پناهگاه حیات وحش موته (استان اصفهان). مجله ی پژوهش و سازندگی در منابع طبیعی، جلد ۴، شماره‌ی ۷۸، صفحه‌های ۱۲۹ تا ۱۳۸.

دهقان، ز.، سفیدکن، ف.، امامی، س. م. و کلوندی، ر. ۱۳۹۳. تأثیر شرایط اقلیمی بر بازده و کیفیت اسانس *Ziziphora clinopodioides* در رویشگاه‌های مختلف استان همدان. مجله‌ی پژوهش‌های گیاهی ، جلد ۲۷، شماره‌ی۱، صفحه‌های ۶۱ تا ۷۱.

مهرنیا، م. و رامک، پ. ۱۳۹۳. بررسی فلورستیک حوزه آبخیز نوژیان. مجله زیست شناسی گیاهی ایران، جلد ششم، شماره‌ی ۲۰، صفحه‌های ۱۱۳ تا ۱۳۶.

Barea, J.M., Palenzuela, J., Cornejo, P., Sánchez-Castro, I., Navarro-Fernández, C., Lopéz-García, A., Estrada, B., Azcón, R., Ferrol, N., Azcón-Aguilar, C. 2011. Ecological and functional roles of mycorrhizas in semi-arid ecosystems of Southeast Spain. Journal of Arid Environments 75: 1292-1301.

Degens, B. P., G. P. Sparling and L. K. Abbott. 1996. Increasing the length of hyphae in a sandy soil increases the amount of water-stable aggregates. Applied Soil Ecology, 3:149-159.

Habibzadeh, H. 2015. The effects of arbuscular mycorrhizal fungi and phosphorus levels on dry matter production and root traits in cucumber (*Cucumis sativus* L.). African Journal of Environmental Science and Technology 9 (2): 65-70.

Hetrick, B. A. D., Hertnett, D. C., Wilson, G. W. T. and Gibson, D. J. 1994. Effects of mycorrhizae, phosphorus availability, and plant density on yield relationships among competing tallgrass prairie grasses. Canadian Journal of Botany 72: 168-176

Lingfei, L. I., Yang, A. and Zhao, Z. 2005. Seasonality of arbuscular mycorrhizal symbiosis and dark septate endophytes in a grassland site in southwest China. FEMS Microbiology Ecology 54: 367-373.

Lombini, A., Dinelli, E., Ferrari, C. and Simoni, A. 1999. Plant-soil relationships in the serpentine screes of Mt. Prinzera (Northern Apennines, Italy). Journal of Geochemical Exploration 64: 19–33.

Marschner, H. 2012. Mineral nutrition of higher plants. 3nd ed. Academic Press, London.

Phillips J. M. and Hayman D.S. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. Transactions of the British. Mycological Society, 55: 157-160.

Schweizer L.E., Nyquist W.E., Santini J.B. and Kimes T.M. 1986. Soybean cultivar mixtures in a narrow-row, noncultivatable production system. Crop Science, 26: 1043-1046.

Vinichuk, M., Taylor, A. F. S., Rosén, K. and Johanson, K. J. 2010. Accumulation of potassium, rubidium and cesium (133Cs and 137Cs) in various fractions of soil and fungi in a Swedish forest. Science Total Environment 408: 2543-2548.

The effect of soil properties on arbuscular mycorrhizal colonization of *Ziziphora clinopodioides* Lam.

P. Ramak[1] and M. Matinizadeh[2]

[1] Research Division of Natural Resources, Lorestan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Khorramabad, Iran

[2] Forest Research Division, Research Institute of Forests and Rangelands, AREEO,Tehran, Iran

Abstract

In this research, the effect of soil nutrients on the percent root colonization and spore numbers of *Ziziphora clinopodioides* in Nojian Watershed was studied during the spring and autumn period for two years. Plant samples were collected randomly and soil samples were gathered from the depth of 0-30 cm of plant canopy area. Soil properties determined by conventionally labrotary methods. Spores of fungi were separated from soil with sucrose gradient and the number of spores per gram of soil was calculated. The results showed that magnesium significant positive correlation with arbuscular mycorrhiza fungi spore density (+ 0.73) and percentage colonization (+ 0.51), but Potassium, Phosphorus and nitrogen negatively correlated with spore density and percentage colonization. Understanding the interaction of soil nutrients and mycorrhizal symbiosis can be useful for development of medicinal plants in agricultural ecosystems.

Key words: Mycorrhizal symbiosis, Soil nutrients, *Ziziphora clinopodioides*