معرفی جعبه پایش ریشه (Rhizotron) برای ارزیابی و مطالعه درجای رشد و توسعه ریشه‌ی گیاه در خاک

جواد زمانی بابگهری و محمد علی حاج عباسی
۱- استادیار گروه علوم خاک دانشگاه جیرفت ۲ - استاد گروه علوم خاک دانشگاه صنعتی اصفهان

چکیده

به منظور مطالعه رشد و توسعه ریشه در این مقاله به معرفی اجمالی جعبه پایش ریشه و روش ساخت آن پرداخت شده است. برای معرفی بهتر این روش از نتایج یک تحقیق با عنوان تاثیر تلقیح گیاه ذرت با قارچ اندوفایت *Piriformospora indica* و حضور یک لایه خاک آلوده به مواد نفتی بر رشد و توسعه ریشه‌های این گیاه استفاده شد. نتایج نشان داد که جعبه پایش ریشه ابزاری مناسب برای مطالعه‌ی ریشه به صورت درجا می‌باشد و با استفاده از این ابزار به خوبی می‌توان تاثیر تیمارهای مورد مطالعه را بر طول ریشه، عمق توسعه ریشه و تعداد نوک ریشه‌های گیاه مورد مطالعه قرار داد. در مطالعه ذکر شده 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 اندوفایت سبب کاهش اثر منفی حضور این لایه آلوده شده بود. تعداد نوک ریشه‌های گیاه ذرت نیز روندی مشابه با رشد طولی ریشه‌ها نشان داد.

واژه های کلیدی: ریزوترون، *P. indica*، گیاه‌پالایی، ImageJ، SmartRoot

مقدمه

ریشه گیاهان در یک محیط ناهمگن، متخلخل، نیمه فشرده و سه فازی، یعنی خاک، رشد می‌کند و لذا بررسی رشد و توسعه آن کار دشواری می‌باشد و در حالت معمول بررسی ریشه‌ها بدون به هم‌خوردگی سیستم خاک – ریشه کاری دشوار خواهد بود (Pierret, 2008). ریشه‌ها در واقع نیمه پنهان گیاهان موجود در کره زمین می‌باشند (Menon et al., 2006) و درک ما از سیستم ریشه - خاک، به دلیل دشواری‌هایی که در مشاهده رشد و فعالیت آن درون خاک وجود دارد، بسیار محدود است. اگر چه دانشمندان در سال‌های اخیر پژوهش‌های زیادی در زمینه محیط‌های متخلخل به صورت دست‌نخورده انجام داده‌اند اما در حال حاضر در مطالعه رشد و فعالیت ریشه گیاهان روش‌ها و ابزارهای کمی برای توصیف سیستم خاک به عنوان یک محیط متخلخل به صورت دست‌نخورده وجود دارد (Crestana and Vaz, 1998). 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 درنظر 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 (Crestana and Vaz, 1998).

روش‌هایی نظیر نوترون رادیوگرافی و توموگرافی (Neutron Radiography or Tomography) و نیز استفاده از عکس‌برداری با اشعه ایکس (X-Ray Imaging) از جمله مواردی هستند (Menon et al., 2006 و Moradi et al., 2009) که می‌توان با استفاده از آن‌ها به بررسی درجا رشد و توسعه ریشه در خاک پرداخت که البته در حال حاضر در ایران، کاربرد این روش‌ها در مطالعات ریشه بسیار هزینه‌بر و نادر می‌باشد. در این بین استفاده از جعبه پایش ریشه یا همان ریزوترون (Rhizotron) 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 (Kuchenbuch and Ingram, 2002).

در این مورد کچاورزی و همکاران (۲۰۰۷) 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 ۲/۵×۲۵×۳۵ سانتی‌متری استفاده کردند که یک سمت آن را با استفاده از پلکسی گلاس 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 (Kechavarzi et al., 2007). بنابراین هدف اصلی این مقاله معرفی اجمالی این روش برای مطالعه درجای رشد ریشه در خاک می‌باشد که در ادامه با ارائه یک مطالعه در زمینه استفاده از جعبه پایش ریشه طراحی شده، نحوه استفاده از این روش نیز به اختصار توضیح داده شده است.

مواد و روش‌ها

توضیحاتی در مورد جعبه پایش ریشه

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 به ما 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 را مورد بررسی قرار دهیم (Kuchenbuch and Ingram, 2002). جعبه پایش ریشه در واقع نوعی جعبه جهت رشد گیاه می‌باشد که امکان مطالعه دو بعدی سیستم ریشه گیاه را امکان‌پذیر می‌نماید (Tsutsumi et al., 2003). 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 ۱ الی ۲/۵ سانتی‌متر درنظر 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 پلکسی‌گلاس 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. زاویه استفاده شده در مطالعات مختلف متفاوت بوده است؛ این زاویه از ۳۵ تا ۹۰ درجه و بسته به نوع مطالعه مورد استفاده متفاوت گزارش شده است (Schwartz et al., 1999 و Tsutsumi et al., 2003). 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 اعمال این زاویه و قرار دادن جعبه‌های پایش 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 ریشه‌ها قسمت جلویی جعبه پایش ریشه باید با استفاده از پلاستیک مشکی یا ورقه نازک آلومینیومی پوشانده شود.

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) در مطالعه خود از یک جعبه پایش ریشه با ابعاد ۲×۳۰×۳۰ 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. (Tsutsumi et al., 2003).

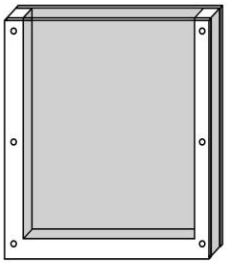
ساخت جعبه پایش ریشه

شکل ۱ شمایی کلی از جعبه پایش ریشه که در این مطالعه طراحی و استفاده شد 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.

این جعبه دارای دو بخش اصلی بود که قسمت جلویی آن توسط 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.

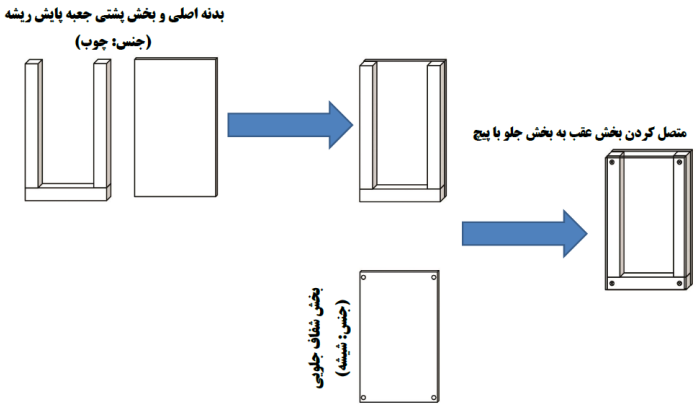
ابعاد (میلی‌متر)

	طول	عرض	ضخامت
بیرونی	۳۲۰	۲۳۵	۲۳
داخلی	۳۱۰	۲۰۵	۱۵



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

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.



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

اجرای آزمایش

به منظور بررسی نحوه استفاده از این جعبه پایش ریشه، آزمایشی طراحی و اجراء شد. هدف اصلی این آزمایش بررسی تاثیر تلقیح گیاه ذرت با قارچ *Piriformospora indica* بر رشد و توسعه ریشه این گیاه در خاک بود.

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.

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

مایه تلقیح قارچ *P. indica* در آزمایشگاه بیولوژی خاک دانشگاه صنعتی اصفهان آماده شد و به منظور تلقیح اسپورها به بذور جوانه‌دار شده از مخلوط ۲×۱۰^{۶} اسپور در میلی‌لیتر قارچ استفاده شد. در این مطالعه از بذور ذرت (*Zea Mays* L.) رقم سینگل کراس ۷۰۴ استفاده گردید. به منظور اجرای این آزمایش از یک خاک با بافت شن لومی (Loamy sand) که از اطراف پالایشگاه شهید هاشمی‌نژاد خانگیران (سرخس) جمع‌آوری شده بود استفاده شد. خاک آلوده نیز از محلی نزدیک به همین منطقه و در محیطی آلوده به مواد نفتی برداشته شد. همچنین به منظور جلوگیری از اثرات ناخواسته سایر میکروارگانیسم‌های موجود، خاک مورد نظر دو مرتبه و هر بار به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس با استفاده از اتوکلاو استریل شد. برخی از ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی این خاک‌ها در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱- برخی از ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک مورد مطالعه

ویژگی	بافت خاک	pH	EC	کربن آلی	ازت کل	فسفر	CEC	TPH
واحد	---	---	dS m^{-1}	٪	mg kg^{-1}	mg kg^{-1}	cmol+ kg-1	mg g-1
خاک غیر آلوده	شن لومی	۷/۲	۱/۲۸	۰/۶۷	۱۳۵	۳۱/۲	۳۲/۹	**N.D.**
خاک آلوده	شن لومی	۷/۴	۱/۲۵	۲/۹۵	۲۰۰	۱۱/۰۳	۹/۲	۲۱/۶

پایش ریشه و آنالیز تصاویر بدست آمده

در طول دوره آزمایش ریشه‌های ظاهر شده در قسمت جلویی جعبه پایش ریشه با استفاده از ماژیک ریز بر روی ورق‌های استاتی شفاف ثبت شد. تصاویر رسم شده بر روی این ورق‌ها با استفاده از اسکنر به صورت Grayscale (8-Bit) و با کیفیت چاپ 300dpi اسکن شدند و برای مرحله بعدی جهت رسم ریشه از همان ورق‌های 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 شدند و جهت آنالیز مورد استفاده قرار گرفت (به ترتیب ۱۲، ۱۶، ۲۲، ۲۶، ۳۳ و ۴۵ روز بعد از شروع مطالعه).

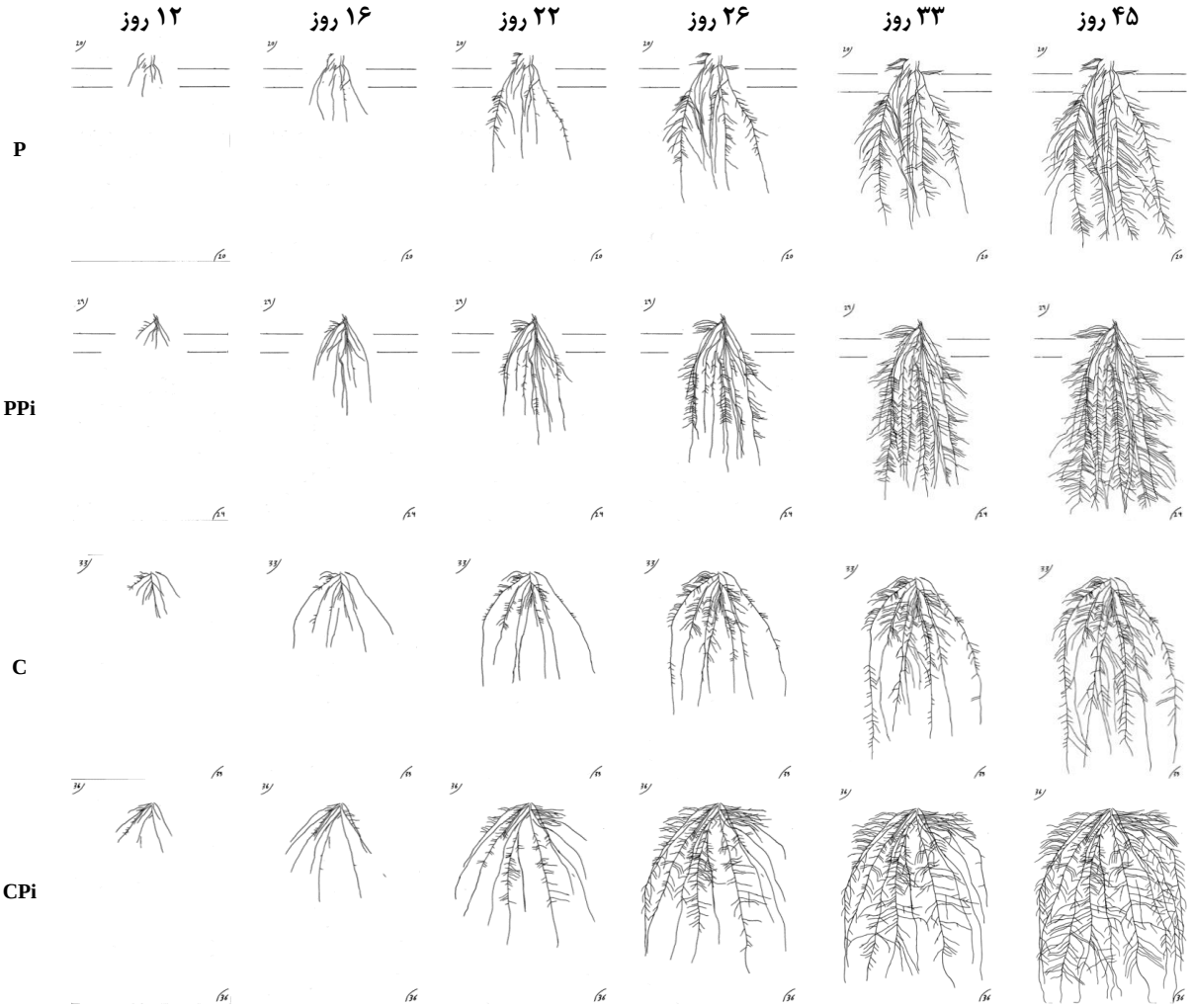
در آنالیز تصاویر بدست آمده بعد از اسکن، می‌توان از نرم‌افزاهایی که توانایی آنالیز تصاویر ریشه را دارند نظیر WinRhizo، EzRhizo، Rootedge، DART، ImageJ، GiaRoot و نیز نرم‌افزای مانند MATLAB استفاده کرد. در این مطالعه تصاویر بدست آمده از ریشه‌ها در هر جعبه و در هر دوره از آزمایش را درون نرم‌افزار ImageJ وارد کرده و از پلاگین SmartRoot برای بررسی طول کل ریشه‌ها، عمق توسعه ریشه‌ها و نیز تعداد نوک ریشه‌های گیاه استفاده شد. 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 دارد و در این زمینه دقت کافی به ویژه برای پارامترهای مربوط به یک بعد را دارا می‌باشد (Lobet et al., 2011).

در پایان آزمایش، تاثیر تلقیح ذرت با قارچ *P. indica* و حضور لایه آلوده در مسیر ریشه بر رشد طولی، توسعه عمقی و تعداد نوک ریشه‌ها و عملکرد اندام هوایی و ریشه گیاه با استفاده از نرم‌افزار SAS در قالب طرح کاملاً تصادفی و به صورت آزمون فاکتوریل مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت و میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد با یکدیگر مقایسه شدند.

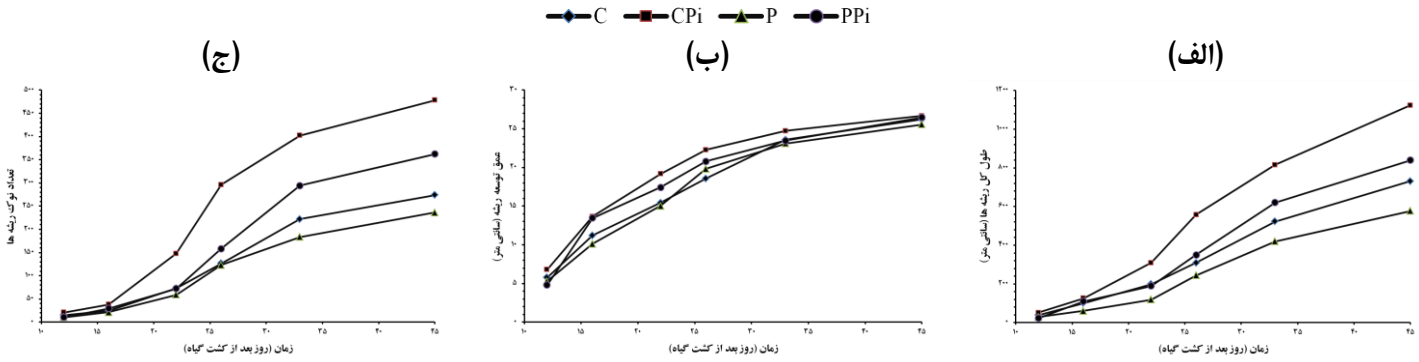
نتایج و بحث

شکل ۴ توزیع دو بعدی ریشه‌های ذرت در تیمارهای مورد مطالعه در طول دوره آزمایش را نشان می‌دهد. نتایج نشان داد که به خوبی می‌توان از جعبه پایش ریشه برای بررسی رشد و توسعه ریشه‌ها استفاده کرد. 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 ریشه‌ای بیشتری نسبت به گیاهان بدون اندوفایت 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.



شکل ۴ – توزیع دو بعدی ریشه‌های ذرت در تیمارهای مورد مطالعه در زمان‌های مختلف (C: تیمار غیرآلوده و بدون اندوفایت؛ CPi: تیمار غیرآلوده با اندوفایت؛ P: تیمار آلوده و بدون اندوفایت؛ PPi: تیمار آلوده با اندوفایت)



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

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 پارامتر و نیز تعداد نوک ریشه‌ها (Root Tips) در ۶ زمان مختلف در طول دوره رشد گیاه مورد ارزیابی قرار گرفت و در شکل ۵ نتایج این بخش آورده شده است. نتایج این بخش استفاده از جعبه پایش ریشه به خوبی تاثیر حضور لایه آلود به مواد نفتی را بر کاهش طول کل ریشه‌ها و نیز تاثیر مثبت تلقیح گیاه با قارچ اندوفیت مورد مطالعه بر افزایش رشد گیاه را نشان می‌دهد.

منابع

Crestana S., and Vaz C.M.P. 1998. Non-invasive instrumentation opportunities for characterizing soil porous systems. Soil and Tillage Research, 47: 19–26.

Kechavarzi C., Pettersson K., et al. 2007. Root establishment of perennial ryegrass (L. perenne) in diesel contaminated subsurface soil layers. Environmental Pollution, 145: 68–74.

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. J. Plant Nutr. Soil Sci., 165: 573–581.

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.

Menon M., Robinson B., et al. 2006. Visualization of root growth in heterogeneously contaminated soil using neutron radiography. European Journal of Soil Science, European Journal of Soil Science, 58: 802–808.

Moradi A.B., Conesa H.M., et al. 2009. Neutron radiography as a tool for revealing root development in soil: capabilities and limitations. Plant Soil, 318: 243–255.

Pierret A. 2008. Multi-spectral imaging of rhizobox systems: new perspectives for the observation and discrimination of rhizosphere components. Plant Soil, 310: 263–268.

Schwartz C., Morel J.L., et al. 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.

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. J. Plant Growth Regul., 21:441–458.

Introduce the rhizotron as an instrument for in situ assessment of root growth and distribution in soil

J. Zamani[1], M. A. Hajabbasi[2]
1- Assistant Professor of Soil Science, University of Jiroft 2- Professor of Soil Science Isfahan University of Technology

Abstract

In order to bring rhizotron forward as a method for in situ assessment of growth, establishment and distribution of plant roots, a greenhouse experiment was performed. The effect of *Piriformospora indica* and a soil petroleum polluted layer on the growth and distribution of maize (*Zea mays* L.) roots was studied. The results well showed that the mentioned rhizotron was an appropriate tool for study and monitoring and root length, root depth and number of root tips could be monitored by this method. The results also showed that the presence of petroleum pollution in the soil significantly decreased the growth and distribution of roots but inoculated plants had more root length and root depth than uninoculated plants. The number of root tips were significantly increased in the inoculated plants as compared with uninoculated ones.

Keywords: Rhizotron, *P. indica*, Phytoremediation, ImageJ, SmartRoot