وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات خاک و آب کشور

روش‌های مقدماتی بررسی قارچ‌های میکوریز آربسکولار

نگارندگان

فرهاد رجالی، عضو هیات علمی موسسه تحقیقات خاک و آب کشور

فهیمه فضلی خانی، کارشناس موسسه تحقیقات خاک و آب کشور

نشریه فنی: 642

1402

مشخصات اثر

عنوان: روش‌های مقدماتی بررسی قارچ‌های میکوریز آربسکولار

نگارندگان: فرهاد رجالی و فهیمه فضلی خانی

ناشر: موسسه تحقیقات خاک و آب کشور

کارشناس انتشارات: سمانه پورمنصور

ویراستار ادبی: زهرا محمدی

طراح جلد: راضیه محمدی

سال انتشار: 1402

حق چاپ برای ناشر محفوظ است.

این اثر با شماره 64772 در تاریخ 1402/11/7 در مرکز اطلاعات و مدارک علمی کشاورزی به ثبت رسیده است.

نقل مطالب با ذکر منبع بلامانع است.

نشانی: کرج، میدان استاندارد، جاده مشکین‌دشت، بلوار امام خمینی (ره)، موسسه تحقیقات خاک و آب کشور

کد پستی: 3177993545 **صندوق پستی:** 311-31785

نمابر : 02636210121 **تلفن:** 026 -36201900

وب‌سایت: http://www.swri.ir **پست الکترونیکی:** info@swri.ir

مسئولیت صحت مطالب به عهده نگارندگان است.

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

1- مفاهیم، اصطلاحات و تعاریف 1
1-1- انواع روابط همزیستی میکوریزی 1
1-1-1- آربسکولار مایکورایزا 2
2-1- مکانیسم فعالیت قارچ‌های میکوریزی 3
2- نمونه‌برداری و روش بررسی نمونه‌های دارای قارچ‌های میکوریز آربسکولار 4
1-2- روش نمونه‌برداری 4
1-1-2- ابزارهای استفاده شده در نمونه‌برداری 5
2-1-2- الگو نمونه‌برداری 5
3-1-2- تعداد نمونه 6
4-1-2- بسته‌بندی و انتقال به آزمایشگاه 6
2-2- آماده‌سازی و نگه‌داری نمونه 7
1-2-2- آماده‌سازی نمونه 7
2-2-2- نگه‌داری نمونه 7
3-2- روش نمونه‌برداری به منظور بررسی قارچ‌های میکوریز آربسکولار 8
3- روش‌های بررسی و مطالعه اسپور قارچ‌های میکوریز آربسکولار 9
1-3- فرآیند استخراج اسپور 10
1-1-3- روش مبتنی بر الک تر با استفاده از دستگاه شیکر الک 11
2-1-3- روش شیب ساکارز 15
2-3- جداسازی اسپور قارچ‌های میکوریز آربسکولار 17
3-3- شمارش اسپورهای قارچ میکوریز آربسکولار 18
1-3-3- روش متداول شمارش اسپور قارچ‌های میکوریز آربسکولار 18
4-3- کشت تک اسپور 20
5-3- تهیه اسلاید دائمی از اسپورها 23
1-5-3- تهیه محلول PVLG 23

3-5-2- تهیه معرف ملزر 24
3-5-3- تهیه اسلاید دائمی 25
3-6- نگه‌داری طولانی مدت اسپور قارچ AM (نگه‌داری نمونه شاهد)..... 27
3-6-1- استفاده از محلول سدیم آزید 27
3-7- نگه داری کوتاه مدت اسپورها..... 28
3-8- ضدعفونی سطحی اسپور قارچ میکوریز آربسکولار 28
4- بررسی همزیستی میان قارچ میکوریز آربسکولار و گیاه میزبان..... 30
4-1- الزامات و روش‌های گلخانه‌ای مورد نیاز برای رشد گیاه میزبان..... 30
4-1-1- ضدعفونی سطحی بذر..... 30
4-1-2- کشت گلخانه‌ای..... 32
4-2- روش تهیه و نگه‌داری نمونه ریشه به منظور رنگ آمیزی 34
4-2-1- نمونه‌گیری از ریشه..... 34
4-2-2- تثبیت و نگه‌داری نمونه ریشه 35
4-3- رنگ‌آمیزی ریشه..... 37
4-3-1- رنگ آمیزی به روش فیلیپس و هایمن (1970) 37
4-4- تهیه اسلاید از نمونه‌های ریشه 41
4-5- اندازه‌گیری درصد کلنیزاسیون ریشه 43
4-5-1- اندازه‌گیری درصد کلنیزاسیون ریشه به روش خطوط شبکه متقاطع 43
4-6- شمارش اندام فعال 46
4-6-1- روش محتمل‌ترین تعداد (MPN)..... 46
5- روش‌های تکثیر قارچ‌های میکوریز آربسکولار 51
5-1-1- کشت تله گلدانی به منظور ازدیاد اسپورهای موجود در نمونه خاک اولیه52
6- منابع 55

مقدمه

یکی از شاخه‌های تحقیقاتی در بخش تحقیقات بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک بررسی و مطالعه پیرامون گسترده‌ترین نوع رابطه همزیستی شناخته شده در جهان طبیعت یعنی همزیستی بین طیف وسیعی از گیاهان از خانواده‌های مختلف با قارچ‌های میکروسکوپی ویژه‌ای بنام قارچ‌های میکوریز آربسکولار می‌باشد. دراین دستورالعمل سعی گردیده رایج‌ترین و مهم‌ترین روش‌های بررسی قارچ‌های میکوریز آربسکولار به همراه تجارب اخذ شده توسط همکاران محترم بخش تحقیقات بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک به صورت مجموعه‌ای مدون در اختیار پژوهشگران و دانشجویان علاقمند به این قارچ‌های میکروسکوپی مفید خاکزی قرار گیرد.

با توجه به ماهیت همزیست اجباری بودن قارچ‌های میکوریز آربسکولار و اینکه ارتباط تنگاتنگی با سیستم ریشه‌ای گیاهان دارند و از طرف دیگر بخش عمده‌ای از روش‌های آزمون بکار گرفته شده در ارتباط با این نوع از قارچ‌های خاکزی مبتنی بر مشاهده میکروسکوپی و تشخیص اندام قارچ در خاک و بافت ریشه گیاه میزبان است لذا در ابتدای این مجموعه به شرح مختصری از چرخه زندگی و اندام این قارچ ها در مراحل مختلف رشدی پرداخته و با ارائه تصاویری سعی شده به تشخیص صحیح مشاهدات میکروسکوپی پژوهشگران این قارچ‌های مفید کمک گردد.

مجموعه حاضر می‌تواند مورد استفاده اعضای هیات علمی، محققین و دانشجویان علاقمند به کار با قارچ‌های میکوریز آربسکولار بویژه در رشته‌های کشاورزی، زیست شناسی، محیط زیست، جنگل و مرتع، شرکت‌های خصوصی تولید کننده نهاده‌های زیستی بویژه انواع حاوی قارچ‌های میکوریز آربسکولار و دیگر علاقه‌مندان بررسی این ریزجانداران مفید خاکزی قرار گیرد.

با وجود تلاش‌های صورت گرفته، این مجموعه ممکن است دارای نواقصی باشد که از همه خوانندگان محترم تقاضا می‌شود با ارسال نظرات سازنده خود مؤلفین را در هرچه پربارتر شدن آن در چاپ‌های بعدی مورد لطف خود قرار دهند.

1- مفاهیم، اصطلاحات و تعاریف

کلمه میکوریزا از دو بخش "Myco" به معنای قارچ و "Rhizae" به معنی ریشه تشکیل شده است و به نوعی رابطه همزیستی بین برخی قارچ‌های خاکزی با ریشه گیاهان اشاره دارد. اولین گونه‌های شناخته شده از گیاهان همزیست با قارچ‌های میکورایزا مربوط به دوران دونین (چهارصد میلیون سال قبل) تقریباً همزمان با پیدایش اولین گونه‌های گیاهی خشکی‌زی می‌باشد. در این همزیستی، گیاه ترکیبات کربنه مورد نیاز قارچ را تامین می‌کند و در مقابل، قارچ جذب آب و عناصر معدنی موردنیاز گیاه را تسهیل می‌نماید. این قارچها حدود 5 تا 50 درصد از توده زنده میکروبی خاک را به خود اختصاص داده و هیف‌های درونی تشکیل‌دهنده حدود 3 درصد از وزن ریشه گیاه می‌باشند، به‌طوری که دربرخی موارد در هر سانتی‌متر از طول ریشه تقریباً 10 تا 100 متر میسلیوم قارچ حضور دارد. کلاف‌های درهم تنیده هیف درون سلول‌های گیاه میزبان با بوجود آوردن اندامی به نام آربسکول سطح گسترده‌ای را جهت تبادل عناصر غذایی ایجاد کرده و همچنین انشعابات گسترده هیف‌ها در خاک به‌ویژه در ناحیه ریزوسفری سطح وسیعی را به منظور جذب آب و عناصر غذایی از خاک مهیا کرده است (He and Nara 2007; Cardoso and Kuyper 2006; Wang and Qiu 2006).

1-1- انواع روابط همزیستی میکوریزی

پروفسور فرانک (شکل 1-1) در سال 1885 به دنبال شناسایی رابطه همزیستی میکوریزی، آن را به دو گروه میکوریز خارجی[1] و میکوریز داخلی[2] تقسیم‌بندی کرد. با شناسایی هر چه بیشتر ساختمان‌های موجود در این نوع همزیستی، هارلی و اسمیت در سال 1983 روابط همزیستی میکوریزی را به هفت نوع مختلف تقسیم‌بندی کردند که عبارتند از اکتومایکورایزا[3]، اکتندومایکورایزا[4]، اربتوئیدمایکورایزا[5]، اریکوئیدمایکورایزا[6]، مونوتروپوئیدمایکورایزا[7]، ارکیدمایکورایزا[8] و آربسکولار مایکورایزا[9].

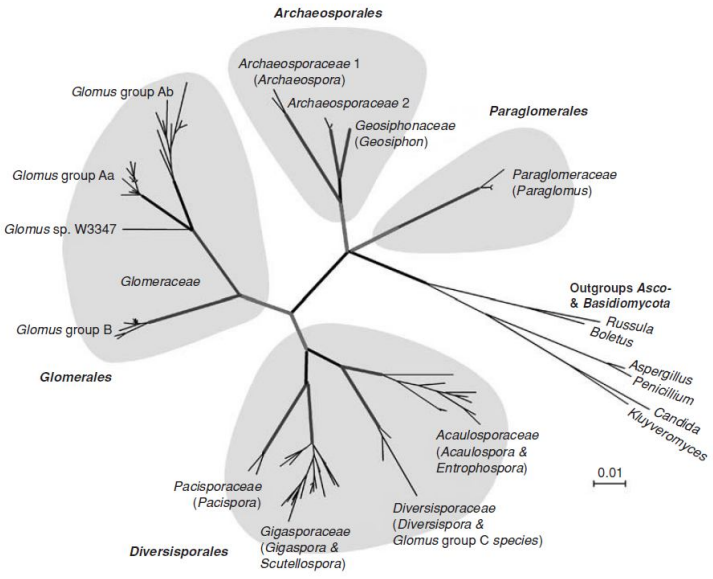
[1]- Ectotrophic
[2]- Endotrophic
[3]- Ectomycorrhiza
[4]- Ectendomycorrhiza
[5]- Arbutoidmycorrhiza
[6]- Ericoidmycorrhiza
[7]- Monotropoidmycorrhiza
[8]- Orchidmycorrhiza
[9]- Arbuscularmycorrhiza

شکل 1-1- پروفسور فرانک 1885

1-1-1- آربسکولار مایکورایزا

رایج‌ترین نوع همزیستی میکوریزی که تقریباً در تمامی جوامع گیاهی از عرصه منابع طبیعی تا اراضی کشاورزی حضوری چشمگیر دارد، رابطه میکوریز نوع آربسکولار است. این نوع همزیستی، بین ریشه گیاهان بازدانه، نهاندانه، سرخس‌ها، خزه‌ها و قارچ‌های میکوریزی متعلق به کلاس Glomeromycetes به وجود می‌آید (شکل 1-2). در بین نهاندانگان تعدادی از خانواده‌ها از جمله تاج‌خروسیان[1]،کلمیان[2]، سلمه ترگان[3] و یوغ برگیان[4] فاقد این نوع همزیستی هستند. بقیه خانواده‌های گیاهی و به خصوص آن‌هایی که دارای ارزش اقتصادی برای انسان هستند همگی از میزبان‌های این قارچ‌ها می‌باشند. قارچ‌های میکوریز آربسکولار از نوع بیوتروف‌های اجباری، یعنی انواعی که فقط در حضور گیاه میزبان مناسب توانا به اسپورزایی و تکمیل چرخه زندگی خود هستند قرار می گیرند. در حالی که وابستگی گیاه میزبان به این قارچ‌ها باتوجه به نوع گونه گیاه به دو صورت اختیاری و اجباری است. بر طبق شواهد دیرینه شناسی از عوامل اصلی استقرار گیاهان بر روی خشکی‌ها برقراری این نوع رابطه همزیستی میکوریزی بوده است و بدین دلیل این قارچ ها تأثیر زیادی بر چگونگی تکامل سیستم ریشه‌ای گیاهان داشته‌اند.

[1]- Amaranthaceae
[2]- Brassicaceae
[3]-Chenopodiaceae
[4]- Zygophyllaceae



شکل 1-2- طبقه بندی قارچ‌های میکوریز نوع آربسکولار متعلق به کلاس Glomeromycetes

1-2- مکانیسم فعالیت قارچ‌های میکوریزی

به‌طور کلی رابطه همزیستی ایجاد شده توسط قارچ های مایکورایزا آثار ویژه‌ای بر کیفیت شیمیایی، فیزیکی و بیولوژیک خاک و درنتیجه رشد گیاه میزبان دارد و حتی به طور غیرمستقیم بر تغذیه انسان نیز مؤثر است. در ذیل به برخی از این پیامدها اشاره شده است:

1. افزایش جذب کل عناصر غذایی در گیاه میزبان شامل عناصری همچون فسفر، نیتروژن، پتاسیم، بور، کلر، مس، کروم، سزیم، کبالت، آهن، مولیبدون، نیکل، سیلیسیوم و روی و در برخی موارد منگنز.
2. تسهیل انتقال آب وعناصر غذایی به گیاهان از طریق شبکه میسلیومی.
3. ایجاد مقاومت نسبت به قارچها و نماتدهای بیمارگر گیاهی، کاهش آثار منفی تنش‌های محیطی مثل خشکی، شوری، تراکم خاک و سمیت فلزات سنگین.
4. تعامل مثبت با تثبیت کننده‌های نیتروژن، حل‌کننده‌های فسفات و باکتری‌های محرک رشد گیاه.

5. بهبود بخشیدن به ساختمان خاک و کاهش فرسایش از راه به دام انداختن ذرات خاک توسط شبکه میسلیومی قارچ های میکوریزی، سنتزگلومالین (چسب طبیعی) و تشکیل خاکدانه‌های مقاوم به فرسایش آبی و بادی.

6. گیاه پالایی آلومینیوم، آرسنیک، کادمیم و جیوه، افزایش استقرار گیاهچه‌ها در خاک، تأثیر بر ترکیب گونه‌ای گیاهان، توالی و تنوع زیستی گیاهان و نیز استفاده جانوران خاک‌زی از اسپور و میسلیوم‌های قارچ به‌عنوان یک منبع غذایی.

2- نمونه‌برداری و روش‌بررسی نمونه‌های دارای قارچ‌های میکوریز آربسکولار

نمونه‌برداری، مرحله مهم در بررسی قارچ‌های میکوریزی محسوب می‌شود و بایستی علاوه بر دارا بودن دقت کافی، تعداد نمونه‌ها نیز مناسب و متناسب با آزمون های آزمایشگاهی باشند. آگاهی از شرایط مؤثر بر توزیع ساختار قارچ‌های میکوریزی در خاک به انجام یک نمونه‌برداری کارامد و موفق کمک می‌کند. توجه به نوع پوشش گیاهی در انتخاب مکان‌های نمونه‌برداری برای بررسی قارچ‌های میکوریز آربسکولار از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. چرا که برخی از گیاهان میزبان این نوع از قارچ‌ها نبوده و لذا وجود این ریزجانداران در ریزوسفر این گیاهان با احتمال کمتری امکان پذیر است. بلعکس برخی از گیاهان همزیستی خوبی با این نوع از قارچ‌ها داشته و ریزوسفر آن‌ها دارای جمعیت زیادی از قارچ‌های میکوریز آربسکولار خواهد بود. با توجه به اینکه در اینجا هدف بررسی جامعه قارچ‌های میکوریز آربسکولار و فعالیت آن‌ها است بایستی نکات خاصی در مراحل نمونه‌برداری مورد توجه قرار گیرد از جمله این موارد می‌توان به نوع پوشش گیاهی، شرایط منطقه، عمق نمونه‌برداری، نوع کاربری محل، رطوبت خاک، زمان نمونه‌برداری و نوع هدف و جامعه مورد بررسی اشاره نمود.

2-1- روش نمونه‌برداری

پس از تعیین هدف و توجه به موارد ذکر شده و تعیین نقاط نمونه برداری، لازم است تا نمونه‌برداری به شیوه‌ای صحیح صورت گیرد تا نمونه‌ها به خوبی نمایانگر خصوصیات جامعه مورد نظر باشند. در ذیل به مواردی از قبیل: ابزارهای مورد استفاده در نمونه برداری، الگوی

نمونه‌برداری، تعداد نمونه و نکات مربوط به بسته بندی و انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه، پرداخته شده است.

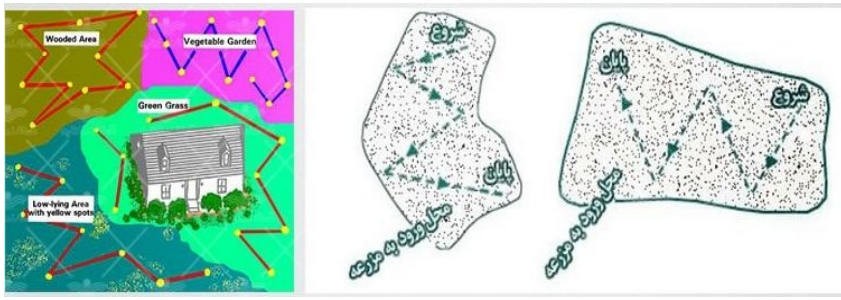
2-1-1- ابزارهای استفاده شده در نمونه‌برداری

وسایلی که برای نمونه برداری از خاک مورد استفاده قرار می‌گیرند عبارتند از: بیل و بیلچه، اوگر مته‌ای، اوگر توخالی. "بیل" و "بیلچه "راحت ترین و سریع ترین وسیله نمونه برداری از خاک است (شکل 2-1). بایستی بخاطر داشت که وسائل نمونه‌برداری به شکل قابل قبولی تمیز باشد که مانع آلودگی در نمونه برداری های متوالی گردد.

شکل 2-1- سمت راست: نمونه برداری به وسیله اوگر، سمت چپ: نمونه برداری به وسیله بیلچه

2-1-2- الگو نمونه‌برداری

در اکثرمطالعات مربوط به بررسی تنوع و جمعیت قارچ‌های میکوریزی بهتر است از نمونه برداری مرکب استفاده شود. در صورت وجود غیریکنواختی در محل نمونه‌برداری می‌بایست با گرفتن نمونه‌های زیاد و نزدیک به هم یک نمونه متوسط و معرف آن قسمت را بدست آورد. به‌عنوان یک قاعده کلی مزارعی که وسعت کمی داشته باشند را به‌عنوان یک واحد نمونه‌برداری می‌توان محسوب کرد. مزارع بزرگ و مزارعی که از یکنواختی برخوردار نیستند باید به قطعات کوچکتر یک‌دست تقسیم و از هر قسمت جداگانه نمونه‌برداری صورت گیرد. در مواردی که هدف بررسی کود زیستی و یا مایه تلقیح قارچ های میکوریز مد نظر باشد (جامعه مورد بررسی کوچک و یکنواخت باشد) می‌توان از نمونه‌برداری ساده استفاده کرد (شکل 2-2).



شکل 2-2- الگو نمونه‌برداری در منطقه مورد مطالعه

در اراضی باغی، محل برداشت نمونه ها بایستی از محیط اطراف ریشه و از منطقه‌ای در زیر تاج درخت و در انتهای ناحیه سایه انداز که محل رشد ریشه های تازه تشکیل شده است گرفته شود. قابل توجه است که خاک بین ردیف درختان وضعیت متفاوتی از خاک زیر درخت دارد. خاک نمونه‌برداری شده نمی‌بایست حاوی برگ و ساقه گیاهان باشد.

2-1-3- تعداد نمونه

به طور کلی پارامترهایی نظیر مساحت منطقه مورد مطالعه، میزان یکنواختی منطقه و هدف آزمایش عوامل تعیین کننده در تعداد نمونه می‌باشند. به عنوان مثال برای بررسی تنوع قارچ‌های میکوریزی موجود در منطقه یکنواختی به وسعت یک هکتار با پوشش گیاهی یکسان، کمینه 10 نمونه مورد نیاز است.

2-1-4- بسته بندی و انتقال به آزمایشگاه

یک نمونه خاک مناسب بایستی حداقل 500 گرم وزن داشته باشد. نمونه‌ها بایستی داخل یک پاکت پلاستیکی ریخته شود و خود داخل پاکت دیگری قرار گیرد . اطلاعات هر نمونه را بایستی به گونه ای روی پاکت نوشت که پاک نشده و در آزمایشگاه اطلاعات خوانا باشد. اطلاعات بایستی شامل مختصات محل نمونه‌برداری، نام نمونه‌بردار، تاریخ نمونه برداری، نوع کاربری و نوع پوشش گیاهی محل باشد.

2-2- آماده‌سازی و نگه‌داری نمونه

2-2-1- آماده سازی نمونه

پس از انتقال نمونه‌های تهیه شده به آزمایشگاه، هواخشک کردن خاک، مقبول‌ترین روش نگه‌داری آن است، چرا که در این صورت میزان واکنش‌های احتمالی درون خاک کاهش می‌یابد. جهت تسریع در فرآیند خشک شدن خاک، کلوخه‌ها بایستی توسط چکش پلاستیکی کوبیده شوند. همچنین می‌توان از جریان هوا استفاده کرد اما نباید جریان هوا دارای آلودگی و گرما باشد. لازم به ذکر است فرایند هوا خشک شدن نباید در دمای بالا (بالاتر از 35 درجه سانتی گراد) انجام شود. بعد از هواخشک شدن کل محتوای آن از الک 2 میلی‌متر عبور داده می‌شود (شکل 2-3).

شکل 2-3- سمت راست: عبور دادن محتوای نمونه خاک از الک 2 میلی‌متری، سمت چپ: نمونه خاک‌های هواخشک، کوبیده و الک شده

2-2-2- نگه‌داری نمونه

نمونه‌های هواخشک و الک شده بایستی درون ظروف دربسته نگهداری گردند. ظروف بایستی تمیز بوده و از موادی تشکیل شده باشد که نمونه را آلوده نکند. ظروف پلاستیکی برای این منظور مناسب هستند. دمای مناسب برای نگه‌داری نمونه ها 4 درجه سانتی‌گراد است(Carter 1993). روی ظروف مربوطه بایستی اطلاعات نمونه خاک به طور خلاصه ذکر گردد (شکل 2-4).

شکل 2-4- بالا سمت راست :برچسب مشخصات نمونه ، سمت چپ: سردخانه (محل قرارگیری نمونه‌های بسته بندی شده خاک، پایین: نمونه‌های خاک قرار داده شده در ظروف شیشه‌ای

2-3- روش نمونه‌برداری به منظور بررسی قارچ‌های میکوریز آربسکولار

با توجه به تمامی موارد ذکر شده در این قسمت روش اصلاح شده توسط Huising و همکاران ارائه شده است که می‌تواند برای خاک‌هایی با کاربری مختلف به منظور بررسی قارچ‌های میکوریز آربسکولار مورد استفاده قرار گیرد.

وسایل و تجهیزات

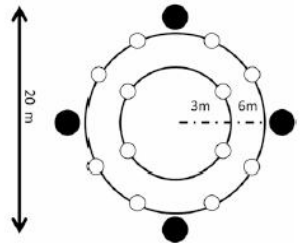
1. سیلندر نمونه‌برداری با قطر 5 سانتی‌متر و عمق 20 سانتی متر (190 میلی‌لیتری)
2. متر
3. کیسه پلاستیکی با گنجایش 2 لیتر
4. جعبه نگه‌دارنده یخ با گنجایش 57-36 لیتر

روش کار

1. در سطح ناحیه مورد نظر 3 تا 5 محدوده نمونه‌برداری انتخاب کنید.

2. در هر محدوده نمونه‌برداری، به طور تصادفی 5 تا 8 مکان نمونه‌برداری را مشخص کنید که هر کدام دارای کاربری مشابه و حداقل به فاصله 50 متر از یکدیگر قرار گرفته باشند.

3. دو دایره متحدالمرکز در شعاع 3 و 6 متری در هر نقطه نمونه‌برداری با مساحت کلی 114 متر مربع مشخص کنید. 4 نقطه بر روی محیط دایره‌ی با شعاع 3 متری و 8 نقطه بر روی محیط دایره‌ی با شعاع 6 متری مشخص کرده و با سیلندر نمونه‌برداری کنید.



4. خاک نمونه‌برداری شده از 12 نقطه نمونه‌برداری را با دست به آرامی خرد کرده و با نسبت مساوی با هم مخلوط کنید. دو نمونه 500 گرمی را به پلاستیک دارای برچسب مشخصات نمونه، منتقل کرده و تا زمان انجام آزمایش در دمای 4 درجه سانتی‌گراد نگه‌دارید.

نکات

1. به منظور نمونه‌برداری بایستی در صورت امکان تمامی تجهیزات و مواد مورد استفاده، استریل و یا ضدعفونی باشند تا احتمال آلودگی طی آزمایش کاهش یابد (Huising *et al*. 2012).

3- روش‌های بررسی و مطالعه اسپور قارچ‌های میکوریز آربسکولار

قارچ‌های میکوریزی همانند اغلب قارچ‌های دیگر، هنگامی که با کمبود عناصر غذایی و شرایط نامناسب محیطی روبه‌رو می‌شوند، اسپورزایی می‌کنند. زمان شروع اسپورزایی بستگی به گونه قارچ و شرایط محیطی دارد و به صورت مستقیم و غیر مستقیم تحت تأثیر وضعیت فیزیولوژیکی گیاه میزبان قرار می‌گیرد. این زمان معمولاً 3 الی 4 هفته پس از برقراری همزیستی میکوریزی و پس از اینکه زیست توده قارچ از یک حد آستانه‌ای بالاتر

رود، آغاز می‌شود. اسپور این قارچ‌ها معمولاً در خاک اطراف ریشه تشکیل شده و در تعدادی از گونه‌های متعلق به جنس Glomus علاوه بر این مکان، اسپورها درون بافت ریشه نیز تشکیل می‌شوند. نحوه تشکیل اسپور نیز از طریق آماس نوک هیف‌های انتهایی و یا نوک هیف‌های جانبی کوتاه صورت گرفته و قطر این اسپورها نیز عمدتا بین 20 تا 150 میکرون متغیر است. دیواره اسپورها ضخیم و معمولاً از بیش از یک لایه تشکیل شده است. محتویات داخلی اسپور شامل دانه‌های چربی، سیتوپلاسم و تعداد زیادی هسته است. گاهی تعداد زیادی اسپور توسط شبکه‌ای از هیف‌های قارچ و یا یک پوشش خارجی در کنار یکدیگر قرار می‌گیرند و ساختمانی را به وجود می‌آوند که به آن اسپورکارپ گفته می‌شود. اسپورها در چرخه زندگی قارچ‌های میکوریز آربسکولار سه وظیفه را بر عهده دارند که عبارتند از اندام ذخیره‌ای قارچ، شکل استراحتی قارچ و اندام موثر در برقراری رابطه همزیستی بین قارچ و گیاه میزبان. اسپور قارچ‌های میکوریز آربسکولار پس از جوانه‌زنی و رویش قدرت همزیست شدن با بافت گیاه میزبان را در طی زمانی محدود دارا می‌باشند.

اسپور به عنوان مهم‌ترین اندام رویشی قارچ‌های میکوریز آربسکولار محسوب شده و بیشترین تأثیر را بر گسترش و تکثیر آنها دارد. اغلب روش‌های مرسوم در زمینه مطالعه و شناخت قارچ‌های میکوریز آربسکولار بر پایه بررسی اسپور این نوع از قارچ‌ها بوده و تا کنون روش‌های بسیاری در راستای شناخت این اندام از قارچ‌های میکوریزی ارائه شده است. با استفاده از روش‌های ذکر شده در ابتدا اسپورها از بستر خاک استخراج شده و پس از انجام آزمایش‌های گوناگون، در گروه‌های مختلف دسته بندی و آزمایش‌های تکمیلی برای شناخت دقیق قارچ‌های میکوریز آربسکولار صورت می‌گیرد. لذا در این فصل به برخی از روش‌های متداول در این زمینه پرداخته خواهد شد.

3-1- فرآیند استخراج اسپور

اسخراج اسپور اولین مرحله در تمامی روش های بررسی مربوط به شناخت قارچ‌های میکوریز آربسکولار، به شمار رفته و به عنوان پایه و اساس در سایر مراحل مطرح می‌باشد. با توجه به اینکه اندازه اسپور این نوع از قارچ‌ها بین 10 تا 1000 میکرون است، اندازه بزرگتری نسبت به سایر ریزموجودات خاک‌زی دارند؛ لذا امکان مشاهده آن‌ها با بزرگنمایی‌های کمتری (حداقل X 40) ممکن است و جداسازی آن‌ها از خاک به جداسازی

موجوداتی همانند نماتدها شباهت دارد. در اغلب این روش‌ها از الک‌ها و فیلترهای بسیار ریز (به طور معمول 40 میکرون) به همراه جریان آب برای جداسازی اسپورها استفاده می‌شود. در برخی نیز با ایجاد اختلاف چگالی در محلول در برگیرنده اسپورها، میتوان آن‌ها را به حالت معلق درآورده و جداسازی نمود. در ادامه یکی از مهم‌ترین روش‌های مرسوم ارائه شده است.

3-1-1- روش مبتنی بر الک تر با استفاده از دستگاه شیکر الک

این روش، در آزمایشگاه برای جداسازی و شمارش اسپور قارچ‌های میکوریزی همگانی است. در این روش از دستگاه شیکر الک استفاده و دستگاه با استفاده از جریان آب و نیز تکان‌های پی در پی موجب شده تا محتویات سوسپانسیون خاک براساس اندازه ذرات، روی الک های مختلف قرار گیرند. ریزگان روش به قرار زیر است (Pacioni 1992; Gerdemann and Nicolson 1963; Tommerup 1992; Brundrett et al. 1996):

وسایل و تجهیزات

- دستگاه شیکر الک (شکل 3-1)
- الک‌هایی با سایز منافذ20، 40، 100،200 میکرون و نیز 2 میلی‌متر (درصورتی که سایز اسپور مورد نظر کوچکتر باشد بایستی از الکی با منافذ ریزتر استفاده نمود)
- بشر با گنجایش مناسب
- اسپاتول
- دستگاه شیکر آزمایشگاهی
- پیست

روش کار

1. با استفاده از الک 2 میلی‌متر نمونه مورد نظر را سرند کنید تا اندازه ذرات خاک به 1 تا 2 میلی‌متر کاهش یافته و سنگ‌ریزه‌ها و مواد آلی درشت حذف شوند (در صورت وجود کلوخه قبل از سرند نمونه، بایستی کلوخه‌ها با چکش پلاستیکی کوبیده شوند).
2. میزان مشخصی از نمونه مورد نظر مثلاً50 گرم (به نکته 1 مراجعه نمایید) را در نیم لیتر آب (تقریباً به میزان 5 برابر) سوسپانسیون کرده و به مدت حداقل 10 دقیقه تکان دهید (عمل تکان دادن می‌تواند به صورت دستی و یا به کمک دستگاه شیکر انجام شود) (شکل 3-1).

3. کم و بیش 10 ثانیه صبر کنید تا ذرات سنگین خاک کمی ته‌نشین شوند. سپس محلول رویی را روی درشت‌ترین الک به آرامی خالی کنید (به نکته 2 مراجعه نمایید).

4. برای اطمینان از استخراج تمامی اسپورهای موجود، مواد باقیمانده در ظرف اولیه را مجدداً سوسپانسیون نموده و مرحله 3 را تکرار نمایید.

5. درب دستگاه را بسته و میزان جریان آب ورودی را تنظیم کنید تا جریان متوسطی از آب به آرامی از الک‌ها عبور کند.

6. پیچ‌های دو سوی ستون الک‌ها را محکم کرده (محکم کردن بیش از اندازه موجب پرش درب دستگاه خواهد شد) و زمان دستگاه را روی 5 دقیقه و میزان لرزش متوسط را تنظیم کنید و دکمه "start" دستگاه را فعال کنید (بسته به نوع خاک میزان زمان تعیین شده می‌تواند کاهش یا افزایش یابد، هر چه خاک بافت ریزتری داشته باشد مدت زمان بیشتری برای شستشو لازم است) (به نکته 3 مراجعه نمایید).

7. بعد از اتمام کار دستگاه، الک مورد نظر را خارج کرده و تمام زوایای الک را با کمک پیست بشویید و محتویات الک را به پلیت شیشه‌ای منتقل کنید (به نکته 4 مراجعه نمایید).در صورتی که محتویات باقی مانده حاوی مقادیری از ذرات همراه بود، به منظور خالص‌سازی اسپورها می‌توان از روش شیب ساکارز استفاده نمود (به قسمت 3-1-2- مراجعه نمایید).

شکل 3-1- سمت راست: سوسپانسیون تهیه شده از نمونه خاک دارای قارچ میکوریز آربسکولار ، سمت چپ: دستگاه الک شیکر و چیدمان الک‌ها روی دستگاه

نکات

1. مقدار نمونه بایستی بین 10 تا 250 گرم انتخاب شود. در صورت استفاده از مقادیر بیشتر، امکان خطا بیشتر خواهد بود. همچنین مقادیر کمتر نیز ممکن است خصوصیات جامعه مورد

بررسی را به خوبی منعکس نکند. مقادیر بسیار کم همانند 10 گرم معمولاً برای شمارش اسپور در مایه تلقیح قارچ میکوریز آربسکولار که حاوی تعداد زیادی اسپور است، مورد استفاده قرار می‌گیرد.

2. شیوه قرارگیری سری الک‌ها روی دستگاه از کوچکترین الک در پایین تا درشت‌ترین الک در بالا بوده و تعداد الک‌ها بسته به نوع آزمایش متفاوت است، به طور معمول از الک 40 میکرون در پایین و الک 200 میکرون در بالا استفاده می‌شود. همچنین اندازه منافذ الک مورد استفاده به گونه قارچ مورد بررسی در نمونه بستگی دارد. در برخی موارد که جداسازی اسپورکارپ‌ها و یا برخی اسپورهای درشت مدنظر است، لازم است تا الک‌هایی با منافذ درشت‌تر مورد استفاده قرار گیرند.

3. این مرحله را می‌توان به صورت دستی و بدون استفاده از دستگاه شیکر الک نیز انجام داد. در ابتدا مجموعه الک‌های مورد نظر را قرار داده و حدود 10 ثانیه صبر کنید تا ذرات سنگین خاک کمی ته‌نشین شوند. سپس محلول رویی را روی درشت‌ترین الک به آرامی خالی کنید. برای اطمینان از استخراج تمامی اسپورهای موجود، مواد باقیمانده در ظرف اولیه را مجدداً سوسپانسیون نموده و روی درشت‌ترین الک خالی کنید. بقایای به جامانده روی الک‌ها را زیر جریان آب به خوبی شستشو دهید. تا همه ذرات کوچک خاک از آن عبور کند و جریان آب عبوری از الک تقریباً زلال شود (به منظور اطمینان از عدم وجود اسپورها در باقیمانده سوسپانسیون اولیه مرحله شستشو را با باقیمانده مواد مجدداً تکرار نمایید). بعد از اتمام شستشو محتویات باقی‌مانده روی الک های مورد نظر را به کمک پیست به پیلت‌های شیشه‌ای مربوطه منتقل کنید (شکل 3-2).

شکل 3-2- شیوه شستشوی سوسپانسیون حاوی اسپور روی الک (روش دستی)

4. معمولاً الک 40 میکرون یا ریزتر، حاوی اسپور بوده و شسته می‌شود. از الک‌های درشت‌تر به منظور جداسازی اسپورکارپ استفاده می‌شود.

5. به منظور اطمینان بیشتر لازم است تا مرحله استخراج با تکرار انجام شده و اسپورهای استخراج شده در هر تکرار از نظر تنوع و تعداد با یکدیگر مقایسه شوند. اگر تمامی مراحل به درستی انجام شده باشد، تعداد و تنوع مشابهی از اسپورها در هر نمونه وجود دارد. تکرار مجدد هر نمونه، به نوع خاک و یا مایه تلقیح و حجم نمونه مورد نظر بستگی دارد و به صورت آزمایشگاهی تعیین می‌شود.

اصلاحات

برخی اصلاحات منجر به نتایج بهتر در تهیه سوسپانسیون شده است که شامل:

1. نسبت بهینه آب به خاک برای تهیه سوسپانسیون 1:10 بوده، یعنی به ازای 100 میلی‌لیتر خاک، 1 لیتر آب استفاده شود.

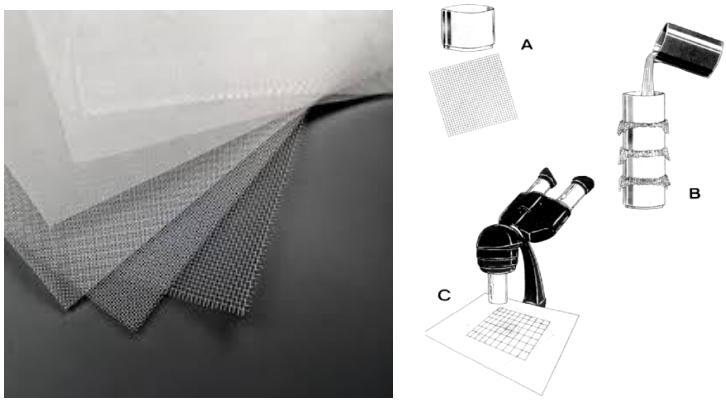
2. سوسپانسیون بایستی توسط مگنت و یا میله همزده شود، مگنت و یا همزنی که گرما ایجاد نکند مناسب تر است. مدت زمان همزدن بسته به ماهیت خاک دارد، ولی معمولاً 10 دقیقه کفایت می‌کند. در مواردی که خاک حاوی حجم زیادی از ذرات رس است، مدت زمان بیشتری نیاز است.

3. کف تشکیل شده روی محلول سوسپانسیون را دور کنید چرا که موجب نگه‌داری مواد زائد (اکثراً مواد آلی) در سطح می‌شود. به این منظور می‌توان از یک آنتی کف همانند توین 80 به میزان 0/1 تا 0/5 درصد استفاده کرد.

4. استفاده از محلول 0/1 مولار سدیم پیروفسفات موجب آزادسازی تعداد بیشتری از اسپورها در محلول سوسپانسیون خواهد شد؛ اما باید در نظر داشت که موجب آسیب به اسپورهای زنده خواهد شد. لذا در مواردی که هدف بررسی جامعه زنده اسپورهای موجود در نمونه است نباید استفاده شود.

5. برداشتن اسپور از الک‌های فلزی گاهاً سخت است. به خصوص هنگامی که مقدار خاک دارای اسپور کم بوده و تک اسپورها در مکان‌های دست نیافتنی (همانند حاشیه الک) قرار گرفته باشند، در این حالت بخشی از اسپورها از دست می‌روند. به این منظور، پاکیونی و رزا (1985) استفاده از فیلترهای نایلونی با مش استاندارد (از نوع مورد استفاده در گرده‌شناسی و

یا در کشت سلولی برای جداسازی پروتوپلاست) را پیشنهاد داده‌اند (Pacioni and Rosa 1985). این روش در شکل 3-3 نشان داده شده است:



شکل 3-3- فیلترهای نایلونی با مش استاندارد

این فیلترها در اندازه‌های 1 میلی‌لیتر تا 40 میکرون تهیه و بین آن‌ها لوله‌هایی با قطر 20 سانتی‌متر و ارتفاع 20 سانتی‌متر قرار گرفته‌اند. بعد از عبور سوسپانسیون و شستشو، فیلترها روی یک شیشه مدرج شفاف پهن و اسپورهای جداسازی شده با استفاده از استریومیکروسکوپ قابل مشاهده خواهند بود.

* موارد 3 و 4 به‌ندرت ضرورت پیدا می‌کنند.

در بیشتر مواقع در نمونه بدست آمده با روش یاد شده اسپور خالص وجود ندارد و دارای مقادیری از مواد همراه همانند ذرات ماده آلی و خاک است. برتری این روش در سریع بودن آن است اما معمولاً خالص سازی دیگری نیز مورد نیاز است، به‌ویژه اگر تعداد اسپور در خاک کم باشد. استفاده از روش زیر به تفکیک بیشتر و جداسازی حداکثری اسپورها کمک می‌کند:

3-1-2- روش شیب ساکارز

این روش در واقع در بر گیرنده روش‌های شیب چگالی و نیز سانتریفیوژ ساکارز است (شکل 3-4) که با اعمال اصلاحات و نیز بر اساس تجربه تغییر یافته و استفاده از آن در

آزمایشگاه بخش تحقیقات بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک موسسه تحقیقات خاک و آب رایج است (Ross and Harper 1970; Sieverding 1983; Ferrol and Lanfranco 2020):

وسایل و تجهیزات

- دستگاه سانتریفیوژ برای لوله‌های 50 میلی‌لیتری با توان g × 2000
- لوله‌های فالکون با گنجایش 50 میلی‌لیتر
- سرنگ پلاستیکی با گنجایش 50 میلی‌لیتر
- لوله پلاستیکی قابل انعطاف برای اتصال به سرنگ
- الک 40 میکرون یا ریزتر
- پیست
- پلیت شیشه‌ای
- بشر شیشه‌ای و پلاستیکی در اندازه مناسب

مواد و/ یا واکنش‌گرها

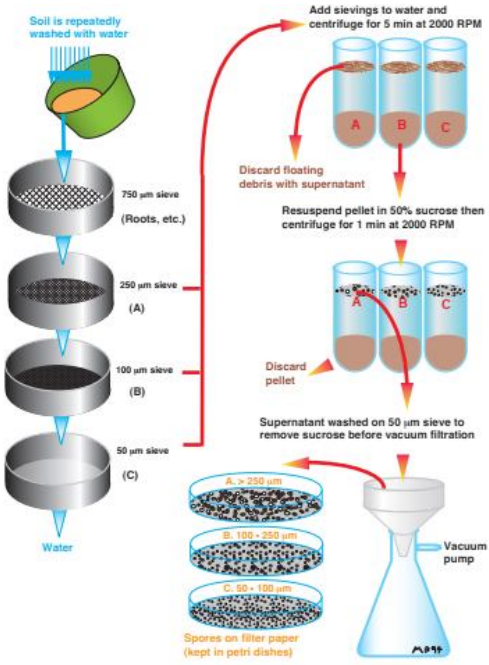
- محلول ساکارز 2 مولار (684.6 گرم از ساکارز را توسط آب مقطر به حجم یک لیتر برسانید)

روش‌کار

1. پس از شستشو، محتویات الک 40 میکرون را با کمک پیست آب به یک بشر 100 میلی‌لیتری منتقل کنید. سعی نموده بیشترین میزان نمونه را با کمترین میزان آب جمع‌آوری کنید.
2. مقداری از سوسپانسیون جمع‌آوری شده را به لوله‌های فالکون منتقل کرده (مقدار حدودی10 میلی‌لیتر در هر لوله) و آن را تا گنجایش 45 میلی‌لیتر با آب پر کنید.
3. لوله را به شدت تکان داده و اجازه دهید 5 دقیقه ثابت بماند.
4. به مدت 5 دقیقه با دور 500xg سانتریفیوژ کرده و سپس آب رویی را خالی کنید.
5. لوله را با ساکارز 2 مولار تا گنجایش 45 میلی‌لیتر پر کنید، تکان داده و اجازه دهید 1 دقیقه ثابت بماند.
6. سپس به مدت 5 دقیقه با دور 500xg سانتریفیوژ کنید.

7. مایع رویی را روی الک 40 میکرون به آرامی خالی کرده و با جریان آب بشویید تا ساکارز اضافی حذف شود.

8. توسط پیست محتویات باقی مانده (روی الک) را به یک پلیت منتقل کنید. لازم به ذکر است با توجه به فشار اسمزی محلول ساکارز، مراحل بالا را با سرعت بیشتر و بدون وقفه انجام دهید.



شکل 3-4- روش شیب ساکارز برای جداسازی اسپور قارچ‌های میکوریز آربسکولار

3-2- جداسازی اسپور قارچ‌های میکوریز آربسکولار

در برخی از آزمایشات مربوط به قارچ‌های میکوریز آربسکولار لازم است تا نخست تعداد مشخصی از اسپورهایی با ظاهر مشابه جداسازی و سپس بیشتر بررسی شوند. جداسازی این اسپورها معمولاً اولین مرحله از آزمایشات گوناگون در بررسی قارچ های میکوریزی به شمار می‌رود و همچنین می‌توان از آن‌ها برای شناسایی توسط روش‌های مولکولی و یا تکثیر، نیز استفاده نمود. به این منظور استفاده از روش زیر توصیه می‌شود.

وسایل و تجهیزات

1. استریومیکروسکوپ دارای منبع نور LED و با مراحل بزرگنمایی 6.3X، 10X، 16X، 25X و 40X
2. سمپلر با قدرت مکش 1 تا 10 میکرولیتر
3. تیپ کریستالی
4. شیشه ساعت با سایز متوسط
5. سرنگ انسولین

روش کار

1. از یک استریو میکروسکوپ برای جداسازی اسپورهای موجود در پلیت دارای محتویات حاصل از الک‌ها استفاده کنید.

2. اسپورهایی با ظاهر مشابه را توسط سمپلر با حداقل میزان آب از پلیت به شیشه ساعت‌های مجزا، منتقل نمایید. سعی کنید اسپورهای سالم و بدون مواد همراه را جدا کنید و در پایان جداسازی، تمامی ذرات زیاده را حذف نمایید. برای جابه‌جایی اسپورها در پلیت و یا شیشه ساعت از سوزن سرنگ انسولین استفاده نمایید (توجه کنید در هنگام استفاده از سرنگ، آسیبی به دیواره اسپور وارد نشود).

3. قبل از انجام آزمایش‌های ارزیابی کارایی و یا تکثیر، اسپورها را در طول شب در دمای 4 درجه سانتی‌گراد نگه‌داری کنید.

3-3- شمارش اسپورهای قارچ میکوریز آربسکولار

در برخی موارد لازم است که در ابتدا شمارش اسپورهای موجود در نمونه خاک و یا کود زیستی صورت گیرد. شمارش اسپور تقریباً در تمامی آزمایش‌های مربوط به قارچ‌های میکوریز آربسکولار انجام می‌شود تا اطلاعات اولیه از حضور قارچ‌های میکوریز آربسکولار به دست آید.

3-3-1- روش متداول شمارش اسپور قارچ‌های میکوریز آربسکولار

وسایل و تجهیزات

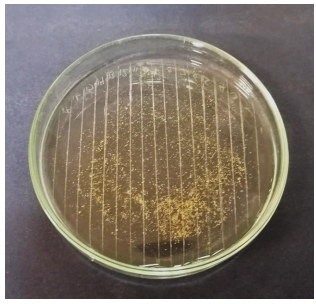
- استوانه مدرج با گنجایش 100 میلی‌لیتر

- میله همزن شیشه‌ای
- پیپت یک میلی‌لیتری
- پلیت مدرج (مخصوص شمارش)
- استریومیکروسکوپ

روش‌کار

1. سوسپانسیون دارای محتویات الک 40 میکرون (به نکته 1 مراجعه نمایید)، را از بشر شیشه‌ای به استوانه مدرج شیشه‌ای منتقل و مقدار سوسپانسیون را به طور دقیق اندازه‌گیری کنید.

2. سپس سوسپانسیون را با یک میله شیشه‌ای به خوبی هم زده و مقدار 1 میلی‌لیتر از آن را با پیپت برداشته و به پلیت شمارش اسپور انتقال دهید (به نکته 2 مراجعه نمایید) (شکل 3-5). کمی آب مقطر به پلیت بیافزایید تا مشاهده محتویات به آسانی انجام شود.



شکل 3-5- پلیت شمارش اسپور حاوی سوسپانسیون نمونه مورد نظر

3. با استفاده از استریومیکروسکوپ، تعداد اسپورهای سالم (از نظر ظاهری) را شمارش کنید (به نکته 3 مراجعه نمایید).

محاسبات

در پایان تعداد کل اسپورهای موجود در هر گرم نمونه از طریق رابطه زیر قابل محاسبه خواهد بود:

$$\text{تعداد کل اسپور در هر گرم نمونه} = \frac{\text{مقدار سوسپانسیون اولیه خاک} \times \text{تعداد اسپور شمارش شده در پلیت}}{\text{وزن خاک مایه اولیه}}$$

نکات

1. در هر شمارش می‌بایست مقدار نمونه اولیه (خاک و یا مایه تلقیح) به طور دقیق اندازه‌گیری شود.

2. این پلیت دارای خطوط موازی است که به فاصله 5 میلی‌متر از یکدیگر قرار گرفته‌اند و در بالای هر ستون شماره مربوط به آن نوشته شده است. تمامی خطوط ایجاد شده بر روی این پلیت توسط الماس شیشه بری ایجاد شده است.

3. کارشناس بایستی تعداد اسپور موجود در هر ستون را با دقت شمارش کرده و در پایان تعداد کل اسپورهای موجود در هر پیلت را گزارش نماید.

4. در صورتی که حجم (میلی لیتر) سوسپانسیون حاصل از روش‌های استخراج اسپور کم باشد، نیازی به برداشتن نمونه ثانویه نیست و کل سوسپانسیون به پلیت شمارش منتقل می‌شود. بدیهی است در این صورت تعداد اسپور حاصل همان تعداد موجود در نمونه اولیه بوده و فقط بایستی تعداد اسپور در هر گرم نمونه با رابطه تناسب تعیین شود.

5. به منظور اطمینان از صحت نتایج شمارش صورت گرفته، برای بررسی جمعیت اسپور قارچ در هر نمونه حداقل سه تکرار در نظر گرفته شود.

شکل 3-6- پلیت شمارش اسپور به همراه سوسپانسیون حاوی اسپور

3-4- کشت تک اسپور

این روش هم به عنوان تهیه کشت خالص از اسپور و هم به عنوان بررسی قابلیت جوانه‌زنی اسپور قارچ‌های میکوریزی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Walley and Germida 1995):

وسایل و تجهیزات

- سرنگ پلاستیکی60 میلی‌لیتری (بدون پیستون)
- ماسه، خاک و پرلیت درشت
- آون
- بذر سورگوم
- گلخانه و یا اتاقک رشد

مواد و / یا واکنش‌گرها

- محلول غذایی هوگلند با منبع فسفر محدود
- محیط کشت واتر آگار

روش کار

1. در ابتدا به تعداد کافی و با در نظر گرفتن 4 تکرار از هر نوع اسپور، سرنگ پلاستیکی 60 میلی‌لیتری استریل (هر سرنگ حاوی 75 گرم مخلوط حجمی 1:1 از ماسه و خاک استریل تهیه شده به صورت قرار دادن ترکیب خاک و ماسه طی دو مرحله با فاصله 48 ساعت درون اتوکلاو به مدت یک ساعت در دمای 121 درجه سانتی گراد و فشار 1/2 اتمسفر) تهیه کنید (شکل 3-7). سپس با 8 میلی‌لیتر محلول غذایی هوگلند در حد رطوبت ظرفیت مزرعه مرطوب کنید. (محلول غذایی را با محدود کردن منبع فسفر (به نکته 1 مراجعه نمایید) اصلاح کنید).

شکل 3-7- سرنگ‌های آماده برای کشت تک اسپور قارچ های میکوریز آربسکولار

2. سپس بذور گیاه سورگوم را که به طور سطحی ضدعفونی کرده‌اید (به بخش 4-1-1- مراجعه نمایید)، در پلیت‌های حاوی 1 درصد وزنی حجمی آگار، در دمای 27 درجه

سانتی‌گراد جوانه‌دار کرده و بعد از تشکیل ریشه اولیه به طول تقریبی 4-2 سانتی‌متر به سطح سرنگ حاوی بستر کشت منتقل کنید.

3. هر اسپور را در قسمت میانی ریشه، با استفاده از استریومیکروسکوپ تلقیح کنید و سپس روی بذر را با بستر کشت مشابه بپوشانید (به نکته 2 مراجعه نمایید). در سطح سرنگ نیز دانه‌های پرلیت قرار دهید تا هم میزان تبخیر از سطح کاهش یابد و هم ورود آلودگی به داخل سرنگ محدود شود. همچنین کمی دانه پرلیت در قسمت تحتانی سرنگ‌ها جهت سهولت زهکشی اضافه نمایید.

4. سرنگ‌ها را به داخل اتاقک رشد با دمای روز 25 درجه سانتی‌گراد، دمای شب 20 درجه سانتی‌گراد و نیز طول روز 16 ساعت به مدت60 روز قرار دهید. سطح تابش می‌بایست در $534\ \mu E\ m^{-2}Sec^{-1}$ قرار گیرد. گیاه را توسط آب استریل و محلول غذایی آبیاری کنید و رطوبت بستر کشت را در حد رطوبت ظرفیت زراعی حفظ نمایید.

5. در انتهای دوره رشد، اندام هوایی گیاه را از محل طوقه قطع کنید. سیستم ریشه‌ای هر گیاه را با روش فیلیپس و هایمن (1970) (به بخش4-3-1- مراجعه نمایید) رنگ‌آمیزی کرده و از نظر وضعیت کلنیزاسیون مورد بررسی قرار دهید.

6. همچنین مخلوط محتویات بدست آمده در هر سرنگ پس از هوا خشک شدن، شامل بستر کشت و قطعات ریشه (قطعات ریشه، بایستی توسط قیچی و یا تیغ اسکالپر خرد شوند) می‌توانند به عنوان مایه تلقیح اولیه حاصل از اسپور تلقیح شده، مورد استفاده قرار گیرد.

محاسبات

در گیاهانی که کلنیزه شده‌اند اسپور قارچ زنده بوده و به این ترتیب درصد جوانه‌زنی اسپورها را با استفاده از رابطه زیر محاسبه کنید:

100× تعداد کل گیاهان تلقیح شده / تعداد گیاهان کلنیزه شده = درصد جوانه‌زنی اسپورها

نکات

1. اصلاح محلول هوگلند با افزودن $(NH_4)_2SO_4$ $60mgml^{-1}$، جایگزین کردن 0.09 mg H_2MoO_4 با $0.1mgNa_2MoO_4.2H_2O$، افزودن $CO(NO_3)_2.6H_2O$ $8\mu gml^{-1}$ و جایگزین کردن محلول فریک تارترات با $1ml.L^{-1}$FeEDTA[1] انجام می‌شود.

2. در هر مرحله کشت برای کنترل انجام صحیح مراحل و تأثیر فاکتورهای خارجی، تیمار شاهد با حداقل 4 تکرار در نظر بگیرید.

3-5- تهیه اسلاید دائمی از اسپورها

برای تهیه اسلاید دائمی از اسپورهای قارچ میکوریز آربسکولار لازم است از دو محلول پلی‌وینیل لاکتوگلیسرول (PVLG) و نیز معرف ملزر استفاده شود. این دو محلول به روش‌های ذیل تهیه می‌شوند(Koskey 1983; Morton 1991):

3-5-1- تهیه محلول PVLG

این محلول برای تثبیت دائم اسپورهای سالم و یا شکسته شده بر روی اسلایدهای شیشه‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرد. در اثر استفاده از این محلول اسپورهای سالم تغییر رنگ داده و عموماً تیره‌تر می‌شوند.

* پلی وینیل الکل مورد استفاده در این محلول بایستی دارای مشخصات زیر باشد:

میزان هیدرولیز 100-99 درصد- ویسکوزیته 32-24 سانتی پویز (محلول در الکل 4 درصد در دمای 20 درجه سانتی‌گراد)

محلول PVLG به طریق زیر تهیه می‌شود:

وسایل و تجهیزات

- بطری تیره
- بن ماری

مواد و / یا واکنش‌گرها

- پلی‌وینیل الکل (PVA)
- اسید لاکتیک
- گلیسرول

* آب مقطر: 100 میلی‌لیتر، اسید لاکتیک: 100 میلی‌لیتر، گلیسرول: 10 میلی‌لیتر و پلی‌وینیل الکل (PVA): 16/6 گرم

روش کار

1. در ابتدا میزان 16/6 گرم پلی‌وینیل الکل را در میزان 100 میلی‌لیتر آب مقطر حل کنید (پلی وینیل الکل به آرامی حل می‌شود بنابراین برای انحلال کامل لازم است که ترکیب آب و پلی وینیل الکل را به مدت 6-4 ساعت در بن‌ماری در دمای 80-70 درجه سانتی‌گراد قرار دهید).

2. سپس باقی مواد را قبل از اضافه کردن پلی وینیل الکل در بطری تیره مخلوط کنید و در انتها محلول پلی ویمیل الکل را اضافه کنید.

* همچنین بر اساس مطالعه کاسکه (Koskey 1983) می‌توان پودر پلی وینیل الکل را به آب اضافه کرده و به مدت 15 دقیقه در دمای 121 درجه سانتی‌گراد اتوکلاو کرد و سپس اسید لاکتیک و گلیسرول را نیز اضافه و ترکیب نهایی را به مدت 24 ساعت در دمای اتاق قرار داد.

3-5-2- تهیه معرف ملزر

معرف ملزر یک ابزار مهم تشخیصی در شناسایی مورفولوژی اسپور قارچ های میکوریز آربسکولار محسوب می‌شود. واکنش رنگ آمیزی اسپور با این محلول شامل: صورتی کمرنگ (واکنش ضعیف)، قرمز-قهوه‌ای تیره (واکنش متوسط) تا بنفش مایل به قرمز تیره (واکنش دکسترونوئیدی شدید) متفاوت خواهد بود. ید موجود در این ترکیب به مناطق آبگریز ماکرومولکول‌ها (در دیواره اسپور) متصل می‌شود و از این رو شدت واکنش تا حدی به طول زنجیره کربوهیدرات مربوط می‌شود. در اکثر موارد شدت واکنش به انعطاف‌پذیری ساختار در اتصالات اسیدی بستگی دارد.

مواد و / یا واکنش‌گرها

- ید
- کلرال هیدرات ($C_2H_3Cl_3O_2$)
- پتاسیم یدید

روش کار

100 گرم کلرال هیدرات را با 100 میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط کرده وسپس 1/5 گرم ید و 5 گرم پتاسیم یدید به آن بیافزایید.

در اثر ترکیب این دو ماده واکنش رنگ آمیزی اندکی کاهش می‌یابد؛ اما این کاهش موجب ندیدن تغییر رنگ نخواهد شد. در واکنش های ضعیف رنگ‌آمیزی، واکنش ایجاد شده در یک یا دو سال بعد از ذخیره شدن محو می‌شود.

3-5-3- تهیه اسلاید دائمی

وسایل و تجهیزات

- اسلاید میکروسکوپی
- سمپلر 10-1 میکرولیتر

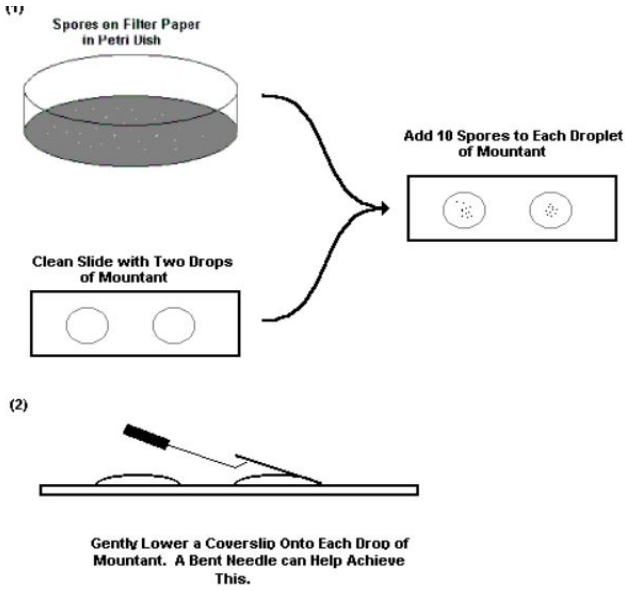
مواد و / یا واکنش‌گرها

- معرف ملزر
- معرفPLVG

روش کار

1. دو قطره کوچک (با عرض تقریبی 0/75-0/5)، یکی از PLVG و دیگری مخلوطی از معرف ملزر و PLVG به یک اسلاید تمیز اضافه کنید(شکل3-8).
2. سپس توسط سمپلر 10-1 میکرولیتر، اسپورها (به نکته 1 مراجعه نمایید) را با حداقل میزان آب اضافه کنید و اجازه دهید اسلاید به مدت حداقل 5 دقیقه ثابت بماند تا سطح قطره‌ها کمی خشک شود (افزایش ویسکوزیته لبه قطره، موجب کاهش جریان در هنگام افزودن لامل خواهد شد).
3. سپس روی هر کدام از قطره‌ها به طور جداگانه لامل قرار داده و با استفاده از نوک مداد یا سوزن، روی هر اسپور فشار دهید. این عمل موجب ایجاد شکاف روی دیواره اسپور و قابل مشاهده شدن لایه‌های آن خواهد شد (در صورت عدم پوشش کامل محلول در سراسر لامل از محلول مربوطه، زیر لامل تزریق کنید. این عمل را به آرامی و با سرنگ ظریف و یا سمپلر 10-1 میکرولیتر انجام دهید).
4. لام را به مدت 5 روز در دمای اتاق و یا دو روز در دمای 60 درجه مطابق شکل در سطح شیبدار قرار دهید تا تثبیت شود (سطح شیبدار موجب خروج حباب از سطح زیر لامل خواهد شد).

5. سپس اطلاعات مربوط به هر نمونه (شامل: تاریخ، نام جنس و گونه در صورت شناخته شدن و کد نمونه) را در قسمت پایین اسلاید بر روی برچسبی بنویسید. اسلایدها می‌بایست به صورت افقی در سینی‌های آلومینیومی و در جعبه‌های چوبی نگه‌داری شوند (به نکته 2 مراجعه نمایید).



شکل 3-8- روش تهیه اسلاید میکروسکوپی دائمی از اسپور قارچ میکوریز آربسکولار

نکات

1. در صورت که قطر اسپورها بیش از 200 میکرون باشد، تعداد اسپورها در هر قطره نبایست بیشتر از 5 تا 10 عدد باشد (در صورتی که قطر آن کمتر از 150 میکرون بود می‌توان از 30-20 اسپور استفاده کرد). برای افراد با مهارت کمتر، بهتر است از اسپور کمتر و اسلاید بیشتر استفاده شود.

2. مشاهده اسپورهای سالم بایستی در اولین روز از تهیه اسلاید صورت گیرد، اما مشاهده اسپورهای شکسته بایستی بعد از گذشت 72 ساعت و محو شدن محتویات، انجام شود تا مشاهده ساختارهای درون سلولی امکان‌پذیر باشد.

3-6- نگه‌داری طولانی مدت اسپور قارچ AM (نگه‌داری نمونه شاهد)

3-6-1- استفاده از محلول سدیم آزید

در برخی مطالعات لازم است تا اسپور مورد مطالعه با حفظ خصوصیات اولیه و بدون تغییر تحت عنوان "اسپور شاهد" حفظ شود تا بتوان از آن در بررسی‌های تکمیلی استفاده کرد. یکی از محلول‌های مورد استفاده در نگه‌داری اسپور شاهد برای مدت طولانی سدیم آزید است. اسپورها در سدیم آزید مرده و با گذشت زمان به طور طبیعی شناور شده و اغلب تیره می‌شوند و ظاهر سالم خود را از دست می‌دهند (توخالی به نظر می‌رسند). با این حال ساختارهای درون سلولی تا حد زیادی ساختار خود را حفظ می‌کنند.

تهیه محلول 0/05 درصد سدیم آزید

برای تهیه محلول 0/05 درصد سدیم آزید، ابتدا 2/5 گرم سدیم آزید را در 50 میلی‌لیتر آب مقطر حل کرده و سپس از این محلول استوک، به میزان 1 میلی‌لیتر به 90 میلی‌لیتر آب مقطراضافه شود. به این ترتیب محلول 0/05 درصد حاصل می‌شود.

وسایل و تجهیزات

- ویال 2 میلی‌لیتری
- سمپلر 10-1 میکرولیتر

مواد و / یا واکنش‌گرها

- محلول 0/05 درصد سدیم آزید

روش کار

1. در ابتدا اسپورهای مورد نظر را با کمترین میزان آب به ویال‌های 2 میلی‌لیتری انتقال دهید.
2. سپس با محلول 0/05 درصد سدیم آزید پر کنید و مشخصات مربوط به هر نمونه را روی ویال یادداشت کرده و در یخچال در دمای 4 درجه سانتی‌گراد نگه‌داری کنید.

نکات

1. سدیم آزید یک مهار کننده تنفسی است و بنابراین هنگام کار با آن از دستکش استفاده کنید.

2. محلول‌های دیگری نیز شامل:FAA (فرمالین-اسید استیک-الکل) و نیز لاکتوفنول (اسید لاکتیک و فنول) در گذشته به طور گسترده برای نگه‌داری اسپورها، استفاده می‌شدند؛ اما شواهد نشان می‌دهد که آن‌ها باعث ایجاد تغییرات عمده یا تخریب ساختار درون سلولی اسپورها می‌شوند.

3-7- نگه داری کوتاه مدت اسپورها

اسپور قارچ های میکوریزی در آب مقطر نیز به مدت 30 روز قابلیت نگه‌داری دارند و در آن برخلاف دیگر محلول‌های مورد استفاده، تغییر رنگ نمی‌دهند (باقی محلول‌ها ظرف مدت 10 روز موجب تغییر رنگ اسپور خواهند شد). اما بایستی توجه نمود که در این روش امکان رشد ساپروفیت‌های انگلی بالاست. بنابراین می‌بایست اسپور ضدعفونی و آب استریل باشد. اسپورهای رنگی کوچک (کوچکتر از 150 میکرون) مدت بیشتری در این شرایط نگه‌داری شده و برخی حتی بیش از یک سال حفظ می‌شوند؛ اما اسپورهای بزرگ رنگی با سرعت بیشتری از بین می‌روند. از کاربرد دیگر محلول‌های ایزوتونیک خودداری کنید چرا که محلول های بافر موجب پلاسمولیز شدن اسپور خواهند شد.

3-8- ضدعفونی سطحی اسپور قارچ میکوریز آربسکولار

ضدعفونی سطحی اسپورها به روش‌های مختلفی انجام که در اغلب آنها از محلول کلرآمینT، هیپوکلریت سدیم و آنتی بیوتیک استفاده می‌شود (MacDonald 1981; Hildebrandt, Janetta, and Bothe 2002; Giovannetti et al. 2003; Srinivasan et al. 2014). مراحل به شرح زیر است:

وسایل و تجهیزات

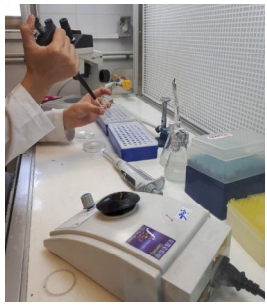
- ویال1/5میلی‌لیتری
- سمپلر 10-1 میکرولیتر
- ورتکس
- استریومیکروسکوپ

مواد و / یا واکنش‌گرها

- محلول کلرآمین T 2 درصد
- هیپوکلریت سدیم 2 درصد
- استرپتومایسین0/02 درصد

روش کار

1. اسپورهای مشابه را از نظر ظاهری پس از تقسیم‌بندی، با حداقل میزان آب به میکروتیوپ 1.5میلی‌لیتر منتقل و سپس 1 میلی‌لیتر آب مقطر استریل به آن افزوده پس از 30 ثانیه ورتکس با دور g× 6000 سانتریفیوژ نمائید (در تمامی مراحل پس از افزودن محلول جدید ورتکس و پس از گذشت 30 ثانیه سانتریفیوژ انجام می‌شود).
2. محلول رویی توسط سمپلر خارج و سپس محلول کلرآمین T 2 درصد به میزان 1 میلی لیتر به میکرو تیوب افزوده و پس از گذشت 10 دقیقه محلول رویی خارج و آب مقطر استریل اضافه می‌شود (شکل3-9).
3. در مرحله بعد اسپورها به مدت 5 دقیقه در هیپوکلریت سدیم 2 درصد قرار گرفته و پس از خارج کردن این محلول برای شستشوی اسپورها از آب مقطر استریل استفاده می‌گردد.
4. در مرحله آخر به مدت 5 دقیقه اسپورها در استرپتومایسین0/02 درصد قرار گرفته و برای شستشوی نهایی در آب مقطر استریل قرار می‌گیرند.



شکل 3-9- تصویری از مراحل انجام ضدعفونی اسپور قارچ میکوریز آربسکولار

نکات

1. برای حصول اطمینان از ضدعفونی سطحی اسپورها، پس از پایان مراحل ضدعفونی، برخی اسپورها را در سطح محیط کشت PDA و نیز نوترینت آگار قرار دهید. پلیت‌های محتوی

اسپور را در انکوباتور در دمای 28 درجه سانتی‌گراد به مدت 48 ساعت قرار داده و پس از زمان مذکور در صورت ظهور باکتری و یا قارچ اسپورهای حاوی آلودگی را حذف نمایید.

4- بررسی همزیستی میان قارچ میکوریز آربسکولار و گیاه میزبان

قارچ‌های میکوریز آربسکولار همزیست اجباری گیاه میزبان به شمار می‌روند و به تنهایی توانایی رشد و تکثیر را ندارند از این رو برای ارزیابی قابلیت رشد و تکثیر آن‌ها و نیز مشاهده اندام های تشکیل شده قارچ میکوریزی نیاز است تا ساختارهای مرتبط با گیاه میزبان به دقت ارزیابی شود. در بین اندام‌های گیاهی، ریشه تنها اندامی است که ارتباط مستقیم و پیچیده‌ای با اندام‌های مربوط به قارچ های میکوریزی دارد. پس از برقراری همزیستی میان قارچ‌های میکوریز آربسکولار و گیاه میزبان، این قارچ‌ها اندام‌های ویژه‌ای شامل هیف‌ها، کویل‌ها (پیچک هیف درون سلولی) آربسکول، وزیکول و نیز اسپور در ریشه گیاه و نیز بر سطح آن و محیط پیرامون ریشه ایجاد می‌کنند. به منظور مشاهده این اندام های قارچی لازم است ریشه گیاه پس از برداشت رنگ‌آمیزی شده و علاوه بر حذف محتویات درون سلولی ریشه گیاه، اندام قارچ همزیست به خوبی رنگ آمیزی شده تا مکان‌های تبادلی میان قارچ و ریشه به خوبی قابل مشاهده گردند. سپس به دقت توسط استریومیکروسکوپ مورد بررسی قرار گیرند. نتایج حاصل از این بررسی در ارزیابی کمی میزان همزیستی میان قارچ میکوریزی و گیاه میزبان و یا دیگر پارامترها استفاده می‌شود.

4-1- الزامات و روش‌های گلخانه‌ای مورد نیاز برای رشد گیاه میزبان

4-1-1- ضدعفونی سطحی بذر

به منظور انجام آزمایشات مختلف در برخی موارد لازم است تا قبل از کاشت گیاه، بذور به صورت سطحی ضدعفونی شوند.

وسایل و تجهیزات

- استوانه مدرج با گنجایش 100 میلی‌لیتر

مواد و یا واکنش‌گرها

- محلول توین 20: چند قطره توین را به یک لیتر آب مقطر بیافزایید.

- اتانول 96 درصد
- محلول 30 درصد هیپوکلریت سدیم: درون استوانه مدرج، مقدار 30 میلی ایتر از محلول هیپوکلریت سدیم را با آب مقطر به حجم 100 میلی‌لیتر برسانید.
- پلیت واتر اگار 1/5 درصد استریل، متناسب با اندازه بذر

روش کار

1. ابتدا تعداد کافی از بذرهای سالم انتخاب و در ظرف مناسب حاوی آب غوطه ور کنید. بذوری که در سطح آب شناور هستند سالم نبوده و بایستی حذف شوند.

2. بذور باقی مانده را در محلول توین 20 به مدت 20 دقیقه غوطه‌ور کرده و سپس چندین مرتبه با آب شستشو دهید.

3. در مرحله بعد بذور را در اتانول 96 درصد به مدت 30 تا 40 ثانیه قرار داده و پس از خالی کردن تمامی اتانول، در محلول 30 درصد هیپوکلریت سدیم قرار دهید. مدت زمان لازم بسته به اندازه و نوع بذر متفاوت بوده و بین 1 تا 30 دقیقه متفاوت است. هر چه بذر ریزتر و پوسته نازک‌تری داشته باشد مدت زمان کمتری نیاز خواهد بود. (جدول4-1) این زمان برای بذر ذرت 7 دقیقه است.

جدول 4-1- مدت زمان مورد نیاز برای قرار گیری بذرهای مختلف در محلول هیپوکلریت سدیم

نوع بذر	مدت زمان قرارگیری در محلول هیپوکلریت سدیم (دقیقه)
ذرت	7
سورگوم	4
بلوط	30
شبدر و یونجه	1
گوجه‌فرنگی	1/5

4. سپس محلول هیپوکلریت را به طور کامل خارج و بذور را حدود 10 مرتبه با آب مقطر استریل شستشو دهید.

5. بذور ضدعفونی شده را بافاصله و به کمک پنس استریل روی سطح کاغذ صافی مرطوب و استریل و یا در پلیت بر سطح واتر اگار 1/5 درصد استریل قرار دهید(شکل4-1).

6. پلیت‌ها را تا زمان جوانه‌زنی بذور درون انکوباتور با دمای 28 درجه سانتی گراد قرار دهید. مدت زمان گرماگذاری برای بذر ذرت 48 ساعت است.

شکل 4-1- بذور ضدعفونی شده ذرت بر روی محیط واتر آگار استریل درون پلیت

4-1-2- کشت گلخانه‌ای

با توجه به حضور اجباری گیاه میزبان در رشد و تکثیر قارچ‌های میکوریز آربسکولار اغلب آزمایش‌های مربوط به این قارچ‌ها در محیط گلخانه انجام می‌گیرد. گلخانه‌ها با دارا بودن محیطی عاری از آفات و آلودگی‌های جانبی برای مطالعات تحقیقاتی قارچ‌های میکوریز آربسکولار از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند. لذا آشنایی با برخی اصول اولیه در ارتباط با کشت‌های گلخانه‌ای ضروری به نظر می‌رسد:

- پیش از شروع کشت محیط گلخانه بایستی سم پاشی شده و با محلول ضدعفونی همانند وایتکس 5 درصد شستشو شود. همچنین در صورت مجهز بودن گلخانه به لامپ UV، بایستی قبل از کشت مورد استفاده قرار گیرد.
- سیستم دمایی، کنترل رطوبت، تهویه و نیز سیستم روشنایی گلخانه بررسی شده و از جهت عملکرد مناسب، اطمینان حاصل شود.
- گلدان و یا ظروفی که برای کشت استفاده می‌شوند در محیط گلخانه با فاصله مناسب چیده شوند و نیز آبیاری به صورت دستی انجام شود تا امکان سرایت تیمار قارچی از گلدانی به گلدان دیگر وجود نداشته باشد.
- دوره نگه‌داری گلدان‌ها معمولاً بین 4 تا 5 ماه باشد تا از رشد آلودگی‌های ساپروفیتی و نیز پیری بیش از اندازه ریشه گیاهان جلوگیری شود. همچنین سلامت گیاهان به صورت

روزانه بررسی شود تا در صورت بروز علایم کمبود و یا درگیری گیاه با آفات، بلافاصله اقدامات اصلاحی صورت گیرد.

4-1-2-1- تهیه محلول غذایی مناسب برای کشت گیاهان میکوریزی

در کشت‌های گلخانه‌ای، هنگام استفاده از بسترهایی همانند شن، پرلیت، پوکه و... که فاقد عناصر غذایی برای رشد گیاه هستند، لازم است در طول دوره رشد بر اساس نیاز گیاه و نیز مرحله رشد گیاه از محلول غذایی مناسب استفاده شود. در مطالعات مربوط به قارچ‌های میکوریزی، به دلیل اثرگذاری مواد مغذی بر همزیستی میان قارچ و ریشه گیاه، این نوع محلول‌ها بایستی با حساسیت بیشتری مورداستفاده قرار گیرند. عناصری همانند فسفر درصورتی‌که به میزان کافی در دسترس باشند، گیاه تمایلی به برقراری رابطه همزیستی نخواهد داشت و بنابراین کلنیزاسیون کاهش می‌یابد. در جدول 4-2 ترکیب محلول غذایی مناسب برای رشد گیاه تلقیح شده با قارچ میکوریز آورده شده است.

جدول 4-2- محلول غذایی مناسب برای کشت گلدانی با بستر خاک شنی فقیر، مناسب برای گیاه سورگوم و شبدر به‌عنوان گیاه میزبان قارچ میکوریز آربسکولار

ترکیب	مقدار موردنیاز در گلدان (mg/Kg soil)		محلول استوک برای سورگوم	
	شبدر	سورگوم	(g/L)	کد استوک
KH_2PO_4	36	36	10/8	A
K_2SO_4	71	150	45	A
NH_4NO_3		50	15	A
$CaCl_2.2H_2O$	94	150	45	B
$MgSO_4.7H_2O$	20	20	6	C
$MnSO_4.H_2O$	10	10	3	C
$ZnSO_4.7H_2O$	5	10	3	C
$CuSO_4.5H_2O$	2/1	5	1/5	C
H_3BO_3	0/8	0/8	0/24	C
$CoSO_4.7H_2O$	0/36	0/4	0/12	C
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0/18	0/3	0/09	C

روش استفاده از ترکیبات ارائه شده به این صورت است که ابتدا ترکیبات مطابق با مقادیر مورد نیاز در گلدان در آب مقطر حل شده و سه استوک را تشکیل می‌دهند (A-B-C). سپس با افزودن 33 میلی‌لیتر از هر یک ازآن‌ها به یک لیتر آب مقطر، محلول غذایی نهایی تهیه شده و به صورت آبیاری در حد ظرفیت زراعی در خاک مورد نظر اعمال می‌شود. به‌عنوان مثال 100 میلی‌لیتر از محلول را به هر کیلوگرم شن خشک بیافزایید تا ظرفیت نگه‌داری آب 10 درصد راداشته باشید (ظرفیت نگه‌داری آب در خاک‌هایی با بافت ریزتر بیشتر است و بایستی مقدار بیشتری از محلول غذایی مورد استفاده قرار گیرد). این مقدار برای خاک‌های با ظرفیت بیشتر بایستی تنظیم شود. این روش استفاده از مواد غذایی در خاکهای شنی که ظرفیت محدودی برای تثبیت مواد غذایی دارند بسیار مناسب است. برای دیگر خاک‌های فقیر ممکن است لازم باشد تا مواد مغذی به شکل خشک استفاده شوند و قبل از کشت با خاک مخلوط شوند (Brundrett et al. 1996).

در ارتباط با گیاه شبدر طبق مقادیرارائه شده در جدول 4-2 سطح فسفر برای تأمین 60 درصد بیشینه رشد شبدر تنظیم شده است؛ اما سایر عناصر معدنی نیز برای یک خاک شنی بسیار فقیر بهینه است. همچنین درصورتی‌که گیاه شبدر با سویه مناسب باکتری ریزوبیوم تلقیح شود نیازی به مکمل‌های نیتروژن ندارد و از این رو در ستون مربوطه یادآوری نشده است. بر اساس نیازهای غذایی غلات (همانند سورگوم) و حبوبات کشت شده در یک خاک شنی بسیار فقیر این سطح از فسفر در نظر گرفته شده است؛ چرا که برای گسترش و تحریک قارچ‌های میکوریز آربسکولار بایستی سطوح فسفر به‌صورت محدود مورد استفاده قرار گیرد. همچنین با توجه به بستر مورد استفاده، در برخی خاک‌ها ممکن است FeEDTA به میزان 25 میلی‌گرم در کیلوگرم نیاز باشد.

4-2- روش تهیه و نگه‌داری نمونه ریشه به منظور رنگ آمیزی

4-2-1- نمونه گیری از ریشه

در فرآیند نمونه‌برداری از ریشه گیاه برای تشخیص و یا اندازه‌گیری میزان همزیستی قارچ میکوریز آربسکولار، لازم است نمونه‌ای مناسب از توده ریشه تهیه شود که علاوه بر دارا بودن شرایط لازم، به خوبی بیانگر خصوصیات کل توده باشد. از این رو توجه به نکات زیر در تهیه نمونه ریشه ضروری است:

– نمونه در حد امکان بایستی از ریشه‌های ظریف و سالم تهیه شود. ریشه‌های قدیمی، تیره، چوبی و ضخیم، ممکن است دارای همزیستی باشند ولی در اغلب موارد پراکنده بوده و امکان مشاهده همزیستی مقدور نیست و تنها هیف‌های خارج ریشه قابل مشاهده‌اند. از طرفی این نوع ریشه‌ها طی مراحل رنگ آمیزی محلول رنگی بیشتری جذب نموده و امکان مشاهده اندام قارچ های میکوریزی به سختی امکان‌پذیر خواهد بود.

– نمونه بایستی از نقاط مختلف توده ریشه (نقاط نزدیک به طوقه، قسمت‌های میانی و نیز نزدیک نوک ریشه) تهیه شود تا نتایج درستی از همزیستی ریشه ارائه دهد (شکل4-2).

4-2- دایره‌های زرد نقاط مناسب برای نمونه‌برداری در توده ریشه

– نمونه ریشه بلافاصله بعد از برداشت و شستشو، رنگ آمیزی شود. درغیر این صورت به روش ارائه شده تثبیت شود (از خشک کردن نمونه‌های ریشه و سپس رنگ‌آمیزی آن‌ها خودداری کنید چرا که نمونه ریشه طی مراحل رنگ‌آمیزی آسیب دیده و امکان بررسی اندام‌های همزیستی به طور دقیق،وجود نخواهد داشت).

4-2-2- تثبیت و نگه‌داری نمونه ریشه

این عمل برای حفظ و نگه‌داری نمونه ریشه برای مدت طولانی (در صورت نگه‌داری در شرایط مناسب معمولاً تا چند ماه) بعد از برداشت و حفظ ساختمان ریشه صورت می‌گیرد.

وسایل و تجهیزات

- ظروف نمونه پلاستیکی یا شیشه‌ای با گنجایش 50 میلی‌لیتر

مواد و / یا واکنش‌گرها

- اتانول و یا ایزوپروپیل الکل 50 درصد (در استوانه مدرج میزان52/1 میلی‌لیتر از اتانول و یا ایزوپروپیل الکل 96 درصد ریخته و توسط آب مقطر به حجم 100 میلی‌لیتر برسانید)

روش کار

1. پس از شستشوی کامل ریشه با آب شهری، نمونه ای با حداقل وزن 5 گرم با در نظر گرفتن نکات یاد شده تهیه کرده و به قوطی پلاستیکی و یا شیشه‌ای دربدار با حداقل میزان آب انتقال دهید (شکل 4-3).

شکل 4-3- نمونه ریشه‌های شسته شده در ظروف نمونه گیری

2. مقدار کافی از محلول 50 درصد اتانول و یا ایزوپروپیل الکل، درون قوطی بریزید تا به خوبی روی نمونه ریشه را در بر گیرد. نمونه ریشه نباید به صورت فشرده باشد تا محلول به خوبی در بین بافت ریشه نفوذ کند (شکل 4-4).
3. قوطی‌های حاوی نمونه ریشه را درون یخچال با دمای 4 درجه سانتی‌گراد قرار دهید.

شکل 4-4- نمونه ریشه‌های تثبیت شده در محلول الکل 50 درصد

* محلول اتانول یا ایزوپروپیل الکل از نظر زیان برای انسان در رده "حداقل مضر" قرار می‌گیرد. در گذشته برای تثبیت ریشه‌ها از فرمالین استفاده می‌شد که با توجه به عوارض مضر آن، دیگر استفاده نمی‌شود.

4-3- رنگ‌آمیزی ریشه

پس از مرحله برداشت و شستشو، ریشه‌ها آماده مراحل رنگ‌آمیزی خواهند بود. اما درصورتی که ریشه در مواد نگه‌دارنده قرار دارد، لازم است که ابتدا با آب شهری به طور کامل شسته شده و سپس رنگ‌آمیزی صورت گیرد.

4-3-1- رنگ آمیزی به روش فیلیپس و هایمن (1970)(Phillips and Hayman 1970)

وسایل و تجهیزات

- لوله آزمایش
- پنس
- شیکر
- استوانه مدرج با حجم یک لیتر
- بالن ژوژه با حجم یک لیتر
- اتوکلاو

مواد و / یا واکنش‌گرها

- محلول 8 درصد KOH: مقدار 80 گرم از ترکیب KOH را درون 1000 میلی‌لیتر آب مقطر حل کنید (برای ساخت KOH 10 درصد، از میزان 100 گرم KOH در 1000 میلی‌لیتر آب مقطر استفاده کنید).
- محلول H_2O_2 قلیایی: میزان 3 میلی‌لیتر آمونیوم هیدرواکسید (NH_4OH) را با 30 میلی‌لیتر آب اکسیژنه (H_2O_2) 10 درصد، مخلوط کرده و درون یک استوانه مدرج به حجم 600 میلی‌لیتر برسانید.
- محلول اسیدکلریدریک (HCl) 1 درصد: مقدار 27 میلی‌لیتر از اسیدکلریدریک 37 درصد را درون یک بالن ژوژه به حجم یک لیتر برسانید.
- محلول لاکتوگلیسرول: مقدار 876 میلی‌لیتر اسید لاکتیک و 64 میلی‌لیتر از گلیسرول را به یکدیگر اضافه کرده و در استوانه مدرج و با آب مقطر به حجم یک لیتر برسانید.
- محلول رنگی تریپان‌بلو: مقدار 0/5 گرم از پورد رنگی تریپان بلو را در 1000 میلی‌لیتر محلول لاکتوگلیسرول حل کرده و به مدت 1 ساعت بر روی شیکر با سرعت 100 دور در دقیقه قرار دهید تا ذرات رنگ کاملاً حل شوند.

روش کار

1. میزان 3 گرم از نمونه ریشه (تازه و یا تثبیت شده) را با آب شستشو داده و به لوله آزمایش انتقال دهید. نمونه ریشه نباید درون لوله آزمایش فشرده باشد (شکل 4-5).

شکل 4-5- نمونه ریشه شسته شده ذرت

2. سپس میزان 30 میلی‌لیتر از محلول KOH 10-8 درصد به آن بیافزایید. میزان محلول بایستی کاملاً سطح ریشه را بپوشاند (شکل 4-6).

شکل 4-6- نمونه ریشه به همراه محلول KOH 8 درصد قبل از انجام اتوکلاو

3. درب لوله آزمایش را با قطعه فویل آلومینیومی پوشانده و روی تمامی لوله‌های آزمایش را مطابق تصویر سمت چپ شکل 4-6 با کیسه فریزر بپوشانید و در اتوکلاو با دمای 121 درجه سانتی گراد به مدت 20-2 دقیقه اتوکلاو کنید. می‌توان لوله‌های آزمایش را به جای اتوکلاو در بن‌ماری به مدت 10 دقیقه تا 1 ساعت در دمای 90 درجه سانتی‌گراد قرار داد (به

نکته 2 مراجعه نمایید). طی این مرحله سیتوپلاسم و بیشتر هسته‌های سلولی از بین می‌رود و ریشه برای مشاهده اندام‌های میکوریزی کاملاً شفاف می‌شود (به نکته 3 مراجعه نمایید).

4. بعد از اتمام زمان اتوکلاو و سرد شدن لوله‌های آزمایش، ریشه را چندین مرتبه با آب شهری شستشو دهید (معمولاً 5 مرتبه). این مرحله را در مکانی با تهویه کافی انجام داده و از استشمام بخار KOH بپرهیزید (به نکته 4 مراجعه نمایید).

5. درصورت تیره و خشبی بودن ریشه، 30 میلی‌لیتر از محلول H_2O_2 قلیایی را به هر لوله اضافه کنید و به مدت 10 دقیقه تا 1 ساعت در دمای آزمایشگاه قرار دهید. در این مرحله، رنگ ریشه‌ها کمی روشن‌تر خواهد شد (به نکته 5 مراجعه نمایید). مدت زمان این مرحله به میزان تیره بودن و سن ریشه بستگی دارد.

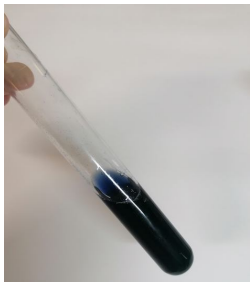
6. بعد از اتمام مرحله فوق، ریشه‌ها را چندین مرتبه با آب شهری شستشو دهید (معمولاً 5 مرتبه).

7. بعد از تیمار ریشه‌ها با محلول‌های KOH و H_2O_2 قلیایی، ریشه‌ها بسیار قلیایی بوده و بایستی قبل از مرحله رنگ‌آمیزی کمی اسیدی شده تا رنگ به اندام‌های قارچ میکوریز آربسکولار متصل شود. به این ترتیب میزان تقریبی 30 میلی‌لیتر از محلول HCl یک درصد به هر لوله افزوده و 10-3 دقیقه صبر کنید تا رنگ ریشه کاملاً روشن شود (شکل 4-7) (برای مثال برای ریشه ذرت یک ماهه، زمان 3 دقیقه کافی است).

شکل 4-7- نمونه ریشه‌ها پس از اتمام مرحله هفتم رنگ‌آمیزی

8. بعد از اتمام مدت زمان اسیدی شدن، محلول اسیدی را به آرامی خالی کرده (به نکته 6 مراجعه نمایید) و بلافاصله محلول رنگی تریپان بلو را بیافزایید (شکل 4-8). میزان رنگ به مقدار ریشه بستگی دارد و بایستی به خوبی سطح ریشه را بپوشاند. ریشه‌ها را به مدت 4 تا 24 ساعت در محلول رنگی در دمای آزمایشگاه قرار دهید. مدت زمان ذکر شده

به میزان تازگی رنگ تهیه شده و نیز ضخامت ریشه‌ها بستگی دارد. هر چه محلول رنگی تازه‌تر و ضخامت ریشه‌ها کمتر باشد، مدت زمان رنگ‌آمیزی نیز کمتر خواهد بود (برای مثال این مدت زمان در ریشه ذرت یک ماهه با محلول رنگ آمیزی تازه، 4 ساعت است).



شکل 4-8- نمونه ریشه پس از افزودن محلول رنگ‌آمیزی

9. بعد از اتمام مرحله رنگ‌آمیزی، رنگ اضافی را خالی کرده و ریشه‌ها را با آب شهری شستشو دهید. نمونه ریشه را به یک پلیت شیشه‌ای انتقال داده (شکل 4-9) و با استفاده از استریومیکروسکوپ بررسی کنید.

شکل 4-9- نمونه ریشه رنگ‌آمیزی شده

نکات رنگ آمیزی

1. محلول‌های مورد نیاز را با استفاده از هود مخصوص مواد شیمیایی و با استفاده از وسایل ایمنی تهیه کنید. هنگام انجام مراحل رنگ آمیزی از دستکش استفاده کنید.

2. مدت زمان اتوکلاو و یا بن ماری به نوع گیاه، ضخامت و میزان خشبی بودن نمونه ریشه بستگی دارد. برای مثال برای ریشه ذرت یک ماهه، مدت زمان 2 دقیقه کافی است و

برای گیاهان چوبی چند ساله، تا 30 دقیقه در اتوکلاو و بیش از یک ساعت در بن ماری کافی خواهد بود.

3. در صورتی که محلول KOH موجب آسیب بهپوست سطحی ریشه شد، از غلظت کمتری استفاده نموده و یا مدت زمان اتوکلاو را کاهش دهید.

4. ریشه در پایان مرحله افزودن KOH بسیار لیز است بنابراین عمل شستشو را با دقت بیشتری انجام دهید تا ریشه‌ها از دست نروند.

5. مرحله H_2O_2 قلیایی، فقط برای گیاهانی کاربرد دارد که ریشه چوبی، خشبی و تیره دارند. بنابراین این مرحله برای گیاهان علفی با ریشه ظریف ضرورتی ندارد.

6. بعد از اتمام مرحله اسیدی شدن، به هیچ عنوان شستشو صورت نمی‌گیرد.

7. ترجیحاً بهتر است محلول‌های مورد استفاده در رنگ آمیزی، تازه تهیه شوند. برای مثال محلول H_2O_2 را بیش از 2 ماه استفاده نکنید چرا که میزان اثر بخشی آن کاهش می‌یابد. لازم به ذکر است محلول رنگ آمیزی قابلیت استفاده مجدد را دارد؛ بنابراین پس از اتمام رنگ آمیزی آن را در ظرفی جداگانه جمع‌آوری کنید.

8. در صورتی که ریشه‌ها در مرحله رنگ آمیزی بیش از حد رنگ جذب کرده باشند، آن‌ها را به مدت 24-72 ساعت در محلول لاکتوگلیسرول قرار داده تا رنگ اضافی حذف واندام‌های میکوریزی قابل رویت شوند.

9. ریشه‌های رنگ‌آمیزی شده بایستی در محلول لاکتوگلیسرول و در مکان تاریک نگه‌داری شوند. ریشه‌ها با این روش تا بیش از دو سال قابل نگه‌داری هستند.

10.در صورتی که نمونه ریشه خشک بود، ریشه‌ها را قبل از رنگ آمیزی در محلول توین 80 غوطه‌ور کنید تا کمی منبسط شوند سپس رنگ‌آمیزی نمایید.

4-4- تهیه اسلاید از نمونه‌های ریشه

در برخی مطالعات لازم است برای انجام مطالعات بعدی و دقیق‌تر از نمونه ریشه رنگ‌آمیزی شده، اسلاید میکروسکوپی تهیه شود (Brundrett et al. 1996).

وسایل و تجهیزات

- استریومیکروسکوپ
- اسلاید میکروسکوپی

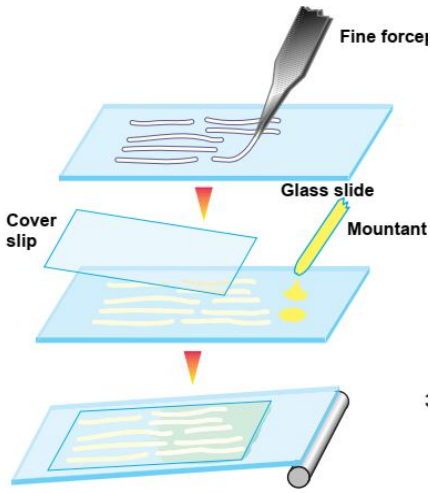
مواد و / یا واکنش‌گرها

- محلول PVLG (برای تهیه این محلول به بخش 3-5-1- مراجعه نمایید)

روش کار

1. به این منظور قطعات ریشه مورد نظر را با استفاده از دستگاه استریومیکروسکوپ، مطابق تصویر و با حداقل میزان آب به صورت موازی و در امتداد اسلاید قرار داده و دوقطره کوچک از محلول PVLG در ابتدای اسلاید اضافه کنید.
2. سپس یک لبه لامل را به صورت زاویه‌دار و به آرامی در ابتدای قطرات قرار داده و به سمت قطعات ریشه بلغزانید و به آرامی رها کنید.
3. اسلاید را در سطح شیبدار قرار دهید تا ریشه‌ها صاف شده و حباب‌های موجود در زیر سطح لامل خارج شود (شکل 4-10).
4. برای ماندگاری بیشتر اسلاید می‌توان حاشیه لامل را با محلولی همانند لاک بی‌رنگ پوشش دهید.

* اسلایدی که از نمونه‌های ریشه به روش یاد شده تهیه شده است، قابلیت نگه‌داری به میزان حداقل 2 سال را خواهد داشت.

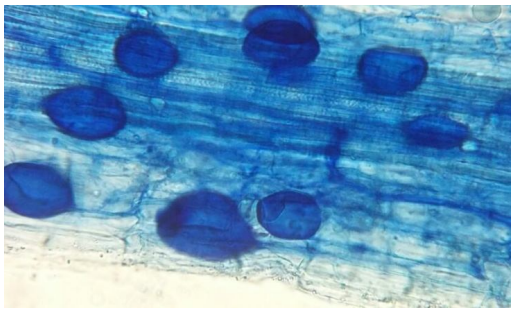


شکل 4-10- شیوه تهیه اسلاید میکروسکوپی از نمونه ریشه گیاه همزیست با قارچ میکوریز آربسکولار

4-5- اندازه‌گیری درصد کلنیزاسیون ریشه

ارزیابی درصد کلنیزاسیون ریشه های میکوریزی مرحله مهمی از بررسی‌های مربوط به قارچ‌های میکوریز آربسکولار محسوب می‌شود. همچنین در آزمایش‌های گلخانه‌ای که تمام ریشه‌های یک گیاه جمع‌آوری و اندازه‌گیری می‌شود، می‌توان از روش خطوط شبکه متقاطع (Giovannetti and Mosse 1980) برای اندازه‌گیری دو متغیر مهم استفاده کرد:

- طول ریشه میکوریزی - تخمین طول ریشه‌های کلنیزه شده توسط قارچ‌های میکرویزی (در صورت تقسیم طول ریشه گیاه به درصد کلنیزاسیون بدست می‌آید) (شکل4-11).
- طول ریشه گیاه - تخمینی از کل طول ریشه‌های تولید شده توسط گیاه.



شکل 4-11- اندام‌های میکوریزی توسعه یافته در ریشه گیاه هویج القاء شده با آگروباکتریوم

4-5-1- اندازه گیری درصد کلنیزاسیون ریشه به روش خطوط شبکه متقاطع

در اندازه‌گیری درصد کلنیزاسیون ریشه، وجود یا نبودن اندام‌های میکوریزی در ریشه گیاه،که در تقاطع با خطوط یک صفحه مشبک وجود دارد به صورت مثبت (درصورت وجود اندام قارچ میکوریزی)یا منفی (درصورت نداشتن اندام قارچ میکوریزی) درنظر گرفته شده و بر این اساس تعداد ریشه‌های همزیست شده با قارچ میکوریز به عنوان درصدی از کل بخش‌های ریشه در نمونه، شمارش و بیان می‌شوند (Giovannetti and Mosse 1980; Brundrett et al. 1996; Ferrol and Lanfranco 2020).

وسایل و تجهیزات

- استریومیکروسکوپ
- پلیت شیشه‌ای مشبک

روش کار

1. نمونه مناسب از ریشه تهیه و توزین نموده و بر اساس روش ذکر شده، رنگ‌آمیزی کنید (وزن نمونه نباید بیش از 0/1 تا 0/2 گرم باشد).

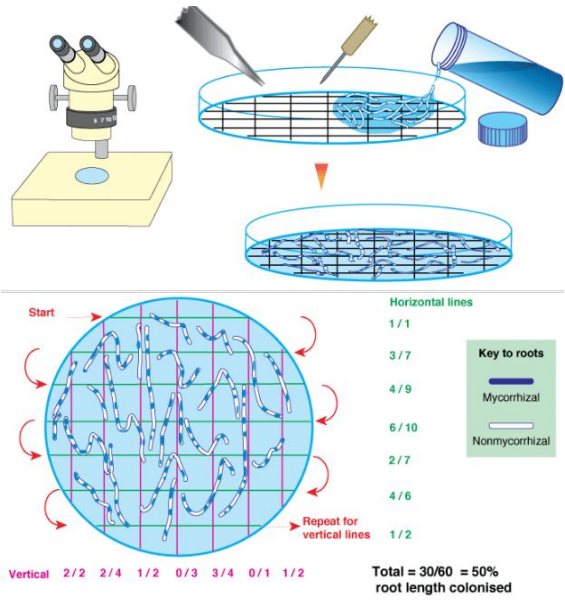
2. نمونه را به حدود 100 قطعه یک سانتی‌متری تقسیم کرده (قبل از رنگ‌آمیزی نیز می‌توان ریشه‌ها را به قطعات یک سانتی‌متری تقسیم نمود) و به طور تصادفی به پلیت شیشه‌ای (حاوی مقدار کمی آب مقطر جهت حفظ رطوبت ریشه‌ها) منتقل کنید. در زیر پلیت کاغذی مشبک با مربع‌های 1.27x1.27 سانتی‌متری قرار داده و یا توسط الماس شیشه‌بری این خطوط را ایجاد نمایید (از ریشه‌های ضخیم و پر رنگ استفاده نکنید چرا که مشاهده اندام‌های میکوریزی در این قطعات مشکل است و موجب بروز خطا در داده‌های بدست آمده خواهد شد). این پلیت بایستی دارای دو شرط زیر باشد (شکل4-13):

a) خطوط شبکه بایستی از مربع‌هایی با ابعاد 1.27x1.27 تشکیل شده باشد. به این ترتیب، بر اساس فرمول نیومن، تعداد کل تقاطع‌ها بین خطوط شبکه و ریشه‌ها برابر با طول کل ریشه بر حسب سانتی‌متر خواهد بود تا بتوانیم کل ریشه کلونیزه‌شده را بر حسب طول بیان کنیم.

b) موقعیت مربع های شبکه نسبت به ظرف نباید به گونه ای تنظیم شود که لبه ظرف با یک خط شبکه منطبق باشد، در این صورت دو مربع نیمه در هر لبه با هم یک مربع کامل ایجاد خواهند کرد.

3. سپس آب موجود در پلیت را تا جایی که امکان دارد با سرنگ خارج نموده و سپس توسط استریومیکروسکوپ پارامترهای زیر را بررسی کنید:

- تعداد کل تقاطع بین خطوط افقی و عمودی با ریشه‌ها (R1)
- تعداد کل تقاطع‌ها در خطوط افقی و عمودی، که در آن‌ها ریشه دارای یکی از اندام مشخصه قارچ‌های میکوریزی است (R2)



شکل 4-12- نحوه اندازه‌گیری کلنیزاسیون ریشه گیاه همزیست با قارچ میکوریز آربسکولار به روش خطوط متقاطع

* مطابق تصویر از بالاترین خط افقی شروع کرده و تمام تقاطع های قطعات ریشه را با خطوط افقی یادداشت نمایید. همچنین تعداد نقاط تقاطعی که در آن‌ها حداقل یکی از اندام‌های همزیستی میکوریزی را مشاهده نموده‌اید را نیز یادداشت نمایید. همین مراحل را در ارتباط با خطوط عمودی نیز انجام داده و داده‌های حاصل را یادداشت نمایید.

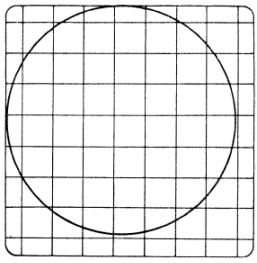
R1=تعداد تقاطع خطوط افقی با ریشه‌ها + تعداد تقاطع خطوط عمودی با ریشه‌ها

R2=تعداد تقاطع خطوط افقی با ریشه‌های میکوریزی + تعداد تقاطع خطوط عمودی با ریشه‌های میکوریزی

به این ترتیب درصد کلنیزاسیون ریشه از رابطه زیر قابل محاسبه خواهد بود:

درصد کلنیزاسیون ریشه توسط قارچ میکوریز = $\frac{\text{تعداد تقاطع دارای همزیستی میکوریزی}}{\text{تعداد کل تقاطع}} \times 100$

درصد کلنیزاسیون ریشه با قارچ میکوریزی = R2/R1×100



شکل 4-13- پیلت شیشه‌ای مشبک حاوی قطعات ریشه یک سانتی‌متری برای اندازه‌گیری درصد کلنیزاسیون ریشه

* در این روش بهتر است چندین مرتبه چیدمان قطعات ریشه را بهم زده و مجددا قرائت را انجام داد تا از صحت داده‌ها اطمینان حاصل شود. داده‌های حاصل شده از مراحل یاد شده بر این فرض استوار هستند که توزیع کلنیزاسیون در نمونه ریشه تهیه شده مطابق با توزیع کلنیزاسیون قارچ در کل سیستم ریشه است.

4-6- شمارش اندام فعال[1]

4-6-1- روش محتمل‌ترین تعداد (MPN)

روش‌های یادآوری شده تا کنون برای شمارش اسپورهای قارچ میکوریز آربسکولار مورد استفاده قرار می‌گیرند. اما برای ارزیابی کل اندام فعال قارچ میکوریزی در یک نمونه ، بهتر است تمامی اندام‌های فعال (پروپاگول) قارچ میکوریزی بررسی شود. روش محتمل‌ترین تعداد یکی از اصلی‌ترین روش‌های ارزیابی تعداد کل اندام فعال قارچ میکوریزی در نمونه مایه تلقیح و یا خاک است. این روش از دقت خوبی برخوردار بوده و میزان خطا در این روش نسبتاً اندک است. در این روش تعداد اندام های فعال موجود براساس قانون احتمال ارزیابی می‌شود و تعداد دقیق شمارش نمی‌شود(An et al. 1990; Mukerji, Manoharachary, and Chamola 2002; Woomer, Bennett, and Yost 1990). مراحل روش به شرح زیر است:

وسایل و تجهیزات

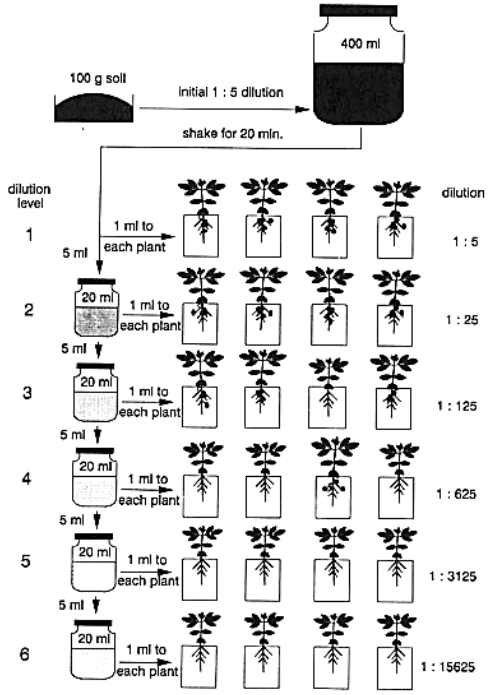
- سرنگ پلاستیکی60 میلی‌لیتری (بدون پیستون) استریل

[1] - Propagule

- بستر کشت استریل: مخلوط خاک و ماسه استریل با نسبت 1:1 (حجمی/حجمی) می‌تواند بستر مناسبی برای این منظور باشد.
- بذر ضدعفونی شده: شبدر، یا ذرت و یا سورگوم بذور مناسب برای این کشت می‌باشند.
- گلخانه و یا اتاقک رشد

روش کار

1. رقت‌های 1:5، 1:25 ، 1:125 و... از نمونه خاک و یا مایه تلقیح با ماسه استریل تهیه کنید (برای مثال برای تهیه رقت 1:5 10 گرم از مایه تلقیح و یا نمونه خاک را با 40 گرم از ماسه استریل مخلوط کنید و سپس میزان 10 گرم از رقت 1:5 تهیه شده را با 40 گرم از ماسه استریل مخلوط کرده تا رقت 1:25 بدست آید و به همین ترتیب رقت‌های بعدی را نیز تهیه نمایید) (شکل 4-14).



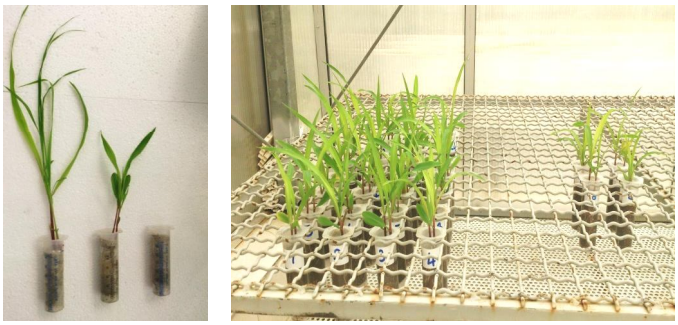
شکل 4-14- شیوه تهیه مجموعه رقت‌های پنج‌تایی از مایه تلقیح و یا نمونه اولیه و روش انجام آزمون

2. تیوپ یا سرنگ‌هایی استریل حاوی 100-50 گرم بستر کشت استریل با در نظر گرفتن 4 تکرار از هر رقت تهیه کنید (شکل4-15).

شکل 4-15- تصویری از سرنگ‌های استریل حاوی بستر، درون ظروف نگه‌دارنده

3. بذرهای جوانه‌دار که ضد عفونی سطحی شده‌اند را درون هر لوله قرار داده و زیر بذور به میزان 1 گرم از رقت‌های تهیه شده بیافزایید. سپس بذور را با بستر کشت استریل بپوشانید.

4. اجازه دهید این گیاهان در محیط گلخانه و یا اتاقک رشد با 16 ساعت روشنایی و دمای 28 درجه سانتی گراد، به مدت 6 هفته رشد کنند (در مراحا آغازین رشد از آبیاری سنگین بپرهیزید و رطوبت خاک را در حد ظرفیت زراعی بستر حفظ نمایید) (شکل 4-16).



شکل 4-16- تصویری از سرنگ‌های کشت شده در محیط گلخانه

5. بعد از اتمام دوره رشد اندام هوایی گیاهان از قسمت طوقه قطع (شکل 4-) و ریشه گیاهان را رنگ‌آمیزی نمایید.

شکل 4-17- قطع اندام هوایی گیاهان از قسمت طوقه و برداشت ریشه

6. ریشه‌های رنگ‌آمیزی شده را از نظر وجود و یا عدم وجود کلنیزاسیون میکوریزی بررسی نمایید و در جدولی مشابه جدول 4-3 ثبت کنید.

جدول 4-3- جدول مربوط به ثبت نتایج آزمون

سری رقت	تکرار اول	تکرار دوم	تکرار سوم	تکرار چهارم	جمع تکرار
1:5	+/-	+/-	+/-	+/-	0....4
1:25	+/-	+/-	+/-	+/-	0....4
1:125	+/-	+/-	+/-	+/-	0....4
1:625	+/-	+/-	+/-	+/-	0....4
1:3125	+/-	+/-	+/-	+/-	0....4
1:15625	+/-	+/-	+/-	+/-	0....4

محتمل‌ترین تعداد اندام فعال قارچ‌های میکوریز آربسکولار موجود در نمونه خاک یا مایه تلقیح را می‌توان از جدول‌های ارائه شده در ذیل جدول 4-1) در واحد وزن یا حجم از نمونه محاسبه کرد.

جدول 4-4 محاسبه جمعیت اندام فعال قارچ در واحد وزن یا حجم از نمونه

ردیف	تعداد نتایج مثبت در سطح رقت 6 5 4 3 2 1	میزان جمعیت براساس MPN با سری رقت 5 تایی
1	0 0 0 0 0 1	1/1
2	0 0 0 0 1 1	2/2
3	0 0 0 0 0 2	2/5
4	0 0 0 0 1 2	3/9
5	0 0 0 0 0 3	4/5
6	0 0 0 0 1 3	6/4
7	0 0 0 0 2 3	8/7
8	0 0 0 0 0 4	8/0
9	0 0 0 0 1 4	11
10	0 0 0 1 1 4	15
11	0 0 0 0 2 4	16
12	0 0 0 1 2 4	22
13	0 0 0 0 3 4	24
14	0 0 0 1 3 4	33
15	0 0 0 2 3 4	44
16	0 0 0 0 4 4	40
17	0 0 0 1 4 4	57
18	0 0 1 1 4 4	75
19	0 0 0 2 4 4	81
20	0 0 1 2 4 4	107
21	0 0 0 3 4 4	121
22	0 0 1 3 4 4	165
23	0 0 2 3 4 4	218
24	0 0 0 4 4 4	203
25	0 0 1 4 4 4	287
26	0 1 1 4 4 4	380
27	0 0 2 4 4 4	409
28	0 1 2 4 4 4	545
29	0 0 3 4 4 4	611
30	0 1 3 4 4 4	830
31	0 2 3 4 4 4	1113
32	0 0 4 4 4 4	1035
33	0 1 4 4 4 4	1465
34	1 1 4 4 4 4	1992
35	0 2 4 4 4 4	2109
36	1 2 4 4 4 4	2813
37	0 3 4 4 4 4	3281
38	1 3 4 4 4 4	4375
39	2 3 4 4 4 4	5938
40	0 4 4 4 4 4	5175
41	1 4 4 4 4 4	7177
42	2 4 4 4 4 4	10228
43	3 4 4 4 4 4	15263

دقت روش MPN به فرضیات زیر بستگی دارد:

- اندام های فعال توانایی برقرای رابطه همزیستی به طور تصادفی در نمونه مورد آزمون پخش شده را داشته باشند.

- هر اندام فعال که توانا به برقراری همزیستی است در طول دوره آزمون یک همزیستی میکوریز آربسکولار تیپیک ایجاد می‌کند.

- هیچ آلودگی وجود ندارد.

معایب روش MPN

- در این روش تعداد اندام فعال دارای توانایی برقرای رابطه همزیستی محاسبه شده، بیشتر از روش شمارش اسپور در روش الک تر است. این تفاوت ممکن است درنتیجه حضور وزیکول، اجزای هیف و دیگر اندام های فعال غیر از اسپور باشد که دارای قابلیت برقراری رابطه همزیستی هستند. این نوع از اندام های فعال با روش‌های معمول قابل شمارش نیستند.

- اسپورهای غیرفعال شده با روش بخاردهی خاک و نیز اسپورهای غیر زنده در روش MPN شمارش نمی‌شوند ولی ممکن است در خاک باقی مانده و بعد از چند ماه بعد از جداسازی از بستر کشت، نیز به صورت اسپورهای نرمال به نظر برسند.

- استفاده از این روش محدود به مطالعات خاص می‌باشد زیرا زمان زیادی برای حاصل شدن نتیجه قابل قبول مورد نیاز است.

5- روش‌های تکثیر قارچ‌های میکوریز آربسکولار

علی‌رغم تأثیرات شگرفی که قارچهای میکوریز آربسکولار در همزیستی با گیاهان میزبان از خود نشان می‌دهند، استفاده عملی از آنها در مقیاس وسیع و در اراضی کشاورزی همچنان به صورت یک مشکل پا برجاست. چرا که این ریزجانداران برخلاف سایر ریزجانداران مفیدی که به شکل وسیع و با سهولت تولید و در اراضی کشاورزی مصرف می‌گردند (از جمله انواع ریزوبیوم‌ها، تیوباسیلوس‌ها، انواع حل‌کننده عناصر و باکتری‌های محرک رشد) در محیط مصنوعی رشد نکرده و به دلیل طبیعت همزیست اجباری آن‌ها با ریشه، تنها در نزدیکی و حمایت ریشه قابل تکثیر می‌باشند این مسئله محققین را بر آن داشته است تا با استفاده از تکنیک‌های ویژه (غیر ازمحیط‌های کشت مصنوعی) مایه تلقیح این قارچها را در مقیاس

نیمه‌صنعتی و صنعتی تهیه نمایند. تاکنون چهار روش کشت‌های تله گلدانی،NFT[1]، ائروپونیک[2] و کشت درون شیشه‌ای[3] قارچ و ریشه گیاه میزبان بیشترین موفقیت را در پی داشته است که در ادامه کشت تله گلدانی به علت ساده و رایج بودن شرح داده می‌شود:

5-1-1- کشت تله گلدانی به منظور ازدیاد اسپورهای موجود در نمونه خاک اولیه

کشت های تله گلدانی رایج ترین و ساده ترین روش تکثیر و تهیه مایه تلقیح قارچ های میکوریز آربسکولار به شمار می‌رود. در این روش از کشت گیاه میزبان مناسب و تلقیح ریشه گیاه با اسپورهای سالم گونه‌های مختلف قارچ‌های میکوریزی و یا مایه تلقیح‌های آماده استفاده می‌شود. از طرفی در برخی موارد به منظور ازدیاد نمونه اسپورهای موجود در نمونه خاک اولیه نیز کشت تله گلدانی مورد استفاده قرار می‌گیرد و پس از آن لازم است خالص سازی بیشتری برای جداسازی اسپورها انجام شود. در این روش پس از رشد کامل گیاه میزبان در شرایط مناسب رطوبتی و حرارتی، گیاه میزبان از سطح محیط کشت قطع شده و محتویات محیط کشت باقی مانده به همراه ریشه گیاه میزبان و اسپورهای تولید شده به عنوان مایه تلقیح قارچ مورد استفاده قرار می‌گیرد.

وسایل و تجهیزات

- بذور گیاه میزبان: گیاه میزبان را می‌توان از هر یک از گیاهان*Brachiariacomata*، *B. decumbens*، *B. brizantha*، *Canavalia ensiformis*، *Tagetes erecta*، *Carica papaya*، *balsaminaImpatiens*، *Solanum lycopersicum* و *Zea mays* متناسب با نوع اقلیم محل آزمایش انتخاب کرد (Simpson and Daft 1990; Struble and Skipper 1988).
- شن استریل
- خاک استریل تهیه شده از محل نمونه‌برداری
- گلدان با گنجایش 500 میلی‌لیتر

مواد و واکنش‌گرها

- محلول غذایی هوگلند اصلاح شده، با میزان فسفر کاهش یافته (جدول 5-1).

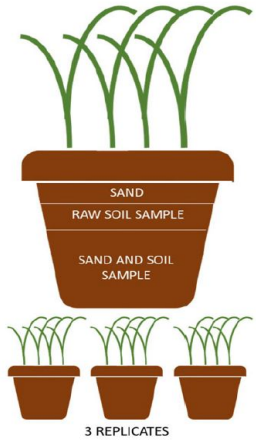
[1]- Nutrient Film Technique
[2]- Aeroponics
[3]- Root Organ Culture

جدول 5-1- ترکیبات محلول غذایی هوگلند اصلاح شده، با میزان فسفر کاهش یافته

For 1L of full Hogland nutrient solutiom	
Nutrients	**Concentration**
KNO3	0.005 M
Ca(NO3)2	0.005 M
KH2PO4	0.1mM
MgSO4	0.002 M
Fe(NO3)2	0.1mM
Stock micronutrients stock	Add 1ml/L of Hogland solution
Micronutrients	Concentration
H3BO3	0.046 M
MnCl2.4H2O	0.009M
ZnSO4.7H2O	7.65×10^{-4} M
CuSO4.5H2O	3.2×10^{-4} M
H2MoO4.H2O	1.11×10^{-4} M
Na2MoO4.2H2O	4.9×10^{-4} M

روش کار

1. در گلدانی با گنجایش 500 میلی‌لیتر، ابتدا 200 گرم از مخلوط ماسه استریل و نمونه خاک استریل مربوط به منطقه موردنظر را (1:1 حجمی/حجمی) در کف گلدان بریزید و 100 گرم از خاک غیر استریل و نمونه برداری شده از منطقه مورد نظر را روی آن اضافه کرده و سپس با 150 گرم ماسه استریل بپوشانید (حداقل سه تکرار از هر نقطه نمونه‌برداری درنظر بگیرید) (شکل 5-1).



شکل 5-1- سیستم کشت تله گلدانی

2. بذور ضدعفونی شده گیاه میزبان را در گلدان‌های محتوی خاک نمونه‌برداری بکارید (از میزبانی که همزیستی خوبی با قارچ میکوریز آربسکولار دارد استفاده کنید و آن را پس از هر چهار سیکل 4 ماهه تعویض کنید.

3. گلدان ها را هر سه روز یکبار و یا هر زمانی که نیاز است با آب مقطر آبیاری کنید تا آب به شرایط ظرفیت زراعی برسد. هر 15 روز یکبار، می توانید گیاهان را با محلول هوگلند اصلاح شده آبیاری کنید.

4. بعد از گذشت 3 ماه آبیاری را به مدت یک ماه متوقف کنید و اجازه دهید گیاه خشک شود. این امر موجب اسپورزایی قارچ های میکوریزی خواهد شد.

5. پس از اطمینان از بدست آمدن نتایج مورد انتظار از نمونه خاک حاصل از کشت تله گلدانی برای آزمایش‌های مختلف نظیر شناسایی و کارایی قارچ‌های میکوریز آربسکولار استفاده کنید. توصیه میشود تا قبل از استفاده، مایه تلقیح تهیه شده درون نایلون پلاستیکی بدون رطوبت و در دمای 4 درجه سانتی گراد نگهداری شود.

6- منابع

An, Z-Q, JW Hendrix, DE Hershman, and GT Henson. 1990. 'Evaluation of the "most probable number"(MPN) and wet-sieving methods for determining soil-borne populations of endogonaceous mycorrhizal fungi', *Mycologia*, 82: 576-81.

Bradford, Marion M. 1976. 'A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding', *Analytical biochemistry*, 72: 248-54.

Brundrett, Mark, Neale Bougher, Bernie Dell, Tim Grove, and N Malajczuk. 1996. 'Working Ylith Mycorrhizas in Forestry and Agriculture', *Canberra: Australian Centre for International Agricultural Research*.

Cardoso, Irene M, and Thomas W Kuyper. 2006. 'Mycorrhizas and tropical soil fertility', *Agriculture, ecosystems & environment*, 116: 72-84.

Carter, Martin R. 1993. *Soil sampling and methods of analysis* (CRC press).

Ferrol, Nuria, and Luisa Lanfranco. 2020. *Arbuscular mycorrhizal fungi: methods and protocols* (Springer.(

Gerdemann, JW, and T Hs Nicolson. 1963. 'Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting', *Transactions of the British Mycological society*, 46: 235-44.

Giovannetti, Manuela, Cristiana Sbrana, Patrizia Strani, Monica Agnolucci, Valeria Rinaudo, and Luciano Avio. 2003. 'Genetic diversity of isolates of Glomus mosseae from different geographic areas detected by vegetative compatibility testing and biochemical and molecular analysis', *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 616-24.

Giovannetti, Mil, and B Mosse. 1980. 'An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots', *New Phytologist*: 489-500.

Gonzalez-Chavez, MC, R Carrillo-Gonzalez, SF Wright, and KA Nichols. 2004. 'The role of glomalin, a protein produced by arbuscular mycorrhizal fungi ,in sequestering potentially toxic elements', *Environmental pollution*, 130: 317-23.

He, Xinhua, and Kazuhide Nara. 2007. 'Element biofortification: can mycorrhizas potentially offer a more effective and sustainable pathway to curb human malnutrition?', *Trends in Plant Science*, 12: 331-33.

Hildebrandt, Ulrich, Katharina Janetta, and Hermann Bothe. 2002. 'Towards growth of arbuscular mycorrhizal fungi independent of a plant host', *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 1919-24.

https://invam.wvu.edu/home.

Huising, EJ, Richard Coe, JE Cares, JN Louzada, R Zanetti, Fátima MS Moreira, and DE Bignell. 2012. 'Estrategias de muestreo y diseño para la evaluación de la biodiversidad bajo el suelo', *Manual de biología de suelos tropicales. México: Instituto Nacional de Ecología*: 53-90.

Janos, David P, Sara Garamszegi, and Bray Beltran. 2008. 'Glomalin extraction and measurement', *Soil Biology and Biochemistry*, 40: 728-39.

Koskey, RE. 1983. 'A convenient, permanent slide mounting medium', *Newsletter Mycol. Soc. Amer.*, 34: 59.

MacDonald, RM. 1981. 'Routine production of axenic vesicular□arbuscular mycorrhizas', *New Phytologist*, 89: 87-93.

Morton, JB. 1991. 'INVAM newsletters, vol. 1-5', *West Virginia University*.

Mukerji, Krisha Gopal, C Manoharachary, and BP Chamola. 2002. *Techniques in mycorrhizal studies* (Springer Science & Business Media.(

Nichols, KA, and SF Wright. 2005. 'Comparison of glomalin and humic acid in eight native US soils', *Soil Science*, 170: 985-97.

Pacioni, G, and S Rosa. 1985. 'An improved filtering apparatus for the 'wet-sieving and decanting'technique for extraction of endogonaceous spores', *Bulletin of the British Mycological Society*, 19: 66-68.

Pacioni, Giovanni. 1992. '16 Wet-sieving and Decanting Techniques for the Extraction of Spores of Vesicular-arbuscular Fungi.' in, *Methods in Microbiology* (Elsevier.(

Phillips, J M[illegible], and DS Hayman. 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: 158-61.

Rillig, Matthias C. 2004. 'Arbuscular mycorrhizae, glomalin, and soil aggregation', *Canadian Journal of Soil Science*, 84: 355-63.

Ross, JP, and JA Harper. 1970. 'Effect of Endogone mycorrhiza on soybean yields', *Phytopathology*, 60: 552-56.

Sieverding, Ewald. 1983. 'Manual de métodos para la investigación de la micorriza vesículo-arbuscular en el laboratorio.'

Simpson, D, and MJ Daft. 1990. 'Spore production and mycorrhizal development in various tropical crop hosts infected with Glomus clarum', *Plant and soil*, 121: 171-78.

Srinivasan, M, K Kumar, K Kumutha, and P Marimuthu. 2014. 'Establishing monoxenic culture of arbuscular mycorrhizal fungus Glomus intraradices through root organ culture', *Journal of Applied and Natural Science*, 6: 290-93.

Steinberg, Peter D, and Matthias C Rillig. 2003. 'Differential decomposition of arbuscular mycorrhizal fungal hyphae and glomalin', *Soil Biology and Biochemistry*, 35: 191-94.

Struble, JE, and HD Skipper. 1988. 'Vesicular-arbuscular mycorrhizal fungal spore production as influenced by plant species', *Plant and soil*, 109: 277-80.

Tommerup, IC. 1992. '2 Methods for the Study of the Population Biology of Vesicular-arbuscular Mycorrhizal Fungi.' in, *Methods in Microbiology* (Elsevier.(

Walley, Frances L, and James J Germida. 1995. 'Estimating the viability of vesicular-arbuscular mycorrhizae fungal spores using tetrazolium salts as vital stains', *Mycologia*, 87: 273-79.

Wang, B, and Y-L Qiu. 2006. 'Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants', *Mycorrhiza*, 16: 299-363.

Woomer, Paul, James Bennett, and Russell Yost. 1990. 'Overcoming the inflexibility of most□probable□number procedures', *Agronomy journal*, 82: 349-53.

Wright, Sarah F, and Am Upadhyaya. 1998. 'A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi', *Plant and soil*, 198: 97-107.

Wright, SF, M Franke-Snyder, JB Morton, and A Upadhyaya. 1996. 'Time-course study and partial characterization of a protein on hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi during active colonization of roots', *Plant and soil*, 181: 193-203.

Wright, SF, and Linda Jawson. 2001. 'A pressure cooker method to extract glomalin from soils', *Soil Science Society of America Journal*, 65: 1734-35.

Wright, SF, and A Upadhyaya. 1999. 'Quantification of arbuscular mycorrhizal fungi activity by the glomalin concentration on hyphal traps', *Mycorrhiza*, 8: 283-85.