

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور

نشریه فنی

افزایش رشد و عملکرد آویشن کوهی (*Thymus kotschyanus*) با استفاده از قارچ‌های میکوریزی آربسکولار

نگارش:

محمد متینی‌زاده^۱، الهام نوری^۲، طاهره علی‌زاده^۲ و سمانه اسدی صنم^۱

۱- عضو هیئت علمی مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور

۲- کارشناس پژوهش مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور

عنوان طرح منتج به نشریه	کد مصوب
کارایی میکوریزی آربسکولار در افزایش رشد و عملکرد آویشن کوهی <i>Thymus kotschyanus</i> برای تولید فناورانه مواد تکثیری آغشته به قارچ	۹۷۱۴۴۳-۱۱۳-۰۹-۰۹-۲۴



عنوان نشریه: افزایش رشد و عملکرد آویشن کوهی (*Thymus kotschyanus*) با استفاده از قارچ‌های میکوریزی آربسکولار

نگارش:

محمد متینی‌زاده- دانشیار پژوهش، موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران
 الهام نوری- کارشناس پژوهش، موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران
 طاهره علی‌زاده- کارشناس پژوهش، موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران
 سمانه اسدی صنم- استادیار پژوهش، موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

تهیه شده در: مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، اداره ترویج و انتقال یافته‌های تحقیقاتی، بخش تحقیقات جنگل

مدیر داخلی: فاطمه عباسپور

ویراستار ادبی: اصغر احمدی

نوبت چاپ: اول - ۱۴۰۳

شمارگان: الکترونیکی

نشانی: بزرگراه تهران-کرج، خروجی پیکانشهر، شهرک سرو آزاد، خیابان شهید علی گودرزی، بلوار باغ گیاه‌شناسی ملی ایران، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور

سندوق پستی: ۱۳۱۸۵-۱۱۶ تلفن: ۵-۴۴۷۸۷۲۸۲-۰۲۱ وبسایت: www.rifr-ac.ir

این نشریه به شماره ۶۵۶۵۷ در تاریخ ۱۴۰۳/۰۵/۳۱ در مرکز اطلاعات و مدارک علمی کشاورزی به ثبت رسیده است.

➤ مخاطبان نشریه:

- محققان، کارشناسان سازمان منابع طبیعی و آبخیزداری کشور، مدیران ادارات منابع طبیعی و تولیدکنندگان نهال، تولیدکنندگان گیاهان دارویی، مراکز استخراج اسانس و ترکیبات مؤثر دارویی

➤ اهداف آموزشی:

- جداسازی و تکثیر قارچ‌های آربسکولار همزیست با آویشن کوهی (*Thymus kotschyanus*) در طبیعت به منظور تولید مایه تلقیح میکوریزی
- تولید آویشن کوهی میکوریزی با استفاده از مایه تلقیح میکوریزی اختصاصی آویشن ارزیابی تأثیر قارچ‌های آربسکولار (AMF) بر ویژگی‌های مورفولوژیک، ماده خشک و عملکرد کمی و کیفی اسانس آویشن کوهی

فهرست مطالب

۱	چکیده
۱	گونه آویشن کوهی و اهمیت آن
۶	نقش قارچ‌های میکوریز آربسکولار در همزیستی با گیاه
۷	ارتباط قارچ‌های میکوریز آربسکولار با گیاهان دارویی
۹	مراحل انجام کار
۲۱	نتیجه‌گیری
۲۲	منابع مورد استفاده



افزایش رشد و عملکرد کمی و کیفی آویشن کوهی
با استفاده از قارچ‌های میکوریزی آربسکولار

چکیده

قارچ‌های میکوریز آربسکولار، به عنوان یکی از مهمترین میکروارگانیسم‌های موجود در خاک، نقش مهمی را در جذب آب، مواد غذایی به‌ویژه فسفر و مقاومت به تنش‌ها مانند شوری، خشکی و عوامل بیماری‌زا در خاک دارند. در این نشریه به منظور بررسی امکان افزایش درصد استقرار و سرعت رشد گیاه آویشن کوهی (*Thymus kotschyanus*) به کمک همزیستی با قارچ‌های میکوریزی آربسکولار، به نحوه تولید مایه تلقیح قارچ‌های میکوریزی آربسکولار همزیست با آویشن، تولید گیاهچه‌های میکوریزی آن، انتقال گیاهچه‌ها به مزرعه و اثر قارچ‌های میکوریزی بر مقدار اسانس و مواد مؤثره پرداخته شده است. درکل، نتایج نشان داد که جداسازی و استفاده از قارچ‌های مختلف همزیست بومی موجود در رویشگاه اصلی، موجب بهبود رشد بوته‌های آویشن کوهی، افزایش بازده اسانس و ترکیب ژرانیول در این گیاه دارویی شد.

آویشن کوهی و اهمیت آن

آویشن کوهی (*Thymus kotschyanus* Boiss. & Hohen.) گیاهی چوبی تقریباً راست و کوتاه قد، پرشاخه و منشعب، بیشتر چمنی متراکم با طوقه بسیار ضخیم می‌باشد و در مناطق نیمه‌خشک و سرد پراکنش دارد. پراکنش جغرافیایی آن در ترکیه، عراق، قفقاز و ایران می‌باشد که در ایران، در شمال، شمال‌غرب، غرب و مرکز رویشگاه دارد و در آذربایجان، همدان، کرمانشاه، خراسان، سمنان، تهران، البرز و قزوین پراکنش دارد (جم‌زاد، ۱۳۹۱؛ فلور ایران، تیره نعنائیان). تصویری از این گیاه از رویشگاه آن در قزوین (در شکل ۱) دیده می‌شود.



شکل ۱- بوته آویشن کوهی در مرحله گلدهی کامل در رویشگاه آن در قزوین- الموت
ارتفاع ۲۰۰۰ متر (فلور ایران، تیره نعناعیان)

ماده مؤثره آویشن، اسانس است که با روش تقطیر به دست می‌آید. اسانس آویشن مایعی زرد رنگ تا نارنجی مایل به قرمز تیره با بوی مطبوع قوی و طعم تند می‌باشد. وجود اسانس‌های روغنی و ترکیبات فنلی باارزش، این گیاه را به عنوان یکی از پرمصرف‌ترین و ارزشمندترین گیاهان دارویی جهان تبدیل کرده است که شرایط محیطی رویشگاه و مزرعه در مقدار هر یک از انواع ترکیب‌های فنولی (تیمول- کارواکرول) و غیرفنولی نقش بسزایی دارد و می‌تواند به ظهور یک نوع ترکیب بیوشیمیایی مشخص منجر شود (Senatore, 1996).

از اسانس آویشن کوهی به عنوان یک ماده معطر ضداسپاسم و ضدنفخ استفاده می‌شود؛ همچنین برای درمان سیاه‌سرفه، آسم مرطوب و برونشیت هم توصیه شده است (نجف‌پور نوایی و همکاران، ۱۳۸۶). به دلیل خاصیت ضد میکروبی اسانس آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*)، از آن در ترکیبات ضدقارچی،

فرمولاسیون‌های فراورده‌های دندان‌پزشکی و به مقدار زیادی در دهان‌شویه‌ها، خمیر دندان‌ها، صابون‌ها، پاک‌کننده‌ها و فراورده‌های مختلف ضدعفونی‌کننده استفاده می‌شود (بندیان سفلا و همکاران، ۱۴۰۰). در طب قدیم هم، از دم‌کرده گیاه آویشن کوهی برای درمان سوء هاضمه، رفع تشنج، قاعدگی دردناک، نفخ شکم، سردرد و همچنین درمان التهابات غشای مخاطی ترشحاتی از قسمت فوقانی دستگاه تنفسی استفاده می‌شد (نجف‌پور نوایی و همکاران، ۱۳۸۶).

جوشانده آویشن‌های تازه یا خشک‌شده نیز به عنوان اشتها آور، عرق‌آور و درمان سرفه‌های معمولی کاربرد دارد (فخر طباطبایی، ۱۳۸۵). یکی دیگر از موارد کاربرد عصاره آبی آویشن شیرازی در کاهش فعالیت هلیکوباکترهای دستگاه گوارش است. مشاهدات نشان داده‌اند که عصاره آبی این گیاه به دلیل جلوگیری از فعالیت آنزیم اوره‌آز (Urease)، دارای اثرهای ضد هلیکوباکتر پیلوری است (علی رمائی و همکاران، ۱۳۹۸).

از گیاه آویشن باغی (*Thymus vulgaris*) در درمان بیماری‌های دیابت، کاهش میزان گلوکز سرم خون و ترمیم بافت پانکراس استفاده شده و اثرهای جانبی انسولین را کاهش می‌دهد (رهنما و همکاران، ۱۳۹۸)؛ این موضوع در اثر افزایش فعالیت آنزیم‌های سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) بوده که موجب حفاظت خون و پانکراس در برابر تنش‌های اکسیداتیو می‌شوند. از آنجا که اسانس آویشن شیرازی، توانایی زیادی در کاهش رشد میسلیوم قارچ‌ها و کپک‌ها دارد، می‌تواند برای بازدارندگی رشد کپک‌ها به جای نگهدارنده‌های شیمیایی و قارچ‌کش‌ها در صنعت غذایی استفاده شود، به‌طوری‌که از اسانس روغنی یا محلول الکلی آن در افزایش عمر انبارداری مرکبات و کاهش ضایعات آنها استفاده می‌شود (سنچولی و همکاران، ۱۳۹۴).

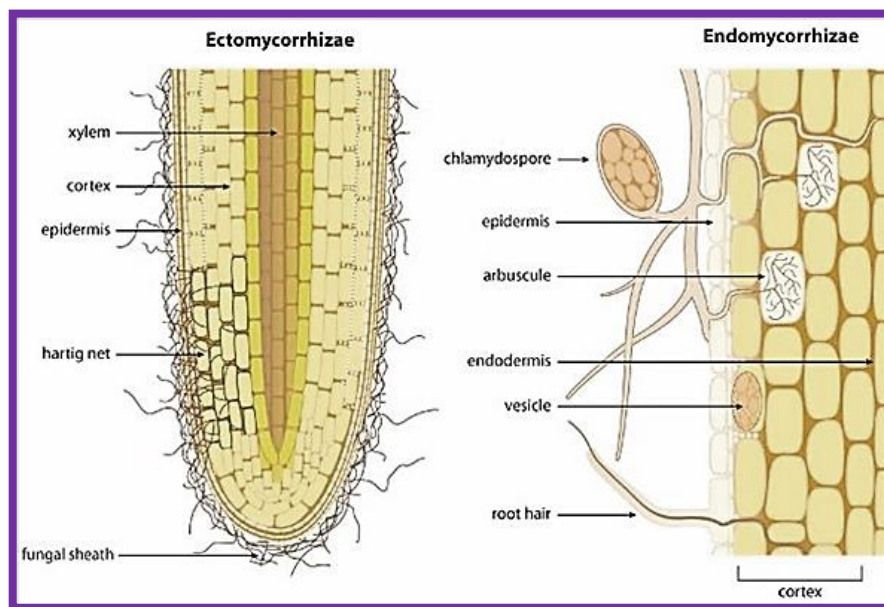
از دیگر موارد کاربرد اسانس آویشن، جایگزینی آنها به جای آنتی‌اکسیدان‌های صنعتی در جلوگیری از اکسیداسیون مواد غذایی است. مشاهده شده است که وجود ترکیبات فنل موجود

در گیاه آویشن دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی طبیعی قوی است که می‌تواند جایگزین و یا مکمل آنتی‌اکسیدان‌های صنعتی در جلوگیری از اکسیداسیون مواد غذایی گردد. استفاده از عصاره گیاهی آویشن باغی در جیره غذایی جوجه‌های گوشتی موجب کاهش لیپیدهای سرمی و کلسترول موجود در بافت گوشت خواهد شد که این موضوع موجب کاهش چربی شکمی و به‌طور کلی چربی خون شده، در نتیجه با مصرف آن میزان LDL و کلسترول‌ها و مواد مضر موجود در گوشت به میزان قابل توجهی کاهش می‌یابد (Gumus et al., 2017).

قارچ‌های میکوریز آربسکولار

قارچ‌های میکوریز یکی از بااهمیت‌ترین میکروارگانیسم‌های موجود در بیشتر خاک‌های تخریب‌نشده هستند، به‌طوری‌که طبق تخمین‌های موجود، حدود ۷۰ درصد توده زنده میکروبی خاک را میسلیم‌های این قارچ‌ها تشکیل می‌دهند (Walker & Schüssler, 2004; Oehl et al., 2011). ریشه گیاه، زیستگاه مناسبی برای فعالیت بسیاری از ریزفاکتورهای خاک ایجاد می‌کند. Frank و McNaughton (۱۹۹۲) این قارچ‌ها را براساس ساختاری به دو گروه میکوریزای داخلی (اندو) و خارجی (اکتو) تقسیم‌بندی کردند (شکل ۲). اکتومیکوریزا، حالتی از همزیستی است که طی آن بخش عمده‌ای از ریشه‌های مویین گیاه توسط غلاف قارچ پوشیده می‌شود و طی آن قارچ وارد فضای داخل ریشه نمی‌شود بلکه در فضای داخل سلولی نفوذ کرده و در نهایت پوشش غلافی کم و بیش ضخیمی روی سطح ریشه‌های کوتاه تغذیه‌کننده ایجاد می‌کند که ریشه را احاطه می‌کنند و اندومیکوریزا حالتی است که در آن قارچ وارد فضای داخل سلولی و سلول‌های پوست ریشه می‌شود، در نتیجه تغییرات ظاهری در سطح ریشه ایجاد نمی‌شود و یا اندک است. تشخیص این نوع میکوریزا با چشم غیرمسلح امکان‌پذیر نبوده و نیاز به رنگ‌آمیزی

ریشه‌ها و مشاهده میکروسکوپی آنهاست. اندومیکوریزا گسترش وسیعی داشته و بسیاری از گیاهان اعم از نهان‌دانگان و بازدانگان و در مواردی خزها نیز از این همزیستی سود می‌برند. مهمترین این نوع، میکوریزی آربسکولار است که به اختصار AM گفته می‌شود. مبنای نامگذاری آن شکل بوته‌ای کوچک (آربسکول) و محفظه کیسه‌ای انباشته از مواد ذخیره‌ای (وزیکول) در درون گیاه میزبان است. آربسکول‌ها محل تبادل مواد بین قارچ و گیاه میزبان در همزیستی است. شناسایی گونه‌های این نوع قارچ، براساس مورفولوژی اسپور و دیواره آن می‌باشد و در حال حاضر بیشتر متخصصان مربوطه با این روش تشخیص می‌دهند.



شکل ۲- میکوریزای خارجی (اکتومیکوریزا) و میکوریزای داخلی (اندومیکوریزا)

نقش قارچ‌های میکوریزا آربسکولار در همزیستی با گیاه

افزایش جذب آب

قارچ‌های میکوریزای آربسکولار توانایی برقرار کردن رابطه همزیستی با ۸۰ درصد از خانواده‌های گیاهی را دارند. این قارچ‌ها در ثبات خاک‌دانه‌های خاک، جلوگیری از فرسایش و کم کردن اثرهای تنش ناشی از عوامل زنده و غیره زنده خاک مؤثر هستند (Smith and Read, 2008). طول یک شبکه منشعب از هیف‌های قارچ میکوریزا در خاک می‌تواند به ۳۰ متر در هر گرم خاک برسد (Wilson et al., 2009). این شبکه می‌تواند دربرگیرنده حدود ۵۰ درصد از مسیلیوم‌های خاک باشد (Rillig et al., 2002)، در نتیجه بخش عمده‌ای از زی‌توده خاک را تشکیل دهد (Leake et al., 2004). این شبکه مسیلیومی می‌تواند در ثبات و نگهداری آب در خاک مشارکت داشته باشد (Bedini et al., 2009). ترکیبی از شبکه گسترده هیف‌ها و ترشح نوعی پروتئین به نام گلومالین عامل مهم در کمک به تشکیل و پایداری خاک‌دانه در نظر گرفته می‌شوند (Caravaca et al., 2006).

احیای پوشش گیاهی

همزیستی گیاهان با قارچ میکوریزا، علاوه بر اثرهای مثبت بر کمیت، دارای اثرهای مثبت زیادی بر کیفیت گیاه دارد که اثرهای سوء ناشی از فقر عناصر غذایی و تنش‌های خشکی و شوری را کاهش (Sasanelli et al., 2009) و رشد گیاه، جذب عناصر غذایی مانند نیتروژن، فسفر، برگشت‌پذیری (پس از تنش) و تحمل گیاه را افزایش می‌دهد (Franken, 2012). احیای پوشش گیاهی یکی از بهترین و مؤثرترین راه‌ها برای کاهش تخریب خاک و جلوگیری از گسترش آن به مناطق مجاور است (Zubek and Blaszkowski, 2009). بنابراین مدیریت

جوامع میکروبی با تأکید بر جهت‌دهی همزیستی میکوریزایی می‌تواند نقش مهمی در احیاء اکوسیستم‌های تخریب‌شده داشته باشد (de Souza *et al.*, 2010).

افزایش رشد گیاه

بررسی همزیستی میکروارگانیسم‌های خاک با ریشه گیاهان یکی از مهمترین مباحث فیزیولوژی نوین است (Bender *et al.*, 2015). به دلیل آثار بسیار مفیدی که قارچ‌های میکوریز آربسکولار در رشد و نمو گیاهان و افزایش مقاومت آنها به شرایط نامساعد دارند (2001 Schüßler *et al.*) مورد توجه بسیاری از پژوهشگران هستند. همزیستی میکوریزی نقش بسیار مهمی در پایداری و توسعه جوامع گیاهان ایفا می‌کند. قارچ‌های همزیست میکوریزایی اثر کیفی مثبت بر رشد و تغذیه گیاه میزبان دارند و جذب عناصر نیتروژن (N)، فسفر (P)، گوگرد (S)، پتاسیم (K)، منیزیم (Mg)، کلسیم (Ca)، منگنز (Mn) و آهن (Fe) را افزایش می‌دهند (2015 Bender *et al.*).

ارتباط قارچ‌های میکوریز آربسکولار با گیاهان دارویی

قارچ‌های میکوریز آربسکولار علاوه بر نقشی که در بهبود رشد و استقرار گیاهان دارویی در اکوسیستم‌های رویشگاهی دارند سبب افزایش بیوسنتز مواد مؤثره در این گیاهان می‌شوند (Zubek *et al.*, 2012). میزان همزیستی قارچ‌های میکوریز آربسکولار با گیاهان، بستگی فراوانی با ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک ریزوسفر گیاهان دارد و درک سازوکار تأثیر عوامل فیزیکی و شیمیایی مختلف خاک (اسیدیته، عناصر معدنی و آلی، بافت) بر چگونگی همزیستی قارچ‌های میکوریز آربسکولار، در مدیریت اکوسیستم‌های طبیعی و زراعی گیاهان دارویی بسیار حائز اهمیت است (Rillig and Mummey, 2006; Arpanahi *et al.*, 2020).

گیاهان دارویی برای هزاران سال با کمترین آثار جانبی به بهداشت و سلامت بشر کمک کرده‌اند. در سال‌های اخیر، افزایش تقاضا برای مصرف گیاهان دارویی و فراورده‌های آنها از یکسو و کمیاب شدن این گیاهان به علت برداشت‌های بی‌رویه از سوی دیگر، از جمله چالش‌هایی هستند که تحقیقات حفظ و احیای اکوسیستم‌های طبیعی و تکثیر و توسعه کشت گیاهان دارویی در اکوسیستم‌های زراعی را اجتناب‌ناپذیر کرده‌اند. با وجود تحقیقات به نسبت خوبی که در زمینه همزیستی قارچ‌های میکوریز آربسکولار با گیاهان زراعی و باغی انجام شده و فناوری استفاده از آنها برای بهبود کمیت و کیفیت این دسته از گیاهان کاربردی شده است، در مورد گیاهان دارویی این تحقیقات به گیاهان کمتری محدود است (Zeng et al., 2013)، البته در مورد اثر همزیستی قارچ‌های میکوریز آربسکولار بر پراکنش گیاهان دارویی در عرصه‌های طبیعی، تعداد مطالعات به مراتب کمتر است. قارچ‌های میکوریز آربسکولار به دلیل نقش تنظیم‌کنندگی که به عنوان کودهای زیستی و افزایش جذب بعضی از عناصر درشت و ریزمغذی دارند و با راه‌اندازی مسیرهای پیام‌رسانی، سبب افزایش قدرت حیات و مقاومت گیاهان در مقابل آفات و بیماری‌ها شده و با ایجاد شبکه هیف در ریزوسفر، بر اصلاح و حفظ ساختار خاک و انباشت آب در محیط ریشه مؤثر هستند و سبب فائق آمدن گیاهان در مقابل تنش کم‌آبی می‌شوند. بنابراین، در استقرار و گسترش گیاهان دارویی در رویشگاه‌های طبیعی نقش مهم و حیاتی دارند (Hosseini et al., 2021). مستندات علمی نشان داده است که همزیستی میکوریزی نقش مهمی در پایداری و توسعه جوامع گیاهان دارویی در اکوسیستم‌های نیمه‌استپی، خشک و کوهستانی و مناطق کویری که فشارهای گوناگون فیزیکی و اکولوژیک بر آنها حاکم است، ایفا می‌کنند (Barea et al., 2011, Akachoud et al., 2022).

از آنجا که آویشن کوهی یکی از پرمصرف‌ترین گیاهان دارویی است، متأسفانه به دلیل برداشت بی‌رویه، بیشتر رویشگاه‌های این گیاه به شدت در معرض تهدید هستند (مهرنیا و رامک، ۱۳۹۳). یکی از مهمترین محدودیت‌های حاکم بر زراعت گیاهان دارویی، شناخت ویژگی‌های زیستی خاک و ایجاد شرایط بهینه کاشت است (Lombini et al., 1999). از این رو، شناخت فیزیولوژی همزیستی میکروارگانیسم‌ها در ریزوسفر ریشه گیاهان دارویی می‌تواند در استقرار و گسترش کشت گیاهان دارویی استفاده شود. بنابراین این نشریه با هدف: (۱) بررسی توانایی کاربرد قارچ‌های میکوریزا به عنوان یک قارچ همزیست و سازگار با طبیعت در احیای عرصه‌های طبیعی، (۲) زراعت و افزایش تولید و استقرار اولیه گیاه آویشن کوهی با بکارگیری مایکوریزا و (۳) امکان تولید و جداسازی آن با استفاده از گیاه تله و تولید مایه تلقیح براساس اسپورهای بومی موجود در رویشگاه‌ها، به عنوان تکنیکی برای اصلاح و احیا مراتع در راستای بهبود استقرار گیاهان با توجه به اصول کشاورزی اکولوژیک انجام شد.

مراحل انجام کار

جمع‌آوری نمونه‌های خاک و ریشه

نمونه‌برداری از خاک آویشن کوهی در مرتع الموت (۱۰۰ کیلومتری شمال شرقی شهر قزوین و در محدوده الموت شرقی در ارتفاع ۲۲۵۰ متری از سطح دریا) با روش کاملاً تصادفی از عمق صفر-۲۰ سانتی‌متر و اطراف ریشه‌های موئین برای جداسازی اسپورهای بومی به منظور کاشت گیاه تله (ذرت) در اوایل بهار انجام شد. نمونه‌ها در محل خنک در کیسه‌های پلاستیکی به آزمایشگاه منتقل و در یخچال نگهداری شدند.

شناسایی قارچ‌های همزیست با ریشه گونه آویشن کوهی

برای شناسایی قارچ‌های همزیست براساس مورفولوژی اسپور آنها، ابتدا اسپورها از خاک اطراف ریشه‌های بوته‌های آویشن جدا شدند. به این منظور، نمونه‌های خاک در هوا خشک و بعد از الک دو میلی‌متری گذرانده شدند. با استفاده از روش گردمن و نیلسون (۱۹۶۳)، در زیر میکروسکوپ اسپورهای غیرهم‌شکل مشاهده شده از یکدیگر تفکیک گردیده و جداگانه نگهداری شدند. از هر نمونه تعدادی اسپور بر روی لام گذاشته و با استفاده از چسب کانادا بالزام ثابت و از آنها عکس تهیه شد. برای شناسایی اسپورهای قارچی، از کلیدهای Benny و Morton (۱۹۹۰) و Trappe (۱۹۸۲) و اطلاعات سایت INVAM (۲۰۰۳) استفاده شد.

تکثیر اسپور، هیف و قطعات ریشه قارچ‌های میکوریزی با کاشت ذرت

به منظور جداسازی اسپورها از خاک اطراف بوته‌های آویشن، اسپورها به روش الک مرطوب و سانتریفوژ کردن آنها و با استفاده از روش گردمن و نیلسون در زیر استریومیکروسکوپ، اسپورهای سالم و جوان غیرهم‌شکل مشاهده و از یکدیگر تفکیک و به گیاه تله (ذرت) در کیسه گلدان تلقیح شد (Gerdemann and Nicolson, 1968). این قارچ‌ها بر خلاف میکروارگانیسیم‌های دیگر در محیط کشت صنعتی تکثیر نمی‌یابند و نیاز به یک گیاه دیگر که اصطلاحاً تله نامیده می‌شود، دارند. گیاهانی از جمله یونجه، شبدر، سورگوم و ذرت گیاهان مناسبی به عنوان گیاه تله هستند که براساس تجربه، ذرت بهترین اسپورزایی را دارد. پس از سه ماه از رشد گیاه ذرت، به منظور تکثیر اسپور یک ماه گیاه در معرض تنش خشکی قرار می‌گیرد.

برای کشت ذرت از ترکیب خاک، ماسه استریل شده (به مدت یک ساعت در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد) و پرلیت (به نسبت ۲:۱:۱) استفاده شد. پس از تکثیر قارچ و ایجاد همزیستی میکوریزی آربسکولار با گیاه تله (شکل ۳)، بهترین بذره‌های آویشن که از قبل با انجام آزمون جوانه‌زنی مشخص شدند، برای کاشتن انتخاب شد.

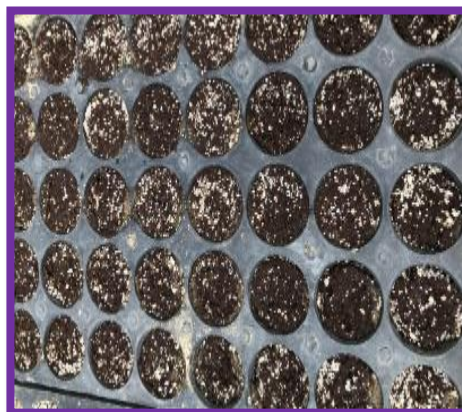
افزایش رشد و عملکرد کمی و کیفی آویشن کوهی
با استفاده از قارچ‌های میکوریزی آربسکولار



شکل ۳- ذرت‌های کشت شده حاصل از تلقیح
با اسپورهای جداشده از ریزوسفر آویشن کوهی
در گلخانه و تنش خشکی به منظور تکثیر آن

مدیریت کاشت، نگهداری و اعمال تیمارها

ترکیب خاک برای سینی‌های کشت دارای تیمار میکوریزی، چهار واحد پیت‌ماس استریل (حجم هر واحد یک بشر دو لیتری است)، یک واحد مایه تلقیح میکوریزی (تهیه شده از ریزوسفر و خاک اطراف ریشه گیاه ذرت) و یک واحد پرلیت استریل بود. تیمار شاهد، به همین طریق بدون مایه تلقیح میکوریزی بود. سپس این ترکیب‌ها به هر پات سینی کشت منتقل شدند (شکل ۴).



شکل ۴- مراحل آماده‌سازی ترکیب خاک برای تیمارهای مختلف میکوریزی
و غیر میکوریزی (شاهد) در گلخانه

آبیاری سینی‌های کشت در گلخانه به وسیله مه‌پاش روزانه و به مدت ۱۵ دقیقه انجام شد تا رطوبت خاک حفظ شود. بعد از دو هفته از رشد گیاهچه‌ها، عملیات تنک‌کردن انجام شد تا در نهایت یک گیاه که رشد بهتری داشت در هر پات سینی کشت باقی ماند. بعد از رشد کافی نشاها (مرحله شش تا هشت برگی نشاها)، سینی‌های کشت به مزرعه آماده‌سازی شده در ایستگاه تحقیقات البرز- مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با سه تکرار، منتقل شد. انتقال نشاها به صورت خطی (جوی و پشته) بود و هر تیمار

در یک خط با فاصله ۵۰ سانتی‌متر از هم با حفر چاله‌هایی در فاصله‌های مدنظر روی پشته‌های مرطوب در اواسط بهار اعمال شد. فاصله بین خطوط کشت، ۵۰ سانتی‌متر در سه تکرار بود. خط کاشت اول، تیمار شاهد بود که بدون مایه تلقیح میکوریزی و فقط کاشت بونه‌های ریشه‌دار آویشن کوهی بود. مقدار مایه تلقیح قارچی برای هر تیمار، ۵۰ میلی‌لیتر بر گرم بود که به چاله‌های کاشت در تماس با ریشه گیاه و ریزوسفر اضافه شد و بلافاصله آبیاری قطره‌ای انجام گردید. عملیات آبیاری به صورت یک روز درمیان تا سه هفته و پس از آن به هفته‌ای دو و یکبار با توجه به نیاز گیاه کاهش یافت. در طول مدت رشد، عملیات وجین‌کردن علف‌های هرز نیز به صورت دستی انجام شد. در این آزمایش هیچ‌گونه نهاده شیمیایی استفاده نشد (شکل ۵). برخی از ویژگی‌های خاک مزرعه در آزمایشگاه خاک‌شناسی مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور اندازه‌گیری شده است که در جدول ۱ مشاهده می‌شود.

جدول ۱- ویژگی‌های خاک مزرعه

اسیدیته	بافت	ماده آلی (درصد)	پتاسیم (ppm)	فسفر (ppm)
۸/۱	لومی شنی	۱/۸	۷۸۸/۵	۵۱/۹

افزایش رشد و عملکرد کمی و کیفی آویشن کوهی
با استفاده از قارچ‌های میکوریزی آربسکولار



شکل ۵- انتقال نهال‌های آویشن از سینی‌های کشت موجود در شرایط گلخانه به مزرعه

برداشت و جمع‌آوری گیاه

در زمان ۵۰ درصد گلدهی آویشن‌ها (خروج گل‌ها در بیش از ۵۰ درصد میان گل‌های موجود)، صفات مورفولوژیک از شاخساره گیاه مانند ارتفاع بوته و مساحت تاج‌پوشش با رعایت اثر حاشیه، در شش بوته اندازه‌گیری شد. سپس، نسبت به برداشت تصادفی از سرشاخه‌های گلدان گیاه از پنج سانتی‌متری بالای خاک اقدام شد. برای تعیین ماده خشک گیاه، نمونه‌های برداشت شده در محیط سایه و در جریان هوای خشک تا زمان از دست دادن رطوبت نگهداری شدند و بعد نمونه‌های خشک شده، برای محاسبه عملکرد ماده خشک و اسانس‌گیری، با ترازوی دقیق توزین گردیدند (شکل ۶).



شکل ۶- نمایی از بوته آویشن در مرحله گلدهی (زمان برداشت)

استخراج اسانس و شناسایی ترکیبات اسانس

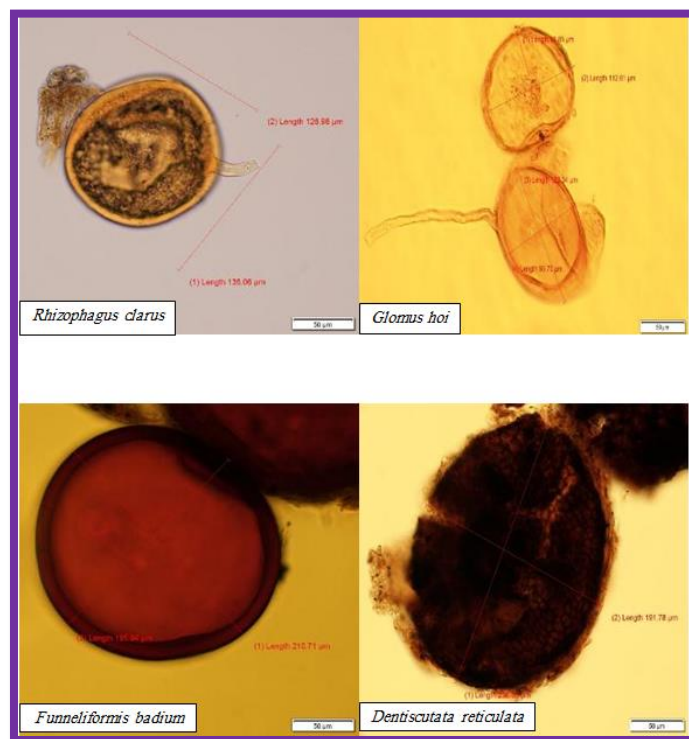
پس از برآورد عملکرد ماده خشک گیاه، اسانس‌گیری از ۳۰ گرم از سرشاخه‌های گلدار خرد شده گیاه به مدت دو ساعت با استفاده از روش تقطیر با آب به وسیله دستگاه کلونجر انجام شد (شکل ۷). اسانس بدست آمده تا زمان آنالیز ترکیبات و اجزای اسانس، در یخچال نگهداری و در نهایت، بازده اسانس براساس وزن خشک سرشاخه محاسبه شد. ترکیب‌های تشکیل دهنده اسانس با دستگاه گاز کروماتوگراف (GC) و گاز کروماتوگراف متصل به طیف‌سنج جرمی (GC/MS) شناسایی کمی و کیفی گردید (شکل ۷).



شکل ۷- اسانس‌گیری از بوته‌های میکوریزی و غیرمیکوریزی آویشن کوهی
با دستگاه کلونجر

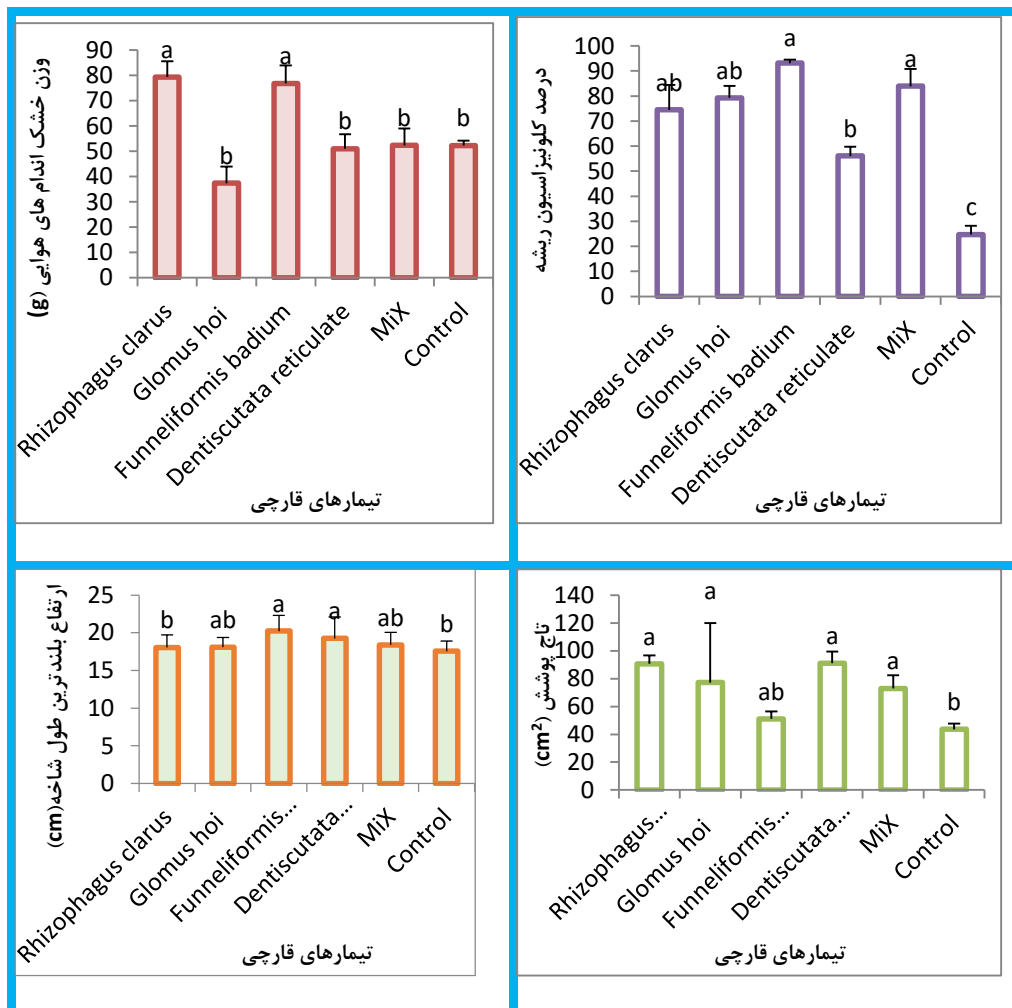
شناسایی قارچ‌های مختلف میکوریزی در ریزوسفر آویشن کوهی

چهار گونه قارچی مختلف در اطراف ریزوسفر آویشن کوهی منطقه الموت براساس خصوصیات مورفولوژیک در آزمایشگاه اکوفیزیولوژی و بیوتکنولوژی بخش تحقیقات جنگل مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور شناسایی شد (شکل ۸). سپس این چهار گونه اسپور قارچ میکوریزی از خاک ریزوسفر آویشن کوهی در منطقه جداسازی و با گیاه تله تکثیر شدند. آنگاه مایه تلقیح میکوریزی شامل چهار قارچ میکوریزی شناسایی شده *Clarus Rhizophagus*، *Glomus hoi*، *Funneliformis badium* و *Dentiscutata reticulata* به صورت جداگانه و مخلوط آن تهیه و با گونه آویشن کشت شدند.



شکل ۸- قارچ‌های مختلف میکوریزی شناسایی شده از ریزوسفر آویشن کوهی در الموت

نتایج نشان داد میزان درصد کلونیزاسیون میکوریزی در ریشه بوته‌های میکوریزی آویشن کوهی با تیمارهای مختلف قارچ، با بوته‌های شاهد تفاوت معنی‌داری داشتند که بیشترین آن، مربوط به تیمار قارچی *Funneliformis badium* بود (شکل ۹). سطح تاج‌پوشش در بین تیمارهای مختلف قارچ، اختلاف معنی‌داری نداشت و همگی بیشتر از تیمار شاهد بودند. بیشترین ارتفاع بوته مربوط به گونه *Funneliformis badium* بود که با دو تیمار شاهد و *Rhizophagus clarus* اختلاف معنی‌دار نشان داد. همچنین وزن خشک اندام‌های هوایی در تیمارهای میکوریزی *Funneliformis badium* و *Rhizophagus clarus* به‌طور معنی‌داری بیشتر از شاهد بود (شکل ۹).



شکل ۹- نتایج درصد کلونیزاسیون، وزن خشک، تاج پوشش و ارتفاع آویشن تحت تیمارهای مختلف میکوریزی و شاهد در سال دوم

بازده اسانس در آویشن‌های دوساله برداشت شده، در بیشتر تیمارهای میکوریزی نزدیک به هم و به‌طور معنی‌داری از تیمار شاهد به لحاظ فراهمی آب بیشتر، دسترسی بهتر به مواد غذایی و رشد بیشتر، بالاتر بود (جدول ۲).

جدول ۲- بازده اسانس گیاه *Th. kotschyanus* تحت تأثیر تیمارهای مختلف

قارچ‌های میکوریزی و شاهد در سال دوم مزرعه

تیمارهای میکوریزی	<i>Rhizophagus clarus</i>	<i>Glomus hoi</i>	<i>Funneliformis badii</i>	<i>Dentiscutata reticulata</i>	Mix	Control
بازده اسانس (درصد)	۲/۵	۲/۷	۲/۲	۲/۴	۲/۲	۱/۴

در سال دوم مزرعه، ژرانیول ترکیب عمده اسانس در آویشن کوهی بود که با میانگین ۷۴/۶ درصد در تیمار قارچ میکوریزی مخلوط، بیشترین مقدار را داشت که نشان‌دهنده نقش مخلوط قارچ میکوریزی در سال دوم کاشت (سال اول، سال استقرار گیاه می‌باشد) در افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه گیاه می‌باشد (جدول ۳). ژرانیول استات، ترکیب بعدی بود که بیشترین مقدار (۲۵/۵ درصد) را در تیمار شاهد نشان داد که نشان‌دهنده این مطلب است که ژرانیول بیشتری به ژرانیول استات تبدیل شده است. دو ترکیب مهم فنلی (تیمول و کارواکرول) در آویشن‌ها، در گونه آویشن کوهی غالب نبود که بیشترین مقدار آن برای تیمول، ۱۱/۲ درصد و برای کارواکرول، ۱۳/۹ درصد در بین تیمارهای میکوریزی اندازه‌گیری و ثبت شد (جدول ۳).

جدول ۳- ترکیبات برتر اسانس گیاه *Th. kotschyanus* تحت تأثیر تیمارهای مختلف

قارچ‌های میکوریزی و شاهد در سال دوم مزرعه

ترکیبات اسانس	تیمارهای میکوریزی					Control
	<i>Rhizophagus clarus</i>	<i>Glomus hoi</i>	<i>Funneliformis badii</i>	<i>Dentiscutata reticulata</i>	Mix	
ژرانیول	۴۶/۸	۵۷/۳	۵۱/۱	۶۶/۳	۷۴/۶	۴۲/۴
ژرانیول استات	۸	۲۳/۶	۵/۹	۱۹/۶	۷/۴	۲۵/۵
تیمول	۱۱/۲	۰/۹	۸/۴	۱/۱	۰/۶	۳/۵
کارواکرول	۹	۱/۲	۶/۱	۱۳/۹	۴/۳	۹/۵

نتیجه‌گیری

این تحقیق در راستای کاربرد کودهای زیستی در عرصه‌های مرتعی با فناوری جداسازی اسپورهای بومی منطقه و نیز تلقیح آنها با بذرهای آویشن کوهی به جای نهاده‌های شیمیایی، استقرار گیاهان در اصلاح و توسعه مراتع و افزایش عملکرد مورد نیاز در مناطق نیمه‌خشک انجام شده است. براساس یافته‌های این پژوهش مشخص شد که گیاه آویشن کوهی قادر است با قارچ‌های میکوریزی آربسکولار همزیستی داشته باشد و تلقیح گیاهان با میکوریز می‌تواند باعث افزایش استقرار، رشد و عملکرد گیاه آویشن کوهی نسبت به شرایط شاهد شود. نتایج حاصل از این بررسی، بیانگر وجود همزیستی قارچ میکوریز گونه *Funneliformis badium* با گیاه دارویی آویشن کوهی در افزایش تولید و استقرار اولیه گیاه در سطح مرتع نیمه‌خشک الموت قزوین می‌باشد. به‌طور کلی نتایج بدست آمده از این تحقیق نشان می‌دهد که همزیستی میکوریزایی باعث افزایش رشد بوته‌های آویشن کوهی شده است. قارچ‌های میکوریزی قادر هستند با افزایش سطح جذب ریشه و تحریک ریشه‌زایی، بیشتر مواد غذایی موجود در خاک را در اختیار گیاه قرار دهند و با افزایش ریشه‌زایی و نفوذ ریشه‌ها، استقرار و بقای آن را بهبود بخشند.

منابع

- بندیان سفلا، ل.، مقدم، م.، بحرینی، م. ۱۴۰۰. بررسی اثر ضد باکتریایی و خاصیت سینرژیستی عصاره اتانولی آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*)، مریم گلی بنفش (*Salvia verticillat*) و اناریجه (*Froriepiea subpinnata*) بر باکتری‌های عامل پوسیدگی سبزیجات. میکروپ‌شناسی مواد غذایی، ۸.
- رهنما، س.، اسدزاده، ع.، حیدریان، ف. ۱۳۹۸. بررسی آزمایشگاهی اثر گیاه آویشن باغی در مهار آنزیم آلفا-گلوکوزیداز به منظور درمان بیماری دیابت. دیابت و متابولیسم ایران، ۱۸(۴): ۱۷۳-۱۷۸.
- سنچولی، ن.، غفاری، م.، قرایی، ا. ۱۳۹۴. بررسی مقایسه‌ای اثرات ضدقارچی اسانس‌های آویشن شیرازی، زیره سبز و میخک هندی در مقایسه با فرمالین بر قارچ مولد آفلاتوکسین. پاتوبیولوژی مقایسه‌ای، ۱۲(۳): ۱۶۹۱-۱۶۹۸.
- رمائی، ع.، ربانی، م.، خوراسگانی، م.، رحمانی، م.، زرکش اصفهانی، س.ح. ۱۳۹۸. تاثیر گیاهان دارویی بومی ایران بر هلیکوباکتر پیلوری: مطالعه مروری. زیست‌شناسی میکروارگانیزم‌ها، ۸(۳۱): ۱-۱۸.
- مومنی، ت.خ.، شاه‌رخ، ن.ب. ۱۳۷۰. اسانس‌های گیاهی و اثرات درمانی آن‌ها. انتشارات دانشگاه تهران.
- مهرنیا، م.، رامک، پ. ۱۳۹۳. بررسی فلوریستیک حوزه آبخیز نوژیان (استان لرستان). زیست‌شناسی گیاهی ایران، ۶(۲۰): ۱۱۳-۱۳۶.
- نجف‌پور نوایی، م.د.، سفیدکن، ف.، میرزا مهدی. ۱۳۸۶. معرفی گیاهان دارویی ضدسرطان ایران. مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع ایران، ۲۶۱ صفحه.
- جم‌زاد، ز. ۱۳۹۱. فلور ایران (تیره نعنائیان - شماره ۷۶). مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور.
- Akachoud, O., Bouamama, H., Facon, N., Laruelle, F., Zoubi, B., Benkebboura, A. & Lounès-Hadj Sahraoui, A. (2022). Mycorrhizal inoculation improves the quality and productivity of essential oil distilled from three aromatic and medicinal plants: *Thymus satureioides*, *Thymus pallidus*, and *Lavandula dentata*. *Agronomy*, 12(9), 2223.
- Arpanahi, A. A., Feizian, M., Mehdipourian, G., & Khojasteh, D. N. (2020). Arbuscular mycorrhizal fungi inoculation improve essential oil and physiological parameters and nutritional values of *Thymus daenensis* Celak and *Thymus vulgaris* L. under normal and drought stress conditions. *European Journal of Soil Biology*, 100, 103217.
- Barea, J. M., Palenzuela, J., Cornejo, P., Sánchez-Castro, I., Navarro-Fernández, C., López-García, A., & Azcón-Aguilar, C. (2011). Ecological and functional roles of mycorrhizas in semi-arid ecosystems of Southeast Spain. *Journal of arid environments*, 75(12), 1292-1301.

- Bedini, S., Pellegrino, E., Avio, L., Pellegrini, S., Bazzoffi, P., Argese, E., & Giovannetti, M. (2009). Changes in soil aggregation and glomalin-related soil protein content as affected by the arbuscular mycorrhizal fungal species *Glomus mosseae* and *Glomus intraradices*. *Soil Biology and Biochemistry*, 41(7), 1491-1496.
- Bistgani, Z. E., Hashemi, M., DaCosta, M., Craker, L., Maggi, F., & Morshedloo, M. R. (2019). Effect of salinity stress on the physiological characteristics, phenolic compounds and antioxidant activity of *Thymus vulgaris* L. and *Thymus daenensis* Celak. *Industrial Crops and Products*, 135, 311-320.
- Caravaca, F., Alguacil, M. M., Azcón, R., & Roldán, A. (2006). Formation of stable aggregates in rhizosphere soil of *Juniperus oxycedrus*: Effect of AM fungi and organic amendments. *Applied Soil Ecology*, 33(1), 30-38.
- de Souza, R. G., Goto, B. T., da Silva, D. K. A., da Silva, F. S. B., Sampaio, E. V., & Maia, L. C. (2010). The role of arbuscular mycorrhizal fungi and cattle manure in the establishment of *Tocoyena selloana* Schum. in mined dune areas. *European Journal of Soil Biology*, 46(3-4), 237-242.
- Franken, P. (2012). The plant strengthening root endophyte *Piriformospora indica*: potential application and the biology behind. *Applied microbiology and biotechnology*, 96, 1455-1464.
- Gerdemann, J. W., & Nicolson, T. H. (1963). Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological society*, 46(2), 235-244.
- Gumus, R., Ercan, N. A. Z. L. I., & Imik, H. I. I. (2017). The effect of thyme essential oil (*Thymus vulgaris*) added to quail diets on performance, some blood parameters, and the antioxidative metabolism of the serum and liver tissues. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 19, 297-304.
- Hosseini, S. A., Rostami, R., Esmailpour, B., Etminan, A., & Salimi, G. (2021). Growth, physiological, and biochemical responses of thyme (*Thymus vulgaris* L.) to the application of arbuscular mycorrhizal fungi under cadmium stress conditions. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 49(3), 11924-11924.
- Leake, J., Johnson, D., Donnelly, D., Muckle, G., Boddy, L., & Read, D. (2004). Networks of power and influence: the role of mycorrhizal mycelium in controlling plant communities and agroecosystem functioning. *Canadian Journal of Botany*, 82(8), 1016-1045.
- Lombini, A., Dinelli, E., Ferrari, C., & Simoni, A. (1998). Plant-soil relationships in the serpentinite screes of Mt. Prinzera (Northern Apennines, Italy). *Journal of Geochemical Exploration*, 64(1-3), 19-33.
- Morton, J. B., & Benny, G. L. (1990). Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): a new order, Glomales, two new suborders, Glomineae and Gigasporineae, and two new families, Acaulosporaceae and Gigasporaceae, with an emendation of Glomaceae. *Mycotaxon*, 37, 471-491.
- Morton, J. F. (1977). Major medicinal plants: botany, culture, and uses. (No Title).
- Rillig, M. C., & Mummey, D. L. (2006). Mycorrhizas and soil structure. *New phytologist*, 171(1), 41-53.

- Sasanelli, N., Anton, A., Takacs, T., D'Addabbo, T., Birò, I., & Malov, X. (2009). Influence of arbuscular mycorrhizal fungi on the nematocidal properties of leaf extracts of *Thymus vulgaris* L. *Helminthologia*, 46, 230-240.
- Schüßler, A., Schwarzott, D., & Walker, C. (2001). A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycological research*, 105(12), 1413-1421.
- Senatore, F. (1996). Influence of harvesting time on yield and composition of the essential oil of a thyme (*Thymus pulegioides* L.) growing wild in Campania (Southern Italy). *Journal of agricultural and food chemistry*, 44(5), 1327-1332.
- Smith, S. E., & Read, D. J. (2010). *Mycorrhizal symbiosis*. Academic press.
- Trappe, J. M. (1982). Synoptic keys to the genera and species of zygomycetous mycorrhizal fungi. *Phytopathology*, 72(8), 1102-1108.
- Wilson, G. W., Rice, C. W., Rillig, M. C., Springer, A., & Hartnett, D. C. (2009). Soil aggregation and carbon sequestration are tightly correlated with the abundance of arbuscular mycorrhizal fungi: results from long-term field experiments. *Ecology letters*, 12(5), 452-461.
- Zeng, Y., Guo, L. P., Chen, B. D., Hao, Z. P., Wang, J. Y., Huang, L. Q., & Zhang, Y. (2013). Arbuscular mycorrhizal symbiosis and active ingredients of medicinal plants: current research status and perspectives. *Mycorrhiza*, 23, 253-265.
- Zubek, S., Mielcarek, S., & Turnau, K. (2012). Hypericin and pseudohypericin concentrations of a valuable medicinal plant *Hypericum perforatum* L. are enhanced by arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*, 22, 149-156.
- Walker, C., & Schüßler, A. (2004). Nomenclatural Clarifications and New Taxa in the Glomeromycota Pacispora. *Mycological Research*, 108(9), 981-982. <https://doi.org/10.1017/S0953756204231173>.
- Oehl, F., Sieverding, E., Palenzuela, J., Ineichen, K., & Alves da Silva, G. (2011). Advances in Glomeromycota taxonomy and classification. *IMA Fungus*, 2(2), 191-199. <https://doi.org/10.5598/imafungus.2011.02.02.10>.
- Frank, D. A., & McNaughton, S. J. (1992). The ecology of plants, large mammalian herbivores, and drought in Yellowstone National Park. *Ecology*, 73(6), 2043-2058.