



## اثر تلقیح بذری قارچ *Piriformospora indica* و محلول پاشی پاکلوبوترازول بر مقاومت به تنش سرمازدگی در گیاه لوبیا سبز (*Phaseolus vulgaris* L.)

معصومه علی‌زاده فروتن<sup>۱</sup>، همت‌اله پیردشتی<sup>۲\*</sup>، یاسر یعقوبیان<sup>۳</sup>، ولی‌اله بابائی‌زاد<sup>۴</sup>

۱. دانشجوی دکتری، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه بیرجند.

۲. دانشیار گروه زراعت، پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری.

۳. دکتری زراعت، پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری.

۴. دانشیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری.

تاریخ دریافت: ۹۳/۹/۲۰؛ تاریخ پذیرش: ۹۵/۹/۲۵

### چکیده

کاهش عملکرد ناشی از تنش سرمازدگی در گیاهان گرمسیری و نیمه‌گرمسیری اهمیت بررسی این تنش و تیمارهایی که می‌توانند اثرات آن را کاهش دهند را نمایان می‌سازد. به‌منظور بررسی اثر قارچ اندوفیت *Piriformospora indica* و پاکلوبوترازول در القای تحمل به تنش سرمازدگی در گیاه لوبیا سبز (*Phaseolus vulgaris* L.)، آزمایشی گلخانه‌ای به‌صورت فاکتوریل بر پایه‌ی طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار در گلخانه‌ی تحقیقاتی پژوهشکده‌ی ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان واقع در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری اجرا شد. فاکتورهای آزمایشی شامل تنش سرمازدگی در سه سطح (شاهد، سه و شش روز تنش سرمازدگی با دمای پنج درجه سانتی‌گراد)، تلقیح قارچی در دو سطح (بدون تلقیح و تلقیح قارچ *P. indica*) و محلول پاشی پاکلوبوترازول در سه سطح (صفر، ۴۰ و ۸۰ میلی‌گرم در لیتر) بود. تلقیح قارچ در مرحله‌ی کاشت، محلول پاشی پاکلوبوترازول پنج و شش هفته و تنش سرمازدگی هشت هفته پس از کاشت اعمال گردید. نتایج نشان داد که تنش سرمازدگی به‌ویژه به مدت شش روز سبب کاهش وزن خشک اندام‌های هوایی و میزان کلروفیل a، b و کاروتنوئید (به ترتیب حدود ۱۹، ۱۸ و ۸ درصد) نسبت به تیمار شاهد گردید. در تمام سطوح تنش، تلقیح قارچ *P. indica* وزن خشک بوته را افزایش داد به‌طوری‌که در تنش شدید، بیشترین تأثیر (افزایش ۶۵ درصدی) را داشت. محلول پاشی پاکلوبوترازول با غلظت ۴۰ میلی‌گرم در لیتر، کلروفیل a، کاروتنوئید و محتوای کلروفیل برگ را به ترتیب ۵، ۹ و ۷ درصد افزایش داد. همچنین محلول پاشی پاکلوبوترازول و تلقیح قارچ سبب کاهش نشت الکترولیت شد. در مجموع قارچ *P. indica* و پاکلوبوترازول در تعدیل اثرات تنش سرما و بهبود رشد گیاه لوبیا سبز اثر مؤثری داشتند.

واژه‌های کلیدی: قارچ اندوفیت، کاروتنوئید، کلروفیل، نشت الکترولیت

### مقدمه

در میان حبوبات، جنس *Phaseolus* در سراسر جهان پراکنده بوده و گیاهان این جنس در مناطق گرمسیری، نیمه‌گرمسیری و معتدل کشت می‌شوند. از بین ۳۰ گونه‌ی شناخته‌شده‌ی این جنس، فقط چهار گونه زراعی است که لوبیا سبز (*Phaseolus vulgaris* L.) مهم‌ترین آن‌هاست. لوبیا سبز در بین انواع گیاهان تجارتي دارای بیشترین میزان پروتئین بوده (Bagheri et al., 2001; Nasri and

حبوبات دومین گروه مهم محصولات زراعی پس از غلات به شمار می‌روند و بخش اصلی رژیم غذایی بسیاری از مردم جهان را تشکیل می‌دهند چراکه مقدار قابل‌توجه پروتئین مرغوب موجود در دانه‌ی این محصولات در ترکیب با غلات می‌تواند یک ترکیب ارزشمند غذایی فراهم کند. پروتئین موجود در دانه‌ی حبوبات ۲-۳ برابر غلات و ۲۰-۱۰ برابر بیشتر از گیاهان غده‌ای است (Nasri and Khalatbari,

بوده و دمای مطلوب رشد آن ۲۰ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد است (Koochaki and Banayan Aval, 2007). بنابراین دماهای کمتر از ۱۰ درجه سانتی‌گراد برای رشد آن نامطلوب بوده و می‌تواند باعث ایجاد تنش سرما در گیاه شود.

پاکلوبوترازول<sup>۲</sup> عضوی از خانواده‌ی تریازول است که دارای دو اثر قارچ‌کشی و تنظیم‌کنندگی رشد گیاهان (بازدارنده‌ی بسیار قوی رشد و توسعه‌ی گیاهان) است (Lin et al., 2009; Chaturvedi et al., 2006). این ترکیبات در گیاهان دو دسته اثرات مورفولوژیکی و آناتومیکی و اثرات بیوشیمیایی بر جای می‌گذارند. اثرات مورفولوژیکی و آناتومیکی تریازول‌ها شامل کاهش طول ساقه و طول کرک، افزایش واکس اپیکوتیکولار<sup>۳</sup>، کلروپلاست‌های بزرگ‌تر و افزایش رشد ریشه است؛ اثرات بیوشیمیایی آن‌ها نیز شامل سم‌زدایی اکسیژن فعال، افزایش میزان پرولین، آنتی‌اکسیدان‌ها و محتوای کلروفیل برگ می‌باشد (Berova et al., 2002). اثر پاکلوبوترازول بر رشد رویشی گیاهان در پژوهش‌های گوناگونی مورد بررسی قرار گرفته است. برای مثال در آزمایشی که روی گیاه گوجه‌فرنگی و کلزا انجام شد پاکلوبوترازول موجب کاهش وزن خشک اندام هوایی نسبت به شاهد گردید اما در تنش‌های سرما و خشکی پاکلوبوترازول سبب افزایش معنی‌دار وزن خشک اندام هوایی شد (Jafari et al., 2006; Razavizadeh and Amoobeygi, 2013).

از سوی دیگر، قارچ اندوفیت *P. indica* از جمله میکروارگانسیم‌های خاک‌زی است که با ایجاد رابطه‌ی همزیستی با طیف وسیعی از گیاهان (Deshmukh et al., 2006) موجب القای افزایش رشد در این گیاهان می‌شود (Verma et al., 1998). قارچ *P. indica* از طریق بهبود تغذیه‌ای گیاه و همچنین ایجاد تغییرات سیستمیکی (آمادگی دفاعی) وابسته به فعالیت مکانیسم‌های آنتی‌اکسیدانی، قادر به افزایش رشد و مقاومت گیاه به تنش‌های زیستی و غیر زیستی محیطی است (Deshmukh et al., 2006; Waller et al., 2005). تلقیح گیاه آراییدوپسیس با *P. indica* نه تنها سبب افزایش بیان ژن‌های مربوط به MDAR<sub>2</sub> (At3g00940) و DHAR<sub>5</sub> (Atlg19570) شد، بلکه با قرار گرفتن گیاه در معرض تنش خشکی، اثر تحریک‌کنندگی این قارچ با افزایش بیان این دو ژن در اندام‌های هوایی گیاهچه‌های تحت تنش همراه بود (Vadassery et al., 2009). با

(Khalatbari, 2011) و از جمله محصولاتی است که می‌توان در زمان‌های مختلف (بهار، تابستان و پاییز) به کشت آن در مازندران اقدام کرد (Motaghian, 2009).

گیاهان زراعی در دوران رشد خود اغلب با یکی از انواع تنش‌های زیستی و غیرزیستی مانند آفات، بیماری‌ها، خشکی، شوری و درجه‌ی حرارت پایین یا بالا روبه‌رو هستند که این تنش‌ها با ایجاد تغییر در فعالیت‌های فیزیولوژیکی طبیعی، عملکرد آن‌ها را کاهش می‌دهد (Berova et al., 2002; Soltanidelroba et al., 2011; Ghorbani et al., 2011). یکی از تنش‌های محیطی که در فعالیت‌های معمول گیاهان اختلال ایجاد می‌کند تنش سرمازدگی<sup>۱</sup> است، زیرا گیاهان برای رشد بهینه به محدوده‌ی دمایی خاصی احتیاج دارند و خارج شدن از این محدوده به‌عنوان یک تنش محسوب می‌شود (Roosta and Sajjadinia, 2010). تنش سرمازدگی یک موضوع مهم در مطالعات فیزیولوژیکی و بیوفیزیکی به شمار می‌رود و به شرایطی گفته می‌شود که گیاه در نتیجه‌ی بروز درجه‌حرارت‌های بین صفر تا ۱۰ درجه‌ی سانتی‌گراد (بسته به گونه و رقم) خسارت می‌بیند (Ehteshami, 2005; Baninasab, 2009). اختلالات اصلی شناخته‌شده در این تنش، کاهش مقدار کلروفیل، مسدود شدن انتقال الکترون در فتوسنتز، کاهش فعالیت آنزیم‌های فتوسنتزی و هدایت روزنه‌ای است (Berova et al., 2002). به‌طور کلی، کاهش میزان رشد گیاه یکی از واضح‌ترین پاسخ‌های گیاهان به تنش سرمازدگی است. در همین زمینه در بررسی اثر تنش سرمازدگی ۱۰ و ۱۵ درجه سانتی‌گراد به مدت هشت روز بر دو رقم مقاوم و حساس برنج در مرحله‌ی جوانه‌زنی کاهش طول و وزن خشک ساقه‌چه و ریشه‌چه در هر دو رقم مشاهده شد (Ghorbani et al., 2011). کاهش وزن خشک ساقه در اثر تنش سرمازدگی در گیاه هندوانه گزارش شده است (Baninasab, 2009). نتایج آزمایشی که روی دو رقم کلزا انجام شد نشان داد که تنش سرما باعث کاهش مقدار کلروفیل a, b و کاروتنوئید در رقم حساس به سرما شد، اما رقم مقاوم دارای برتری معنی‌داری در صفات‌های ذکر شده نسبت به رقم حساس بود (Keshavarz et al., 2011). نتیجه‌ی مشابهی برای کاهش کلروفیل و کاروتنوئید در گیاه گندم در تنش سرمای چهار درجه سانتی‌گراد گزارش شد (Mohsenzadeh et al., 2010). با توجه به اینکه لوبیا سبز گیاهی گرمادوست

<sup>3</sup> Epicuticular wax

<sup>1</sup> Chilling stress

<sup>2</sup> Paclobutrazol

سانتی‌گراد)، دو سطح تلقیح قارچی (عدم تلقیح و تلقیح با قارچ *P. indica*) و سه سطح پاکلوبوترازول (صفر، ۴۰ و ۸۰ میلی‌گرم در لیتر) بود. خاک مورد استفاده در این پژوهش از عمق ۰-۳۰ سانتی‌متری مزرعه‌ی تحقیقاتی تهیه شده و پس از الک کردن با نسبت ۱:۲ با ما سه شسته مخلوط گردید. به منظور افزایش دقت آزمایش و بررسی دقیق‌تر اثر قارچ شبه‌میکوریزای *P. indica*، از خاک استریل شده جهت کشت استفاده شد. به این منظور، خاک مورد استفاده در آزمایش به مدت یک ساعت در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار یک بار اتوکلاو (مدل BATEC PC 22، شرکت کاوش مگا) شد. برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک مورد استفاده در جدول ۱ آمده است.

توجه به موارد مطرح شده پژوهش حاضر با هدف تعیین توانایی قارچ *P. indica* و کارایی پاکلوبوترازول در افزایش تحمل گیاه لوبیا سبز به تنش سرمازدگی طراحی و اجرا شد.

### مواد و روش‌ها

این آزمایش در بهار ۱۳۹۲ در گلخانه‌ی تحقیقاتی پژوهشکده‌ی ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان واقع در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری به صورت فاکتوریل بر پایه‌ی طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار اجرا شد. تیمارهای آزمایشی شامل سه سطح تنش سرمازدگی (شاهد، سه و شش روز در دمای پنج درجه

جدول ۱. برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک

هدایت الکتریکی Electrical Conductivity (dS.m <sup>-1</sup> )	اسیدیته (pH)	پتاسیم (Potassium) (mg.Kg <sup>-1</sup> )	فسفر (Phosphorus) میلی‌گرم در کیلوگرم	نیتروژن (Nitrogen)	شن (Sand) درصد (%)	سیلت (Silt)	رس (Clay)	بافت خاک Soil Pattern
1.52	7.65	270	14.5	0.21	22	35.8	42.2	رسی لومی Loam Clay

بذرها، تعداد ۱۲ عدد بذر در عمق دو سانتی‌متری خاک گلدان‌های پلاستیکی (گنجایش دو کیلوگرم خاک) کشت گردید. بوته‌ها در دو مرحله‌ی دو هفته و چهار هفته پس از کاشت تنک شده و به شش بوته در هر گلدان کاهش یافت. همچنین در مراحل اولیه رشد، یک‌بار کوددهی با اوره (معادل ۱۵۰ کیلوگرم در هکتار) انجام شد.

محلول پاشی پاکلوبوترازول طی دو مرحله و در پنج و شش هفته پس از کاشت صورت گرفت. هشت هفته پس از کاشت و دو هفته پس از دومین برگ‌پاشی با پاکلوبوترازول، گلدان‌های دارای تنش سرمازدگی، برای اعمال تنش سرما به اتاقک رشد (مدل SPG30000، شرکت نور صنعت) با دمای پنج درجه سانتی‌گراد و شدت نور ۸۰۰۰ لوکس با طول دوره‌ی ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی، منتقل و سایر گلدان‌ها در شرایط نوری مشابه و دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از سه و شش روز تنش سرمازدگی،

سویه‌ی قارچ *P. indica* از مجموعه‌ی قارچ‌های زنده آزمایشگاه قارچ‌شناسی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری تهیه و در محیط کشت جامد کفر<sup>۱</sup> (Kaefer, 1977)، به مدت چهار هفته در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد کشت گردید. پس از گذشت مدت‌زمان مذکور سوسپانسیون<sup>۲</sup> اسپور اولیه با استفاده از آب توئین یک در هزار تهیه شده و سپس تعداد اسپورها با استفاده از لام هموسیتمتر<sup>۳</sup> شمارش و به غلظت ۵×۱۰<sup>۵</sup> اسپور در میلی‌لیتر رسانده شد (Ghabooli et al., 2011).

بذرها با هیپوکلریت سدیم یک درصد به مدت ۲۰ دقیقه ضدعفونی و چند بار با آب مقطر شستشو (Blee and Anderson, 1996) و سپس به مدت سه روز در اتاقک رشد در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد جوانه‌دار شدند. سپس بذرها در سوسپانسیون اسپور قارچی غوطه‌ور شده و به مدت چهار ساعت با سرعت ۸۰ دور در دقیقه شیک گردید. پس از تلقیح

<sup>3</sup> Hemocytometer

<sup>1</sup> Kaefar

<sup>2</sup> Suspension

آزمون نرمال بودن داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS و روش کولموگروف-اسمیرنوف<sup>۱</sup> انجام گرفت. سپس داده‌ها به روش تجزیه واریانس و به‌وسیله‌ی نرم‌افزار آماری SAS (SAS Institute, 2009) تجزیه و مقایسه‌ی میانگین‌ها با استفاده از آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) در سطح احتمال پنج درصد انجام شد. برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel استفاده شد.

## نتایج و بحث

### صفات رویشی

نتایج تجزیه واریانس داده‌های به‌دست‌آمده از آزمایش (جدول ۲) نشان داد که اثر ساده‌ی تنش سرمازدگی بر تمام صفات اندازه‌گیری شده معنی‌دار بود. همچنین اثر قارچ بر وزن خشک برگ، بوته ( $P \leq 0.01$ ) و ساقه ( $P \leq 0.05$ ) و اثر ساده‌ی ی پاکلوبوترازول بر وزن خشک برگ ( $P \leq 0.01$ ) معنی‌دار بود. برهمکنش سرمازدگی و قارچ در تمام صفات به‌جز وزن خشک ساقه، در سطح یک درصد معنی‌دار شد. بین سرمازدگی و پاکلوبوترازول نیز از نظر تمامی صفات مورد مطالعه به‌جز وزن خشک ساقه برهمکنش معنی‌داری وجود داشت. اثر متقابل قارچ و پاکلوبوترازول بر وزن خشک برگ و بوته ( $P \leq 0.01$ ) معنی‌دار بود. همچنین برهمکنش سه‌گانه‌ی سرمازدگی و قارچ و پاکلوبوترازول نیز در همه‌ی صفات به‌جز وزن خشک ساقه معنی‌دار گردید (جدول ۲).

بر اساس یافته‌ها، با زیاد شدن مدت تنش از سه روز به شش روز، همزیستی قارچی توانست اثرات تنش سرمازدگی را به‌طور معنی‌داری کاهش دهد (شکل ۱). وزن خشک برگ و بوته‌ی گیاهان تلقیح نشده با *P. indica* در شرایط تنش سرمازدگی روند کاهشی نسبت به شاهد (بدون تنش) نشان داد به‌طوری‌که کمترین وزن خشک برگ و بوته گیاهان تلقیح نشده با قارچ مربوط به تنش شش روز سرمازدگی بود (شکل ۱-الف و ب). مقایسه گیاهان تلقیح نشده و گیاهان تلقیح‌شده با *P. indica* در شرایط تنش و بدون تنش نشان‌دهنده‌ی افزایش قابل‌ملاحظه‌ای در وزن خشک برگ و بوته گیاهان همزیست شده با قارچ است.

گلدان‌ها از اتاقک رشد خارج شده و پس از دوازده ساعت نمونه‌برداری‌های موردنظر انجام شد.

جهت اندازه‌گیری وزن خشک اندام‌های هوایی، بوته‌ها کف‌بر شده و پس از جداسازی ساقه و برگ، به مدت ۴۸ ساعت در آون با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. اندازه‌گیری وزن خشک برگ، ساقه و بوته با استفاده از ترازوی حساس ۰/۰۰۱ (AND HR-100, Japan) انجام شد.

اندازه‌گیری کلروفیل‌های a (رابطه ۱)، b (رابطه ۲)، کلروفیل a+b (رابطه ۳) و کاروتنوئید (رابطه ۴) به‌وسیله‌ی دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل Analytik Jena- SPEKOL 1300) صورت گرفت (Porra et al., 2002).

$$C_a (\mu\text{g/ml}) = 16.72 A_{665.2} - 9.16 A_{652.4} \quad [1]$$

$$C_b (\mu\text{g/ml}) = 34.09 A_{652.4} - 15.28 A_{665.2} \quad [2]$$

$$C_{(a+b)} (\mu\text{g/ml}) = C_a + C_b \quad [3]$$

$$C_{(x+c)} (\mu\text{g/ml}) = (1000A_{470} - 1.63c_a - 104.96c_b)/221 \quad [4]$$

در این رابطه‌ها  $C_a$ ،  $C_b$ ،  $C_{(a+b)}$  و  $C_{(x+c)}$  به ترتیب کلروفیل a، b، کلروفیل کل و کاروتنوئید و  $A_{470}$ ،  $A_{652.4}$ ،  $A_{665.2}$  میزان نور جذبی محلول در طول موج‌های ۶۶۵/۲، ۶۵۲/۴ و ۴۷۰ نانومتر است.

به‌منظور اندازه‌گیری نشت الکترولیت نمونه‌ی برگ‌ی در لوله‌های آزمایش حاوی ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر قرار گرفت. پس از گذشت ۲۴ ساعت، هدایت الکتریکی هر نمونه با استفاده از دستگاه EC متر (Cybercan, CON 410) اندازه‌گیری شد ( $EC_1$ ). به‌منظور اندازه‌گیری میزان کل نشت الکترولیت‌ها در اثر مرگ سلول، لوله‌های آزمایش در دستگاه بن ماری (NB\_301) با دمای ۹۰ درجه و به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شدند و مجدداً هدایت الکتریکی نمونه‌ها ثبت گردید ( $EC_2$ ). سپس درصد نشت الکترولیت‌ها با استفاده از معادله ۵ محاسبه شد (Teutonica et al., 1993).

$$\text{درصد نشت الکترولیت} = \frac{EC_1}{EC_2} \times 100 \quad [5]$$

<sup>1</sup> Kolmogorov-Smirnov

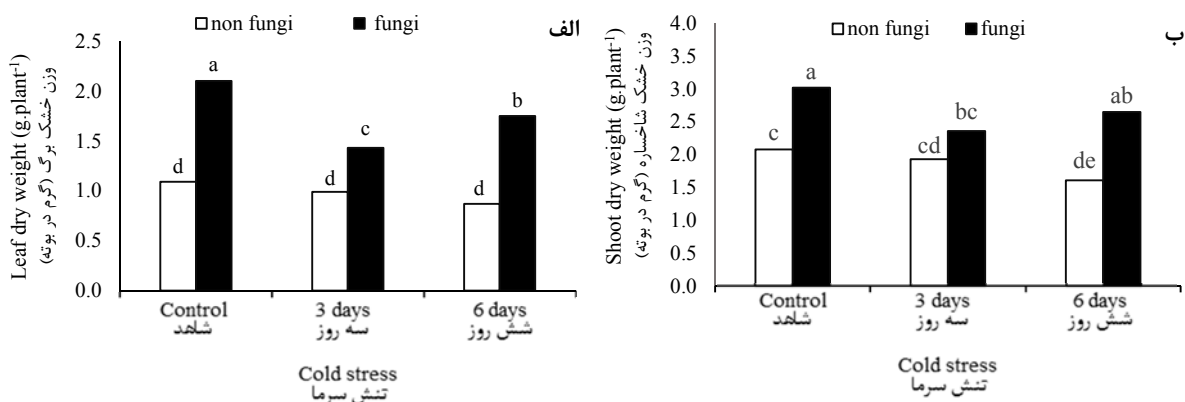
جدول ۲. میانگین مربعات (MS) اثر تنش سرمازدگی، تلقیح قارچ و محلول پاشی پاکلوبوترازول بر وزن خشک اندام‌های هوایی گیاه لوبیا سبز

Table 2. Mean squares (MS) for the effect of cold stress, fungi inoculation and Paclbutrazol spraying on dry weights of aboveground organs in green bean

S.O.V	منابع تغییر	درجه آزادی df	وزن خشک Dry weight		
			برگ Leaf	ساقه Stem	بوته Plant
Cold Stress (C)	تنش سرمازدگی (C)	2	0.72**	0.14**	1.01**
Fungi (F)	قارچ (F)	1	8.12**	0.10*	8.60**
PBZ (P)	پاکلوبوترازول (P)	2	0.47**	0.03 <sup>ns</sup>	0.18 <sup>ns</sup>
C×F	C×F	2	0.41**	0.01 <sup>ns</sup>	0.48**
C×P	C×P	4	0.41**	0.05 <sup>ns</sup>	0.40**
F×P	F×P	2	0.53**	0.06 <sup>ns</sup>	0.66**
C×F×P	C×F×P	4	0.19**	0.01 <sup>ns</sup>	0.29**
Error	خطای آزمایشی	36	0.04	0.02	0.10
CV (%)	ضریب تغییرات (%)		15.00	17.68	14.18

\* و \*\* به ترتیب معنی دار در سطح احتمال پنج و یک درصد. ns غیر معنی دار

\*and\*\*significant at 5 and 1% probability levels, respectively. ns, non-significant



شکل ۱. برهمکنش تنش سرمازدگی و تلقیح قارچ بر وزن خشک برگ (A) و شاخساره (B) گیاه لوبیا سبز

Fig. 1. Interaction of cold stress and fungi inoculation on leaf (A) and Plant (B) dry weight of green bean plant.

و بوته را به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش داد (شکل ۱-الف و ب). در همین راستا، استفاده از همزیستی گیاه با قارچ‌های میکوریزا و بهبود روابط آبی آن‌ها با گیاه میزبان از جمله راهکارهایی است که طی دهه‌های اخیر به کار گرفته شده است (Smith and Read, 2008). درزمینه‌ی نقش *P. indica* در بهبود رشد رویشی گیاهان در تنش سرمازدگی

بیشترین وزن خشک برگ و بوته در گیاهان شاهد (بدون تنش) به دست آمد که نسبت به گیاهان شاهد تلقیح نشده به ترتیب ۵۳ و ۴۵ درصد افزایش داشت. قرار دادن گیاه در تنش سرمازدگی باعث کاهش وزن خشک برگ و بوته نسبت به شاهد شد ولی در تمام سطوح تنش سرمازدگی به جز تنش سرمازدگی سه روز، تلقیح قارچ *P. indica* وزن خشک برگ

درصد) مربوط به غلظت ۴۰ میلی‌گرم در لیتر پاکلوبوترازول بود. با این وجود، در تنش سرمازدگی سه و شش روز افزایش غلظت پاکلوبوترازول تأثیری بر وزن خشک برگ نداشت (جدول ۳). وزن خشک بوته در گیاهان شاهد (بدون تنش سرمازدگی) با کاربرد غلظت ۴۰ میلی‌گرم در لیتر پاکلوبوترازول به صورت معنی‌داری (حدود ۲۶ درصد) نسبت به غلظت صفر آن کاهش یافت. در حالی که در غلظت ۸۰ میلی‌گرم در لیتر، وزن خشک بوته افزایش یافت که این افزایش نسبت به غلظت صفر میلی‌گرم در لیتر پاکلوبوترازول معنی‌دار نبود. همچنین قرار گرفتن گیاه به مدت سه و شش روز در تنش سرمازدگی هم‌زمان با افزایش غلظت پاکلوبوترازول تأثیری بر وزن خشک بوته نداشت (جدول ۳). در همین زمینه در پژوهشی که روی گیاهچه‌های هندوانه (*Citrullus lanatus* L.) در تنش سرمازدگی انجام شد حداقل آسیب وارده در اثر تنش سرمازدگی مربوط به گیاهچه‌های تیمار شده با پاکلوبوترازول ۵۰ و ۷۵ میلی‌گرم در لیتر بود که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد (Baninasab, 2009). همچنین گزارش شد که ترکیبات تریازولی منجر به افزایش بقای گیاهچه‌های خیار در تنش سرمازدگی گردید (Feng et al., 2003). از طرفی، بیان شده که پاکلوبوترازول با محافظت گیاهچه‌های گندم از آسیب تنش سرمازدگی علائم آسیب تنش را در مراحل مختلف رشد کاهش داد (Fletcher et al., 2000).

گزارشی به ثبت نرسیده اما یکی از اثرات مثبت همزیستی شبه‌میکوریزایی در رشد رویشی گیاه می‌تواند به دلیل بهبود جذب فسفر و افزایش جذب آب به وسیله هیف‌های قارچی و همچنین افزایش تراکم و طول ریشه گیاه، به خصوص در شرایط تنش خشکی باشد (Abo-Ghalia and Khalafallah, 2008). سرما نیز به عنوان یک تنش اسمزی، با محدود کردن جذب آب از ریشه گیاه باعث افت پتانسیل آب و انتقال آب از سیمپلاست به آپوپلاست می‌شود که نتیجه آن کم‌آبی شدید است (Mohsenzadeh et al., 2010). همچنین، نتایج بیشتر بررسی‌ها نشان داده است که تجمع کربوهیدرات‌ها (Demir, 2004)، میزان رشد (Karagiannidis et al., 2011) و جذب عناصر غذایی مانند فسفر (Al-Karaki, 2000)، پتاسیم (Marschner and Dell, 1994)، روی (Calvet et al., 2001) و منگنز (Amirabadi et al., 2009) در همزیستی گیاهان با قارچ‌های میکوریزایی افزایش می‌یابد. از آنجایی که قارچ‌های شبه-میکوریزا رفتار قارچ‌های میکوریزا را در همزیستی با گیاهان تقلید می‌کنند بنابراین به نظر می‌رسد همزیستی با *P. indica* از این لحاظ می‌تواند در تنش سرمازدگی برای گیاه مفید باشد.

در تیمار شاهد سرمازدگی با افزایش غلظت پاکلوبوترازول از صفر به ۸۰ میلی‌گرم در لیتر کاهش معنی‌داری در وزن خشک برگ مشاهده شد که بیشترین کاهش (حدود ۴۵

جدول ۳. برهمکنش تنش سرمازدگی و محلول‌پاشی پاکلوبوترازول بر وزن خشک اندام‌های هوایی گیاه لوبیا سبز

Table 3. Interaction effect of cold stress and Paclobutrazol spraying on dry weight of aboveground organs in green bean

تنش سرمازدگی Cold stress	پاکلوبوترازول PBZ (mg.L <sup>-1</sup> )	وزن خشک Dry weight	
		برگ Leaf	بوته Plant
		(g.plant <sup>-1</sup> )	
(Control) شاهد	0	2.07 <sup>a</sup>	2.86 <sup>a</sup>
	40	1.15 <sup>c</sup>	2.11 <sup>b</sup>
	80	1.57 <sup>b</sup>	2.68 <sup>a</sup>
(3 day) سه روز	0	1.28 <sup>c</sup>	2.17 <sup>b</sup>
	40	1.21 <sup>c</sup>	2.17 <sup>b</sup>
	80	1.13 <sup>c</sup>	2.09 <sup>b</sup>
(6 day) شش روز	0	1.29 <sup>c</sup>	2.01 <sup>b</sup>
	40	1.31 <sup>c</sup>	2.19 <sup>b</sup>
	80	1.33 <sup>c</sup>	2.19 <sup>b</sup>

میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند. Means in each column followed by similar letter(s) have not significantly different at 5% probability level according to LSD test.

سیستمیک به سموم، یون‌های فلزی سنگین و عوامل بیماری‌زا را القاء می‌کند و همچنین رشد و تولید را در آن‌ها تحریک می‌نماید (Das et al., 2012). بسیاری از گیاهان مانند برنج، ذرت، لوبیا، کلم، تنباکو، اسفناج، خردل سیاه، نیشکر و کدوی زینتی در همزیستی با *P. indica* رشد بهتر همراه با افزایش تولید زیست‌توده را نشان دادند (Varma et al., 2012). ریشه‌های گیاهان تلقیح شده با قارچ *P. indica* در مقایسه با گیاهان تلقیح نشده گسترده‌تری نشان دادند که به تنظیم بیان ژن‌های تکامل دهنده‌ی ریشه نسبت داده شده است (Waller et al., 2005). (Kumar et al., 2009) نشان دادند که ریشه‌های تلقیح شده‌ی ذرت با این قارچ افزایش رشد داشتند که در پاسخ به کلونیزه شدن لایه‌های بیرونی ریشه با *P. indica* بود. از آنجایی که ریشه عضو مهم ارتباط گیاه با محیط خاک و جذب مواد غذایی است به نظر می‌رسد که یک عامل افزایش رشد و تولید زیست‌توده در گیاهان همزیست شده با این قارچ همین افزایش رشد ریشه و بهبود عملکرد در جذب مواد غذایی باشد.

نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل سه‌گانه (جدول ۵) نشان داد که در تمام سطوح تنش سرما و پاکلوبوترازول، تلقیح قارچ *P. indica* وزن خشک برگ را بین هشت تا ۲۸۰ درصد و وزن خشک بوته را بین صفر تا ۱۴۳ درصد افزایش داد. بیشترین اثر قارچ *P. indica* در تنش سرمای شش روز و بدون محلول پاشی پاکلوبوترازول مشاهده شد که وزن تر برگ را به میزان حدود ۲۸۰ و وزن خشک بوته را حدود ۱۴۳ درصد افزایش داد. بیشترین وزن خشک برگ (۲/۶۸ گرم در بوته) در شرایط بدون تنش سرما با تلقیح قارچ و سطح صفر پاکلوبوترازول و بیشترین وزن خشک بوته (۳/۴۲ گرم در بوته) در شرایط بدون تنش سرما با تلقیح قارچ و محلول پاشی پاکلوبوترازول ۸۰ میلی‌گرم در لیتر به دست آمد.

### صفات فیزیولوژیک

تجزیه واریانس داده‌های به‌دست‌آمده از این پژوهش در مورد صفات فیزیولوژیک (جدول ۶) نشان داد که تنش سرمازدگی بر تمام صفات فیزیولوژیک مورد مطالعه اثر معنی‌داری ( $P \leq 0.01$ ) داشت. اثر ساده‌ی تلقیح قارچ به‌جز در نشت الکترولیت ( $P \leq 0.05$ ) در سایر صفات مورد بررسی معنی‌دار نبود ولی محلول پاشی پاکلوبوترازول بر محتوای کلروفیل برگ

به‌طور کلی تدابیری که در کشاورزی جهت محافظت گیاهان از سرمازدگی به کار می‌رود شامل سه راهکار است که جلوگیری از گسترش آسیب، پس از قرارگیری گیاه در معرض دمای سرد یکی از آن‌ها است. در این میان مصرف مواد شیمیایی روی گیاهان، قبل از قرارگیری آن‌ها در تنش سرما در افزایش مقاومت به سرما در شرایط آزمایشگاهی بسیار مؤثر بوده است (Kafi et al., 2009). مصرف ترکیبات شیمیایی خانواده‌ی تریازول‌ها مانند پاکلوبوترازول مانع از بروز صدمات ناشی از بسیاری از تنش‌ها مانند سرمازدگی گردیده است. پاکلوبوترازول با مهار بیوسنتز جیبرلین (GA)، ممکن است منجر به افزایش سطح آبسزیک اسید (ABA) به‌عنوان یک فیتوهورمون<sup>۱</sup> شناخته‌شده برای کاهش تنش‌های گیاهی شود (Still and Pill, 2004). همچنین پاکلوبوترازول به دلیل ایجاد مقاومت به تنش‌های محیطی و بیوشیمیایی در گیاهان، «محافظت‌کننده‌ی چندگانه<sup>۲</sup>» گیاهی نامیده شده است. از سوی دیگر، حفاظت از گیاهان در برابر تنش به‌وسیله‌ی تریازول‌ها از راه فعال‌سازی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و سیستم کارآمد مهار رادیکال‌های آزاد که منجر به سم‌زدایی اکسیژن فعال می‌شود نیز صورت می‌گیرد (Somasundaram et al., 2009).

مقایسه میانگین برهمکنش قارچ و پاکلوبوترازول نشان داد که در گیاهان تلقیح نشده با قارچ *P. indica* محلول پاشی پاکلوبوترازول اثر معنی‌داری بر وزن خشک برگ و بوته نداشت اما در گیاهان همزیست با *P. indica* پاکلوبوترازول وزن خشک برگ و بوته را کاهش داد. به‌طوری‌که این کاهش در وزن خشک برگ در غلظت‌های ۴۰ و ۸۰ میلی‌گرم در لیتر نسبت به شاهد به ترتیب حدود ۳۱ و ۱۳ درصد و در وزن خشک بوته در غلظت ۴۰ میلی‌گرم در لیتر نسبت به شاهد حدود ۱۷ درصد بود (جدول ۴).

یکی از اثرات مفید قارچ برای گیاه در ارتباط با عرضی بهتر مواد غذایی به‌وسیله‌ی هیف‌های قارچی است و حتی در شرایط سخت نیز در یک رابطه‌ی دوجانبه، گیاهان اجازه‌ی گسترش و زنده ماندن بهتر را به قارچ می‌دهند و قارچ نیز مقاومت گیاه را افزایش می‌دهد (Oelmuller et al., 2009). افزایش جذب مواد غذایی در همزیستی با *P. indica* به گیاهان این امکان را می‌دهد که در شرایط تنش‌های خشکی، شوری و دماهای بالا یا پایین زنده بمانند و مقاومت

<sup>2</sup> Multiprotection

<sup>1</sup> Phytohormones

الکترولیت اثر معنی‌داری بر سایر صفات فیزیولوژیک مورد بررسی نداشت. برهمکنش سه‌گانه‌ی سرمازدگی، قارچ و پاکلوبوترازول نیز تنها از نظر کلروفیل کل برگ در سطح یک درصد معنی‌دار گردید.

(عدد اسپد) و کلروفیل a در سطح پنج درصد و بر میزان کاروتنوئید و نشت الکترولیت در سطح یک درصد اثر معنی‌داری نشان داد. برهمکنش سرمازدگی و قارچ، سرمازدگی و پاکلوبوترازول و همچنین قارچ و پاکلوبوترازول نیز به‌جز نشت

جدول ۴. برهمکنش تلقیح قارچ و محلول‌پاشی پاکلوبوترازول بر وزن خشک اندام‌های هوایی گیاه لوبیا سبز  
Table 4. Interaction effect of fungi inoculation and Paclobutrazol spraying on dry weight of aboveground organs in green bean.

همزیستی قارچی Fungi symbiosis	پاکلوبوترازول PBZ (mg.L <sup>-1</sup> )	وزن خشک Dry weight	
		بوته Plant	برگ Leaf
بدون قارچ (-) Non fungi (-)	0	1.89 <sup>c</sup>	1.03 <sup>d</sup>
	40	1.98 <sup>c</sup>	1.03 <sup>d</sup>
	80	1.77 <sup>c</sup>	0.88 <sup>d</sup>
با قارچ (+) Fungi (+)	0	2.81 <sup>a</sup>	2.06 <sup>a</sup>
	40	2.34 <sup>b</sup>	1.42 <sup>c</sup>
	80	2.88 <sup>a</sup>	1.80 <sup>b</sup>

میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.  
Means in each column followed by similar letter(s) have not significantly different at 5% probability level according to LSD test.

چشمگیری ادامه داشت به‌طوری‌که حدود ۲۰ درصد نسبت به شاهد کاهش نشان داد (جدول ۷). کاهش کلروفیل b نیز در اثر تنش سرمازدگی کاملاً مشهود بود به‌طوری‌که در تنش سه روز و شش روز به ترتیب حدود ۱۵ و ۱۸ درصد نسبت به شاهد کمتر بود (جدول ۷). (Jafari et al (2006) نیز در آزمایشی روی گیاه گوجه‌فرنگی به نتیجه مشابهی دست یافتند.

کلروفیل کل (a+b) بین تیمارهای تنش سرمازدگی تفاوت معنی‌داری وجود داشت به‌گونه‌ای که با اعمال تنش سرمازدگی سه روز و شش روز میزان کلروفیل کل به ترتیب حدود ۱۱ و ۱۹ درصد نسبت به شاهد کاهش یافت. اختلاف تیمار سرمازدگی سه‌روزه با شاهد و همچنین اختلاف تیمار سرمازدگی شش‌روزه با تیمار شاهد و سرمازدگی سه‌روزه معنی‌دار بود (جدول ۷). تنش دمایی پایین باعث تغییرات قابل توجهی در بیوشیمی و فیزیولوژی گیاهان می‌شود. از جمله اختلالات اساسی شناخته‌شده در مورد این تنش می‌توان به کاهش سطح کلروفیل، مسدود شدن انتقال الکترون در

در این پژوهش محتوای کلروفیل برگ (عدد SPAD) تحت تأثیر تنش سرمازدگی قرار گرفت به‌طوری‌که گیاهان شاهد (بدون تنش) دارای بیشترین میزان عدد اسپد بودند. گیاهانی که در تنش سرمازدگی سه‌روزه قرار گرفتند کاهش معنی‌داری در محتوای کلروفیل برگ (حدود ۶ درصد) نسبت به گیاهان شاهد داشتند و با ادامه‌ی تنش سرمازدگی تا شش روز این کاهش ادامه داشت (جدول ۷). محتوای کلروفیل برگ یک عامل مهم در تعیین ظرفیت فتوسنتزی برگ است (Yordanova and Popova, 2007). کاهش میزان کلروفیل برگ در شرایط تنش سبب کاهش خسارت به سیستم فتوسنتزی گیاه به علت کاهش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌شود. در شرایط تنش، کاهش میزان کلروفیل و پایین بودن مقدار آن در اثر کاسته شدن رادیکال‌های آزاد اکسیژن، می‌تواند یک صفت مطلوب باشد (Kranner et al., 2002). کلروفیل a در تنش سه‌روزه‌ی سرمازدگی کاهش داشت اما از نظر آماری تفاوت معنی‌داری با شاهد نداشت. روند کاهش کلروفیل a در شش روز تنش سرمازدگی به‌طور



حدود ۵۳ و ۴۲ درصد) نشان داد. به نظر می‌رسد سخت شدن به سرمازدگی گاهی با افزایش سطح رنگیزه‌های کم‌اهمیت‌تری مانند کاروتنوئید صورت می‌گیرد. این رنگیزه در دمای پایین اکسید شده و سبب کاهش تلفات کلروفیل a و b می‌شود که ممکن است از خسارت سرما جلوگیری کند (Kafi and Mahdavi Damghani, 2001). البته کاهش میزان کاروتنوئید در تنش شش روز نسبت به تنش سه روز می‌تواند به دلیل طولانی بودن مدت تنش و اثرات تخریبی ناشی از آن باشد.

فتوسنتز، کاهش فعالیت آنزیم‌های فتوسنتزی و هدایت روزنه-ای اشاره کرد. همچنین تنش سرمازدگی می‌تواند با مهار واکنش‌های نوری و تاریکی بر روی فتوسنتز تأثیر بگذارد (Kafi et al., 2009). کاهش معنی‌دار کلروفیل در تنش سرمازدگی را به کاهش سنتز کلروفیل و تخریب ساختمان آن تحت تأثیر رادیکال‌های فعال اکسیژن نسبت داده شده است (Campos et al., 2003). میزان کاروتنوئید برگ در تنش سه‌روزه‌ی سرمازدگی نسبت به شاهد و تنش شش روز افزایش معنی‌داری (به ترتیب

جدول ۵. برهمکنش تنش سرمازدگی، تلقیح قارچ و محلول پاشی پاکلوبوترازول بر وزن خشک اندام‌های هوایی گیاه لوبیا سبز  
Table 5. Interaction effect of cold stress, fungi inoculation and Pacllobutrazol spraying on dry weight of aboveground organs in green bean

تنش سرمازدگی Cold stress	همزیستی قارچی Fungi symbiosis	پاکلوبوترازول PBZ (mg.L <sup>-1</sup> )	وزن خشک Dry weight	
			برگ Leaf	بوته Plant
g.plant <sup>-1</sup>				
شاهد (Control)	بدون قارچ (-) Non fungi (-)	0	1.47 <sup>c-e</sup>	2.47 <sup>c-e</sup>
		40	0.89 <sup>hi</sup>	1.84 <sup>g-i</sup>
		80	0.93 <sup>g-i</sup>	1.96 <sup>e-i</sup>
	با قارچ (+) Fungi (+)	0	2.68 <sup>a</sup>	3.25 <sup>ab</sup>
		40	1.42 <sup>c-f</sup>	2.39 <sup>c-f</sup>
		80	2.22 <sup>b</sup>	3.42 <sup>a</sup>
سه روز (3 days)	بدون قارچ (-) Non fungi (-)	0	1.11 <sup>f-h</sup>	2.03 <sup>e-i</sup>
		40	1.17 <sup>e-h</sup>	2.19 <sup>d-h</sup>
		80	0.71 <sup>ij</sup>	1.59 <sup>ij</sup>
	با قارچ (+) Fungi (+)	0	1.46 <sup>c-e</sup>	2.32 <sup>d-g</sup>
		40	1.27 <sup>d-g</sup>	2.17 <sup>d-h</sup>
		80	1.56 <sup>cd</sup>	2.60 <sup>cd</sup>
شش روز (6 days)	بدون قارچ (-) Non fungi (-)	0	0.54 <sup>j</sup>	1.18 <sup>j</sup>
		40	1.06 <sup>gh</sup>	1.91 <sup>f-i</sup>
		80	1.02 <sup>g-i</sup>	1.77 <sup>hi</sup>
	با قارچ (+) Fungi (+)	0	2.05 <sup>b</sup>	2.86 <sup>bc</sup>
		40	1.57 <sup>cd</sup>	2.49 <sup>c-e</sup>
		80	1.64 <sup>c</sup>	2.62 <sup>cd</sup>

میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.  
Means in each column followed by similar letter(s) have not significantly different at 5% probability level according to LSD test.

جدول ۶. میانگین مربعات (MS) اثر تنش سرمازدگی، تلقیح قارچ و محلول‌پاشی پاکلوبوترازول بر صفات فیزیولوژیکی گیاه لوبیا سبز  
 Table 6. Mean squares (MS) for the effect of cold stress, fungi inoculation and Paclbutrazol spraying on green bean physiological traits.

منابع تغییر	S.O.V.	درجه آزادی df	کلروفیل برگ (عدد SPAD) SPAD value	کلروفیل a Chlorophyll a	کلروفیل b Chlorophyll b	کلروفیل کل (a+b) Total chlorophyll	کاروتنوئید Carotenoid	نشت الکترولیت Electrolyte leakage
Cold Stress	تنش سرمازدگی	2	25.22**	5.16**	0.85**	9.80**	0.01**	75.56*
Fungi	قارچ	1	2.71 <sup>ns</sup>	0.20 <sup>ns</sup>	0.01 <sup>ns</sup>	0.07 <sup>ns</sup>	3.70 <sup>ns</sup>	190.48**
PBZ	پاکلوبوترازول	2	12.07*	1.40*	0.07 <sup>ns</sup>	1.27 <sup>ns</sup>	0.17**	633.22**
Cold Stress × Fungi	سرمازدگی × قارچ	2	0.93 <sup>ns</sup>	0.40 <sup>ns</sup>	0.09 <sup>ns</sup>	0.46 <sup>ns</sup>	0.01 <sup>ns</sup>	23.36 <sup>ns</sup>
Cold Stress × PBZ	سرمازدگی × پاکلوبوترازول	4	1.43 <sup>ns</sup>	0.39 <sup>ns</sup>	0.10 <sup>ns</sup>	0.67 <sup>ns</sup>	0.004 <sup>ns</sup>	171.53**
Fungi × PBZ	قارچ × پاکلوبوترازول	2	2.44 <sup>ns</sup>	0.20 <sup>ns</sup>	0.05 <sup>ns</sup>	0.85 <sup>ns</sup>	0.03 <sup>ns</sup>	117.97**
Cold Stress × Fungi × PBZ	سرمازدگی × قارچ × پاکلوبوترازول	4	2.77 <sup>ns</sup>	0.88 <sup>ns</sup>	0.12 <sup>ns</sup>	2.17**	0.05 <sup>ns</sup>	43.20 <sup>ns</sup>
Error	خطای آزمایشی	36	2.98	0.37	0.05	0.55	0.03	4.30
CV (%)	ضریب تغییرات (درصد)		5.27	12.22	11.12	10.54	10.09	5.0

\* و \*\* معنی‌دار در سطح احتمال پنج و یک درصد. ns غیر معنی‌دار

\* and \*\* significant at 5 and 1% probability levels, respectively. ns, non-significant.

جدول ۷. اثر تنش سرمازدگی بر صفات فیزیولوژیکی گیاه لوبیا سبز

Table 7. Effect of cold stress on green bean physiological traits

تنش سرمازدگی Cold stress	کلروفیل برگ (عدد SPAD) SPAD value	کلروفیل a Chlorophyll a	کلروفیل b Chlorophyll b	کلروفیل کل (a+b) Total chlorophyll (a+b)	کاروتنوئید Carotenoids
شاهد Control	34.14 <sup>a</sup>	5.51 <sup>a</sup>	2.30 <sup>a</sup>	7.81 <sup>a</sup>	1.58 <sup>b</sup>
سه روز 3 days	32.11 <sup>b</sup>	5.12 <sup>a</sup>	1.96 <sup>b</sup>	6.97 <sup>b</sup>	2.42 <sup>a</sup>
شش روز 6 days	32.06 <sup>b</sup>	4.45 <sup>b</sup>	1.88 <sup>b</sup>	6.34 <sup>c</sup>	1.71 <sup>b</sup>

میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

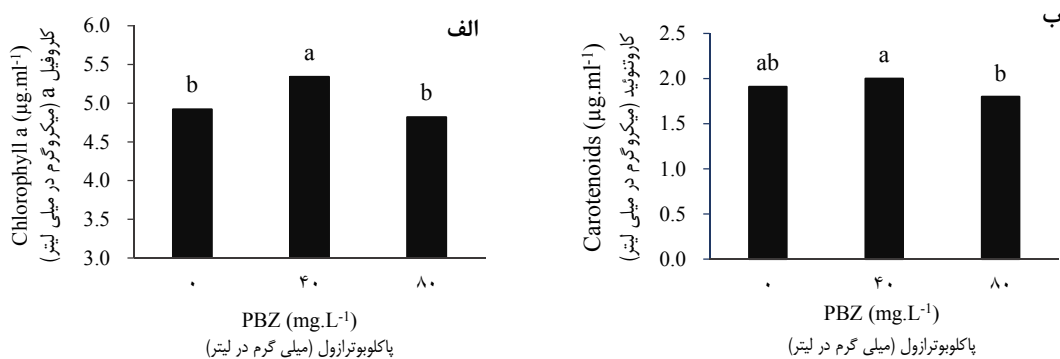
Means in each column followed by similar letter(s) have not significantly different at 5% probability level according to LSD test.

معنی‌دار بود. بین غلظت صفر و ۸۰ پاکلوبوترازول تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (شکل ۲-الف). غلظت ۴۰ میلی‌گرم در لیتر پاکلوبوترازول سبب افزایش میزان کاروتنوئید شد اما با افزایش غلظت آن تا ۸۰ میلی‌گرم در لیتر، مقدار کاروتنوئید

میزان کلروفیل a در اثر استفاده از غلظت ۴۰ میلی‌گرم در لیتر پاکلوبوترازول به صورت معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش یافت ولی در کاربرد غلظت ۸۰ میلی‌گرم در لیتر آن دوباره کاهش نشان داد که نسبت این کاهش به سطح ۴۰ آن

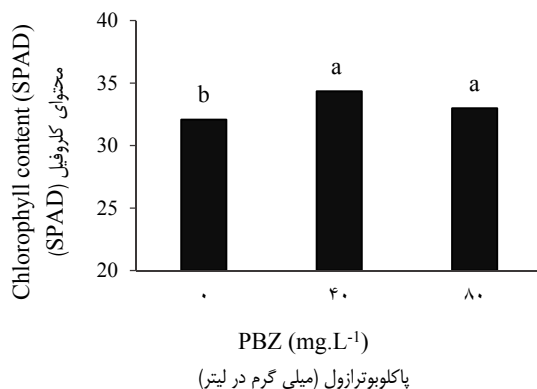
محلول پاشی پاکلوبوترازول به صورت معنی داری افزایش یافت که بیشترین افزایش مربوط به غلظت ۴۰ میلی گرم در لیتر (۷ درصد افزایش نسبت به شاهد) بود که نسبت به غلظت ۸۰ میلی گرم در لیتر آن تفاوت معنی داری نداشت (شکل ۳).

نیز کاهش یافت که این کاهش نسبت به غلظت ۴۰ میلی گرم در لیتر آن معنی دار بود (شکل ۲-ب). جعفری و همکاران (Jafari et al., 2006) نیز در آزمایشی روی گیاه گوجه فرنگی به نتایج مشابهی دست یافتند. محتوای کلروفیل برگ در اثر



شکل ۲. اثر پاکلوبوترازول بر کلروفیل a (الف) و کاروتنوئید (ب) برگ گیاه لوبیا سبز

Fig. 2. Effect of Pacllobutrazol spraying on chlorophyll a (A) and carotenoid (B) of green bean leaves



شکل ۳. اثر محلول پاشی پاکلوبوترازول بر محتوای کلروفیل برگ گیاه لوبیا سبز

Fig. 3. Effect of Pacllobutrazol spraying on chlorophyll content (SPAD) of green bean leaves

افزایش غلظت کلروفیل در هر کلروپلاست، افزایش تعداد کلروپلاست در هر سلول برگ و افزایش تعداد سلولها در واحد سطح برگ باشد (Kishrekumar et al., 2006). همچنین مشاهده شده است که پاکلوبوترازول سبب افزایش رنگیزه‌های فتوسنتزی در گیاهان تحت تنش خشکی و سرمازدگی شده است (Amina and Hanan, 2011; Percival and Noviss, 2008; Pinhero and Fletcher,

افزایش رنگیزه‌های کلروفیلی در گیاه حسن‌یوسف (Kishorekumar et al., 2006) و محتوای کلروپلاست برگ در گیاه هندوانه (Baninasab, 2009) نیز در اثر کاربرد پاکلوبوترازول در تنش سرمازدگی مشاهده شد که با نتایج این پژوهش مطابقت دارد. افزایش غلظت کلروفیل در برگ‌های گیاهان تیمار شده با پاکلوبوترازول ممکن است به دلیل

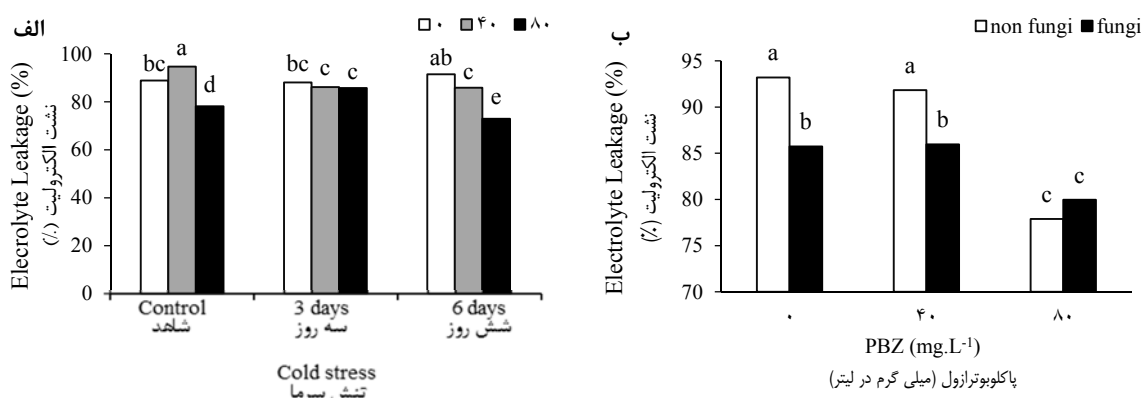
شرایط تنش سرما انجام شد نیز نقش مثبت پاکلوبوترازول در کاهش نشت الکترولیت، گزارش گردید (Amooaghaee and Shariat, 2014). کاهش پراکسیداسیون لیپیدی غشای گیاهچه‌های هندوانه و گوجه‌فرنگی در اثر کاربرد پاکلوبوترازول در تنش سرما نیز گزارش شده است (Baninasab, 2009; Jafari et al., 2006).

از سوی دیگر در غلظت‌های مختلف پاکلوبوترازول به جز غلظت ۸۰ میلی‌گرم در لیتر آن، تلقیح قارچ *P. indica* کاهش محسوس نشت الکترولیت را به دنبال داشت. میزان کاهش نشت الکترولیت در اثر تلقیح قارچ، در غلظت صفر و ۴۰ میلی‌گرم در لیتر پاکلوبوترازول به ترتیب حدود هشت و هفت درصد بود (شکل ۴-ب).

نتایج مقایسه میانگین برهمکنش سه‌گانه بر کلروفیل کل (جدول ۸) نشان داد که با افزایش مدت‌زمان تنش سرما، غلظت کلروفیل کل در برگ گیاه لوبیا سبز کاهش یافت. در تمام سطوح تنش سرما و در هر دو سطح تلقیح و عدم تلقیح قارچ، محلول‌پاشی گیاهان با پاکلوبوترازول ۴۰ میلی‌گرم در لیتر، کلروفیل کل را نسبت به غلظت صفر آن افزایش داد. حال آنکه غلظت پاکلوبوترازول ۸۰ میلی‌گرم در لیتر کاهش کلروفیل کل را به دنبال داشت. بیشترین غلظت کلروفیل کل در شرایط بدون تنش و تلقیح قارچ و محلول‌پاشی ۴۰ میلی‌گرم در لیتر پاکلوبوترازول مشاهده شد.

کاروتنوئیدها ترکیبات تتراترپنی هستند که به‌عنوان حامی رنگیزه‌های فتوسنتزی و غیر فتوسنتزی شناخته شده‌اند که می‌توانند انرژی اضافی طول‌موج‌های کوتاه را گرفته و اکسیژن آزاد را به اکسیژن سه‌تایی تبدیل کنند. همچنین با جمع‌آوری رادیکال‌های اکسیژن تولیدشده نقش آنتی-اکسیدانی از خود بروز می‌دهند (Razavizadeh and Amoobeygi, 2013). در گیاهچه‌های گندم نیز که در تنش سرمازدگی قرار داشتند میزان کاروتنوئیدها پس از تیمار با پاکلوبوترازول در مقایسه با گروه شاهد افزایش یافت (Berova et al., 2002). این نتیجه شاید به دلیل تأثیر پاکلوبوترازول در به تأخیر انداختن پیری و حفاظت این ماده از تخریب غشاها باشد (Sankhla et al., 1985).

بر اساس شکل ۴-الف محلول‌پاشی پاکلوبوترازول در هر سه سطح تنش سرما کاهش درصد نشت الکترولیت‌ها را به دنبال داشت به‌طوری‌که این کاهش در شرایط شاهد و تنش سرمای شش روز معنی‌دار بود و بیشترین تأثیر آن در تنش سرمای شش روز مشاهده شد به‌طوری‌که میزان نشت الکترولیت‌ها در محلول‌پاشی با پاکلوبوترازول ۸۰ میلی‌گرم در لیتر نسبت به غلظت صفر آن حدود ۲۰ درصد کاهش نشان داد. این نتایج حاکی از اثر مثبت پاکلوبوترازول در کاهش اثر تنش سرما و بهبود تحمل گیاه به این تنش است. در پژوهشی که به بررسی اثر پاکلوبوترازول بر لوبیا قرمز و لوبیا سفید در



شکل ۴. برهمکنش تنش سرما و پاکلوبوترازول (A) و قارچ و پاکلوبوترازول (B) بر نشت الکترولیت برگ گیاه لوبیا سبز  
**Fig. 4. Interaction effect of cold stress and Paclobutrazol spraying (A) and fungi inoculation and Paclobutrazol spraying (B) on electrolyte leakage of green bean leaves.**

جدول ۸. برهمکنش تنش سرمازدگی، محلول پاشی پاکلوبوترازول و تلقیح قارچ بر صفات فیزیولوژیکی گیاه لوبیا سبز  
 Table 8. Interaction effect of cold stress, fungi inoculation and Paclobutrazol spraying on green bean physiological traits

تنش سرمازدگی Cold stress	همزیستی قارچی Fungi symbiosis	پاکلوبوترازول PBZ (mg.L <sup>-1</sup> )	کلروفیل کل (a+b) Total chlorophyll (a+b) ( $\mu\text{g.ml}^{-1}$ )
شاهد (Control)	بدون قارچ (-) Non fungi (-)	0	7.11 <sup>a-d</sup>
		40	7.89 <sup>ab</sup>
		80	8.08 <sup>a</sup>
	با قارچ (+) Fungi (+)	0	7.78 <sup>a-c</sup>
		40	8.11 <sup>a</sup>
		80	7.93 <sup>ab</sup>
سه روز (3 days)	بدون قارچ (-) Non fungi (-)	0	7.24 <sup>ab-d</sup>
		40	6.79 <sup>bc-f</sup>
		80	7.48 <sup>ab-d</sup>
	با قارچ (+) Fungi (+)	0	7.04 <sup>ab-e</sup>
		40	7.94 <sup>ab</sup>
		80	5.34 <sup>g</sup>
شش روز (6 days)	بدون قارچ (-) Non fungi (-)	0	6.51 <sup>d-g</sup>
		40	6.82 <sup>b-f</sup>
		80	5.80 <sup>fg</sup>
	با قارچ (+) Fungi (+)	0	5.81 <sup>e-g</sup>
		40	6.55 <sup>c-g</sup>
		80	6.57 <sup>c-g</sup>

میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.  
 Means in each column followed by similar letter(s) have not significantly different at 5% probability level according to LSD test

### نتیجه‌گیری

نتایج آزمایش نشان‌دهنده‌ی اثر مثبت تلقیح قارچ *P. indica* و محلول پاشی پاکلوبوترازول در تحمل به تنش سرمازدگی در لوبیا سبز است. به طوری که مقایسه گیاهان تلقیح نشده و گیاهان تلقیح شده با *P. indica* در شرایط تنش و بدون تنش نشان‌دهنده‌ی افزایش قابل ملاحظه‌ای در وزن خشک برگ و بوته گیاهان همزیست شده با قارچ بود و در تمام سطوح تنش سرما و پاکلوبوترازول، تلقیح قارچ *P. indica* وزن خشک برگ و بوته را به ترتیب تا ۲۸۰ و ۱۴۳ درصد افزایش داد. کاربرد پاکلوبوترازول نیز به‌ویژه در غلظت ۴۰ میلی‌گرم در لیتر آن میزان رنگیزه‌های برگ را افزایش و درصد نشت الکترولیت‌ها را کاهش داد؛ بنابراین با توجه به نتایج این

آزمایش به نظر می‌رسد می‌توان از قارچ *P. indica* همراه با تنظیم‌کننده‌ی رشد برای القای مقاومت به تنش سرمازدگی استفاده نمود. هرچند که برای کامل‌تر شدن نتایج باید آزمایش‌های تکمیلی در سایر مراحل رشدی گیاه نیز اجرا گردد.

### سپاسگزاری

بدین‌وسیله از مساعدت‌ها و حمایت‌های مالی پژوهشکده‌ی ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان و همچنین دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری قدردانی می‌گردد.

## منابع

- Abo-Ghalia, H.H., Khalafallah, A.A., 2008. Responses of wheat plants associated with arbuscular mycorrhizal fungi to short-term water stress followed by recovery at three growth stages. *Journal of Applied Sciences Research*. 4, 570-580.
- Al-Karaki, G.N., 2000. Growth of mycorrhizal tomato and mineral acquisition under salt stress. *Mycorrhiza*. 10, 51-54.
- Amina, A.A., Hanan, H.L., 2011. Differential effects of paclobutrazol on water stress alleviation through electrolyte leakage, phytohormones, reduced glutathione and lipid peroxidation in some wheat genotypes (*Triticum aestivum* L.) grown in vitro. *Romanian Biotechnological Letters*. 6, 6710-6721.
- Amirabadi, M., Rajali, F., Ardakani, MR., Borji M., 2009. Effect of Azotobacter and mycorrhizal fungi inoculants at different levels of phosphorus on uptake of some mineral elements by forage maize. *Iranian journal of soil research (formerly soil and water sciences)*. 23(1), 107-115. [In Persian with English Summary].
- Amooaghaee, R., Shariat, E., 2014. Effect of cultivar, cold and paclobutrazol on growth, chlorophyll content and cell membrane injury in *Phaseolus vulgaris* plantlet. *Iranian Journal of Plant Biology*. 22, 77-90. [In Persian with English Summary].
- Bagheri, A., Mahmoudi, A.A., Ghezeli, F., 2001. Common Beans, Research for Crop Improvement. Translate. Mashhad University Jihad Press. First edition. 556 p. [In Persian]
- Baninasab, B., 2009. Amelioration of chilling stress by paclobutrazol in watermelon seedlings. *Scientia Horticulturae*. 121, 144-148.
- Berova, M., Zlatev, Z., Stoeva, N., 2002. Effect of paclobutrazol on wheat seedlings under low temperature stress. *Plant Physiology*. 28, 75-84.
- Blee, K.A., Anderson, A.J., 1996. Defense-related transcript accumulation in *Phaseolus vulgaris* L. colonized by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* Schenck & Smith. *Plant Physiology*. 110, 675-688.
- Calvet, C., Pinochet, J., Hernandez-Dorrego, A., Estan, V., Camprubi, A., 2001. Field microplot performance of the peach-almond hybrid GF-677 after inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi in a replant soil infested with root knot nematodes. *Mycorrhiza*. 10, 295-300.
- Chaturvedi, A.K., Vashistha, R.K., Prasad, P., Nautiyal, M.C., 2009. Influence of foliar spray with paclobutrazol and ethephon on growth and photosynthetic behavior of *Saussurea costus* (Falc.) Lipsch. - an endangered medicinal and aromatic herb. *Journal of Nature and Science*. 7, 53-62.
- Das, A., Sheramati, I., Varma, A., 2012. Contaminated soils: physical, chemical and biological components. In: Varma A, Kothe E (eds.), *Bio-geo Interactions in Metal-Contaminated Soils*. Springer, Heidelberg, pp 1-16.
- Demir, S., 2004. Influence of arbuscular mycorrhiza on some physiological growth parameters of pepper. *Turkish Journal of Biology*. 28, 85-90.
- Deshmukh, S., Huckelhoven, R., Schafer, P., Imani, J., Sharma, M., Weiss, M., Waller, F., Kogel, K.H., 2006. The root endophytic fungus *Piriformospora indica* requires host cell death for proliferation during mutualistic symbiosis with barley. *Proceedings of the National Academy of Sciences. U.S.A.* 103, 18450-18457.
- Ehteshami, M.H., 2005. Effect of chilling on crop physiological characteristics and adaptation mechanisms. *Scientific and Applied Symposium on Chilling and Frost Damage Control*. Yazd Agriculture Jihad Organization. p. 21-24. [In Persian]
- Feng, Z., Guo, A., Feng, Z., 2003. Amelioration of chilling stress by triadimefon in cucumber seedlings. *Journal of Plant Growth Regulation*. 39, 277-283.
- Fletcher, R.A., Gilley, A., Sankhla, N., Davis, T.D., 2000. Triazoles as plant growth regulators and stress protectants. *Horticultural Reviews*. 24, 55-122.
- Ghabooli, M., Shahryari, F., Sepehri, M., Marashi, H., Hoseyni Salkade, GH. 2011. Effect of endophytic fungus *Piriformospora indica* on some characteristics of barley (*Hordeum vulgare* L.) in drought stress. *Journal of Agroecology*. 3, 328-336.

- Ghorbani, A., Zarinkamar, F., Fallah, A., 2011. Effect of cold stress on the anatomy and morphology of the tolerant and sensitive cultivars of rice during germination. *Tissue and Cell*. 2(3), 235-244. [In Persian with English Summary].
- Jafari, S.R., Manuchehri Kalantari, Kh., Turkzadeh, M., 2006. The evaluation of paclobutrazol effects on increase cold hardiness in tomato seedlings (*Lycopersicon esculentum*L.). *Journal of Biology*. 19(3), 290-298. [In Persian with English Summary].
- Kaefer, E., 1977. Meiotic mitotic recombination in *Aspergillus* and its chromosomal aberration. *Advances in Genetics*. 19, 33-131.
- Kafi, M., Borzooyi, A., Salehi, M., Kamamndi, A., Maasumi, A., Nabati, J., 2009. *Environmental Stress Physiology in Plants*. Mashhad University Jihad Press. 502 p. [In Persian].
- Kafi, M., Mahdavi Damghani, A., 2001. Resistance mechanisms of plants to environmental stresses. Translate. Mashhad University Jihad Press. 467 p. [In Persian].
- Karagiannidis, N., Thomidisa, T., Lazarib, D., Panou-Filotheoua, E., Karagiannidoua, C., 2011. Effect of three Greek arbuscular mycorrhizal fungi in improving the growth, nutrient concentration, and production of essential oils of oregano and mint plants. *Scientia Horticulturae*. 129, 329-334.
- Keshavarz, H., Modares Sanavi, A.M., Zarin Kamar, F., Dolat Abadian, A., Panahi, M., and Asilan, K., 2011. Effect of foliar application of salicylic acid on some biochemical characteristics of two cultivars of rapeseed (*Brassica napus* L.) under conditions of cold stress. *Crop Science*. 42(4), 423-734. [In Persian].
- Kishorekumar, A., Abdul Jaleel, C., Manivannan, P., Sankar, B., Sridharan, R., Somasundaram, R., Panneerselvam, R., 2006. Differential effects of hexaconazole and paclobutrazol on the foliage characteristics of Chinese potato (*Solenostemon rotundifolius*). *Acta Biologica Szegediensis*. 50, 127-129.
- Kranner, I., Beckett, R.P., Wornik, S., Zorn, M., Pfeifhofer, H.W., 2002. Revival of a resurrection plant correlates with its antioxidants status. *The Plant Journal*. 31, 13-24.
- Koochaki, E., Banayan Aval, M., 2007. *Pulse Crops*. Mashhad Jihad Daneshgahi Press. 236 P.
- Kumar, M., Yadav, V., Tuteja, N., Johri, A.K., 2009. Antioxidant enzyme activities in maize plants colonized with *Piriformospora indica*. *Microbiology*. 155, 780-790.
- Lin, K.H., Tsou, C.C., Hwang, S.Y., Chen, L.F.O., Lo, H.F., 2006. Paclobutrazol pre-treatment enhanced flooding tolerance of sweet potato. *Journal of Plant Physiology*. 163, 750-760.
- Marschner, H., Bell, B., 1994. Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. *Plant and Soil*. 159, 89-102.
- Mohsenzadeh, S., Karimi Andani, J., Mohabbatkar, H., 2010. Study of gene sequence and physiological responses to cold stress responses in susceptible and resistant wheat cultivars. *Crop Science*. 41(3), 613-621. [In Persian]
- Motaghian, A., Pirdashti, H., Bahmanyar, M. A., 2009. Response of bush bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedling emergence and growth to different vermicompost amounts. *Journal of Agroecology*. 1, 103-114. [In Persian with English Summary].
- Nasri, M., Khalatbari, M., 2011. Effect of nitrogen fertilizer, potassium and zinc on quantitative and qualitative characteristics of greenbeans (*Phaseolous vulgaris*) genotypes Sunray. *Field Crop Physiology*. 3(1), 82-93. [In Persian with English Summary].
- Oelmuller, R., Sherameti, I., Tripathi S., Varma, A., 2009. *Piriformospora indica*, a cultivable root endophyte with multiple biotechnological applications. *Symbiosis*. 49, 1-12.
- Percival, C.G., Noviss, K., 2008. Triazole induced drought tolerance in horse chestnut (*Aesculus hippocastanum*). *Tree Physiology*. 28, 1685-1692.
- Pinhero, R., Fletcher, R., 1994. Paclobutrazol and ancymidol protect corn seedlings from high and low temperature stresses. *Journal of Plant Growth Regulation*. 15, 47-53.
- Porra, R.J., 2002. The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls a and b. *Photosynthesis Research*. 73, 149-156.

- Razavizadeh, R., Amoobeygi, M., 2013. The effect of paclobutrazol in improvement of drought tolerance of *Brassica napus* L. seedling under in vitro culture. *Journal of Plant Process and Function* .2(3), 21-34. [In Persian with English Summary].
- Roosta, H.R., Sajjadinia, A., 2010. Studying the effect of cold stress on green basil, violet basil, tomato and lettuce using chlorophyll fluorescence technique. *Environ. Environmental Stresses in Crop Sciences*. 3(1), 1-8. [In Persian with English Summary].
- Sankhla, N., Davis, T.D., Upodhyaya, A., Sankhla, D., Walser, R.H., Smith, B.N., 1985. Growth and metabolism of soybean affected by Paclobutrazol. *Plant and Cell Physiology*. 26, 913-921.
- Smith, S.E., Read, D.J., 2008. *Mycorrhizal Symbiosis*. 3rd ed., Academic Press, London.
- Soltanidelroba, N., Karamian, R., Ranjbar, M., 2011. Interaction of salicylic acid and cold stress on activity of antioxidant enzymes in plant licorice (*Glycyrrhiza glabra* L.). *Journal of Herbal Drugs*. 2(1), 7-13. [In Persian with English Summary].
- Somasundaram, R., Cheruth, A.J., Sindhu, S.A., Azooz, M.M., Panneerselvam, R., 2009. Role of Paclobutrazol and ABA in drought stress amelioration in *Sesamum indicum* L. *International Journal of Molecular Sciences*. 4, 56-62.
- Still, J.R., Pill, W.G., 2004. Growth and stress tolerance of tomato seedlings (*Lycopersicon esculentum* Mill.) in response to seed treatment with Paclobutrazol. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. 79, 197-203.
- Teutonica, R.A., Palta, J.P., Osborn, T.C., 1993. In vitro freezing tolerance in relation to winter survival of rapeseed cultivars. *Crop Science*. 33, 103-107.
- Vadassery, J., Tripathi, S., Prasad, R., Varma, A., Oelmüller, R., 2009. Mono dehydro ascorbate reductase 2 and dehydro ascorbate reductase 5 are crucial for a mutualistic interaction between *Piriformospora indica* and Arabidopsis. *Plant Physiology*. 166, 1263-1274.
- Varma, A., Bakshi, M., Lou, B., Hartmann, A., Oelmueller, R., 2012. *Piriformospora indica*: A novel plant growth-promoting mycorrhizal fungus. *Agricultural Research*. 1(2), 117-131.
- Verma, S., Varma, A., Rexer, K.H., Kost, G., Sarbhoy, A., Bisen, P., Butehorn, B., Franken, P., 1998. *Piriformospora indica*, gen. et sp. nov., a new root-colonizing fungus. *Mycologia*. 95, 896-903.
- Waller, F., Achatz, B., Baltruschat, H., Fodor, J., Becker, K., Fischer, M., Heier, T., Huckelhoven, R., Neumann, C., Wettstein, D., Franken, P., Kogel, K., 2005. The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt- stress tolerance, disease resistance, and higher yield. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences*. U.S.A. 103, 18450-18457.
- Yordanova, R.Y., Popova, L.P., 2007. Effect of exogenous treatment with salicylic acid on photosynthetic activity and antioxidant capacity of chilled wheat plants. *General and Applied Plant Physiology*. 33, 155-170.