Arshive of SID

نشریه فیزیولوژی محیطی گیاهی، سال سیزدهم، شماره ۵۰، تابستان ۱۳۹۷ / صفحات: ۵۲-۴۱

بررسی تاثیر قارچ *Piriformospora indica* بر برخی صفات مورفوفیزیولوژیک گیاه دارویی سنبل‌الطیب (*Valeriana officinalis* L.) در شرایط تنش خشکی

شیدا لرستانی[۱]، مهدی قبولی[۱*]، زهرا موحدی[۱]، روح الله کریمی[۲]

[۱]گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ملایر، ملایر، ایران

[۲]گروه فضای سبز، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ملایر، ملایر، ایران

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۱/۲۷ تاریخ پذیرش:۹۷/۶/۱۶

چکیده

هدف از اجرای این پژوهش بررسی تاثیر قارچ *Piriformospora indica* بر برخی صفات مورفوفیزیولوژیکی گیاه دارویی سنبل‌الطیب (وزن تر و خشک ریشه و اندام هوایی، رنگیزه‌های فتوسنتزی، نشت یونی، پروتئین، کربوهیدرات، پرولین و ...) در شرایط نرمال و تنش خشکی بود. این پژوهش به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار انجام شد. فاکتورهای آزمایش شامل ۲ سطح تنش خشکی (ظرفیت زراعی و ۵۰ درصد ظرفیت زراعی) و ۳ سطح تیمار تلقیح با قارچ اندوفیت *P. indica* (تلقیح با اسپور، تلقیح با میسیلیوم و عدم تلقیح) بودند. نتایج نشان داد تلقیح با قارچ *P. indica* سبب افزایش بیوماس قسمت‌های هوایی و ریشه گیاهان تلقیح شده نسبت به گیاهان شاهد در هر دو سطح آبیاری نرمال و تنش گردید، به‌طوری‌که در شرایط تنش وزن خشک اندام هوایی و ریشه در گیاهان تلقیح شده نسبت به شاهد به‌ترتیب ۳۷ و ۱٤ درصد افزایش نشان داد. هم‌چنین در شرایط تنش، فاکتورهای فیزیولوژیک نظیر کلروفیل کل (۲٤ درصد)، فنل کل (۱٤ درصد)، کربوهیدرات (٤/۳ برابری)، پروتئین (۱۷ درصد) و پرولین (۲/۱ برابری) در گیاهان تلقیح‌شده با قارچ افزایش یافت. به‌علاوه، تلقیح با قارچ باعث کاهش ۳۸ درصدی نشت یونی در گیاهان تلقیح شده گردید. این نتایج بر نقش مؤثر این قارچ در افزایش رشد و مقاومت به تنش در گیاه سنبل‌الطیب دلالت دارد و می‌تواند امکان بررسی تاثیر قارچ در افزایش ماده موثره دارویی این گیاه دارویی را فراهم آورد.

واژه‌های کلیدی: تلقیح، تنش‌های غیرزیستی، زیست‌توده، مقاومت، همزیستی.

مقدمه

سنبل‌الطیب (*Valeriana officinalis*)، گیاهی علفی، چند ساله و از خانواده Valerianaceae می باشد. ریشه دارای ریزومی کوتاه و استوانه‌ای شکل است که از ریزوم، انشعاب‌های متعدد گوشتی و استوانه‌ای شکل خارج شده و گیاهان پس از گذراندن سرمای زمستان، در سال دوم به ساقه می‌روند. سنبل‌الطیب از زمان‌های گذشته به‌عنوان یک گیاه دارویی ارزشمند همواره مورد توجه و استفاده بوده و حاوی مواد موثره ارزشمندی هستند که برای معالجه بیماری‌های اعصاب و روان استفاده می‌گردد (Wang et al., 2010).

هر عاملی که سوخت و ساز طبیعی یک گیاه را به‌طور زیان‌آوری تحت تاثیر قرار داده و از این طریق اثرات سوء بر رشد و نمو گیاه داشته باشد، تنش

*نویسنده مسئول: m.ghabooli@malayeru.ac.ir

www.SID.ir

Arshive of SID

نامیده می‌شود. خشکی یکی از تنش‌های شایع است که به‌عنوان اصلی‌ترین عامل کاهش عملکرد گیاهان زراعی محسوب می‌شود (Figueras et al., 2004). خشکسالی و تنش خشکی، باعث محدودیت در تولیدات کشاورزی گردیده و از اینرو بازده استفاده از مناطق نیمه‌خشک و کشت دیم را کاهش داده و تولید محصولات زراعی را در ایران و جهان با مشکل روبرو ساخته است؛ از اینرو یافتن راهکارهایی برای مقابله با اثرات محدودکننده تنش خشکی ضروری است. کاربرد روش‌های زیستی نقش موثری در افزایش مقاومت گیاه به تنش‌های محیطی دارند که یکی از این روش‌ها، استفاده از پتانسیل ارگانیسم‌های مفید خاکزی از جمله قارچ‌های میکوریزی می‌باشد. قارچ‌های میکوریزی با مکانیسم‌های مختلفی، سبب بهبود رشد، افزایش مقاومت گیاه به عوامل بیماری‌زا و کمک به کاهش اثرات سوء تنش‌های محیطی می‌گردند. یکی از قارچ‌های اندوفیت شبه‌میکوریزی، قارچ *Piriformospora indica* است که در سال ۱۹۹۸ توسط Varma و همکاران (۱۹۹۹) در ایالت راجستان کشور هندوستان شناسایی شد. این قارچ با تعداد زیادی از گیاهان عالی رابطه همزیستی برقرار می‌نماید که شامل انواع خشکی پسند، بوته‌های یک‌ساله و چندساله و درختان چوبی می‌باشند. اثرات تحریک کنندگی رشد قارچ *P. indica* بر روی چندین گیاه دارویی مختلف نظیر *Bacopa monniera* (Prasad et al., 2013)، *Stevia rebaudiana* (Kilam et al., 2017) و *Withania somnifera* (Ahlawat et al., 2017) بررسی و گزارش شده است. نتایج تحقیقات این پژوهشگران نشان می‌دهد تلقیح گیاهان دارویی با قارچ *P. indica* می‌تواند باعث بهبود فاکتورهای رشدی گیاه و همچنین افزایش مواد موثره دارویی آنها گردد.

دامنه میزبانی گسترده و امکان کشت بر روی محیط‌های کشت مصنوعی (بر خلاف قارچ‌های میکوریزی) سبب گردیده است تا قارچ *P. indica* به عنوان یک قارچ مدل در تحقیقات همزیستی مطرح گردد. نقش قارچ *P. indica* در بهبود رشد گیاهان میزبان و افزایش عملکرد و تحمل به تنش‌های غیرزیستی توسط پژوهشگران مختلف گزارش شده است (Waller et al., 2005; Ghabooli et al., 2013). در کلم چینی، قارچ *P. indica* با افزایش تولید آنتی اکسیدانت‌ها و بیان ژن‌های مرتبط با خشکی، سبب مقاومت به خشکی گردیده است (Sun et al., 2010). در آرابیدوپسیس نیز قارچ با بیان ژن‌های مرتبط با تنش در برگ‌ها، باعث اعطای مقاومت به خشکی گردیده است (Sherameti et al., 2008). Xu و همکاران (۲۰۱۷) گزارش کردند که افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت، تجمع پرولین، خسارت کمتر به غشاء و بیان ژن‌های مرتبط با خشکی در مقاومت گیاهان ذرت تلقیح شده با قارچ *P. indica* به خشکی موثر است. با توجه به تغییرات اقلیمی، وسعت مناطق خشک و نیمه خشک در ایران و همچنین ارزش افزوده بالای گیاهان دارویی تلاش برای کاشت گیاهان دارویی در شرایط خشک و نیمه‌خشک و افزایش مقاومت این گیاهان به خشکی، می‌تواند به کشاورزی پایدار کمک شایانی نماید و این مسائل اهمیت تحقیقات مرتبط با تنش خشکی در گیاهان دارویی را گوشزد می‌نماید. بر این اساس، هدف از این پژوهش بررسی تأثیر قارچ بر افزایش رشد و برخی صفات مورفوفیزیولوژیکی گیاه دارویی سنبل‌الطیب و همچنین توانایی قارچ در افزایش مقاومت به تنش خشکی می‌باشد.

www.SID.ir

Arshive of SID

مواد و روش‌ها

تهیه، تشخیص و تکثیر مایه تلقیح قارچ *P. indica*: جدایه قارچ مطابق با روش Ghabooli و همکاران (۲۰۱۳) کشت داده شد و پس از جمع‌آوری اسپورهای قارچ، تعداد آن‌ها با استفاده از لام نئوبار شمارش گردید. برای تهیه میسلیوم، دیسک‌های فعال قارچ از محیط کشت ذخیره برداشته و در ارلن‌های حاوی محیط کشت مایع قرار داده شدند و سپس در انکوباتور حاوی شیکر با دمای ۲±۲۸ درجه سانتی‌گراد و ۱۵۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰-۷ روز قرار داده شد. در مرحله بعد با استفاده از فیلتر کاغذی، میسلیوم‌ها از محیط کشت جدا و چندین بار با آب مقطر شستشو داده شد (Bajaj et al., 2015).

کشت گیاه و اعمال تیمارها: این پژوهش به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در سال ۱۳۹۶ اجرا شد. خاک مورد استفاده (ترکیبی از خاک طبیعی و ماسه) قبل از شروع آزمایش به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد در اتوکلاو استریل گردید. فاکتورهای آزمایش شامل ۲ سطح خشکی (ظرفیت زراعی (F.C.) و ۵۰ درصد ظرفیت زراعی) و ۳ سطح تیمار با قارچ *P. indica* (تلقیح با اسپور، تلقیح با میسیلیوم و عدم تلقیح) بودند. برای تیمار اسپور، ابتدا بذرهای جوانه‌دار شده سنبل‌الطیب با مقداری مایه تلقیح قارچ حاوی ۵×۱۰^{۵} اسپور در میلی‌لیتر تلقیح و به مدت ۱ ساعت بر روی دستگاه لرزاننده با دور آرام (۵۰-۴۰ دور در دقیقه) قرار داده شدند تا امکان اتصال اسپورهای قارچ به سطح ریشه‌چه فراهم شود؛ برای تیمار میسلیوم، مقدار ۱٪ (w/w) میسلیوم به هر گلدان (گلدان های پلاستیکی ۱/۵ کیلوگرمی) اضافه گردید. لازم به ذکر است که در مورد تیمارهای شاهد، بذرهای جوانه‌دار شده بدون تلقیح با قارچ در گلدان‌ها کاشته و به گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی منتقل شدند (یک بوته هر گلدان). پس از گذشت یک هفته از کاشت، نمونه‌برداری از ریشه گیاهان تلقیح‌شده برای تعیین میزان آلودگی ریشه با قارچ صورت پذیرفت (Waller et al., 2005). برای اعمال تنش خشکی، ظرفیت زراعی خاک بر اساس روش وزنی تعیین گردید. گلدان‌ها تا دو هفته در حد ظرفیت زراعی نگه داشته شدند و اعمال تنش خشکی ۳ هفته پس از کاشت گیاهان انجام شد (Ghabooli et al., 2013; Ghaffari et al., 2016). تنش خشکی با قطع آبیاری و با توزین روزانه گلدان‌ها و تنظیم آن‌ها در حد تنش مورد نظر اعمال شد. لازم به‌ذکر است که در شرایط کنترل (عدم اعمال تنش خشکی)، آبیاری گیاهان به‌صورت منظم انجام گرفت و رطوبت خاک در حد ظرفیت زراعی تنظیم شد. پس از گذشت ٤ هفته از اعمال تنش نمونه‌برداری از اندام‌های گیاهی (برگ و ریشه) انجام گرفت.

بررسی صفات مورفولوژیک و فیزیولوژیک: پس از تعیین وزن تر نمونه‌های گیاهی برداشت‌شده، نمونه‌های مذکور به مدت ٤٨ ساعت در آون با دمای ٦٥ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و وزن خشک آن‌ها نیز محاسبه گردید.

رنگیزه‌های برگ (کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل کل) با استفاده از استون ۸۰ درصد (v/v) عصاره‌گیری و سنجش آن مطابق با روش Arnon (۱۹٤۹) انجام شد. غلظت کلروفیل a در طول موج ٦٦۳ نانومتر، کلروفیل b در طول موج ٦٤٥ نانومتر و کلروفیل کل در طول موج ٦٥۲ نانومتر تعیین گردید. نشت یونی مطابق با روش Valentovic و همکاران (۲۰۰٦) و با استفاده از دستگاه EC متر (Cond 720 آلمان) اندازه‌گیری شد. استخراج و اندازه‌گیری پروتئین کل به روش کالریمتری Bradford (۱۹۸۷) انجام شد و توسط دستگاه اسپکتروفتومتر جذب در ۵۹۵ نانومتر با استفاده از سرم آلبومین گاوی به عنوان

www.SID.ir

Arshive of SID

استاندارد خوانده شد. استخراج کربوهیدرات‌های محلول از بافت تر به روش Irigoyen و همکاران (۱۹۹۲) با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر مدل کری ۱۰۰ (ساخت استرالیا) در طول موج ٦٢٠ نانومتر قرائت و با استفاده از منحنی استاندارد بدست‌آمده از غلظت‌های مختلف گلوکز بیان گردید. جهت سنجش پرولین روش Bates و همکاران (۱۹۷۳) انتخاب شد و در طول موج ۵۲۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. استخراج فنول کل به روش کالریمتری به وسیله معرف فولین سیوکالتیو مطابق با روش Singleton و همکاران (۱۹٦۵) صورت گرفت و در طول موج ۷٦۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. مقدار فنول کل با استفاده از منحنی کالیبراسیون استانداردی که برای اسید گالیک در غلظت‌های مختلف تهیه شده بود، محاسبه شد. به‌منظور مقایسه گیاهان شاهد و گیاهان تلقیح شده با قارچ *P. indica*، تجزیه آماری نتایج، با استفاده از نرم‌افزار JUMP انجام گردید. مقایسه میانگین‌ها نیز در سطح ۵٪ و بر اساس آزمون دانکن انجام شد.

نتایج

وزن خشک ریشه و اندام هوایی: نتایج اندازه‌گیری وزن خشک ریشه و اندام هوایی در جدول تجزیه واریانس آورده شده است (جدول ۱). همانطور که در جدول مشاهده می‌شود، اثرات ساده قارچ و خشکی در هر دو صفت معنی‌دار است، اما اثرات متقابل معنی‌دار نیست. نتایج مقایسه میانگین اثرات اصلی خشکی بیانگر تاثیر افزایشی تنش خشکی بر وزن خشک ریشه است (۱۲/٦٤ گرم در شرایط ظرفیت زراعی در مقابل ١٦/١٦ گرم در شرایط تنش خشکی)، در حالیکه در اندام هوایی این تاثیر کاهشی است (۹/۰۵ گرم در شرایط ظرفیت زراعی در مقابل ٦/٨١ گرم در شرایط تنش). نتایج مقایسه میانگین اثرات اصلی قارچ نیز نشان داد تلقیح با قارچ باعث افزایش وزن خشک ریشه و اندام هوایی در گیاهان تلقیح‌شده با قارچ در مقایسه با گیاهان شاهد تلقیح‌نشده گردید؛ بطوریکه بالاترین وزن خشک ریشه (۱۵/۳۷ گرم) و اندام هوایی (۸/۹٤ گرم) به‌ترتیب مربوط به تیمار گیاهان با میسلیوم و اسپور قارچ می‌باشد. بررسی نتایج مقایسه میانگین نشان داد تفاوت معنی‌داری بین تیمار اسپور و میسلیوم در هر دو صفت اندازه‌گیری شده وجود ندارد (جدول ۲). بطور کلی تلقیح با قارچ اثری افزایشی در میزان ماده خشک ریشه هم در شرایط نرمال (۳۹ درصد) و هم تنش (۳۷ درصد) دارد (شکل ۱). هرچند تنش خشکی باعث کاهش معنی‌دار وزن خشک اندام هوایی گردیده است، اما تلقیح گیاهان با قارچ (اسپور و میسلیوم) به‌ترتیب باعث افزایش ٢٤ و ١٤ درصدی وزن خشک اندام هوایی گیاه سنبل‌الطیب در شرایط نرمال و تنش گردیده است. شکل ۲ تفاوت گیاهان شاهد و تلقیح شده را در سطوح مختلف تنش نشان می‌دهد.

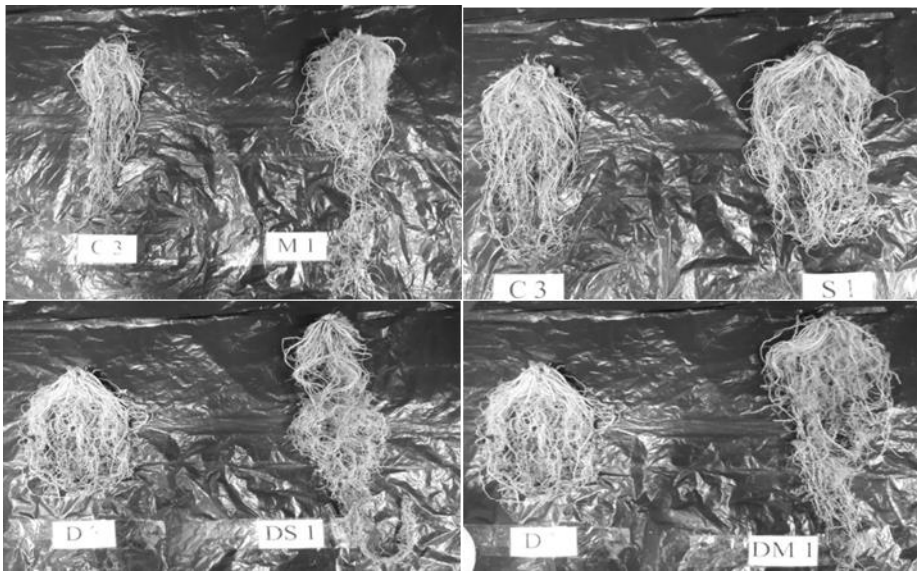
جدول ۱: نتایج تجزیه واریانس صفات مورفوفیزولوژیک گیاه سنبل‌الطیب تحت تأثیر تنش خشکی و تیمار با قارچ

منابع تغییر	درجه آزادی	وزن‌خشک ریشه	وزن‌خشک اندام‌هوایی	کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل کل	نشت یونی	پروتئین	کربوهیدرات	پرولین	فنول
خشکی	۱	۵۵/۵٤**	۲۲/۵۵۷**	۱/۰٤۵**	۰/۰٤۲٦**	۲/۸۰٦**	۲۳۷/۳۲**	۰/۰۹**	۵۹۵/۱۲**	۲۵/۲۵**	۰/۰۱**
قارچ	۲	۱۱/۰٦**	۱۱/۸۹۲*	۰/۰۰٦ns	۰/۰۷٦*	۰/۲۰۹*	۵۱/٤۸**	۰/۰۱**	۱۱۹۹/٦۷**	٤/۵٤**	۰/۰۰۳**
خشکی×قارچ	۲	۰/۰۱۹ ns	۰/۳۳۳ ns	۰/۰۳۱ns	۰/۰۰٦ns	۰/۰٦٦ns	۹/۵۱*	۰/۰۰۱*	۵۰٦/٤٦**	٤/۳۸**	۰/۰۰۱**
خطای آزمایش	۱۲	۰/۸۸	۰/٦٤	۰/۰۱۷	۰/۰۱۳	۰/۰۳۱	۱/۵٤	۰/۰۰۱	۲٦/۲۹	۰/۰۲۷	۰/۰۰۱
ضریب‌تغییرات	–	۱٦/۹	۱۰/۲	۸/۱	۱۵/۱	۷/۳	۱٤/۸	٦/۸	۲۵/٤	۹/۱	۲/۱

ns و ** و* به‌ترتیب غیر معنی‌داری و معنی‌داری در سطح ۱ و ۵ درصد می‌باشد.

www.SID.ir

Arshive of SID



شکل ۱: تفاوت رشد ریشه گیاهان تلقیح‌شده نسبت به گیاهان شاهد [بالا/سمت راست: گیاه تلقیح شده با قارچ اسپور (S)، میسیلیوم (M)، بالا/چپ: ریشه گیاهان شاهد در شرایط ظرفیت زراعی]؛ [پائین/سمت راست: گیاه تلقیح شده با قارچ اسپور (S)، میسیلیوم (M)، پائین/چپ: ریشه گیاهان شاهد در شرایط تنش خشکی]

شکل ۲: تفاوت رشد اندام هوایی گیاهان سنبل‌الطیب تلقیح‌شده نسبت به گیاهان شاهد **[**بالا/سمت چپ: گیاه تلقیح شده با قارچ اسپور (**S**)، میسیلیوم (**M**)، بالا/راست: گیاهان شاهد در شرایط ظرفیت زراعی**]**؛ **[** پائین/سمت چپ: گیاه تلقیح شده با قارچ اسپور (**S**)، میسیلیوم (**M**)، پائین/راست: گیاهان شاهد در شرایط تنش خشکی**]**

www.SID.ir

Arshive of SID

رنگیزه‌های فتوسنتزی (کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل کل): تجزیه واریانس این سه صفت در جدول ۱ آورده شده است. نتایج در مورد کلروفیل a نشان داد تنها تاثیر ساده خشکی بر این صفت معنی‌دار است. نتایج مقایسه میانگین نشان‌دهنده اثر کاهشی تنش خشکی بر این صفت در هر دو تیمار قارچی می‌باشد. به‌طوری‌که تنش خشکی باعث کاهش میزان کلروفیل a از ۱/۸۹ میلی‌گرم بر گرم وزن تر در شرایط بدون تنش به ۱/٤۱ میلی‌گرم بر گرم وزن تر در شرایط تنش گردیده است. نتایج تجزیه واریانس در مورد صفات کلروفیل b و کلروفیل کل نشان داد اثرات ساده قارچ و خشکی بر این صفات معنی‌دار بوده اما اثرات متقابل معنی‌دار نمی‌باشد. نتایج مقایسه میانگین اثرات اصلی خشکی نشان می‌دهد کمترین میزان کلروفیل b (۰/٦۲ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) و کلروفیل کل (۲/۰۲ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) مربوط به تنش ۵۰ درصد ظرفیت زراعی می‌باشد. همچنین بررسی اثرات اصلی قارچ نشان می‌دهد بالاترین میزان کلروفیل b (۰/۸۸ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) و کلروفیل کل (۲/۵۳ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) به ترتیب مربوط به تیمار با میسیلیوم و اسپور قارچ می‌باشد (جدول ۲). همچنین مقایسه میانگین نشان می‌دهد بین تیمار با میسیلیوم و اسپور قارچ تفاوت معنی‌داری وجود ندارد و تلقیح با هر دو فرم قارچ اندوفیت *P. indica* باعث افزایش این رنگیزه‌ها گردیده است؛ برای مثال میزان رنگیزه کلروفیل کل در گیاهان تلقیح شده با قارچ بیشتر از گیاهان شاهد بود (۹ درصد در شرایط نرمال و ٢٤ درصد در شرایط تنش) که نشاندهنده تاثیر مثبت این قارچ بر میزان کلروفیل و ظرفیت فتوسنتزی در گیاهان میزبان می‌باشد.

میزان نشت یونی: برای بررسی اثر تنش خشکی بر نفوذپذیری غشاء، درصد نشت یونی اندازه‌گیری شد. نتایج جدول تجزیه واریانس نشان دهنده معنی‌دار بودن اثرات ساده و متقابل بر میزان نشت یونی می‌باشد (جدول ۱). بیشترین میزان نشت یونی در گیاهان تلقیح‌نشده در شرایط تنش خشکی مشاهده شد (١٦/۰۷ درصد). همچنین نتایج نشان داد تیمار گیاهان سنبل‌الطیب با قارچ *P. indica* باعث کاهش نشت یونی و افزایش پایداری غشاء می‌گردد (٥٤٪ در شرایط نرمال و ۳۸٪ در شرایط تنش)؛ به نظر می‌رسد تیمار با قارچ توانسته است اثرات منفی تنش خشکی بر پایداری غشاء را تا حد زیادی خنثی نماید (جدول ۳).

جدول ۲: مقایسه میانگین صفات مورفوفیزیولوژیک گیاه سنبل‌الطیب تحت تأثیر تیمار با قارچ

تیمارها	وزن خشک ریشه (گرم)	وزن خشک اندام‌هوایی (گرم)	کلروفیل b (میلی‌گرم بر گرم وزن تر)	کلروفیل کل (میلی‌گرم بر گرم وزن تر)
F0	۱۲/۸٥^{b}	٦/۳۳^{b}	۰/٦٥^{b}	۲/۲۰^{b}
F1	١٤/٩٨^{a}	۸/٩٤^{a}	۰/۷۸^{ab}	۲/٥۳^{a}
F2	۱٥/۳۷^{a}	۸/٥٤^{a}	۰/۸۸^{a}	۲/٥۲^{a}

میانگین‌هایی که در یک ستون با حداقل یک حرف مشترک مشخص شده‌اند، با یکدیگر اختلاف معنی‌داری براساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ٥ درصد ندارند.

(F0: تلقیح‌نشده؛ F1: تلقیح شده با قارچ (اسپور)؛ F2: تلقیح شده با قارچ (میسیلیوم))

www.SID.ir

Arshive of SID

جدول ۳: مقایسه میانگین صفات مورفوفیزیولوژیک گیاه سنبل‌الطیب تحت تأثیر تنش خشکی و تیمار با قارچ

تیمارها	نشت یونی (درصد)	پروتئین (میلی‌گرم برگرم وزن تر)	کربوهیدرات (میلی‌گرم گلوکز در گرم وزن تر)	پرولین (میکروگرم پرولین در هر گرم بافت تر)	فنول کل (میلی‌گرم بر گرم وزن تر)
D0F0	۷/٤٦^{c}	۰/۵۵^{a}	۳/۵۷^{d}	۰/٦۷^{d}	۰/٤۵۰^{bc}
D0F1	۱/۹۲^{e}	۰/۵۹ ^{ab}	۱۵/٦۰^{c}	۰/٦۷^{d}	۰/٤۸۹^{a}
D0F2	٤/۹۷^{d}	۰/٦۳^{a}	۲۷/٦۰^{b}	۰/۵۹ ^{d}	۰/٤٦۷ ^{b}
D1F0	۱٦/۰۷^{b}	۰/٤۰ ^{d}	٦/۹۷ ^{cd}	۱/۷۷^{c}	۰/۳۸٦^{d}
D1F1	۱۰/۷۵^{ab}	۰/٤۸ ^{c}	٤۸/۱۳^{a}	٤/۹۵^{a}	۰/٤۳۷^{c}
D1F2	۹/۳۳^{bc}	۰/٤٦ ^{cd}	۲٦/۱۷^{b}	۲/۲۸^{b}	۰/٤٤٤^{c}

میانگین‌هایی که در یک ستون با حداقل یک حرف مشترک مشخص شده‌اند، با یکدیگر اختلاف معنی‌داری براساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد ندارند.

(D0F0: گیاه شاهد در شرایط نرمال؛ D0F1: گیاه تلقیح شده با قارچ (اسپور) در شرایط نرمال؛ D0F2: گیاه تلقیح شده با قارچ (میسیلیوم) در شرایط نرمال؛ D1F0 : گیاه شاهد در شرایط تنش خشکی؛ D1F1: گیاه تلقیح شده با قارچ (اسپور) در شرایط تنش خشکی؛ D1F2: گیاه تلقیح شده با قارچ (میسیلیوم) در شرایط تنش خشکی).

پروتئین و کربوهیدرات محلول: نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان می‌دهد که اثرات ساده خشکی و قارچ و اثرات متقابل بر میزان پروتئین گیاه سنبل‌الطیب معنی‌دار می‌باشد. تنش باعث کاهش میزان پروتئین در هر دو گروه از گیاهان تیمار شده و تیمار نشده گردیده است اما قارچ نیز با افزایش میزان پروتئین در گیاهان تلقیح شده در شرایط نرمال (۱۲٪) و تنش خشکی (۱۷٪) توانسته است اثرات منفی تنش را تا حدی خنثی نماید. اثرات ساده و متقابل تیمارها بر میزان کربوهیدرات گیاه سنبل‌الطیب معنی‌دار می‌باشد. نتایج مقایسه میانگین نشان می‌دهد بالاترین میزان کربوهیدرات مربوط به تیمار اسپور (٤۸/۱۳ درصد) در شرایط تنش خشکی بود. همان‌طورکه مشاهده می‌شود تنش باعث افزایش میزان کربوهیدرات‌ها گردیده است اما این افزایش معنی‌دار نمی‌باشد در حالیکه در گیاهان تلقیح‌شده این افزایش معنی‌دار است. همچنین قارچ تاثیر مثبت و افزایشی بر میزان کربوهیدرات گیاهان تلقیح‌شده در شرایط نرمال (۵/۱ برابری) و تنش (٤/۳ برابری) داشته است (جدول ۳).

پرولین و فنول کل: نتایج تجزیه واریانس در مورد هر دو صفت نشان می‌دهد که اثرات ساده و متقابل تیمارها بر میزان پرولین و فنول کل گیاه سنبل‌الطیب معنی‌دار می‌باشد (جدول ۱). نتایج مقایسه میانگین نشان داد بالاترین میزان پرولین مربوط به تیمار اسپور در شرایط تنش خشکی (٤/۹۸ میکرومولار بر گرم وزن تر) بود. تنش خشکی باعث افزایش میزان پرولین گردیده است که این افزایش معمولا در تنش‌های غیر زیستی مورد انتظار است؛ همچنین تلقیح با قارچ *P. indica* باعث افزایش میزان پرولین در شرایط تنش (۲/۱ برابری) گردیده است اما در شرایط نرمال تاثیر خاصی نداشته است (جدول ۳). در مورد فنل کل، نتایج مقایسه میانگین نشان داد که بالاترین میزان فنول مربوط به تیمار اسپور در شرایط نرمال (۰/٤۹ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) و کمترین میزان فنول مربوط به تیمار بدون قارچ در شرایط تنش خشکی (۰/۳۹ میلی گرم بر گرم وزن خشک) بود. تلقیح

www.SID.ir

Arshive of SID

گیاهان سنبل الطیب با قارچ سبب افزایش میزان فنل کل در شرایط نرمال (٦ درصد) و تنش خشکی (١٤ درصد) گردیده است (جدول ٣).

بحث

نتایج این پژوهش نشان داد تنش خشکی اثرات کاهشی بر صفات اندازه گیری شده (بجز وزن خشک ریشه) دارد، به‌طوری‌که گیاهان در معرض تنش، رشد و زیست‌توده کمتری داشتند؛ از طرفی هر دو فرم اینوکولوم قارچ *P. indica* (اسپور و میسیلیوم) توانست باعث افزایش رشد گیاهان سنبل‌الطیب در شرایط نرمال و تنش گردد؛ به‌طوری‌که گیاهان تلقیح شده نسبت به گیاهان شاهد ظرفیت فتوسنتزی بالاتری داشته، سریعتر رشد کرده و دارای تعداد بیشتری برگ بودند و وزن خشک ریشه و اندام هوایی در آنها بیشتر بود. تأثیر قارچ بر میزان وزن خشک ریشه و اندام هوایی گیاهان تلقیح شده با قارچ در چندین پژوهش گزارش شده است (Waller et al., 2005; Ghabooli et al., 2013). استفاده از وزن خشک به عنوان شاخص تحمل به تنش‌هایی نظیر خشکی و شوری توسط پژوهشگران مورد استفاده قرار گرفته است (Cramer et al., 1990; Shannon and Grieve, 1998). در این پژوهش نیز، از وزن خشک ریشه و اندام هوایی به عنوان معیاری جهت بررسی میزان تحمل به تنش خشکی استفاده شد. نتایج نشان داد که اعمال تنش خشکی باعث کاهش وزن خشک اندام هوایی و افزایش وزن خشک ریشه گردید. افزایش رشد نسبی ریشه تحت تنش خشکی ممکن است به سیستم ریشه‌ای کمک کند تا آب بیشتری را از عمق خاک جذب کند. در شرایط تنش خشکی، به دلیل کاهش میزان آب موجود در خاک، آب در دسترس گیاه نیز کاهش می‌یابد. بنابراین، گیاه جهت جذب آب باید رشد سیستم ریشه‌ای را افزایش دهد تا امکان جذب بیشتر آب برای گیاه فراهم شود (Terzi and Kadioglu, 2006). تلقیح با قارچ توانسته است میزان وزن خشک ریشه را در گیاهان تلقیح‌شده افزایش دهد. به‌نظر می‌رسد میسلیوم‌های قارچ سطح جذب بالاتری را برای گیاه سنبل‌الطیب فراهم آورده و از طرفی به نگهداری آب در اطراف آن کمک کرده‌اند و همین مسئله سبب شده است تا در شرایط یکسان گیاهان تلقیح‌شده نسبت به گیاهان شاهد آب بیشتری در اختیار داشته باشند.

همچنین نتایج بیانگر کاهش رنگیزه‌های بررسی-شده در شرایط تنش است؛ اما تلقیح با قارچ، میزان رنگیزه‌ها را افزایش می دهد؛ این نتایج با نتایج Karimi و همکاران (٢٠١٥) و Basak و همکاران (٢٠١١) مطابقت داشت. به نظر می‌رسد قارچ اندوفیت با تاثیر بر روی پروتئین‌های درگیر در فرآیند فتوسنتز و چرخه کالوین و افزایش بیان آن‌ها، نقش موثری در حفظ و پایداری فتوسنتز ایفا می‌کنند (Karimi et al., 2015). در این آزمایش، افزایش مقدار کلروفیل می‌تواند یکی از مکانیسم‌های افزایش مقاومت گیاهان در شرایط تنش خشکی باشد. افزایش محتوی کلروفیل a، b و کلروفیل کل در گیاهان تلقیح شده با قارچ *P. indica* می‌تواند به دلیل بهبود وضعیت آبی گیاه باشد. از دلایل دیگر در افزایش میزان کلروفیل در گیاهان تلقیح شده با قارچ، جذب بهتر عناصر معدنی می‌باشد (Shahabivand et al, 2017). فتوسنتز جزء اولین فرایندهایی است که تحت تاثیر تنش خشکی قرار می گیرد. در شرایط تنش خشکی، با کاهش مقدار آب قابل دسترس، فتوسنتز کاهش یافته و متعاقب آن تولید ماده خشک گیاه نیز کاهش می‌یابد. تاثیر مثبت تلقیح با قارچ بر میزان کلروفیل می‌تواند تاثیرات مخرب تنش بر میزان فتوسنتز را تا حدی کاهش داده و تولید وزن خشک را در شرایط تنش حفظ نماید.

www.SID.ir

Arshive of SID

خشکی موجب القای تنش اکسیداتیو ثانویه شده و با تولید سطح افزایش یافته ای از گونه های اکسیژن فعال موجب تخریب غشاء و افزایش نشت الکترولیتی می‌گردد. به‌نظر می‌رسد قارچ با کمک به پایداری غشاء و جلوگیری از نشت یونی در شرایط تنش به بهبود فعالیت‌های فیزیولوژیکی گیاه کمک شایانی می‌نماید؛ بطوریکه میزان نشت یونی در گیاهان تیمارشده با قارچ به طور معنی‌داری کاهش پیدا کرده بود (۳۸ درصد). تاثیر قارچ‌های میکوریزی و همچنین قارچ‌های شبه‌میکوریزی مانند *P. indica* بر متابولیسم ROSها و کمک به حفظ هموستازی ROSها در شرایط تنش توسط Nath و همکاران گزارش شده است (Nath et al., 2016).

براساس پژوهش حاضر، تنش خشکی مقدار پروتئین را کاهش می‌دهد. همچنین تیمارهای مختلف قارچ بر میزان پروتئین سنبل‌الطیب معنی‌دار می‌باشد؛ بطوریکه هم در شرایط تنش و هم در شرایط نرمال، میزان پروتئین در گیاهان تلقیح‌شده به طور معنی‌داری بالاتر بود. Bagheri و همکاران (۲۰۱۳) گزارش کردند که تیمار گیاهان برنج با قارچ *P. indica* باعث افزایش میزان پروتئین کل محلول می‌گردد. بررسی میزان کربوهیدرات در گیاه سنبل‌الطیب نشان داد تنش بر میزان آن روندی افزایشی دارد اما این میزان معنی‌دار نمی‌باشد اما تلقیح با قارچ سبب افزایش میزان کربوهیدرات در گیاهان تلقیح شده در شرایط مختلف رطوبتی شده است که با نتایج Ghabooli (۲۰۱٤) و Bagheri و همکاران (۲۰۱۳) مطابقت دارد.

تجمع بالای پرولین به عنوان یک اسمولیت تحت تنش در مقالات زیادی گزارش شده است که نشان‌دهنده اهمیت این اسید آمینه در تنظیم اسمزی در شرایط تنش می‌باشد. افزایش میزان پرولین تحت تنش خشکی در این پژوهش مشاهده گردید. همچنین مشاهده شد که تلقیح با قارچ اگرچه در شرایط نرمال تاثیری بر میزان پرولین در گیاهان تلقیح شده ندارد اما در شرایط تنش و با کاهش فراهمی آب، میزان پرولین را در گیاهان تلقیح شده به‌طور معنی‌داری (۲/۱ برابر) افزایش می‌دهد. تاثیر قارچ بر محتوای پرولین گیاهان تلقیح شده توسط پژوهشگران مختلف گزارش شده است (Ghabooli, 2014; Shahabivand et al, 2017).

بررسی تغییرات فنول کل در تیمارهای مورد مطالعه ژنوتیپ‌های نخود توسط Zare و همکاران (۲۰۱۳) نشان داد که با افزایش سطح تنش خشکی به‌طور معنی‌داری مقدار فنول کل در برگ‌ها کاسته شد، این کاهش می‌تواند ناشی از تخریب این ترکیبات در اثر واکنش با ترکیبات اکسیداتیو در شرایط تنش خشکی باشد. در سنبل‌الطیب هم نتایج مشابهی به‌دست آمد و تنش باعث کاهش فنول کل در هر دو گروه از گیاهان شد. تنش خشکی می‌تواند باعث ایجاد تنش اکسیداتیو شود که این فرایند می‌تواند نقش ویژه‌ای در تخریب سامانه فتوسنتزی، تخریب غشاء سلولی و کلروپلاستی داشته باشد. در این راستا، گیاهان قادرند با تولید ترکیبات آنتی اکسیدانی نظیر ترکیبات فنلی و کارتنوئیدها از ساختارهای سلولی خود در برابر رادیکال های فعال تولید شده در شرایط تنش محافظت کنند. به نظر می رسد افزایش معنی‌دار میزان فنل کل در گیاهان تلقیح شده نقش مهمی در حفاظت آنتی‌اکسیدانی در برابر تنش خشکی داشته باشد. یافته‌های پیشین ما در سطح پروتئین، تاثیر قارچ اندوفیت *P. indica* بر بهبود سیستم آنتی اکسیدانی گیاه میزبان را اثبات کرده بود (Ghabooli et al., 2013). بطور کلی بررسی نتایج نشان داد تلقیح با قارچ *P. indica* می‌تواند اثرات مضر تنش خشکی بر رشد، فتوسنتز، پایداری غشاء و فعالیت فیزیولوژیکی گیاه را کاهش دهد به‌طوری‌که گیاهان تلقیح شده قادرند در شرایط تنش خشکی تا حد زیادی ظرفیت فتوسنتزی خود را حفظ کرده و از طرفی بالاتر بودن

www.SID.ir

Arshive of SID

میـزان پـروتئین، کربوهیـدرات و پـرولین در گیاهـان سنبل‌الطیب تلقیح شده آنها را قادر می‌سازد تا شـرایط تنش را بهتر تحمل کـرده و در مجمـوع رشـد و نمـو بهتری در شرایط تنش داشته باشند.

نتیجه‌گیری کلی

در ایـن پـژوهش کلنیزاسـیون ریشـه گیاهـان سنبل‌الطیب توسط قارچ اندوفیت *P. indica* بررسی و تأثیر مثبت آن بر برخی صفات مورفوفیزیولوژیـکی و بهبود مقاومت به تـنش خشـکی مشـاهده شـد. نتـایج نشان داد که تلقیح گیاهان با اسـپور و میسـلیوم قـارچ سبب بهبود بسیاری از صفـات بررسی شده گردیـده است؛ بـه‌طـوری‌کـه از هـر دو روش مـی‌تـوان بـرای کلنیزاسیون موثر ریشه گیاهـان سـنبل‌الطیـب اسـتفاده نمود و کارایی آنها در بهبود صفات تقریبا مشابه بـوده و اختلاف معنی‌داری با هم ندارنـد. افـزایش مقاومـت به خشکی توسـط قـارچ *P. indica* در سـنبل‌الطیـب، می‌تواند امکان کاشـت ایـن گیـاه دارویـی مهـم را در مناطق خشک و نیمه‌خشک فـراهم نمایـد؛ البتـه نیـاز اسـت کـه بـا پـژوهش‌هـای بیشـتر و بهینـه‌سـازی کلنیزاسـیون ریشـه، ایـن امکـان را عملـی نمـود. در مجموع نتایج بدست آمده خصوصـا در شـرایط حـال حاضر که بر اثر گرم شدن جهـانی دچـار تغییـر اقلـیم شده‌ایم، حائز اهمیت است و نشان می‌دهـد در آینـده استفاده از اندوفیت‌هایی نظیر *P. indica* می‌تواند نقش مهمی در کشاورزی پایدار در ایران بازی کند.

Reference

Ahlawat, S., Saxena, P., Ali, A., Khan, S. and Abdin, M.Z. (2017). Comparative study of withanolide production and the related transcriptional responses of biosynthetic genes in fungi elicited cell suspension culture of *Withania somnifera* in shake flask and bioreactor. Plant Physiology and Biochemistry, 114: 19-28.

Arnon, D.I. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphennol oxidase in Beta vulgaris. Plant Physiology, 24:150-151.

Basak, H., Demir, K. and Kasim, R. (2011). The effect of endo-mycorrhiza (VAM) treatment on growth of tomato seedling grown under saline conditions. African Journal of Agricultural Research, 6(11): 2532-2538.

Bagheri, A.A., Saadatmand, S., Niknam, V., Nejadsatari, T. and Babaeizad, V. (2013). Effect of endophytic fungus, *Piriformospora indica*, on growth and activity of antioxidant enzymes of rice (*Oryza sativa* L.) under salinity stress. International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research, 1(11), 1337-1350.

Bajaj, R., Hu, W., Huang, Y., Chen, S., Prasad, R., Varma, A. and Bushley, K.E. (2015). The beneficial root endophyte Piriformospora indica reduces egg density of the soybean cyst nematode. Biological Control, 90:193-199.

Bates, L.S., Walderd, R.P. and Teare, I.D. (1973). Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant Soil, 39: 205-208.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72: 248-254.

Cramer, G.R., Epstein, E. and Läuchli, A. (1990). Effects of sodium, potassium and calcium on salt- stressed barley. I. Growth analysis. Physiologia Plantarum, 80(1): 83-88.

Figueras, M., Pujal, J., Saleh, A., Save, R., Pages, M. and Goday, A. (2004). Maize Rabl7 overexpression in Arabidopsis plants promotes osmotic stress tolerance. Annals of Applied Biology, 144(3): 251-257.

Irigoyen, J.J., Emerich, D.W. and Sanchez-Diaz, M. (1992). Alfalfa leaf senescence induced by drought stress:

www.SID.ir

Arshive of SID

photosynthesis, hydrogen peroxide metabolism, lipid peroxidation and ethylene evaluation. Physiologia Plantarum, 84:67-72.

Ghabooli, M., Khatabi, B., Ahmadi, F.S., Sepehri, M., Mirzaei, M., Amirkhani, A. and Salekdeh, G.H. (2013). Proteomics study reveals the molecular mechanisms underlying water stress tolerance induced by *Piriformospora indica* in barley. Journal of Proteomics, 94: 289-301.

Ghabooli, M., Hosseini salekdeh, G. and Sepehri M. (2015). The Effect of Mycorrhiza-like Fungus *Piriformospora indica* on Some Morphophysiological Traits of Rice under Normal and Drought Stress Conditions. Plant Production Technology, 7: 59-69.

Ghabooli, M. (2014). Effect of *Piriformospora indica* inoculation on some physiological traits of barley (*Hordeum vulgare*) under salt stress. Chemistry of Natural Compounds, 50(6): 1082-1087.

Ghaffari, M.R., Ghabooli, M., Khatabi, B., Hajirezaei, M.R., Schweizer, P. and Salekdeh, G. H. (2016). Metabolic and transcriptional response of central metabolism affected by root endophytic fungus *Piriformospora indica* under salinity in barley. Plant Molecular Biology, 90(6): 699-717

Karimi, F., Sepehri, M., Afuni, M. and Hajabbasi, M. (2015). Effect of Endophytic Fungus, *Piriformospora Indica*, on Barley Resistance to Lead. JWSS–Isfahan University of Technology, 19 (71): 311-321.

Kilam, D., Saifi, M., Abdin, M.Z., Agnihotri, A. and Varma, A. (2017). Endophytic root fungus *Piriformospora indica* affects transcription of steviol biosynthesis genes and enhances production of steviol glycosides in Stevia rebaudiana. Physiological and Molecular Plant Pathology, 97: 40-48.

Nath, M., Bhatt, D., Prasad, R., Gill, S.S., Anjum, N.A. and Tuteja, N. (2016). Reactive oxygen species generation-scavenging and signaling during plant-arbuscular mycorrhizal and *Piriformospora indica* interaction under stress condition. Frontiers in Plant Science, 7: 1-7.

Prasad, R., Kamal, S., Sharma, P.K., Oelmüller, R. and Varma, A. (2013). Root endophyte *Piriformospora indica* DSM 11827 alters plant morphology, enhances biomass and antioxidant activity of medicinal plant *Bacopa monniera*. Journal of Basic Microbiology, 53: 1016-1024.

Shahabivand, S., Parvaneh, A. and Aliloo, A.A. (2017). Root endophytic fungus *Piriformospora indica* affected growth, cadmium partitioning and chlorophyll fluorescence of sunflower under cadmium toxicity. Ecotoxicology and Environmental Safety, 145: 496-502.

Shannon, M. and Grieve, C. (1998). Tolerance of vegetable crops to salinity. Scientia Horticulturae, 78(1-4): 5-38.

Singleton, V.L., and Rossi, A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-posphotungustic acid reagent. American journal of Enology and Viticulture, 16(3): 144-158.

Sherameti, I., Venus, Y., Drzewiecki, C., Tripathi, S., Dan, V.M., Nitz, I., Varma, A., Grundler, F.M. and Oelmüller, R. (2008). PYK10, a β-glucosidase located in the endoplasmatic reticulum, is crucial for the beneficial interaction between Arabidopsis thaliana and the endophytic fungus *Piriformospora indica*. Plant Journal, 54: 428–439

Sun, C., Johnson, J.M., Cai, D.G., Sherameti, I., Oelmuller, R. and Lou, B.G. (2010). *Piriformospora indica* confers drought tolerance in Chinese cabbage leaves by stimulating antioxidant enzymes, the expression of drought-related genes and the plastid-localized CAS protein, Journal of Plant Physiology, 16712: 1009–1017.

Terzi, R. and Kadioglu, A. (2006). Drought stress tolerance and antioxidant enzyme system in *Ctenanthe setosa*. Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica. 48: 89-96.

Valentovic, P., Luxova, M., Kolarovic, L. and Gasparikova, O. (2006). Effect of osmotic stress on compatible solutes content, membrane stability and water

www.SID.ir

Arshive of SID

relations in two maize cultivars. Plant Soil and Environment, 52: 186-191.

Varma, A., Verma, S., Sahay, N., Bütehorn, B. and Franken, P. (1999). *Piriformospora indica*, a cultivable plant-growth-promoting root endophyte. Applied Environmental Microbiology, 65(6): 2741-2744.

Waller, F., Achatz, B., Baltruschat, H., Fodor, J., Becker, K., Fischer, M., Heier, T., Hückelhoven, R., Neumann, C. and Von Wettstein, D. (2005). The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 102(38): 13386-13391.

Wang, J., Zhao, J., Liu, H., Zhou, L., Liu, Z., Wang, J., Han, J., Yu, Z. and Yang, F. (2010). Chemical analysis and biological activity of the essential oils of two valerianaceous species from China: Nardostachys chinensis and Valeriana officinalis. Molecules, 15(9):6411- 6422.

Xu, L., Wang, A., Wang, J., Wei, Q. and Zhang, W. (2017). *Piriformospora ind*ica confers drought tolerance on Zea mays L. through enhancement of antioxidant activity and expression of drought-related genes. The Crop Journal, 5(3): 251-258.

Zare, M., Bagheri, A.R., Bahrami, A.R. and Massomi, A. (2013). Effect of drought stress on photosynthetic characteristics, phenolic compounds and radical scavenging activities in different chickpea (*Cicer arietinum* L.) genotypes in hydroponic conditions. Journal of Science and Technology of Greenhouse Culture, 3 (4):59-77.

www.SID.ir