

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

شیدا لرستانی^۱، مهدی قبولی^{۱*}، زهرا موحدی^۱، روح الله کریمی^۲

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

^۲گروه 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 مورفوفیزیولوژیک گیاه دارویی سنبل الطیب (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 کاملاً 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 میسلیوم 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، به طوری که در شرایط تنش وزن خشک اندام هوایی و ریشه در گیاهان تلقیح شده نسبت به شاهد به ترتیب ۳۷ و ۱۴ درصد افزایش نشان داد. همچنین در شرایط تنش، فاکتورهای فیزیولوژیک نظیر کلروفیل کل (۲۴ درصد)، فنل کل (۱۴ درصد)، کربوهیدرات (۴/۳ برابری)، پروتئین (۱۷ درصد) و پرولین (۲/۱ برابری) در گیاهان تلقیح شده با قارچ افزایش یافت. به علاوه، 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 سنبل الطیب 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

سنبل الطیب 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

سنبل الطیب (*Valeriana officinalis*)، گیاهی علفی، چند ساله و از خانواده Valerianaceae می‌باشد. 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.

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

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.

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 ارگانسیم‌های مفید خاکزی از جمله قارچ‌های میکوریزی می‌باشد. قارچ‌های میکوریزی با مکانسیم‌های 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 تحریک‌کنندگی رشد قارچ *P. indica* بر روی چندین گیاه دارویی مختلف نظیر *Bacopa monniera* (Prasad et al., 2013) *Stevia rebaudiana* (Kilam Ahlawat et al., 2017) و *Withania somnifera* (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.

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 میسلیم، 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 28 ± 2 درجه سانتی‌گراد و ۱۵۰ دور در دقیقه به مدت ۷-۱۰ روز قرار داده شد. در مرحله بعد با استفاده از فیلتر کاغذی، میسلیم‌ها از محیط کشت جدا و چندین بار با آب مقطر شستشو داده شد (Bajaj et al., 2015).

کشت گیاه و اعمال تیمارها: این پژوهش به صورت 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 به مدت 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 میسلیم و عدم تلقیح) بودند. برای تیمار اسپور، ابتدا بذرها را جوانه‌دار شده سنبل‌الطیب با مقداری مایه تلقیح قارچ حاوی 5×10^5 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 میسلیم، مقدار ۱٪ (w/w) میسلیم به هر گلدان (گلدان‌های پلاستیکی ۱/۵ کیلوگرمی) اضافه گردید. لازم به ذکر است که در مورد تیمارهای شاهد، بذرها را 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 به ذکر است که در شرایط کنترل (عدم اعمال تنش خشکی)، آبیاری گیاهان به صورت منظم انجام گرفت و رطوبت خاک در حد ظرفیت زراعی تنظیم شد. پس از گذشت ۴ 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 ۴۸ ساعت در آون با دمای ۶۵ 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 (۱۹۴۹) انجام شد. غلظت کلروفیل a در طول موج ۶۶۳ نانومتر، کلروفیل b در طول موج ۶۴۵ نانومتر و کلروفیل کل در طول موج ۶۵۲ نانومتر تعیین گردید. نشت یونی مطابق با روش Valentovic و همکاران (۲۰۰۶) 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

در هر دو صفت معنی دار است، اما اثرات متقابل معنی دار نیست. نتایج مقایسه میانگین اثرات اصلی خشکی بیانگر تاثیر افزایشی تنش خشکی بر وزن خشک ریشه است (۱۲/۶۴ گرم در شرایط ظرفیت زراعی در مقابل ۱۶/۱۶ گرم در شرایط تنش خشکی)، در حالیکه در اندام هوایی این تاثیر کاهش یافته است (۹/۰۵ گرم در شرایط ظرفیت زراعی در مقابل ۶/۸۱ 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 تلقیح شده با قارچ در مقایسه با گیاهان شاهد تلقیح نشده گردید؛ بطوریکه بالاترین وزن خشک ریشه (۱۵/۳۷ گرم) و اندام هوایی (۸/۹۴ گرم) به ترتیب مربوط به تیمار گیاهان با میسلیوم و اسپور قارچ می باشد. بررسی نتایج مقایسه میانگین نشان داد تفاوت معنی داری بین تیمار اسپور و میسلیوم در هر دو صفت اندازه گیری 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 معنی دار وزن خشک اندام هوایی گردیده است، اما تلقیح گیاهان با قارچ (اسپور و میسلیوم) به ترتیب باعث افزایش ۲۴ و ۱۴ درصدی وزن خشک اندام هوایی گیاه سنبل الطیب در شرایط نرمال و تنش گردیده است. شکل ۲ تفاوت گیاهان شاهد و تلقیح شده را در سطوح مختلف تنش نشان می دهد.

استاندارد خوانده شد. استخراج کربوهیدرات های محلول از بافت تر به روش Irigoyen و همکاران (۱۹۹۲) با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر مدل کری ۱۰۰ (ساخت استرالیا) در طول موج ۶۲۰ نانومتر قرائت و با استفاده از منحنی استاندارد بدست آمده از غلظت های 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 (۱۹۶۵) صورت گرفت و در طول موج ۷۶۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. مقدار فنول کل با استفاده از منحنی کالیبراسیون استاندارد که برای اسید گالیک در غلظت های مختلف تهیه شده بود، محاسبه شد. به منظور مقایسه گیاهان شاهد و گیاهان تلقیح شده با قارچ *P. indica*، تجزیه آماری نتایج، با استفاده از نرم افزار JUMP انجام گردید. مقایسه میانگین ها نیز در سطح ۵٪ و بر اساس آزمون دانکن انجام شد.

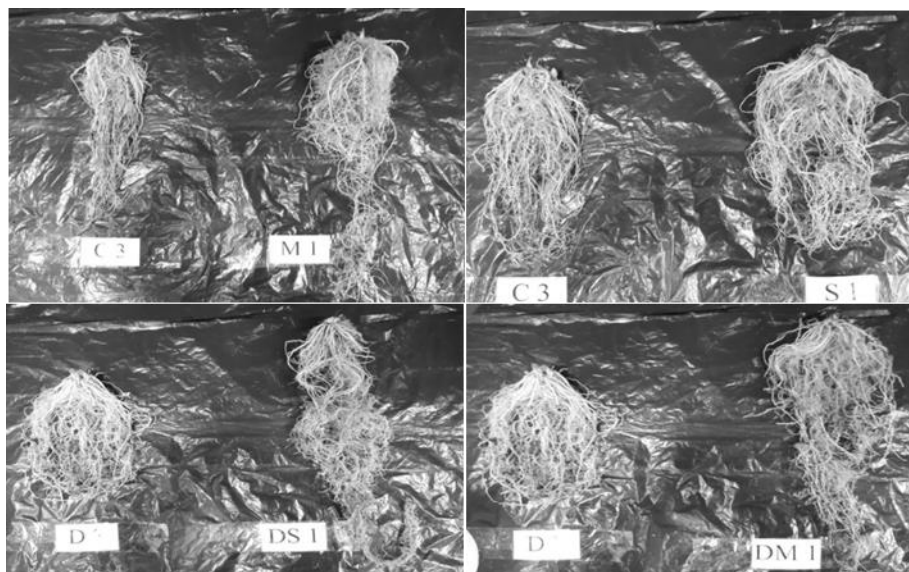
نتایج

وزن خشک ریشه و اندام هوایی: نتایج اندازه گیری وزن خشک ریشه و اندام هوایی در جدول تجزیه واریانس آورده شده است (جدول ۱). همانطور که در جدول مشاهده می شود، اثرات ساده قارچ و خشکی

جدول ۱: نتایج تجزیه واریانس صفات مورفوفیزیولوژیک گیاه سنبل الطیب تحت تاثیر تنش خشکی و تیمار با قارچ

منابع تغییر	درجه آزادی	وزن خشک ریشه	وزن خشک اندام هوایی	کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل کل	نشست یونی	پروتئین	کربوهیدرات	پرولین	فنول
خشکی	۱	۵۵/۵۴**	۲۲/۵۵۷**	۱/۰۴۵**	۰/۰۴۲۶**	۲/۸۰۶**	۲۳۷/۳۲**	۰/۰۹**	۵۹۵/۱۲**	۲۵/۲۵**	۰/۰۱**
قارچ	۲	۱۱/۰۶**	۱۱/۸۹۲*	۰/۰۰۶ ^{ns}	۰/۰۷۶*	۰/۲۰۹*	۵۱/۴۸**	۰/۰۱**	۱۱۹۹/۶۷**	۴/۵۴**	۰/۰۰۳**
خشکی×قارچ	۲	۰/۰۱۹ ^{ns}	۰/۳۳۳ ^{ns}	۰/۰۳۱ ^{ns}	۰/۰۰۶ ^{ns}	۰/۰۶۶ ^{ns}	۹/۵۱*	۰/۰۰۱*	۵۰۶/۴۶**	۴/۳۸**	۰/۰۰۱**
خطای آزمایش	۱۲	۰/۸۸	۰/۶۴	۰/۰۱۷	۰/۰۱۳	۰/۰۳۱	۱/۵۴	۰/۰۰۱	۲۶/۲۹	۰/۰۲۷	۰/۰۰۱
ضریب تغییرات	-	۱۶/۹	۱۰/۲	۸/۱	۱۵/۱	۷/۳	۱۴/۸	۶/۸	۲۵/۴	۹/۱	۲/۱

ns و ** و * به ترتیب غیر معنی داری و معنی داری در سطح ۱ و ۵ درصد می باشد.



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



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

می‌دهد بین تیمار با میسلیوم 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 ۲۴ 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 (۱۶/۰۷ درصد). همچنین نتایج نشان داد تیمار گیاهان سنبل‌الطیب با قارچ *P. indica* باعث کاهش نشت یونی و افزایش پایداری غشاء می‌گردد (۵۴٪ 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).

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 کاهش تنش خشکی بر این صفت در هر دو تیمار قارچی می‌باشد. به طوری که تنش خشکی باعث کاهش میزان کلروفیل a از ۱/۸۹ میلی‌گرم بر گرم وزن تر در شرایط بدون تنش به ۱/۴۱ 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 (۰/۶۲ 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 میسلیوم و اسپور قارچ می‌باشد (جدول ۲). همچنین مقایسه میانگین نشان

جدول ۲: مقایسه میانگین صفات مورفوفیزیولوژیک گیاه سنبل‌الطیب تحت تاثیر 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	۱۲/۸۵ ^b	۶/۳۳ ^b	۰/۶۵ ^b	۲/۲۰ ^b
F1	۱۴/۹۸ ^a	۸/۹۴ ^a	۰/۷۸ ^{ab}	۲/۵۳ ^a
F2	۱۵/۳۷ ^a	۸/۵۴ ^a	۰/۸۸ ^a	۲/۵۲ ^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 ۵ درصد ندارند.

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

جدول ۳. مقایسه میانگین صفات مورفوفیزیولوژیک گیاه سنبل الطیب تحت تأثیر تنش خشکی و تیمار با قارچ

تیمارها	نشت یونی (درصد)	پروتئین (میلی گرم بر گرم وزن تر)	کربوهیدرات (میلی گرم گلوکز در گرم وزن تر)	پرولین (میکروگرم پرولین در هر گرم بافت تر)	فنول کل (میلی گرم بر گرم وزن تر)
D0F0	۷/۴۶ ^c	۰/۵۵ ^a	۳/۵۷ ^d	۰/۶۷ ^d	۰/۴۵۰ ^{bc}
D0F1	۱/۹۲ ^e	۰/۵۹ ^{ab}	۱۵/۶۰ ^c	۰/۶۷ ^d	۰/۴۸۹ ^a
D0F2	۴/۹۷ ^d	۰/۶۳ ^a	۲۷/۶۰ ^b	۰/۵۹ ^d	۰/۴۶۷ ^b
D1F0	۱۶/۰۷ ^b	۰/۴۰ ^d	۶/۹۷ ^{cd}	۱/۷۷ ^c	۰/۳۸۶ ^d
D1F1	۱۰/۷۵ ^{ab}	۰/۴۸ ^c	۴۸/۱۳ ^a	۴/۹۵ ^a	۰/۴۳۷ ^c
D1F2	۹/۳۳ ^{bc}	۰/۴۶ ^{cd}	۲۶/۱۷ ^b	۲/۲۸ ^b	۰/۴۴۴ ^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 (مسیلیوم) 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 (مسیلیوم) در شرایط تنش خشکی).

(۵/۱ برابری) و تنش (۴/۳ 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 سنبل الطیب معنی‌دار می‌باشد (جدول ۱). نتایج مقایسه میانگین نشان داد بالاترین میزان پرولین مربوط به تیمار اسپور در شرایط تنش خشکی (۴/۹۸ میکرومولار بر گرم وزن تر) بود. تنش خشکی باعث افزایش میزان پرولین گردیده است که این افزایش معمولاً 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 تأثیر 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 (۰/۴۹ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) و کمترین میزان فنول مربوط به تیمار بدون قارچ در شرایط تنش خشکی (۰/۳۹ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) بود. تلقیح

پروتئین و کربوهیدرات محلول: نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان می‌دهد که اثرات ساده خشکی و قارچ و اثرات متقابل بر میزان پروتئین گیاه سنبل الطیب 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 سنبل الطیب معنی‌دار می‌باشد. نتایج مقایسه میانگین نشان می‌دهد بالاترین میزان کربوهیدرات مربوط به تیمار اسپور (۴۸/۱۳ درصد) در شرایط تنش خشکی بود. همان‌طور که مشاهده می‌شود تنش باعث افزایش میزان کربوهیدرات‌ها گردیده است اما این افزایش معنی‌دار نمی‌باشد در حالیکه در گیاهان تلقیح شده این افزایش معنی‌دار است. همچنین قارچ تأثیر مثبت و افزایشی بر میزان کربوهیدرات گیاهان تلقیح شده در شرایط نرمال

گیاهان سنبل الطیب با قارچ سبب افزایش میزان فنل کل در شرایط نرمال (۶ درصد) و تنش خشکی (۱۴ درصد) گردیده است (جدول ۳).

بحث

نتایج این پژوهش نشان داد تنش خشکی اثرات کاهشی بر صفات اندازه گیری شده (بجز وزن خشک ریشه) دارد، به طوری که گیاهان در معرض تنش، رشد و زیست توده کمتری داشتند؛ از طرفی هر دو فرم اینوکولوم قارچ *P. indica* (اسپور و میسلیوم) توانست باعث افزایش رشد گیاهان سنبل الطیب در شرایط نرمال و تنش گردد؛ به طوری که 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 تلقیح شده افزایش دهد. به نظر می‌رسد میسلیوم‌های قارچ سطح جذب بالاتری را برای گیاه سنبل الطیب فراهم آورده و از طرفی به نگهداری آب در اطراف آن کمک کرده‌اند و همین مسئله سبب شده است تا در شرایط یکسان گیاهان تلقیح شده 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 می‌دهد؛ این نتایج با نتایج Karimi و همکاران (۲۰۱۵) و Basak و همکاران (۲۰۱۱) مطابقت داشت. به نظر می‌رسد قارچ اندوفیت با تأثیر 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 تأثیر تنش خشکی قرار می‌گیرد. در شرایط تنش خشکی، با کاهش مقدار آب قابل دسترس، فتوسنتز کاهش یافته و متعاقب آن تولید ماده خشک گیاه نیز کاهش می‌یابد. تأثیر مثبت تلقیح با قارچ بر میزان کلروفیل می‌تواند تأثیرات مخرب تنش بر میزان فتوسنتز را تا حدی کاهش داده و تولید وزن خشک را در شرایط تنش حفظ نماید.

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 می گردد. به نظر می رسد قارچ با کمک به پایداری غشاء و جلوگیری از نشت یونی در شرایط تنش به بهبود فعالیت های فیزیولوژیکی گیاه کمک شایانی می نماید؛ بطوریکه میزان نشت یونی در گیاهان تیمار شده با قارچ به طور معنی داری کاهش پیدا کرده بود (۳۸ درصد). تاثیر قارچ های میکوریزی و همچنین قارچ های شبه میکوریزی مانند *P. indica* بر متابولیسم ROS ها و کمک به حفظ هموستازی ROS ها در شرایط تنش توسط Nath و همکاران گزارش شده است (Nath et al., 2016).

بر اساس پژوهش حاضر، تنش خشکی مقدار پروتئین را کاهش می دهد. همچنین تیمارهای مختلف قارچ بر میزان پروتئین سنبل الطیب معنی دار می باشد؛ بطوریکه هم در شرایط تنش و هم در شرایط نرمال، میزان پروتئین در گیاهان تلقیح شده به طور معنی داری بالاتر بود. Bagheri و همکاران (۲۰۱۳) گزارش کردند که تیمار گیاهان برنج با قارچ *P. indica* باعث افزایش میزان پروتئین کل محلول می گردد. بررسی میزان کربوهیدرات در گیاه سنبل الطیب نشان داد تنش بر میزان آن روندی افزایشی دارد اما این میزان معنی دار نمی باشد اما تلقیح با قارچ سبب افزایش میزان کربوهیدرات در گیاهان تلقیح شده در شرایط مختلف رطوبتی شده است که با نتایج Ghabooli (۲۰۱۴) و Bagheri و همکاران (۲۰۱۳) مطابقت دارد.

تجمع بالای پرولین به عنوان یک اسمولیت تحت تنش در مقالات زیادی گزارش شده است که نشان دهنده اهمیت این اسید آمینه در تنظیم اسمزی در شرایط تنش می باشد. 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 به طور معنی داری (۲/۱ برابر) افزایش می دهد. 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 ژنوتیپ های نخود توسط Zare و همکاران (۲۰۱۳) نشان داد که با افزایش سطح تنش خشکی به طور معنی داری مقدار فنول کل در برگ ها کاسته شد، این کاهش می تواند ناشی از تخریب این ترکیبات در اثر واکنش با ترکیبات اکسیداتیو در شرایط تنش خشکی باشد. در سنبل الطیب هم نتایج مشابهی به دست آمد و تنش باعث کاهش فنول کل در هر دو گروه از گیاهان شد. تنش خشکی می تواند باعث ایجاد تنش اکسیداتیو شود که این فرایند می تواند نقش ویژه ای 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 معنی دار میزان فنل کل در گیاهان تلقیح شده نقش مهمی در حفاظت آنتی اکسیدانی در برابر تنش خشکی داشته باشد. یافته های 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* می تواند اثرات مضر تنش خشکی بر رشد، فتوسنتز، پایداری غشاء و فعالیت فیزیولوژیکی گیاه را کاهش دهد به طوری که گیاهان تلقیح شده قادرند در شرایط تنش خشکی تا حد زیادی ظرفیت فتوسنتزی خود را حفظ کرده و از طرفی بالاتر بودن

کلنیزاسیون موثر ریشه گیاهان سنبل الطیب استفاده نمود و کارایی آنها در بهبود صفات تقریباً مشابه بوده و اختلاف معنی داری با هم ندارند. افزایش مقاومت به خشکی توسط قارچ *P. indica* در سنبل الطیب، می تواند امکان کاشت این گیاه دارویی مهم را در مناطق خشک و نیمه خشک فراهم نماید؛ البته نیاز است که با پژوهش های بیشتر و بهینه سازی کلنیزاسیون ریشه، این امکان را عملی نمود. در مجموع نتایج بدست آمده خصوصاً در شرایط حال حاضر که بر اثر گرم شدن جهانی دچار تغییر اقلیم شده ایم، حائز اهمیت است و نشان می دهد در آینده استفاده از اندوفیت هایی نظیر *P. indica* می تواند نقش مهمی در کشاورزی پایدار در ایران بازی کند.

میزان پروتئین، کربوهیدرات و پرولین در گیاهان سنبل الطیب تلقیح شده آنها را قادر می سازد تا شرایط تنش را بهتر تحمل کرده و در مجموع رشد و نمو بهتری در شرایط تنش داشته باشند.

نتیجه گیری کلی

در این پژوهش کلنیزاسیون ریشه گیاهان سنبل الطیب توسط قارچ اندوفیت *P. indica* بررسی و تأثیر مثبت آن بر برخی صفات مورفوفیزیولوژیکی و بهبود مقاومت به تنش خشکی مشاهده شد. نتایج نشان داد که تلقیح گیاهان با اسپور و میسلیم قارچ سبب بهبود بسیاری از صفات بررسی شده گردیده است؛ به طوری که از هر دو روش می توان برای

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. Polyphenol 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., Nejadstari, 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 Rab17 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:

- 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-phosphotungstic 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., Oelmüller, 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

- 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 indica* 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., Bahrani, 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.