نقش میکوریزا در تحمل به خشکی همیشه بهار (*Calendula officinalis* L.)

شیوا مقدسان[۱]، اکبر صفی‌پور افشار[۲*] و فاطمه سعید نعمت‌پور[۲]

چکیده

به منظور بررسی تأثیر همزیستی میکوریزا و تنش خشکی در گیاه همیشه بهار، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در آزمایشگاه تحقیقات گیاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد نیشابور انجام شد. میکوریزا در دو سطح (کاربرد و عدم کاربرد) به عنوان عامل اول و تنش خشکی در سه سطح (آبیاری بر اساس ۱۰۰٪، ۷۵ و ۵۰٪ ظرفیت زراعی) به‌عنوان عامل دوم در نظر گرفته شدند. نتایج نشان دادند که در شرایط تنش خشکی خصوصیات رشدی، نظیر ارتفاع گیاه، تعداد و سطح برگ، وزن تر و خشک ریشه و ساقه و میزان کلروفیل‌های *a* و *b*، در گیاهان میکوریزایی و غیرمیکوریزایی به‌طور معنی‌داری کاهش یافتند. اما کاربرد میکوریزا سبب افزایش پارامترهای رشدی و رنگیزه‌های فتوسنتزی در گیاهان میکوریزایی نسبت به گیاهان غیرمیکوریزایی شد. میزان نسبی آب برگ، میزان فسفر و پتاسیم در اثر خشکی کاهش و مقدار پرولین افزایش یافتند. تلقیح با میکوریزا، میزان نسبی آب گیاه و میزان فسفر و پتاسیم گیاه را در شرایط تنش خشکی در مقایسه با گیاهان تلقیح نشده به‌طور معنی‌داری افزایش و مقدار پرولین را کاهش داد. نتایج نشان داد که تلقیح میکوریزایی همیشه بهار از طریق کمک به جذب آب و یون‌های معدنی سبب افزایش تحمل به خشکی آن می‌شود.

واژگان کلیدی: تنش کم آبی، ظرفیت زراعی، میکوریزا، همزیستی، همیشه بهار.

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه زیست شناسی، واحد نیشابور، دانشگاه آزاد اسلامی، نیشابور، ایران
۲- استادیار گروه زیست شناسی، واحد نیشابور، دانشگاه آزاد اسلامی، نیشابور، ایران
(* نگارنده‌ی مسئول)
asafshar@iau-neyshabur.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۴/۱/۲۲
تاریخ پذیرش: ۹۴/۸/۲۰

مقدمه

همیشه بهار (*Calendula officinalis* L.) گیاهی یک ساله و متعلق به تیره کاسنی و یکی از گیاهان دارویی شناخته شده می‌باشد که امروزه از گل و اسانس آن در داروسازی و صنایع آرایشی و بهداشتی استفاده فراوانی می‌شود. مطالعات داروشناسی تأیید کرده است که گل همیشه بهار مقدار وسیعی اثرات بیولوژیکی و فعالیت‌های داروشناختی محافظ کبدی و ضد اسپاسم دارد (Arora *et al.*, 2013). تنش خشکی یکی از مهم‌ترین تنش‌های محیطی است که رشد و عملکرد گیاهان را تحت تأثیر قرار می‌دهد. خشک‌سالی مهم‌ترین عامل محدودکننده رشد گیاه و تولید محصول در سراسر نقاط جهان است (Abedi and Pakniyat, 2010). کم آبی هم‌چنین باعث کاهش جذب آب توسط سیستم ریشه گیاه، کاهش تعرق، کاهش هدایت روزنه‌ای و فتوسنتز و هم‌چنین به هم خوردن موازنه هورمونی در گیاه می‌گردد. عقیده بر این است که همزیستی قارچی میکوریز آرباسکولار از گیاهان در برابر صدمات تنش خشکی محافظت می‌کند (Auge *et al.*, 2015). از مکانیسم‌های احتمالی افزایش تحمل به خشکی در گیاهان میکوریزایی می‌توان به افزایش هدایت هیدرولیکی ریشه‌ها (Tian *et al.*, 2013)، افزایش جذب آب در شرایط رطوبتی کم به دلیل گسترش ریسه‌های قارچی، ایجاد تعادل اسمزی و حفظ فشار تورگر (Singh *et al.*, 2011)، افزایش فعالیت فتوسنتزی، تجمع کربوهیدرات‌ها و پرولین و افزایش جذب عناصر غذایی (Deepika and Kothamasi, 2015) اشاره کرد. همزیستی ریشه گیاهان با قارچ‌های میکوریز آرباسکولار یکی از قدیمی‌ترین و رایج‌ترین راه‌کارهای افزایش جذب عناصر غذایی برای سازگاری با تنش‌های محیطی است (Ortiz *et al.*, 2015). ریسه‌های گسترش یافته این قارچ‌ها در خاک سطح وسیعی را فراهم می‌کند که از آن طریق عناصر غذایی همچون فسفر، روی و مس جذب و به گیاه میزبان منتقل می‌شوند. مشخص شده است که گیاهان همزیست چه در شرایط تنش چه در شرایط بدون تنش فسفر بیشتری جذب می‌کنند و در نتیجه این گیاهان رشد بهتر و محصول بیشتری خواهند داشت (Abbaspour *et al.*, 2012). از طرف دیگر همزیستی میکوریزا امکان جذب اشکال غیر قابل دسترس نیتروژن را برای گیاه فراهم می‌کند که منجر به رشد و تغذیه بهتر در شرایط خشک می‌شود. همچنین، این قارچ‌ها از طریق افزایش نسبی جذب آب که باعث رقیق شدن اثرات یون‌های سمی می‌شود، افزایش غلظت قندهای محلول در ریشه که منجر به کاهش پتانسیل اسمزی ریشه می‌شود و ایجاد تعادل عناصر غذایی گیاه موجب افزایش مقاومت گیاهان در برابر تنش‌های محیطی می‌گردند (Tavasoli and Asgharzadeh, 2009). تنظیم اسمزی به‌عنوان جزیی مهم از ساز و کار تحمل به تنش خشکی در گیاهان در نظر گرفته می‌شود (Jalili-marandi, 2011). این پدیده شامل تجمع مولکول‌های آلی نظیر پرولین، بتائین و کربوهیدرات‌ها و یون‌های معدنی هم‌چون پتاسیم و کلسیم می‌باشد. در شرایط کمبود آب، در نتیجه تجمع این مواد، پتانسیل اسمزی درون سلول کاهش یافته و آب به درون سلول کشیده می‌شود که به حفظ فشار آماس سلولی کمک می‌کند (Lehmann *et al.*, 2010).

اگر چه مطالعات زیادی برای ارزیابی تحمل به تنش خشکی در گونه‌های دارویی مختلف انجام شده است، ولی تاکنون برای ارزیابی اثر خشکی و قارچ‌های میکوریزا و نحوه اعمال آن بر گیاه دارویی همیشه بهار مطالعه‌ای صورت نگرفته است. بنابراین هدف از این پژوهش، بررسی اثر میکوریزا گونه‌ی

intraradices بر گیاه همیشه بهار و تأثیر آن بر برخی از شاخص‌های رشد و پارامترهای فیزیولوژیکی این گیاه تحت تنش خشکی است.

مواد و روش‌ها

این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در آزمایشگاه تحقیقات گیاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد نیشابور در سال ۱۳۹۳ انجام شد. عامل اول میکوریزا در دو سطح کاربرد و عدم کاربرد میکوریزا (*Glomus intraradices*) و عامل دوم تنش خشکی در سه سطح (آبیاری بر اساس ۱۰۰٪، ۷۵ و ۵۰٪ ظرفیت زراعی) بود. بذور گیاه همیشه بهار از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شد و در گلدان‌های میکوریزایی با دو سوم خاک اتوکلاو شده، یک سوم خاک (۲۵۰ گرم) حاوی اسپورهای (حدود ۱۳۰۰ اسپور) میکوریزا و در گلدان‌های غیرمیکوریزایی با خاک اتوکلاو شده، در عمق نیم سانتی‌متری سطح خاک کاشته شد. برای تعیین ظرفیت زراعی، مقداری از خاک مورد استفاده به مدت ۲۴ ساعت در آون و در دمای ۷۰ درجه سلسیوس قرار داده شد. سپس خاک در گلدان ریخته شده و توزین شد. گلدان تا خارج شدن آب از زیر آن آبیاری شد، مجددا بعد از ۲۴ ساعت گلدان توزین شد، افزایش وزن به دست آمده معرف حداکثر وزن ظرفیت زراعی است. سه چهارم این مقدار معرف ظرفیت زراعی خاک مورد نظر است. نسبت‌های ۱۰۰، ۷۵ و ۵۰٪ ظرفیت زراعی بر این اساس محاسبه گردیدند. یک ماه بعد از کشت (مرحله چهار برگی) تیمارهای مختلف تنش کم آبی بر روی گلدان‌ها به مدت سه هفته اعمال شد. در پایان آزمایش، پارامترهای رویشی شامل وزن تر و خشک ریشه و ساقه، ارتفاع گیاه، تعداد و سطح برگ اندازه‌گیری شدند. برای اندازه‌گیری وزن خشک، نمونه‌های گیاهی به‌مدت ۲۴ ساعت در آون در دمای ۷۰ درجه سلسیوس قرار گرفته و سپس وزن آنها تعیین گردید.

جهت تعیین میزان نسبی آب برگ از هر تیمار دو بوته انتخاب و از هر بوته دو برگ از بخش انتهایی آن برداشت و بلافاصله با ترازوی دقیق توزین شدند. سپس در لوله های آزمایش درب‌دار محتوی آب مقطر غوطه‌ور و به مدت ۲۴ ساعت در محیط آزمایشگاه با دمای تقریبی ۲۲ درجه سلسیوس نگهداری شدند. پس از ۲۴ ساعت برگ‌ها از داخل لوله‌های آزمایش خارج و پس از خشک کردن با ترازوی دقیق وزن آماس برگ‌ها تعیین شد. سپس برگ‌ها در داخل آون با دمای ۷۰ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند و پس از خشک شدن با ترازو توزین و میزان نسبی آب برگ با استفاده از رابطه زیر محاسبه گردید (Diaz-Perez *et al.*, 2006):

(وزن خشک برگ - وزن آماس برگ)/(وزن خشک برگ - وزن تر برگ) = میزان نسبی آب برگ

به منظور سنجش مقدار پرولین از روش بیتس و همکاران (Bates *et al.*, 1973) استفاده شد.

اندازه‌گیری کلروفیل‌ها به روش تغییر یافته آرنون (Arnon, 1949) صورت گرفت. بدین منظور ۰/۵ گرم از بخش هوایی گیاه با کمک ۵ میلی‌لیتر استون ۸۰٪ (v/v) در داخل یک هاون چینی ساییده شده و به صورت هموژن و یکنواخت درآمد. سپس با کمک قیف شیشه‌ای و کاغذ صافی واتمن شماره ۲، محلول تهیه شده صاف گردید. حجم نهایی عصاره به دست آمده ۲۰ میلی‌لیتر می‌باشد. جهت محاسبه غلظت کلروفیل‌های a وb، جذب محلول در طول موج‌های ۶۴۵ و ۶۶۳ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مدل UV/VIS T80+ ساخت شرکت PG Instruments با استفاده از شاهد استون ۸۰٪ خوانده و محاسبه گردید.

کلروفیل a = [12.7(D_{663})-2.69(D_{645})] × (V/1000×W)

کلروفیل b = [22.9(D_{645})-4.68(D_{663})] × (V/1000×W)

که در این روابط V حجم کلروفیل استخراج شده بر حسب میلی‌لیتر و W وزن‌تر بافت مورد استفاده بر حسب گرم می‌باشد. بعد از خشک کردن نمونه‌های گیاهی، جهت اندازه‌گیری غلظت عناصر غذایی از روش سوزاندن خشک استفاده شد و به روش هضم توسط اسید نیتریک یک مولار، عصاره آنها تهیه گردید. پتاسیم به روش نور سنجی شعله با دستگاه فلیم فتومتر و فسفر به روش رنگ سنجی با دستگاه اسپکتروفتومتر (طول موج ۴۲۰ نانومتر) اندازه‌گیری شد (Ghazan- Shahi, 1997). تحلیل آماری نتایج حاصل با نرم افزار SAS نسخه ۹.۱ و STATISTIX نسخه ۸ و مقایسه میانگین داده‌ها به روش آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد انجام شد.

نتایج و بحث

خصوصیات رشدی: نتایج جدول تجزیه واریانس نشان داد که اثرات ساده و متقابل تنش خشکی و میکوریزا بر صفات سطح برگ، وزن خشک ریشه و ساقه و وزن تر ریشه معنی‌دار ($p\leq$ ۰/۰۵) بود. صفت تعداد برگ تنها از تنش خشکی تاثیر پذیرفت و صفات ارتفاع گیاه و وزن تر اندام هوایی تحت تاثیر اثرات ساده فاکتورها قرار گرفتند (جدول ۱).

با توجه به مقایسه میانگین‌ها افزایش تنش خشکی سبب کاهش معنی‌دار صفات تعداد برگ، ارتفاع بخش هوایی و وزن تر اندام هوایی شد. همچنین، استفاده از میکوریزا سبب افزایش ارتفاع گیاه و وزن تر اندام هوایی شد (جدول ۲). در مورد سایر صفات رشدی (سطح برگ، وزن خشک ریشه و ساقه و وزن تر ریشه) در شرایط آبیاری با ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی گیاهان میکوریزایی افزایش معنی‌داری را در این صفات نسبت به گیاهان فاقد میکوریزا نشان دادند. تیمار تنش خشکی باعث کاهش معنی‌دار صفات سطح برگ، وزن خشک ریشه و ساقه و وزن تر ریشه‌چه در گیاهان میکوریزایی و غیرمیکوریزایی شد اما تحریک رشد حاصل از قارچ *G. intraradices* در گیاهان میکوریزایی از کاهش این صفات نسبت به گیاهان غیرمیکوریزایی کاست (جدول ۳). احتمالاً کاهش خصوصیات رشدی به دلیل کاهش محتوای نسبی آب و متعاقباً کوچک شدن اندازه سلول‌ها، کاهش تقسیم سلول‌های مریستمی و در نتیجه کند شدن رشد برگ، توقف تولید برگ، تسریع پیری و متعاقب آن ریزش برگ‌ها می‌باشد (Osuagwu *et al.*, 2010; Lobato *et al.*, 2008). سایر محققان اظهار داشته‌اند که کاهش حجم و وزن خشک ریشه‌ها در هنگام تنش به این دلیل است که تنش خشکی سبب کاهش سطح برگ، بسته شدن روزنه‌ها، کاهش جذب و انتقال آب و عناصر غذایی به دنبال کاهش رطوبت در منطقه ریشه و به‌طورکلی به کارگیری ساز و کارهای تحمل می‌باشد (Asgharipoor and Rafiei, 2010; Ganjeali and Bagheri, 2010). در مطالعه‌ای کاهش طول ساقه در جعفری با افزایش تنش خشکی مشاهده شده است (Petropoulos *et al.*, 2008). کلونیزه شدن گیاهان به وسیله قارچ سبب تنظیم اسمزی بهتر و بهبود رابطه آبی می‌شود. قارچ باعث افزایش میزان جذب آب در گیاه نسبت به تیمارهای بدون قارچ می‌شود و افزایش جذب آب سبب تورژسانس در سلول‌ها می‌گردد که خود یک عامل محرک طویل شدن سلول‌ها است. قارچ سبب گسترش سیستم هیف در اطراف ریشه و متعاقباً افزایش تماس ریشه با خاک می‌شود و در نتیجه توانایی جذب آب در آنها بیشتر می‌گردد. علاوه بر این، قارچ موجب افزایش جذب عناصر غذایی از خاک و افزایش فعالیت آنتی اکسیدان‌های آنزیمی و غیر

آنزیمی می‌گردد که عامل افزایش رشد ریشه و اندام هوایی و عملکرد ماده خشک آنها می‌باشد (Wu and *et al*., 2009). بهبود صفات رشدی مشاهده شده در نتیجه کاربرد میکوریزا در این تحقیق با نتایج تحقیقات راپارینی و همکاران (Rapparini *et al*, 2008) درمورد گیاه درمنه (*Artemisia annua*) و سنسوی و همکاران (Sensoy *et al*., 2007) در فلفل (*Capsicum annuum* L.) مطابقت دارد.

میزان نسبی آب برگ: بر اساس نتایج جدول تجزیه واریانس اثرات ساده و متقابل تنش خشکی و میکوریزا بر میزان نسبی آب برگ معنی‌دار (۰/۰۵ $\geq p$) بود (جدول ۱). در سطوح مختلف تنش خشکی استفاده از میکوریزا سبب افزایش میزان نسبی آب برگ نسبت به شرایط عدم استفاده از میکوریزا شد، به‌طوری‌که در ۱۰۰، ۷۵ و ۵۰ درصد ظرفیت زراعی، استفاده از میکوریزا به ترتیب سبب افزایش ۳/۹، ۱۷/۸ و ۲۶ درصدی در میزان نسبی آب برگ نسبت به شرایط عدم استفاده از میکوریزا گردید. بر اساس این نتایج در شرایط تنش، میکوریزا تاثیر مثبت بیشتری بر میزان نسبی آب برگ دارد (جدول ۳). محققان معتقدند که کاهش میزان محتوای رطوبت نسبی برگ در اثر تنش کم آبی مربوط به بسته‌تر شدن روزنه‌ها می‌باشد و علت بسته شدن روزنه‌ها را تجمع هورمون آبسیزیک اسید می‌دانند به‌طوری‌که در شرایط تنش خشکی در ریشه ساخته شده و در سلول‌های روزنه‌ای تجمع می‌یابد (Khan *et al*., 2007). به نظر می‌رسد که میکوریزا احتمالاً از طریق تغییر در مرفولوژی ریشه و طویل کردن سیستم ریشه گیاه میزبان و افزایش سطح جذب از طریق ریسه‌های قارچ، میزان آب بیشتری جذب کرده و باعث بهبود روابط آبی گیاه می‌گردد (Auge, 2015). همچنین، تجمع یون‌ها یا مواد آلی در واکوئل سلول‌های برگ تحت تنش خشکی، در گیاهان میکوریزی بیشتر انجام می‌شود و باعث کاهش پتانسیل اسمزی سلول‌های برگ می‌گردد. تمام این تغییرات موجب تغییر نسبت آب در گیاهان میکوریزی می‌شود (Wu *et al*., 2007). گزارش‌های مشابهی نیز از افزایش میزان نسبی آب برگ در نتیجه همزیستی گیاهان با قارچ‌های میکوریزا وجود دارد (Tarahomi *et al*., 2011; Hammer *et al*., 2011).

مقدار پرولین: نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر تنش خشکی و هم‌زیستی میکوریزی و اثر متقابل آنها بر محتوای پرولین برگ معنی‌دار ($p \leq$ ۰/۰۱) بود (جدول ۱). نتایج نشان داد که تنش خشکی سبب افزایش میزان پرولین در گیاه همیشه بهار شد اما استفاده از میکوریزا در سطوح مختلف تنش خشکی (۱۰۰، ۷۵ و ۵۰ درصد ظرفیت زراعی) به‌ترتیب باعث کاهش۳۰، ۴۵ و ۵۵ درصدی میزان تجمع پرولین نسبت به حالت عدم کاربرد آن شد (جدول ۳). یکی از مکانیسم‌های کارآمدی که گیاه به هنگام مواجه با خشکی برای حفظ تورژسانس و آماس سلولی به خدمت می‌گیرد، تنظیم اسمزی است. در طی این پدیده فیزیولوژیکی، پتانسیل اسمزی بافت‌های تحت تنش، در اثر انباشت یک سری مواد اسمزی در سلول‌ها کاهش می‌یابد، بنابراین فشار تورگر سلول‌ها در حد مطلوب نگهداری می‌شود (Omidi, 2010). این مواد اسمزی شامل تجمع مولکول‌های آلی نظیر پرولین، بتائین و کربوهیدرات‌ها و یون‌های معدنی همچون پتاسیم، کلسیم و سدیم می‌باشد. در بین این مواد احتمالاً پرولین فراوان‌ترین تنظیم کننده اسمزی به‌شمار می‌آید. پرولین یک اسیدآمینه مهم در گیاه است که در شرایط تنش خشکی از اکسیداسیون درون سلولی و تشکیل رادیکال‌های آزاد جلوگیری می‌کند و همچنین فشار اسمزی گیاه را برای جذب آب تنظیم می‌کند. در شرایط تنش خشکی مقدار پرولین در تیمارهای

میکوریزی کمتر از تیمارهای غیر میکوریزی بود و نشان می‌دهد که تغییرات سنتز این اسیدآمینه با تلقیح قارچی و تحمل خشکی مرتبط است (Bhosale and Shinde, 2011). از آنجایی که قارچ‌های میکوریزا به بهبود رشد گیاه میزبان در شرایط تنش خشکی کمک می‌کنند، گیاهان میکوریزایی مقادیر کمتری از پرولین را نسبت به گیاهان غیرمیکوریزایی سنتز می‌کنند. در حالی که گیاهان غیرمیکوریزایی برای حفظ بقای خود به پرولین به‌عنوان یک تنظیم کننده اسمزی نیاز دارند، در نتیجه مقادیر بیشتری از پرولین را نسبت به گیاهان میکوریزایی سنتز می‌کنند. در رابطه با کاهش میزان پرولین در گیاهان میکوریزایی رودریگرز و همکاران (Rodriguez *et al.*, 2004) پیشنهاد کردند که قارچ‌های میکوریزا به گیاهان همزیست اجازه می‌دهند که تنش را خیلی سریع‌تر از گیاهان غیرهمزیست دریافت کنند و با فعال‌سازی سریع واکنش‌های بیوشیمیایی باعث کاهش اثر شدید تنش شوند.

میزان کلروفیل‌های a و b: نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشـــان داد که اثر تنش خشکی و هم‌زیستی میکوریزی و اثر متقابل آنها بر میزان کلروفیل‌های a و b معنی‌دار ($p \leq ۰/۰۱$) بود (جدول ۱). مقایسه میانگین‌ها بیانگر اثر مضر و کاهشی تنش خشکی بر میزان کلروفیل‌ها است. اما میزان کلروفیل‌های a و b در گیاهان میکوریزایی به‌طور معنی‌داری بیشتر از گیاهان غیرمیکوریزایی است به‌طوری که در شرایط تنش خشکی آبیاری با ۵۰ درصد ظرفیت زراعی میزان کلروفیل‌های a و b در گیاهان میکوریزایی به‌ترتیب ۲۲ و ۴۱ درصد نسبت به گیاهان غیرمیکوریزایی افزایش نشان داد (جدول ۳). کاهش میزان کلروفیل تحت شرایط تنش خشکی که در این تحقیق مشاهده گردید توسط محققین متعددی گزارش شده است (Birhane *et al.*, 2012; Miransari, 2010). تنش خشکی با ایجاد تنش اکسیداتیو و تولید اکسیژن‌های فعال سبب تجزیه و تخریب کلروفیل می‌شود. در طی تنش، کلروفیل‌ها در کلروپلاست تجزیه و ساختارهای تیلاکوئیدی ناپدید می‌گردند. از طرفی دیگر تنش خشکی باعث ایجاد اختلال در سیستم‌های آنزیمی کاهش دهنده فعالیت اکسیژن فعال و افزایش پر اکسیداسیون چربی‌ها و در نتیجه خسارت به غشای سلولی و تخریب رنگدانه‌ها می‌گردد (Ruiz-Sanchez *et al.*, 2011). میکوریزا از طریق روابط ایجاد همزیستی با گیاه در جذب کارآمد برخی عناصر مانند فسفر که به عنوان عنصر کلیدی در انتقال انرژی طی فرآیند فتوسنتز مطرح است، افزایش محتوای کلروفیل و به دنبال آن فتوسنتز را به دنبال دارد. همچنین، گزارش شده است که میکوریزا با تسهیل روند جذب عناصری مانند نیتروژن و منیزیم (جزء اصلی ساختار مولکول کلروفیل) به افزایش محتوای کلروفیل کمک می‌کند.

غلظت فسفر و پتاسیم: بر اساس نتایج جدول تجزیه واریانس، اثرمتقابل تنش خشکی و میکوریزا بر مقدار فسفر و پتاسیم اندام هوایی معنی‌دار ($p \leq ۰/۰۵$) بود (جدول ۱). تنش خشکی سبب کاهش معنی‌دار میزان فسفر و پتاسیم شد و کاربرد میکوریزا باعث افزایش این دو عنصر نسبت به شرایط عدم کاربرد میکوریزا شد، به‌طوری که استفاده از میکوریزا باعث افزایش ۳۵ درصدی میزان فسفر و ۳۱ درصدی میزان پتاسیم در شرایط آبیاری کامل نسبت به گیاهان غیر میکوریزا شد (جدول ۳). فسفر به عنوان یک عنصر ساختمانی در ساخت اسیدهای نوکلئیک نقش دارد و این اسیدها ناقل اطلاعات ژنتیکی در گیاه می‌باشند. فسفر در انتقال انرژی در درختان میوه نقش دارد بنابراین در فعالیت متابولیکی گیاه نقش داشته و به‌طور غیرمستقیم بر عملکرد محصولات از این طریق تأثیر می‌گذارد. هم‌چنین، فسفر نقش

مـؤثــری را در کربن‌گیری ایفا می‌کند (Goharipour fard, 2010). در شرایط محدودیت رطوبت خاک جذب فسفر کاهش می‌یابد. البته خاک‌های مختلف به علت توانایی متفاوتی که از نظر تثبیت فسفر دارند، از این نظر متفاوت‌اند (Kafi *et al.*, 2009). تنش کم آبی تعداد تارهای کشنده ریشه را کاهش داده و بر مورفولوژی ریشه و انشعابات ریشه صدمه وارد می‌نماید که در نتیجه آن جذب عنـاصر غذایی به‌وسیله سیستم ریشه‌ای کاهش می‌یابد. در حقیقت تنش کم آبی مقاومت مکانیکی خاک را افزایش می‌دهد و در نتیجه موجب کاهش رشد ریشه می‌شود. کاهش در رشد ریشه موجب کاهش توانایی گیاه برای جذب عناصر غذایی به‌ویژه فسفر می‌شود (Whitmore and Whalley, 2009). در گیاهان میکوریزایی، هیف‌های قارچی اطراف ریشه توانایی نفوذ بیشتری به منافذ خاک را داشته و بنابراین دسترسی بیشتری جهت جذب املاح معدنی مانند فسفر را پدید می‌آورند. همچنین، تولید و ترشح آنزیم فسفاتاز توسط هیف‌های میکوریزا باعث می‌شود که فسفات غیرمحلول و تثبیت شده در خاک به فرم محلول درآمده و برای ریشه قابل جذب گردد (Gonzalez-Chavez *et al.*, 2009). پتاسیم یکی از مهم‌ترین کاتیون‌های مورد نیاز گیاه می‌باشد که تجمع آن در شرایط تنش خشکی به نقش این عنصر در تنظیم فشار اسمزی نسبت داده شده است (Aliasgharzad *et al.*, 2009). علاوه بر این، در شرایط تنش خشکی، تشکیل رادیکال‌های آزاد اکسیژن در اثر انتقال الکترون فتوسنتزی و یا در اثر فعالیت آنزیم NADPH اکسیداز موجب آسیب سلولی و در نتیجه کاهش رشد گیاهان می‌شود. از بین عناصر غذایی، عناصر پتاسیم و روی از فعالیت آنزیم NADPH اکسیداز جلوگیری می‌کنند و بنابراین از گیاه در برابر آسیب ایجاد شده در اثر تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن در شرایط تنش حفاظت می‌کنند (Cakmak, 2006). نتایج متعددی در خصوص نقش پتاسیم در تنظیم اسمزی و تحمل گیاهان به خشکی گزارش شده است. از جمله می‌توان به یافته‌های باقری (Bagheri, 2010) و تارومی و همکاران (Tarahomi *et al*, 2011) اشاره نمود. تلقیح گیاه با میکوریزا موجب بهبود وضعیت تغذیه‌ای از جمله افزایش غلظت پتاسیم در بافت برگ می‌شود، در نتیجه میزان آب برگ و انتقال عناصر غذایی به گیاه افزایش می‌یابد (Hammer *et al.*, 2011). این وضعیت به افزایش انتقال اسیمیلات به مخزن منجر می‌شود و از شدت خشکی بر تولید محصول می‌کاهد و در نهایت رشد و تولید را افزایش می‌دهد (Colla *et al.*, 2008).

نتیجه‌گیری کلی

بر اساس نتایج به دست آمده، با افزایش شدت تنش خشکی، رشد رویشی کاهش یافت. استفاده از قارچ *G. intraradices* نسبت به حالت عدم کاربرد آن مثبت ارزیابی شد و کاربرد قارچ سبب افزایش صفات رشدی مورد بررسی گردید. همچنین، در سطوح مختلف تنش خشکی استفاده از میکوریزا سبب افزایش میزان نسبی آب برگ و کاهش مقدار پرولین نسبت به شرایط عدم استفاده از میکوریزا شد. به علاوه، تنش خشکی سبب کاهش معنی‌دار میزان فسفر و پتاسیم در گیاهان میکوریزایی و غیرمیکوریزایی شد اما این کاهش در گیاهان غیرمیکوریزایی شدیدتر بود. به نظر می‌رسد همزیستی ریشه گیاه همیشه بهار با قارچ *G. intraradices* و در نتیجه افزایش توانایی گیاه در جذب آب و املاحی چون فسفر و پتاسیم به تحمل شرایط خشکی توسط گیاه کمک کرده است.

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس برخی صفات مورفوفیزیولوژیکی گیاه همیشه بهار تلقیح شده با میکوریزا تحت شرایط تنش خشکی

Table 1- Analysis of variance of some morphophysiological traits of marigold inoculated with mycorrhiza under drought stress condition

منابع تغییر S.O.V	درجه آزادی df	میانگین مربعات MS.					
		تعداد برگ Leaf number	سطح برگ Leaf area	ارتفاع گیاه Plant height	وزن خشک ریشه Root dry weight	وزن تر ریشه Root fresh weight	وزن خشک ساقه Shoot dry weight
Drought Stress(D)	2	7.722*	1254.9**	40.66**	0.0049**	0.0081**	0.0148**
Mycorrhizae (M)	1	2.00ns	1640.48**	37.55**	0.0045**	0.0072**	0.0168**
D×M	2	1.16ns	304.57**	1.55ns	0.0009**	0.0010*	0.0034*
Error	12	1.72	39.90	2.5	0.00009	0.0002	0.0005
CV(%)		14.02	19.66	12.82	17.70	13.30	18.19

ns، * و ** به‌ترتیب غیرمعنی‌دار، معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۵ و معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۱ است.

ns, * and **: non significant, significant at the 5% and 1% levels of probability, respectively

ادامه جدول ۱

Table 1 - Continued

منابع تغییر S.O.V	درجه آزادی df	میانگین مربعات MS.						
		وزن تر بخش هوایی Shoot fresh weight	میزان نسبی آب RWC	پرولین Proline	کلروفیل a Chlorophyll a	کلروفیل b Chlorophyll b	پتاسیم K	فسفر P
Drought Stress(D)	2	0.036**	255.46**	0.170**	2087.85**	4883.57**	394.97**	5.903**
Mycorrhizae (M)	1	0.056**	334.71**	0.10**	578.56**	9408.71**	256.88**	4.805*
D×M	2	0.001ns	42.49*	0.027**	89.73**	923.27**	17.10*	3.309*
Error	12	0.001	10.75	0.001	270.14	982.16	4.373	0.729
CV(%)		15.26	5.2	16.4	8.93	12.7	9.61	14.39

ns، * و ** به‌ترتیب غیرمعنی‌دار، معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۵ و معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۱ است.

ns, * and **: non significant, significant at the 5% and 1% levels of probability, respectively

جدول ۲- مقایسه میانگین اثر میکوریزا و تنش خشکی بر برخی صفات رشدی و فیزیولوژیکی گیاه همیشه بهار

Table 2- Mean comparisons of mycorrhiza and drought stress on some growth and physiological traits of marigold

تیمار Treatment		تعداد برگ Leaf number	ارتفاع گیاه Plant height (cm)	وزن تر بخش هوایی Shoot fresh weight (g)
تنش خشکی بر اساس ظرفیت زراعی Drought stress based on FC (%)	100	7.83±0.54 a	15.33±1.20 a	0.346±0.026 a
	75	6.16±0.47b	11.0±0.57 b	0.261±0.037 b
	50	5.66±0.55b	10.66±0.76 b	0.190±0.023 c
میکوریز mycorrhizae	*Glomus intraradices*	6.88±0.32 a	13.77±0.77 a	0.322±0.025 a
	Non- mycorrhizal	6.22±0.65 a	10.88±0.99 b	0.210±0.026 b

جدول ۳- مقایسه میانگین اثرات متقابل میکوریزا و تنش خشکی بر برخی صفات رشدی و فیزیولوژیکی گیاه همیشه بهار

Table 3- Mean comparisons of interaction between mycorrhiza and drought stress on some growth and physiological traits of marigold

میکوریز mycorrhizae	ظرفیت زراعی FC (%)	سطح برگ Leaf area (mm^2)	وزن خشک ریشه Root dry weight (g)	وزن تر ریشه Root fresh weight (g)	وزن خشک اندام هوایی Shoot dry weight (g)	کلروفیل a Chlorophyll a (mg/gFW)
غیر میکوریزی Non-mycorrhizal	100	29.02±3.12 bc	0.036±0.003 b	0.113±0.012 b	0.09±0.005 bc	63.56±4.68 a
	75	25.11±3.74 c	0.013±0.003 d	0.08±0.003 c	0.05±0.008 cd	45.14±6.50 cd
	50	13.62±1.06 d	0.015±0.002 cd	0.06±0.006 c	0.04±0.005 d	33.59±3.47 e
Glomus intraradices	100	64.22±3.90 a	0.093±0.008 a	0.18±0.005 a	0.20±0.012 a	83.81±2.35 b
	75	39.04±2.85 b	0.033±0.003 bc	0.12±0.008 b	0.10±0.027 b	51.47±2.77 c
	50	21.77±5.60 cd	0.020±0.010 bcd	0.08±0.010 c	0.06±0.005 cd	41.03±4.29 d

ادامه جدول ۳

Table 3- Continued

میکوریز mycorrhizae	ظرفیت زراعی FC (%)	کلروفیل b Chlorophyll b (mg/gFW)	میزان نسبی آب RWC (%)	پرولین Proline (mg)	پتاسیم K (mg)	فسفر P (mg)
غیر میکوریزی Non-mycorrhizal	100	67.50±5.74 b	68.43±1.94 ab	0.05±0.026 d	12.32±0.97 d	5.52±0.48 b
	75	48.39±2.27 c	57.48±1.07 c	0.26±0.008 b	15.49±1.83 cd	5.84±0.51 b
	50	36.08±3.61 e	50.26±1.61 d	0.52±0.024 a	26.16±1.06 b	4.89±0.38 b
Glomus intraradices	100	89.75±5.38 a	71.12±3.03 a	0.03±0.015 d	16.16±0.70 c	8.26±0.72 a
	75	71.48±3.47 b	67.69±1.92 ab	0.12± 0.026 c	25.91±1.39 b	6.17±0.48 b
	50	50.91±2.91 c	63.24±1.0 bc	0.23±0.003 b	34.57±0.92 a	4.92±0.20 b

*Means with common letters in each column based on the LSD test are not statistically significant at the 5% probability level

References منابع مورد استفاده

- Abbaspour, H., S. Saeidi-Sar, H. Afshari, and M.A. Abdel-Wahhab. 2012. Tolerance of Mycorrhiza infected pistachio (*Pistacia vera* L.) seedling to drought stress under glasshouse conditions. *Journal of Plant Physiology*. 169(7): 704-709.
- Abedi, T., and H. Pakniyat. 2010. Antioxidant enzyme changes in response to drought stress in ten cultivars of oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*. 46: 27-34.
- Auge, R.M., H.D. Toler, and A.M. Saxton. 2015. Arbuscular mycorrhizal symbiosis alters stomatal conductance of host plants more under drought than under amply watered conditions: a meta-analysis. *Mycorrhiza*. 25(1): 13-24.
- Aliasgharzad, N., S.A. Bolandnazar, M.R. Neyeshabouri, and N. Chaparzadeh. 2009. Impact of soil sterilization and irrigation interval on P and K acquisition by mycorrhizal onion (*Allium cepa* L.). *Biologicals* (London). 64(3): 512-515.
- Arnon, D.I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in Beta vulgaris. *Plant Physiology*. 24: 1–15.
- Arora, D., A. Rani, and A. Sharma, 2013. A review on phytochemistry and ethnopharmacological aspects of genus Calendula. *Pharmacognosy Reviews*. 7: 179-187.
- Asgharipoor, M.R., and M. Rafiei. 2010. Effect of drought stress on different morphological characteristics of root and root: shoot ratio on mungbean genotypes. Pp: 28-14. (In Persian).
- Auge, R.M., H.D. Toler, and A.M. Saxton. 2015. Arbuscular mycorrhizal symbiosis alters stomatal conductance of host plants more under drought than under amply watered conditions: a meta-analysis. *Mycorrhiza*. 25(1): 13-24.
- Bagheri, A.R. 2010. The effect of drought stress on yield, yield components and ion contents of four wheat cultivars. *Journal of Plant Ecophysiology*. 1(3):15-30. (In Persian).
- Bates, I.S., R.P. Waldern, and I.D. Teare. 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil*. 39: 205-207.

- Bhosle, K.S., and B.P. Shinde. 2011. Influence of arbuscular mycorrhizal fungi on prolineand chlorophyll content in *Zingiber officinale* rosc grown under water stress. *Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences*. 1(3): 172-176.
- Birhane, E., F.J. Sterck, M. Fetene, F. Bongers, and T.W. Kuyper. 2012. Arbuscular mycorrhizal fungi enhance photosynthesis, water use efficiency, and growth of frankincense seedlings under pulsed water availability conditions. *Oecologia.* 169: 895-904.
- Cakmak, I. 2006. Role of mineral nutrients in tolerance of crop plants to environmental stress factors. *Faculty of Engineering and Natural Sciences*. 35-48.
- Colla, G., Y. Rouphael, M. Cardarelli, M. Tullio, M.R. Carlos, and R. Elvira. 2008. Alleviation of salt stress by arbuscular mycorrhizal in zucchini plants grown at low and high phosphorus concentration. *Biology and Fertility of Soils.* 44: 501–509.
- Deepika, S., and D. Kothamasi. 2015. Soil moisture--a regulator of arbuscular mycorrhizal fungal community assembly and symbiotic phosphorus uptake. *Mycorrhiza.* 25(1):67-75.
- Diaz-Perez, J.C., K.A. Shackel, and E.G. Sutter. 2006**.** Relative water content. *Annals of Botany*. 97 (1): 85-96.
- Ganjeali, A., and A. Bagheri. 2010. Evaluation of morphological characteristics of root chickpea (*Cicer arietinum* L.) in response to drought stress. *Iranian Journal of Pulses Research.* 1 (2):101-110. (In Persian).
- Goharipour fard, F. 2010. Effect of micronutrients on yield *Brassica napus* L. oil. Ph.D Thesis, Islamic Azad University, Arsanjan Branch. 100 pp. (In Persian).
- Gonzalez-Chavez, M.C., R. Carrillo-Gonzalez, and M.C. Gutierrez-Castorena. 2009. Natural attenuation in a slag heap contaminated with cadmium: the role of plants and arbuscular mycorrhizal fungi. *Journal of Hazardous Materials* 161(2-3): 1288-1298.
- Hammer, E.C., H. Nasr, J. Pallon, P.A. Olsson, and H. Wallander. 2011. Elemental composition of arbuscular mycorrhizal fungi at high salinity. *Mycorrhiza*. 21:117–129.
- Jalili-Marandi, R. 2011. Physiology environmental stresses and mechanisms of resistance in garden plants. Urmia University Jahad Press. 636 pp. (In Persian).
- Kafi, M., A. Borzoie, M. Salehi, A, Kamandi, A. Masoumi, and J. Nabati. 2009. Physiology environmental stress in plants. Mashhad University Jahad Press. (In Persian).
- Khan, H.U., W. Link, T. Hocking, and F. Stoddard. 2007. Evaluation of physiological biomembranes. *Methods in Enzymology*. 148: 350-382.
- Lehmann, S., Funck, D., Szabados, L. and Rentsch, D. 2010. Proline metabolism and transport in plant development. *Amino Acids*. 39: 949-962.
- Lobato, A.K.S., C.F. Oliveira Neto, B.G. Santos Filho, R.C.L. Costa, F.J.R Cruz, H.K.B. Neves, and M.J.S. Lopes. 2008. Physiological and biochemical behavior in soybean (*Glycine max* cv. Sambaiba) plants under water deficit. *Australian Journal Crop Science*. 2: 25-32.
- Miransari, M. 2010. Contribution of arbuscular mycorrhizal symbiosis to plant growth under different types of soil stress. *Plant Biology (Stuttg)* 12: 563-569.

- Omidi, H. 2010. Changes of proline content and activity of antioxidative enzymes in two canola genotype under drought stress. *American Journal of Plant Physiology*. 5(6): 338-349.
- Ortiz, N., E. Armada, E. Duque, A. Roldan, and R. Azcon. 2015. Contribution of arbuscular mycorrhizal fungi and/or bacteria to enhancing plant drought tolerance under natural soil conditions: effectiveness of autochthonous or allochthonous strains. *Journal of Plant Physiology*. 174: 87-96.
- Osuagwu, G.G.E., H.O. Edeoga, and A.N. Osuagwu. 2010. The influence of water stress (drought) on the mineral and vitamin potential of the leaves *Ocimum gratissimum* L. *Recent Research in Science and Technology*. 2: 27-33
- Petropoulos, S.A., M.G. Polissiou, and H.C. Passam. 2008. The effect of water deficit stress on the growth, yield and composition of essential oils of parsley. *Science Horticultural.* 115: 393-397.
- Rapparini, F., J. Liusia, and J. Penuelas. 2008. Effect of arbuscular mycorrhiza colonization on terpen emission and content of *Artemisia annua* L. *Plant Biology*. 10(1):108-122.
- Rodriguez, R., R. Redman, and J.M. Henson, 2004. The role of fungal symbioses in the adaptation of plants to high stress environments. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change* 9: 261-272.
- Ruiz-Sanchez, M., E. Armada, Y. Munoz, I.E. Garcia de Salamone, R. Aroca, J.M. Ruiz-Lozano, and R. Azcon. 2011. Azospirillum and arbuscular mycorrhizal colonization enhance rice growth and physiological traits under well-watered and drought conditions. *Journal of Plant Physiology*. 168: 1031-1037.
- Sensoy, S., S. Demir, O. Turkmen, C. Erdinc, and O. Savur. 2007. Responses of some different pepper (*Capsicum annum* L.) genotypes to inoculation with two different arbuscular mycorrhizal fungi. *Sciential Horticulturae*. 113: 92-95.
- Tarahomi, G., M. Lahoti, and F. Abbasi. 2011. Study the effects of drought stress on changes of soluble sugars, chlorophyllcontent and potassium in *Salvia Leriifolia* Benth. *The Quarterly Journal of Biological Scienc* (Islamic Azad University, Zanjan branch). 9 (3):1-7 (In Persian).
- Tavasoli, A., and N. Asgharzadeh. 2009. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on nutrient uptake and yield onion (*Allium cepa* L.) in saline soil in field conditions. *Journal of Water and Soil*. 19(1): 145-158.
- Tian, M., Y.L. Chen, M. Li, and R.J. Liu 2013. Structure and function of arbuscular mycorrhiza: a review. *Ying Yong Sheng Tai Xue Bao* 24(8): 2369-2376.
- Whitmore, A.P., and W.R. Whalley. 2009. Physical effects of soil drying on roots and crop growth. *Journal of Experimental Botany*. 60 (10): 2845-2857.
- Wu, Q.S., R.X. Xia, Y.N. Zou, and G.Y. Wang. 2007. Osmotic solute responses of mycorrhizal citrus (*Poncitrus trifoliate*) seedling to drought stress. *Acta physiologica Plantarum*. 29: 543-549.
- Wu, Q.S., Y.N. Zou, R.X. Xia, and M.Y. Wangi. 2009. Mycorrhiza has a direct effect on reactive oxygen metabolism of drought-stressed citrus. *Soil, Environmental and Atmospheric Sciences*. 55(10): 436–442.

The Role of Mycorrhiza in Drought Tolerance of Marigold (*Calendula officinalis* L.)

Moghadasan. Sh.[1], A. Safipour Afshar[2*], and F. Saeid Nematpour[2]

Received: April 2015, Accepted: 11 November 2015

Abstract

To study the effect of mycorrhizal symbiosis and drought stress on marigold, a factorial experiment in a completely randomized design with three replications was conducted at the Plant Research Laboratory of Islamic Azad University, Neyshabur branch in 2014. The first factor consisted of application and non-application of mycorrhiza (*Glomus intraradices*) and the second factor consisted of drought stress with three levels (irrigation based on 100%, 75% and 50% of field capacity). The results showed that growth parameters like plant height, leaf number, leaf area, root, shoot dry/fresh weight, Chla and Chlb content were significantly decreased by drought stress in both mycorrhizal and non-mycorrhizal plants. However, inoculation of plants by mycorrhizal fungus increased growth parameters and photosynthetic pigments as compared with non-mycorrhizal ones. Traits like RWC, potassium and phosphorus in response to drought stress were decreased. Inoculation of plant roots with Mycorrhizal fungi increased significantly RWC, potassium and phosphorus content of the plants under drought conditions as compared with non-inoculated plants. The results also showed the mycorrhizal symbiosis by *Glomus intraradices* improved drought tolerance of marigold through enhancing the absorption of water and mineral ions.

Key words: Colonization, Drought stress, Field capacity, Marigold, Symbiosis.

1- M.Sc. student, Department of Biology, Neyshabur Branch, Islamic Azad University, Neyshabur, Iran.
2- Asistant Professor, Department of Biology, Neyshabur Branch, Islamic Azad University, Neyshabur, Iran.
**** Corresponding Author:*** *asafshar@iau-neyshabur.ac.ir*