تأثیر قارچ شبه‌میکوریزی *Piriformospora indica* روی برخی خصوصیات مورفوفیزیولوژیک گیاه برنج تحت شرایط نرمال و تنش خشکی

The Effect of Mycorrhiza-like Fungus *Piriformospora indica* on Some Morphophysiological Traits of Rice under Normal and Drought Stress Conditions

مهدی قبولی[۱*]، قاسم حسینی‌سالکده[۲] و مژگان سپهری[۳]

تاریخ دریافت: ۹۲/۰۵/۲۹ تاریخ پذیرش: ۹۳/۰۳/۰۵

چکیده

قارچ‌های میکوریزی با فراهم نمودن سطح جذب‌کننده وسیع‌تر برای انتقال عناصر غذایی موجود در خاک به ریشه گیاهان، سبب بهبود رشد گیاه می‌گردند. قارچ *P. indica* به‌عنوان یک قارچ اندوفیت شبه‌میکوریزی باعث تحریک رشد بسیاری از گونه‌های گیاهی گردیده و همچنین مقاومت به تنش‌های زیستی و غیرزیستی را افزایش می‌دهد. هدف از اجرای این پژوهش بررسی امکان کلونیزاسیون ریشه گیاه برنج توسط قارچ اندوفیت *P. indica* و تأثیر آن در بهبود رشد و افزایش برخی پارامترهای مورفولوژیکی گیاه برنج در شرایط نرمال و تنش بود. این بررسی به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار در گلخانه پژوهشکده بیوتکنولوژی اصفهان اجرا شد. فاکتورهای آزمایش شامل دو سطح قارچ (تلقیح و عدم‌تلقیح) و ۳ سطح خشکی (ظرفیت زراعی، ۲۵٪ ظرفیت زراعی و ۵۰٪ ظرفیت زراعی) بود. نتایج حاصله نشان داد که قارچ *P. indica* قادر به کلونیزاسیون ریشه گیاه برنج می‌باشد و تلقیح با قارچ سبب افزایش بیوماس قسمت‌های هوایی و ریشه گیاهان تلقیح شده نسبت به گیاهان شاهد گردید، به‌طوری‌که در شرایط تنش خشکی شدید وزن خشک اندام هوایی و ریشه در گیاهان تلقیح شده نسبت به شاهد به‌ترتیب ۴۷ و ۶۳ درصد افزایش نشان داد. همچنین در شرایط تنش شدید محتوای نسبی آب گیاهان تلقیح شده ۱۹٪ بالاتر بود. نتایج بر نقش مؤثر این قارچ در بهبود خصوصیات گیاه برنج تحت شرایط تنش خشکی به‌ویژه در شرایط تنش شدید (۲۵٪ ظرفیت زراعی) دلالت داشت. با توجه به این نتایج به نظر می‌رسد برنج نیز یکی از میزبان‌های این قارچ محسوب می‌شود و قارچ می‌تواند امکان کشت برنج را در سایر مناطق ایران فراهم آورد. همچنین بهبود رشد در گیاهان تلقیح شده نیاز به استفاده از کودهای شیمیایی را در کشت برنج کاهش خواهد داد.

واژه‌های کلیدی: اندوفیت، کشاورزی پایدار، کلونیزاسیون، تلقیح، بیوماس

۱. استادیار گروه زراعت، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ملایر، ملایر، ایران
۲. دانشیار گروه سیستم بیولوژی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج، ایران
۳. استادیار گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران
*: نویسنده مسئول Email: m.ghabooli@malayeru.ac.ir

مقدمه

برنج یکی از غذاهای اصلی برای جمعیت زیادی از مردم دنیا به خصوص آسیا محسوب می‌شود. با توجه به افزایش روزافزون جمعیت از یک‌طرف و کاهش زمین و منابع آبی در دسترس برای کشت برنج از سوی دیگر، یافتن راه‌کارهایی برای افزایش عملکرد ضروری به نظر می‌رسد (*دی*[1] و همکاران، 1996). تنش خشکی در تولید گیاه برنج یکی از موانع اصلی دستیابی به عملکرد بالا محسوب می‌شود. روش‌های بیولوژیک مبتنی بر استفاده از پتانسیل ارگانیسم‌های مفید خاکزی در برقراری روابط همزیستی با گیاهان، نقش مؤثری در افزایش مقاومت به تنش‌های محیطی ازجمله تنش خشکی بر عهده دارند (*بوهنرت*[2] و همکاران، 1996). همزیستی میکوریزی یکی از مهم‌ترین روابط همزیستی در عالم حیات می‌باشد که در آن، ریشه گیاه با قارچ به‌صورت یک واحد زنده فعالیت می‌کنند و از یکدیگر سود می‌برند. قارچ‌های میکوریزی با فراهم نمودن سطح جذب‌کننده وسیع‌تر برای انتقال عناصر غذایی موجود در خاک به ریشه گیاهان، سبب بهبود رشد گیاه می‌گردند. از دیگر مزایای این ارتباط مفید می‌توان به تولید هورمون‌های محرک رشد گیاه، افزایش عملکرد محصول، افزایش مقاومت گیاه به عوامل بیماریزای ریشه، کمک به کاهش تنش‌های محیطی و از همه مهم‌تر کاهش مصرف کودهای شیمیایی اشاره نمود (*کرچ*[3] و همکاران، 2000). قارچ‌های میکوریزی آربوسکولار همزیست اجباری هستند که این خود سبب ایجاد مشکلات متعددی در زمینه تولید مایه تلقیح شده و چالش عظیمی در علم میکوریز بوجود آورده است. تاکنون تحقیقات متعدد مولکولی در زمینه شناسایی و برطرف نمودن موانع ژنتیکی عدم‌رشد قارچ‌های میکوریزی در محیط‌های مصنوعی و امکان تکثیر سریع و تولید انبوه این قارچ‌ها به‌منظور استفاده در برنامه‌های کشاورزی پایدار به‌عمل‌آمده، اما متأسفانه چندان موفقیت‌آمیز نبوده است.

یکی از قارچ‌های اندوفیت، قارچ *Piriformospora indica* است که در سال ۱۹۹۹ توسط *وارما*[4] و همکاران (1999) از خاک مناطق بیابانی کشور هندوستان جداسازی شد. *P. indica* دارای دامنه وسیعی از گیاهان میزبان است که با کلونیزاسیون ریشه آنها سبب تحریک شدید رشد میزبان‌های خود می‌گردد. این قارچ با تعداد زیادی از گیاهان عالی (تک و دولپه‌ای) رابطه همزیستی برقرار می‌نماید که شامل انواع خشکی‌پسند، بوته‌های یک‌ساله و چندساله و درختان چوبی می‌باشند (*سینگ*[5] و همکاران، 2000). تأثیر تلقیح قارچ *P. indica* در افزایش زیست‌توده (بیوماس) گیاهان دیگری نظیر ذرت، جعفری، توتون، آرتمسیا و درخت سپیدار توسط *ورما*[6] و همکاران (1998) نیز گزارش‌شده است. نتایج مطالعات آن‌ها حاکی از افزایش بیوماس قسمت‌های هوایی و ریشه گیاهان تلقیح‌شده با قارچ به میزان دو برابر نسبت به گیاهان شاهد بود. اثر تحریک‌کنندگی رشد این قارچ بر گیاهان لگومینوز شامل نخود، نخودفرنگی، لوبیا، سویا و اسفناج نیز اثبات‌شده است (*وارما* و همکاران، 2004؛ *رای*[7] و همکاران، 2001 و *رای* و همکاران، 2005). نتیجه برخی تحقیقات نشان داد که برخلاف قارچ‌های میکوریزی آربوسکولار که قادر به ایجاد همزیستی با گیاهان خانواده شب‌بو نمی‌باشند، قارچ *P. indica* واجد این توانایی است و اثر تحریک‌کنندگی رشد بر اعضای این خانواده را نیز دارد. قارچ *P. indica* برخلاف قارچ‌های میکوریزی که همزیست اجباری گیاهان میزبان هستند، همزیست اختیاری است و به آسانی در محیط‌های کشت مصنوعی قادر به رشد می‌باشد. دامنه میزبانی وسیع این قارچ و توان کشت بر روی محیط‌کشت مصنوعی نقطه روشنی در علم میکوریز ایجاد کرده است (*ژیانگ*[8] و همکاران، 2011)

اهمیت برقراری ارتباط همزیستی قارچ *P. indica* با گیاهان مختلف در تحریک رشد گیاه و در نتیجه افزایش عملکرد و توان تحمل گیاه به تنش‌های شوری، خشکی و عوامل بیماری‌زا توسط پژوهشگران مختلف گزارش‌شده است (*رای* و همکاران، 2005؛ *والر*[9] و همکاران، 2005، *وارما* و همکاران، 2012). نتایج بررسی تأثیر قارچ *P. indica* در گیاه جو نشان داد که قارچ باعث افزایش فاکتورهای مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی و همچنین افزایش مقاومت گیاهان تلقیح‌شده به تنش شوری و خشکی می‌گردد (*والر* و همکاران، 2005؛ قبولی و همکاران، ۱۳۹۰). پژوهش حاضر با هدف بررسی امکان کلونیزاسیون ریشه گیاه برنج به‌عنوان یک گیاه زراعی مهم در کشور ایران توسط قارچ اندوفیت *P. indica* و همچنین مطالعه تأثیرات احتمالی قارچ بر برخی خصوصیات مورفولوژیکی گیاه در شرایط بدون تنش و تنش خشکی انجام شده است.

1. Dey
2. Bohnert
3. Kirch
4. Varma
5. Singh
6. Verma
7. Rai
8. Qiang
9. Waller

مواد و روش‌ها

تهیه، تشخیص و تکثیر مایه تلقیح قارچ *P. indica*

مایه تلقیح اولیه قارچ از دانشگاه گیسن کشور آلمان تهیه شد. جدایه قارچ مذکور با تهیه تعداد کافی پتری‌دیش محتوی محیط‌کشت پیچیده (حاوی عناصر میکرو، ماکرو، نمک‌ها، پپتون و عصاره مخمر)، کشت داده شد و در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد درون انکوباتور به‌مدت ۴ هفته نگهداری شد. پس از سپری شدن مدت زمان لازم جهت تولید اسپور، مقدار ۳۰-۲۰ میلی‌لیتر محلول آب-توئین ۲۰ درصد به هر پتری‌دیش افزوده شد و پس از جمع‌آوری اسپورهای قارچ، تعداد آنها با استفاده از لام نئوبار شمارش شد (دشمخ[1] و همکاران، 2006).

کشت گیاه و اعمال تیمارها

این بررسی به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار و با استفاده از خاک طبیعی در گلخانه پژوهشکده بیوتکنولوژی اصفهان اجرا شد. خاک مورداستفاده از مزرعه دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان تهیه و قبل از شروع آزمایش به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد در اتوکلاو استریل گردید. فاکتورهای آزمایش شامل ۳ سطح خشکی (ظرفیت زراعی (F.C.)، ۵۰٪ ظرفیت زراعی و ۲۵٪ ظرفیت زراعی) و ۲ سطح تیمار قارچی (تلقیح و عدم تلقیح) بودند. ابتدا بذرهای جوانه‌دار شده برنج (رقم صدری) با مقداری مایه تلقیح قارچ حاوی 5×10^5 اسپور در میلی‌لیتر تلقیح و به مدت ۱ ساعت بر روی شیکر با دور آرام قرار داده شدند تا امکان اتصال اسپورهای قارچ به سطح ریشه‌چه فراهم شود، سپس تعداد ۳ گیاهچه تلقیح‌شده با قارچ در داخل هر گلدان (گلدان‌های ۵ کیلویی) کاشته شد. لازم به‌ذکر است که در مورد تیمارهای شاهد، بذرهای جوانه‌دار شده برنج بدون تلقیح با اسپورهای قارچ در گلدان‌های حاوی بستر کشت کاشته شدند. گلدان‌ها پس از کشت، به گلخانه با دمای روزانه ۲۸ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۷۰ درصد منتقل و به‌مدت ۴ هفته نگهداری شدند. پس از گذشت یک هفته از کاشت گیاهان، نمونه‌برداری از ریشه گیاهان تلقیح‌شده برای تعیین میزان آلودگی ریشه با قارچ (درصد کلونیزاسیون ریشه: نسبت تعداد ریشه‌هایی که در آن‌ها اندام‌های قارچ مشاهده‌شده نسبت به تعداد ریشه‌هایی که در آن‌ها اندام‌های قارچ مشاهده نشد. این نسبت برای گیاهان شاهد برابر با صفر بود.) صورت پذیرفت (*والر* و همکاران، 2005). برای اعمال تنش خشکی، ظرفیت زراعی خاک موردنظر در آزمایشگاه خاکشناسی تعیین گردید که برابر با ۲۷/۵٪ بود. گلدان‌ها تا ۱۴ روز در حد ظرفیت زراعی نگه داشته شدند و اعمال تنش خشکی ۱۴ روز بعد از کاشت گیاهان انجام شد. تنش خشکی با قطع آبیاری و با توزین روزانه گلدان‌ها و تنظیم آن‌ها در حد تنش موردنظر اعمال شد. لازم به ذکر است که در شرایط کنترل (عدم‌اعمال تنش خشکی)، آبیاری گیاهان به‌صورت منظم انجام گرفت و رطوبت خاک در حد ظرفیت زراعی تنظیم شد. پس از گذشت ۴ هفته از اعمال تنش و اندازه‌گیری صفاتی همچون ارتفاع اندام هوایی و محتوای نسبی آب، نمونه‌برداری از اندام‌های گیاهی (برگ و ریشه) انجام شد. برای اندازه‌گیری فاکتورهای مورد نظر از هر گلدان ۳ بوته انتخاب و وزن تر و خشک آن‌ها پس از اندازه‌گیری به‌عنوان یک تکرار در نظر گرفته شد، به‌عبارت دیگر ۴ گلدان به عنوان ۴ تکرار در نظر گرفته شده است. پس از تعیین وزن تر نمونه‌های گیاهی برداشت‌شده، نمونه‌های مذکور به‌مدت ۴۸ ساعت در آون با دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و وزن خشک آن‌ها نیز محاسبه گردید. به‌منظور مقایسه گیاهان شاهد و گیاهان تلقیح‌شده با قارچ *P. indica*، تجزیه آماری نتایج حاصل با استفاده از نرم‌افزارهای JUMP به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. مقایسه میانگین‌ها نیز در سطح ۵٪ و براساس آزمون دانکن انجام شد.

نتایج و بحث

بررسی توان آلوده‌سازی ریشه توسط قارچ *P. indica*

نتایج مطالعات میکروسکوپی صورت گرفته بر روی ریشه گیاهان برنج تلقیح‌شده با اسپورهای قارچ نشان داد که کلونیزاسیون ریشه گیاهان برنج توسط قارچ صورت گرفته است، به‌طوری‌که می‌توان ریسه‌های برون ریشه‌ای حاصل از رشد اسپورهای قارچ در سطح خارجی ریشه و همچنین اندامک‌های کروی قارچ را در داخل کورتکس ریشه مشاهده نمود. نتایج نشان داد که قارچ *P. indica* توان بالایی در اشغال ناحیه کورتکس ریشه گیاه برنج دارد و این گیاه نیز مانند بسیاری از گیاهان ازجمله جو (قبولی و همکاران، ۱۳۹۰) در محدوده میزبانی این قارچ قرار دارد. اندازه‌گیری درصد کلونیزاسیون نیز نشان داد بیش از ۸۰٪ ریشه‌های مورد بررسی توسط قارچ آلوده شده‌اند که این مطلب نشان می‌دهد که این گیاه میزبان زراعی خوبی برای قارچ می‌باشد و امکان مطالعات بیشتر را در آینده فراهم می‌آورد.

1. Deshmukh

وزن خشک ریشه

نتایج اندازه‌گیری وزن خشک ریشه در جدول تجزیه واریانس آورده شده است (جدول ۱). همان‌طورکه در جدول مشاهده می‌شود اثرات ساده قارچ و خشکی کاملاً معنی‌دار است، اما اثرات متقابل آنها معنی‌دار نیست. نتایج نشان داد که تنش خشکی در مجموع اثری کاهشی بر این پارامتر دارد و با افزایش تنش خشکی و کاهش فراهمی آب موردنیاز برای گیاه، میزان توسعه ریشه کاهش پیدا می‌کند. در شکل ۱ میزان کاهش وزن خشک ریشه در اثر تنش در گیاهان تلقیح شده و شاهد و مقایسه آن‌ها آورده شده است. همان‌طورکه در شکل مشاهده می‌شود، تنش خشکی باعث کاهش وزن خشک ریشه شده، به‌طوری‌که کمترین مقدار این صفت در بالاترین سطح خشکی (تنش شدید) مشاهده می‌شود و این مسئله در مورد هر دو گروه (تلقیح شده و شاهد) صادق است. با این حال نتایج نشان می‌دهد میزان کاهش این صفت در گیاهان تلقیح شده در مقایسه با گیاهان شاهد کمتر است، به‌طوری‌که در گیاهان شاهد ۵۵٪ کاهش صفت بین تیمار بدون تنش و تنش شدید (تیمار ۲۵٪ ظرفیت زراعی) مشاهده شد اما میزان این کاهش در گیاهان تلقیح شده حدود ۴۲٪ بود. همچنین مقایسه میزان وزن خشک ریشه در گیاهان تلقیح‌شده و شاهد در سطوح مختلف خشکی نشان می‌دهد که تلقیح با قارچ اثری افزایشی در میزان ماده خشک ریشه در همه سطوح تنش دارد، به‌طوری‌که قارچ به‌ترتیب در شرایط نرمال و تنش شدید باعث افزایش ۲۵ و ۶۳ درصدی وزن خشک ریشه گیاهان تلقیح شده در مقایسه با گیاهان شاهد گردیده است. در شکل ۲ می‌توان تفاوت در میزان رشد ریشه گیاهان تلقیح شده و شاهد را در شرایط نرمال و تنش شدید مشاهده نمود. میزان تفاوت این صفت بین گیاهان تلقیح شده و شاهد در هر سه سطح خشکی کاملاً مشهود و معنی‌دار است. تأثیر قارچ بر میزان وزن خشک ریشه گیاهان تلقیح‌شده با قارچ در چندین پژوهش مستقل گزارش‌شده است (قبولی و همکاران، ۱۳۹۰؛ *والر* و همکاران، 2005؛ *علیخانی*[1] و همکاران، 2013).

وزن خشک اندام هوایی

در جدول ۱، نتایج تجزیه واریانس مربوط به اندازه‌گیری وزن خشک و تر اندام هوایی آورده شده است. این نتایج تقریباً مشابه با نتایج اندازه‌گیری وزن خشک ریشه می‌باشد. نتایج نشان داد که با افزایش شدت تنش، وزن خشک و تر اندام هوایی گیاهان تلقیح شده و شاهد به میزان قابل‌توجهی کاهش می‌یابد و مانند نتایج اندازه‌گیری وزن خشک ریشه، بیشترین کاهش در تیمار خشکی شدید مشاهده می‌شود (شکل ۳). پژوهشگران اثر تنش کمبود آب را در مراحل مختلف رشد برنج مورد بررسی قرار دادند و اظهار نمودند که تنش کمبود آب در مرحله رشد رویشی به‌طور معنی‌داری باعث کاهش ارتفاع گیاه گردید و تعداد پنجه‌ها را نیز کاهش داد (پیردشتی و همکاران، ۱۳۸۳). در این پژوهش نیز نتایج مشابهی به‌دست آمد، به‌طوری‌که تنش خشکی بر فاکتورهای اندازه‌گیری شده تأثیر معنی‌داری داشت و تنش شدید به‌ترتیب باعث کاهش ۷۸ و ۷۲ درصدی وزن تر و خشک اندام هوایی در گیاهان شاهد گردید، با این حال میزان این کاهش در گیاهان تلقیح شده به‌ترتیب ۶۷ و ۶۰ درصد بود. شکل ۳ اثر سطوح مختلف تنش خشکی و تیمار با قارچ را بر روی وزن خشک اندام هوایی نشان می‌دهد. با دقت در این شکل می‌توان به دو نکته پی برد. اول اینکه در سه تیمار خشکی بین گیاهان شاهد و تیمار اختلاف وجود دارد و این اختلاف با افزایش تنش مشهودتر است به‌طوری‌که در تنش متوسط و شدید این اختلاف معنی‌دار است. قارچ در شرایط بدون تنش باعث افزایش ۴٪ وزن خشک گیاهان تلقیح شده گردیده، درحالی‌که در شرایط تنش خشکی شدید این مقدار به ۴۷٪ افزایش پیدا کرده است. دوم این‌که قارچ توانسته افت وزن خشک را در گیاهان شاهد کاهش دهد به‌طوری‌که در گیاهان شاهد، ۷۲٪ کاهش در وزن خشک مشاهده می‌شود درحالی‌که در گیاهان تلقیح‌شده این مقدار ۶۰٪ است که این امر بیانگر تأثیر قارچ بر بهبود وزن خشک تحت شرایط تنش می‌باشد. شکل ۴ تفاوت رشد اندام هوایی را در گیاهان شاهد و تلقیح‌شده با قارچ نشان می‌دهد. این نتایج همراه با نتایج مربوط به وزن خشک ریشه بیانگر این است که تلقیح با قارچ باعث افزایش فاکتورهای مورفولوژیکی گیاه خصوصاً تحت شرایط تنش می‌گردد.

1. Alikhani

جدول ۱: تجزیه واریانس صفات اندازه‌گیری شده در سطوح مختلف خشکی و قارچ

Table 1: Analysis of variance of measured physiological traits at different levels of drought and fungus

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	میانگین مربعات (Mean Square)				
		وزن خشک ریشه Root dry weight	وزن تر اندام هوایی Total shoot fresh weight	وزن خشک اندام هوایی Total shoot dry weight	ارتفاع Height	محتوای نسبی آب RWC
خشکی (Drought)	2	0.034**	0.120**	0.004**	11944.41**	0.068**
قارچ (Fungus)	1	0.025**	0.003**	0.001**	491.68*	0.038**
خشکی × قارچ (Drought × Fungus)	2	0.0001	0.001	0.001	48.20	0.004**
خطا (Error)	18	0.0004	0.001	0.001	104.91	0.001

* و **: به‌ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد

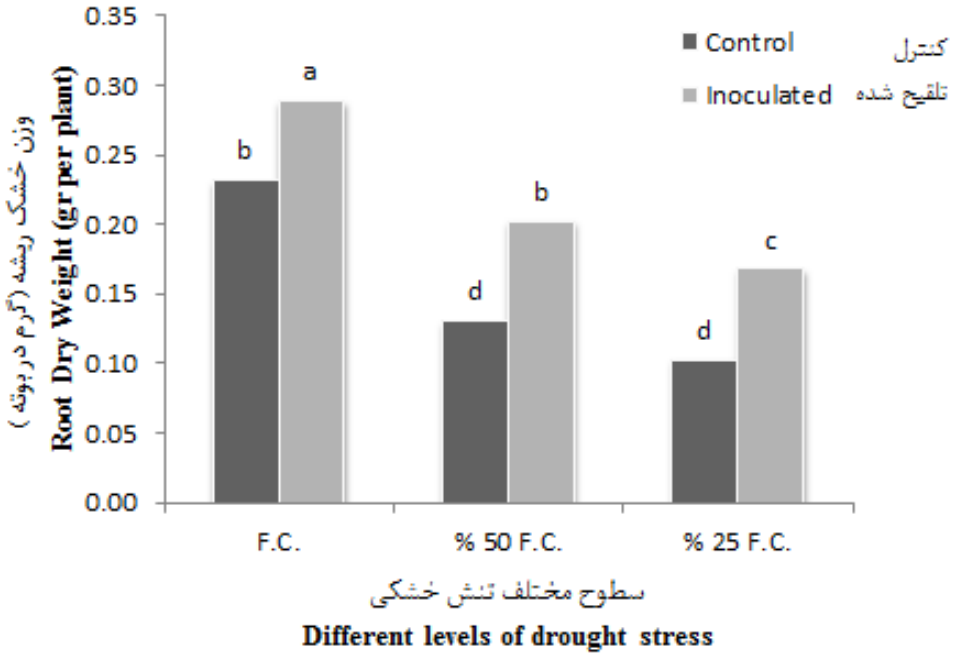
* and **: significant at the 5 and 1% level of probability, respectively

تنش خشکی رشد، وزن خشک و محصول قابل برداشت گیاهان را کاهش می‌دهد. استفاده از وزن خشک گیاه به عنوان شاخص تحمل به تنش‌هایی نظیر خشکی و شوری توسط پژوهشگران مورد استفاده قرار گرفته است (*شانن*[1] و همکاران، 1990؛ *کرامر*[2] و همکاران، 1998). در این پژوهش نیز از وزن خشک اندام هوایی و ریشه به‌عنوان معیاری جهت بررسی میزان تحمل گیاهان مورد مطالعه به تنش خشکی و مقایسه آنها استفاده شد. نتایج اندازه‌گیری وزن خشک اندام هوایی و وزن خشک ریشه بیانگر اهمیت ارتباط همزیستی قارچ *P. indica* با گیاه برنج در تحریک رشد گیاه و در نتیجه افزایش احتمالی عملکرد آن است. مقایسه وزن خشک اندام هوایی و ریشه گیاهان تلقیح‌شده نسبت به گیاهان شاهد در شرایط بهینه از نظر خشکی (ظرفیت مزرعه) تأییدکننده اثر تحریک‌کنندگی قارچ است، به‌طوری‌که حتی در شرایط بدون تنش هم افزایش صفات اندازه‌گیری‌شده مشاهده شد. به نظر می‌رسد میسیلیوم‌های قارچ سطح جذب بالاتری را برای گیاه برنج 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. این امر خصوصاً در شرایط تنش برای گیاهان دارای اهمیت زیادی است. مطالعات مختلف نشان می‌دهد قارچ *P. indica* بر متابولیسم فسفر، گوگرد و ازت تأثیر مستقیم داشته و همچنین فراهمی فسفر موجود در خاک را افزایش می‌دهد (*مالا*[3] و همکاران، 2004؛ *اولمولر*[4] و همکاران، 2009). در این پژوهش نیز اگرچه تنها برخی فاکتورهای مورفوفیزیولوژیکی اندازه‌گیری شد اما تأثیر احتمالی قارچ بر فرایند جذب عناصر نیز دور از ذهن نیست.

علاوه‌بر توان تحریک‌کنندگی رشد گیاه برنج توسط قارچ، نتایج حاصل از این تحقیق بر نقش مؤثر آن در بهبود رشد و تحمل گیاه تحت شرایط تنش خشکی دلالت دارد. نتایج نشان داد که تلقیح ریشه گیاهان برنج با قارچ *P. indica* سبب افزایش مقدار وزن خشک اندام هوایی و ریشه به‌ترتیب به‌میزان ۴۷ و ۶۳ درصد نسبت به شرایط بدون تلقیح گردید که با توجه به اینکه از وزن خشک گیاه به‌عنوان شاخص تحمل به تنش استفاده می‌شود می‌توان نتیجه گرفت که قارچ در افزایش مقاومت به تنش خشکی در گیاه برنج به‌عنوان یک گیاه نیازمند به آب مؤثر بوده است. در گیاه برنج بین توسعه سیستم ریشه‌ای و میزان عملکرد برنج رابطه مستقیم وجود دارد، لذا سیستم ریشه‌ای توسعه‌یافته میزان عملکرد برنج را افزایش خواهد داد. به‌نظر می‌رسد در این پژوهش نیز قارچ با افزایش سطح جذب از طریق میسیلیوم‌های خود، فراهمی آب و عناصر را برای گیاه افزایش داده که این افزایش به نوبه خود سبب گردیده است که میزان فتوسنتز و تولید قندها و مواد ذخیره‌ای افزایش یابد و در نتیجه رشد اندام هوایی و ریشه‌ها افزایش یابد. تأثیر احتمالی افزایش وزن خشک ریشه و ساقه گیاهان تلقیح شده با قارچ با عملکرد برنج نیاز به بررسی‌های بیشتر دارد اما دور از ذهن نیست که قارچ بر زودرسی و عملکرد گیاه برنج مؤثر باشد.

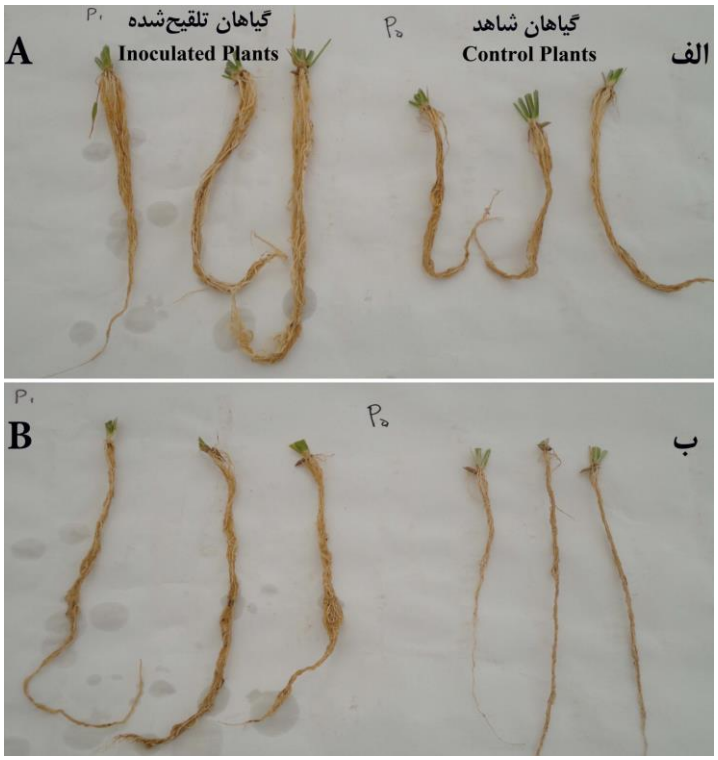
مقایسه این نتایج با نتایج پژوهش بر روی گیاه جو (قبولی و همکاران، ۱۳۹۰) نشان‌دهنده تأثیر بیشتر تنش خشکی بر کاهش میزان وزن خشک ریشه و اندام هوایی در گیاه برنج در مقایسه با گیاه جو است که این مطلب با نیاز آبی بیشتر کشت برنج و همچنین سیستم ریشه‌ای متفاوت جو و برنج مرتبط است. البته در هر دو پژوهش تأثیر قارچ بر افزایش این دو فاکتور مشهود و قابل‌توجه است.

1. Shannon
2. Cramer
3. Malla
4. Oelmuller



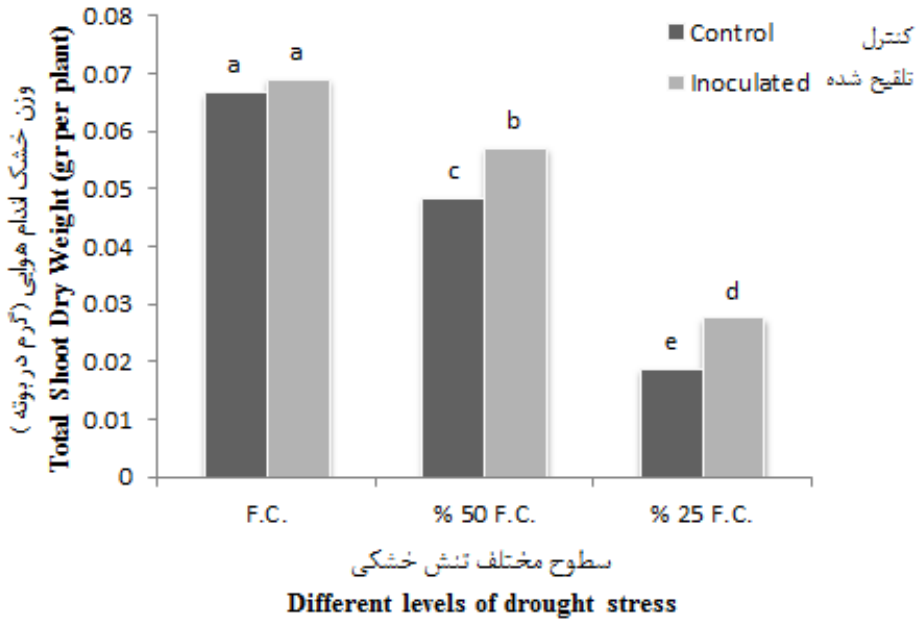
شکل ۱: مقایسه وزن خشک ریشه گیاهان تیمار و شاهد تحت شرایط تنش خشکی

Fig. 1: Comparing root dry weight in inoculated and control plants under drought stress



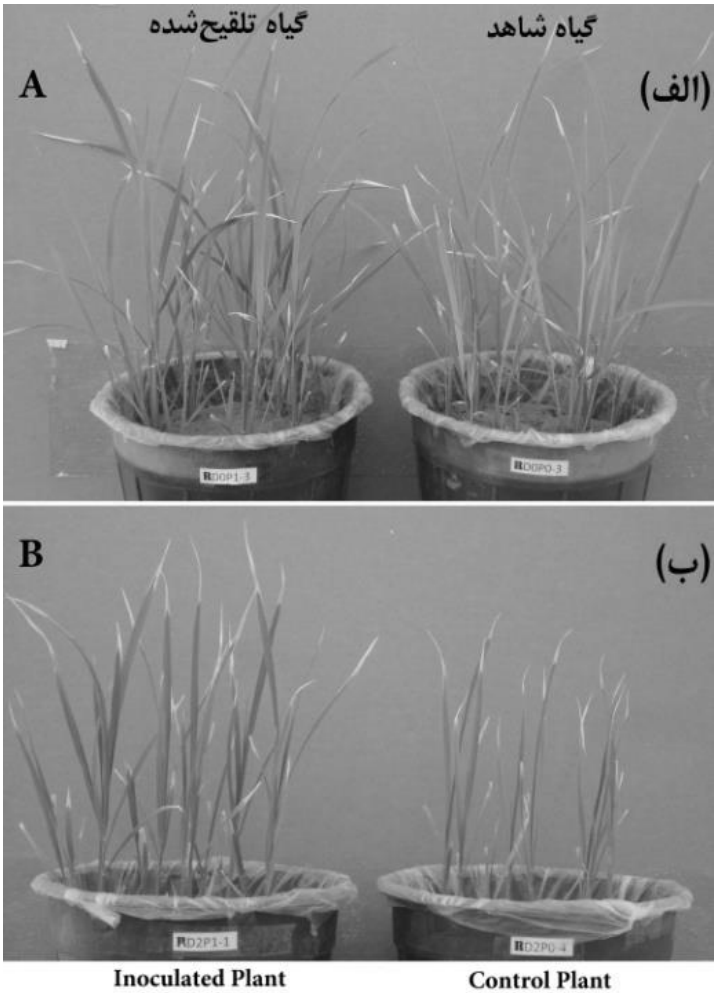
شکل ۲: تفاوت رشد ریشه گیاهان تلقیح‌شده نسبت به گیاهان شاهد، ۲۸ روز بعد از تلقیح. الف) تیمار F.C. ۵۰٪؛ ب) تیمار F.C. ۲۵٪؛ (سمت چپ. گیاه تلقیح شده با قارچ؛ راست. گیاه شاهد)

Fig. 2: Differences between the root plant growth of inoculated and control plants, 28 days after inoculation. A) 50% F.C. B) 25% F.C. (left: inoculated plant; right: control plant)



شکل ۳: مقایسه وزن خشک اندام هوایی گیاهان تیمار و شاهد تحت شرایط تنش خشکی

Fig. 3: Comparing total shoot Dry weight in inoculated and control plants under drought stress

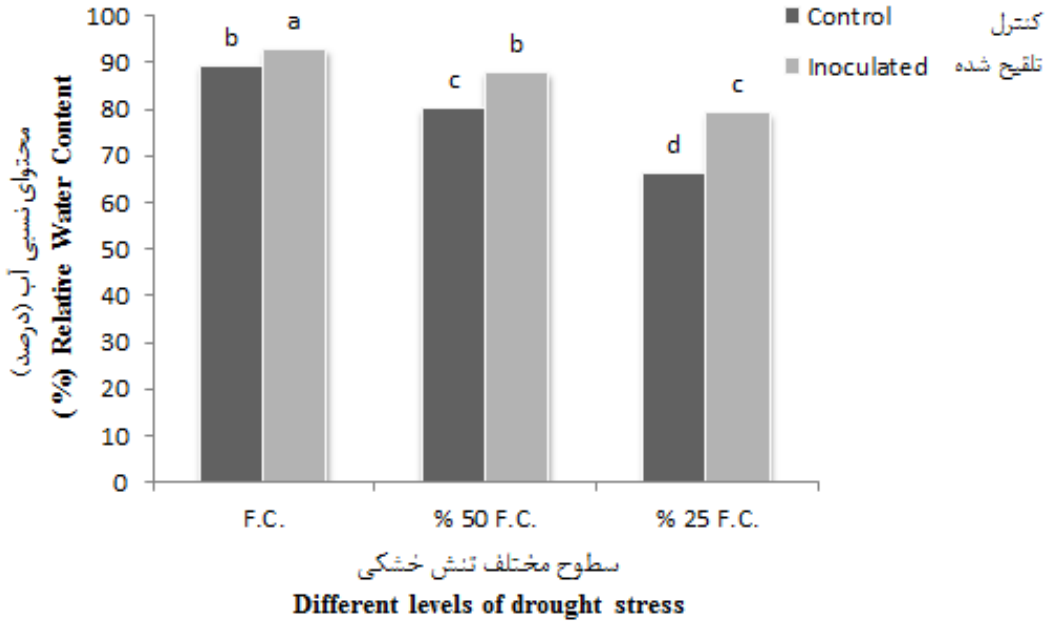


شکل ۴: تفاوت رشد گیاهان تلقیح‌شده نسبت به گیاهان شاهد، ۲۸ روز بعد از تلقیح. الف) تیمار F.C. ۵۰٪؛ ب) تیمار F.C. ۲۵٪؛ (سمت چپ. گیاه تلقیح شده با قارچ؛ راست. گیاه شاهد)

Fig. 4: Differences between the plant growth of inoculated and control plants, 28 days after inoculation. A) 50% F.C. B) 25% F.C. (left: inoculated plant; right: control plant)

مقایسه محتوای نسبی آب گیاه

در جدول تجزیه واریانس می‌توان نتایج تجزیه آماری این فاکتور را مشاهده کرد. در مورد محتوای نسبی آب گیاهان به‌عنوان یکی از فاکتورهای فیزیولوژیکی مهم، اثرات ساده خشکی و قارچ و همچنین اثرات متقابل معنی‌دار می‌باشد. نتایج بیانگر آن است که با افزایش خشکی، محتوای نسبی آب برگ گیاهان تلقیح شده و شاهد کاهش می‌یابد، به‌طوری‌که با اعمال خشکی به‌میزان ۵۰٪ ظرفیت زراعی (تنش متوسط) مقدار کاهش صفت مذکور در گیاهان شاهد و تلقیح شده نسبت به شرایط رطوبت زراعی به‌ترتیب ۱۰٪ و ۵٪ کاهش می‌یابد، درحالی‌که محتوای نسبی آب برگ گیاهان شاهد و تلقیح شده در سطح شدیدتر تنش خشکی (۲۵٪ ظرفیت زراعی) نسبت به شرایط رطوبت ظرفیت مزرعه به‌ترتیب ۲۶٪ و ۱۵٪ کاهش‌یافته است (شکل ۵). به‌طورکلی با مقایسه گیاهان شاهد و تلقیح شده در شرایط رطوبت مزرعه و نیز در سطوح خشکی اعمال‌شده، این نتیجه به‌دست می‌آید که محتوای نسبی آب برگ گیاهان تلقیح شده بیشتر از گیاهان شاهد است و مقایسه رشد گیاهان بعد از اعمال تنش نشان می‌دهد که بعد از اعمال تنش شدید، رشد گیاهان شاهد کند و سپس تقریباً متوقف شد اما در گیاهان تلقیح شده رشد به کندی اتفاق افتاد اما متوقف نشد، به‌طوری‌که با گذشت زمان تفاوت رشدی بین گیاهان شاهد و تیمار مشهودتر گردید. مقایسه محتوای نسبی آب گیاهان به خوبی نشان می‌دهد که گیاهان تلقیح‌شده در شرایط تنش آب بیشتری (۱۹٪ بیشتر از گیاهان شاهد) در اختیار دارند (شکل ۵). دلیل این امر هنوز هم به‌روشنی مشخص نیست، اما به‌نظر می‌رسد مهم‌ترین دلیل برای این وجود میسیلیوم‌های قارچ می‌باشد که در جذب آب و مواد غذایی کمک شایانی به گیاهان میزبان می‌نماید. وجود این میسیلیوم‌ها سبب می‌گردد که سطح جذب ریشه‌ها در گیاهان تلقیح شده با قارچ نسبت به گیاهان شاهد افزایش‌یافته و این افزایش به‌نوبه خود محتوای نسبی آب گیاهان تلقیح شده را افزایش دهد. نتایج به‌دست‌آمده با نتایج مطالعات مشابه بر روی تأثیر قارچ بر مقاومت گیاه جو در شرایط تنش خشکی و شوری مطابقت دارد (سپهری و همکاران، ۱۳۸۶ و قبولی و همکاران، ۱۳۹۰). نکته قابل‌توجه در نتایج به‌دست‌آمده از این تحقیق تأثیر قارچ بر روی خصوصیات مورفوفیزیولوژیکی گیاه در شرایط تنش شدید است، به‌طوری‌که مقایسه نتایج نشان داد که با کاهش رطوبت خاک، گیاهان تلقیح شده نسبت به گیاهان شاهد واکنش بهتری را نشان دادند.



شکل ۵: مقایسه محتوای نسبی آب گیاهان شاهد و تیمار در شرایط تنش خشکی

Fig. 5: Comparing relative water content (RWC) in inoculated and control plants under drought stress

نتیجه‌گیری کلی

به‌منظور برآورد نیاز غذایی جمعیت رو به تزاید لازم است که تولید برنج افزایش یابد. اگرچه هنوز بررسی کاملی در مورد سطح کمبود آب برای تولید برنج در آسیا ازجمله ایران وجود ندارد، اما نشانه‌هایی نیز دیده می‌شود دال بر این‌که کاهش کیفیت و کمیت منابع آب، پایداری نظام تولید برنج آبی را تهدید می‌کند. خشکسالی یکی از محدودیت‌های عمده برای افزایش عملکرد برنج دیم است. در ایران قسمت عمده کشت

برنج به‌صورت آبی می‌باشد. یکی از محدودیت‌های اصلی که باعث کاهش عملکرد برنج می‌شود، تنش کمبود آب است (*اتول*[1] و همکاران، 1979). یافتن روش‌های برای تولید برنج بیشتر در ازای مصرف آب کمتر به‌منظور تأمین امنیت غذایی و حفظ سلامت محیط‌زیست در کشور ضروری است، لذا در صورت کشت دیم برنج امکان بالا بردن سطح زیر کشت این محصول در ایران فراهم می‌شود. در این پژوهش برای اولین بار کلونیزاسیون ریشه گیاهان برنج توسط قارچ اندوفیت *P. indica* و تأثیر مثبت آن بر برخی فاکتورهای مورفوفیزیولوژیکی و بهبود مقاومت به تنش خشکی مشاهده شد. این نتایج می‌تواند دریچه‌ای به روی استفاده از این قارچ در کشت دیم و حتی کشت آبی برنج باز نماید که با پژوهش‌های بیشتر و بهینه‌سازی کلونیزاسیون ریشه برنج می‌توان این امکان را عملی نمود. همچنین با استفاده مؤثر از قارچ امکان کاهش مصرف کودهای شیمیایی و جلوگیری از آلودگی بیشتر آب‌های زیرزمینی فراهم شده و در این زمینه گامی به‌سمت کشاورزی پایدار برداشته خواهد شد.

نکته پایانی در مورد این پژوهش فراهم آمدن امکان مطالعات مولکولی در زمینه رابطه همزیستی قارچ با گیاه برنج می‌باشد، به‌طوری‌که اثبات کلونیزاسیون برنج راه را برای این مطالعات باز خواهد نمود. در مورد دیگر گیاه زراعی مهم یعنی جو مقالات بسیاری در این زمینه به چاپ رسیده است (*والر* و همکاران، 2005؛ *قبولی*[2] و همکاران، 2013). امکان مطالعات مولکولی بیشتر، شانس یافتن مکانیسم‌های مولکولی و ژن‌های احتمالی دخیل در مقاومت به تنش از جمله تنش خشکی و شوری را در برنج افزایش خواهد داد. اثبات نمودن گیاه برنج به‌عنوان یکی از میزبان‌های قارچ موردنظر و تأثیر مثبت آن بر فاکتورهای مورد بررسی در شرایط تنش اهمیت نتایج این پژوهش را نشان می‌دهد که به نوبه خود می‌تواند دریچه‌ای به سوی پژوهش‌های بیشتر باشد.

سپاسگزاری

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از زحمات و تلاش‌های مدیریت و اعضای پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی منطقه مرکزی کشور (اصفهان) تشکر و قدردانی نمایند.

1. OToole

2. Ghabooli

منابع

قبولی، م.، شهریاری ، ف.، سپهری، م.، مرعشی، ح. و حسینی سالکده، ق. ۱۳۹۰. تأثیر قارچ اندوفیت *Piriformospora indica* بر برخی خصوصیات جو در شرایط تنش خشکی، نشریه بوم‌شناسی کشاورزی، جلد ۳، شماره ۳: ۳۳۶-۳۲۸.

سپهری، م. ۱۳۸۶. شناسایی مکانیسم‌های مولکولی مقاومت القاشده توسط قارچ *Piriformospora indica* به گیاه جو در شرایط تنش شوری. رساله دکتری، دانشگاه تهران، ۲۱۶ صفحه.

Alikhani, M., Khatabi, B., Sepehri, M., Nekouei, M. K. and Salekdeh, Gh. 2013. A proteomics approach to study the molecular basis of enhanced salt tolerance in barley (*Hordeum vulgare* L.) conferred by the root mutualistic fungus *Piriformospora indica*. Molecular BioSystem, 9(6): 1498-1510.

Bohnert, H. J. and Jensen, R. G. 1996. Strategies for engineering water-stress tolerance in plants. Trends in Biotechnology, 14: 89-97.

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: 83-88.

Deshmukh, S., Hückelhoven, R., Schäfer, P., Imani, J., Sharma, M., Weiss, M., Waller, F. and Kogel, K. H. 2006. The root endophytic fungus *Piriformospora indica* requires host cell death for proliferation during mutualistic symbiosis with barley. Proceedings of the National Academy of Sciences, 103(49): 18450-18457.

Dey, M. M. and Upadhyaya, H. K. 1996. Yield loss due to drought, cold and submergence in Asia. *In* RE Evenson, RW Herdt, M Hossain, eds, Rice Research in Asia: Progress and Priorities. CAB International, Wallingford, UK, 291-303.

Ghabooli, M., Khatabi, B., Shahriary Ahmadi, F., Sepehri, M., Mirzaei, M., Amirkhani, A., Jorrín-Novo, J. V. and Hosseini Salekdeh, Gh. 2013. Proteomics study reveals the molecular mechanisms underlying water stress tolerance induced by *Piriformospora indica* in barley. Journal of Proteomics, 94: 289-301.

Kirch, H. H., Vera-Estrella, R., Golldack, D., Quigley, F., Michalowski, C. B., Barkla, B. J. and Bohnert, H. J. 2000. Expression of water channel proteins in Mesembryanthemum crystallinum. Plant Physiology, 123: 111-124.

Malla, R., Prasad, R., Kumari, R., Giang, Ph., Pokharel, U., Olmuller, R. and Vama, A. 2004. Phosphorus solubilizing symbiotic fungus: *Piriformospora indica*. Endocytobiosis Cell Research, 15 (2): 579-600.

Oelmuller, R., Sherameti, I., Tripathi, S. and Varma, A. 2009. *Piriformospora indica*, a cultivable root endophyte with multiple biotechnological applications. Symbiosis, 49: 1-12.

Otoole, J. C. and Chang, T. T. 1979. Drought resistance in cereals. Rice: A case study. In: Messel, H. and Taples, R. C. (eds.). Physiology of crop plants. John Wiley and Sons, New York. pp. 347-405.

Pirdashti, H., Sarvestani, Z. T., Nematzadeh, G. and Ismail, A. 2004. Study of water stress effects in different growth stage on yield components of different rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. New directions for a diverse planet: Proceeding of 4th International Crop Science Congress Brisbane, Australia, pp 1-7.

Qiang, X., Weiss, M., Kogel, K. H. and Schafer, P. 2011. *Piriformospora indica* a mutualistic basidiomycete with an exceptionally large plant host range. Molecular Plant Pathology, 13 (5): 508-518.

Rai, M., Acharya, D., Singh, A. and Varma, A. 2001. Positive growth responses of the medicinal plants Spilanthes calva and Withania somnifera to inoculation by *Piriformospora indica* in a field trial. Mycorrhiza, 11: 123-128.

Rai, M. and Varma, A. 2005. Arbuscular mycorrhiza-like biotechnological potential of *Piriformospora indica*, which promotes the growth of Adhatoda vasica Nees. Electronic Journal of Biotechnology, 8: 1-6.

Shannon, M. and Grieve, C. 1998. Tolerance of vegetable crops to salinity. Scientia Horticulture, 78: 5-38.

Singh, A., Sharma, J., Rexer, K. H. and Varma, A. 2000. Plant productivity determinants beyond minerals, water and light: *Piriformospora indica*-a revolutionary plant growth promoting fungus. Current Science-Bangalore, 79: 1548-1554.

Varma, A., Abbott, L., Werner, D. and Hampp, R. 2004. The state of art. Plant surface microbiology. Plant surface microbiology. Springer, Berlin Heidelberg New York, 1-11.

Varma, A., Bakshi, M., Lou, B., Hartman, A. and Oelmuller, R. 2012. *Piriformospora indica*: A novel plant growth-promoting mycorrhizal fungus. Agricultural research, 1 (2): 117-131.

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: 2741-2744.

Verma, S., Varma, A., Rexer, K. H., Hassel, A., Kost, G., Sarbhoy, A., Bisen, P., Bütehorn, B. and Franken, P. 1998. Piriformospora indica, gen. et sp. nov., a new root-colonizing fungus. Mycologia, 90 (5): 896-903.

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, 102 (38): 13386-13391.

The Effect of Mycorrhiza-like Fungus *Piriformospora indica* on Some Morphophysiological Traits of Rice under Normal and Drought Stress Conditions

Ghabooli[1*], M., Hosseini Salekdeh[2], Gh. and Sepehri[3], M.

Abstract

Micorrhizal fungi provide greater absorbing surface for the transfer of nutrients to plant roots and therefore improve the plant growth. *Piriformospora indica* as a Micorrhizal-like fungus exhibits a high effect in plant growth and increased resistance against biotic and abiotic stresses. The goal of this research was the study of the potential of *P. indica* to colonize the roots of rice plant and enhances growth and elevating drought resistance. This study was done as a factorial experiment in a completely randomized design with four replications and was conducted in the greenhouse of Agricultural Biotechnology Research Institute (Isfahan). The experimental factors included 2 fungal levels (inoculated and non-inoculated) and 3 drought levels (F.C., 50% F.C., 25% F.C.). The results indicated that *P. indica* can colonize rice roots plant. Also, inoculation of plant with *P.indica* increased the biomass of rice plants, as in inoculated plants under severe drought stress total shoot dry weight and root dry weight was increased by 47% and 63%, respectively. Under severe stress conditions, RWC in inoculated plant was greater as well (19% was higher than control plants). The results showed the effective role of fungus in enhancing rice morphological parameters in drought stress conditions (especially at the 25% F.C. level). According to the results, it seems that Rice is also one of the hosts of this fungus and endophytic fungus can provide the possibility of rice cultivation in other regions of Iran. As well as the improvement of growth in inoculated rice plant will decrease the requirement to chemical fertilizer in flooded rice cultivation.

Keywords: Endophyte, Sustainable agriculture, Colonization, Inoculation, Biomass

1. Assistant Professor, Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Malayer University, Malayer, Iran
2. Associate Professor, Department of Systems Biology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Karaj, Iran
3. Assistant Professor, Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran
*: Corresponding author Email: m.ghabooli@malayeru.ac.ir