مجله علوم و فنون باغبانی ایران جلد ۲۲ شماره ۴ صفحه های ۵۱۹ تا ۵۳۴ (۱۴۰۰)
مقاله پژوهشی

بررسی کارایی قارچ‌های مایکوریز آربوسکولار بر بهبود شاخص‌های فیزیولوژیکی پایه ریزافزایی‌شده گلابی (پیرودوارف) زیر تنش خشکی[1]

Investigation the Efficiency of Arbuscular Mycorrhizal Fungi on Physiological Indices of Micropropagated Pear Rootstock (Pyrodwarf) under Drought Stress

خاطره شیرین‌زاده، ابراهیم صداقتی*، علی‌اکبر محمدی میریک، حمیدرضا کریمی و ماریه نادی[2]

چکیده

ریزافزایی یکی از روش‌های افزایش سریع گیاهان در محیط غذایی است، اما بقا و رشد ضعیف این گیاهان پس از انتقال، استفاده‌ه گسترده از این روش را محدود می‌کند. میزان موفقیت این روش می‌تواند با استفاده از عامل‌های زیستی مانند همزیستی با قارچ‌های میکوریز آربوسکولار افزایش یابد. به‌منظور بررسی تاثیر قارچ‌های میکوریز آربوسکولار بر بهبود شاخص‌های فیزیولوژیکی و تنظیم‌کننده‌های اسمزی نهال‌های حاصل از ریزازدیادی گلابی پایه پیرودوارف زیر تنش خشکی، آزمایشی به‌صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملا تصادفی با دو فاکتور شامل دو سطح میکوریزا (با و بدون میکوریزا) و سه سطح تنش خشکی (دور آبیاری سه، پنج و هفت روز یک بار) در سه تکرار در شرایط گلخانه‌ای اجرا شد. دو ماه پس از اعمال تنش خشکی، نتیجه‌های حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که همزیستی میکوریزی به‌طور معنی‌داری بر شاخص‌های فیزیولوژیکی و تنظیم‌کننده‌های اسمزی مورد ارزیابی در تمامی سطوح تنش خشکی اثرگذار بود. میزان کلونیزاسیون پس از پایان آزمایش در تیمارهای میکوریزی در سطوح کم، متوسط و شدید تنش خشکی به‌ترتیب ۸۴، ۸۱/۶۶ و ۷۲ درصد تعیین شد. به‌طور کلی،کاربرد میکوریز باعث افزایش معنی‌دار شاخص‌های فیزیولوژیکی مانند F_v/F_m، شاخص کارایی فتوسنتز، شاخص سبزینگی (SPAD)، محتوای کلروفیل b، کلروفیل کل و کاروتنوئید و همچنین کاهش محتوای پرولین و قندهای محلول شد. در مجموع، نتایج این آزمایش نشان داد که نهال‌های کشت بافتی تیمار شده با قارچ‌های میکوریز آربوسکولار سازگاری بیشتری با شرایط برون‌شیشه‌ای داشته و باعث ایجاد تحمل در برابر تنش خشکی می‌شوند.

واژه‌های کلیدی: تنش غیرزیستی، درون‌شیشه‌ای، سازگاری، همزیستی میکوریزی.

مقدمه

گلابی (*Pyrus communis* L.) گیاهی است گلدار، از رده دولپه‌ای‌ها که به تیره گل‌سرخیان (Rosaceae) و زیرتیره دانه‌دارها (Pomoideae) تعلق دارد (۳). گلابی بعد از سیب، مهم‌ترین میوه دانه‌دار دنیا و ایران محسوب می‌شود (۳). ایران با دارا بودن بیش از ۱۰ گونه از جنس گلابی به عنوان یکی از مراکز تنوع ژنتیکی گلابی شناخته شده است (۸). اغلب باغ‌های گلابی در استان‌های تهران، خراسان، اصفهان، آذربایجان غربی و شرقی و قزوین واقع شده‌اند.

۱- تاریخ دریافت: ۹۸/۸/۱۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۲/۱۶

۲- به‌ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشیار، گروه گیاه‌پزشکی، استادیار، گروه ژنتیک و تولید گیاهی، استاد، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی‌عصر (عج) رفسنجان و استادیار، پژوهشکده پسته، موسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رفسنجان، ایران

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: (sedaghati@vru.ac.ir).

پایه گلابی پیرودوارف[1]یکی از ۸۰ پایه رویشی می‌باشد که از *Pyrus communis* در سال ۱۹۸۰ در ایستگاه تحقیقات جیسن‌هیم[2] آلمان انتخاب شد و در سال ۱۹۹۳ به‌صورت یک پایه ملی ثبت شد (۲۵). پایه پیرودوارف از پاکوتاه کننده‌ترین پایه‌های رویشی گلابی است که از ویژگی‌های آن می‌توان به افزایش آسان به صورت کشت بافت، سازگاری با رقم‌های گلابی، زود باردهی، راندمان بالای باروری، اندازه مطلوب و یکسان میوه، عدم تمایل به تولید پاجوش و از همه مهم‌تر عدم حساسیت به کم‌سبزینگی ناشی از کمبود آهن در خاک‌های قلیایی اشاره کرد (۲۵).

یکی از مهم‌ترین مزیت‌های ریزازدیادی امکان تولید سریع تعداد زیادی گیاه یکسان از لحاظ ژنتیکی، در مدت کوتاه‌تر از مدت زمان لازم در روش‌های مرسوم می‌باشد (۳۸).

میکوریز نوعی همزیستی بین قارچ با ریشه گیاه میزبان می‌باشد که بیشتر هر دو طرف در این رابطه سود می‌برند. در این سیستم، قارچ پوشش ریسه‌ای گسترده‌ای در پیرامون ریشه گیاه میزبان تشکیل می‌دهد و ماده‌های غذایی مورد نیاز خود را از محصول‌های فتوسنتزی و کربوهیدرات‌های گیاه تأمین می‌کند. در مقابل، این گروه قارچی در جذب آب و عناصر غذایی، به ویژه عنصرهای کم‌تحرک مانند فسفر، مس، روی و غیره از خاک به گیاه کمک می‌کند (۱۹). در میان انواع مختلف میکوریز، قارچ‌های میکوریز آربوسکولار(AMF[3])، رایج‌ترین نوع همزیستی همیاری بین میکروارگانیسم‌های خاکزی و گیاهان را دارا می‌باشند که اهمیت اقتصادی و اکولوژیکی فراوانی برخوردار هستند (۴۷، ۵۳). در این نوع همزیستی، قارچ‌های همزیست اجباری که جزء میکوریزهای درونی و از شاخه Glomeromycota می‌باشند، با ریشه بیش از ۹۰ درصد گیاهان نهان‌دانه، بازدانه، خزه‌ها و سرخس‌ها ارتباط برقرار می‌کنند (۴۷). بر اساس نظر پژوهشگران (۱۹) برقراری ارتباط میان قارچ های AM و ریشه گیاهان طی دو مرحله صورت می‌گیرد: در مرحله اول که در واقع فاز توسعه بُرونی می‌باشد ریسه‌های خارجی قارچ به داخل خاک توسعه می‌یابد، در مرحله دوم ریسه‌های بین یاخته‌ای، آربوسکول‌های داخل یاخته‌ای با انشعابات زیاد و وزیکل‌های پراکنده در طول ریشه گیاه تشکیل می‌شوند (۱۰، ۱۹). ریسه‌های بُرونی آب و ماده‌های معدنی را از خاک به درون ریشه انتقال می‌دهند. کلونیزاسیون ریشه به وسیله میکوریز آربوسکولار سبب افزایش مقاومت گیاه در برابر عوامل بیماری‌زا، تنش خشکی و تنش شوری می‌گردد (۲۶، ۴۷).

تنش خشکی یکی از مهم‌ترین تنش‌های محیطی و غیرزنده است که از مهمترین فاکتورهای محدودکننده رشد و عملکرد گیاهان می‌باشد (۱۱). با توجه به این‌که بیش از ۹۴ درصد منابع آب کشور در بخش کشاورزی مصرف می‌شود (بیش از ۸۳ میلیارد متر مکعب)، یکی از اساسی‌ترین نیازهای پژوهشی کشور مربوط به ایجاد راهکارهای مناسب جهت کاهش مصرف آب است (۳۰). خشکی، زیست‌ساخت و فعالیت متابولیت‌های فیزیولوژیکی گیاه را مختل کرده و یا میزان آن‌ها را کاهش می‌دهد و متابولیت‌های ثانویه در پاسخ به تنش خشکی تولید می‌گردند. هم‌چنین، تنش خشکی باعث خسارت به غشا و سیستم فتوسنتزی می‌شود و به دو روش فتوسنتز را زیر تأثیر قرار می‌دهد که اول بسته شدن روزنه‌ها و نرسیدن دی‌اکسیدکربن به روزنه‌ها و دوم از راه کاهش پتانسیل آب یاخته است.

اگرچه کشت بافت یک فن مرسوم برای تکثیر گیاه در شرایط درون‌شیشه‌ای می‌باشد، اما گیاهچه‌های حاصل از کشت درون‌شیشه‌ای به دلیل رشد در شرایط محیطی کنترل شده (مانند شدت نور کم و رطوبت بالا) در ظرف‌های کشت، باید با دقت لازم و در نظر گرفتن تمام جنبه‌های عوامل محیطی به شرایط دیگر انتقال پیدا کنند. در نتیجه، گیاهچه‌ها ممکن است به تنش ناگهانی تغییرهای محیطی متحمل نباشند. گیاهان حاصل از ریزازدیادی بعد از انتقال، به علت شکل‌گیری نظام ریشه‌ای ضعیف، روزنه‌های ناکارآمد، تغذیه نامناسب و شرایط محیطی نامناسب رشد ضعیفی دارند (۲۰). لذا با شرایط خارج شیشه‌ای سازگاری زیادی ندارند. نکته دیگر، این است که گیاهان در شرایط درون‌شیشه‌ای به صورت دگرپرور[4] هستند، در حالی که در شرایط برون‌شیشه‌ای باید به شکل خودپرور[5] باشند، یعنی به جای استفاده از ماده‌های قندی آماده شده، ماده‌های مورد نیاز خود را از فتوسنتز به دست آورند. بنابراین گیاهچه‌های تولید شده ظریف، دارای کوتیکول نازک و ریشه‌های موئین کم می‌باشند و هم‌چنین امکان تلف شدن گیاهان حاصل از ریزازدیادی در اثر عوامل مختلف در زمان انتقال وجود دارد (۲۸).

۱- Pyrodwarf ۲- Geisenheim ۳- Arbuscular Mycorrhizal Fungi
۴- Heterotroph ۵- Autotroph

بنابراین، میزان موفقیت در مورد گیاهچه‌های ریزازدیادی می‌تواند به‌طور مؤثری از راه مقاوم‌سازی به‌موقع، با استفاده از عامل‌های زیستی مثل میکوریز آربوسکولار افزایش یابد (۴۲).

ریسه‌های باریک قارچ‌های میکوریز آربوسکولار می‌توانند به داخل منافذ خارج از دسترس تارهای ریشه نفوذ کرده، بنابراین آبی را که خارج از دسترس گیاهان غیرمیکوریز است، جذب می‌کنند (۱۴). مطالعه‌ها نشان داده که در طول دوران خشکی خاک، گیاهان میکوریزایی تبخیر و تعرق بیشتری نسبت به گیاهان غیرمیکوریز انجام می‌دهند و میزان فتوسنتز در گیاهان میکوریز نسبت به گیاهان بدون میکوریز بالاتر می‌باشد (۲۱).

بنابراین هدف از انجام پژوهش حاضر، مطالعه کارایی قارچ‌های میکوریز آربوسکولار بومی ایران بر بقا، رشد و افزایش تحمل به تنش خشکی در گلابی پایه کشت بافتی پیردووارف در مقایسه با پایه‌های بدون همزیستی میکوریزی بود.

مواد و روش‌ها

گیاهچه‌های ۵۰ روزه (پس خروج از شیشه) ریزازدیاد شده گلابی پایه پیرودوارف از آزمایشگاه کشت بافت گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان تهیه شدند. در ادامه این پژوهش، یک ماه پس از شروع آزمایش گیاهچه‌های کشت بافتی سازگار شده به گلدان‌های یک کیلویی حاوی خاک، ماسه، پرلایت و پیت‌ماس (۱: ۱: ۰/۵: ۱) منتقل شدند. مایه تلقیح میکوریزی مورد استفاده در این پژوهش ترکیبی از چند گونه قارچ میکوریز آربوسکولار شامل گونه‌های *Funneliformis mosseae*, *F. caledonius*, *Rhizophagus intraradices*, *R. iranicus* بود که از کلکسیون قارچ‌شناسی دانشکده کشاورزی دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان تهیه گردید. در نمونه‌هایی که تلقیح با چند گونه میکوریز صورت گرفت از مخلوط خاکی اتوکلاو شده استفاده گردید و مقدار ۱۵ گرم مایه تلقیح میکوریزی (دارای بیش از ۱۰۰ پروپاگول در هر گرم) به رایزوسفر ریشه‌های هر گلدان اضافه شد. گلدان‌ها در شرایط گلخانه‌ای با دمای ۳۵-۲۷ درجه سلسیوس، ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی نگهداری شدند. در طول این مدت گلدان‌ها یک روز در میان با ۲۰۰ میلی‌لیتر آب، آبیاری شدند. سه ماه پس از مایه‌زنی، گیاهچه‌هایی به صورت تصادفی برداشت شده و جهت رنگ‌آمیزی ریشه‌ها از روش Phillips و Hayman (۳۵) استفاده شد. درصد کلونیزاسیون ریشه‌ها نیز براساس روش Giovannetti و Mosse (۱۸) محاسبه شد. در مرحله بعدی، گیاهچه‌ها به گلدان‌های ۴ کیلویی منتقل شدند و پس از ۷۵ روز، تنش خشکی در سه سطح شامل سطح مطلوب آبیاری (D0)، تنش خشکی ملایم (D1) و تنش خشکی شدید (D2) اعمال شد. در این مدت مقدار آب استفاده شده برای هر گلدان ۳۰۰ میلی‌لیتر بود.

آزمایش به صورت فاکتوریل و با دو فاکتور در قالب طرح کاملا تصادفی برای نهال‌های کشت بافتی گلابی (پایه پیرودوارف)، عامل اول قارچ ریشه آربوسکولار در دو سطح (دارای میکوریز و بدون میکوریز) و عامل دوم تنش خشکی در سه سطح (دور آبیاری سه، پنج و هفت روز یک بار) در سه تکرار انجام شد.

در نهایت، دو ماه پس از اعمال تنش خشکی، داده‌برداری گلخانه‌ای صورت گرفت. سپس گیاهان برداشت شده و شاخص‌های مورد نظر اندازه‌گیری شدند.

پارامترهای فتوسنتزی

اندازه‌گیری نسبت F_v/F_m و PI

پس از پایان دوره تنش خشکی دو ماهه، میزان کلروفیل فلورسانس برگ با استفاده از دستگاه کلروفیل فلوریمتر[۱](مدل Hanatech LTD Pocket PEA) در میانه روز (ساعت ۱۱ الی ۱۳) اندازه‌گیری گردید. این دستگاه میزان کلروفیل فلورسانس را بر اساس F_v/F_m (نسبت فلورسانس متغیر به فلورسانس بیشینه) ثبت می‌کند. روش کار بدین صورت بود که از هر گلدان بسته به تعداد برگ های سالم دو تا چهار برگ بالغ از قسمت‌های میانی گیاه انتخاب شد و در گیره‌های ویژه برای ایجاد شرایط تاریکی به مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفتند و بعد از این مدت میزان F_v/F_m و شاخص کارایی فتوسنتز (Performance Index = PI) ثبت گردید (۲۱).

۱- Chlorophyll Fluorimeter

شاخص سبزینگی

جهت اندازه‌گیری شاخص سبزینگی (SPAD index) از دستگاه کلروفیل‌متر SPAD – 502 استفاده گردید. به این صورت که از هر گلدان سه برگ انتخاب شد و میانگین عددهای ثبت شده برای آن‌ها به عنوان شاخص سبزینگی یادداشت شد (۲۱).

رنگیزه‌های گیاهی

سنجش کلروفیل a، b، کلروفیل کل و کاروتنوئید

جهت اندازه‌گیری کلروفیل a، b، کلروفیل کل و کاروتنوئید از استون ۸۰ درصد استفاده گردید و میزان جذب نور آن با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل T80 UV/VIS Spectrometer PG Instruments Ltd) در طول موج های ۴۸۰، ۵۱۰، ۶۴۵، ۶۶۳ نانومتر خوانده شد و در نهایت غلظت کلروفیل‌ها و کاروتنوئید با استفاده از رابطه‌های زیر محاسبه گردید (۴۸).

Chlorophyll a (mg/g.Fw) = {[(12.7×OD663) – (2.69×OD645)]×V}/{1000×W}
Chlorophyll b (mg/g.Fw) = {[(12.7×OD645) – (2.69×OD663)]×V}/{1000×W}
Total Chlorophyll (mg/g.Fw) ={[(8.02×OD663)-(20.2×OD645)]×V}/{1000×W}
Carotenoids (mg/g.Fw) = {[(7.6×OD480) – (1.49×OD510)]×V}/{1000×W}

OD = عدد خوانده شده توسط دستگاه (میزان جذب نور)

V = حجم استون مصرف شده (۱۰ میلی‌لیتر)

W = وزن تر نمونه مورد استفاده (۰/۲۵ گرم)

شاخص‌های تنظیم‌کننده اسمزی

اندازه‌گیری محتوای پرولین

جهت استخراج پرولین، ۰/۵ گرم برگ توسعه یافته با استفاده از ۵ میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد در هاون چینی له گردید و عصاره به‌دست آمده در لوله فالکون ریخته شد. عمل استخراج برای بار دوم با اتانول ۷۰ درصد انجام گرفت. عصاره حاصل به عصاره قبل اضافه گردید و به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۳۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. بعد از جداسازی فاز مایع از جامد، قسمت مایع جهت استخراج پرولین مورد استفاده قرار گرفت. جهت تعیین غلظت پرولین، یک میلی‌لیتر از عصاره الکلی بالا با ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر رقیق شد و ۵ میلی‌لیتر معرف ناین هیدرین (مخلوط ۱/۲۵ گرم ناین هیدرین در ۳۰ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال و ۲۰ میلی‌لیتر اسید فسفریک ۶ مولار) به آن اضافه گردید و بعد از افزودن ۵ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال به آن و سپس با دست به مدت چند ثانیه هم زدن، محلول به مدت ۴۵ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۱۰۰-۹۰ درجه سلسیوس قرار گرفت. بعد از خارج کردن نمونه‌ها از حمام آب گرم و خنک کردن آن‌ها ۱۰ میلی‌لیتر بنزن به آن‌ها اضافه شد و با همزن مکانیکی مخلوط گردید تا پرولین وارد فاز بنزن شود. سپس نمونه‌ها ۳۰ دقیقه به حالت سکون رها شده و میزان جذب با دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل T80 UV/VIS Spectrometer PG Instruments Ltd) در طول موج ۵۱۵ نانومتر خوانده شد. استانداردهای پرولین نیز با استفاده از ال-پرولین در غلظت‌های صفر، ۳۱/۲۵، ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر تهیه و اندازه‌گیری گردید (۳۳).

اندازه‌گیری قندهای محلول

به منظور اندازه‌گیری کربوهیدرات‌های محلول، ۰/۱ میلی‌لیتر از عصاره الکلی که برای اندازه‌گیری پرولین تهیه شده بود با ۳ میلی‌لیتر آنترون تازه تهیه شده (۱۵۰ میلی‌گرم آنترون به همراه ۱۰۰ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۷۲ درصد) مخلوط شد. این محلول به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم قرار گرفت تا واکنش انجام و رنگی شود. سپس میزان جذب آن با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۲۵ نانومتر خوانده شده و غلظت قندهای محلول محاسبه گردید. جهت تهیه استاندارد قندها گلوکز خالص در غلظت‌های صفر، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۲۵۰، ۱۵۰۰، ۱۷۵۰، ۲۰۰۰، ۲۲۵۰ و ۲۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر تهیه شد و جذب آن‌ها در همان طول موج اندازه‌گیری گردید (۲۴).

رنگ‌آمیزی ریشه‌ها و تعیین درصد کلونیزاسیون میکوریزی

جهت بررسی همزیستی میکوریزی و مشاهده اندام‌های قارچی ریشه‌های کشت بافتی گیاه گلابی، رنگ‌آمیزی ریشه‌ها براساس روش Phillips و Hayman (۳۵) با اندکی تغییر انجام گرفت. با توجه به حساسیت و ظریف بودن ریشه‌های به دست آمده از کشت بافت، در مراحل رنگ آمیزی ریشه به جای استفاده از گرمای بن ماری، ریشه‌ها در دمای آزمایشگاه برای مدت زمان بیشتری قرار گرفتندتا ساختار ریشه تخریب نشود.

به منظور تعیین درصد کلونیزاسیون ریشه گیاهان کشت بافتی گلابی، از روش خطوط متقاطع (Gridline Intersect Method) استفاده گردید (۱۸).

واکاوی آماری

تجزیه آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS انجام شد و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال ۵٪ صورت گرفت. نمودارها و جدول‌ها نیز توسط نرم افزارهای Excel و Word رسم شد.

نتایج و بحث

بر اساس نتیجه‌های حاصل از اندازه‌گیری شاخص‌های فیزیولوژیکی، مشخص شد که پایه‌های ریزازدیادی گلابی رقم پیرودوارف مایه‌زنی شده با میکوریز زیر تنش خشکی از لحاظ بقا و سازگاری و هم‌چنین مؤلفه‌های فیزیولوژیکی نسبت به تیمارهای غیرمیکوریزی، از شرایط بهتری برخوردار بوده و مقاومت بیشتری داشتند (شکل ۱).

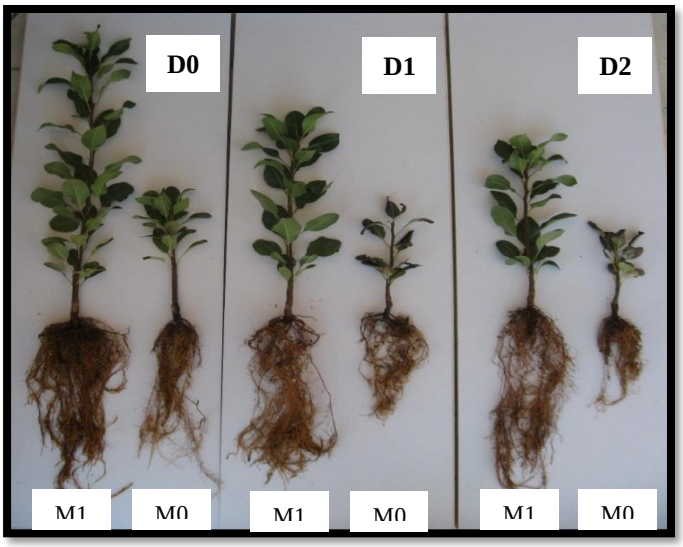

Fig. 1. Comparing mycorrhizal and non-mycorrhizal treatments in micro-propagated pear rootstocks. M0: Non-mycorrhizal (Control) and M1: Mycorrhizal. D0: Optimal level of irrigation, D1: Moderate drought stress and D2: Severe drought stress.

شکل ۱- مقایسه تیمارهای میکوریزایی و غیرمیکوریزایی در نهال‌های ریزافزایی شده گلابی پایه پیرودوارف. M0 : بدون میکوریز (شاهد) و M1: با میکوریز. D0: سطح بهینه آبیاری، D1: تنش خشکی ملایم و D2: تنش خشکی شدید.

نتیجه‌های تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که ویژگی‌های فیزیولوژیکی اندازه‌گیری شده در این پژوهش از جمله کلروفیل فلورسانس، شاخص کارایی فتوسنتز، شاخص سبزینگی، کلروفیل a، کلروفیل b، کاروتنوئید و شاخص‌های تنظیم کننده اسمزی مانند پرولین و قندهای محلول زیر تأثیر برهم‌کنش میکوریز و تنش خشکی قرار گرفته‌اند. براساس نتیجه‌های به‌دست آمده از تجزیه واریانس اثر برهم‌کنش میکوریز و تنش خشکی بر میزان کلروفیل فلورسانس و شاخص کارایی فتوسنتز در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار شد. با توجه به مقایسه میانگین‌ها (شکل ۲- الف)، همزیستی میکوریزی در همه سطوح آبیاری باعث افزایش میزان کلروفیل فلورسانس شد؛ به‌طوری که در سطوح D0، D1 و D2 میزان F_v/F_m در نهال‌های میکوریزی نسبت به نهال‌های بدون میکوریز به ترتیب ۱۴/۴، ۷/۱ و ۲۷/۲ درصد افزایش نشان دادند.

با توجه به اطلاعات به‌دست آمده از مقایسه میانگین‌های مربوط به شاخص کارایی فتوسنتز (شکل ۲- ب)، همزیستی میکوریزی در تمام سطوح آبیاری به‌طور چشمگیری منجر به افزایش شاخص کارایی فتوسنتز (PI) در تیمارهای میکوریزی نسبت به تیمارهای بدون میکوریز گردید. به‌طوری که بالاترین میزان این شاخص برابر ۱۰/۲۳ در تیمار میکوریز در سطح تنش شدید خشکی (D2) قرار داشت که نسبت به شاهد (بدون میکوریز) ۴۸۱/۲ درصد افزایش نشان داد. در همین راستا، در سطوح D0 و D1 نیز شاخص کارایی فتوسنتز، در نهال‌های میکوریزی نسبت به نهال‌های بدون میکوریز به ترتیب ۱۴۷/۶ و ۹۶/۳ درصد افزایش نشان دادند. در مجموع، مایه‌زنی با میکوریز صرف‌نظر از خشکی، شاخص سبزینگی را به‌طور معنی‌داری زیر تأثیر قرار داد و موجب افزایش ۳۵ درصدی شاخص سبزینگی تیمارهای میکوریزی نسبت به تیمارهای بدون میکوریز شد (شکل ۲- پ). در سطوح D0، D1 و D2 میزان عدد اسپد در نهال‌های میکوریزی نسبت به نهال‌های بدون میکوریز به ترتیب ۳۴/۳، ۳۲ و ۳۸/۹ درصد افزایش نشان دادند.

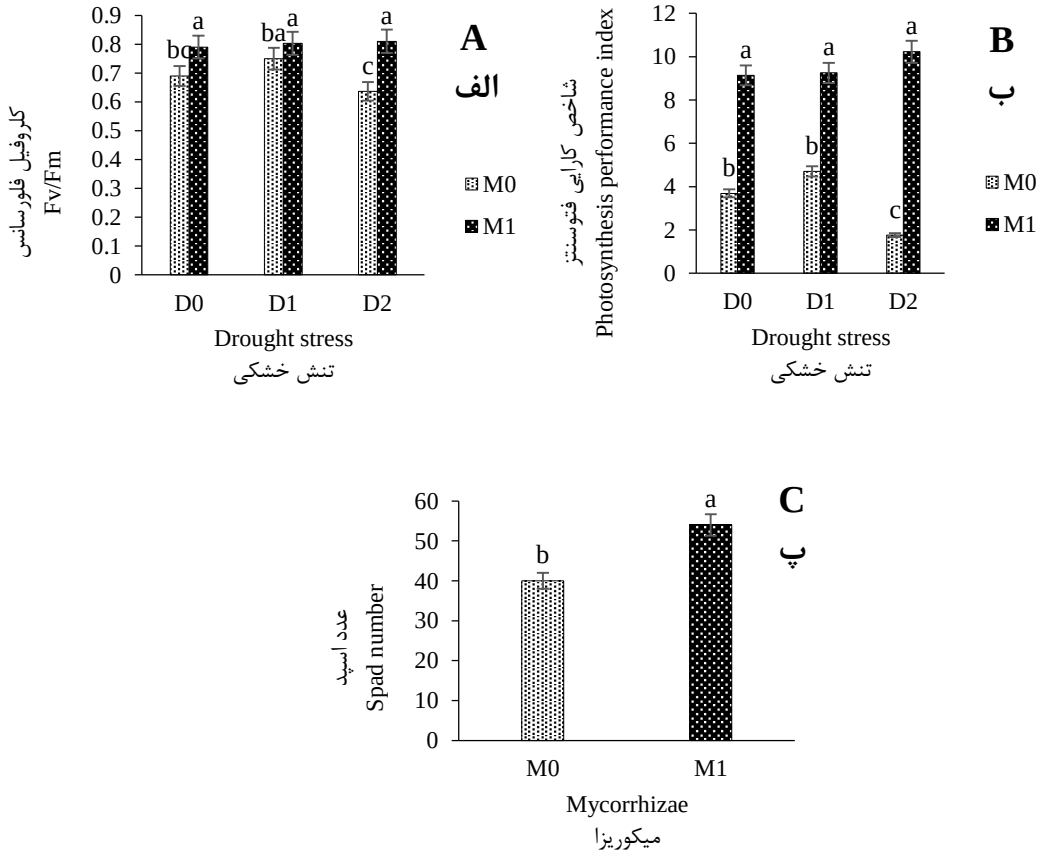

Fig. 2. The interaction effect of mycorrhizal symbiosis and drought stress on the F_v/F_m (A) and performance index (B). Main effect of mycorrhizal symbiosis on the SPAD index of micro-propagated pear rootstocks (C). M0: Non-mycorrhizal (Control) and M1: Mycorrhizal. D0: Optimal level of irrigation, D1: Moderate drought stress and D2: Severe drought stress.

شکل ۲- تأثیر برهم‌کنش همزیستی مایکوریزایی و تنش خشکی بر F_v/F_m (الف) و شاخص کارایی فتوسنتز (ب). اثر اصلی همزیستی میکوریزایی بر شاخص سبزینگی (پ) گیاهان ریزازدیاد شده گلابی. M0: بدون میکوریز (شاهد) و M1: با میکوریز. D0: سطح مطلوب آبیاری، D1: تنش خشکی ملایم و D2: تنش خشکی شدید.

براساس نتیجه‌های به‌دست آمده از تجزیه واریانس داده‌ها، اثر برهمکنش قارچ‌های میکوریز آربوسکولار و تنش خشکی بر کلروفیل a معنی‌دار شد. به‌طور کلی، با توجه به مقایسه میانگین داده‌ها (شکل ۳- الف)، همزیستی میکوریزی موجب شد که میزان کلروفیل a در سطح مطلوب آبیاری در نهال‌های میکوریزی روند صعودی داشته باشد که نسبت به نهال‌های بدون میکوریز ۶ درصد بیشتر بود. با افزایش تنش خشکی میزان این صفت در تیمارهای میکوریزی کاهش پیدا کرد که بین سطح

مطلوب آبیاری با تنش خشکی ملایم و شدید اختلاف معنی‌داری مشاهده شد در صورتی که بین تیمارهای بدون میکوریز تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. صرف‌نظر از میکوریز، تأثیر تنش خشکی بر میزان کلروفیل b از نظر آماری در سطح پنج درصد معنی‌دار گردید، به‌طوری که در ابتدا با افزایش تنش خشکی، میزان کلروفیل b بیشتر شد، اما در صورت قرار گرفتن در تنش خشکی شدید، روند نزولی چشمگیری پیدا کرد (شکل ۳- ب). تأثیر میکوریز بر میزان کلروفیل b معنی‌دار نبود. روند تغییرهای کلروفیل کل به تقریب مشابه کلروفیل b بود. همان‌طور که نتیجه‌ها نشان دادند محتوای کلروفیل کل گیاهانی که در معرض تنش خشکی ملایم قرار گرفته بودند در مقایسه با شاهد (سطح مطلوب آبیاری) تفاوت معنی‌داری را نشان نداد و در نهایت در تنش خشکی شدید کاهش کلروفیل کل مشاهده گردید. با توجه به مقایسه میانگین تأثیر میکوریز و تنش خشکی بر این صفت، همزیستی میکوریزی تأثیر زیادی بر میزان کلروفیل کل گیاهان زیر تنش داشت و منجر به افزایش کلروفیل کل در گیاهان میکوریزی نسبت به گیاهان بدون میکوریز گردید. به‌طور کلی، در سطوح D0، D1 و D2 میزان کلروفیل کل در نهال‌های میکوریزی نسبت به نهال‌های بدون میکوریز به ترتیب ۱/۸، ۲/۶ و ۳/۹ درصد افزایش پیدا کردند.

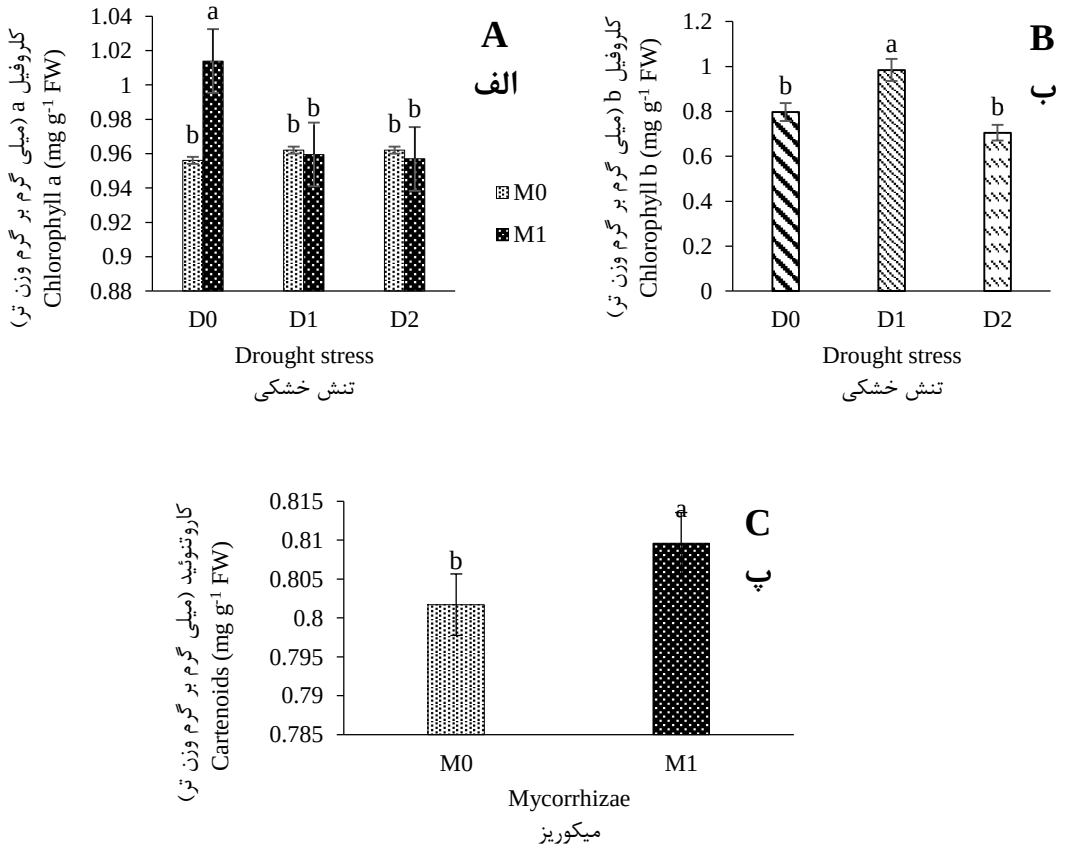

Fig. 3. The interaction effect of mycorrhizal symbiosis and drought stress on chlorophyll a content (A). The main effect of drought stress on chlorophyll b content (B). The separately effect of mycorrhizal symbiosis on carotenoids content (C) of micro-propagated pear rootstock. M0: Non-mycorrhizal (Control) and M1: Mycorrhizal. D0: Optimal level of irrigation, D1: Moderate drought stress and D2: Severe drought stress.

شکل ۳- تأثیر برهم‌کنش همزیستی میکوریز و تنش خشکی بر میزان کلروفیل a (الف). تأثیر جداگانه تنش خشکی بر میزان کلروفیل b (ب). تأثیر جداگانه همزیستی میکوریز بر میزان کاروتنوئید (پ) گیاهان ریزازدیاد شده گلابی. M0: بدون میکوریز (شاهد) و M1: با میکوریز. D0: سطح مطلوب آبیاری، D1: تنش خشکی ملایم و D2: تنش خشکی شدید.

برهمکنش قارچ میکوریز و تنش خشکی در ارتباط با کاروتنوئیدها از نظر آماری معنی‌دار واقع نشد، اما تأثیر میکوریز به تنهایی در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار گردید. نتیجه‌های مقایسه میانگین مربوط به اثر برهم‌کنش میکوریز و تنش خشکی بر میزان کاروتنوئید بیانگر این است که در تیمارهای میکوریزی با افزایش تنش خشکی میزان کاروتنوئید برگ گیاهان ریزازدیاد شده گلابی افزایش پیدا کرد هر چند که بین سطوح تنش، تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. در تیمارهای بدون میکوریز در ابتدا با افزایش تنش خشکی میزان کاروتنوئید افزایش پیدا کرد و سپس با قرار گرفتن در معرض تنش خشکی شدید به صورت معنی‌داری کاهش یافت. هم‌چنین نتیجه‌ها نشان دادند که نهال‌های دارای میکوریز در مقایسه با نهال‌های بدون میکوریز ۰/۹ درصد افزایش داشتند (شکل ۳- پ). در نهایت، در سطوح D0، D1 و D2 میزان کاروتنوئید در نهال‌های میکوریزی نسبت به نهال‌های بدون میکوریز به ترتیب ۰/۸، ۰/۰۸ و ۲ درصد بیشتر بودند.

با توجه به نتیجه‌های به‌دست آمده از تجزیه واریانس داده‌ها، اثر اصلی تیمارهای میکوریز و تنش خشکی بر میزان پرولین برگ در نهال‌های ریزازدیادی گلابی پایه پیرودوارف، از نظر آماری در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. بر اساس نتیجه‌های مقایسه میانگین، کاربرد میکوریز منجر به کاهش میزان پرولین در نهال‌های میکوریزی در تمام سطوح تنش خشکی گردید. در مجموع، تیمارهای بدون میکوریز در مقایسه با تیمارهای میکوریزی به میزان ۳۸ درصد افزایش پرولین داشتند (شکل ۴- الف). با افزایش تنش خشکی میزان پرولین هم در تیمارهای میکوریزی و هم در تیمارهای بدون میکوریز افزایش پیدا کرد؛ به‌طوری که بین سطح مطلوب آبیاری و تنش خشکی شدید اختلاف معنی‌دار بود (شکل ۴- ب). بیشترین میزان پرولین در تیمار بدون میکوریز زیر تنش خشکی شدید مشاهده شد. به‌طور کلی در تیمارهای میکوریزی میزان پرولین برگ در سطوح D0، D1 و D2 به ترتیب ۳۶/۱، ۳۹ و ۳۵/۴ درصد کمتر از تیمارهای بدون میکوریز بودند. بین غلظت قندهای محلول در تیمار میکوریز و بدون میکوریز اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد وجود داشت و میزان این شاخص در تیمارهای میکوریزی در مقایسه با تیمارهای بدون میکوریز در حدود ۲۳/۹ درصد کمتر بود (شکل ۴- پ). تنش خشکی نیز تأثیر معنی‌داری بر تیمارها در سطح احتمال یک درصد داشت (شکل ۴- ت). در هر دو تیمار میکوریز و بدون میکوریز با افزایش سطح تنش خشکی میزان قندهای محلول کاهش پیدا کرد؛ با این تفاوت که در تیمارهای میکوریزی بین سطح مطلوب آبیاری با تنش خشکی ملایم و شدید اختلاف معنی‌دار بود، اما در تیمارهای بدون میکوریز بین سطح آبیاری مطلوب و تنش خشکی ملایم با تنش خشکی شدید اختلاف معنی‌داری وجود داشت.

بر اساس نتیجه‌های حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها، اثرهای تیمار میکوریز و سطوح مختلف تنش خشکی و هم‌چنین اثر برهم‌کنش آن‌ها بر میزان کلونیزاسیون ریشه معنی‌دار بود. بررسی میزان کلونیزاسیون میکوریزایی دو ماه پس از مایه‌زنی نشان داد که نهال‌های حاصل از ریزازدیادی گلابی، ۷۴ درصد کلونیزاسیون میکوریزایی داشتند. با توجه به مقایسه میانگین، بررسی میزان کلونیزاسیون پس از پایان آزمایش در تیمارهای میکوریزی در سطوح D0، D1 و D2 تنش خشکی به ترتیب ۸۴، ۸۱/۶۶ و ۷۲ درصد تعیین شد (شکل ۵). گیاهان شاهد که میکوریز دریافت نکرده بودند درصد کلونیزاسیون آن‌ها صفر بود. به‌طور کلی، نتیجه‌ها نشان دادند که افزایش شدت تنش خشکی باعث کاهش درصد کلونیزاسیون ریشه گردید. تشکیل اندام‌های میکوریزایی در نهال‌های میکوریزایی در مقایسه با نهال‌های بدون میکوریز در شکل ۶ نشان داده شده است.

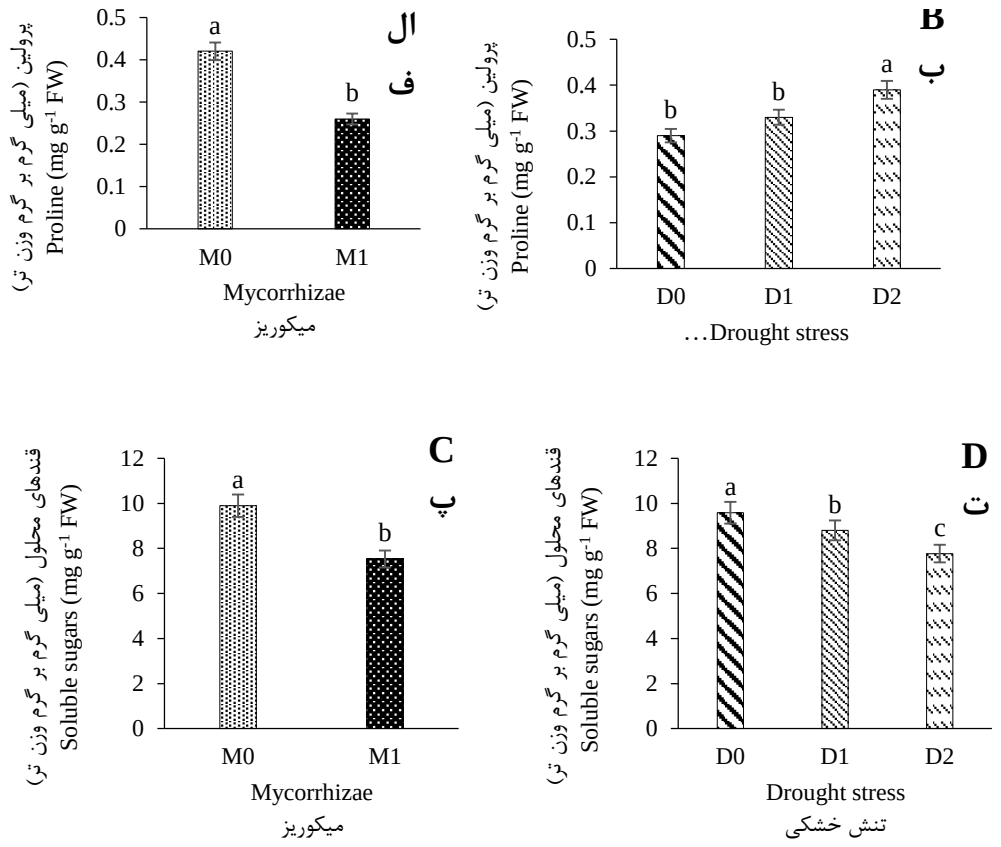

Fig. 4. The separately effect of mycorrhizal symbiosis (A) and drought stress (B) on the amount of proline. The separately effect of mycorrhizal symbiosis (C) and drought stress (D) on the amount of soluble sugars of micro-propagated Pear rootstock. M0: Non-mycorrhizal (Control) and M1: Mycorrhizal. D0: Optimal level of irrigation, D1: Moderate drought stress and D2: Severe drought stress.

شکل ۴- تأثیر جداگانه همزیستی میکوریز (الف) و تنش خشکی (ب) بر میزان پرولین. تأثیر جداگانه همزیستی میکوریز (پ) و تنش خشکی (ت) بر میزان قندهای محلول گیاهان ریزازدیاد شده گلابی. M0: بدون میکوریز (شاهد) و M1: با میکوریز. D0: سطح مطلوب آبیاری، D1: تنش خشکی ملایم و D2: تنش خشکی شدید.

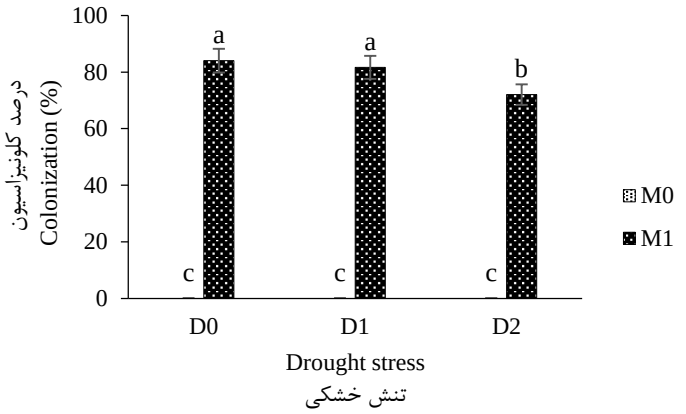

Fig. 5. The interaction effect of mycorrhizal symbiosis and drought stress on colonization percent of micro-propagated pear rootstocks. M0: Non-mycorrhizal (Control) and M1: Mycorrhizal. D0: Optimal level of irrigation, D1: Moderate drought stress and D2: Severe drought stress.

شکل ۵- تأثیر برهم‌کنش قارچ میکوریز و تنش خشکی بر درصد کلونیزاسیون ریشه گیاهان ریزازدیاد شده گلابی. M0: بدون میکوریز (شاهد) و M1: با میکوریز. D0: سطح مطلوب آبیاری، D1: تنش خشکی ملایم و D2: تنش خشکی شدید.

Fig. 6. Intraradical structures of AMF treated (A) and non-treated (B) roots of micro-propagated pear rootstocks.

شکل ۶- اندام‌های میکوریزایی درون‌ریشه‌ای در تیمار میکوریز (الف) در مقایسه با تیمار شاهد (ب) در ریشه گیاهان ریزازدیاد شده گلابی.

بحث

در پژوهش حاضر مشخص شد که قارچ‌های میکوریز آربوسکولار بر بیشتر شاخص‌های فیزیولوژیکی نهال‌های حاصل از ریزازدیادی گلابی پایه پیرودوارف، مانند کلروفیل فلورسانس، شاخص کارایی، شاخص سبزینگی و کاروتنوئید در شرایط تنش خشکی مؤثر بوده و آن‌ها را نسبت به شاهد (بدون میکوریز) افزایش داد. شاخص F_v/F_m شاخص خوبی از خسارت ممانعت نوری است. هنگامی که گیاهان در معرض تنش‌های محیطی از جمله کمبود آب قرار می‌گیرند، سوخت و ساز برگ‌ها کاهش پیدا می‌کند. در این شرایط، دستگاه فتوسنتزی از آسیب نوری ایجاد شده دچار اختلال می‌شود و در نتیجه، به برانگیختگی بیش از حد فتوسیستم II منجر می‌شود (۷، ۱۶). قارچ‌های میکوریز از راه بهبود روابط آبی و افزایش هدایت روزنه‌ای (۵) و همچنین، بهبود شرایط تغذیه‌ای گیاه میزبان که از راه افزایش جذب عنصرهای کم‌مصرف مانند آهن، مس، منگنز، روی و عنصرهای پرمصرف مانند پتاسیم و فسفر می‌باشد، بر بهبود فتوسنتز گیاه تأثیر می‌گذارند. در همین راستا نتیجه‌های مشابهی توسط پژوهشگران دیگر نیز گزارش شده است (۵، ۴۰). همزیستی با قارچ‌های میکوریز می‌تواند با افزایش میزان جذب عنصرهای غذایی مانند منیزیم و آهن به علت شرکت این عنصرها در ساختمان کلروفیل و به عبارتی ضروری بودن این عنصرها جهت فتوسنتز، موجب افزایش سبزینگی گردد (۲۸، ۳۲). این قارچ‌ها هم‌چنین نقش مهمی در جذب فسفر به عنوان منبع انرژی توسط گیاه داشته (۳۱) و به این صورت می‌توانند سبب بهبود فتوسنتز و در مجموع، افزایش در محتوای و سازمان‌دهی کلروپلاست‌های برگی در این گیاهان گردند. شاخص سبزینگی بیانگر میزان سبزی رنگ برگ می‌باشد که رابطه

مستقیمی با سلامت برگ دارد. در این رابطه عنصرهایی مانند نیتروژن، آهن و غیره دخالت دارند. هر گونه شرایطی که منجر به تغییر رنگ برگ شود بیان‌کننده این است که برگ در شرایط تنش می‌باشد (۴۵). یافته‌های پژوهش حاضر با نتیجه‌های پژوهش‌های Germana (۱۷) و آقابابایی و رئیسی (۲) روی بادام و باقری و همکاران (۶) و عباس‌پور و همکاران (۱) روی پسته همخوانی دارد. در پژوهش حاضر نیز اثر بخش بودن همزیستی قارچ‌های میکوریز در افزایش میزان کلروفیل و به‌طور کلی میزان فتوسنتز حاصل گردید که پژوهش‌های انجام گرفته تأییدی بر نتیجه‌های این پژوهش می‌باشد.

کاهش میزان کلروفیل a، b، کاروتنوئید و کلروفیل کل در اثر تنش خشکی شدید به‌علت افزایش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌باشد که این رادیکال‌های آزاد باعث پراکسیداسیون و در نتیجه تجزیه این رنگیزه می‌گردند. کاهش مقدار کلروفیل می‌تواند به دلیل بین رفتن آنزیم‌های تولیدکننده رنگدانه‌های فتوسنتزی در شرایط تنش باشد (۵۰). هم‌چنین می‌تواند به علت تغییر سوخت و ساز نیتروژن، در ارتباط با ساخت ترکیب‌هایی مثل پرولین باشد که در تنظیم اسمزی کارایی دارند. افزایش تولید پرولین در هنگام تنش باعث می‌گردد که گلوتامات که پیش‌ماده مشترک ساخت کلروفیل و پرولین می‌باشد، کمتر در مسیر ساخت کلروفیل قرار گیرد. در پژوهشی، Woodward و Bennett (۵۰) گزارش کردند که با کاهش مقدار آب در یاخته، از غلظت کلروفیل a و کلروفیل b کاسته شد. آن‌ها بیان نمودند که کاهش غلظت کلروفیل به واسطه فعالیت کلروفیلاز است. افزایش در میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی می‌تواند در نتیجه افزایش میزان فتوسنتز در گیاهچه‌های همزیست با میکوریز صورت گرفته باشد. برای افزایش میزان کلروفیل با کاربرد قارچ‌های میکوریز، Tang و همکاران (۴۹) افزایش در میزان کلروفیل گیاه میکوریزایی شده را به افزایش جذب نیتروژن توسط سیستم میکوریزایی نسبت دادند. کاهش کلروفیل را می‌توان به‌عنوان شاخص تنش اکسیداتیو در گیاهان زیر تنش خشکی در نظر گرفت. هرچند گیاهان میکوریزی زیر تنش خشکی ملایم نسبت به گیاهان میکوریزایی در سطح مطلوب آبیاری از محتوای کلروفیل بیشتری برخوردار بودند، اما با اعمال تنش خشکی شدید محتوای کلروفیل کل در این گیاهان کاهش پیدا کرد. بسته شدن روزنه‌ها در بیشتر گیاهان در پاسخ به تنش خشکی پیش از هر گونه تغییر در محتوای آب برگ یا پتانسیل آب برگ رخ می‌دهد. طولانی شدن زمان تنش و بسته‌شدن روزنه‌ها به مدت طولانی می‌تواند به تخریب کلروپلاست منجر شود. پژوهش‌هایمختلف نشان داده‌اند که قارچ‌های میکوریز می‌توانند باعث افزایش در هدایت روزنه‌ای و فتوسنتز و در مجموع افزایش در غلظت کلروفیل‌ها در گیاهان پس از تنش آبی شوند (۴۵).

در همین راستا، Sanchez-Blanco و همکاران (۴۳) بیان کردند که گیاهان رزماری (*Rosmarinus officinalis*) میکوریزی زیر شرایط تنش خشکی، محتوای کلروفیل بالاتری را نسبت به گیاهان غیرمیکوریزی داشتند. در مطالعه‌ای که اثر قارچ‌های میکوریز بر محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی و ترکیب‌های آنتی‌اکسیدان پس از دوره سازگاری گیاهچه‌های باززایی شده پروانش مورد بررسی قرار گرفته بود، نتیجه‌ها بیانگر اثر مثبت میکوریز بر محتوای رنگیزه‌های کلروفیل a، b و کاروتنوئیدها نسبت به غیرمیکوریز بود (۳۹). با توجه به نتیجه‌های به‌دست آمده، گیاهان میکوریزی قرار گرفته در شرایط تنش خشکی نسبت به گیاهان شاهد (غیرمیکوریز) در همان شرایط رطوبتی کم‌تر دچار محدودیت نیتروژن برای ساخت کلروفیل و پرولین می‌شوند. در این بررسی در اثر تنش خشکی شدید، میزان کلروفیل a، b، کاروتنوئید و کلروفیل کل به شدت کاهش یافت. براساس نتیجه‌های به‌دست آمده در پژوهش حاضر مشخص شد که قارچ‌های میکوریز آربوسکولار بر شاخص‌های تنظیم‌کننده اسمزی نهال‌های میکوریزی حاصل از ریزازدیادی گلابی پایه پیرودوارفزیر تنش خشکی مؤثر بوده و آن‌ها را نسبت به شاهد (بدون میکوریز) کاهش داد.

گیاهان با استفاده از سازوکارهای مختلف، فشار آماس یاخته‌های خود را بالا نگه می‌دارند. از جمله مکانیسم‌های کارآمد جهت حفظ فشار تورژسانس در شرایط تنش خشکی، تنظیم اسمزی می‌باشد (۵۲). گیاهان غلظت برخی از متابولیت‌ها را با استفاده از این مکانیسم، در یاخته‌های خود افزایش می‌دهند (۹). ترکیب‌هایی که در تنظیم اسمزی مؤثر می‌باشند، اغلب قندهای محلول، پتاسیم، منیزیم، کلسیم، اسیدهای آلی و اسیدهای آمینه از جمله پرولین هستند (۲۲). یکی از شاخص‌های تحمل گیاهان به خشکی، اندازه‌گیری مقدار پرولین است. پرولین نوعی اسید آمینه می‌باشد که در پاسخ به اغلب تنش‌ها در گیاهان انباشت پیدا می‌کند. پژوهشگران چند دلیل را برای انباشت پرولین در گیاهان زیر شرایط خشکی بیان کرده‌اند، برخی زیست‌ساخت آبسیزیک اسید (ABA) در ریشه و انتقال آن به قسمت‌های هوایی گیاه را به عنوان پیامی جهت انباشت پرولین می‌دانند و برخی هم معتقدند که پراکسید هیدروژن تولید شده در طول تنش خشکی می‌تواند سیگنالی جهت تجمع پرولین

باشد (۲۲). پرولین می‌تواند به‌عنوان یک تنظیم‌کننده اسمزی در گیاه عمل نموده و هم‌چنین تجمع آن در سیتوپلاسم یاخته نقش مهمی را در پایداری پروتئین‌های یاخته و غشایی طی تنش‌های وارد شده بر گیاه ایفا می‌کند (۱۳، ۲۳). قندهای محلول نیز گروهی از اسمولیت‌های سازگار هستند که در شرایط خشکی تجمع یافته و به عنوان عامل اسمزی عمل می‌کنند. افزایش قندها در اثر تنش با تنظیم اسمزی و نگهداری آماس و نیز با پایداری غشاها و پروتئین‌ها مرتبط است. در توضیح کاهش غلظت قندهای محلول در برگ گیاهان در شرایط تنش خشکی شدید براساس نظر پژوهشگران می‌توان گفت که وقتی فتوسنتز محدود انجام گیرد قارچ‌ها رقیب قوی جهت اختصاص یافتن کربن به ریشه می‌باشند. قارچ‌ها جهت انتقال آمونیوم به ریشه برای تثبیت نیتروژن، نیاز به اسکلت کربنی دارند. کمبود آب به شدت فعالیت آنزیم اینورتاز را کاهش می‌دهد، این عمل می‌تواند نشان‌دهنده احتمال تجمع کربوهیدرات محلول ریشه و کاهش کربوهیدرات برگ در طول تنش خشکی باشد. بنابراین، میزان انتقال قندهای محلول به وسیله قارچ‌های میکوریز آربوسکولار به ریشه افزایش پیدا می‌کند. هم‌چنین، ممکن است مقدار زیادی از قندها به ساقه انتقال یافته باشند تا بتوانند به ریشه رفته و غذای قارچ را در شرایط تنش تأمین نمایند و یا این‌که می‌توان گفت قندها در ساقه انباشته شده‌اند (۱۴). قندهای محلول در شرایط خشکی تجمع یافته و به عنوان عامل اسمزی عمل می‌نمایند. افزایش قندها در اثر تنش با تنظیم اسمزی و نگهداری تورژسانس و هم چنین با پایدار کردن غشاها و پروتئین‌ها در ارتباط است.

در ارتباط با نقش میکوریز بر مقدار پرولین و قندهای محلول در تنش خشکی، گزارش‌های متعددی وجود دارد. برخی از پژوهشگران بر این باورند که قارچ میکوریز سبب افزایش مقدار این ماده‌ها در برگ گیاهان میزبان می‌گردد و دلیل آن را چنین بیان می‌کنند که این ترکیب‌ها با تجمع در یاخته، موجب کاهش پتانسیل آبی برگ شده و گیاه را از آسیب‌های تنش خشکی محافظت می‌کنند (۲۷، ۴۶، ۵۱). به عبارتی تحمل بهتر تنش خشکی گیاهان میکوریزی با استفاده از سازوکارهای ایجاد شده توسط همزیستی میکوریز نسبت به گیاهان بدون میکوریز می‌باشد و در نتیجه، کمتر از آسیب‌های ناشی از تنش خشکی تأثیر می‌پذیرند (۳۷). برخی دیگر از پژوهشگران نیز معتقدند که میکوریز میزان پرولین و قندهای محلول را در برگ گیاهان میزبان نسبت به گیاهان بدون میکوریز در شرایط تنش خشکی کاهش می‌دهد. گیاهان میکوریز اغلب در این مرحله با موفقیت بیشتری می‌توانند با استفاده از روابط آبی و تغذیه بهتر نسبت به گیاهان بدون میکوریز، از شرایط تنش خشکی اجتناب کرده و بنابراین نیاز کمتری دارند تا آنزیم‌های حمایت‌کننده اسمزی را تنظیم کنند (۴۰) و کمتر دچار آسیب گردند. در نتیجه میزان پرولین و قندهای محلول نسبت به گیاهان بدون میکوریز، افزایش کمتری نشان می‌دهند (۱۲، ۳۷، ۴۱). هم‌چنین ممکن است در این مرحله سایر محلول‌های سازگار مانند گلایسین بتائین و یا کربوهیدرات در گیاهان مایه‌زنی‌شده انباشته شوند و یا پرولین در این مرحله جهت ساخت پروتئین مصرف شده باشد (۱۴).

پیرزاد و همکاران (۳۶) افزایش میزان پرولین را در اثر ایجاد تنش آبی در گیاه بابونه آلمانی (*Matricaria chamomilla* L.) نشان دادند. هم‌چنین تأثیر قارچ‌های میکوریز بر افزایش محتوای این آمینواسید در گیاهچه‌های حاصل از شرایط درون‌شیشه‌ای انگور (*Vitis vinifera* L.) پس از طی دوره سازگاری نشان داده شده است (۲۸). پژوهشگران مشاهده نمودند که همزیستی با قارچ میکوریز بر تجمع قندهای محلول در گیاه توتون در شرایط خشکی تاثیرگذار است (۴۴). به این صورت که میزان فروکتوز و گلوکز کمتری در برگ گیاهان میکوریزی نسبت به غیرمیکوریز، زیر شرایط خشکی تجمع پیدا می‌کند. همچنین، بیان شده است که میکوریز در شرایطی که فتوسنتز محدود می‌باشد، به عنوان یک رقابت‌کننده قوی با ریشه در دریافت کربوهیدرات‌ها رقابت دارد. توانایی تنظیم اسمزی در شرایط تنش از راه تجمع ماده‌های قابل حل مانند پرولین و قندهای محلول در مورد درختان زیادی از جمه انگور (۳۴) و پسته (۶) گزارش شده‌اند. افزایش غلظت اسمولیت‌های سازگار مانند کربوهیدرات‌ها و پرولین تحت تأثیر تنش‌های محیطی مانند خشکی (۲۱، ۲۹) و شوری (۱۵) به اثبات رسیده است. بر اساس نتیجه‌های آزمایش حاضر مقدار پرولین و قندهای محلول در برگ‌های گیاهان میکوریزایی کمتر از مقدار آن در برگ‌های گیاهان بدون میکوریز بود.

نتیجه‌گیری

در این پژوهش استفاده از گونه‌های قارچ میکوریز آربوسکولار در تیمارهای میکوریزی تحت تنش خشکی مثبت ارزیابی شد و درصد کلونیزاسیون ریشه گیاهان میکوریزی در این پژوهش به نسبت بالا بود که این موضوع افزایش عملکرد را به دنبال داشت. بنابراین، استفاده از میکوریز در کنار ریزافزایی در جهت تکثیر و تولید گیاهانی با کیفیت بالا و عاری از عوامل بیماری‌زا می‌تواند گامی مهم در جهت رفع دشواری‌های موجود در مسیر ازدیاد و کاهش هزینه‌های کشت و کار گیاهان باشد. تلقیح قارچ میکوریز سبب بهبود سازگاری و افزایش رشد گیاهچه‌های به‌دست آمده از ریزازدیادی گلابی پایه پیرودوارف شد. بنابراین، می‌توان از قارچ‌های میکوریز آربوسکولار در جهت بهبود درصد زنده‌مانی و کاهش دوره سازگاری گیاهچه‌های به‌دست آمده از کشت بافت استفاده نمود. با توجه به نتیجه‌های به‌دست آمده در این پژوهش می‌توان بیان نمود که قارچ‌های میکوریز آربوسکولار می‌توانند به عنوان یک عامل پیش‌برنده در افزایش مقاومت گیاهان طی فرایند سازگاری عمل کنند.

منابع References

1. Abbaspour, H., S., Saeidi-Sar, H., Afshari and M., Abdel-Wahhab. 2012. Tolerance of mycorrhiza infected pistachio (*Pistacia vera* L.) seedling to drought stress under glasshouse conditions. J. Plant Physiol. 169: 704-709.
2. Aghababaie, F. and F., Raesi. 2009. Endomycorrhizal symbiosis formation in some commercial Almond genotypes. Iranian J. Hort. Sci. Technol. 10: 127-140.
3. Ahmed, M., M. A., Anjum, A. H., Shah and A., Hamid. 2010. *In vitro* preservation of *Pyrus* germplasm with minimal growth using different temperature regimes. Pak. J. Bot. 42: 1639-1650.
4. Amooaghaie, R. and F., Vafadar. 2012. The effect of mycorrhiza on transfer shock tolerance and heat stress in stevia seedlings obtained from tissue culture. Third Iranian Agricultural Biotechnology Conference (Plant, Animal and Industrial), Ferdowsi University Mashhad.
5. Augé, R. M. 2001. Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. Mycorrhiza, 11: 3-42.
6. Bagheri, V., M., Shamshiri, H., Shirani and H., Roosta. 2011. Effect of mycorrhizal inoculation on ecophysiological responses of pistachio plants grown under different water regimes. Photosynthetica, 49: 531-538.
7. Baker, N. R. 2008. Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. Ann. Rev. Plant Biol. 59: 89-113.
8. Bakhtiari, F., J., Mozaffari and H., Abdollahi. 2016. A study on growth, propagation and rooting of Iranian native pears for developing in vitro conservation system. Agr. Biotech. J. 8: 17-34.
9. Bohnert, H.J. and R.G., Jensen. 1996. Strategies for engineering water-stress tolerance in plants. Trends Biotechnol. 14: 89-97.
10. Bonfante-Fasolo, P. 2018. Anatomy and morphology of VA mycorrhizae. In: (Ed.), VA mycorrhiza. CRC Press, 5-33.
11. Cattivelli, L., F., Rizza, F.-W., Badeck, E., Mazzucotelli, A. M., Mastrangelo, E., Francia, C., Marè, A., Tondelli and A. M., Stanca. 2008. Drought tolerance improvement in crop plants: an integrated view from breeding to genomics. Field Crops Res. 105: 1-14.
12. Davies Jr, F., J., Potter and R., Linuerman. 1993. Drought resistance of mycorrhizal pepper plants independent of leaf P concentration-response in gas exchange and water relations. Physiol. Plant. 87: 45-53.
13. Errabii, T., C.B., Gandonou, H., Essalmani, J., Abrini, M., Idaomar and N., Skali-Senhaji. 2006. Growth, proline and ion accumulation in sugarcane callus cultures under drought-induced osmotic stress and its subsequent relief. African J. Biotechnol. 5: 1488-1493.

14. Faghani, E., M., Godarzi and A., Safarnezhad. 2015. Effects of mycorrhizal symbiosis on some physiological characters of Sesbania aculeta against water deficient stress. Agr. J. (Pajouhesh and Sazandegi), 106: 37-44.
15. Farhoudi, R., F., Sharifzadeh, K., Poustini, M., Makkizadeh and M., Kochak Por. 2007. The effects of NaCl priming on salt tolerance in canola (*Brassica napus* L.) seedlings grown under saline conditions. Seed Sci. and Technol. 35: 754-759.
16. Fracheboud, Y. 2004. Using chlorophyll fluorescence to study photosynthesis. Presentation from the Institute of Plant Sci. ETH, Universitätstrasse.
17. Germana, C. 1996. Experiences on the response of almond plants (*Amygdalus communis* L.) to water stress. II International Symposium on Irrigation of Horticultural Crops. 449: 497-504.
18. Giovannetti, M. and B., Mosse. 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhiza infection in roots. New Phytologist, 84: 489-500.
19. Harley, J. L. and S. E., Smith. 1983. Mycorrhizal symbiosis. Academic Press Inc, London, UK.
20. Hazarika, B. 2003. Acclimatization of tissue-cultured plants. Current Sci. 85: 1704-1712.
21. Heidari, M. and V., Karami. 2013. Effects of drought stress and mycorrhiza species on grain yield, yield components, chiorophyll content and biochemical components of sunflower. J. Environ. Str. Crop Sci. 6: 17-26.
22. Heuer, B. 1999. Osmoregulatory role of proline in plants exposed to environmental stresses. Second edition, In M. Pessarakli (Ed.), Handbook of Plant and Crop Stress. pp: 675-695.
23. Hong-Bo, S., C., Xiao-Yan, C., Li-Ye, Z., Xi-Ning, W., Gang, Y., Yong-Bing, Z., Chang-Xing and H., Zan-Min. 2006. Investigation on the relationship of proline with wheat anti-drought under soil water deficits. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 53: 113-119.
24. Irigoyen, J., D., Einerich and M., Sánchez-Díaz. 1992. Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa (*Medicago sativa* L.) plants. Physiol. Plant. 84: 55-60.
25. Jacob, H. 2000. New pear rootstocks from Geisenheim, Germany. VIII International Symposium on Pear, 596: 337-344.
26. Karimi, F., S., Zangeneh, M., Yousefzadi and H., Zarre Mayvan. 2005. Identification of arbuscular mycorrhiza fungi (AMF) and root colonization peroentage in Kharturan biospher reserve. Environ. Sci. 10: 83-88.
27. Khalafallah, A. A. and H.H., Abo-Ghalia. 2008. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on the metabolic products and activity of antioxidant system in wheat plants subjected to short-term water stress, followed by recovery at different growth stages. J. Appl. Sci. Res. 4: 559-569.
28. Krishna, H., S., Singh, R., Sharma, R., Khawale, M., Grover and V., Patel. 2005. Biochemical changes in micropropagated grape (*Vitis vinifera* L.) plantlets due to arbuscular-mycorrhizal fungi (AMF) inoculation during ex vitro acclimatization. Sci. Hort. 106: 554-567.
29. Ma, Q., D. W., Turner, D., Levy and W. A., Cowling. 2004. Solute accumulation and osmotic adjustment in leaves of *Brassica* oilseeds in response to soil water deficit. Australian J. Agr. Res. 55: 939-945.
30. Maleki Koohbahani, A., H.R., Karimi and H. R., Roosta. 2012. Evaluation of pistachio interspecies hybrid (*P. atlantica* * *P. vera*) to salinity and drought stress. Master Thesis, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Vali-e-Asr University of Rafsanjan.
31. Malekzadeh, P., J., Khara and S., Farshian. 2007. Effect of Arbuscular Mycorrhiza (*Glomus etunicatum*) on some physiological growth parameters of tomato plant under copper toxicity in solution. Pakistan J. Biol. Sci. 10: 1326-1330.
32. Mohammadi, Zh., L., Naseri and M., Barin. 2016. Effect of arbuscular mycorrhiza fungi symbiosis and culture media on establishment and growth of micropropagated MM106 apple rootstock. Iran. J. Hort. Sci. 47: 287-296.

33. Paquin, R. and P., Lechasseur. 1979. Observations sur une méthode de dosage de la proline libre dans les extraits de plantes. Canad. J. Bot. 57: 1851-1854.
34. Patakas, A., N., Nikolaou, E., Zioziou, K., Radoglou and B., Noitsakis. 2002. The role of organic solute and ion accumulation in osmotic adjustment in drought-stressed grapevines. Plant Sci. 163: 361-367.
35. Phillips, J. M. and D., Hayman. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. Transactions of the British Mycological Society. 55: 158-161.
36. Pirzad, A., M. R., Shakiba, S., Zehtab-Salmasi, S. A., Mohammadi, R., Darvishzadeh and A., Samadi. 2011. Effect of water stress on leaf relative water content, chlorophyll, proline and soluble carbohydrates in *Matricaria chamomilla* L. J. Medicinal Plants Res. 5: 2483-2488.
37. Porcel, R. and J. M., Ruiz-Lozano. 2004. Arbuscular mycorrhizal influence on leaf water potential, solute accumulation, and oxidative stress in soybean plants subjected to drought stress. J. Exp. Bot. 55: 1743-1750.
38. Raaman, N. and S., Patharajan. 2006. Integration of arbuscular mycorrhizal fungi with micropropagated plants. In: Mukerji, K.G., Manoharachary, C. (Eds.), Current Concepts in Botany. I. K. International Publishing House, India.
39. Rahmatzadeh, S., J., Khara and S. K., Kazemitabar. 2013. Assessment effect of mycorrhizal fungi *Glomus etunicatum* on photosynthetic pigments and antioxidant properties of regenerated *Catharanthus roseus* L. plants during acclimatization process. Iran. J. Plant Ecophysiol. Res. 8: 12-20.
40. Ruiz-Lozano, J. 2003. Arbuscular mycorrhizal symbiosis and alleviation of osmotic stress. New perspectives for molecular studies. Mycorrhiza, 13: 309-317.
41. Ruiz-Lozano, J. and R., Azcón. 1996. Mycorrhizal colonization and drought stress as factors affecting nitrate reductase activity in lettuce plants. Agr. Ecosys. Environ. 60: 175-181.
42. Rupnawar, B. and A., Navale. 2000. Effect of VA-mycorrhizal inoculation on growth of pomegranate layers. J. Maharashtra Agr. Universities. 25: 44-46.
43. Sanchez-Blanco, J., T., Ferrández, A., Morales, A., Morte and J. J., Alarcón. 2004. Variations in water status, gas exchange, and growth in *Rosmarinus officinalis* plants infected with *Glomus deserticola* under drought conditions. J. Plant Physiol. 161: 675-682.
44. Schellenbaum, L., J., Müller, T., Boller, A., Wiemken and H., Schüepp. 1998. Effects of drought on non-mycorrhizal and mycorrhizal maize: changes in the pools of non-structural carbohydrates, in the activities of invertase and trehalase, and in the pools of amino acids and imino acids. The New Phytol.ogist, 138: 59-66.
45. Selvaraj, T. and P., Chellappan. 2006. Arbuscular mycorrhizae: a diverse personality. J. Cent. Europ. Agr. 7: 349-358.
46. Subramanian, K., C., Charest, L., Dwyer and R., Hamilton. 1997. Effects of arbuscular mycorrhizae on leaf water potential, sugar content, and P content during drought and recovery of maize. Canad. J. Bot. 75: 1582-1591.
47. Smith, S.E. and D. J., Read. 2008. Mycorrhizal symbiosis. Third edition, Academic Press. pp: 800.
48. Tabatabai, J. 2009. Principles of mineral nutrition of plants. Teacher Press, Tabriz. 314 pp. (In Persian).
49. Tang, M., H., Chen, J., Huang and Z., Tian. 2009. AM fungi effects on the growth and physiology of *Zea mays* L. seedlings under diesel stress. Soil Biol. Biochem. 41: 936-940.
50. Woodward, A. J. and I. J., Bennett. 2005. The effect of salt stress and abscisic acid on proline production, chlorophyll content and growth of *in vitro* propagated shoots of Eucalyptus camaldulensis. Plant Cell, Tiss. Organ Cult. 82: 189-200.
51. Wu, Q.-S. and R.-X., Xia. 2006. Arbuscular mycorrhizal fungi influence growth, osmotic adjustment and photosynthesis of citrus under well-watered and water stress conditions. J. Plant Physiol. 163: 417-425.

52. Yordanov, I., V., Velikova and T., Tsonev. 2003. Plant responses to drought and stress tolerance. Bulg. Acad. Sci. Plant Physiol. 187-206.
53. Zarei, M. and Gh., Salehi Jouzani. 2010. Identification of arbuscular mycorrhiza fungi, challenges and solutions. J. Genetics, 5: 5-20.

Iranian Journal of Horticultural Science and Technology 22 (4): 519-534 (2021)
Research article

Efficacy of Arbuscular Mycorrhizal Fungi on Physiological Indices of Micropropagated Pear Rootstock (Pyrodwarf) Under Drought Stress

Kh. Shirinzadeh, E. Sedaghati*, A.A. Mohammadi Mirik, H.R. Karimi and M. Nadi[1]

Micropropagation is a method for mass and rapid proliferation of plants on tissue culture media. Low survival and poor growth of micropropagated seedling after transplanting is one of the main disadvantages of this technique in many plants. The success of this method can be increased by using biological agents such as arbuscular mycorrhizal fungi. The experiment was conducted to evaluate the efficiency of arbuscular mycorrhizal fungi to improve physiological indices and osmotic regulators content of micropropagated pear rootstock (Pyrodwarf) under drought stress. Factorial experiment was performed in a completely randomized design with two factors (two mycorrhizal and three drought stress level). Experiment was conducted in three replications under greenhouse conditions. Drought stress continued for two months. Results of analysis of variance showed that mycorrhizal symbiosis significantly increased physiological parameters and decreased osmotic regulators at all levels of drought stress. Mycorrhizal colonization percentage determined as 84, 81.66 and 72%, in low, medium and severe drought stresses levels, respectively. Mycorrhizal application significantly increased physiological indices such as *Fv/Fm*, photosynthetic efficiency index, SPAD index, and the content of chlorophyll b, cartenoid and total chlorophyll in mycorrhizal treatments compared to control (no mycorrhizal plants) and decreased proline and soluble sugars content. Overall, the results of this experiment showed that rootstocks obtained from tissue culture treated with arbuscular mycorrhizal fungi were more adapted to natural conditions and drought stress.

Keywords: Abiotic stress, Adaptation, In-vitro, Mycorrhizal symbiosis.

1. Former M.Sc. Student of Plant Pathology, Associate Professor, Department of Plant Protection, College of Agriculture, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Assistant Professor, Department of Crop Production and Genetic, Professor, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Vali-e-Asr University of Rafsanjan and Assistant Professor, Pistachio Research Center, Horticultural Sciences Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rafsanjan, Iran, respectively.

* Corresponding Author, Email: (sedaghati@vru.ac.ir).