Journal of Horticultural Science
Vol. 30, No. 1, Spring 2016, P. 112-121
ISSN: 2008 - 4730

نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۰، شماره ۱، بهار ۱۳۹۵، ص. ۱۲۱-۱۱۲
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

بررسی تأثیر باکتری *Pseudomonas putida* و قارچ *Glomus intraradices* بر برخی صفات مورفولوژی و بیوشیمیایی گیاه شنبلیله (*Trigonella foenum-graecum* .L)

سیمین ایران خواه[۱]- علی گنجعلی[۲*] - مهرداد لاهوتی[۳] - منصور مشرقی[۴]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۵/۲۶
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۷/۰۱

چکیده

شنبیله (*Trigonella foenum-graecum* .L) یک گیاه دارویی قدیمی متعلق به خانواده لگوم‌ها (Fabaceae) است. باکتری‌های محرک رشد، رشد گیاه را از طریق مکانیزم‌هایی مثل بهبود جذب عناصر معدنی و تولید فیتوهورمون‌ها افزایش می‌دهند. بعلاوه اثر مفید بعضی از این باکتری‌ها می‌تواند به علت برهم‌کنش با قارچ‌های ویزیکولار آرباسکولار میکوریز باشد. آزمایش با چهار تیمار (فاکتور اول) شامل تلقیح بذر با باکتری *Pseudomonas putida*، تلقیح با قارچ آرباسکولار میکوریز *Glomus intraradices*، تلقیح مضاعف باکتری و قارچ میکوریز و شاهد در دو سطح تنش خشکی (فاکتور دوم) ۴۰ درصد ظرفیت زراعی و بدون تنش (۸۰ در صد ظرفیت زراعی) بصورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در اتاقک رشد آزمایشگاه فیزیولوژی گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد انجام شد. صفاتی مانند بیوماس گیاه، مقدار پروتئین‌های محلول، محتوای ماده‌ی دارویی دیوزژنین و مقدار فسفر گیاه اندازه‌گیری و مورد بررسی قرار گرفتند. تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که تیمار گیاه شنبلیله با باکتری و قارچ آرباسکولار میکوریز، باعث افزایش صفات مورد بررسی در شرایط تنش خشکی می‌شود. باکتری *Pseudomonas putida* و قارچ آرباسکولار میکوریز *Glomus intraradices* از طریق افزایش میزان جذب عناصر غذایی، حفظ و نگهداری آب باعث افزایش بیوماس، مقدار پروتئین محلول و مقدار ماده دارویی دیوزژنین می‌شود. از آنجایی که دیوزژنین یک ترکیب دارویی بسیار مهم است می‌توان از طریق برقراری رابطه همزیستی گیاه شنبلیله با باکتری و قارچ آرباسکولار میکوریز مذکور تولید دیوزژنین را در گیاه افزایش داد.

واژه‌های کلیدی: باکتری محرک رشد، تنش خشکی، دیوزژنین، رابطه همزیستی و قارچ میکوریز

مقدمه

شنبلیله (*Trigonella foenum-graecum* .L) گیاهی یکساله، دو لپه و متعلق به خانواده لگوم‌ها (Fabaceae)، یکی از قدیمی‌ترین گیاهان مهم دارویی چند منظوره است. در مورد منشا گیاه شنبلیله گفته می‌شود که این گیاه بومی نواحی مدیترانه‌ای یا جنوب غربی آسیا است و در مناطق مختلفی از جمله بخش‌هایی از اروپا، افریقا، شرق و غرب آسیا، شمال و جنوب امریکا و استرالیا کاشته می‌شود. برگ‌ها و دانه‌های شنبلیله بطور گسترده‌ای به صورت عصاره و پودر برای مصارف دارویی استفاده می‌شوند. دانه‌های شنبلیله به صورت چاشنی به غذا افزوده می‌شوند و برگ‌های سبز و ساقه‌های ظریف آن به علت داشتن کولین، پروتئین، مواد معدنی و ویتامین‌ها به صورت سبزی مصرف می‌شوند. در زمان‌های گذشته از شنبلیله در ترمیم زخم، تحریک تولید شیر، درمان آرتریت، تورم، بیماری‌های قلبی، بزرگ شدن طحال و کبد، بیماری‌های مزمن کلیه، تحریک معده ودرمان بی‌اشتهایی استفاده می‌شده است (۱).

مطالعات انجام شده، خواص آنتی‌دیابتیک، آنتی‌باکتریایی، آنتی‌اکسیدانی، ضد سرطانی، پایین آورندگی کلسترول، ضد پرکاری تیروئید، ضد نازایی، ضد آنتروژنی، ضد آلرژی، ضد فاسد شدگی، ضد تب و خصوصیات محافظت‌کنندگی در برابر سمیت اتانولی را برای شنبلیله تایید نموده است (۲۲). این خصوصیات چندگانه شنبلیله به علت داشتن ترکیبات شیمیایی شامل گالاکتوزآمین‌ها، دیوزژنین، تیگوژنین، نئوتیگوژنین، ترپنوئیدها، تریگونلین، کولین، ایزولوسین، فلاوونوئید و ترکیبات متنوع فنولی است. دیوزژنین یک پیش ساز مهم برای ترکیبات استروئیدی نیمه سنتزی مانند کورتیکواستروئیدها، هورمون‌های جنسی (مثل پروژسترون) و دیگر داروهای استروئیدی است. بیشترین مقدار دیوزژنین در برگ‌های جوان و سپس در دانه‌های بالغ وجود دارد. دیوزژنین از کلسترول سنتز می‌شود و یازده آنزیم کلیدی در سنتز آن دخالت دارند (۲۲). دیوزژنین در مقایسه با دو

۱،۲، ۳ و ۴- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشیار، استاد و دانشیار گروه زیست شناسی دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد
(*- نویسنده مسئول: Email: ganjeali@um.ac.ir)

استروئید گیاهی دیگر (هکوژنین و تیگوژنین) موثرترین القاکننده مرگ سلولی در خط سلولی ۱۵۴۷سارکومای استخوانی انسان است. با توجه به افزایش تقاضا برای کوتیکواستروئیدها، هورمون‌های جنسی و دیگر داروهـای اسـتروئیدی از سـال ۱۹۶۰، تولیـد اسـتروئید هـا از پـیش ماده‌های گیاهی یک مزیت به شمار می‌آید (۵).

خشکی یکی از مهم‌ترین تنش‌های محیطـی اسـت کـه رشـد و تولیدات گیاهی را بیش از سایر تنش‌های زیستی و غیر زیستی کاهش می دهد. مهم‌ترین اثرات تـنش خشـکی در گیاهـان زراعـی، کـاهش تقسیم و توسعه سلولی، اندازه‌ی برگ، طویل شدن ساقه، تولید ریشه و کاهش راندمان مصرف آب است (۸ و ۱۲). بطور کلی اثـر کمبـود آب بر روی رشد گیاه بستگی به شدت تنش و مرحله رشد گیاه دارد (۲).

گروه متنـوعی از میکروارگانیسـم‌هـا بـا سیسـتم ریشـه شـنبلیله همزیست می‌شوند و این همزیستی‌ها از طریق افزایش تثبیت نیتروژن اتمسفر، تولید هورمون‌های رشد، سیدروفورها و محلول‌سـازی فسـفر، باعث افزایش چشم‌گیر رشد و تولید محصول در گیاه مـی‌شـود. تـاثیر مفید قارچ های آرباسکولارمیکوریزی(VAM[2]) در بهبـود تحمـل بـه تنش، توسعه کودهای زیستی برای خاک‌های آلوده به فلزات و جـذب مواد غذایی مربوط می‌شـود (۱۷). بـاکتری‌هـای محـرک رشـد گیـاه معمولا در تماس بـا سـطح ریشـه هسـتند و رشـد گیـاه را از طریـق مکانیزم‌هایی مثل بهبود جذب عناصر معدنی و تولید فیتوهورمـون‌هـا، افزایش می‌دهند. بعلاوه اثر مفید بعضی از این باکتری‌ها می‌توانـد بـه علت برهم‌کنش آن‌ها با قـارچ‌هـای VAM باشـد (۳). بـاکتری‌هـای محـرک رشـد نیـز مـی‌تواننـد از طریـق تعـدیل فعالیـت سـایر میکروارگانیسم‌های همزیست با گیاه مانند میکوریز و یا ریزوبیوم‌ها بر رشـد ونمـو گیاهـان مـوثر واقـع شـوند (۱۹). قـارچ‌هـای ویزیکـولار آرباسکولار، قارچ‌های همزیست بـا گیـاه هسـتند، ریشـه‌هـای اغلـب گیاهان چوبی و علفی می‌توانند با دامنه‌ی وسیعی از قـارچ‌هـای AM[3] می‌توانند رابطه میکوریزایی داشته باشند و این نشان دهنده یک رابطه دو طرفه تبادل مواد غذایی است. گیاه کربن مورد نیاز قـارچ VAM را تامین و قارچ عمدتاً فسفر مورد نیاز گیاه را فراهم می‌کند و لـذا ایجـاد رابطه‌ی میکوریزایی منجر به افزایش رشد می‌شود. آلـودگی ریشـه بـا قارچ VAM گاهی منجـر بـه تغییـر در سـنتز متابولیـت‌هـای ثانویـه می‌شـود و الگـوی سـنتز آن‌هـا را تغییـر مـی‌دهـد (۱۶). قـارچ‌هـای میکوریزایی (VAM) می‌توانند با همکاری بـاکتری‌هـا، رشـدگیاه را از طریق بهبودجذب عناصر غذایی و مقاومـت بـه پـاتوژن‌هـای قـارچی بهبود بخشند. اطلاعات کمـی در مـورد مکانیسـم‌هـای بـرهم‌کـنش باکتری‌ها با قارچ‌های VAM و ریشه‌ی گیاه در ریزوسفر وجـود دارد. بعضـی از مکانیسـم‌هـای پیشـنهاد شـده عبارتنـد از : ۱ - برخـی از بـاکتری‌هـا، تـاثیر مسـتقیمی بـر سـرعت رشـد و جوانـه زنـی قارچ‌های VAM دارند، بنابراین می‌توانند تاثیر مفیدی بر روی گیاه در طول دوره‌ی همزیستی با قارچ‌های VAMداشته باشند؛ ۲- باکتری‌ها نیز می‌توانند به طور مستقیم بر فیزیولوژی گیاه موثر واقع شوند، برای مثال افزایش نفوذپذیری سلول‌های ریشـه و بهبـود تبـادل مـواد؛ ۳- برخی باکتری‌های می‌توانند به صورت ویـژه‌ای رابطـه همزیسـتی بـا قارچهـا برقـرار نمایندکـه بـه بهبـود رشـد گیـاه کمـک نمایـد، مثـل بهبودجذب عناصرغذایی، مهار پاتوژن‌های گیاهی و افزایش انشـعابات ریشه و ۴- بررسی‌ها نشان داده است که قـارچ‌هـای VAM، ترکیـب جمعیتی باکتری‌ها را تحت تاثیر قرار می‌دهند و از این طریق، ترکیـب شیمیایی ترشحات ریشه را تغییر می‌دهند، این ترشحات معمـولا یـک منبع غذایی برای باکتری‌هـای همزیسـت هسـتند (۳). بـاکتری‌هـا از طریق تولید اگزوپلی ساکاریدها می‌توانند تنش خشکی را تحمل کنند، اگزوپلی‌ساکاریدها با افزایش قدرت نگهداری آب و تنظیم انتشار منابع کربنی به باکتری‌ها در تحمل تنش کمک می‌کنند. اگزوپلی‌ساکاریدها به علت ایجاد ترکیبات رشته‌ای، چسبیدن باکتری بـه ریشـه و ایجـاد کلنیزاسیون را تسهیل می‌کنند (۵).

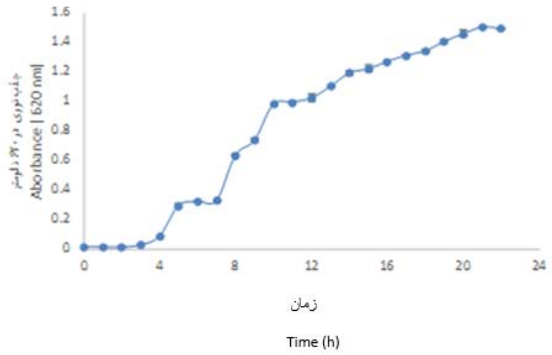
مکانیسم‌های ایجاد تغییر در مقدار ترکیبات فیتوشیمیایی گیاه بـه وسیله‌ی قارچ‌های VAMعمـدتا بـه صـورت تعـدیل ترکیبـاتی مثـل فلاونوئیدها و آلکالوئیدها اسـت کـه مـی‌توانـد پیامـد مکانیسـم‌هـای علامتـی بـین گیـاه میزبـان و قـارچ باشـد و یـا تغییـر در تعـادل متابولیت‌های ثانویه که نتیجه پاسخ گیاه به آلودگی قارچی است و یـا افزایش بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه در گیاهان میکوریزایی مـی‌توانـد بـه علـت بهبـود تغذیـه فسـفر ونیتـروژن حاصـل از فعالیـت قـارچ VAMباشد و نهایتاً وجود یک رابطه بین تغییر در مقدار متابولیت‌های ثانویه و تغییر در مقدار فیتوهورمون‌های گیاهی است (۲۴). با توجه به موارد فوق آزمایش حاضر با هدف بررسی تاثیر بـاکتری‌هـای محـرک رشد و قارچ میکوریز بر بیوماس، مقدار فسفر، مقدار پروتئین‌های کل و مقدار ماده‌ی دارویی دیوزژنین در گیاه شنبلیله انجام شد.

مواد و روش‌ها

برای انجام این آزمایش، گلدان‌های دو کیلـوگرمی کـه بـا خـاک برگ (نسبت ۱:۱ ماسه نرم و خاک باغی) پـر شـده بودنـد بـه عنـوان واحدهای آزمایشی استفاده شد. بذور شنبلیله پس از تست قوه نامیه به وسیله‌ی هیپوکلریت سدیم ۵ درصد ضد عفونی شـدند. قـارچ VAM (*Glomus intraradices*) به صورت پودر خـاک مخلـوط بـا اسـپور قارچ تهیه شد. به منظـور تلقـیح بـذر بـا قـارچ مـذکور، درعمـق سـه سانتی‌متری از سطح هر گلدان به ازای هر یـک کیلـوگرم خـاک، ۵۰ گرم پودر حاوی اسپورهای قارچ اضافه و سپس بذرها در گلدان کاشته شدند. باکتری محرک رشد، سـوش *Pseudomonas putida* نیـز از

2- Vesicular Arbuscular Mycorrhiza
3- Arbuscular Mycorrhiza

آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده علوم دانشگاه فردوسی تهیه شد. به منظور تلقیح بذر با باکتری، ابتدا منحنی رشد باکتری *Pseudomonas putida* در مدت ۲۴ ساعت رسم شد (شکل ۱) و با توجه به فاز لجستیک رشد باکتری و تعیین بهترین زمان رشد باکتری، مایع تلقیح در بهترین زمان با غلظت ۰/۵ مک فارلند آماده شد. بذرها ابتدا در محلول قندی و سپس در محیط کشت قرار گرفته و سپس به گلدان ها منتقل شدند. به منظور تلقیح مضاعف، بذرها پس از تلقیح با باکتری در گلدان های حاوی پودر قارچی قرار گرفتند. سپس گلدان‌ها به اتاقک رشد آزمایشگاه فیزیولوژی با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و طول دوره ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی منتقل شدند. تنش خشکی از روز چهاردهم پس از سبزشدن بر روی گلدان‌ها اعمال شد و گلدان‌ها بر اساس دو شرایط تنش خشکی (۴۰ درصد ظرفیت زراعی) و بدون تنش (۸۰ در صد ظرفیت زراعی) آبیاری شدند. تنظیم رطوبت خاک بر اساس درصد رطوبت جرمی محاسبه و کسری آب تا سطح رطوبت مورد نظر پس از محاسبه تعیین و در اختیار گیاه قرار گرفت. اعمال تنش تا پایان دوره آزمایش ادامه یافت. به این ترتیب آزمایش به صورت طرح کاملاً تصادفی با هشت تیمار شامل تیمار بذر با باکتری در شرایط تنش خشکی و شرایط فراهمی آب، تیمار بذر با قارچ میکوریز در شرایط تنش خشکی و شرایط فراهمی آب، تیمار توام بذر با باکتری و قارچ میکوریز در شرایط تنش خشکی و شرایط فراهمی آب و شاهد (بدون تلقیح) در شرایط تنش خشکی و شرایط فراهمی آب و با سه تکرار انجام شد. ۵۰ روز پس از سبز شدن، نمونه برداری از گیاهان برای بررسی و اندازه گیری صفات مورد بررسی شامل بیوماس گیاه، میزان فسفر، محتوای پروتئین‌های محلول و مقدار ماده دارویی دیوزژنین انجام شد.

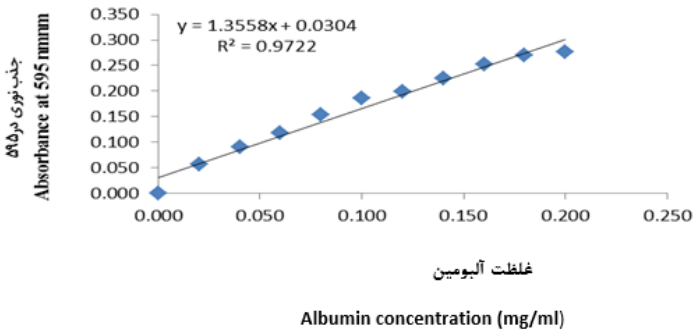


شکل ۱- منحنی رشد باکتری *Pseudomonas putida*

Figure 1- Growth curve of *Pseudomonas putida*

به منظور اندازه‌گیری بیوماس گیاه، اندام هوایی هر گیاه به مدت ۷۲ ساعت در آون با دمای ۷۰ درجه سانتی گراد قرار داده شده و سپس وزن خشک اندام هوایی اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری مقدار پروتئین به روش برادفورد (۶) انجام شد، به این ترتیب که پس از تهیه‌ی عصاره از هر نمونه گیاهی، به لوله‌های آزمایش حاوی پنج میلی لیتر معرف براد فورد، ۱۰۰ میکرولیتر عصاره‌ی حاوی نمونه‌های پروتئینی اضافه شد و لوله‌ها سریعاً به مدت ۱۰ ثانیه با سرعت ۲۲۰۰rpm ورتکس شدند. لوله شاهد به جای عصاره پروتئینی تنها شامل ۱۰۰ میکرولیتر بافر استخراج بود. پس از بیست دقیقه جذب نمونه‌ها با دستگاه طیف سنج نوری (V-7200- UV/VIS, JASCO., Japan) و در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد و باکمک منحنی استاندارد، غلظت پروتئین موجود در هر نمونه بر حسب میلی‌گرم در گرم وزن تر محاسبه شد. منحنی استاندارد پروتئین با استفاده ازغلظت‌های ۰، ۰/۰۲، ۰/۰۴، ۰/۰۶، ۰/۰۸، ۰/۱، ۰/۱۲، ۰/۱۴، ۰/۱۶، ۰/۱۸ و ۰/۲ میلی‌گرم در میلی لیتر آلبومین سرم گاوی به روش برادفورد رسم شد (شکل ۲).



شکل ۲- نمودار استاندارد پروتئین

Figure 2- Standard curve of protein

سنجش دیوزژنین به روش باکو و همکاران (۴) و اوماتسو و همکاران (۲۳) انجام شد. به این ترتیب که پس از تهیه عصاره‌ی متانولی از هر نمونه گیاهی، دو محلول A و B به صورت زیر تهیه شد. محلول A شامل ۰/۵ میلی لیتر ۴-متوکسی بنزآلدئید (p-آنیزالدئید) و ۹۹/۵ میلی‌لیتر اتیل استات و محلول B شامل ۵۰ میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ به همراه ۵۰ میلی‌لیتر اتیل استات. سپس در هر لوله آزمایش ۲۰۰ میکرولیتر عصاره‌ی متانولی در ۲ میلی‌لیتر اتیل استات حل شد و سپس به هر لوله آزمایش ۱ میلی لیتر از هر کدام از محلول‌های A و B اضافه شد. لوله‌های آزمایش به مدت ده دقیقه در حمام آب گرم ۶۰ درجه و سپس به مدت ۱۰دقیقه در آب ۲۵ درجه قرار گرفتند. پس از گذشت زمان فوق، جذب نمونه‌ها با طیف سنج نوری (V-7200- UV/VIS, JASCO, Japan) و طول موج ۴۳۰ نانومتر خوانده شد. منحنی استاندارد دیوزژنین با استفاده از غلظت‌های ۰، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵ و ۴۰ میلی گرم در میلی لیتر دیوزژنین رسم گردید، شکل ۳).

سنجش مقدار فسفر

به منظور تعیین میزان فسفر در ریشه و اندام هوایی گیاه از روش رنگ سنجی استفاده شد. در این روش از ترکیب اسید مولیبدیک با فسفات موجود در نمونه، اسید فسفومولیبدیک حاصل می‌شود. احیای کمپلکس مزبور موجب ایجاد رنگ آبی در محلول می‌گردد. شدت رنگ تشکیل شده با غلظت فسفر در محلول متناسب است و شدت رنگ به وسیله کالریمتر در طول موج ۷۳۰ نانومتر اندازه‌گیری می‌شود (۷).

۰/۵ میلی‌لیتر از خاکستر تر ریشه و یا اندام هوایی گیاه را در بشر ۱۰۰cc ریخته، pH آن بافنل فتالئین کنترل و در pH خنثی تنظیم گردید (با استفاده از محلول‌های اسید کلریدریک و هیدروکسید سدیم ۰/۰۵ نرمال). با افزودن آب مقطر حجم محلول به ۳۰ میلی‌لیتر رسانده شد و سپس ۴ میلی‌لیتر مولیبدات آمونیوم اسیدی به آن اضافه گردید و محلول هم زده شد. در مرحله بعد ۰/۱ گرم آسکوربات اضافه و محلول تا حد جوش حرارت دید و پس از سرد شدن، حجم محلول در بالن ژوژه به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد و جذب آن به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر مدل در طول موج ۷۳۰ نانومتر خوانده شد (برای شاهد از ۰/۵ میلی‌لیتر آب مقطر استفاده شد).

برای رسم منحنی استاندارد فسفر، محلول پایه ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر فسفر آماده و محلول‌های استاندارد فسفر در غلظت‌های ۱۰،۲۰،۳۰،۴۰ و۵۰ میلی‌گرم در لیتر تهیه و جذب آن به روش مذکور توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد و منحنی استاندارد رسم گردید و با استفاده از این منحنی استاندارد، غلظت فسفر در نمونه‌ها تعیین شد و سپس مقدار آن در صد گرم وزن خشک محاسبه گردید.

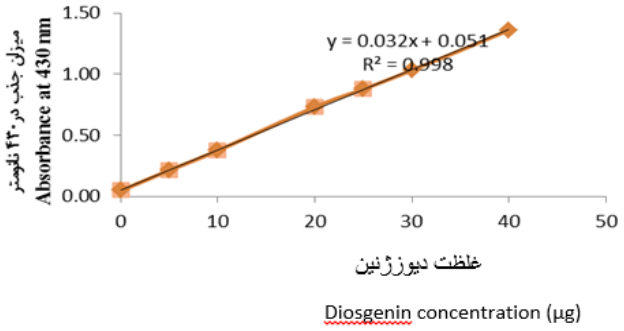
تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

داده‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی بوسیله نرم افزار SPSS 19 تجزیه واریانس شدند و میانگین داده‌ها توسط آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد ($p\leq0.05$) مقایسه‌ی آماری شدند و نمودارهای مربوط نیز در نرم افزار Excel رسم گردیدند.

نتایج و بحث

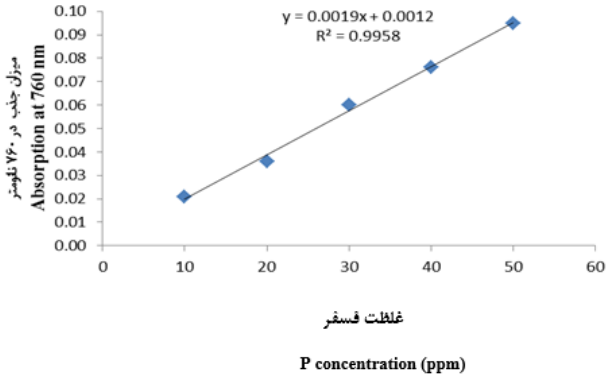
بیوماس گیاه

نتایج حاصل از مقایسه میانگین مشاهدات نشان داد که تیمار کاربرد توام باکتری *Pseudomonas putida* و میکوریز *Glomus intraradices* و نیز کاربرد میکروارگانیسم‌ها به تنهایی در شرایط فراهمی رطوبت تاثیر معنی‌داری در مقدار بیوماس گیاه ایجاد نداشت.



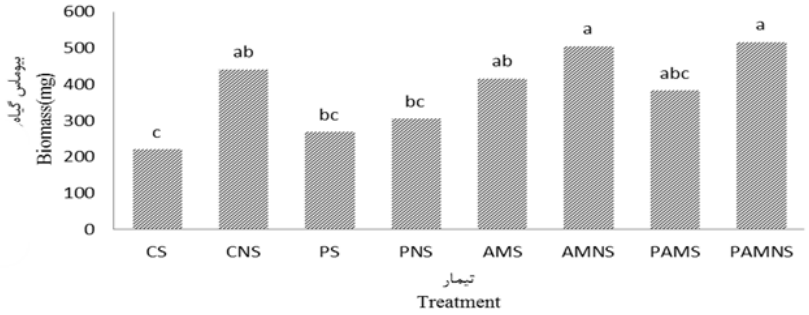
شکل ۳- نمودار استاندارد دیوزژنین

Figure 3- Standard curve of diosgenin



شکل ٤- نمودار استاندارد فسفر

Figure 4- Standard curve of phosphorus



شکل ٥- مقایسه میانگین بیوماس گیاه در سطوح مختلف تیماری شامل: تلقیح باکتریایی، میکوریزی و اثر توام باکتری و میکوریز در شرایط تنش خشکی و فراهمی رطوبت در گیاه شنبلیله. CS: گیاه بدون تلقیح در شرایط تنش، CNS: گیاه بدون تیمار در شرایط فراهمی رطوبت، PS :تیمار با باکتری سودوموناس پوتیدا در شرایط تنش، PNS : تیمار با باکتری سوموناس پوتیدا در شرایط فراهمی رطوبت، AMS: تیمار با قارچ میکوریزی *G. intradices* در شرایط تنش، AMNS: تیمار با قارچ *G. intradices* در شرایط فراهمی رطوبت، PAMS: تیمار توام گیاه با باکتری سودوموناس پوتیدا و قارچ میکوریزی *G. intradices* در شرایط تنش، PAMNS: تیمار توام گیاه با باکتری سودوموناس پوتیدا و قارچ میکوریزی *G. intradices* در شرایط فراهمی رطوبت. میانگین‌هایی که در هر ستون دارای حروف مشترک می باشند مطابق آزمون چند دامنه ای دانکن اختلاف معنی‌داری ندارند ($p\leq0.05$).

Figure 5-Comparison of the average amount of biomass at different levels of treatment, Including: bacterial inoculation, mycorrhizal inoculation and effect of combined association of bacteria and mycorrhiza in drought stress and non-stress conditions in fenugreek (*Trigonella foenum- graceum* L.). CS: plant with no inoculation of mycro-organisms in stress condition. CNS: plant whit no inoculation of mycro-organisms in non-stress condition. PS: treatment whit *P.putida* in drought stress condition, PNS: treatment whit *P.putida* in non-stress condition. AMS: treatment whit *G.intraradices* in drougt stress condition, AMNS: treatment whit *G.intraradices* in non-stress condotion. PAMS: combined association of *P.putida* and *G.intraradices* in drought stress conditions, PAMNS: combined association of *P.putida* and *G. intraradices* in non-stress condition. Values followed by same letters did not differ significantly from Duncan's multiple range tests ($p\leq0.05$).

در شرایط تنش خشکی، تیمار تلقیح میکوریز *Glomus intraradices* به تنهایی تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد (بدون تلقیح میکروارگانیسم) از نظر بیوماس داشت. تیمار تلقیح باکتری *Pseudomonas putida* به تنهایی و نیز به صورت توام با قارچ *Glomus intraradices*، در شرایط تنش، اگر چه بیوماس گیاه را نسبت به تیمار شاهد (بدون تلقیح میکرو ارگانیسم) افزایش داد ولی این افزایش از نظر آماری معنی‌دار نبود (شکل ۵).

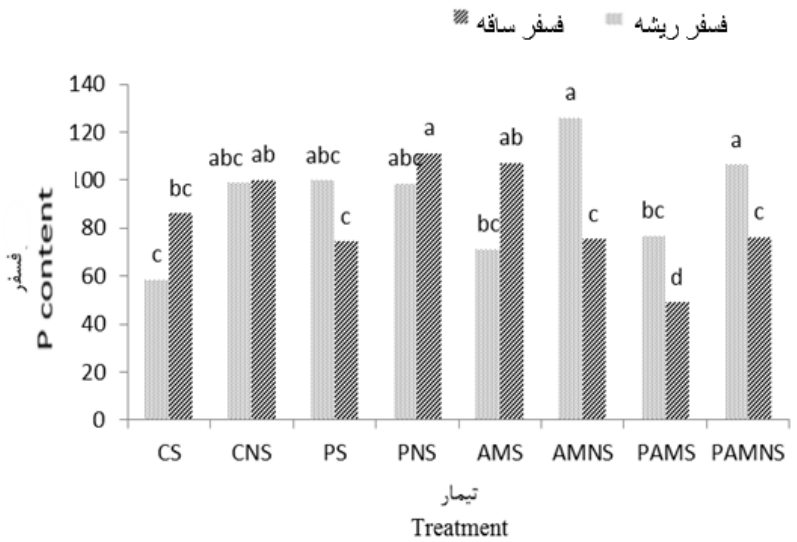
نتایج حاصل از بررسی بیوماس گیاه نشان داد که تنش خشکی باعث کاهش مقدار بیوماس گیاه شد. در یک تحقیق بر روی گیاه برنج، بیوماس گیاه با افزایش کمبود آب کاهش یافت. گیاهانی که روزانه آبیاری شدند بیوماس بیشتری نسبت به گیاهان تحت تنش خشکی داشتند. کاهش در بیوماس گیاه می تواند با نرخ کاهش تولید برگ و تعداد کم برگ‌ها همراه باشد (۲۱). احتمالاً کاهش فتوسنتز، افزایش مواد بازدارنده رشد و کاهش هورمون‌ها (اکسین و سیتوکینین)

در شرایط تنش خشکی از جمله عواملی است که رشد و وزن اندام هوایی را کاهش می دهد (۹).

نتایج حاصل از آزمایش نشان داد که تیمار توام گیاه با قارچ میکوریزی و باکتری و هم چنین تیمار هر میکروارگانیسم به تنهایی باعث افزایش مقدار بیوماس گیاه شد که این نتایج با نتایج نیراج و سینگ (۱۵) مطابقت دارد. آن‌ها نشان دادند که تیمار توام باکتری سودوموناس فلورسنس و قارچ‌های میکوریزی *Glomus mosseae* و یا *Gigaspora albida* باعث افزایش مقدار بیوماس گیاه لوبیا می‌شود. آن‌ها بیان کردند که باکتری سودوموناس باعث افزایش کلونیزاسیون قارچ و گیاه می‌شود و از این طریق باعث افزایش رشد گیاه می‌شوند.

مقدار فسفر ریشه و اندام هوایی

نتایج حاصل از میانگین مشاهدات نشان داد که در شرایط فراهمی رطوبت کاربرد توام باکتری *Pseudomona putida* و میکوریز *Glomus intraradices* و نیز میکوریز بدون حضور باکتری از بالاترین مقدار فسفر ریشه برخوردار بود اما تفاوت آن از لحاظ آماری با سایر سطوح تیماری معنی‌دار نبود. سایر تیمارها نیز اگرچه باعث افزایش میزان فسفر ریشه گیاه شدند، این افزایش نیز از نظر آماری معنی‌دار نبود، در شرایط تنش خشکی تیمار توام باکتری *Pseudomonas putida* و میکوریز *Glomus intraradices* و هم چنین تیمارگیاه با قارچ و باکتری به تنهایی باعث افزایش مقدار فسفر ریشه شدند و بیشترین مقدار افزایش مربوط به تیمار باکتری *Pseudomonas putida* به تنهایی بود، اگرچه این افزایش از لحاظ آماری معنی‌دار نبود (شکل ۶).



شکل ٦- مقایسه میانگین مقدار فسفر ریشه و اندام هوایی گیاه در سطوح مختلف تیماری شامل: تلقیح باکتریایی، میکوریزی و اثر توام باکتری و میکوریز در شرایط تنش خشکی و فراهمی رطوبت در گیاه شنبلیله. CS: گیاه بدون تلقیح در شرایط تنش، CNS: گیاه بدون تیمار در شرایط فراهمی رطوبت، PS: تیمار با باکتری سودوموناس پوتیدا در شرایط تنش، PNS: تیمار با باکتری سوموناس پوتیدا در شرایط فراهمی رطوبت، AMS: تیمار با قارچ میکوریزی *G. intradices* در شرایط تنش، AMNS: تیمار با قارچ *G. intradices* در شرایط فراهمی رطوبت، PAMS: تیمار توام گیاه با باکتری سودوموناس پوتیدا و قارچ میکوریزی *G. intradices* در شرایط تنش، PAMNS: تیمار توام گیاه با باکتری سودوموناس پوتیدا و قارچ میکوریزی *G. intradices* در شرایط فراهمی رطوبت. میانگین‌هایی که در هر ستون دارای حروف مشترک می باشند مطابق آزمون چند دامنه ای دانکن اختلاف معنی‌داری ندارند (p≤0.05).

Figure 6- Comparison of the average amount of phosphorus content in plant roots and shoots at different treatment, Including: bacterial inoculation; mycorrhizal inoculation and effect of combined association of bacteria and mycorrhiza in drought stress and non-stress conditions in fenugreek (*Trigonella foenum- graceum* L.). CS: plant with no inoculation of mycro-organisms in stress condition. CNS: plant whit no inoculation of mycro-organisms in non-stress condition. PS: treatment whit *P.putida* in drought stress condition, PNS: treatment whit *P.putida* in non-stress condition. AMS: treatment whit *G.intraradices* in drougt stress condition, AMNS: treatment whit *G.intraradices* in non-stress condotion. PAMS: combined association of *P.putida* and *G.intraradices* in drought stress conditions, PAMNS: combined association of *P.putida* and *G. intraradices* in non-stress condition. Values followed by same letters did not differ significantly from Duncan's multiple range tests (p≤0.05).

نتایج حاصل از میانگین مشاهدات نشان داد که در شرایط فراهمی رطوبت تیمار گیاه با باکتری *Pseudomonas putida* به تنهایی از بالاترین مقدار فسفر در اندام هوایی برخوردار است اما تفاوت آن با تیمار شاهد در شرایط فراهمی رطوبت معنی‌دار نیست. در شرایط تنش خشکی تیمار گیاه با قارچ میکوریزی *Glomus intraradices* از بالاترین مقدار فسفر اندام هوایی برخوردار است اما تفاوت آن با تیمار شاهد در شرایط تنش خشکی معنی‌دار نیست (شکل ۶). قارچ‌های آرباسکولار میکوریزی از لحاظ اکولوژیکی همزیست‌های مهمی برای ریشه گیاهان و از اجزای مهم اکوسیستم هستند و تاثیر به سزایی در جذب عناصر معدنی از طریق ریشه‌ها دارند (۱۸). لنین و همکاران (۱۱) در تحقیقی بر روی چهار گیاه *Lycopersicume sculentum*L.، *Capsicum annuum* L.، *Solanum melongen*a L. و *Abelmoschus esculentus* L. نشان دادند که تلقیح گیاه با قارچ میکوریزی *Glomus fasciculatum* باعث افزایش مقدار بیوماس در هر چهار گیاه مذکور شد، آن‌ها بیان کردند که افزایش بیوماس گیاه می‌تواند.

به علت افزایش جذب فسفر گیاه و رساندن مقدار آن به سطحی باشدکه باعث افزایش ارتفاع گیاه و در نتیجه افزایش بیوماس گیاه می‌شود. نتایج حاصل از آزمایش حاضر نشان داد که مقدار فسفر در گیاه در تیمارهای انجام شده افزایش یافت و بیشترین مقدار افزایش فسفر مربوط به تیمار گیاه با قارچ میکوریزی *Glomus intraradices* بود که این نتایج با نتایج حاصل از لنین و همکاران (۱۱) و ربیع و همکاران (۱۸) مطابقت دارد.

محتوای پروتئین‌های محلول برگی

نتایج حاصل از مقایسه میانگین مشاهدات نشان داد که تیمار گیاه با باکتری *Pseudomonas putida* هم در شرایط فراهمی آب و هم در شرایط تنش خشکی، از بالاترین مقدار پروتئین‌های محلول برگی برخوردار است و تفاوت آن با سایر سطوح تیماری معنی‌دار است. تیمار گیاه با قارچ میکوریز Glomus intraradices در شرایط عدم حضور باکتری هم در شرایط فراهمی رطوبت و هم در شرایط تنش خشکی باعث افزایش مقدار پروتئین‌های محلول برگی شد و تفاوت آن با سایر سطوح تیماری معنی‌دار بود. تنش خشکی باعث افزایش مقدار پروتئین‌های محلول برگی گیاه شاهد نسبت به حالت فراهمی رطوبت شد اما این افزایش از لحاظ آماری معنی‌دار نبود (شکل ۷).

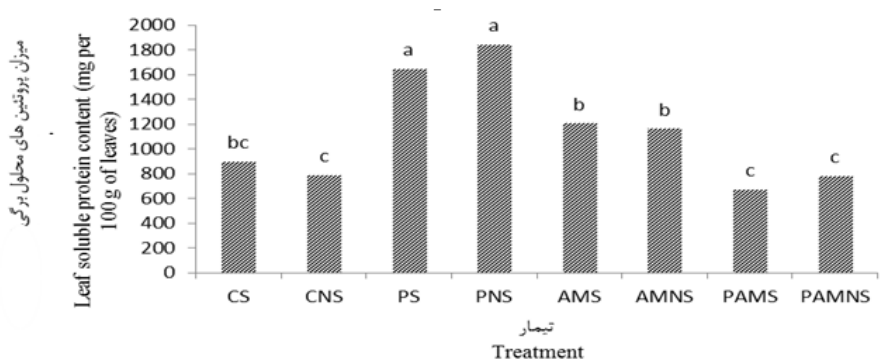
نتایج حاصل از تحقیق کنونی نشان می‌دهد که تنش خشکی باعث افزایش میزان پروتئین‌های محلول برگی نسبت به شرایط فراهمی رطوبت شد. مطابق با این نتایج، میزان پروتئین‌های محلول در برگ‌های گیاهان کتان تحت تیمارهای خشکی بیشتر از گیاهان شاهد بوده است (۱۲). در آزمایش دیگر، تنش خشکی غلظت پروتئین‌های محلول را در برگ‌های نخود افزایش داد. تنظیم تنش اسمزی شامل تجمع فعال املاح سلولی از جمله پروتئین‌های محلول در درون گیاه در پاسخ به کاهش پتانسیل آب خاک و کاهش اثرات مضر کمبود آب باشد (۱۴). افزایش در غلظت پروتئین‌های محلول تحت تنش خشکی می‌تواند به افزایش سنتز پروتئین مرتبط باشد که ممکن است به سازش و برنامه‌ریزی مجدد برای شرایط جدید و هم چنین برای حفاظت از سلول در برابر تنش مربوط باشد.

نتایج حاصل از تحقیق کنونی نشان می‌دهد که تیمار حضور توام قارچ میکوریزی و باکتری سودوموناس و هم چنین تیمار مجزای هرکدام، باعث افزایش مقدار پروتئین‌های محلول برگی گیاه می‌شود. لنین و همکاران (۱۱) در تحقیقی بر روی چهار گیاه *Lycopersicum esculentum*L.، *Capsicum annuum* L.، *Solanum melongen*a L. و *Abelmoschus esculentus* L. نشان دادند که تلقیح گیاه با قارچ میکوریزی *Glomus fasciculatum* باعث افزایش مقدار پروتئین‌های محلول برگی در هر چهار گیاه مذکور شد. افزایش پروتئین محلول برگی گیاه می‌تواند به علت وجود پروتئین‌های محلول قارچی در گیاه و یا سنتز پروتئین‌های تعدیل کننده‌ی آلودگی در گیاه میزبان باشد (۱۰).

مقدار ماده دارویی دیوزژنین

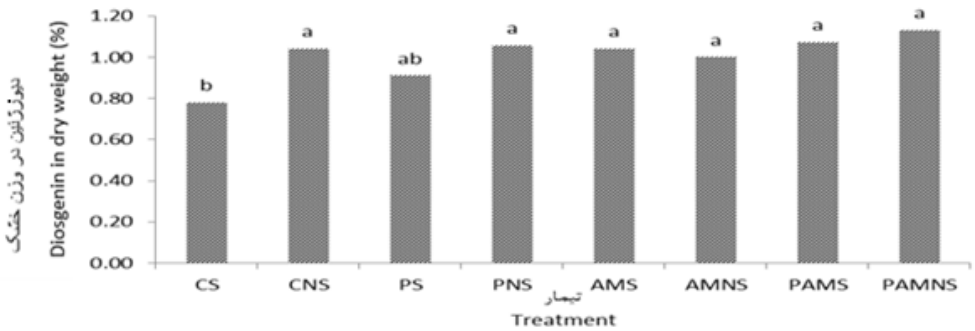
نتایج حاصل از مقایسه میانگین مشاهدات نشان داد که تیمار تنش خشکی باعث کاهش مقدار دیوزژنین شد و تیمار کاربرد توام باکتری *Pseudomonas putida* و میکوریز *Glomus intraradices* و نیز میکوریز بدون حضور باکتری در شرایط تنش خشکی به صورت معنی‌داری باعث افزایش مقدار دیوزژنین گیاه شد. در شرایط تنش خشکی تیمار گیاه با باکتری بدون حضور میکوریز باعث افزایش مقدار دیوزژنین شد اما این افزایش از لحاظ آماری معنی‌دار نبود. در شرایط فراهمی رطوبت، اگرچه تیمار گیاه با میکروارگانیسم‌های مذکور باعث افزایش مقدار دیوزژنین شد ولی این افزایش از نظر آماری معنی‌دار نبود (شکل ۸).

نتایج حاصل از تحقیق کنونی نشان داد که تیمار کاربرد توام قارچ میکوریزی و باکتری سودوموناس و هم چنین تیمار مجزای هرکدام باعث افزایش مقدار ماده دارویی دیوزژنین در گیاه شد. هماشناگام و سلواراج (۱۰) نشان دادند که برهم‌کنش گیاه *Solanum viarum* با قارچ آرباسکولار میکوریزی *Glomus saggregatum* و باکتری‌های محرک رشد *Bacillus coagulans* و *Trichoderma harzianum* باعث افزایش متابولیت‌های ثانویه از جمله ساپونین‌ها می‌شود. مطابق با این نتایج، افزایش متابولیت‌های ثانویه در برهم‌کنش قارچ میکوریزی و باکتری‌های محرک رشد، توسط سلواراج و همکاران (۲۰) گزارش شد.



شکل ۷- مقایسه میانگین مقدار پروتئین‌های محلول برگی گیاه در سطوح مختلف تیماری شامل: تلقیح باکتریایی، میکوریزی و اثر توام باکتری و میکوریز در شرایط تنش خشکی و فراهمی رطوبت در گیاه شنبلیله. CS: گیاه بدون تلقیح در شرایط تنش، CNS: گیاه بدون تیمار در شرایط فراهمی رطوبت، PS :تیمار با باکتری سودوموناس پوتیدا در شرایط تنش، PNS: تیمار با باکتری سوموناس پوتیدا در شرایط فراهمی رطوبت، AMS : تیمار با قارچ میکوریزی *G. intradices* در شرایط تنش، AMNS: تیمار با قارچ *G. intradices* در شرایط فراهمی رطوبت، PAMS: تیمار توام گیاه با باکتری سودوموناس پوتیدا و قارچ میکوریزی *G. intradices* در شرایط تنش، PAMNS: تیمار توام گیاه با باکتری سودوموناس پوتیدا و قارچ میکوریزی *G. intradices* در شرایط فراهمی رطوبت. میانگین‌هایی که در هر ستون دارای حروف مشترک می باشند مطابق آزمون چند دامنه ای دانکن اختلاف معنی‌داری ندارند (p≤0.05).

Figure 7- Comparison of the average amount of soluble proteins at different treatment, including: bacterial inoculation; mycorrhizal inoculation and effect of combined association of bacteria and mycorrhiza in drought stress and non-stress conditions in fenugreek (*Trigonella foenum- graceum* L.). CS: plant with no inoculation of mycro-organisms in stress condition. CNS: plant whit no inoculation of mycro-organisms in non-stress condition. PS: treatment whit *P.putida* in drought stress condition, PNS: treatment whit *P.putida* in non-stress condition. AMS: treatment whit *G.intraradices* in drougt stress condition, AMNS: treatment whit *G.intraradices* in non-stress condotion. PAMS: combined association of *P.putida* and *G.intraradices* in drought stress conditions, PAMNS: combined association of *P.putida* and *G. intraradices* in non-stress condition. Values followed by same letters did not differ significantly from Duncan's multiple range tests (p≤0.05).



شکل ۸- مقایسه میانگین درصد دیورژنین گیاه در سطوح مختلف تیماری شامل: تلقیح باکتریایی، میکوریزی و اثر توام باکتری و میکوریز در شرایط تنش خشکی و فراهمی رطوبت در گیاه شنبلیله. CS: گیاه بدون تلقیح در شرایط تنش، CNS: گیاه بدون تیمار در شرایط فراهمی رطوبت، PS :تیمار با باکتری سودوموناس پوتیدا در شرایط تنش، PNS: تیمار با باکتری سوموناس پوتیدا در شرایط فراهمی رطوبت، AMS : تیمار با قارچ میکوریزی *G. intradices* در شرایط تنش، AMNS: تیمار با قارچ *G. intradices* در شرایط فراهمی رطوبت، PAMS: تیمار توام گیاه با باکتری سودوموناس پوتیدا و قارچ میکوریزی *G. intradices* در شرایط تنش، PAMNS: تیمار توام گیاه با باکتری سودوموناس پوتیدا و قارچ میکوریزی *G. intradices* در شرایط فراهمی رطوبت. میانگین‌هایی که در هر ستون دارای حروف مشترک می باشند مطابق آزمون چند دامنه ای دانکن اختلاف معنی‌داری ندارند (p≤0.05).

Figure 8- Comparison of the average amount of Diosgenin % in dry weight at different treatment, Including: bacterial inoculation; mycorrhizal inoculation and effect of combined association of bacteria and mycorrhiza in drought stress and non-stress conditions in fenugreek (*Trigonella foenum- graceum* L.). CS: plant with no inoculation of mycro-organisms in stress condition. CNS: plant whit no inoculation of mycro-organisms in non-stress condition. PS: treatment whit *P.putida* in drought stress condition, PNS: treatment whit *P.putida* in non-stress condition. AMS: treatment whit *G.intraradices* in drougt stress condition, AMNS: treatment whit *G.intraradices* in non-stress condotion. PAMS: combined association of *P.putida* and *G.intraradices* in drought stress conditions, PAMNS: combined association of *P.putida* and *G. intraradices* in non-stress condition. Values followed by same letters did not differ significantly from Duncan's multiple range tests (p≤0.05).

نتیجه‌گیری کلی

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که حضور قارچ میکوریزی و باکتری سودوموناس در شرایط تنش خشکی باعث افزایش مقدار فسفر، بیوماس گیاه، پروتئین محلول برگی و مقدار ماده دارویی دیوزژنین می‌شود. احتمالاً بهبود جذب فسفر و سایر عناصر غذایی و افزایش کارایی جذب آب به دلیل تشکیل ریشه‌های انبوه و متراکم میسلیومی روی ریشه‌های گیاه و بهره‌برداری وسیع از بستر رشد و نهایتاً افزایش کارایی مصرف آب و جذب عناصر غذایی از دلایل اصلی افزایش بیومس گیاه و تولید دیوزژنین می‌باشند.

منابع

1- Acharya S.N., Thomas J.E., and Basu S.K. 2008. Fenugreek an alternative crop for semiarid region of North America, Crop science, 48: 841- 853.

2- Aroca R. 2012. Plant responses to drought stress from morphological to molecular features, Springer Heidelberg, New York Dordrecht, London.

3- Artusson V., Rojer D., and Janet Jansson K. 2006. Interaction between arbuscularmycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth, Enviromental Microbiology, 8:1-10.

4- Baccou J.C., Lambert F., Sanvaire Y. 1997. Spectrophotometric method for the determination of total steroidal sapogenin, Analyst, 102: 458-466.

5- Bashinu C., Zeev W. 2005.Variation in diosgenin level in seed kernels among different provenances of *Balanitesaegyptiaca* Del (Zygophyllaceae) and its correlation with oil content, American Journal of Botany, 4:1209-1213.

6- Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Analytical Biochemistry**,** 72:248-258.

7- Chap man H.D., Pratt P. F. 1982. Method of analysis for soil, plants and water. Chapman publisher: Riverside, CA.

8- Farooq M., Basra S.M.A., Wahid A., Ahmad N., Saleem B.A. 2009. Improving the drought tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) by exogenous application of salicylic acid, Journal of Agronomy and Crop Science, 195:237–246.

9- Hamashenpagam N., Selvaraj T. 2011. Effect of arbuscular mycorrhizal (AM) fungus and plant growth promoting rhizomicroorganisms (PGPR's) on medicinal plant Solanumviarum seedlings, Journal of Enveriromental Biology, 32-57.

10- Krishna K.R., Bagyaraj D.J. 1984. Growth and nutrient uptake of peanut inoculated with the mycorrhizalfungus *Glomus fasciculatum*. Compared with own inoculated ones, Plant Soil, 77:405-408.

11- Lenin M., Selvakumar G., Thamiziniyan P., Rajendiran R. 2010. Growth and Biochemical Changes of Vegetable Seedlings Induced by Arbuscularmycorrhizal Fungus, Journal of Environmental Studies and Sciences, 1: 27-31.

12- Li D., Li C., Sun H.,Wang W., Liu L., Zhang Y. 2010. Effect of drought on soluble protein content and projective enzyme system in cotton leaves, Frontiers of Agriculture in China, 4: 56-62.

13- Li P., Mou Y., Lu S., Sun W., Lou J., Yin C., Zhou L. 2012. Quantitative determination of diosgenin in *Dioscorea zingiberensis* cell cultures by microplate-spectrophotometry and high-performance liquid chromatography, African Journal of Pharmacy and Pharmacology, 6: 1186 – 1193.

14- Najaphy A., Niari Khamssi N., Mostafaie A., Mirzaee H. 2010. Effect of progressive water deficient stress on proline accumulation and protein profiles of leaves in chickpea, American Journal of Botany: 7033-7036.

15- Neeraj singh. K. 2011.Organic amendments to soil inoculated arbuscular mycorrhizal fungi and Pseudomonas fluorescens treatments reduce the development of root-rotdisease and enhance the yield of *Phaseolus vulgaris* L, European Journal of Soil Biology, 47: 288-295.

16- Nell M. 2009. Effect of the arbuscularmycorrhiza on biomass productionand accumulation of pharmacologically active compounds in medicinal plants. University of Natural Resources and Applied Life Sciences Vienna, Department of Applied Plant Sciences and Plant Biotechnology, Institute of Plant Protection, Vienna.

17- Paul A.K., Arundhati P. 2014. Phytosphere Microbiology and Antimiccrobial Efficacy *Trigonella Foenum-graecum* L, American Journal of Soil issue and Humanitie, 50-67.

18- Rabie G. H., Abdoul-Nasar M. B., Al-Huminary A. 2005. Increase salinity tolerance of coepea plant by dual inoculation of fungus *GlomusClarum* and nitrogen-fixer *Azospirillum brasilinse*, Mycrobiology, 33:51-61.

19- Requene N., Jimenez I., Toro M., Barea J. M.1997. Interactions between plant-growth promoting rhizobacteria (PGPR), arbuscularmycorrhizal fungi and *Rhizobium* spp. in the rhizosphere of *Anthyllis cytisoides*, a model legume for revegetation in Mediterranean semi-arid ecosystem, New Phytol,136: 667-677.

20- Selvaraj T., Rajeshkumar S., Nisha M. C., Wondimu L., and Mitiku T. 2008. Effect of Glomus mosseae and plant growth promotingrhizomicroorganisms (PGPR's) on growth, Nutrients and content ofsecondary metabolites in Begonia malabarica Lam, Maejo International Journal of science and technology, 2: 516-525.
21- Sikuku P.A., Netondo G.W., Onyang J.C., Musyimi D.M. 2010. Effect of water deficit on physiology and morphology of tree varieties of NERICA rainfed rice (*Oryza sativa* L.), ARPN journal of Agricultural and Biological Science, 5: 23-28.
22- Srinivasan K. 2006. Fenugreek (*Trigonellafoenum-graecum*): A review of health beneficial physiologica effects, Food Reviews International, 22: 203-224.
23- Uematsu Y., Hirata K., Saito K. 2000. Spectrophotometric Determination of Saponin in Yucca Extract Used as Food Additive, Journal of the Association of Official Analytical Chemists, 83: 1451-1454.
24- Zubek S., Mielcarek S., Turnau K. 2012. Hypercin and pseudohypercin concentration of a valuable medicinal plant *Hypericumperforatum*L. are enhanced by arbuscular mycorrhizal fungi, Mycorrhiza, 22: 149-156.