دوماهنامه علمی- پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ijmapr.2018.106765.1802
جلد ۳۳، شماره ۶، صفحه ۹۶۰- ۹۵۰ (۱۳۹۶)

تأثیر قارچ مایکوریزا و بسترهای مختلف کشت بر صفات کمّی و کیفی گیاه پنیرباد (*Withania coagulans* (Stocks) Dun.)

زینب محکمی[۱*]، علی میرشکار[۲]، فاطمه بیدرنامنی[۳]، زهرا غفاری مقدم[۳] و محمد فروزنده[۳]

۱*- نویسنده مسئول، مربی، پژوهشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران، پست الکترونیک: zeynabmohkami@gmail.com

۲- استادیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

۳- مربی، پژوهشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

تاریخ دریافت: تیر ۱۳۹۵ تاریخ اصلاح نهایی: آذر ۱۳۹۶ تاریخ پذیرش: آذر ۱۳۹۶

چکیده

پنیرباد (*Withania coagulans* (Stocks) Dun.) درختچه‌ای چند ساله از خانواده سولاناسه است. پیکره این گیاه دارای متابولیت‌های ثانویه از گروه لاکتون‌های استروئیدی با نام ویتانولوئیدها می‌باشد که امروزه اثرات فارماکولوژیکی قابل توجهی از آنها گزارش شده است. آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با فاکتور اصلی بستر کاشت در سه سطح (پرلیت + کوکوپیت، ماسه، خاک باغچه + کود دامی) و فاکتور فرعی قارچ مایکوریزا در چهار سطح (شاهد، *Glomus mosseae*، *G. intraradice* و کاربرد همزمان هر دو قارچ) در سه تکرار در پژوهشکده کشاورزی دانشگاه زابل واقع در چاه نیمه بقیه‌الله‌الاعظم (عج) اجرا شد. آنالیز فیتوشیمیایی عصاره به روش HPLC انجام شد. آنالیز آماری داده‌ها و ترسیم نمودارها به کمک نرم‌افزارهای SPSS و Excel انجام گردید. نتایج آزمایش حکایت از آن داشت که بستر خاک باغچه + کود دامی و کاربرد همزمان هر دو قارچ بهترین اثر را بر افزایش صفات طول ساقه، وزن تر و وزن خشک داشت. در بررسی اثر ساده بستر بر میزان متابولیت‌های ثانویه مشاهده شد که تیمار خاک باغچه + کود دامی باعث افزایش متابولیت‌های ثانویه ویتافرین آ، ویتانولید آ، گلوکوویتانولید، ویتااسترامونولید، ویتانوزید X و کوآگولین در این آزمایش شد. کاربرد همزمان هر دو قارچ نیز باعث افزایش بیشتر متابولیت‌های ثانویه (بجز ویتااسترامونولید و کوآگولین) گردید. نتایج حکایت از آن داشت که کاربرد همزمان دو گونه قارچ *G. mosseae* و *G. intraradice* در بستر خاک باغچه + کود دامی سبب افزایش صفات مورفولوژیکی و ویتانولوئیدها در گیاه دارویی پنیرباد شد.

واژه‌های کلیدی: بستر کشت، لاکتون‌های استروئیدی، مایکوریزا، ویتانولوئیدها، *Withania coagulens* (Stocks) Dun.

مقدمه

پنیرباد درختچه‌ای چندساله از خانواده سولاناسه است. این گیاه با نامهای مایه پنیر، مایه پنیر هندی، کاکنج هندی و نام لاتین Cheese-maker (Indian ennet, Vegetable rennet) شناخته شده‌است (Ghorbani Ghozhdi, 2014). پراکنش این گونه دارویی و با ارزش در ایران منحصراً محدود به رویشگاه‌های معدودی در اطراف سراوان، گشت، خاش، ایرانشهر، دامن، نیک‌شهر، قصرقند و شهرستان سرباز

در استان سیستان و بلوچستان می‌باشد (Valizadeh & Valizadeh, 2011). از خواص دارویی پنیرباد می‌توان به ضدالتهاب، کنترل تومورهای سرطانی، ضداسترس، آنتی‌اکسیدان، تقویت سیستم ایمنی، خونساز، مقوی قلب، ضدآلزایمر، ضدپارکینسون، ضدباکتری و مدر اشاره کرد (Mirjalili *et al*., 2008؛ Mohkami & Bidarnamani, 2014؛ Rahman *et al*., 2003؛ Maurya *et al*., 2010). ترکیب‌های شناسایی شده در این گیاه عبارتند از: آلکالوئیدها، فلاونوئیدها، ساپونین‌ها، فنول‌ها، گلیکوزیدها، آنتروکوئینون‌ها، تانن‌ها، قندهای احیاءکننده، ترکیب‌های ترپنوئیدی و استروئیدهای گیاهی (Viji & Parvatham, 2011). برای پاسخگویی به افزایش تقاضا برای گیاهان مورد استفاده در صنایع دارویی، تأکید در تحقیقات اخیر بر توسعه روش‌های جدید به‌منظور بهبود عملکرد و کیفیت مواد مؤثره گیاهیست. یکی از این تکنیک‌ها استفاده از قارچ‌های مایکوریزا آربوسکولار (AM) در زمان کاشت است. قارچ مایکوریزا بر برخی از جنبه‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه اثر گذاشته و موجب بهبود رشد، روابط آب در گیاه، مقاومت در مقابل تنش‌های محیطی ازجمله شوری، خشکی و فلزات سنگین، مقاومت در مقابل عوامل بیماری‌زا، افزایش جذب عناصر مخصوصاً فسفات توسط ریشه و افزایش متابولیت‌های ثانویه در گیاه می‌شوند (Sharifi, 2012؛ Smith & Read, 2008). قارچ *Glomus* به‌عنوان یکی از گونه‌های غالب در ناحیه ریزوسفر پنیرباد در هندوستان شناسایی شده‌است (Panwar & Tarafdar, 2006). در اثر تلقیح ریزنمونه‌های پنیرباد با *Agrobacterium tumefaciens* در شرایط درون شیشه‌ای کشت ریشه موئینه با دو مورفولوژی متفاوت ظاهر شد: الف) کالوس‌های ریشه‌مانند با قابلیت تولید مقادیر بالای ویتانولوئیدها ب) ریشه‌های موئینه عادی با قدرت رشد بالاتر ولی قدرت تولید مقادیر پایین‌تر ویتانولوئیدها (Mirjalili *et al*., 2008). بالاترین عملکرد اسانس زوفا از تلقیح با *G. intraradices* و *G. mosseae* طی دو سال آزمایش بدست آمد (Pirzad & Soleymani, 2014). اثر متقابل قارچ میکوریزا و امواج التراسونیک بر ارتفاع ساقه، تعداد کپسول در بوته، وزن هزاردانه، کلونیزاسیون ریشه، عملکرد بیولوژیک، شاخص برداشت، درصد اسانس و روغن دانه در گیاه سیاه‌دانه (*Nigella sativa* L.) معنی‌دار شد (Gholipour *et al*., 2013). مصرف بی‌رویه و نامتعادل کودهای شیمیایی، بدون استفاده از کودهای دامی، عوارضی مانند سفتی، شوری، عدم تعادل عناصر غذایی خاک، آلودگی و اُفت کیفی محصولات کشاورزی، ناپایداری در بخش کشاورزی و در نهایت هدر رفتن بخش عظیمی از سرمایه ملی را به‌دنبال داشته است (Zarei, 1995). افزودن ماسه و پرلیت به ترکیب‌های بستر پرورش نسبت هوا را در مخلوط گلدانی افزایش می‌دهند (Wilson & Stoffella, 2006؛ Kuepper, 2004). کوکوپیت نیز باعث نگهداشت رطوبت و تهویه در بستر می‌گردد. ظرفیت تبادل کاتیونی آن متوسط تا زیاد، اسیدیته آن ۵/۴ تا ۶/۹، نسبت کربن به نیتروژن آن متوسط است، اما به کندی می‌پوسد (Abad *et al*., 2002؛ Ghasemi Ghahsareh & Kafi, 2008). با توجه به مطالب فوق کاربرد بسترهای مختلف کشت و قارچ مایکوریزا برای بهینه‌سازی بستر کشت برای حصول حداکثر عملکرد کمّی و کیفی گیاه دارویی پنیرباد در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

کشت بذر و تلقیح با مایکوریزا

بذر گیاه پنیرباد از کلکسیون گیاهان دارویی پژوهشکده کشاورزی دانشگاه زابل واقع در چاه نیمه بقیه‌الله‌الاعظم (عج)، در پایان فصل رشد (شهریور ماه) و از میوه‌های بالغ جدا گردید و تا زمان کاشت در محیط خشک و خنک نگهداری شد. قارچ‌های مایکوریزا (*Glomus intraradices* و *G. mossae*) از شرکت تعاونی زیست‌فناور توران استان سمنان خریداری شد. بذرها قبل از کشت به‌وسیله اسید سولفوریک ۹۵٪ به مدت یک دقیقه اسکاریفه شده و بعد از آن به مدت ۲۴ ساعت در آب ولرم قرار داده شد تا بذر از هرگونه آغشته بودن به اسید سولفوریک پاک شود

(Ranjbar *et al*., 2011). بستر کشت محتوای ۳ تیمار: الف) خاک باغچه+ کود دامی کاملاً پوسیده، ب) کوکوپیت + پرلیت و ج) ماسه بادی بود. قبل از اعمال تیمارهای قارچی، مواد بکار رفته در بستر (Bidarnamani *et al*., 2010) مورد سنجش کیفی قرار گرفت (جدول‌های ۱ و ۲) و بعد در دمای ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد و فشار بخار یک اتمسفر به مدت دو ساعت استریل گردید (Gupta *et al*., 2002) و به‌مدت دو هفته با آب مقطر استریل آبیاری شد. تیمارهای قارچی آزمایش شامل: شاهد، *G. intraradices*، *G. mossae* و کاربرد همزمان هر دو قارچ به میزان ۳۰ گرم در هر گلدان بود (Zubek *et al*., 2012). سویه‌های قارچ کاملاً با محتوای خاک گلدان مخلوط شدند.

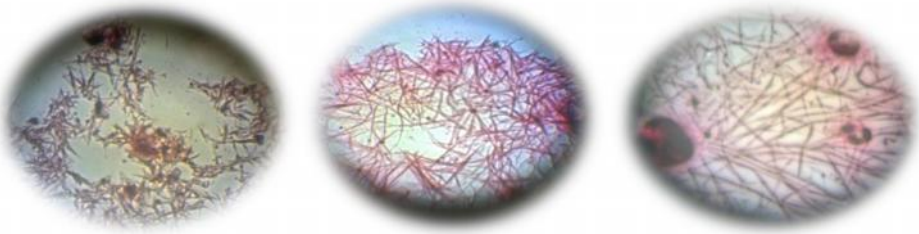
جدول ۱- نتایج آزمایش خاک باغچه مورد استفاده در آزمایش

بافت	شن	رس	سیلت	پتاسیم	فسفر	نیتروژن	pH	EC
	(٪)		(mg/kg)			(٪)		ds/m^{-1}
شنی لومی	۸۰	۹	۱۱	۶۴۹	۱۲	۰/۱۲	۷/۵۱	۴/۲۳

جدول ۲- نتایج تجزیه سایر مواد مورد استفاده در بستر

بسترهای مورد استفاده	نیتروژن (٪)	فسفر (ppm)	پتاسیم (ppm)	منیزیم (ppm)	آهن (ppm)
ماسه	۰/۰۱۹	۲۸	۲۷۵	۱۸۰	۳/۳۸
پرلیت	۰/۰۳۹	۱۱	۱۸۲	۱۴۰	۴/۴
کوکوپیت	۳/۸۴	۲۱	۹۱۷	۸۸۰	۴۲/۸۸
کود دامی پوسیده	۱/۵۷	۲۹۸	۹۲۶	۱۱۴۰	۴/۱۲

در نهایت پنج بذر در هر گلدان یک لیتری کشت گردید. گلدان‌ها در طول دوره رشد در شرایط گلخانه- دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۷۰٪ و نور معمولی- نگهداری و هفته‌ای دوبار با آب دوبار تقطیر استریل شده در اتوکلاو (۲۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد با خروج سریع بخار) آبیاری شدند. چهار ماه پس از کاشت، گیاهان برای اندازه‌گیری پارامترهای آزمایش به‌طور کامل از بستر خارج شدند. ریشه پنیرباد برای ارزیابی اثر همزیستی با مایکوریزا به قطعات یک سانتی‌متری تقسیم شد و بعد طبق پروتکل رنگ‌آمیزی و زیر میکروسکوپ مشاهده گردید (شکل ۱) (Zubek *et al*., 2010).



شکل ۱- تصاویر ریشه همزیست شده با قارچ مایکوریزا

به‌ترتیب از راست به چپ *G. mossae*، *G. intraradics* و همزیستی با هر دو گونه قارچ

روش عصاره‌گیری برای سنجش میزان ترکیب‌های مؤثره به کمک HPLC

کل پیکره رویشی گیاه (برگ، ساقه و ریشه) پس از برداشت و ارزیابی صفات مورفولوژیکی، شستشو، خشک و آسیاب شده و در نهایت ۰/۲ گرم بافت خشک گیاه برای تهیه عصاره اتانولی مورد استفاده قرار گرفت (Abuzid *et al*., 2010). عصاره اتانولی پس از آماده‌سازی به دستگاه HPLC تزریق شد (Rekhas *et al*., 2006).

مشخصات دستگاه HPLC مورد استفاده

به‌منظور شناسایی متابولیت‌های ثانویه از دستگاه HPLC (Manwar *et al*., 2012) مدل Unicam-Crystal-Zoe ساخت انگلستان با سیستم فاز معکوس دارای ستون Lichrocart-C 18 به طول ۲۵ سانتی‌متر، قطر داخلی ۴/۵ سانتی‌متر و قطر ذرات ۵ میکرومتر استفاده شد. مقدار ۲۰ میکرولیتر از عصاره استخراجی به این ستون تزریق شد. فاز متحرک شامل: استونیتریل ۴۰٪، اسید استیک ۱٪ و آب مقطر ۵۹٪ بود که دارای سرعت چرخش یک میلی‌لیتر بر دقیقه است. دتکتور این سیستم از نوع آرایه دیودی بوده و نوع و مقدار هر ماده براساس زمان بازداری پیک خروجی و سطح زیر منحنی آن با استفاده از نمونه‌های استاندارد مشخص گردید.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها ازجمله تجزیه واریانس و مقایسات میانگین بر درک بهتر روابط بین صفات و تأثیر فاکتور آزمایش بر صفات به کمک SPSS انجام شد. تمامی نمودارها توسط نرم‌افزار Excel ترسیم شدند.

نتایج

نتایج تجزیه‌وتحلیل داده‌ها نشان داد که تیمارهای مختلف بستر، قارچ مایکوریزا و اثرات متقابل آنها اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ بر صفات کمّی و کیفی گیاه دارویی پنیرباد داشته است (جدول ۳).

جدول ۳- تجزیه واریانس صفات کمّی و کیفی پنیرباد در تیمارهای آزمایش

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات						
		طول ساقه	طول ریشه	وزن تر	وزن خشک	ویتافرین آ	ویتانولید آ	ویتااسترامونولید
بستر (A)	۲	۲۷/۲۴**	۲۳/۰۱**	۴۵۹/۷۰**	۶۳/۸۳**	۱۱۸۹/۱۴**	۵۲۰۴۰/۲**	۰/۱۹۶**
قارچ مایکوریزا (B)	۳	۲۵/۳۷**	۵۲/۱۷**	۲۸۷/۸۱**	۱۸/۰۵**	۶۱/۳۴**	۸۵۴/۸۵**	۰/۱۷۲**
اثر متقابل (A × B)	۶	۲/۴۴**	۱۲/۰۲**	۲۵/۴۲**	۱/۳۴*	۲۹/۱۱**	۴۳۴/۵۳**	۰/۰۵۰۹**
خطای آزمایش	۲۴	۰/۲۰۸	۰/۵۱	۱/۲۴	۰/۷۲۷	۰/۰۲۰	۰/۰۱۰۳	۰/۰۰۰۴
ضریب تغییرات (٪)	-	۳/۲۰۴	۵/۳۸۱	۳/۰۹۴	۶/۸۸	۱/۴۸	۲/۰۳۴	۳/۳۲

**، * و ns: معنی‌داری در سطح ۵٪، ۱٪ و عدم معنی‌داری

ادامه جدول ۳-

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات						
		ویتانوزید VIII	ویتانوزید X	گلوکوویتانولوید	ویتانوزید	کوآگولین	ویتانون
بستر (A)	۲	۵/۶۱**	۱۸/۵۶**	۱۲۱/۳۹**	۰/۱۰۰۸**	۰/۴۱۴**	۰/۳۴۴ns
قارچ مایکوریزا (B)	۳	۴/۱۸**	۲/۵۸**	۴/۶۱**	۰/۱۱۱**	۰/۰۳۷*	۰/۱۷۴ns
اثر متقابل (A × B)	۶	۱/۰۱۱**	۰/۷۲**	۰/۱۷**	۰/۰۴۶**	۰/۵۹**	۰/۱۷۳ns
خطای آزمایش	۲۴	۰/۰۰۷	۰/۰۰۳۷	۰/۱۰۳	۰/۰۰۰۷	۰/۰۰۳۷	۰/۱۵۶
ضریب تغییرات(٪)	-	۲/۴۷	۲/۳۵	۲/۴۱	۵/۸۸	۴/۳۸	۵۶/۷۰

**، * و ns: معنی‌داری در سطح ۵٪، ۱٪ و عدم معنی‌داری

تأثیر تیمارها بر شاخص‌های رشدی

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که کاربرد بسترهای مختلف کاشت اثر معنی‌داری بر شاخص‌های مورفولوژیکی مانند طول ساقه، وزن تر و وزن خشک ($P\leq0.05$) داشته است. به‌طوری که بیشترین طول ساقه (۱۷/۹ سانتی‌متر)، وزن تر (۵۰ گرم) و وزن خشک (۱۸/۵ گرم) در تیمار خاک باغچه + کود دامی و کاربرد همزمان قارچ‌های *G. intraradices* و *G. mosseae* مشاهده شد (جدول ۴). در حالی‌که بیشترین طول ریشه (۱۸/۶۴ سانتی‌متر) در تیمار خاک پرلیت + کوکوپیت و کاربرد قارچ *intraradices* مشاهده گردید (جدول ۴).

جدول ۴- تأثیر بسترهای مختلف کشت و قارچ مایکوریزا بر صفات مورفولوژیک پنیرباد

پارامتر	تیمار بستر	C	G.I,M	G.M	G.I
طول ساقه (سانتی‌متر)	خاک باغچه + کود دامی	۱۴/۲d	۱۷/۹a	۱۵/۳c	۱۶/۲b
	ماسه	۱۲/۸f	۱۶/۱b	۱۳/۹e	۱۴/۳d
	پرلیت + کوکوپیت	۱۰/۵۳g	۱۵/۹۶b	۱۰/۷۳g	۱۳/۷۶e
وزن تر (گرم)	خاک باغچه + کود دامی	۳۲/۹h	۵۰a	۴۳/۸c	۴۶/۴b
	ماسه	۳۰/۵i	۴۰/۸d	۳۰/۵i	۳۴g
	پرلیت + کوکوپیت	۲۲/۳j	۳۶/۲c	۳۰/۲i	۳۵/۸f
وزن خشک (گرم)	خاک باغچه + کوددامی	۱۳/۲c	۱۸/۵a	۱۳/۸j	۱۵/۵b
	ماسه	۹/۸h	۱۳/۱c	۱۰/۸g	۱۱/۷e
	پرلیت+کوکوپیت	۸/۷i	۱۱/۲۴f	۱۰/۹۶fg	۱۲/۲۴d
طول ریشه (سانتی‌متر)	خاک باغچه + کوددامی	۱۰/۵۷g	۱۵/۶c	۱۱/۴f	۱۲/۱e
	ماسه	۹/۲۱i	۱۱/۹e	۱۴/۱d	۱۶/۴b
	پرلیت + کوکوپیت	۱۰/۱۸h	۱۳/۴۸d	۱۶/۶b	۱۸/۶۴a

C: Control G.I, M: *G. intraradices* + *G. mosseae* G.M: *G. mosseae* G.I: *G. intraradices*

تأثیر تیمارها بر متابولیت‌های ثانویه

تأثیر استفاده از دو گونه قارچ مایکوریزا و اثر متقابل آنها با بستر کاشت در مقایسه با شاهد، اثر معنی‌داری بر میزان متابولیت‌های ثانویه در گیاه پنیرباد داشته است. به‌طوری که بیشترین میزان آلکالوئیدهای ویتافرین آ (۲۹/۴µg/g D.W)، ویتانولوئید آ (۱۵/۱µg/g D.W)، گلوکوویتانولید (۸/۸۳µg/g D.W) و ویتااسترامونولید (۰/۹۶µg/g D.W) در بستر باغچه + کود دامی و کاربرد همزمان هر دو قارچ مایکوریزا تولید شده است (جدول ۵).

بیشترین میزان ویتانوزید VIII (۵/۲۱۲µg/g D.W) در بستر پرلیت + کوکوپیت و کاربرد همزمان هر دو قارچ مایکوریزا مشاهده گردید. بیشترین میزان متابولیت ویتانوزید X (۴/۳۶µg/g D.W) در بستر خاک باغچه + کود دامی و قارچ *G. mosseae* مشاهده شد. بیشترین میزان متابولیت کوآگولین در بستر خاک باغچه + کود دامی (۱/۷۱µg/g D.W) و متابولیت ویتانون در بستر خاک پرلیت + کوکوپیت (۱/۴۲µg/g D.W) در تلقیح با قارچ *G. intraradice* وجود داشته است که با نتایج Ceccarelli و همکاران (۲۰۱۰) در تجمع توتال فنول در برگ‌های آرتیشوی خاردار (*Cynara cardunculus*) مطابقت داشت (جدول ۶).

جدول ۵- تأثیر بسترهای مختلف کشت و قارچ مایکوریزا بر متابولیت‌های ثانویه پنیرباد (ویتافرین آ، ویتانولوئید آ، گلوکوویتانولید و ویتااسترامونولید)

پارامتر	تیمار بستر	C	G.I,M	G.M	G.I
ویتافرین آ (µg/g D.W)	خاک باغچه + کوددامی	۱۵/۵d	۲۹/۴a	۲۱/۸b	۱۷/۵c
	ماسه	۳i	۴/۳۵g	۳/۸۳h	۳/۱۶i
	پرلیت + کوکوپیت	۲/۲۶j	۵/۱e	۴/۶۸f	۴/۱۲g
ویتانولوئید آ (µg/g D.W)	خاک باغچه + کوددامی	۱۱/۳c	۱۵/۱a	۱۰/۰۹d	۱۴/۳۲b
	ماسه	۱/۰۲g	۱/۶۹e	۱/۱۲g	۱/۴۶f
	پرلیت + کوکوپیت	۰/۵۶i	۱/۳f	۰/۸۱h	۱/۰۹g
گلوکوویتانولید (µg/g D.W)	خاک باغچه + کوددامی	۶/۵۶d	۸/۸۳a	۸/۱b	۷/۷۶c
	ماسه	۲/۴h	۳/۶۶e	۳/۱۷f	۲/۸۶g
	پرلیت+کوکوپیت	۰/۸۲k	۲/۴h	۲/۱۳i	۱/۸۲j
ویتااسترامونولید (µg/g D.W)	خاک باغچه+کوددامی	۰/۵۳de	۰/۹۶a	۰/۸۸ab	۰/۶cde
	ماسه	۰/۴۲ef	۰/۴۳ef	۰/۶۲cd	۰/۵de
	پرلیت+کوکوپیت	۰/۳۱f	۰/۵۳de	۰/۷۶bc	۰/۶۸cd

جدول ۶- تأثیر بسترهای مختلف کشت و قارچ مایکوریزا بر متابولیت‌های ثانویه پنیرباد (ویتانوزید VIII، ویتانوزید X، کوآگولین، ویتانون و ویتانوزید)

پارامتر	تیمار بستر	C	G.I,M	G.M	G.I
ویتانوزید VIII (µg/g D.W)	خاک باغچه + کوددامی	۳/۱f	۴/۱۴c	۳/۳۷e	۳/۶d
	ماسه	۲/۱۱i	۲/۹۴g	۲/۶۶h	۲/۸۲g
	پرلیت + کوکوپیت	۲/۱۱i	۵/۱۲a	۴/۶۳b	۴/۰۲c
ویتانوزید X (µg/g D.W)	خاک باغچه + کوددامی	۳/۲۴e	۴/۰۷b	۴/۳۶a	۳/۶۹c
	ماسه	۱/۰۵j	۱/۸۸g	۱j	۱/۴۸h
	پرلیت + کوکوپیت	۱/۳۱i	۳/۴۶d	۲/۳f	۳/۱۸e
کوآگولین (µg/g D.W)	خاک باغچه + کوددامی	۱/۵bc	۱/۴cd	۱/۵۳b	۱/۷۱a
	ماسه	۱/۰۱g	۱/۳۱de	۱/۱۶f	۱/۲۳ef
	پرلیت + کوکوپیت	۱/۶۱ab	۱/۲۹de	۱/۳۸d	۱/۵bc
ویتانون (µg/g D.W)	خاک باغچه + کوددامی	۰/۶۵b	۰/۸۱ab	۰/۴۸b	۰/۷ab
	ماسه	۰/۴۳b	۰/۴۸b	۰/۷ab	۰/۵۹b
	پرلیت + کوکوپیت	۰/۷۵ab	۰/۵۵b	۰/۸۱ab	۱/۴۲a
ویتانوزید (µg/g D.W)	خاک باغچه + کوددامی	۰/۳۸fg	۰/۵۱d	۰/۳۳gh	۰/۴ef
	ماسه	۰/۳h	۰/۴۴e	۰/۵۹c	۰/۴۲ef
	پرلیت + کوکوپیت	۰/۳۷fg	۰/۸a	۰/۷۳b	۰/۴۱ef

بحث

ترکیب بستر کشت می‌تواند پارامترهای رشدی پنیرباد را تحت تأثیر قرار دهد. نتایج این تحقیق نشان داد که بالاترین مقادیر مربوط به صفات مورفولوژیک (به‌استثنای طول ریشه) در تیمار خاک باغچه + کود دامی وجود داشت. علت این امر به‌دلیل بالاتر بودن ترکیب‌های مغذی موجود در این بستر است، مخصوصاً عنصر ازت که نقش بسزایی در افزایش تولید بیومس گیاه دارد. البته طول ریشه در بستر پرلیت + کوکوپیت بیشتر از سایر بسترها بود که به‌دلیل تخلخل درشت (macro pore) بیشتر در این بستر نسبت به دو بستر دیگر بوده است که با نتایج تحقیق انجام شده روی گیاه دارویی عروسک پشت پرده مطابقت داشت (Mohamadi *et al*., 2014).

تلقیح با مایکوریزا می‌تواند تغییرات کمّی و کیفی خاصی را در گیاهان دارویی القاء کند. مطالعات متعددی به تأثیر مایکوریزا بر صفات مورفولوژیکی گیاهان دارویی مانند ارتفاع ساقه، تعداد کپسول در بوته، عملکرد دانه، وزن هزاردانه، کلونیزاسیون ریشه، عملکرد بیولوژیک، وزن خشک ریشه، شاخص برداشت (Gholipour *et al*., 2013؛ Asghari *et al*., 2012)، تعداد کرک‌های ترشحی سطح برگ و تعداد انشعابات ریشه و نسبت ریشه به ساقه (Copetta *et al*. 2006؛ Berta *et al*., 2002) اشاره داشته است. تحقیقات نشان داده که استفاده از قارچ‌های مایکوریزا سرعت رشد گیاه را افزایش داده و بر تخصیص بیوماس بین ریشه و ساقه و نسبت آنها و همچنین طول ریشه اثر می‌گذارد (Fan *et al*., 2011)، به‌طوری که با جذب بیشتر عناصر غذایی و انتقال آنها، وزن خشک اندام‌های هوایی افزایش می‌یابد. همچنین مایکوریزا قادر است تغییراتی در غلظت عناصر معدنی مانند فسفر (Copetta *et al*., 2006؛ Torelli *et al*., 2000) و ازت (Pirzad & Soleymani, 2014)، هورمون‌های گیاهی مانند اکسین، سیتوکنین و جیبرلین‌ها (Torelli *et al*., 2000)، رنگیزه‌های فتوسنتزی (Asghari *et al*., 2012) و متابولیت‌های ثانویه مانند درصد اسانس و روغن دانه (Gholipour *et al*., 2013)، آلکالوئیدها (Abu-Zeyad *et al*., 1999؛ Rojas-Andrade *et al*., 2003)، ترپنوئیدها (Akiyama & Hayashi, 2002؛ Kapoor *et al*., 2002a,b؛ Kapoor *et al*., 2007؛ Copetta *et al*., 2006؛ Jurkiewicz *et al*., 2010)، کاروتنوئیدها (Fester *et al*., 2002)، فلاونوئیدها (Larose *et al*., 2002) و اسیدهای فنولی (Toussaint *et al*., 2007, 2008؛ Ceccarelli *et al*., 2010) القاء کند. سازوکار تغییرات ناشی از تلقیح گیاه با مایکوریزا در غلظت فیتوشیمیایی ترکیب‌های مؤثره موجود در پیکره گیاه (رویشی/ زایشی) چندجانبه است. اصلاح غلظت ترکیب‌هایی مانند فلاونوئیدها و آلکالوئیدها در گیاه ممکن است نتیجه‌ای از سازوکارهای سیگنالی بین گیاه میزبان و قارچ باشد (Larose *et al*., 2002؛ Rojas-Andrade *et al*., 2003) و در نتیجه پاسخ گیاه به کلونیزیسیون قارچ مایکوریزا حاصل شود. به‌عبارت دیگر، می‌توان بیان کرد که گیاهان سنتز متابولیت‌های ثانویه را به‌عنوان یک واکنش دفاعی به حضور AMF افزایش می‌دهند (Copetta *et al*., 2006). از طرفی افزایش سنتز متابولیت‌های ثانویه در گیاهان تلقیح شده با مایکوریزا، ممکن است درنتیجه تغذیه بهتر فسفر و یا نیتروژن (Kapoor *et al*., 2002a,b؛ Toussaint *et al*., 2007) و تغییرات سطوح هورمونی میزبان در اثر همزیستی با قارچ AMF باشد (Copetta *et al*., 2006؛ Kapoor *et al*., 2007؛ Toussaint *et al*., 2007). همانطور که در نتایج مشاهده گردید، گونه‌های مختلف قارچ‌های ویزیکولار آرباسکولار تغییرات مختلفی در تولید ترکیب‌های متفاوت متابولیت‌های ثانویه القاء می‌کنند که با نتایج Copetta و همکاران (۲۰۰۶) مطابقت داشت. کاربرد همزمان قارچ‌های مایکوریزا در تجمع ویتانولوئیدهای ویتافرین آ، ویتانولوئید آ، گلوکوویتانولید، ویتااسترامونولید و ویتانوزیدVIII بهتر از کاربرد آنها به تنهایی بوده است که ممکن است در اثر روابط متقابل قارچ‌های مایکوریزا باشد و با نتایج Zubek و همکاران (۲۰۱۲) در تجمع هایپرسین در گل راعی مطابقت دارد.

به‌عنوان نتیجه‌گیری کلی باید بیان کرد که نتایج این آزمایش حکایت از اثرات شگرف بستر کشت و همزیستی با قارچ‌های مایکوریزا بر پارامترهای مورفولوژیک گیاه دارویی پنیرباد داشته است؛ به‌طوری که بیشترین طول ساقه، وزن تر و وزن خشک در تیمار خاک باغچه + کود دامی و کاربرد همزمان قارچ‌های *G. intraradices* و *G. mosseae* مشاهده شد. در حالی‌که بیشترین طول ریشه در تیمار خاک پرلیت + کوکوپیت و کاربرد قارچ *intraradices* مشاهده گردید. افزون‌براین میزان آلکالوئیدها در گیاه پنیرباد هم تحت تأثیر تیمارهای مختلف نوع بستر کشت و قارچ میکوریزا قرار گرفت؛ بدین‌ترتیب که بیشترین میزان ویتانوزید VIII در بستر پرلیت + کوکوپیت و کاربرد همزمان هر دو قارچ مایکوریزا مشاهده گردید. به‌نحوی که بیشترین میزان متابولیت ویتانوزید X در بستر خاک باغچه + کود دامی و قارچ *G. mosseae* مشاهده شد و بیشترین میزان متابولیت کوآگولین در بستر خاک باغچه + کود دامی و متابولیت ویتانون در بستر خاک پرلیت + کوکوپیت در تلقیح با قارچ *G. intraradice* وجود داشته است. با توجه به نتایج این تحقیق و سایر شواهد، به نظر می‌رسد دستکاری جوامع ریزوسفر با کاربرد قارچ‌های مایکوریزا یا سایر کودهای زیستی و بهینه‌سازی بستر کشت ممکن است در پیشبرد اهداف توسعه کشاورزی پایدار و تولید مواد مؤثره بیشتر از گیاه دارویی مؤثر باشد.

سپاسگزاری

این مقاله مستخرج از طرح پژوهشی با عنوان "بررسی اثر همزیستی قارچ ویزیکولار آرباسکولار بر خصوصیات مورفولوژیک و فیتوشیمیایی گیاه دارویی پنیرباد (*Withania somnifera*)" و کد ۹۲۰۱۰۰۴ بوده که با دریافت گرنت پژوهشی از معاونت پژوهشی دانشگاه زابل در پژوهشکده کشاورزی اجرا شده است.

منابع مورد استفاده

- Abad, M., Noguera, P., Puchades, R., Maquieira, A. and Noguera, V., 2002. Physico-chemical and chemical properties of some coconut dusts for use as a peat substitute for containerized ornamental plants. Bioresource Technology, 82: 241-245.
- Abu-Zeyad, R., Khan, A.G. and Khoo, C., 1999. Occurrence of arbuscular mycorrhiza in *Castanospermum australe* A. Cunn. & C. Fraser and effects on growth and production of castanospermine. Mycorrhiza, 9: 111-117.
- Abuzid, S.F., EL-Bassouny, A.A. and Nasib, A., 2010. Withaferin A production by root culture of *Withania coagulants*. International Journal of Applied Research in Nature Products, 3: 23-27.
- Akiyama, K. and Hayashi, H., 2002. Arbuscular mycorrhizal fungus-promoted accumulation of two new triterpenoids in cucumber roots. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 66(4): 762-769.
- Asghari, H.R., Ameriyan, M.R., Bahadori, F., Rahimi, M. and Golshan, M. 2012. Effect of Mycprrhizal and Humic acid on some qualitive and quantitive traits of *Satureja hortensis* in different levels of Urea. Master's Thesis, Agriculture Faculity, Technological University of Shahrood, Shahrood.
- Berta, G., Fusconi, A. and Hooker, J., 2002. Arbuscular mycorrhiza modifications to plant root systems: scale, mechanisms and consequences: 71-86. In: Gianinazzi, S., Schüepp, H., Barea, J.M. and Haselwandter, K., (Eds.). Mycorrhizal Technology in Agriculture. Birkhäuser, Basel, 296p.
- Bidarnamani, F., 2010. An investigation into various pot mixture effects on morphological characteristics of *Pothos* and *Benjamina ficus*. Master's Thesis, Plant Production Faculity, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan.
- Ceccarelli, N., Curadi, M., Martelloni, L., Sbrana, C., Picciarelli, P. and Giovannetti, M., 2010. Mycorrhizal colonization impacts on phenolic content and antioxidant properties of artichoke leaves and flower heads two years after field transplant. Plant Soil, 335: 311-323.
- Copetta, A., Lingua, G. and Berta, G., 2006. Effects of three AM fungi on growth, distribution of glandular hairs, and essential oil production in *Ocimum basilicum* L. var. *Genovese*. Mycorrhiza, 16: 485-494.
- Fan, L., Dalpé, Y., Fang, Ch., Dubé, C. and Khanizadeh, Sh. 2011. Influence of arbuscular mycorrhizae on biomass and root morphology of

in roots of *Medicago sativa* are modulated by the developmental stage of the symbiosis and the root colonizing arbuscular mycorrhizal fungus. Journal of Plant Physiology, 159: 1329-1339.
- Manwar, J.V., Mahdik, K.R. and Paradakar, A.R., 2012. Determination of withanolides from the rootes and herbal formulation of *Withania somnifera* by HPLC using DAD and ELSD detector. Der Pharmacia sSinia, 3(1): 41-46.
- Maurya, R., Akanksha, A. and Jayendra, M., 2010. Chemistry and pharmacology of *Withania coagulans*: an Ayurvedic remedy. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 62: 153-160.
- Mirjalili, H., Fakhr Tabatabaei, S.M., Alizadeh, H., Ghasempour, H.R. and Palazon, Kh., 2008. Evaluation the medicinal spices of *Withania* spp. and optimization of capillary root culture for Withanoloeides production. Ph.D. Thesis, Agricultural faculty, Tehran University, Tehran.
- Mohamadi, H., Tabrizi, L. and Salehi, R., 2014. The effect of different ratios of vermicompost in substrates on the growth of *Physalis peruviana* L. seedlings. Iranian Horticultural Science, 45(4): 383-390.
- Mohkami, Z. and Bidarnamani F., 2014. Evolution of antimicrobial activity of *Withania somnifera* aqueous extract against human pathogens. Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences, 4(S4): 2969-2973.
- Panwar, J. and Tarafdar, J.C., 2006. Distribution of three endangered medicinal plant species and their colonization with arbuscular mycorrhizal fungi. Journal of Arid Environments, 5: 350-337.
- Pirzad, A. and Soleymani, F., 2014. The effect of mycorrhizal fungi symbiotic echophysiological and biochemical indices of *Hyssopus officinalis* under water scarcity conditions. Ph.D. Thesis, Agricultural faculty, Orumia University, Orumia.
- Rahman, A., Shahwar, D., Naz, A. and Choudhary, M.I., 2003. Withanolides form *Withania coagulans*. Phytochemistry, 63(4): 387-390.
- Ranjbar, F., Riyahinia, Sh., Komayestani, N. and Valizadeh, M., 2011. Effect of different sulfuric acid treatments on Ashwiganda plantlet germination and growth. 2th National Seed Technology Conferance, Mashhad, Iran, 26-27 October.
- Rekhas, D., Vijeshwar, V. and Krishan, T., 2006. Phytochemical and genetic analysis in selected chemotypes of *Withania somnifera*. Phytochemistry, 67: 2269-2276.
- Rojas-Andrade, R., Cerda-García-Rojas, C.M., Frías-Hernández, J.T., Dendooven, L., Olalde-Portugal, V. and Ramos-Valdivia, A.C., 2003. Changes in the selected strawberry cultivars under salt stress. Botany, 89 (6): 397-403.
- Fester, T., Schmidt, D., Lohse, S., Walter, M.H., Giuliano, G., Bramley, P.M., Fraser, P.D., Hause, B. and Strack, D., 2002. Stimulation of carotenoid metabolism in arbuscular mycorrhizal roots. Planta, 216(1): 148-154.
- Ghasemi Ghahsareh, M. and Kafi, M., 2008. Scientific and Practical Floriculture (Vol. II). Tehran, 420p. (In Persian)
- Gholipour, M., Aryani Mohammadiyeh, H., Gholami, A. and Karimi Fard, Sh., 2013. The interaction of mycorrhiza and ultrasonic waves on growth and yield of *Nigella sativa* L. Master's Thesis, Agricultural Faculty, University of Shahroud, Shahroud.
- Ghorbani Ghozhdi, H., 2014. An Introduction to the Basics of Herbs, Spices and Aromatic Plants. University of Shahroud Publication, 512p.
- Gupta, M.L., Prasad, A. Ram, M. and Kumar, S., 2002. Effect of the vesicular-arbuscular mycorrhizal (VAM) fungus *Glomus fasciculatum* on the essential oil yield related characters and nutrient acquisition in the crops of different cultivars of menthol mint (*Mentha arvensis*) under field conditions. Bioresource Technology, 81: 77-79.
- Jurkiewicz, A., Ryszka, P., Anielska, T., Waligórski, P., Białońska, D., Góralska, K., Tsimilli-Michael, M. and Turnau, K., 2010. Optimization of culture conditions of *Arnica montana* L.: effects of mycorrhizal fungi and competing plants. Mycorrhiza, 20: 293-306.
- Kapoor, R., Giri, B. and Mukerji, K.G., 2002a. *Glomus macrocarpum*: a potential bioinoculant to improve essential oil quality and concentration in Dill (*Anethum graveolens* L.) and Carum (*Trachyspermum ammi* (Linn.) Sprague). World Journal of Microbiology and Biotechnology, 18: 459-463.
- Kapoor, R., Giri, B. and Mukerji, K.G., 2002b. Mycorrhization of coriander (*Coriandrum sativum* L.) to enhance the concentration and quality of essential oil. Journal of the Science of Food and Agriculture, 82: 339-342.
- Kapoor, R., Chaudhary, V. and Bhatnagar, A.K., 2007. Effects of arbuscular mycorrhiza and phosphorus application on artemisinin concentration in *Artemisia annua* L. Mycorrhiza, 17: 581-587.
- Kuepper, G., 2004. Potting Mixes for Certified Organic Production. National Sustainable Agriculture Information Service, 24p.
- Larose, G., Chênevert, R., Moutoglis, P., Gagné, S., Piché, Y. and Vierheilig, H., 2002. Flavonoid levels

irrespective of phosphorus nutrition. Mycorrhiza, 17(4): 291-297.
- Valizadeh, J. and Valizadeh, M., 2011. Development of efficient micropropagation protocol for *Withania coagulans* (Stocks) Dunal. African Journal of Biotechnology, 10(39): 7611-7616.
- Viji, M.O. and Parvatham, R., 2011. In vitro culture studies on *Withania somnifera* (L.) Poshita variety. Journal of Tropical medicinal plants, 21(1): 49-52.
- Wilson, S.B. and Stoffella, P.J., 2006. Using compost for container production of ornamental wetland and flatwood species native to Florida. Native Plants Journal, 7(3): 293-300.
- Zarei, H., 1995. Determine the accumulation of nitrates in lettuce and spinach associated with excessive use of nitrogen fertilizers. Master's Thesis, Agricultural Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran.
- Zubek, S., Stojakowska, A., Anielska, T. and Turnau, K., 2010. Arbuscular mycorrhizal fungi alter thymol derivative contents of *Inula ensifolia* L. Mycorrhiza, 20(7): 497-504.
- Zubek, S., Mielcarek S. and Turnau, K., 2012. Hypericin and pseudohypericin concentrations of a valuable medicinal plant *Hypericum perforatum* L. are enhanced by arbuscular mycorrhizal fungi. Mycorrhiza, 22(2): 149-156.

concentration of trigonelline in a semi-arid leguminous plant (*Prosopis laevigata*) induced by an arbuscular mycorrhizal fungus during the presymbiotic phase. Mycorrhiza, 13(1): 49-52.
- Sharifi, M., 2012. The role and importance of mycorrhizae in the absorption and stabilizing of phosphate and the possibility of mycorrhiza biotechnology in phosphate uptake by plants. Research Projects, Biology Group, Faculty of Sciences, Tehran University, Tehran.
- Smith, S.E. and Read, D.J., 2008. Mycorrhizal Symbiosis. Academic, London, 787p.
- Torelli, A., Trotta, A., Acerbi, L., Arcidiacono, G., Berta, G. and Branca, C., 2000. IAA and ZR content in leek (*Allium porrum* L.) as influenced Pnutriation and arbascular mycorrhizae, in relation to plant development. Plant soil, 226: 29-35.
- Toussaint, J.P., Kraml, M., Nell, M., Smith, F.A., Smith, S.E., Steinkellner, S., Schmiderer, C., Vierheilig, H. and Novak, J. 2008. Effect of *Glomus mosseae* on concentration of rosmarinic and caffeic acids and essential oil compounds in basil inoculated with *Fusarium oxysporum* F. sp. *basilica*. Plant Pathology, 57: 1109-1116.
- Toussaint, J.P., Smith, F.A. and Smith, S.E., 2007. Arbuscular mycorrhizal fungi can induce the production of phytochemicals in sweet basil

Effect of mycorrhiza fungi and different substrates on quantitative and qualitative characteristics of *Withania coagolense* (Stocks) Dun.

Z. Mohkami[1*], A. Mirshekar[2], F. Bidarnamani[3], Z. Ghafari Moghadam[3] and M. Forouzandeh[3]

1*- Corresponding author, Agricultural Research Institute, University of Zabol, Zabol, Iran
E-mail: zeynabmohkami@gmail.com
2- Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran
3- Agricultural Research Institute, University of Zabol, Zabol, Iran

Received: July 2016 Revised: December 2017 Accepted: December 2017

Abstract

Withania *coagolense* (Stocks) Dun. is a perennial shrub, belonging to the Solanaceae family. The study species is rich in a group of valuable compounds as steroidal lactones called withanolides. Nowadays, significant pharmacological properties of withanolides have been reported. The effects of mycorrhizal fungi symbiosis and substrate were studied on withania in the greenhouse of Agricultural Institute at the University of Zabol. The study was conducted in a factorial experiment based on a completely randomized design. The main plot was substrate (cocopit + perlit, garden soil+ manure, sand) and the subplot consisted of mycorrhizal fungi (control, *Glomus intraradice*, *G. mosseae*, simultaneous use of both fungi). Phytochemical analysis of the extract was performed by HPLC. Statistical analysis was done using Excel and SPSS software. The results indicated that the garden soil+ manure and simultaneous use of both fungi had the best effect on increased shoot length and fresh and dry weight. According to the results, the garden soil+ manure resulted in increased production of secondary metabolites. The simultaneous use of both fungi resulted in higher production of secondary metabolites (except withastramonolid and coagolin). Our results clearly showed that the simultaneous use of both fungi in garden soil+ manure resulted in increased morphological traits and withastramonolid in the study specie.

Keywords: Substrate, steroid lactones, mycorrhizal fungi, *Withania coagolense* (Stocks) Dun., withanolides.