

مقاله پژوهشی

تأثیر قارچ اندوفیت *Piriformospora indica* بر رشد و درصد اسانس گیاه آنیسون (*Pimpinella anisum* L.) تحت شرایط کم‌آبی

سولماز عبدالمهی^۱، ناصر علی اصغرزاد^۲، سعید زهتاب سلماسی^۳ و بهمن خوشرو^{۴*}

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۷/۳۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۲/۰۲

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

۲- استاد بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

۳- استاد اکوفیزیولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

۴- دانشجوی دکتری بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: bahmankhoshru@yahoo.com

چکیده

با توجه به اینکه مواد مؤثره حاصل از گیاهان دارویی مستقیماً به مصرف انسان رسیده یا در فرمولاسیون داروها مورد استفاده قرار می‌گیرند، لذا علاوه بر کمیت تولید، کیفیت آنها نیز دارای حائز اهمیت است. تنش کم آبی می‌تواند علاوه بر کمیت، روی کیفیت ماده مؤثره این گیاهان اثر منفی بگذارد. گزارش شده که کاربرد قارچ اندوفیت *Piriformospora indica* در برخی گیاهان اثرات زیان‌بار تنش کم‌آبی را کاهش می‌دهد. احتمالاً این قارچ علاوه بر کاهش خسارات تنش کم‌آبی، در تولید متابولیت‌های گیاهی نیز نقش مستقیم و غیرمستقیم داشته باشد. بر این اساس پژوهشی به صورت آزمایش‌گلدانی با گیاه آنیسون در قالب طرح کاملاً تصادفی به صورت فاکتوریل با دو فاکتور شامل دو سطح قارچ *P. indica* (تلقیح و عدم تلقیح) و سه سطح رطوبت خاک شامل تنش شدید $FC(W_2)$ ۴۰-۵۰، تنش متوسط $FC(W_1)$ ۶۰-۷۰ و بدون تنش $FC(W_0)$ ۸۰-۹۰ در چهار تکرار اجرا شد. پارامترهای اندازه‌گیری شده شامل وزن خشک بخش هوایی و ریشه، عملکرد بذر، عملکرد و درصد اسانس و مقدار آنیتول اسانس بود. نتایج نشان داد که با افزایش شدت تنش کم‌آبی، صفات عملکردی گیاه آنیسون کاهش می‌یابد، ولی تلقیح قارچ *P. indica* در مقایسه با تیمار شاهد منجر به افزایش ویژگی‌های اندازه‌گیری شده در گیاه آنیسون گردید بطوری که در سطح تنش شدید (W_2) منجر به افزایش وزن خشک بخش هوایی (۵۸/۹۳٪)، وزن خشک ریشه (۵۶/۲۵٪)، عملکرد بذر (۴۷/۱٪)، عملکرد اسانس (۹۳/۱۳٪) و درصد اسانس (۵۸/۳۳٪) نسبت به تیمار بدون قارچ (شاهد) شد. در سطح تنش متوسط (W_1) نیز برای تیمارهای قارچی نیز سه پارامتر عملکرد اسانس (۷۵/۱۸٪)، درصد اسانس (۵۳/۹۲٪) و درصد آنیتول اسانس (۵۰/۵۲٪) دارای افزایش عملکرد نسبت به تیمار شاهد بودند. در این تحقیق مشخص گردید که قارچ *P. indica* با افزایش میزان آنیتول اسانس آنیسون، کیفیت دارویی آن را بالاتر می‌برد.

واژه‌های کلیدی: آنیتول، سطوح رطوبتی، گیاهان دارویی، متابولیت گیاهی

Effects of Endophytic Fungus *Piriformospora indica* on Growth and Essential Oil Content of *Pimpinella anisum* Plant under Water Deficit Conditions

S Abdollahi¹, N Aliasgharzad², S Zehtab Salmasi³ and B Khoshru^{4*}

Received: October 22, 2019

Accepted: February 20, 2021

1-MSc of Soil Biology and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Univ. of Tabriz, Iran

2-Prof. of Soil Biology and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Univ. of Tabriz, Iran.

3-Prof. of Plant Eco-physiology, Faculty of Agriculture, Univ. of Tabriz, Iran.

4-PhD Student of Soil Biology and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Univ. of Tabriz, Iran.

*Corresponding Author, E-mail: bahmankhoshru@yahoo.com

Abstract

The products from medicinal plants are directly used for human consumption or used in the formulation of drugs. Therefore, in addition to quantity, their quality is also considered. Water deficit stress could affect the quality and quantity of the active substance in these plants. It has been reported that the use of *Piriformospora indica* as an endophytic fungus in some plants reduces the harmful effects of water deficit stress. Probably, this fungus will have direct and indirect roles in the production of plant metabolites likely by reducing the adverse effects of water deficit stress. Accordingly, this research was conducted in a pot culture experiment with anise plant by completely randomized design with factorial arrangement with two factors including two levels of *P. indica* (inoculated and non-inoculated) and soil moisture with three levels of 80-90 %FC (W0), 60-70 %FC (W1) and 40-50 %FC (W2) with four replications. Measured parameters included shoot and root dry weight, seed yield, essential oil yield and percentage and anethole content. The results showed that with increasing the intensity of water deficit stress, the yield traits of anise decreased, but inoculation with *P. indica* increased the measured characteristics of anise compared to the non-fungal treatment. Severe water stress (W2) lead to an increase in shoot dry weight (58.93%), root dry weight (56.25%), seed yield (47.1%), essential oil yield (93.13%), and the percentage of essential oil (58.33%) compared to the non-inoculated plants. At moderate stress level (W1) with fungal treatment, three parameters of essential oil yield (75.18%), essential oil percentage (53.92%) and essential oil anethole percentage (50.52%) showed an increase compared to control treatment. In this study, it was found that *P. indica* increases the medicinal quality of anise essential oil by increasing its anethole amount.

Keywords: Anethole, Medicinal plants, Moisture levels, Plant metabolites.

گیاهان در طب سنتی و مدرن رو به افزایش بوده است (وانگ و همکاران ۲۰۲۰). گیاهان دارویی با دارا بودن یک یا چند ماده مؤثره^۱ می‌توانند از ایجاد برخی بیماری‌ها جلوگیری کرده و سبب درمان و یا تخفیف عوارض آن

مقدمه

از دیرباز گیاهان دارویی از منابع مهم درمان بیماری‌ها در تمام نقاط جهان بوده و در حال حاضر نیز این گیاهان از جایگاه مهمی در پزشکی برخوردار می‌باشند، به خصوص در دهه‌های گذشته کاربرد این

متابولیسم گیاهان، به ویژه در پاسخ به تنش وارد شده به گیاه می‌باشد (عیسی ۲۰۱۹). از جمله عوامل مهمی که بر خصوصیات کمی و کیفی گیاهان دارویی مؤثر است، می‌توان به تنش کم‌آبی اشاره نمود (آقایی و کوماتسو ۲۰۱۳). تنش و محدودیت آب به طور معمول بر مراحل مختلف رشد و نمو گیاهان اثر منفی دارد. در نتیجه بروز تنش کم‌آبی، گیاهان با ذخیره مواد تنظیم‌کننده اسمزی از قبیل اسیدهای آمینه، قندها، برخی از یون‌های معدنی، هورمون‌ها و پروتئین‌ها سعی در مقابله با تنش دارند (سینگ و همکاران ۲۰۲۰).

قارچ اندوفیت *Piriformospora indica* از شاخه Basidiomycota، رده Agaricomycetes، دسته Sebaciniales، خانواده Sebacinaceae، جنس *Piriformospora* و گونه *Piriformospora indica* می‌باشد که برای اولین بار توسط وارما و همکاران (۱۹۹۸) در هندوستان شناسایی شد. اهمیت برقراری ارتباط همزیستی قارچ *P. indica* با گیاهان مختلف در تحریک رشد گیاه و در نتیجه افزایش عملکرد آن و نیز افزایش توان تحمل گیاه به تنش‌های شوری، خشکی و عوامل بیماری‌زای ریشه و برگ می‌باشد که توسط محققین مختلف گزارش شده است (برتولازی و همکاران ۲۰۱۹). قارچ *P. indica* با افزایش قابل توجه تعداد ریشه، گیاه را در جذب آب و مواد غذایی توانمندتر نموده و سبب افزایش رشد رویشی و سطح فتوسنتزی می‌شود. در این حالت تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهان دارویی نیز افزایش می‌یابد (منسا و همکاران ۲۰۲۰). قارچ *P. indica* سبب افزایش

شوند (صفورا و همکاران ۲۰۱۳). به موازات رشد علم و افزایش اطلاعات، مواد مؤثره بسیاری از گیاهان دارویی شناسایی و طبقه‌بندی شده است (وانگ و همکاران ۲۰۲۰). خاصیت دارویی این گیاهان ناشی از متابولیت‌های ثانویه است. این متابولیت‌ها عموماً زمانی که گیاهان دارویی در محیط طبیعی و تحت تنش، رقابت، همزیستی و غیره رشد می‌کنند تولید می‌شود (عیسی ۲۰۱۹).

گیاه دارویی آنیسون با نام علمی *Pimpinella anisum* دارای اهمیت طبی و دارویی است (سان و همکاران ۲۰۱۹) و به عنوان یک ادویه برای اولین بار توسط مصریان باستان و بعد توسط یونانی‌ها، رومی‌ها و اعراب کشت شد. یک گیاه شیرین، گرم‌کننده و محرک معده است که باعث بهبود دستگاه گوارش شده، برای کبد و دستگاه گردش خون مفید است و دارای خاصیت ضد سرفه و اثر استروژنیک^۱ می‌باشد (سان و همکاران ۲۰۱۹). مهمترین ماده تشکیل‌دهنده اسانس، آنیتول^۲ (۹۰-۸۰ درصد) می‌باشد و از مواد دیگر تشکیل‌دهنده اسانس می‌توان متیل‌کاوایکول^۳ (۱۰-۵ درصد) و سایمین^۴ را نام برد (صایبی و همکاران ۲۰۱۲). میوه آنیسون حاوی اسانس^۵، مواد پکتینی، روغن، قند، نشاسته، مواد معدنی و صمغ می‌باشد (اورآو و همکاران ۲۰۰۸). همچنین میوه‌های آن حاوی ۱/۵ تا ۶ درصد اسانس، تا ۱۱ درصد اسیدهای چرب از جمله پالمیتیک و اولئیک اسید، ۴ درصد کربوهیدرات و ۱۸ درصد پروتئین می‌باشد (سان و همکاران ۲۰۱۹). ماده مؤثره این گیاه از نوع اسانس است که محصول فرآیندهای اصلی

⁴ Cymene

⁵ Essential oil

¹ Estrogenic

² Anethole

³ Methylchavicol

کفر^۱ و به مدت دو هفته در دمای ۲۴ درجه سلسیوس درون انکوباتور تکثیر شد. سپس، با استفاده از تیغ اسپاتول استریل شده لایه نازکی از قارچ روی محیط کشت، برداشته شده و با شن استریل شده به طور کامل و یکنواخت مخلوط گردید و به عنوان زادمایه قارچی در کشت گلدانی استفاده شد (فام و همکاران ۲۰۰۸). در هر گرم زادمایه علاوه بر هیف‌های قارچ، حدود ۱۰^۴ اسپور بود که با استفاده لام مدرج نئوبایر شمارش گردید.

آماده‌سازی خاک

بعد از هوا خشک کردن و عبور از الک دو میلی‌متری، ویژگی‌های مهم خاک، شامل EC با روش عصاره گل اشباع با دستگاه EC متر، pH با روش عصاره گل‌اشباع با دستگاه pH متر (ریچارد ۱۹۵۴)، بافت خاک به روش هیدرومتر (گی و بادر ۱۹۸۶)، فسفر قابل جذب با عصاره‌گیری با بی‌کربنات سدیم (اولسن و سومرز ۱۹۸۲)، کربن آلی با روش والکی بلک (نلسون و سومرز ۱۹۸۲)، پتاسیم قابل جذب با استفاده از استات آمونیوم یک نرمال با pH=7 (گوپتا ۲۰۰۰) و رطوبت ظرفیت مزرعه با استفاده از دستگاه صفحات فشار تعیین گردید. خصوصیات اندازه‌گیری شده خاک مورد استفاده در آزمایش در جدول ۱ آورده شده است. خاک مورد نظر پس از عبور از غربال ۴/۷۵ میلی‌متری در گونی‌های کنفی پرشد و به مدت دو ساعت در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس و فشار ۱/۲ بار در اتوکلاو استریل گردید.

آماده سازی بذر

در ابتدا بذور آنیسون (تهیه شده از آزمایشگاه

سطح جذب ریشه بواسطه طریق تکثیر ریشه‌های موئین، پهنای برگ، میزان کلروفیل، راندمان فتوسنتزی برگ، تعداد جوانه‌های گل، تعداد میوه‌ها، میزان تجمع آب و مواد پرورده میوه، کیفیت بهتر میوه و در نهایت عملکرد گیاهان همزیست، از جمله گیاهان دارویی می‌شود (قاسم نژاد و همکاران، ۲۰۱۱). پژوهش‌ها نشان داده که این قارچ علاوه بر تأثیر مستقیم در رشد گیاه از طریق تحریک سیستم دفاعی گیاه مقاومت آن را در مقابل بیماری‌ها و همچنین کم‌آبی (خشکی) افزایش می‌دهد (دشموخ و همکاران ۲۰۰۶). اثرات مثبت ناشی از برقراری رابطه همزیستی قارچ اندوفیت *P. indica* بر بقا و افزایش رشد گیاهان میزبان در مناطق خشک و نیمه‌خشک جهان که با دو معضل عمده خشکی و شوری روبرو هستند، توجه پژوهشگران را به خود جلب نموده است. با توجه به پتانسیل *P. indica* و اهمیت گیاه آنیسون به ویژه از نظر دارویی، این پژوهش به منظور اثر قارچ *P. indica* بر برخی از اجزای عملکرد و میزان آنتیول در اسانس گیاه آنیسون در شرایط تنش کم آبی انجام گرفته است.

مواد و روش‌ها

محل اجرای آزمایش

این آزمایش به صورت کشت گلدانی در گلخانه تحقیقاتی گروه علوم و مهندسی خاک دانشگاه تبریز با گیاه دارویی آنیسون انجام گرفت.

تهیه زادمایه قارچ *P. indica*

قارچ اندوفیت *P. indica* به صورت کشت خالص از گروه زیست‌شناسی دانشگاه مراغه تهیه گردید. قارچ *P. indica* در تعداد کافی پتری دیش محتوی محیط کشت

¹ Kaefer

سطوح رطوبتی اعمال شدند.

اعمال سطوح رطوبتی

جهت اعمال سطوح رطوبتی از روش توزین روزانه گلدان‌ها استفاده شد. برای این کار ابتدا درصد رطوبت ظرفیت مزرعه‌ای برای خاک مورد آزمایش تعیین گردید (کرخام ۲۰۰۵) و در ادامه سطوح رطوبتی شامل سه سطح تنش شدید $FC(W_2)$ % ۴۰-۵۰، تنش متوسط $FC(W_1)$ % ۶۰-۷۰ و بدون تنش $FC(W_0)$ % ۹۰-۸۰ بودند.

اندازه‌گیری وزن خشک بخش هوایی و ریشه

بعد از گذشت ۴ ماه از کشت ابتدایی و بعد از جدا کردن بذور از بخش هوایی، شاخصاره گیاهان از محل طوقه قطع شد و در مورد ریشه نیز پس از جدا کردن ریشه‌ها از خاک، ریشه‌ها به دقت و با مقادیر فراوان آب شسته شدند. بعد از اینکه آب اضافی آنها با کاغذ خشک‌کن گرفته شد، حدود ۰/۵ گرم از ریشه‌های ریز، پس از شستشوی کامل با آب، جهت تعیین درصد کلنیزاسیون ریشه در الکل اتیلیک ۵۰ درصد تثبیت شدند. کلیه نمونه‌های بخش هوایی و ریشه در داخل پاکت‌های کاغذی به داخل آون منتقل شده و در دمای ۷۵ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت خشک شد و وزن خشک آنها تعیین گردید.

رنگ آمیزی و تعیین درصد کلنیزاسیون ریشه توسط

قارچ *P. indica*

برای رنگ‌آمیزی ریشه‌ها بروش وهابی و همکاران (۲۰۱۱) عمل شد و برای تعیین درصد کلنیزاسیون ریشه نیز از روش تقاطع خطوط شبکه استفاده شد (نوریه و همکاران ۱۹۹۲؛ شنک و پرن ۱۹۸۸).

اکوفیزیولوژی گیاهان زراعی و دارویی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز) چند بار با آب مقطر شستشو گردید سپس با استفاده از الکل ۹۶ درصد به مدت ۳۰ ثانیه و محلول هیپوکلریت سدیم یک درصد به مدت ۱۰ دقیقه ضدعفونی و ۳-۴ مرتبه با آب مقطر استریل شستشو گردید. بذره‌ای ضدعفونی شده به صورت یکنواخت و در شرایط استریل بر روی کاغذ صافی درون پتری‌دیش‌های شیشه‌ای انتقال یافتند.

کشت گلدانی و اعمال تیمار قارچی

دو کیلوگرم خاک استریل در هر گلدان (گلدان‌ها قبلاً به وسیله پنبه و الکل ضدعفونی شده بودند) ریخته شد حدود ۱۰۰ گرم زاد مایه قارچی (10^4 اسپور در هر گرم زادمایه) به صورت یک لایه نازک، در عمق دو سانتی‌متری از سطح خاک ریخته شد. بذور جوانه‌دار آنیسون در عمق دو سانتی‌متر و بر روی مایه تلقیح قارچی قرار گرفتند. در مورد گیاهان شاهد بدون قارچ، به همان نسبت شن استریل شده اضافه گردید. در هر گلدان ۱۵ بذر آنیسون کشت شد. عناصر غذایی نیتروژن از منبع اوره به میزان 200 mg kg^{-1} (670 kg ha^{-1})، فسفر از منبع سوپرفسفات‌تریپل به میزان 100 mg kg^{-1} (230 kg ha^{-1}) و پتاسیم از منبع سولفات پتاسیم به میزان 100 mg kg^{-1} (230 kg ha^{-1}) براساس آزمون خاک و توصیه کودی برای گیاه آنیسون (ملکوتی ۲۰۰۰)، به طور یکنواخت به خاک همه گلدان‌ها قبل از کشت افزوده و به خوبی مخلوط شد. رطوبت گلدان‌ها در ابتدای رشد به روش توزین در $FC/0.9$ تنظیم شد. گلدان‌ها در شرایط کنترل شده گلخانه با نور طبیعی و با دمای روز و شب به ترتیب 25 ± 2 و 15 ± 2 درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. بعد از رسیدن ارتفاع گیاهان گلدان به پنج سانتی‌متر،

اسانس‌گیری

(امیدبگی ۱۹۹۵).

استخراج اسانس از گیاه آنیسون

درصد و عملکرد اسانس

این شاخص‌ها از روابط زیر محاسبه شدند

(جایمند و رضایی ۲۰۰۶):

$$\text{درصد اسانس} = \frac{\text{جرم حجمی اسانس (g/cm}^3\text{)} \times \text{حجم اسانس (cm}^3\text{)}}{\text{وزن خشک بذر}} \times 100$$

بذر محاسبه گردید. سفیدکن و همکاران (۱۹۹۸) جرم حجمی اسانس آنیسون را 0.978 g.cm^{-3} گزارش کردند.

بعد از خشک کردن بذور، اسانس و ترکیبات

اسانس (آنتول) اندازه‌گیری شد. اسانس موجود در

بذور به روش تقطیر با آب^۱ و با استفاده از دستگاهاسانس‌گیر کلونجر^۲ به مدت ۲/۵ ساعت استخراج گردید

با استفاده از دستگاه رطوبت‌سنج، درصد رطوبت

بذور به دست آمد که این درصد برای بذور آنیسون

۳/۵۲٪ شد. با استفاده از درصد رطوبت، وزن خشک

درصد اسانس × عملکرد بذر (گرم در گلدان) = (g pot^{-1}) عملکرد اسانس

از هلیم فوق خالص با سرعت عبور یک میلی‌لیتر در دقیقه به عنوان گاز حامل استفاده شد (یانگ کول و همکاران ۲۰۰۵). برای شناسایی ماده مؤثره اسانس، از بین اسانس‌های استخراج شده برحسب میزان اسانس تولید شده، دو نمونه (۱-تلقیح شده با قارچ و ۲-عدم تلقیح) که تحت تنش رطوبتی متوسط بودند انتخاب شد و مورد بررسی قرار گرفت.

طرح آزمایشی و تجزیه آماری

این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو فاکتور، شامل دو سطح قارچ (تلقیح و عدم تلقیح) و سه سطح رطوبتی شامل تنش شدید $\text{FC}(W_1) 70-60\%$ و $\text{FC}(W_2) 50-40\%$ ، تنش متوسط $\text{FC}(W_0) 90-80\%$ با چهار تکرار انجام گرفت. آزمون نرمال بودن توزیع داده‌ها و سپس تجزیه واریانس و مقایسه میانگین آنها با استفاده از نرم افزار

شناسایی ترکیبات تشکیل دهنده اسانس آنیسون

جهت تجزیه نمونه‌های اسانس و اندازه‌گیری

دقیق آنتول موجود در آن از دستگاه گاز کروماتوگراف

مدل Hewlett-Packard 6890 دارای انجکتور Splitless و

ستون موئینه به طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۰/۲۵

میلی‌متر و ضخامت فیلم ۲۵ میلی‌متر مدل Agilent/J and

DB-WAX (Scientific, Folsom, CA, USA W) استفاده

شد. دتکتور آن از نوع یونیز و اشعه آن با حرارت ۲۱۰

درجه سلسیوس بود که در آن گاز هیدروژن و هوا با

سرعت ۴۰ میلی‌لیتر بر دقیقه عبور داده می‌شود. دمای

اولیه در ۸۰ درجه سلسیوس به مدت ۲ دقیقه نگه داشته

شد و سپس با تغییرات ۱۰ درجه در دقیقه به ۱۴۰ درجه

رسید و پس از ۱ دقیقه با تغییرات ۴ درجه در دقیقه به

۱۹۰ درجه رسید و به مدت ۲ دقیقه نگه داشته شد و

سپس با تغییرات ۲ درجه در دقیقه به ۲۱۰ درجه رسید.

مشاهده تفاوت در ترکیبات در تیمارهای موجود مهم بوده است.

نتایج و بحث

برخی از ویژگیهای خاک مورد آزمایش در جدول ۱ آورده شده است.

MSTAT-C و رسم نمودارها با Excel انجام شد. مقایسه میانگینها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال یک و پنج درصد انجام شد. چون آنالیز کروماتوگرافی گازی به علت محدودیت مالی فقط در چند نمونه منتخب صورت گرفته و تکرار نداشته است لذا این نتایج فاقد مقایسه آماری بوده است و صرفاً جهت

جدول ۱- برخی ویژگیهای فیزیکی و شیمیایی خاک مورد استفاده

K (mg kg ⁻¹)	P (mg kg ⁻¹)	FC%	OC%	بافت خاک	%نسلیت	%نشن	%زس	ECe (dS m ⁻¹)	pH
۱۹۸	۷/۴	۲۰	۰/۲	شن لومی	۶/۰۹	۸۶/۶	۷/۳۱	۱/۸	۷/۶۴

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس تأثیر تنش کم آبی و قارچ *P. indica* بر صفات کمی و کیفی گیاه آنیسون

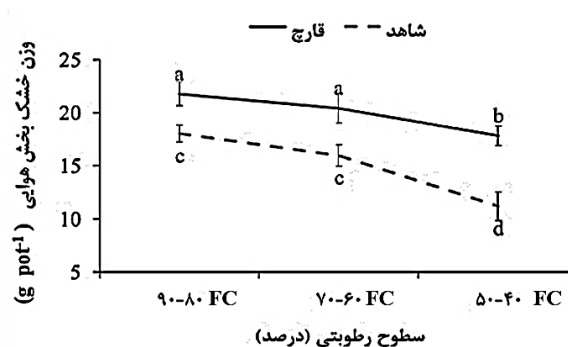
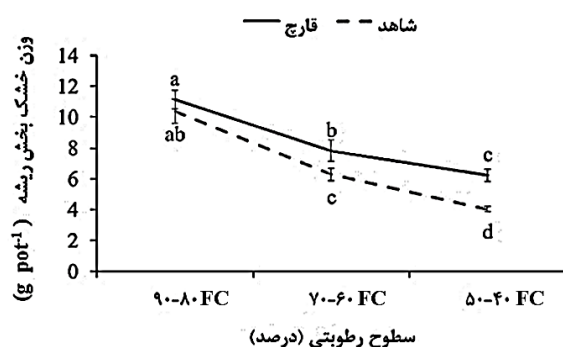
میانگین مربعات				درجه آزادی		منابع تغییرات
درصد	عملکرد	عملکرد بذر	کلونیزاسیون ریشه	وزن خشک بخش هوایی	وزن خشک ریشه	
۰/۰۸۰**	۰/۳۲۲**	۱۴/۲۵۸**	۲۰۰۱۳/۳۳۶**	۱۵۹/۹۰۷**	۶/۲۵۴*	قارچ
۰/۰۰۹**	۰/۰۲۰**	۵/۵۰۶**	۳۷/۸۹۴**	۳۱/۰۰۷**	۴۱/۸۱۲**	تنش کم آبی
۰/۰۰۴**	۰/۰۱۵**	۰/۵۷۹*	۳۷/۸۹۴*	۰/۵۳۸*	۰/۲۲۶*	قارچ* تنش کم آبی
۰/۰۰۰۰۶	۰/۰۰۶	۰/۰۰۳	۰/۰۹۶	۰/۱۱۶	۰/۰۱۰	خطا
۲۳/۹۲	۲۲/۱۴	۱۷/۰۱	۱۰/۷۰	۲۴/۵۵	۶/۳۰	ضریب تغییرات (%)

* و ** به ترتیب تأثیر معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد و یک درصد.

صفر ۲۱/۱۱٪ و در سطح تنش شدید ۵۸/۹۳٪ در مقایسه با تیمار شاهد مشاهده شد (شکل ۱). برای بخش ریشه نیز نتیجه تجزیه واریانس (جدول ۲) نشان داد که اثر متقابل سطوح رطوبتی خاک × قارچ بر وزن خشک ریشه معنی‌دار بود ($p < ۰/۰۵$). مشاهده شد که با کاهش رطوبت خاک، وزن خشک ریشه نیز کاهش یافته است. ولی این کاهش در تیمارهای قارچی کمتر بود. مشاهده شد که قارچ توانسته وزن خشک بخش ریشه را در گیاهان تلقیح شده نسبت به شاهد افزایش دهد. تلقیح قارچ منجر به افزایش ۶/۲۵ درصدی وزن خشک ریشه گیاه در سطح تنش شدید در مقایسه با تیمار شاهد شد (شکل ۲).

وزن خشک بخش هوایی و ریشه

بر اساس نتایج آنالیز واریانس (جدول ۲) اثر متقابل تنش × قارچ بر وزن خشک بخش هوایی معنی‌دار بود ($p < ۰/۰۵$). در هر سه سطح تنش بین گیاهان تلقیح شده و نشده اختلاف معنی‌دار وجود داشت و این اختلاف با افزایش تنش بیشتر مشهود بود. بطور کلی تنش کم آبی باعث کاهش وزن خشک بخش هوایی در گیاهان تلقیح شده با قارچ و نیز شاهد شد ولی شدت کاهش در گیاهان تلقیح شده با قارچ کمتر بود. مشاهده شد که قارچ توانسته وزن خشک بخش هوایی را در گیاهان تلقیح شده نسبت به شاهد افزایش دهد. افزایش وزن خشک بخش هوایی گیاه توسط قارچ در سطح تنش



شکل ۲- اثر متقابل سطوح رطوبتی خاک و قارچ بر وزن خشک بخش هوایی.

شکل ۱- اثر متقابل سطوح رطوبتی خاک × قارچ بر وزن خشک بخش هوایی. سطوح رطوبتی شامل تنش شدید $50-40\%FC(W_2)$ ، تنش متوسط $70-60\%FC(W_1)$ و بدون تنش $90-80\%FC(W_0)$ هستند.

درصد کلنیزاسیون ریشه و عملکرد بذر

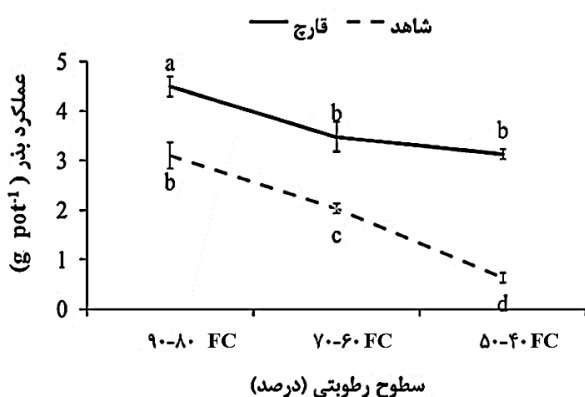
بر اساس جدول تجزیه واریانس (جدول ۲)، اثر اصلی و اثر متقابل سطوح تنش کم آبی و قارچ بر کلنیزاسیون ریشه‌ها معنی‌دار بود ($P < 0.05$). نتایج نشان داد که افزایش شدت تنش کم آبی سبب کاهش کلنیزاسیون ریشه‌های گیاهان تلقیح شده با قارچ شده است. بطوری که در سطح تنش شدید (W_2) نسبت به سطح بدون تنش کم آبی (W_0) در تیمار قارچی، ۱۲/۵۹ درصد کاهش در درصد کلنیزاسیون ریشه‌ها مشاهده شد. درصد کلونیزاسیون قارچ در شرایط بدون تنش ۷۲/۴۳٪ بود (شکل ۳). در گیاهان بدون قارچ هیچ گونه کلونیزاسیون مشاهده نشد.

در بخش عملکرد بذر نیز نتایج تجزیه واریانس اثر متقابل تنش کم آبی × قارچ معنی‌دار بود ($p < 0.05$). با افزایش تنش کم آبی، عملکرد بذر در تیمار تلقیح شده و شاهد کاهش یافت (شکل ۴). در هر سه سطح تنش کم آبی بین گیاهان شاهد و تیمار قارچی اختلاف معنی‌دار وجود داشت و این اختلاف با افزایش تنش

دولت آباد و همکاران (۲۰۱۷) گزارش کردند که

تلقیح گیاه نعنا با قارچ *P. indica* منجر به افزایش ۶۷ درصدی وزن خشک بخش هوایی گیاه گردید. قارچ با تقویت سطح جذب از طریق میسلیوم‌های خود، فراهمی آب و عناصر غذایی را برای گیاه تسهیل می‌کند که این کار به نوبه خود سبب می‌گردد که میزان فتوسنتز و تولید قندها و مواد ذخیره‌ای گیاه بیشتر شده و در نتیجه رشد اندام هوایی و ریشه‌ها افزایش یابد (سوتا و پادماواتی ۲۰۱۹). قارچ *P. indica* منجر به افزایش معنی‌دار طول ریشخ و طول ساقه و وزن خشک بخش هوایی و ریشه در گیاه بادمجان (*Solanum melongena* L.) شد (سوتا و پادماواتی ۲۰۱۹). به نظر می‌رسد میسلیوم‌های قارچ سطح جذب بالاتری را برای گیاه آنیسون فراهم آورده و از طرفی به نگهداری آب در اطراف آن کمک کرده‌اند و همین مسئله سبب شده است تا در شرایط یکسان گیاهان تلقیح شده نسبت به گیاهان شاهد آب بیشتری در اختیار داشته باشند

به W0 در تیمار قارچی، ۳۳/۰۶ درصد کاهش در عملکرد بذر و در تیمار شاهد بدون قارچ میزان این کاهش ۸۰/۱۵ درصد بود (شکل ۴).

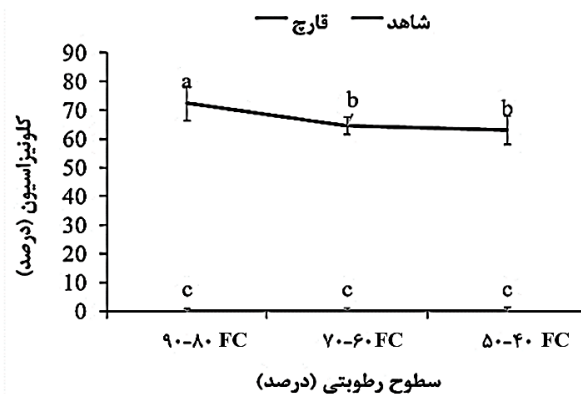


شکل ۴- اثر متقابل سطوح رطوبتی خاک × قارچ بر عملکرد بذر.

عملکرد و درصد اسانس

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۲) نشان داد که اثرات ساده و متقابل تنش کم آبی × قارچ بر عملکرد و درصد اسانس معنی دار بود ($p < 0.01$). در هر سه سطح تنش بین گیاهان تلقیح شده با قارچ و شاهد اختلاف معنی دار وجود داشت. در سطوح رطوبتی متناظر، عملکرد اسانس در گیاهان تلقیح شده نسبت به تلقیح نشده بیشتر بود. بیشترین عملکرد اسانس در تیمار تلقیح شده با قارچ در سطح رطوبتی W1 (تنش متوسط) مشاهده شد ولی در تیمار شاهد بیشترین عملکرد اسانس در سطح رطوبتی W0 (بدون تنش) و W1 (تنش متوسط) مشاهده گردید. با افزایش تنش کم آبی از سطح W0 به W1 عملکرد اسانس روند افزایشی داشت و این افزایش عملکرد در تیمار قارچی ۷۶/۱۲ درصد و در تیمار شاهد ۸/۷۵ درصد بود. با ادامه افزایش تنش از سطح W1 به W2 روند عملکرد

بیشتر مشهود بود، بطوری که در سطح W2 این اختلاف کاملاً مشهود بود. در شرایط رطوبتی یکسان قارچ توانسته بود عملکرد بذر را در گیاهان تلقیح شده نسبت به تلقیح نشده افزایش دهد چنان که در سطح W2 نسبت

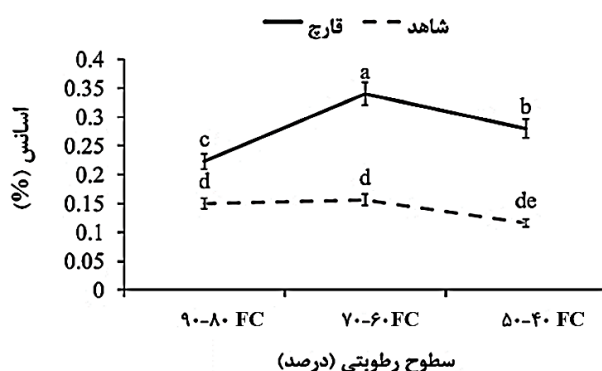


شکل ۳- اثر متقابل سطوح رطوبتی خاک و قارچ بر کلنیزاسیون ریشه در گیاهان تلقیح شده.

پژوهش‌ها نشان داده است که پس از تلقیح قارچ، اسپور قارچ *P. indica* قادر است که در سطح ریشه گیاهان کنگرفرنگی جوانه زده و در سطح ریشه گسترش یابد و تعداد ریشه را نسبت به گیاهان غیره‌آلوده افزایش دهد (قاسم نژاد و بابایی زاد ۲۰۱۱). کلنیزاسیون گیاه توسط قارچ *P. indica* می‌تواند با افزایش عملکرد بافت رویشی، تعداد گل آذین، میانگین وزن دانه و عملکرد گیاه را افزایش دهد (دولت آبادی و همکاران ۲۰۱۱).

احمدوند و حاجی‌نیا (۲۰۱۸) گزارش کردند که تلقیح گیاه ارزن با قارچ *P. indica* عملکرد دانه ارزن را تحت شرایط تنش شدید کم آبی، ۳۵/۳۴ درصد نسبت به تیمار شاهد افزایش داد. نتایج این تحقیق نشان داد که تلقیح بذر با قارچ *P. indica* موجب کاهش آثار تنش کم آبی و بهبود عملکرد ارزن شد. آنها تأثیر مثبت قارچ بر جذب و کارایی مصرف نور در گیاه ارزن در سطوح مختلف آبیاری را علت افزایش عملکرد دانه اظهار کردند.

که کاهش رطوبت از سطح W_0 تا W_1 سبب افزایش درصد اسانس و بعد از آن سبب کاهش درصد اسانس در گیاهان تلقیح شده با قارچ و شاهد شده است. مشخص شد که در هر سه سطح تنش کم آبی بین گیاهان تلقیح شده و نشده اختلاف معنی دار وجود داشت و این اختلاف با افزایش تنش کم آبی بیشتر شده است. به طوری که در شرایط رطوبتی یکسان درصد اسانس در گیاهان تلقیح شده بیشتر از شاهد بود. افزایش درصد اسانس در تیمار قارچی نسبت به شاهد در سطح تنش شدید متوسط (W_1) ۵۳/۹۲ درصد و در سطح تنش شدید (W_2) ۵۸/۳۳ درصد بود (شکل ۶).



شکل ۶- اثر متقابل سطوح رطوبتی خاک × قارچ بر درصد اسانس.

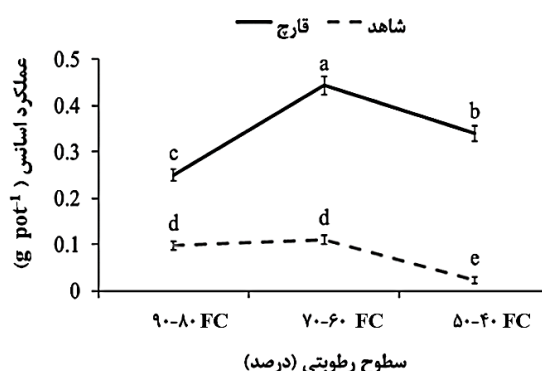
ناشی از اثر زیان آور تنش کم آبی بر رشد و عملکرد پیکر رویشی گیاه باشد. اثرات نامناسب تنش کم آبی در کاهش عملکرد اسانس توسط حسنی و امیدبیگی (۲۰۰۶) در آویشن گزارش گردیده است.

مقدار آنیتول و ترکیبات تشکیل دهنده اسانس آنیسون

ترکیب‌های تشکیل دهنده اسانس دانه آنیسون در هر دو تیمار (تلقیح شده با قارچ و شاهد) جدول ۳ ارائه شده است. نتایج آزمایش حاضر نشان داد که از ترکیب‌های اسانس آنیسون، ترانس آنیتول بیشترین

اسانس کاهشی بود. افزایش عملکرد اسانس در تیمار قارچی نسبت به شاهد در سطح تنش متوسط (W_1) ۷۵/۱۸ درصد و در سطح تنش شدید (W_2) ۹۳/۱۳ درصد بود (شکل ۵).

در بخش نتایج جدول تجزیه واریانس درصد اسانس نیز اثرات اصلی و متقابل تنش کم آبی × قارچ بر درصد اسانس معنی دار بود ($p < 0.01$). نتایج مقایسات میانگین بین تیمارهای قارچی و شاهد نیز مشخص کرد که تقریباً یک روند مشابه نتایج عملکرد اسانس بدست آمده و تفاوت‌های موجود هم ناشی از عملکرد بذر می‌باشد (رابطه ۲). نتایج این بخش نیز نشانگر آن بود



شکل ۵- اثر متقابل سطوح رطوبتی خاک × قارچ بر عملکرد اسانس.

دولت آباد و همکاران (۲۰۱۷) گزارش کردند که تلقیح گیاه نعنا با قارچ *P. indica* منجر به افزایش حداکثری عملکرد اسانس (0.78 w w^{-1} درصد) در مقایسه با تیمار شاهد گردید. مرادی (۲۰۰۴) گزارش کرد که استفاده از کودهای آلی و زیستی باعث افزایش معنی دار عملکرد اسانس رازیانه نسبت به شاهد شد و دلیل این افزایش را عملکرد دانه و درصد اسانس بالاتر معرفی کرد. با توجه به این که عملکرد اسانس برآیند عملکرد بذر و درصد اسانس است، کاهش عملکرد اسانس در نتیجه کاهش شدید رطوبت خاک ممکن است

تجزیه نشان دهنده اهمیت زیاد ترانس آنیتول در اسانس آنیسون می باشد، که در این آزمایش نیز بالاترین جزء را تشکیل می دهد.

مقدار را دارد، که در تیمار قارچی ۷۱/۸۵٪ و تیمار شاهد ۲۱/۳۳٪ می باشد. ترکیبات دیگر اسانس نیز شناسایی شده و در جدول ۳ ارائه شده است. این

جدول ۳- ترکیبات تشکیل دهنده اسانس گیاه آنیسون در سطح رطوبتی W₁.

شاهد		<i>P. indica</i>	
نام ترکیب	درصد ترکیب	نام ترکیب	درصد ترکیب
1,4,5,8-Tetramethylnaphthalene	۰/۳۱	2-(1',2'-epoxypropyl)-4-methoxyp	۶/۲۱
2-(1',2'-epoxypropyl)-4-methoxyp	۸/۲۸	2-(1-E-propenyl)-4-methoxyphenyl	۱۴
7,9-Di-tert-butyl-1-oxaspiro	۱/۱۶	Beta. -Bisabolene	۰/۱۵
Anisole, m-(2-nitrovinyl)-	۰/۴۷	Estragole	۲/۳۶
Diazinon	۱/۱۳	gamma. -himachalene	۰/۶۱
Docosane (CAS)	۵/۴۶	Isoeugenol2	۳/۲۱
Eicosane	۱۲/۹۵	trans-anethole	۷۱/۸۵
Estragole	۱۴/۴۵	α -cadinol	۰/۰۹
Heneicosane	۱/۷۷	2-Propanone, 1-(4-methoxyphenyl)-	۰/۱۱
Heptacosane	۲۴/۸۷	1H-3a,7-Methanoazulene, 2,3,4,7	۰/۲۱
Heptadecanenitrile	۱/۰۲	(-)-Caryophyllene oxide	۰/۰۷
Hexanoic acid, 2-ethyl-, hexadecyl ester	۰/۴۷	4,8,8-Trimethylspiro [2.6] non-4,6.	۰/۲۸
Palmitic acid	۰/۳۵	(1.alpha.,4.alpha.,4a.beta.,5.alpha.)	۰/۰۹
trans-anethole	۲۱/۳۳		
α -cadinol	۰/۲۸		

است. در بین این ترکیبات، 2-(1',2'-epoxypropyl)-4-methoxyp...، Estragole، trans-anethole و α -cadinol مشترک می باشد. بقیه ترکیبات می توانند به علت برخی فرآیندهایی که توسط قارچ صورت گرفته به ترکیبات دیگری تبدیل شوند و همچنین می تواند به علت ناچیز بودن درصد آنها قابل شناسایی نبوده باشند (خالید و همکاران ۲۰۱۹). اسانس آنیسون علاوه بر هیدروکربن های اشباع، حاوی ترکیبات اکسیژنه

با توجه به نتایج به دست آمده در این پژوهش مشخص شد که قارچ *P. indica* با افزایش درصد ترکیبات اسانس به ویژه آنیتول باعث افزایش کیفیت دارویی این گیاه می شود. اصلی ترین ترکیبی که در تحقیق فعلی مورد بحث بود ترکیب ترانس آنیتول بود که مقدار آن در تیمار قارچی بیشتر از تیمار شاهد مشاهده گردید (جدول ۳). در مجموع در نمونه تلقیح شده، ۱۳ ترکیب و در نمونه شاهد، ۱۵ ترکیب شناسایی شده

نتیجه‌گیری کلی

در این پژوهش اثرات مثبت قارچ اندوفیت *P. indica* در تعدیل تنش کم‌آبی بر روی گیاه دارویی آنیسون مشاهده گردید. در این آزمایش با افزایش تنش کم‌آبی، شاخص‌های وزن خشک گیاه، عملکرد بذر، درصد کلنیزاسیون، عملکرد و درصد اسانس کاهش یافت. کاهش عملکرد اسانس ممکن است به دلیل اثرات زیان‌بار تنش کم‌آبی بر عملکرد گیاه باشد و قارچ *P. indica* به دلیل تشکیل همزیستی با گیاه و افزایش جذب آب و مواد غذایی منجر به کاهش اثرات سوء تنش کم‌آبی و در ادامه عملکرد گیاه و تولید درصد و عملکرد اسانس را افزایش داده است. همچنین مشخص شد که در تنش متوسط کم‌آبی (W_1)، درصد و عملکرد اسانس در هر دو تیمار قارچی و شاهد نسبت به سطوح دیگر تنش (W_0 و W_2) بالاتر بودند. بررسی مقدار آنیتول موجود در اسانس در سطح تنش متوسط (W_1) نیز مشخص کرد که تلقیح قارچ باعث افزایش مقدار آن در اسانس شده است. در نهایت مشخص گردید که قارچ *P. indica* با بهبود شرایط رشدی مناسب برای گیاه آنیسون باعث افزایش درصد برخی ترکیبات اسانس آن شده و علاوه بر کمیت باعث افزایش کیفیت اسانس گیاه نیز می‌گردد.

ترپنوئیدی نیز می‌باشد که اثر دارویی اسانس بیشتر به خاطر ترکیبات اکسیژنه ترپنوئیدی می‌باشد (مورسی ۲۰۱۷). در این پژوهش ترکیبات اکسیژن‌دار ترپنوئیدی در تیمار قارچی بیشتر از تیمار شاهد مشاهده شد. پس این‌گونه می‌توان نتیجه گرفت که قارچ مذکور اثر دارویی آنیسون را بهبود بخشیده است. گزارش شده است که قارچ *P. indica* با ایجاد تغییرات قابل توجهی در فعالیت‌های آنزیمی و سازوکارهای فیزیولوژیک، به تجمع متابولیت‌های ثانویه مانند کاروتنوئیدها و پلی‌فنل‌ها در گیاهان میزبان منجر می‌شود (باقری و همکاران ۲۰۱۴). همچنین تلقیح این قارچ در گیاهان مریم‌گلی، آویشن و پونه کوهی منجر به افزایش چشمگیر مقدار مانول، تیمول و کارواکول شد (تارراف و همکاران ۲۰۱۵). همزیستی این قارچ با گیاهان میزبان باعث افزایش پهنای برگ شده و افزایش پهنای برگ در واقع منجر به افزایش میزان کلروفیل و در نهایت فتوسنتز برگ شده و از این طریق علاوه بر این که به صورت مستقیم سبب افزایش عملکرد اندام رویشی می‌شود بلکه با افزایش فتوسنتز، افزایش مواد حواسط را در برداشته که بیشتر آنها یا به طور مستقیم در گروه مواد ثانویه قرار دارند و یا اینکه در نهایت به متابولیت‌های ثانویه تبدیل می‌شوند (قاسم نژاده و بابایی زاد ۲۰۱۱).

منابع مورد استفاده

- Aghaei K and Komatsu S, 2013. Crop and medicinal plants proteomics in response to salt stress. *Frontiers in Plant Science* 4: 8-16.
- Ahmadvand G and Hajinia S, 2018. Effect of fungus *Piriformospora indica* on the grain yield, absorption and radiation use efficiency of millet under different irrigation regimes, *Cereal Research* 8 (2): 261-276. doi: 10.22124 / c.2018.8272.1324. (In Persian with English abstract)
- Bagheri S, Ebrahimi MA, Davazdahemami S and Minooyi Moghadam J, 2014. Terpenoids and phenolic compounds production of mint genotypes in response to mycorrhizal bio-elicitors. *Engineering, Technology and Applied Science* 4(4):339-48.

- Bertolazi AA, de Souza SB, Ruas KF, Campostrini E, de Rezende CE, Cruz C, Melo J, Colodete CM, Varma A and Ramos AC, 2019. Inoculation with *piriformospora indica* is more efficient in wild-type rice than in transgenic rice over-expressing the vacuolar H⁺-PPase. *Frontiers in Microbiology* 10: 1087-1096.
- Deshmukh S, Hükelhoven R, Schäfer P, Imani J, Sharma M, Weiss M, Waller F and Kogel KH, 2006. The root endophytic fungus *Piriformospora indica* requires host cell death for proliferation during mutualistic symbiosis with barley. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(49):18450-18457.
- Dolatabad HK, Goltapeh EM, Safari M and Golafaie TP, 2017. Potential effect of *Piriformospora indica* on plant growth and essential oil yield in *Mentha piperita*. *Plant Pathology & Quarantine* 7: 96-104.
- Dolatabadi HK, Goltapeh EM, Jaimand K, Rohani N and Varma A, 2011. Effects of *Piriformospora indica* and *Sebacina vermifera* on growth and yield of essential oil in fennel (*Foeniculum vulgare*) under greenhouse conditions. *Journal of Basic Microbiology* 51(1): 33-39.
- Gee GW and Bauder JW, 1986. Particle-size analysis. Pp. 383- 411. In: Klute A (ed.). *Methods of Soil Analysis: Physical and Mineralogical Methods. Part 1*, 2nd (ed.) Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin, United States of America.
- Ghasemnezhad A and Babaeizad V, 2011. The influence of fungus (*Piriformospora indica*) on vegetative growth and the content of caffeic acid of leaves of artichoke (*Cynara scolymus* L.) plant. *Journal of Plant Production* 18(1): 133-140. (In Persian with English abstract).
- Gupta PK, 2000. *Soil, Plant Water and Fertilizer Analysis*. Agrobios, New Delhi, India.
- Hassani A and Omidbaigi R, 2006. Effect of Water stress on some morphological and biochemical characteristics of purple basil (*Ocimum basilicum*). *Journal of Biological Sciences* 6: (4) 763-767. (In Persian with English abstract).
- Isah T, 2019. Stress and defense responses in plant secondary metabolites production. *Biological Research* 52(1): 39-53.
- Khalid M, Rahman SU and Huang D, 2019. Molecular mechanism underlying *Piriformospora indica*-mediated plant improvement/protection for sustainable agriculture. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 51(3):229-42.
- Kirkham MB, 2005. *Principles of Soil and Plant Water Relations*. Academic Press.
- Malakoti MJ, 2000. Optimal fertilizer recommendation for crops and horticulture. Technical Report, No. 200, Soil and Water Research Institute, Nash Agricultural Education. (In Persian)
- Mensah RA, Li D, Liu F, Tian N, Sun X, Hao X, Lai Z and Cheng C, 2020. Versatile *Piriformospora indica* and its potential applications in horticultural crops. *Horticultural Plant Journal* 6 (2):111-121
- Morsy NF, 2017. Chemical structure, quality indices and bioactivity of essential oil constituents. *Medicinal and Aromatic Plants* 8:175-206.
- Nelson DW and Sommers LE, 1982. Total carbon, organic carbon, and organic matter. Pp. 539–579. In: Page AL, Miller RH & Keeney DR (eds). *Methods of Soil Analysis, part 2*. American Society of Agronomy, Soil Science Society of America. Madison, Wisconsin.
- Norriif IR, Read DJ and Varma AK, 1992. *Methods in Microbiology Techniques for Study of Mycorrhiza*. Academic press, London.
- Olsen SR and Sommers LE, 1982. Phosphorus. Pp: 403-430. In: Page AL, (ed.) *Methods of Soil Analysis, Chemical and Microbiological Properties. Part 2*. American Society of Agronomy, Soil Science Society of America. Madison, Wisconsin.
- Omidbaigi R, 1995. Application of modified chamomile in the cosmetics industry. Pp: 38-40. *Proceedings of the First International Seminar on Health and Beauty*, October 24-26, University of Tehran, Tehran, Iran.
- Orav A, Raal A and Arak E, 2008. Essential oil composition of *Pimpinella anisum* L. fruits from various European countries. *Natural Product Research* 22(3): 227-232.
- Pham GH, Singh A, Malla R, Kumari R, Prasad R, Sachdev M, Rexer KH, Kost G, Luis P, Kaldorf M and Buscot F, 2008. Interaction of *Piriformospora indica* with diverse microorganisms and plants. Pp: 237-265. In: *Plant Surface Microbiology*, Springer, Berlin, Heidelberg.
- Richardes LA, 1954. *Diagnosis and Improvement of Saline and Alkali Soils*. United States Salinity Laboratory Staff. *Agriculture Handbook* 60. United States Department of Agriculture, 160p.
- Saibi S, Belhadj M and Benyoussef EH, 2012. Essential oil composition of *Pimpinella anisum* from Algeria. *Analytical Chemistry Letters* 2(6): 401-404.
- Schenck NC and Perez Y, 1988. *Manual for the Identification of VA Mycorrhizal Fungi*. INVAM, 1453 Fifield Hall, University of Florida, Gainesville, Flo, USA.

- Singh AK, Dhanapal S and Yadav BS, 2020. The dynamic responses of plant physiology and metabolism during environmental stress progression. *Molecular Biology Reports* 47(2): 1459-1470.
- Sefidkan F, Asgari F and Mirza M, 1998. Quantitative and qualitative study of compounds in Roman anise essential oil. *Research and Construction* 38 (11): 73-70. (In Persian with English abstract).
- Sofowora A, Ogunbodede E and Onayade A, 2013. The role and place of medicinal plants in the strategies for disease prevention. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines* 10(5): 210-229.
- Sun W, Shahrajabian MH and Cheng Q, 2019. Anise (*Pimpinella anisum* L.), a dominant spice and traditional medicinal herb for both food and medicinal purposes. *Cogent Biology* 5(1): 1-25.
- Swetha S and Padmavathi T, 2019. Mitigation of drought stress by *Piriformospora indica* in *Solanum melongena* L. cultivars. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences* 2:1-9.
- Tarraf W, Ruta C, De Cillis F, Tagarelli A, Tedone L and De Mastro G, 2015. Effects of mycorrhiza on growth and essential oil production in selected aromatic plants. *Italian Journal of Agronomy* 10(3):160-2.
- Vahabi K, Johnson JM, Drzewiecki C and Oelmüller R, 2011. Fungal staining tools to study the interaction between the beneficial endophyte *Piriformospora indica* with *Arabidopsis thaliana* roots. *Endocytobiosis and Cell Research* 21:77-88.
- Varma A, Savita S, Sahay N, Butehorn B and Franken P, 1998. *Piriformospora indica*, A cultivable plantgrowth- promoting root endophyte. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 2741-2744.
- Wang W, Xu J, Fang H, Li Z and Li M, 2020. Advances and challenges in medicinal plant breeding. *Plant Science* 7: 561-573.
- Young-Cheol Y, Hoi-Seon L, Hyeock Si, Lee J, Marshall C and Young-Joon A, 2005. Ovicidal and adulticidal activities of *Cinnamomum zeylanicum* bark essential oil compounds and related compounds against *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae). *International Journal for Parasitology* 35: 1595 - 1600.
- Yuan Y, Tang X, Jia Z, Li C, Ma J and Zhang J, 2020. The effects of ecological factors on the main medicinal components of *dendrobium officinale* under different cultivation modes. *Forests* 11(1): 94-106.