

تاثیر پاکلوبوترازول و تلقیح قارچ *Piriformospora indica* بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و صفات مورفولوژیک گیاه لوبیا سبز (*Phaseolus vulgaris* L.) تحت تنش سرما

معصومه علی‌زاده فروتن^۱، همت‌اله پیردشتی*^۲، یاسر یعقوبیان^۲ و ولی‌اله بابایی‌زاد^۳

^۱ گروه زراعت، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ^۲ گروه زراعت، پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ^۳ گروه گیاهپزشکی، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری (تاریخ دریافت: ۹۳/۰۸/۲۶، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۴/۰۲/۰۲)

چکیده:

به منظور بررسی اثر قارچ اندوفیت *Piriformospora indica* و پاکلوبوترازول در القای تحمل به تنش سرما در گیاه لوبیا سبز (*Phaseolus vulgaris* L.)، آزمایشی گلخانه‌ای در سال ۱۳۹۲ و در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری به صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار، اجرا شد. تیمارهای آزمایشی شامل سه سطح تنش سرما (شاهد، سه روز و شش روز تنش سرمای ۵ درجه سانتی‌گراد)، دو سطح تلقیح قارچی (بدون تلقیح و تلقیح قارچ *P. indica*) و سه سطح پاکلوبوترازول (صفر، ۴۰ و ۸۰ میلی‌گرم در لیتر) بود. تلقیح قارچ در مرحله‌ی کاشت، محلول‌پاشی پاکلوبوترازول در دو مرحله‌ی پنج و شش هفته پس از کاشت و تنش سرما هشت هفته پس از کاشت اعمال گردید و صفات مورفولوژیک، محتوای نسبی آب برگ (RWC) و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز (CAT) و پراکسیداز (POD) اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که اعمال تنش سرما به‌ویژه تنش شش روز سبب کاهش صفات طول ساقه، RWC و فعالیت POD گردید ولی افزایش حدود ۲/۳ برابری فعالیت CAT را در پی داشت. تلقیح قارچ *P. indica* در تنش سرمای شش روز افزایش ۸ درصدی تعداد گره و همچنین در تنش سه و شش روز، افزایش میزان RWC (به ترتیب حدود ۳ و ۱۱ درصد) و فعالیت CAT (به ترتیب ۲/۱۶ برابر و ۳۴ درصد) را در پی داشت. در تمام سطوح تنش سرما، محلول‌پاشی با غلظت ۸۰ میلی‌گرم در لیتر پاکلوبوترازول باعث افزایش فعالیت CAT (به ترتیب ۵۰، ۱۵۹ و ۸۷ درصد) گردید. در مجموع نتایج به دست آمده از این پژوهش نشان‌دهنده‌ی نقش مثبت قارچ *P. indica* و پاکلوبوترازول بر بهبود رشد و افزایش مقاومت گیاه لوبیا سبز نسبت به تنش سرما می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، پاکلوبوترازول، قارچ اندوفیت، لوبیا سبز، *Piriformospora indica*

مقدمه:

فشار شدیدی وارد می‌کند و تولیدات کشاورزی را کاهش می‌دهد. این تنش می‌تواند سرعت فرآیندهای بیوشیمیایی سلول‌ها را تحت تأثیر قرار داده و منجر به ایجاد عدم تعادل در فرآیندهای اصلی مسیرهای متابولیک شود (پائیزی و شریعتی، ۱۳۹۰؛ Jan et al., 2009). بررسی عوامل دخیل در خسارت سلولی نشان می‌دهد که ایجاد گونه‌های اکسیژن فعال به عنوان

گیاهان همواره در معرض طیف وسیعی از تنش‌های زیستی و غیرزیستی قرار دارند که امروزه به یک مشکل جهانی و زیست‌محیطی تبدیل شده است (Knight and Knight, 2001; Adya et al., 2013). دمای پایین نیز یک عامل زیست‌محیطی مهم است که بر رشد، زنده‌مانی و گسترش جغرافیایی گیاهان

قابل کشت معرفی گردید. نتایج تحقیقات نشان داده است که تلقیح طیف گسترده‌ای از گیاهان با *P. indica* اثر مثبتی روی زیست‌توده تولیدی گذاشته و اثرات فیزیولوژیکی متعددی مانند افزایش گلدهی، افزایش عملکرد، بهبود تغذیه‌ای گیاه و ایجاد تغییرات سیستمیکی (آمادگی دفاعی) وابسته به فعالیت مکانیسم‌های آنتی‌اکسیدانی در پی دارد. این اثرات سبب افزایش رشد و تحمل گیاه به تنش‌های زیستی و غیرزیستی می‌گردد (Waller et al., 2005; Deshmukh et al., 2006; Druege et al., 2007).

از سوی دیگر، پاکلوبوترازول که عضوی از گروه مهارکننده‌های رشد یعنی تریازول‌ها است نیز سبب افزایش مقاومت گونه‌های مختلف گیاهی به تنش‌های زیستی و غیرزیستی از جمله بیماری‌های قارچی، خشکسالی، آلودگی هوا و تنش دمایی بالا و پایین نیز می‌شود (Baninasab, 2009; Davis and Curry, 1991). پاکلوبوترازول تنظیم‌کننده بیوستز جبریلین است و اکسیداسیون کائورن به کائورنیک اسید (Kaurenic Acid) که به وسیله‌ی کائورن اکسیداز انجام می‌شود را مهار می‌کند (رضوی‌زاده و عمویگی، ۱۳۹۲). همچنین این ترکیب، سبب تغییر در توازن هورمون‌های آبسزیک اسید (ABA)، سیتوکینین (CK) و اتیلن می‌گردد (جعفری و همکاران، ۱۳۸۵). در حقیقت پاکلوبوترازول با کاهش آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از تنش‌های محیطی از طریق افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، از گیاهان محافظت می‌کند (Lin et al., 2006).

جنس *Phaseolus* در سراسر جهان پراکنده است. گیاهان این جنس در مناطق گرمسیری، نیمه‌گرمسیری و معتدل کشت می‌شوند. از بین ۳۰ گونه‌ی شناخته شده‌ی این جنس، فقط چهار گونه زراعی است که لوبیا سبز (*Phaseolus vulgaris* L.) مهم‌ترین آنهاست. لوبیا در بین انواع گیاهان تجارته‌ی دارای بیشترین میزان پروتئین بوده (باقری و همکاران، ۱۳۸۰؛ نصری و خلعتبری، ۱۳۹۰) و از جمله محصولات است که می‌توان در زمان‌های مختلف (بهار، تابستان و پاییز) به کشت آن در مازندران اقدام کرد (مقیان و همکاران، ۱۳۸۸). بنابراین با توجه به زمان‌های متفاوت کشت این گیاه، احتمال مواجه شدن

یکی از عوامل تخریب، سبب تغییر عوامل دخیل در حفظ ترکیبات غشایی، ترکیبات ضدانجماد، آنتی‌اکسیدان‌ها و فرآیندهای بسیار دیگری می‌گردد (Cao et al., 2010). میزان مقاومت در برابر تنش اکسیداتیو نیز بستگی به فعالیت مکانیسم‌های دفاعی دارد، این مکانیسم‌ها می‌توانند با جمع‌آوری انواع اکسیژن فعال و ترمیم نقاط صدمه دیده، تنش اکسیداتیو را کاهش داده و گیاه را به شرایط مطلوب برسانند (Jubany-Mari et al., 2010). هرچند در شرایط عادی نیز رادیکال‌های آزاد اکسیژن تولید می‌شوند، اما به هنگام تنش، تجمع ردوکتانت‌ها در سیستم چرخه‌ی انتقال الکترون فتوسنتزی، سبب تولید مقدار زیادی از رادیکال‌های آزاد اکسیژن مانند اکسیژن نوزاد، سوپراکسید، پراکسید هیدروژن و سایر رادیکال‌های هیدروکسیل می‌گردد که این رادیکال‌ها با اجزا و ترکیب‌های سلولی چون لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک واکنش نشان داده و منجر به پراکسیداسیون غشا، تخریب پروتئین‌ها و جهش در مولکول‌های DNA می‌گردند (Modarresi et al., 2012; Zhu et al., 2009).

به طور کلی تولید محصولات کشاورزی به‌ویژه در شرایط وجود تنش‌های محیطی، نیازمند برنامه‌ریزی و اقدامات راهبردی دقیق است تا میزان تولید این محصولات پاسخگوی نیازهای جمعیت روبه رشد جهان باشد. یک راهکار ممکن در این زمینه، بهره‌برداری از همزیستی میکوریزایی برای تحریک رشد گیاه به‌ویژه در شرایط تنش‌زا می‌باشد (Adya et al., 2013). قارچ *Piriformospora indica* نیز رابطه همزیستی با گیاهان داشته و در افزایش تحمل به تنش‌های محیطی مؤثر واقع می‌گردد (کاری دولت‌آبادی و همکاران، ۱۳۹۱). قارچ *P. indica* یک شبه‌میکوریزا است که رفتار قارچ‌های میکوریزا را در همزیستی با گیاهان تقلید می‌کند. این قارچ برای اولین بار در سال ۱۹۹۸ به وسیله‌ی ورما و همکاران (Verma et al., 1998) از ریزوسفر درختچه‌های چوبی کهور (*Prosopis juliflora*) و کنار (*Zizyphus numularia*) در بیابان تار (Thar) که در بخش غربی ایالت راجستان در شبه قاره‌ی هند واقع است، جداسازی شده و به عنوان یک شبه‌میکوریزای

۵۰۰ میلی لیتر سوسپانسیون اسپور قارچی و نیم دیگر درون بشر حاوی ۵۰۰ میلی لیتر محلول آب-تویین یک در هزار غوطه‌ور شده و به مدت ۴ ساعت روی شیکر با سرعت ۸۰ دور در دقیقه قرار گرفتند. تعداد ۱۲ عدد بذر در عمق ۲ سانتی متری خاک گلدان‌های پلاستیکی با گنجایش دو کیلوگرم خاک کشت گردید و بوته‌ها در دو مرحله‌ی دو هفته و چهار هفته پس از کاشت تنک شده و به ۶ بوته در هر گلدان کاهش یافت.

محلول‌پاشی پاکلوبوترازول در دو مرحله و طی هفته‌های پنجم و ششم پس از کاشت صورت گرفت. برای تیمار صفر میلی گرم در لیتر پاکلوبوترازول نیز به منظور یکسان‌سازی شرایط تیماری از آب مقطر استفاده گردید. هشت هفته پس از کاشت و دو هفته پس از دومین محلول‌پاشی، دو سوم گلدان‌ها برای اعمال تنش سرمازدگی به اتافک رشد (مدل SPG30000، شرکت نور صنعت) با دمای ۵ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. پس از سه و شش روز تنش سرما گلدان‌ها از اتافک رشد خارج شده و پس از گذشت دوازده ساعت، سه بوته از هر گلدان جهت نمونه‌برداری صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی انتخاب و نمونه‌برداری از برگ‌های بالای بوته‌ها صورت گرفت. سه بوته باقی‌مانده نیز برداشت شده و طول ساقه، ارتفاع بوته، قطر ساقه، تعداد برگ در بوته و تعداد گره ساقه اندازه‌گیری شد.

محتوای نسبی آب برگ: محتوای نسبی آب برگ با استفاده از روش ایریگوین و همکاران (Irigoyen et al., 1992) و با قرار دادن نمونه‌های تازه برگ‌ها به مدت ۲۴ ساعت در آب مقطر اندازه‌گیری و با استفاده از رابطه ۱ محاسبه گردید.

$$RWC = \frac{FW - DW}{SW - DW} \times 100$$

در این رابطه F_w : وزن تر برگ بلافاصله بعد از نمونه‌برداری، D_w : وزن خشک برگ بعد از قرار گرفتن در آن و S_w : وزن اشباع برگ بعد از قرار گرفتن در آب مقطر است.

اندازه‌گیری آنزیم‌ها: برای استخراج محلول‌های آنزیمی کاتالاز و پراکسیداز، ۰/۵ گرم از نمونه برگ‌ها با استفاده از هاون چینی کاملاً سرد و نیتروژن مایع همگن و سپس به آن ۵ میلی لیتر بافر فسفات سرد (pH= 7.5) محتوی EDTA ۰/۵ میلی

آن با سرمای بهاره یا پاییزه وجود دارد. از این رو، با توجه به موارد مطرح شده، این پژوهش با هدف بررسی میزان اثربخشی همزمان تلقیح قارچ *P. indica* و محلول‌پاشی پاکلوبوترازول بر افزایش تحمل به تنش سرمازدگی در گیاه لوبیا سبز اجرا شد.

مواد و روش‌ها:

این آزمایش در بهار ۱۳۹۲ در گلخانه‌ی تحقیقاتی پژوهشکده‌ی ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان واقع در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری به صورت فاکتوریل برپایه‌ی طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار اجرا شد. تیمارهای آزمایشی شامل دو سطح عدم تلقیح و تلقیح با قارچ *Piriformospora indica*، سه سطح پاکلوبوترازول (صفر، ۴۰ و ۸۰ میلی گرم در لیتر) و سه سطح تنش سرما (شاهد، سه روز و شش روز در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد) بود. خاک مورد استفاده در این پژوهش از عمق ۰-۳۰ سانتی متری مزرعه‌ی تحقیقاتی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری تهیه شده و پس از الک کردن با نسبت ۱:۲ با ماسه شسته مخلوط گردید. به منظور افزایش دقت آزمایش و بررسی دقیق‌تر اثر قارچ *P. indica*، خاک مورد استفاده به مدت یک ساعت در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه‌ی سانتی‌گراد استریل شد. اطلاعات خاک مورد استفاده در پژوهش، در جدول ۱ آورده شده است.

سویه‌ی قارچ *P. indica* از مجموعه‌ی قارچ‌های زنده آزمایشگاه قارچ‌شناسی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری تهیه و پس از کشت در محیط کشت کفر (Kaefer, 1977)، به مدت چهار هفته در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری و پس از اسپورزایی، اسپورهای قارچی از محیط کشت جداسازی و پس از رساندن به غلظت 5×10^6 اسپور در میلی لیتر برای تلقیح بذرهای لوبیا سبز رقم سان ری (Sunray) استفاده شد. قبل از تلقیح، بذرها با هیپوکلریت سدیم یک درصد به مدت ۲۰ دقیقه ضدعفونی و چند بار با آب مقطر شستشو شدند (Blee and Anderson, 1996). سپس بذرها به مدت سه روز در ژرمیناتور با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد جوانه‌دار گردید. بذرهای جوانه‌دار به دو قسمت تقسیم و برای یکسان‌سازی شرایط تلقیح، نیمی از بذرها درون بشر حاوی

جدول ۱- برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک مورد استفاده در پژوهش

بافت خاک	رس	سیلت	شن	نیترژن	فسفر	پتاسیم	اسیدیته	هدایت الکتریکی
	درصد (%)				(ppm)		(pH)	(dSm ⁻¹)
رسی لومی	۴۲/۲	۳۵/۸	۲۲	۰/۲۱	۱۴/۵	۲۷۰	۷/۶۵	۱/۵۲

نرم افزار Excel استفاده گردید.

نتایج و بحث:

صفات مورفولوژیک: بر اساس جدول تجزیه واریانس داده‌های مربوط به صفات مورفولوژیک (جدول ۲)، اثر ساده‌ی تنش سرما بر تمام صفات اندازه‌گیری شده به جز قطر ساقه، در سطح یک درصد معنی‌دار شد. اثر همزیستی قارچی بر قطر ساقه، تعداد برگ در بوته و تعداد گره ساقه ($P \leq 0/01$) و همچنین اثر ساده‌ی پاکلوبوترازول بر ارتفاع بوته ($P < 0/01$)، تعداد برگ در بوته ($P < 0/05$) و تعداد گره ساقه ($P < 0/01$) معنی‌دار بود. برهمکنش سرما و تلقیح قارچ بر صفات تعداد برگ در بوته ($P < 0/01$) و تعداد گره ساقه ($P < 0/05$) و برهمکنش سرما و پاکلوبوترازول بر ارتفاع بوته، قطر ساقه ($P < 0/01$) و تعداد گره ساقه ($P < 0/05$) اثر معنی‌داری داشت، در حالی که برهمکنش قارچ و پاکلوبوترازول بر هیچ یک از صفات اندازه‌گیری شده معنی‌دار نبود. برهمکنش سه گانه‌ی سرما، قارچ و پاکلوبوترازول نیز بر صفات قطر ساقه ($P < 0/05$) و تعداد برگ در بوته ($P < 0/01$) اثر معنی‌داری نشان داد.

بوته‌های در معرض تنش سرمای سه روز، ساقه‌های بلندتری نسبت به بوته‌های شاهد (بدون تنش) داشتند درحالی که اعمال تنش شش روز سبب کاهش چشمگیر طول ساقه نسبت به شرایط شاهد و تنش سه روز سرمازدگی شد (شکل ۱). در پژوهشی مشابه، کاهش رشد رویشی در گیاه گندم نیز در اثر تنش سرما گزارش شده است (Tobeh and Jamaati-e-Somarin, 2012). تنش سرما با تأثیر بر فعالیت‌های فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و آسیب بافت‌ها و سلول‌ها سبب اختلال در تولید کلروفیل و کلروپلاست شده و در نتیجه بر فتوسنتز اثر منفی می‌گذارد. همچنین فتوسنتز خالص گیاهان در تنش سرما کاهش می‌یابد که به دلیل توقف جریان سیتوپلاسمی، کاهش انرژی در فتوسنتز

مولار اضافه شد. همگن‌ها پس از انتقال به لوله‌های آزمایش، به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۲۰۰۰۰ در دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، سانتریفیوژ شدند (Sairam et al., 2002).

فعالیت آنزیم کاتالاز بر اساس روش ابی (Aebi, 1984) اندازه‌گیری شد. کمپلکس واکنشی شامل ۱/۵ میلی‌لیتر از بافر پتاسیم فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار (pH=7)، ۰/۵ میلی‌لیتر پراکسید هیدروژن ۷/۵ میلی‌مولار و ۵۰ میکرولیتر از محلول آنزیمی می‌باشد که حجم نمونه‌ها با اضافه کردن آب مقطر به ۳ میلی‌لیتر رسانده شد. با افزودن پراکسید هیدروژن واکنش آغاز می‌گردد و کاهش در جذب نمونه‌ها در طول موج ۲۴۰ نانومتر در مدت یک دقیقه ثبت گردید.

کمپلکس واکنشی آنزیم پراکسیداز (دو میلی‌لیتر) شامل یک میلی‌لیتر بافر فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار (pH=7)، ۲۵۰ میکرولیتر از EDTA ۰/۱ میلی‌مولار، یک میلی‌لیتر گایاکول ۵ میلی‌مولار، یک میلی‌لیتر پراکسید هیدروژن ۱۵ مولار و ۵۰ میکرولیتر از محلول آنزیمی استخراج شده بود. واکنش با اضافه کردن محلول آنزیمی شروع شده و افزایش جذب در طول موج ۴۷۰ نانومتر به مدت یک دقیقه ثبت شد (Tang and Newton, 2005).

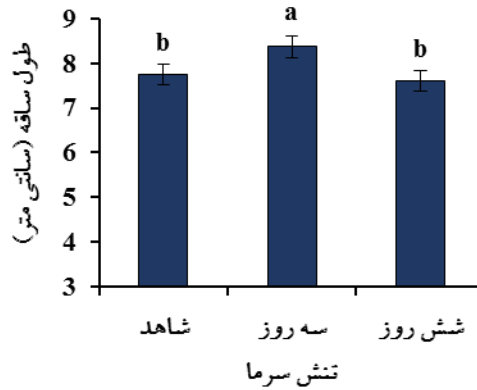
میزان پروتئین موجود در نمونه‌های آنزیمی استخراج شده، به روش بردفورد (Bradford, 1976) اندازه‌گیری شد. کمپلکس واکنش شامل ۱۰۰ میکرولیتر از محلول آنزیمی استخراج شده، ۲۰۰ میکرولیتر معرف بردفورد و ۷۰۰ میکرولیتر آب دیونیزه بود و جذب آنها در طول موج ۵۹۵ نانومتر یادداشت شد.

آزمون نرمال بودن داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS و روش کولموگروف-اسمیرنوف انجام گرفت. سپس داده‌ها به روش تجزیه واریانس و به وسیله‌ی نرم افزار آماری SAS نسخه ۹/۱ (SAS Institute, 2009) تجزیه و مقایسه‌ی میانگین‌ها با استفاده از آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) در سطح احتمال پنج درصد انجام شد. برای رسم نمودارها از

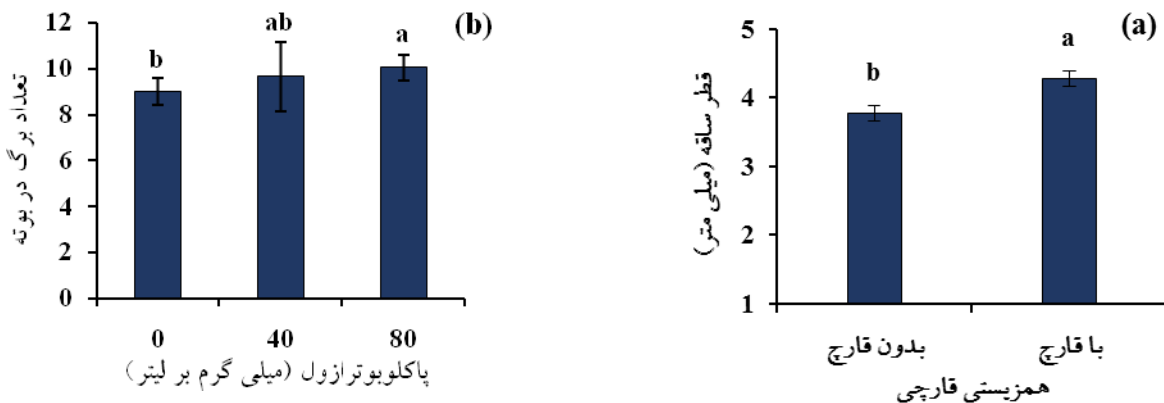
جدول ۲- میانگین مربعات (MS) اثر سرما، قارچ و پاکلوبوترازول بر صفات مورفولوژیک لوبیا سبز.

منابع تغییر	درجه آزادی	طول ساقه	ارتفاع بوته	قطر ساقه	تعداد برگ در بوته	تعداد گره ساقه
تنش سرما (C)	۲	۳/۰۱**	۱۲/۵۶*	۰/۰۷ ^{ns}	۵۴/۵۷**	۳/۱۲**
قارچ (F)	۱	۰/۰۵ ^{ns}	۲/۸۶ ^{ns}	۳/۲۲**	۷۸/۲۴**	۳/۶۲**
پاکلوبوترازول (P)	۲	۰/۶۹ ^{ns}	۷/۹۲**	۰/۰۴ ^{ns}	۵/۱۲*	۰/۷۹**
C×F	۲	۰/۷۲ ^{ns}	۱/۲۷ ^{ns}	۰/۰۵ ^{ns}	۶/۱۲**	۰/۵۷*
C×P	۴	۱/۲۱ ^{ns}	۵/۳۱**	۰/۶۶**	۱/۴۹ ^{ns}	۰/۴۹*
F×P	۲	۰/۳۴ ^{ns}	۰/۷۶ ^{ns}	۰/۱۵ ^{ns}	۳/۶۸ ^{ns}	۰/۲۴ ^{ns}
C×F×P	۴	۰/۵۰ ^{ns}	۳/۲۴ ^{ns}	۰/۴۰*	۴/۶۵**	۰/۲۶ ^{ns}
خطای آزمایشی	۳۶	۰/۶۵	۱/۳۶	۰/۱۴	۱/۳۷	۰/۱۴
ضریب تغییرات (درصد)		۱۰/۲۶	۵/۱۲	۹/۵۳	۱۲/۲۲	۸/۵۱

* و ** معنی دار در سطح احتمال پنج و یک درصد. ns غیر معنی دار.



شکل ۱- اثر تنش سرما بر طول ساقه‌ی لوبیا سبز. حروف مشابه بیانگر عدم اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد است.



شکل ۲- اثر همزیستی قارچی بر قطر ساقه (a) و اثر پاکلوبوترازول بر تعداد برگ در بوته (b) گیاه لوبیا سبز. حروف مشابه بیانگر عدم اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد است.

داشت. به طوری که، قطر ساقه‌ی گیاهان تلقیح شده حدود ۱۳ درصد بیشتر از گیاهان تلقیح نشده بود (شکل ۲- a). کاربرد پاکلوبوترازول تعداد برگ را در گیاه لوبیا سبز به طور قابل

و فراهم نبودن فسفات های سرشار از انرژی می باشد و در نهایت منجر به کاهش رشد گیاه می شود (کافی و همکاران، ۱۳۸۸). تلقیح گیاه با قارچ *P. indica* افزایش قطر ساقه را به دنبال

در تنش شش روز، در گیاهان همزیست با قارچ سبب افزایش ۸ درصدی در تعداد گره نسبت به گیاهان غیرهمزیست شد (جدول ۳). قارچ *P. indica* از طریق تولید اکسین سبب افزایش طول ریشه و جذب بیشتر عناصر غذایی می‌شود که نتیجه‌ی آن بهبود رشد در قسمت‌های هوایی گیاه است (کاری دولت‌آبادی و همکاران، ۱۳۹۱).

در برهمکنش تنش سرما و پاکلوبوترازول (جدول ۴)، در شرایط شاهد (بدون تنش) و تنش سرمای شش روز، محلول پاشی پاکلوبوترازول تعداد گره ساقه را به طور قابل‌ملاحظه‌ای افزایش داد، به طوری که این افزایش در تیمار بدون تنش سرما، برای غلظت‌های ۴۰ و ۸۰ میلی‌گرم در لیتر حدود ۴ درصد و در تنش سرمای شش روز به ترتیب حدود ۲۹ و ۲۴ درصد بود. در تنش سرمای سه روز، کاربرد پاکلوبوترازول اثر معنی داری بر تعداد گره در بوته نداشت (جدول ۴).

قطر ساقه و ارتفاع بوته گیاهان شاهد (بدون تنش سرما) و تنش سرمای سه روزه تحت تأثیر محلول‌پاشی پاکلوبوترازول قرار نگرفت اما در تنش شش روز، کاربرد پاکلوبوترازول قطر ساقه و ارتفاع بوته‌ی گیاهان را افزایش داد به طوری که بیشترین افزایش مربوط به غلظت ۴۰ میلی‌گرم در لیتر پاکلوبوترازول بود که به ترتیب حدود ۲۱ و ۱۵ درصد در مقایسه با غلظت صفر آن افزایش داشت (جدول ۴). شاکری و همکاران (۱۳۸۸) گزارش کردند که پس از محلول‌پاشی پاکلوبوترازول طول دم‌برگ در گیاه توت‌فرنگی بر عکس قطر دم‌برگ کاهش یافت. در مورد نقش پاکلوبوترازول بر پارامترهای رشد گزارش‌های متعددی وجود دارد. از جمله گزارش شده که پاکلوبوترازول کاهش رشد ناشی از تنش سرما را بهبود بخشید (Pinhero and Fletcher, 1994). سرما به عنوان یک تنش اسمزی، جذب آب از ریشه‌ی گیاه را محدود کرده و باعث افت پتانسیل آب و انتقال آب از سیمپلاست به آپوپلاست می‌شود که نتیجه‌ی آن کم‌آبی شدید است (محسن زاده و همکاران، ۱۳۸۹). با توجه به اینکه رشد و تقسیم سلولی نیازمند حفظ فشار تورژسانس می‌باشد و سلول‌ها باید حجم مناسبی برای تقسیم داشته باشند بنابراین به دنبال کمبود آب

ملاحظه‌ای افزایش داد. بر اساس شکل ۲-b در غلظت ۸۰ میلی‌گرم در لیتر پاکلوبوترازول بیشترین تعداد برگ مشاهده شد که نسبت به غلظت صفر آن حدود ۱۲ درصد افزایش داشت. گزارش‌های گوناگونی از اثر پاکلوبوترازول بر تعداد برگ در بوته وجود دارد به طوری که حجتی و همکاران (۱۳۸۹) در کوکب کوهی و Yeshitela و همکاران (۲۰۰۴) در گیاه انبه کاهش تعداد برگ در اثر کاربرد پاکلوبوترازول را گزارش کردند که برخلاف نتایج پژوهش حاضر است. همچنین در آزمایشی که روی توت‌فرنگی رقم سلوا انجام شد، تعداد برگ‌ها تحت تأثیر پاکلوبوترازول قرار نگرفت (شاکری و همکاران، ۱۳۸۸). به نظر می‌رسد اثر پاکلوبوترازول بر تولید برگ‌های جدید بستگی به غلظت مورد استفاده آن دارد. پاکلوبوترازول در غلظت‌های بالا تولید برگ را کاهش می‌دهد در حالی که غلظت‌های پایین، تعداد برگ را تحت تأثیر قرار نمی‌دهد (Young, 1983). همچنین بین زمان کاربرد پاکلوبوترازول و ظهور علائم ناشی از آن در گیاه فاصله‌ی زمانی وجود دارد که به عواملی چون زمان کاربرد، غلظت مورد استفاده، میزان تعرق، سرعت حرکت شیره‌ی گیاهی و میزان جیبرلین درونی بستگی دارد (شاکری و همکاران، ۱۳۸۸).

بر اساس مقایسه میانگین انجام شده در هر دو تیمار تلقیح بدون تلقیح با قارچ *P. indica*، تنش سرما کاهش تعداد برگ در بوته را به دنبال داشت. به طوری که در گیاهان بدون تلقیح قارچ، تنش سرمای شش روز و در گیاهان تلقیح شده، تنش سرمای سه روز بیشترین کاهش را (به ترتیب حدود ۱۵ و ۳۷ درصد) نسبت به شاهد نشان داد (جدول ۳). به نظر می‌رسد رشد کم یک حالت سازگاری برای زنده ماندن گیاه در شرایط تنش است، به دلیل این‌که در این حالت مواد غذایی و انرژی به جای استفاده در رشد شاخساره به سمت مولکول‌های نگهداری‌کننده‌ی گیاه در برابر تنش هدایت می‌شود (Khalid, 2006).

تعداد گره در گیاهان بدون قارچ و با قارچ در شرایط بدون تنش سرما (شاهد) تفاوتی با هم نداشتند. با اعمال تنش سرمای سه روز، تعداد گره در گیاهان همزیست شده با قارچ حدود ۲۵ درصد نسبت به گیاهان غیرهمزیست کاهش نشان داد اما

جدول ۳- مقایسه میانگین برهمکنش تنش سرما و قارچ بر تعداد برگ و تعداد گره در بوته‌ی لوبیا سبز.

تعداد گره در ساقه	تعداد برگ در بوته	تنش سرما	همزیستی قارچی
۴/۸۸ ^a	۱۰/۲۲ ^b	شاهد	بدون قارچ (-)
۵/۰۰ ^a	۱۲/۶۶ ^a	سه روز	
۴/۱۱ ^{bc}	۸/۶۶ ^c	شش روز	
۴/۸۸ ^a	۹/۸۸ ^b	شاهد	با قارچ (+)
۳/۷۷ ^c	۶/۲۲ ^d	سه روز	
۴/۴۴ ^b	۹/۷۷ ^{bc}	شش روز	

میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشابه در هر ستون بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

جدول ۴- مقایسه میانگین برهمکنش تنش سرما و پاکلوبوترازول بر صفات مورفولوژیک لوبیا سبز.

ارتفاع بوته (سانتی‌متر)	قطر ساقه (میلی‌متر)	تعداد گره ساقه	پاکلوبوترازول (mg.L^{-1})	تنش سرما
۲۲/۸۵ ^{ab}	۴/۰۸ ^{bc}	۴/۸۳ ^{ab}	۰	شاهد
۲۲/۳۶ ^b	۳/۸۴ ^{bc}	۵/۰۰ ^a	۴۰	
۲۳/۶۶ ^{ab}	۳/۹۲ ^{bc}	۵/۰۰ ^a	۸۰	
۲۳/۱۶ ^{ab}	۴/۱۲ ^{abc}	۴/۵۰ ^{bc}	۰	سه روز
۲۴/۰۱ ^a	۳/۸۵ ^{bc}	۴/۵۰ ^{bc}	۴۰	
۲۳/۵۵ ^{ab}	۴/۲۲ ^{ab}	۴/۵۰ ^{bc}	۸۰	
۲۰/۱۵ ^c	۳/۷۴ ^c	۳/۵۰ ^d	۰	شش روز
۲۳/۱۵ ^{ab}	۴/۵۲ ^a	۴/۵۰ ^{bc}	۴۰	
۲۲/۴۷ ^b	۳/۸۷ ^{bc}	۴/۳۳ ^c	۸۰	

میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشابه در هر ستون بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

و ایجاد تنش اسموتیک، با از دست رفتن آب سلول‌ها، فشار تورژسانس و حجم سلول کاهش یافته و این امر موجب کاهش رشد و تقسیم سلولی می‌گردد (Xing and Zhu, 2002).
صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی: نتایج حاصل از تجزیه واریانس اثر تیمارهای آزمایشی بر شاخص‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی (جدول ۵) نشان داد که اثر تنش سرما بر محتوای نسبی آب برگ و فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. اثر ساده‌ی قارچ *P. indica* بر محتوای نسبی آب برگ و فعالیت آنزیم‌های کاتالاز در سطح یک درصد و همچنین اثر ساده‌ی پاکلوبوترازول بر فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز ($P < 0/01$) معنی‌دار گردید.
 برهمکنش تنش سرما و قارچ بر محتوای نسبی آب برگ ($P < 0/01$) و فعالیت آنزیم‌های کاتالاز ($P < 0/01$) و پراکسیداز

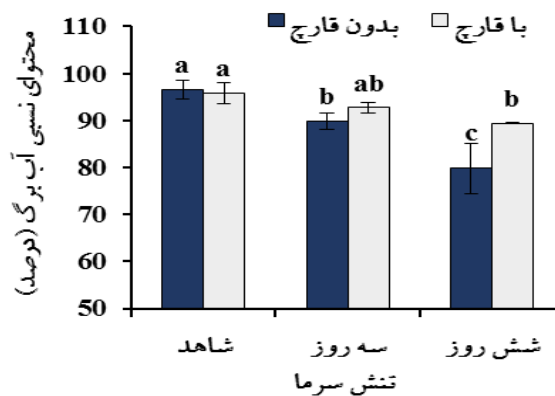
($P < 0/05$) معنی‌دار گردید. همچنین برهمکنش تنش سرما و پاکلوبوترازول بر تمام صفات به جز پروتئین محلول اثر معنی‌داری ($P < 0/01$) داشت ولی اثر متقابل قارچ و پاکلوبوترازول تنها بر محتوای نسبی آب برگ معنی‌دار بود. برهمکنش سه گانه‌ی تنش سرما، قارچ و پاکلوبوترازول نیز بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۵).
 بر اساس نتایج پژوهش حاضر، تنش سرمای سه و شش روزه در هر دو تیمار تلقیح و عدم تلقیح قارچ، محتوای نسبی آب برگ را نسبت به گیاهان شاهد (بدون تنش) به صورت معنی‌داری کاهش داد ولی میزان کاهش در دو تیمار قارچی متفاوت بود، به طوری‌که در گیاهان تلقیح شده با *P. indica* کاهش کمتری نسبت به گیاهان تلقیح نشده (به ترتیب حدود ۷ و ۱۷ درصد) مشاهده گردید (شکل ۳).

و ایجاد تنش اسموتیک، با از دست رفتن آب سلول‌ها، فشار تورژسانس و حجم سلول کاهش یافته و این امر موجب کاهش رشد و تقسیم سلولی می‌گردد (Xing and Zhu, 2002).
صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی: نتایج حاصل از تجزیه واریانس اثر تیمارهای آزمایشی بر شاخص‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی (جدول ۵) نشان داد که اثر تنش سرما بر محتوای نسبی آب برگ و فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. اثر ساده‌ی قارچ *P. indica* بر محتوای نسبی آب برگ و فعالیت آنزیم‌های کاتالاز در سطح یک درصد و همچنین اثر ساده‌ی پاکلوبوترازول بر فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز ($P < 0/01$) معنی‌دار گردید.
 برهمکنش تنش سرما و قارچ بر محتوای نسبی آب برگ ($P < 0/01$) و فعالیت آنزیم‌های کاتالاز ($P < 0/01$) و پراکسیداز

جدول ۵- میانگین مربعات (MS) اثر سرما، قارچ و پاکلوبوترازول بر صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی لوبیا سبز.

منابع تغییر	درجه آزادی	محتوای نسبی آب برگ	کاتالاز	پراکسیداز	پروتئین محلول
تنش سرما (C)	۲	۶۰۴/۳۴**	۰/۰۱۴**	۳/۲۴**	۰/۰۰۱۵ ^{ns}
قارچ (F)	۱	۲۰۸/۶۶**	۰/۰۰۲**	۰/۰۲ ^{ns}	۰/۰۰۳ ^{ns}
پاکلوبوترازول (P)	۲	۴۹/۳۲ ^{ns}	۰/۰۰۶**	۰/۸۶**	۰/۰۰۲ ^{ns}
C×F	۲	۱۲۵/۴۴**	۰/۰۰۱**	۰/۱۸*	۰/۰۰۱ ^{ns}
C×P	۴	۸۷/۳۳**	۰/۰۰۱**	۰/۵۹**	۰/۰۰۳ ^{ns}
F×P	۲	۷۲/۵۲*	۰/۰۰۰۱ ^{ns}	۰/۰۹ ^{ns}	۰/۰۰۲ ^{ns}
C×F×P	۴	۲۲/۹۵ ^{ns}	۰/۰۰۱**	۰/۴۵**	۰/۰۰۳ ^{ns}
خطای آزمایشی	۳۶	۲۹/۰۳	۰/۰۰۰۱	۰/۰۴	۰/۰۰۲
ضریب تغییرات (درصد)		۵/۲۹	۲۶/۰۱	۱۲/۵۳	۱۴/۱۴

* و ** معنی دار در سطح احتمال پنج و یک درصد. ns غیر معنی دار.



شکل ۳- برهمکنش تنش سرما و قارچ بر محتوای نسبی آب برگ گیاه لوبیا سبز. حروف مشابه بیانگر عدم اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد است.

فیزیولوژی برگ تأثیر می‌گذارد (Auge et al., 2001). میسلیم قارچ در خاک نقش مهمی در تأثیر قارچ بر رابطه آبی گیاه میزبان دارد و باعث جذب آب از منافذ بسیار ریز خاک می‌شود (Bearden, 2001). این قارچ‌ها احتمالاً از طریق تغییر در مورفولوژی ریشه و طول کردن سیستم ریشه گیاه میزبان و افزایش سطح جذب از طریق ریشه‌های قارچ، میزان آب بیشتری جذب کرده و باعث بهبود روابط آبی گیاه میزبان می‌گردد (Auge et al., 2001). با توجه به این موارد، احتمال می‌رود که افزایش محتوای نسبی آب برگ همزیستی با *P. indica* در تنش سرمادگی در گیاه لوبیا سبز نیز به دلیل بهبود روابط آبی در این نوع همزیستی باشد.

در تنش سرمای سه روزه غلظت‌های ۴۰ و ۸۰ میلی‌گرم در

گزارش‌هایی در رابطه با کاهش محتوای نسبی آب برگ (RWC) تحت تنش دمایی پایین در گیاهانی مانند، چهار رقم گندم (محسن‌زاده و همکاران، ۱۳۸۹) و دو گونه فسکیوی بلند (*Festuca arundinacea* Shreb) و مرتعی (*Festuca pratensis* Huds) (پارساییان و همکاران، ۱۳۸۵) ارایه شده است. با وجود اینکه *P. indica* از ریگزارهای گرم واقع در غرب راجستان هند جدا شده است، در دماهای پایین نیز در حضور میزبان‌های علفی ویژگی‌های منحصر به فردی را به نمایش می‌گذارد که هنوز در منابع به‌طور کامل به آن پرداخته نشده است (Varma et al., 2013)، اما بیان شده که همزیستی میکوریزایی اغلب منجر به تغییر سرعت حرکت آب در داخل و خارج گیاهان میزبان شده و بر آب‌گیری بافت و

معنی دار فعالیت آنزیم پراکسیداز همراه بود که این افزایش نسبت به گیاهان تلقیح نشده حدود ۱۴ درصد بود. اما در تنش سه و شش روز قارچ *P. indica* اثر معنی داری بر فعالیت آنزیم مذکور نداشت (شکل ۶-ب).

گزارشی در مورد نقش *P. indica* در سیستم آنتی اکسیدانی گیاه در تنش سرما وجود ندارد اما مطالعات اندکی در مورد افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی و سایر آنتی اکسیدان‌ها در تنش‌های خشکی و شوری در گیاهان همزیست شده با *P. indica* وجود دارد که می‌توان به افزایش فعالیت آنزیم آنتی اکسیدانی و میزان آسکوربیک اسید در ریشه‌ی جو تحت تنش شوری (Baltruschat et al., 2008)، افزایش فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز در تنش خشکی (Sun et al., 2010; Kumar et al., 2009) و افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی در شرایط بروز بیماری‌های گیاهی (Waller et al., 2005) اشاره کرد.

گزارش شده که *P. indica* سبب افزایش مقاومت در برابر تنش‌های غیرزیستی در گیاهان شده و افزایش رشد گیاه در شرایط تنش نیز در پی دارد (Kumari et al., 2003; Rai et al., 2005; Rai and Varma, 2001). *P. indica* سیستم دفاعی را تعدیل کرده و به منظور جبران خسارت به فتوسنتز و جلوگیری از آسیب اکسیداتیو ناشی از تنش، در متابولیسم گیاه تغییراتی ایجاد می‌کند. همچنین یافته‌ها حاکی از آن است که این قارچ سبب افزایش آنزیم‌های آنتی اکسیدانی متعددی شد که در سم-زدایی گونه‌های اکسیژن فعال نقش دارند. این آنزیم‌ها شامل سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز، گلوکاتایون ردوکتاز، پراکسیداز (POD)، مونو دهیدروآسکوربات ردوکتاز (MDHAR) و دهیدرو ردوکتاز (DHAR) می‌باشند. همچنین گزارش شده که *P. indica* سبب افزایش پاسخ‌های ژنتیکی گیاه به تنش‌ها می‌شود که در بالا بردن مقاومت گیاهان زراعی به تنش‌های غیرزیستی نقش دارد (Varma et al., 2012; Kumar et al., 2013).

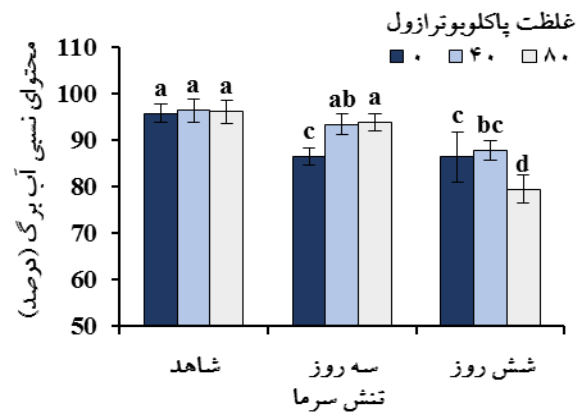
گاهی در شرایط تنش ممکن است قدرت آنتی اکسیدانی به منظور کاهش اثر آسیب‌های اکسیداتیو کافی نباشد به همین دلیل کاهش فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در اثر تنش سرما منطقی به نظر

لیتر پاکلوبوترازول محتوای نسبی آب برگ را نسبت به سطح صفر آن به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش داد. با این وجود، در تنش سرمای شش روز، تیمار پاکلوبوترازول اثر مثبتی بر محتوای نسبی آب برگ نداشت و حتی غلظت ۸۰ میلی گرم در لیتر آن اثر کاهشی داشته و میزان RWC را نسبت به سطوح صفر و ۴۰ میلی گرم در لیتر کاهش داد. غلظت پایین پاکلوبوترازول (۴۰ میلی گرم در لیتر) بیشترین اثر را بر محتوای نسبی آب برگ داشت و غلظت ۸۰ میلی گرم در لیتر این ماده نتوانست اثر تخریبی تنش سرما را جبران کند (شکل ۴).

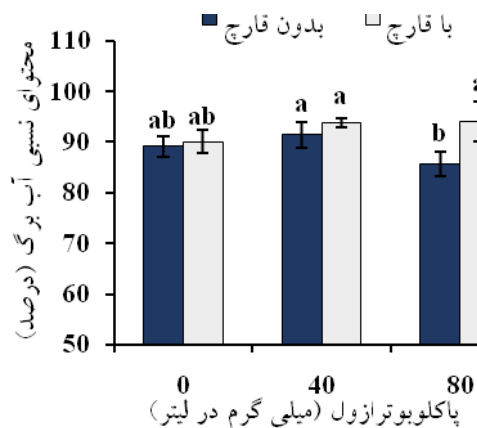
در شرایط بدون تلقیح قارچ *P. indica* کاربرد غلظت ۴۰ میلی گرم در لیتر پاکلوبوترازول در محتوای نسبی آب برگ اثر چندانی نداشت و غلظت ۸۰ میلی گرم در لیتر سبب کاهش چهار درصدی آن گردید، ولی این روند در تلقیح قارچ *P. indica* بر عکس بوده و افزایش میزان RWC را به دنبال داشت. در غلظت ۸۰ میلی گرم در لیتر پاکلوبوترازول تلقیح *P. indica* سبب افزایش ۱۰ درصدی محتوای نسبی آب برگ نسبت به شرایط بدون تلقیح آن شد (شکل ۵).

فعالیت آنزیم کاتالاز تحت تأثیر تنش سرما و تلقیح قارچ *P. indica* قرار گرفت. اعمال تنش سه و شش روز سبب افزایش فعالیت این آنزیم گردید که بیشترین فعالیت آن در تنش شش روزه و با افزایش ۲/۳ برابری نسبت به تیمار شاهد مشاهده شد. در گیاهانی که به مدت سه و شش روز تحت تنش سرمای ۵ درجه سانتی‌گراد قرار داشتند، تلقیح قارچ *P. indica* فعالیت آنزیم کاتالاز را به طور معنی داری افزایش داد که این افزایش برای تنش سه و شش روزه به ترتیب ۲/۱۶ برابر و ۳۴ درصد بود ولی در گیاهان شاهد (بدون تنش سرما) تفاوت معنی داری بین تیمار تلقیح و عدم تلقیح قارچ مشاهده نشد (شکل ۶-ا).

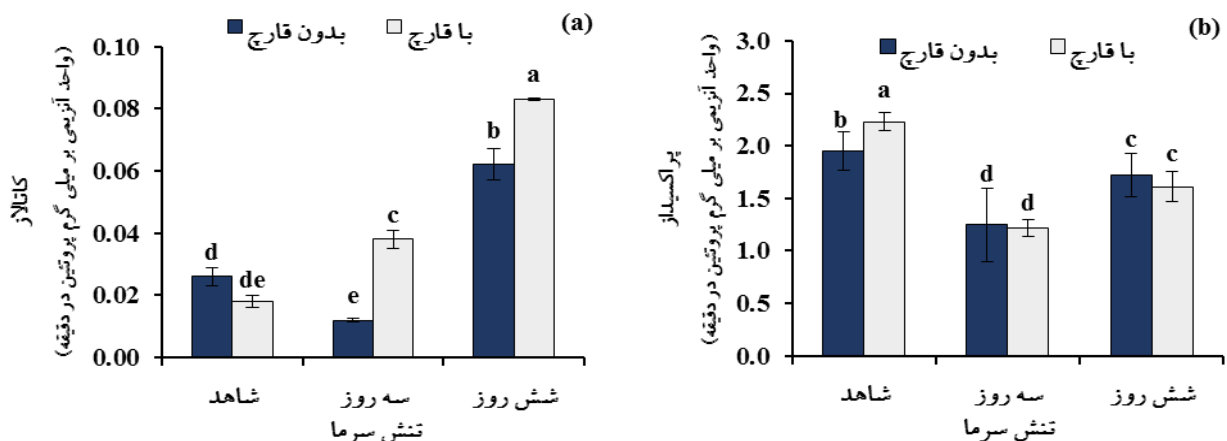
فعالیت آنزیم پراکسیداز برخلاف آنزیم کاتالاز، در اثر تنش سرما از روند کاهشی برخوردار بود به طوری که با اعمال تنش سه روزه سرما کاهش فعالیت آن مشهود بود ولی با ادامه تنش تا شش روز افزایش فعالیت این آنزیم مشاهده شد هر چند در تنش شش روز نیز نسبت به شرایط شاهد، فعالیت کمتری داشت. در گروه شاهد (بدون تنش سرما) تلقیح قارچ با افزایش



شکل ۴- برهمکنش تنش سرما و پاتریوترازول بر محتوای نسبی آب برگ گیاه لویا سبز. حروف مشابه بیانگر عدم اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد است.



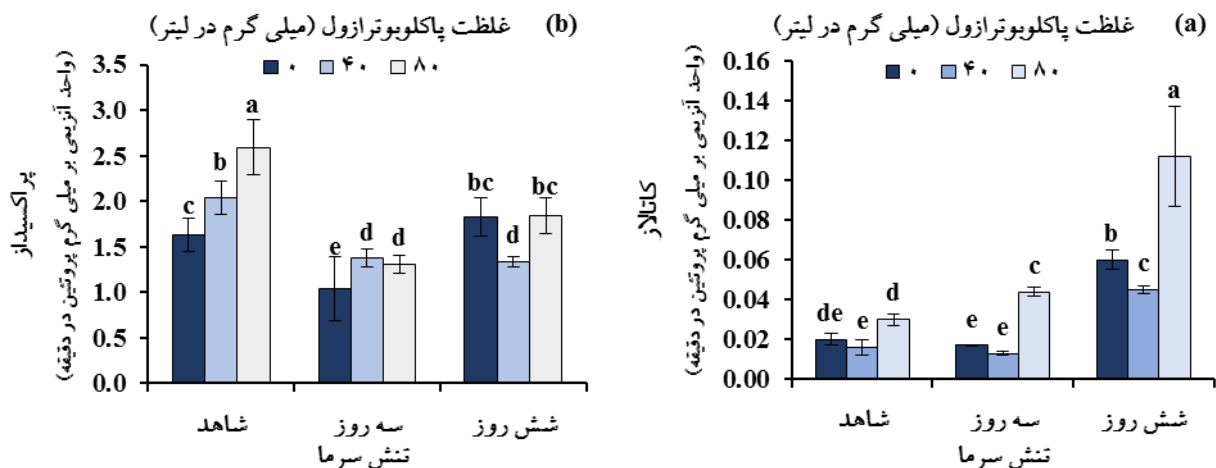
شکل ۵- برهمکنش قارچ و پاتریوترازول بر محتوای نسبی آب برگ گیاه لویا سبز. حروف مشابه بیانگر عدم اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد است.



شکل ۶- برهمکنش سرما و قارچ بر فعالیت آنزیم‌های کاتالاز (a) و پراکسیداز (b) برگ گیاه لویا سبز. حروف مشابه بیانگر عدم اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد است.

در حذف گونه‌های فعال اکسیژن باشد. کاتالاز یکی از اجزای مهم سیستم آنتی‌اکسیدانی است که هیدروژن پراکسید تولید شده از فعالیت سوپراکسید دیسموتاز را تجزیه می‌کند

می‌رسد (شاهاندرستی و همکاران، ۱۳۹۰؛ سلطانی و همکاران، ۱۳۹۰). همچنین احتمال دارد کاهش آنزیم پراکسیداز و افزایش آنزیم کاتالاز در این آزمایش به دلیل کافی بودن فعالیت کاتالاز



شکل ۷- برهمکنش تنش سرما و پاکلوبوترازول بر کاتالاز (a) و پراکسیداز (b) برگ گیاه لوبیا سبز. حروف مشابه بیانگر عدم اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد است.

پراکسی زوم و گلی اکسی زوم و میتوکندری ایفا می کند (Seckin *et al.*, 2010; Foyer and Nector, 2000). افزایش فعالیت کاتالاز در گیاهان سخت شده به سرما می تواند به جلوگیری از آسیب های ناشی از تنش کمک نماید، زیرا ممکن است سطوح سوپراکسید و مواد اکسیدشده تک اکسیژنه در بافت سرمزده افزایش یابد (کافی و مهدوی دامغانی، ۱۳۸۶). همچنین گزارش شده پاکلوبوترازول ممکن است اثرات تنش سرما را از طریق افزایش سطح آنزیم های آنتی اکسیدانی بهبود بخشد (Lin *et al.*, 2006; Sankar *et al.*, 2007).

نتیجه گیری کلی:

در مجموع می توان بیان داشت که تلقیح قارچ *P. indica* و همچنین محلول پاشی پاکلوبوترازول به میزان قابل توجهی شرایط نامساعد تنش سرمزدگی را بهبود بخشیده و سبب افزایش تحمل گیاه لوبیا سبز به این تنش گردید، که البته جهت تکمیل نتایج، پژوهش های گلخانه ای و مزرعه ای بیشتری در این زمینه لازم است.

سپاسگزاری:

بدینوسیله از مساعدت ها و حمایت های مالی پژوهشکده زنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری قدردانی می گردد.

(Foyer *et al.*, 1994; Pan *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2009).

در گیاهان شاهد و تنش سه روز و شش روز با محلول پاشی غلظت های ۴۰ و ۸۰ میلی گرم در لیتر پاکلوبوترازول فعالیت آنزیم کاتالاز ابتدا کاهش و سپس افزایش یافت. گیاهان محلول پاشی شده با غلظت ۸۰ میلی گرم در لیتر پاکلوبوترازول از فعالیت آنزیمی بیشتری برخوردار بودند (شکل ۷- a).

فعالیت آنزیم پراکسیداز پس از محلول پاشی غلظت های مختلف پاکلوبوترازول در گیاهان شاهد (بدون تنش سرما) افزایش تدریجی داشت به طوری که این افزایش در غلظت ۸۰ نسبت به غلظت ۴۰ و صفر میلی گرم در لیتر به ترتیب حدود ۲۷ و ۵۹ درصد بود. با افزودن غلظت ۴۰ و ۸۰ میلی گرم در لیتر پاکلوبوترازول در تنش سه روز فعالیت آنزیم پراکسیداز نسبت به غلظت صفر میلی گرم در لیتر افزایش یافت. همچنین در تنش شش روز با اضافه کردن پاکلوبوترازول ابتدا کاهش و سپس افزایش در فعالیت این آنزیم رخ داد که بین غلظت صفر و ۸۰ میلی گرم در لیتر تفاوت معنی داری وجود نداشت (شکل ۷- b).

افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز در این پژوهش با نتایج تنش سرما بر روی گیاه نخود که به وسیله ونایی و همکاران (۱۳۹۰) گزارش شده است، همخوانی دارد. کاتالاز از شناخته شده ترین آنزیم های آنتی اکسیدانی است که نقش مهمی در جمع آوری پراکسید هیدروژن و کاهش اثرات تخریبی آن در

منابع:

- های *Sebacina vermifera* و *Piriformospora indica* روی نعنای فلفلی (*Mentha piperita*) و آویشن (*Thymus vulgaris*) در شرایط درون شیشه‌ای. فصلنامه گیاهان دارویی ۲۲: ۱۳-۲۰۰۲.
- کاظمی شاهاندشتی، ص. معالی‌امیری، ر. زینالی‌خانقاه، . (۱۳۹۰) بررسی برخی شاخصهای خسارت سلولی تحت تنش سرما در نخود جم. فصلنامه ژنتیک نوین. ۴: ۷۷-۷۰.
- کافی، م.، برزویی، ا.، صالحی، م.، کمندی، ع.، معصومی، ع. و نباتی، ج. (۱۳۸۸) فیزیولوژی تنش‌های محیطی در گیاهان. انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد. ۵۰۲ صفحه.
- کافی، م. مهدوی‌دامغانی، ع. (۱۳۸۶) مکانیسم‌های مقاومت گیاهان به تنش‌های محیطی. ترجمه. انتشارات دانشگاه مشهد. ۴۶۷ صفحه.
- محسن‌زاده، س.، کریمی‌اندانی، ج. و محبت‌کار، حسن. (۱۳۸۹) مطالعه پاسخ‌های فیزیولوژیکی و توالی یکی از ژن پاسخ دهنده به تنش سرما در چهار رقم گندم حساس و مقاوم. مجله علوم گیاهان زراعی ایران ۴۱: ۶۲۱-۶۱۳.
- ونایی، س.، سی و سه مرده، ع. و حیدری، غ. (۱۳۹۰). اثرات تنش سرما در مرحله جوانه‌زنی و گیاهچه‌ای بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و برخی صفات فیزیولوژیکی در نخود (*Cicer arietinum* L.). فصلنامه پژوهش‌های زراعی ایران ۹: ۵۲۴-۵۱۴.
- Adya, A. K., Gautam, A., Zhang, L. and Varma, A. (2013) Characterization of *Piriformospora indica* Culture Filtrate. *Piriformospora indica*. Soil Biology 33: 345-375.
- Auge, R. M., Stodola, A. J. W., Tims, J. E. and Saxton, A. M. (2001) Moisture retention properties of a mycorrhizal soil. *Journal of Plant and Soil*. 230: 87-97.
- Aebi, H. (1984) Catalase *in vitro*. *Method of Enzymology* 105:121-126.
- Bradford, M. M. (1976) A Rapid and sensitive method for the quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Methods of Biochemical Analysis* 72:248-254.
- Baltruschat, H., Fodor, J., Harrach, B. D., Niemczyk, E., Barna, B., Gullner, G., Janeczko, A., Kogel, K. H., Schäfer, P., and Schwarczinger, I. (2008) Salt tolerance of barley induced by the root endophyte *Piriformospora indica* is associated with a strong
- پائیزی، م. و شریعتی، م. (۱۳۹۰) بررسی اثر تنش دمای پایین بر عملکرد فتوسیستم II در جلبک *Dunaliella salina* با استفاده از کینتیک فلوروسنس کلروفیل a. مجله سلول و بافت. ۲(۴): ۳۹۵-۴۰۵.
- پارسایان، م.، میرلوحی، آ.، رضایی، ع. و خیام‌نکویی، م. (۱۳۸۵) تأثیر قارچ‌های اندوفایت بر خصوصیات فیزیولوژیکی و مقاومت به سرما در گونه فسکیوی مرتعی و فسکیوی بلند. مجله علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی (علوم آب و خاک). ۱۰: ۲۱۱-۱۹۷.
- جعفری، ر.، منوچهری کلانتری، خ. و ترکزاده، م. (۱۳۸۵) بررسی اثرات پاکلوبوترازول بر افزایش مقاومت به سرما در نهال‌های گوجه‌فرنگی (*Lycopersicon esculentum* L.). مجله‌ی زیست‌شناسی ایران ۱۹: ۲۹۸-۲۹۰.
- حجتی، م.، اعتمادی، ن.ا. و بانی‌نسب، ب. (۱۳۸۹) اثر پاکلوبوترازول و سایکوسل بر رشد رویشی و گلدهی کوکب کوهی. فصلنامه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی) ۲۴: ۱۲۷-۱۲۲.
- رضوی‌زاده، ر. و عمویگی، م. (۱۳۹۲) تأثیر پاکلوبوترازول بر بهبود تحمل به خشکی در گیاهچه‌های کلزا (*Brassica napus* L.) در شرایط کشت درون شیشه‌ای (*in vitro*). فصلنامه فرآیند و کارکرد گیاهی ۲: ۳۴-۲۱.
- سلطانی‌دلریا، ن. کریمان، ر. رنجبر، م. (۱۳۹۰) اثر برهمکنش سالیسیلیک اسید و تنش سرما بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاه شیرین بیان (*Glycyrrhiza glabra* L.). مجله‌ی داروهای گیاهی ۲: ۱۳-۷.
- شاگری، ف.، بانی‌نسب، ب.، قبادی، س. و مبلی، م. (۱۳۸۸). اثر غلظت و روش استفاده از پاکلوبوترازول بر رشد رویشی و زایشی توت‌فرنگی رقم سلوا (*Fragaria × ananassa* Duch. cv. Selva). فصلنامه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی). ۲۳: ۲۴-۱۸.
- کاری دولت‌آبادی، ح.، محمدی گل‌تپه، ا.، معینی، ا. و ورما، آ. (۱۳۹۱) ارزیابی تأثیر غلظت‌های مختلف اکسین و قارچ

- Knight, H. and Knight, M. R. (2001) Abiotic stress signaling pathways: specificity and cross-talk. *Journal of Trends Plant Science* 6: 262-267.
- Kumar, M., Sharma, R., Jogawat, A., Singh, P., Dua, M., Gill, S.S., Trivedi, D. K., Tuteja, N., Varma, A. K., Oelmueller, R., and Johri, A. K. (2012) *Piriformospora indica* a root endophytic fungus, enhances abiotic stress tolerance of the host plant. *Improving Crop Resistance to Abiotic Stress*. 1 and 2: 543-548.
- Kumar, M., Yadav, V., Tuteja, N., and Johri, AK. (2009) Antioxidant enzyme activities in maize plants colonized with *Piriformospora indica*. *Microbiology*. 155: 780-790.
- Kumari, R., H. Kishan, Y. K. Bhoon and A. Varma, (2003) Colonization of cruciferous plants by *Piriformospora indica*. *Current Science* 85: 1672-1674.
- Lin, K. H. R., Tsou, C. C., Hwang, S. Y., Chen, and L. F. O., Lo, H. F. (2006) Paclobutrazol pre-treatment enhanced flooding tolerance of sweet potato. *Journal of Plant Physiology* 163:750-760.
- Modarresi, M., G. Nematzadeh, F. Moradian and S. M. Alavi. (2012) Identification and Cloning of the Cu/Zn Superoxide Dismutase Gene from Halophyte Plant *Aeluropus litoralis*. *Russian Journal of Genetics* 48: 130-134.
- Pan, Y., Jun, W. L. and Liang. Y. Z. (2006) Effect of salt and drought stress on antioxidant enzyme activities and SOD isoenzymes of liquorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch). *Plant Growth Regulation* 49: 157-165.
- Pinhero, R., and Fletcher, R. (1994) Paclobutrazol and ancymidol protect corn seedlings from high and low temperature stresses. *Plant Growth Regulation* 15: 47-53.
- Rai, M., D. Achaya, A. Singh and Varma, A. (2001) Positive growth responses of the medicinal plants *Spilanthes calva* and *Withania somnifera* to inoculation by *Piriformospora indica* in a field trial. 2001. *Mycorrhiza* 11: 123-128.
- Rai, M. and Varma, A. (2005) Arbuscular mycorrhizal-like biotechnological potential of *Piriformospora indica*, which promotes the growth of *Adhatoda vasica*. *Electronic Journal of Biotechnology* 8: 107-111.
- Sankar, B., Jaleel, C. A., Manivannan, P., Kishorekumar, A., Somasundaram, R. and Panneerselvam, R. (2007) Drought-induced biochemical modifications and proline metabolism in *Abelmoschus esculentus* (L.) Moench. *Acta Botanica Croatica* 66: 43-56.
- Seckin, B., Turkan, I., Sekmen, A. H., and Ozfidan, C. (2010) The role of antioxidant defense systems at differential salt tolerance of *Hordeum marinum* Huds. (sea barley grass) and *Hordeum vulgare* L. (cultivated barley). *Journal of Environmental and Experimental Botany* 69: 76-85.
- increase in antioxidants. *Journal New Phytologist* 180: 501-510.
- Baninasab, B. (2009) Amelioration of chilling stress by Paclobutrazol in watermelon seedlings. *Journal of Scientia Horticultura* 121: 144-148.
- Bearden, B. N. (2001) Influence of arbuscular mycorrhizal fungi on soil structure and soil water characteristics of vertisols. *Plant and Soil* 229: 245-258.
- Blee K. A., and Anderson, A. J. (1996) Defense-Related transcript accumulation in *Phaseolus vulgaris* L. colonized by the arbuscular mycorrhizal fungus *glomus intraradices* Schenck & Smith. *Journal of Plant Physiology* 110: 675-688.
- Cao, S., Bian, X., and Jiang, S. (2010) Cold treatment enhances lead resistance in *Arabidopsis*. *Acta Physiologiae Plantarum* 32: 19-25.
- Davis, T. D., and Curry, E. A. (1991) Chemical regulation of vegetative growth. *Critical Reviews in Plant Science* 10: 151-188.
- Deshmukh, S., R. Huckelhoven, P. Schafer, J. Imani, M. Sharma, M. Weiss, F. Waller, and K. H. Kogel. (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* 103:18450-18457.
- Druege, U., Baltruschat, H., and Franken, P. (2007) *Piriformospora indica* promotes adventitious root formation in cuttings. *Journal of Scientia Horticulturae*. 112: 422-426.
- Foyer, C. F., and Nector, G. (2000) Oxygen processing in photosynthesis regulation and signaling. *New Phytologist* 46: 359-388.
- Foyer, C. H., Lelandais, M., and Kunert, K. J. (1994) Photooxidative stress in plants. *Journal of Physiologia Plantarum* 92: 696-717.
- Irigoyen, J. J., Fmerrich, D. W., and Sanchez-Diaz, M. (1992) Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa plant. *Physiol plant*. 84:55-60.
- Jan, N., ul-Hussain, M., I. and Andrabi, KH. (2009) Cold resistance in plants: A mystery unresolved. *Electronic Journal of Biotechnology* 12: 1-15.
- Jubany-Mari, T., Prinsen, E., Munne-Bosch, S., and Alerge, L. (2010) The timing of methyl jasmonat, hydrogen peroxide and ascorbate acculation during water deficit and subsequent recovery in the Mediterranean shrub *Cistus albidus* L. *Journal of Environmental and Experimental Botany* 69:47-55.
- Kaefer, E. (1977) Meiotic mitotic recombination in *Aspergillus* and its chromosomal aberration. *Advances in Genetics* 19: 33-131.
- Khalid, K. A. (2006) Influence of water stress on growth, essential oil and chemical composition of herbs (*Ocimum sp.*). *International Agrophysics* 20: 289- 296.

- Piriformospora indica*, gen. et sp. nov., a new root-colonizing fungus. *Mycologia* 95:896–903.
- Waller, F., B. Achatz, H. Baltruschat, J. Fodor, K. Becker, M. Fischer, T. Heier, R. Huckelhoven, C. Neumann, D. Wettstein, P. Franken, and K. Kogel. (2005) The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt- stress tolerance, disease resistance, and higher yield. In: Proceedings of the National Academy of Sciences 103: 18450-18457.
- Xing, L. and Zhu, J. H. (2002) Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. *Plant Cell and Environment* 25: 131-139.
- Yeshitela T., Robbertse P. J. and Stassen P. J. C. (2004) Paclobutrazol suppressed vegetative growth and improved yield as well as fruit quality of 'Tommy Atkins' mango (*Mangifera indica*) in Ethiopia. *New Zealand Journal of Crop Horticulture Science* 32: 281-293.
- Young, R. S. (1983) Peach growth response from PP333 (Paclobutrazol). *Plant Growth Regulation Society America* 10: 192-194.
- Zhu, Z. Liang, Z. and Han, R. (2009) Saikosapnin accumulation and antioxidative protection in drought-stressed *Bupleurum chinense* DC. *Plants. Environmental and Experimental Botany* 66: 326-333.
- Sairam, R. K., Veerabhadra Rao, K., Srivastava, G. C. (2002) Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. *Journal of Plant Science* 163: 1037-1046.
- Sun, Ch., Johnson, J. M., Cai, D., Sherameti, I., Oelmüller, R., and Lou, B. (2010) *Piriformospora indica* confers drought tolerance in Chinese cabbage leaves by stimulating antioxidant enzymes, the expression of drought-related genes and the plastid-localized CAS protein. *Journal of Plant Physiology* 167: 1009-1017.
- Tang, W., Newton, R. J. (2005) Peroxidase and catalase activities are involved in direct adventitious shoot formation induced by thidiazuron in eastern white pine (*Pinus strobus* L.) zygotic embryos. *Journal of Plant Physiology and Biochemistry* 43:730-769.
- Tobeh, A., and Jamaati-e-Somarin, SH. (2012) Low temperature stress effect on wheat cultivars germination. *African Journal of Microbiology Research* 6 :1265-1269.
- Varma, A., Kost, G., and Oelmüller, R. (2013) *Piriformospora indica*. *Sebacinales and Their Biotechnological Applications Series: Soil Biology* 33: 397 pp.
- Verma, S., A. Varma, KH. Rexer, G. Kost, A. Sarbhoy, P. Bisen, B. Butehorn, Franken. P. (1998)