تغییر در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در گیاه کاهو تحت تیمار قارچ *Piriformospora indica* و عنصر روی

اکبر پاداش[۱]، صالح شهابی‌وند[۲*]، فرهاد بهتاش[۱]، احمد آقایی[۲]، علی‌اصغر علیلو[۳]

[۱] گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه مراغه، [۲] گروه زیست‌شناسی سلولی ملکولی، دانشکده علوم، دانشگاه مراغه، [۳] گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه مراغه

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۰/۲۰، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹٦/۰۵/۱٤)

چکیده

این پژوهش که در آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه مراغه در بهار سال ۱۳۹۵، به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کاملاً تصادفی انجام گرفت، به بررسی تغییر در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در گیاه کاهو رقم سیاهو تلقیح شده با قارچ آندوفیت *Piriformospora indica* و سطوح مختلف روی (صفر، ۲/۵، ۵ و۱۰ میلی‌گرم بر لیتر) می‌پردازد. قارچ در مرحله دو برگی کاهو و در نزدیکی ریشه به بستر کشت شنی اضافه شد. نمونه‌های گیاهی، ۳۵ روز بعد از کشت، برای اندازه‌گیری میزان وزن خشک و تر اندام هوایی، پروتئین محلول کل، غلظت مالون‌دی‌آلدئید و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (سوپراکسیددیسموتاز، گایاکول‌پراکسیداز و کاتالاز)، مورد بررسی قرارگرفتند. نتایج آزمایش نشان داد که اثر متقابل قارچ و روی بر مقدار وزن خشک و تر، درصد همزیستی، میزان پروتئین محلول کل و فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز در سطح احتمال ۱ درصد معنی دار بود. اثر اصلی عنصر روی بر غلظت مالون‌دی‌آلدئید، میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز و کاتالاز در سطح احتمال ۱ درصد معنی دار شد. بیشترین میزان وزن خشک و تر اندام هوایی، مقدار پروتئین محلول و فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز، در گیاهان تیمار شده با قارچ *P. indica* در غلظت روی ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر به‌دست آمد. بیشترین غلظت مالون‌دی‌آلدئید، فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و گایاکول پراکسیداز در غلظت روی صفر (در تیمار) حاصل گردید. نتایج نشان داد که همزیستی گیاه کاهو با قارچ *P. indica* همراه با استفاده از عنصر روی (بخصوص در سطح ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر)، نقش مهمی در افزایش شاخص‌های رشدی و تعدیل فعالیت‌های آنزیم‌های آنتی اکسیدان گیاه کاهو دارد.

کلمات کلیدی: آنزیم آنتی اکسیدان، عنصر روی، قارچ آندوفیت، Lettuce

مقدمه

کاهو (*Lactuca sativa* L.) گیاهی یکساله از خانواده‌ی مرکبان (Asteraceae) و یکی از سبزی‌های برگی فصل خنک است که در سالهای اخیر توجه خاصی به کشت آن معطوف شده است. کاهو بدلیل داشتن ارزش غذایی بالا و راحت بودن تهیه آن برای مصرف بویژه در سالاد و نیز مواد فیبری فراوان، مورد پذیرش مصرف‌کنندگان در سراسر جهان قرار گرفته است. این گیاه منبع مناسبی برای مواد آنتی اکسیدانی، ویتامینهای A، B_6، C و K و همچنین عناصر غذایی آهن، پتاسیم، منگنز، کلسیم و منیزیوم است (Jordao *et al.*, 2007). با توجه به مصرف روز

*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: shahabi@maragheh.ac.ir

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.27.10.1]

افزون این گیاه، یافتن راههایی برای رشد بهتر و افزایش میزان محصول و نیز کم کردن اثر شرایط نامساعد محیطی بر رشد آن، ضروری بنظر می‌رسد.

Piriformospora indica یک قارچ شبه میکوریز و از قارچهای آندوفیت ریشه است که در سال ۱۹۹۸ توسط وارما و همکاران از خاک ریزوسفری گیاهان خشکی‌پسند کهور و کنار از صحرای تار ایالت راجستان کشور هندوستان جداسازی شد. *P. indica* دارای دامنه‌ی وسیعی از گیاهان میزبان است که با کلنیزاسیون ریشه آنها سبب تحریک رشد میزبانهای خود می‌گردد. این گیاهان شامل انواع خشکی پسند، بوته‌های یکساله و چندساله و درختان چوبی می‌باشند. این قارچ با برقراری رابطه‌ی همزیستی با گیاهان میزبان و از طریق افزایش جذب عناصر غذایی توسط ریشه به عنوان یک قارچ محرک رشد گیاه (Plant Growth Promoting Fungus) شناخته می‌شود (Varma *et al.*, 2012). مشاهده شده که بر اثر همزیستی با قارچ، سیستم آنتی اکسیدان گیاه فعال می‌شود و همچنین این قارچ در افزایش تحمل به تنش غیرزیستی و زیستی شرکت می‌کند (Varma *et al.*, 2012). طبق مطالعات انجام شده در مورد نحوه اثر قارچ *P. indica* در گیاهان مختلف، مشخص شده این قارچ در شرایط مختلف از طریق مکانیسم‌های متفاوت بر آنزیم‌های آنتی اکسیدان گیاهان اثر می‌گذارد. به عنوان مثال قارچ *P. indica* در گیاه ذرت آلوده شده به قارچ *Fusarium verticillioides* باعث کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان می‌گردد تا به گیاه در غلبه بر عفونت کمک نماید (Kumar *et al.*, 2009)، اما در برگ گیاه کلم چینی در شرایط تنش خشکی قارچ *P. indica* باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، کاتالاز و سوپراکسیددیسموتاز جهت کاهش گونه‌های فعال اکسیژن و کاهش یا تأخیر اثرات خشکی بر گیاه می‌شود (Sun *et al.*, 2010). بطور کلی تأثیر همزیستی این قارچ بر گیاه متکی بر بهبود تغذیه معدنی، میانجی‌گری در فرایندهای فیزیولوژیکی و نیز تغییر در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان است (Zerea *et al.*, 2013).

کمبود روی در خاک‌های اکثر نقاط جهان در شدت‌های متفاوت به ویژه در مناطق خشک و نیمه خشک دیده می‌شود که هر ساله روبه افزایش بوده و بیشتر این خاک‌ها آهکی هستند (Singh *et al.*, 2005). در کشت متراکم، برای کاهش کمبود روی در خاک از کودهای شیمیایی و غیرآلی استفاده می‌شود. در اثر کاهش فلز روی در خاک، کمبود روی به‌طور معمول در گیاهان، چارپایان و انسان به‌طور همزمان اتفاق می‌افتد (Lehmann *et al.*, 2014). کمبود روی علاوه بر اینکه موجب کاهش در میزان عملکرد محصول می‌شود، باعث تولید رادیکال‌های آزاد مربوط به گونه‌های فعال اکسیژن (مانند پراکسید هیدروژن و رادیکال‌های سوپراکسید و هیدروکسیل) نیز می‌شود که به سلول‌ها صدمه وارد می‌کند (Cakmak, 2000; Abadi and Sepehri, 2015). هرچند تولید رادیکال آزاد سوپراکسید و هیدروژن پراکسید غیر قابل اجتناب در سلول‌های گیاهی است، رادیکال‌های آزاد را می‌توان با استفاده از سطوح مناسب روی سمیت‌زدایی کرد به‌صورتیکه روی در فعال سازی و بیان ژن‌هایی که مسئول سمیت‌زدایی هستند نقش دارد (Cakmak and Marschner, 1993). بیشتر رادیکال‌های آزاد توسط آنزیم‌های آنتی اکسیدان مانند پراکسیداز (POX)، سوپراکسیددیسموتاز (SOD) ، کاتالاز (CAT) و پلی فنل اکسیداز (PPO) کاهش پیدا می‌کنند (Harinasut *et al.*, 2003). غلظت روی بر فعالیت ایزوزیم Cu/Zn – SOD تأثیر می‌گذارد و خطر تنش اکسیداتیو را در بسیاری از گیاهان کاهش می‌دهد (Cakmak and Marschner, 1993).

با توجه به مصرف روز افزون گیاه کاهو از یکطرف و تأثیر قارچ *P. indica* بر رشد گیاهان و نیز نقش تعدیل کنندگی آن در میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در مطالعات پیشین، این آزمایش به منظور بررسی اثر متقابل قارچ آندوفیت *P. indica* و عنصر روی (در غلظت‌های مختلف) بر رشد، میزان پروتئین محلول، غلظت مالون‌دی‌آلدئید و میزان فعالیت آنزیمهای آنتی‌اکسیدان در برگ گیاه کاهو رقم سیاهو، انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

طرح آزمایشی و شرایط کاشت: برای این آزمایش بذور کاهو

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.27.10.1]

رقم سیاهو از گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه مراغه تهیه گردید و سویه‌ی مربوط به قارچ *P. indica* از آزمایشگاه زیست شناسی دانشگاه مراغه تهیه گردید. این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. تیمارهای آزمایشی شامل تیمار کاهو با قارچ *P. indica* (تلقیح و عدم تلقیح) و سطوح مختلف عنصر روی (صفر، ۲/۵، ۵ و ۱۰ میلی گرم بر لیتر) بود. در این آزمایش گلدان‌هایی با قطر دهانه‌ی ۲۵ سانتی متر را با ماسه و پرلایت (به‌ترتیب با نسبت ۱:۲) به‌عنوان بستر کشت، پر کرده و به مدت ۲ روز شستشو داده شدند تا املاح و مواد سمی شسته شوند و بسترکشت عاری از هرگونه مواد غذایی، موجود زنده و عناصر سمی و غیره شود. سپس بذرها در هر گلدان (۲ بذر برای هر گلدان) در داخل گلخانه با دمای روزانه و شبانه به ترتیب ۲±۲۰ و ۲±۱۸ درجه‌ی سانتی گراد، و رطوبت نسبی ٦۰ درصد کشت شدند. محلول غذایی مورد استفاده محلول هوگلند تغییر یافته بود. pH محلول غذایی در ٦/۵ تنظیم گردید. برای این منظور از اسید سولفوریک یک مولار استفاده شد. محلول غذایی پس از تهیه در ظروف پلاستیکی ۲۰ لیتری ریخته شده و به صورت دستی به پای گیاهان درون بسترهای کشت افزوده شدند. محلول‌دهی بر اساس اندازه‌ی گیاه و شرایط محیطی (دما و رطوبت) انجام گرفت. بذور کاهو از زمان جوانه زنی تا مرحله‌ی ۲ برگی با همین ترکیب تغذیه شدند. ترکیب و غلظت نمک‌های استفاده شده در محلول هوگلند مطابق با مقادیر جدول ۱ می‌باشد.

تکثیر قارچ *P. indica* و نحوه اعمال تیمارها: جهت تکثیر قارچ *P. indica* از محیط تغییر یافته‌ی آسپرژیلوس (Hill and Kafer, 2001)، استفاده شد این محیط دارای عناصر ماکرو، عناصر میکرو، پپتون، گلوکز، عصاره مخمر و ویتامین‌ها می باشد. برای تکثیر قارچ در شرایط استریل قطعه‌هایی به ابعاد ۱×۱ سانتیمتر از محیط جامد اولیه، جدا گردید و به طور وارونه بر روی محیط جدید در پلیت‌هایی با قطر ۱۰ سانتیمتر قرار داده شد. پلیت‌ها در انکوباتور با دمای ۲۹±۱ درجه سانتیگراد و به‌مدت ۲ هفته قرار گرفتند. زمانی که بذور کشت شده به مرحله‌ی دوبرگی رسیدند، آنها با قارچ *P.indca* تیمار شدند. نحوه‌ی تیمار به این صورت بود که ابتدا ماسه‌های بغل ریشه را از دو طرف کنار زده و قارچ *P.indica* که قبلاً در داخل پتری دیش کشت شده بودند، به صورت قطعات ۱cm در ۱ cm برش داده شدند و در دو طرف گیاه، هیف‌های قارچ روی ریشه گیاه قرار گرفتند (در هر طرف یک قطعه). به محلول غذایی هوگلند تهیه شده مقادیر مختلف سولفات روی (محصول شرکت مرک آلمان) اضافه شد (صفر، ۲/۵، ۵ و ۱۰ میلی گرم بر لیتر) و گیاهان تا مرحله‌ی برداشت با همین سیستم غذایی تیمار شدند (روزانه ۱۰۰ میلی لیتر برای هر گلدان). مقادیر سولفات روی اضافه شده، علاوه بر مقدار سولفات روی موجود در محلول هوگلند بود.

شاخص‌های رشدی مورد بررسی: برای اندازه‌گیری وزن تر و وزن خشک، به طور تصادفی از هر واحد آزمایشی یک گیاه برداشت گردید. پس از جدا نمودن قسمت هوایی گیاه از اندام زیرزمینی، وزن تر اندام هوایی، برای کلیه تیمارها محاسبه گردید. سپس نمونه‌های اندام هوایی در درون پاکت کاغذی قرار داده شدند و به‌مدت ٤۸ ساعت در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد در دستگاه خشک کن قرار داده شدند تا وزن خشک آنها تعیین گردد. وزن‌های تر و خشک به وسیله ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۱ گرم تعیین شدند.

رنگ آمیزی و بررسی کلنیزاسیون ریشه: برای رنگ آمیزی و بررسی کلنیزاسیون ریشه از روش Phillips و Hayman (1970) استفاده شد. چندین قطعه‌ی نازک از ریشه‌ی اصلی گیاه انتخاب و با آب شسته شد و نمونه‌های ریشه را به مدت ۵ دقیقه در محلول KOH ۱۰ درصد از قبل گرم شده قرار داده و در ادامه داخل محلول اسیدی ۱ درصد HCl قرار داده شدند. در نهایت از رنگ تریپان بلو ۲۰ درصد از قبل گرم شده به مدت ۵ دقیقه استفاده شد، به این صورت، فقط ریشه های دارای همزیستی میکوریزایی رنگ گرفتند. سپس ریشه‌ها در پلیتی که از قبل به مربع‌های ۰/۵ cm × ۰/۵ cm تقسیم شده بودند، پخش شدند. در مرحله‌ی اول تمام نقاطی که توسط ریشه‌ها قطع شده‌بودند، شمارش شده و در مرحله‌ی بعد

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.27.10.1]

جدول ۱- ترکیبات و مقادیر آنها در محلول هوگلند آزمایش

نوع نمک	غلظت (گرم بر لیتر)	نوع نمک	غلظت (میلی‌گرم بر لیتر)
$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	۰/۴۷	H_3BO_3	۲/۸۶
KNO_3	۰/۳	$MnCl_2.4H_2O$	۱/۸۱
$MgSO_4.7H_2O$	۰/۲۵	$ZnSO_4.7H_2O$	۰/۲۲
$NH_4H_2PO_4$	۰/۰۶	$Na_2MoO_4.2H_2O$	۰/۰۲
شلات آهن (سکوسترین)	۰/۱	$CuSO_4.5H_2O$	۰/۰۸

فقط نقاطی که ریشه‌های دارای همزیستی میکوریزایی، به رنگ آبی، قطع کرده‌بودند، شمارش گردیدند و از طریق رابطه ی زیر درصد کلنیزاسیون محاسبه گردید:

$$\text{درصد کلونیزاسیون} = \frac{\text{تعداد نقاط دارای همزیستی میکوریزی}}{\text{تعداد کل نقاط}} \times 100$$

اندازه‌گیری میزان مالون‌دی‌آلدئید (MDA): اندازه‌گیری میزان مالون‌دی‌آلدئید به عنوان محصول پراکسیداسیون لیپیدها و به روش Heath و Packer (۱۹۶۸) انجام شد. ۰/۱ گرم ماده گیاهی در هاون چینی (روی یخ و دمای ٤ درجه سانتی‌گراد) ساییده شد. روی ماده گیاهی کاملاً پودر شده، ۱/۵ میلی لیتر تری‌کلرواستیک‌اسید (TCA) ۱٪ اضافه شد و ورتکس گردید. محلول حاصله در شرایط g × ۱۰۰۰۰ و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ شد (Eppendorf 5810 R). به ۰/۵ میلی لیتر از محلول رویی، ۱ میلی لیتر محلول ۰/۵٪ تیوباربیتوئیک اسید (TBA) به اضافه ۲۰٪ TCA اضافه شد. مخلوط واکنش به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد درون حمام بخار قرار گرفت. بعد از ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ نمونه‌ها در g × ۱۰۰۰۰ جذب محلول رویی حاصل در دو طول موج ۵۳۲ و ٦۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. ضریب خاموشی mM^{-1} cm^{-1} ۱۵۵ نیز در محاسبه غلظت MDA لحاظ گردید.

استخراج و اندازه‌گیری پروتئین محلول کل: نیم گرم ماده گیاهی با استفاده از نیتروژن مایع در هاون چینی (روی یخ) ساییده شده و روی ماده گیاهی کاملاً پودر شده، ۱/۵ میلی لیتر بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی مولار (pH= ۷) و ۰/۰۲۵ گرم پلی‌وینیل‌پیرولیدون اضافه شد و ورتکس گردید. عصاره حاصله در rpm ۱۵۰۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول رویی مستقیماً جهت اندازه‌گیری پروتئین محلول کل، فعالیت آنزیم‌های کاتالاز (CAT)، گایاکول پراکسیداز (GPX) و سوپراکسیددیسموتاز مورد استفاده قرار گرفت. میزان پروتئین محلول کل به روش Bradford (۱۹۷٦) اندازه‌گیری شد. جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد و آلبومن سرم گاوی (BSA) جهت ترسیم منحنی استاندارد مورد استفاده قرار گرفت.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان: فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) با روش Aebi (۱۹۸٤) اندازه‌گیری شد. مخلوط واکنش شامل ۷۵۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم ۲۵ میلی مولار (pH=۷)، ۷۵۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن (H_2O_2) ۱۰ میلی مولار و ۲۰ میکرولیتر عصاره پروتئینی خام بود. واکنش با اضافه نمودن H_2O_2 به مخلوط مورد نظر آغاز شد و فعالیت آنزیم به دلیل مصرف H_2O_2 با کاهش جذب در طول موج ۲٤۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. ضریب خاموشی معادل ۳۹/٤ mM^{-1} cm^{-1} در محاسبه فعالیت آنزیم در نظر گرفته شد. فعالیت آنزیم کاتالاز بر حسب تعداد واحدهای آنزیم بر میلی‌گرم پروتئین در دقیقه گزارش گردید (U/mg protein. min).

فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز (GPX) به روش Chance و Maehly (۱۹۵۵) اندازه‌گیری شد. مخلوط واکنش شامل ۷۵۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی مولار (pH=۷)، ۱۰۰ میکرو لیتر H_2O_2 (۷۰ میلی مولار)، ۷۵۰ میکرولیتر گایاکول (۱۰ میلی مولار) و عصاره پروتئینی خام بود. فعالیت آنزیم GPX در طول موج ٤۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. ضریب

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.27.10.1]

خاموشی معادل mM^{-1} cm^{-1} ۲۶/۶ در محاسبه فعالیت آنزیم در نظر گرفته شد. فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز بر حسب تعداد واحدهای آنزیم بر میلی گرم پروتئین در دقیقه گزارش گردید (U/mg protein. min).

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم سوپر اکسیددیسموتاز با روش Giannopolitis و Ries (۱۹۹۷) و به کمک سنجش مهار احیای نوری نیتروبلوتترازولیوم (NBT) در طول موج ۵۶۰ نانومتر، انجام گرفت. برای این منظور ابتدا محلول بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی مولار با pH= ۷/۵ تهیه و سپس برای تهیه‌ی محلول واکنش، ترکیبات EDTA ۰/۱ میلی‌مولار، نیتروبلوتترازولیوم (NBT) ۷۵ میلی مولار، متیونین ۱۳ میلی مولار و ریبوفلاوین ٤ میکرومولار به ترتیب اضافه و محلول حاصل در تاریکی نگه داشته شد. از هر نمونه عصاره، ۱۰۰ میکرولیتر در هر لوله آزمایش ریخته و ۳ میلی لیتر از محلول فوق به آن اضافه گردید و با قرار دادن آنها تحت روشنایی لامپ فلورسنت (٤۰W) بلافاصله واکنش آغاز گردید. پس از ۸ دقیقه، جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۶۰ نانومتر خوانده شد. برای سنجش فعالیت آنزیم، نیاز به شاهد روشنایی است. این نمونه، شامل ۳ میلی لیتر از محلول واکنش (فاقد عصاره) است که در روشنایی قرار می‌گیرد. به این ترتیب، میزان فعالیت آنزیم SOD در نمونه‌ها در مقایسه با شاهد قرار گرفته در روشنایی اندازه گیری و محاسبه شدند. فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز بر حسب واحد آنزیمی بر میلی گرم پروتئین گزارش شد.

تجزیه آماری: داده‌های این پژوهش با استفاده از نرم افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد انجام گردید.

نتایج و بحث

درصد همزیستی: نتایج به دست آمده از تجزیه واریانس داده ها نشان داد که اثر متقابل تیمارهای قارچ *P. indica* و عنصر روی بر درصد کلونیزاسیون ریشه در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ۲). داده‌های حاصل بیانگر کاهش درصد همزیستی در ریشه گیاه کاهو با افزایش سطح روی می‌باشد و بیشترین درصد، مربوط به گیاهان تیمار شده با قارچ در غلظت روی صفر میلی‌گرم بر لیتر (در تیمار صفر) بود (جدول ۳). مطالعات روی گوجه فرنگی نشان داده است که با افزایش سطح روی در بستر کشت گیاه، درصد همزیستی کاهش پیدا می‌کند (Watts-Williams *et al.*, 2013). Pawlowska و Charvat (۲۰۰٤) نشان دادند که اسپور قارچ میکوریز آربوسکولار بسیار حساس به محیطی است که دارای سرب، روی و کادمیم است. آنها نتیجه گرفتند که حساسیت اسپورهای قارچ همزیست به این فلزات، ممکن است ناشی از اشباع شدن سیستم سلولی مسئول در بافری کردن فلزات، زمانی که در شرایط اشباع از این فلزات قرار می‌گیرند، باشد. کاهش درصد همزیستی در ریشه گیاه کاهو با افزایش غلظت روی ممکن است ناشی از اثر سمی روی باشد که موجب کاهش پتانسیل مایه تلقیح (inoculum) مؤثر می‌شود و از جوانه‌زنی و رشد عادی اسپور جلوگیری می‌کند. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که علی‌رغم کاهش همزیستی در غلظت‌های بالای روی (جدول ۳)، استفاده همزمان از قارچ و روی برای افزایش عملکرد و سایر پارامترهای رشدی، بسیار مؤثر بوده است.

وزن خشک و وزن تر: نتایج به دست آمده از تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۲) نشان داد که اثر تیمار قارچ *P. indica* و عنصر روی بر وزن خشک و وزن تر اندام هوایی گیاه کاهو در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود. با توجه به جدول مقایسه‌ی میانگین داده‌ها، مشخص شد که تلقیح با قارچ *P. indica* و روی سبب افزایش در وزن تر و خشک اندام هوایی گیاهان کاهو نسبت به شاهد گردیده است (شکل ۱ و ۲). بیشترین وزن تر در تیمار قارچ *P. indica* همراه با روی ۱۰ و ۵ میلی گرم بر لیتر حاصل شد که نسبت به گیاه تیمار نشده با قارچ تفاوت معنی‌داری را نشان داد (شکل ۱). کمترین وزن تر اندام هوایی نیز در گیاهان بدون تیمار با قارچ و روی بدست آمد. بیشترین مقدار وزن خشک نیز در تیمار با قارچ *P. indica* و ترکیب روی ۱۰ میلی گرم بر لیتر حاصل گردید

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.27.10.1]

جدول۲- نتایج تجزیه واریانس داده‌های تأثیر قارچ *P. indica* و عنصر روی بر درصد همزیستی، وزن‌تر و وزن خشک در گیاه کاهو

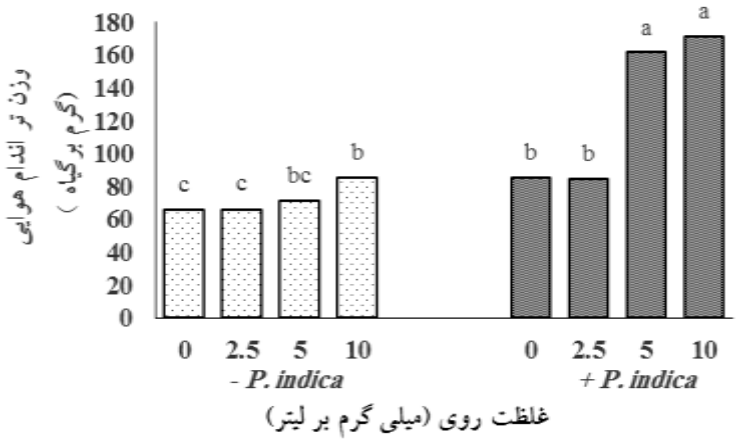
		میانگین مربعات		
منابع تغییرات	درجه آزادی	درصد همزیستی	وزن تر	وزن خشک
قارچ	۱	۱۵٦۵۷**	۱۷۰۱۳/۳**	۳۷۲/۸**
روی (Zn)	۳	۱۱٤/۳**	٤۵٦۹/۸**	۱۲۲/۱**
قارچ × روی	۳	۱۱٤/۳**	۲۳۷٤/۷**	۷۱/۵**
خطا	۱٦	٤	۸۷/۵	۱/۱
ضریب تغییرات (درصد)	-	۸	۵	۸/۵

**** معنی دار در سطح احتمال ۱ درصد**

جدول ۳- تأثیر متقابل قارچ *P. indica* و فلز روی بر درصد همزیستی در گیاه کاهو.

تیمار قارچ (*P. indica*)	تیمار عنصر روی (میلی‌گرم بر لیتر)	کلونیزه شدن ریشه (٪)
بدون قارچ	صفر	۰e
	۲/۵	۰e
	۵	۰e
	۱۰	۰e
با قارچ	صفر	٦۱/۳a
	۲/۵	۵۵b
	۵	٤٦c
	۱۰	٤۲d

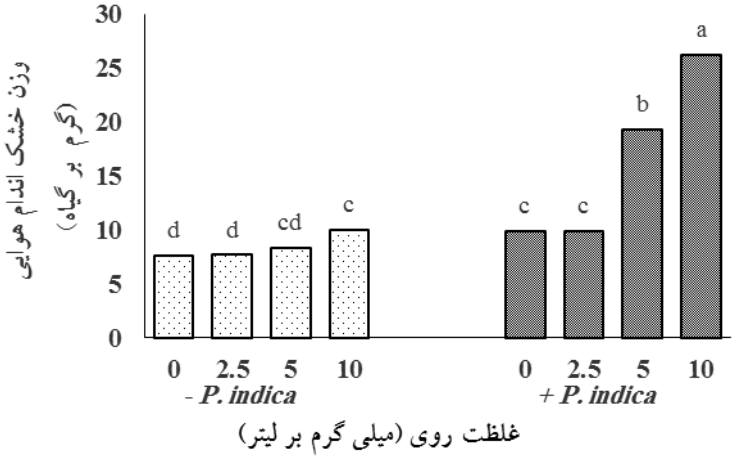
حروف متفاوت، نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشند.



شکل ۱- تأثیر متقابل قارچ *P. indica* و فلز روی بر وزن تر اندام هوایی در گیاه کاهو. در روی هر ستون، حروف متفاوت، نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشند.

(شکل ۳). یکی از ویژگی‌های مهم قارچ *P. indica* این است که رشد را در اکثر گیاهان همزیست افزایش داده و به عنوان یک کود بیولوژیک قلمداد می‌شود به‌طوریکه تلقیح گیاه کلم چینی (Sun *et al.*, 2010) و ذرت (Kumar *et al.*, 2009) با

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.27.10.1]



شکل ۲- تأثیر قارچ *P. indica* و فلز روی بر وزن خشک اندام هوایی در گیاه کاهو. در روی هر ستون، حروف متفاوت، نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشند.

این قارچ موجب افزایش در میزان وزن خشک و تر گردید. گیاهانی که با قارچ *P. indica* تیمار شده‌اند، میزان اکسین بیشتری نسبت به شاهد دارند. با توجه به نقش اکسین در انگیزش ریشه‌ی نابجا در گیاه سالم و قلمه‌ها افزایش ریشه‌های جانبی می‌تواند ساده‌ترین دلیل از نحوه‌ی اثر قارچ بر رشد گیاهان باشد (Druege *et al.*, 2007). Alam و همکاران (۲۰۰۱) اثرات روی و فسفر بر میزان وضعیت رشد گیاه برنج را مورد بررسی قرار داده و دریافتند که استفاده از روی در غلظت پایین موجب افزایش طولی ریشه، ساقه و وزن تر و خشک در این اندام‌ها می‌شود. با توجه به مطالعات قبلی و نتایج حاصل از این پژوهش می‌توان نتیجه گرفت که قارچ *P. indica* با تأثیر بر ریشه، موجب افزایش طول و رشد ریشه شده و جذب عناصر مورد نیاز برای رشد (روی، نیتروژن، فسفر و ...) را بیشتر کرده و به طور غیر مستقیم در رشد گیاه مؤثر است.

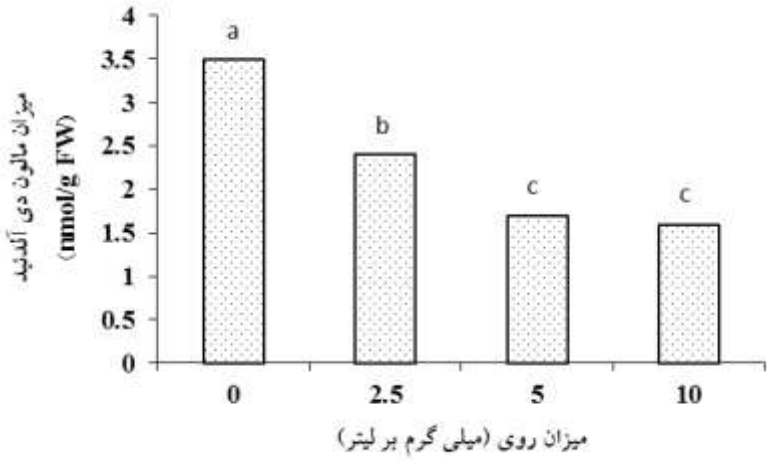
غلظت مالون‌دی‌آلدئید: با توجه به نتایج تجزیه واریانس، اثر متقابل و اثر اصلی قارچ بر غلظت مالون‌دی‌آلدئید و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی معنی دار نبوده ولی اثر اصلی روی برای غلظت مالون‌دی‌آلدئید در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ٤). غلظت MDA با افزایش سطح روی در بستر کشت کاهش یافته و در غلظت صفر عنصر روی بیشترین مقدار را دارا می‌باشد (شکل ۳) یکی از نشانه‌های پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء، تشکیل مالون‌دی‌آلدئید می‌باشد که یکی از محصولات حاصل از تجزیه اسیدهای چرب اشباع نشده به حساب می‌آید. آسیب به غشای سلولی تحت تأثیر انواع تنش‌ها ایجاد شده و در نتیجه باعث پراکسیداسیون لیپید ها می‌شود. معلوم شده است که پراکسیداسیون لیپیدها در نتیجه رادیکال‌های آزاد ایجاد شده و بازتابی از خسارت ناشی از تنش‌ها در سطح سلولی می‌باشد، بنابراین مقدار MDA که طی پراکسیداسیون لیپید ایجاد می‌شود، به عنوان شاخصی از آسیب اکسیداسیون محسوب می‌شود. MDA می‌تواند با اتصال به پروتئین‌های غشاء و آنزیم ها، منجر به آسیب رسانی به ساختار و عمل غشاء شود (Saeidi-Sar *et al.*, 2007). غلظت MDA در گیاهان همزیست شده با قارچ *P. indica* غیر معنی‌دار بود ولی غلظت MDA در گیاهان تیمار شده با قارچ کمتر از گیاهان عدم تیمار با قارچ می‌باشد که احتمال می‌رود که همزیستی با قارچ *P. indica* نقش تعدیل آنزیم‌های آنتی اکسیدانی را داشته و شرایط را برای گیاه بهبود ساخته است. همچنین در برگهای گیاه گندم تیمار شده با این قارچ اندوفیت، کاهش در میزان MDA مشاهده شد (Abadi and Sepehri, 2015). عنصر روی به دلیل اینکه کوفاکتور بسیاری از آنزیم‌ها می‌باشد، فعالیت آنزیمی را در غلظت بالا افزایش داده و غلظت MDA را کاهش داده است (با توجه به نتایج آزمایش حاضر). چنین می‌توان نتیجه گرفت که روی در غلظت‌های مناسب با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی مانع از پراکسیداسیون لیپیدها

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.27.10.1]

جدول ٤- تجزیه واریانس تیمار با قارچ *P. indica* و فلز روی بر فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، گایاکول پراکسیداز، کاتالاز، میزان مالون‌دی‌آلدهاید و میزان پروتئین در گیاه کاهو

منابع تغییرات	درجه آزادی	مالون دی‌آلدهید (MDA)	پروتئین (Protein)	سوپر اکسیددیسموتاز (SOD)	کاتالاز (CAT)	گایاکول پراکسیداز (GPOX)
		میانگین مربعات				
قارچ	۱	۰/۵ns	۳/٤**	۲۰/٦**	۰/۰۰۵ns	۰/۵ ns
روی (Zn)	۳	٤/۷**	۱/۹**	۸۵/۳**	۰/۰۱**	٤/٤**
قارچ × روی	۳	۰/۰۷ns	۰/۳**	٤/۳**	۰/۰۰٤ns	۰/۱ ns
خطا	۱٦	۰/۲	۰/۰۲	۰/۷	۰/۰۰۳	۰/۳
ضریب تغییرات (درصد)		۱۹/٤	۱۷/۷	۵/۵	۱۸/۳	۱۹/۷

ns غیر معنی‌دار، ** معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد



شکل ۳- تأثیر اصلی عنصر روی بر غلظت مالون‌دی‌آلدهاید در گیاه کاهو. در روی هر ستون، حروف متفاوت، نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشند.

می‌شود.

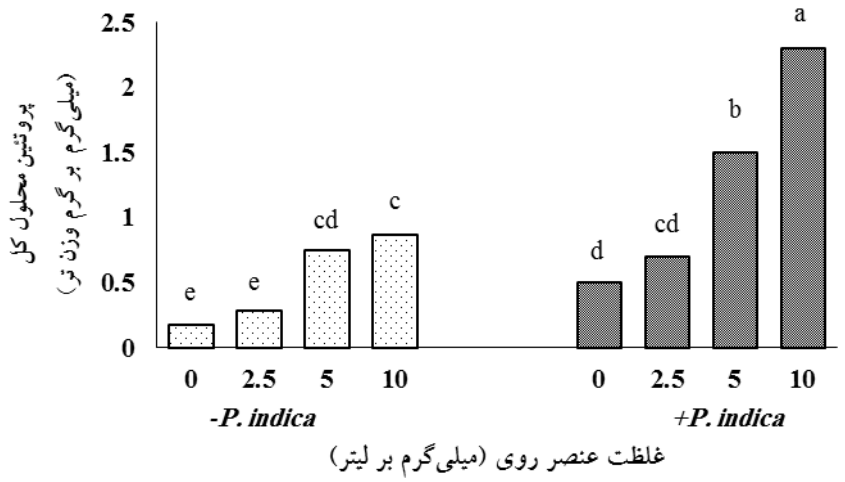
میزان پروتئین محلول: اثر متقابل قارچ *P. indica* و عنصر روی بر شاخص میزان پروتئین محلول در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ٤). پروتئین موجود در برگ گیاه کاهو همزیست شده با قارچ *P. indica* با افزایش غلظت روی در بستر کشت افزایش معنی داری یافت، به‌طوریکه در غلظت روی ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر، میزان پروتئین برگ ١٤ برابر نسبت به شاهد افزایش یافته بود (شکل ٤).

همزیستی با قارچ‌های مختلف میکوریز باعث افزایش معنی‌دار در میزان پروتئین محلول در برگ‌های گیاه شاه‌توت در شرایط بدون تنش شد (Shi *et al*., 2016). در گیاهانی که کمبود روی دارند ساخته شدن پروتئین کاهش می‌یابد و انباشته شدن اسیدهای آمینه در این گیاهان نشان دهنده‌ی اهمیت روی در سنتز پروتئین است (Marschner, 1995). افزایش در میزان پروتئین در گیاهان تلقیح شده با قارچ *P. indica* ممکن است به دلیل افزایش جذب روی باشد. چون روی از عوامل مؤثر بر سنتز اسیدآمینه‌هایی مانند تریپتوفان و آسپارژین است.

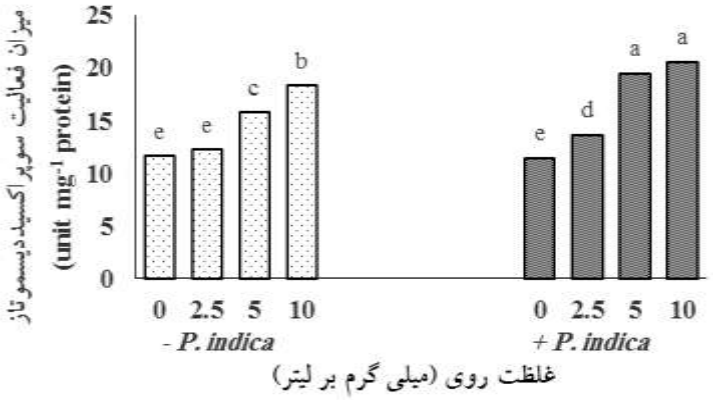
فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز: تجزیه واریانس داده ها نشان داد که اثر قارچ *P. indica* و عنصر روی بر میزان فعالیت آنزیم SOD در سطح احتمال ۱ درصد معنی دار بود

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.27.10.1]



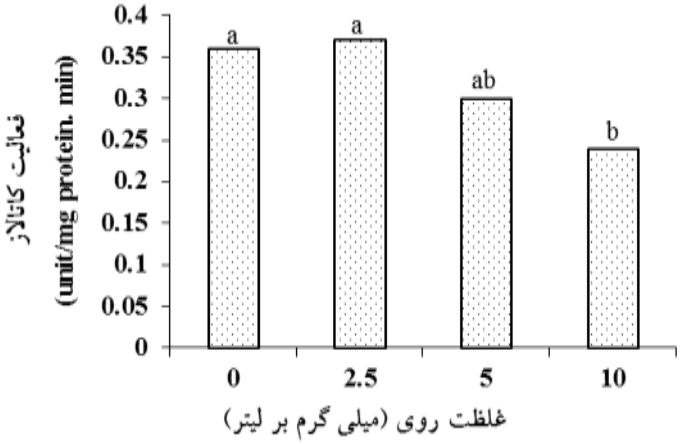
شکل ٤- تأثیر متقابل قارچ *P. indica* و روی بر پروتئین محلول کل در گیاه کاهو. در روی هر ستون، حروف متفاوت، نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ٥ درصد می‌باشند.



شکل ٥- اثر متقابل قارچ *P. indica* و روی بر میزان فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز. در روی هر ستون، حروف متفاوت، نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ٥ درصد می‌باشند.

(جدول ٤). استفاده از قارچ *P. indica* همراه با کاربرد روی به طور قابل توجهی فعالیت آنزیم SOD را افزایش داده و در غلظت روی ۱۰ میلی گرم بر لیتر بیشترین میزان فعالیت دیده شد (شکل ٥). تحقیقات محققان نشان داده است که Zn حداقل در ساختمان چهار آنزیم کربنیک آنهیدراز، الکل‌دهیدروژناز، SOD و RNA پلی مراز بکار رفته است. سوپراکسیددیسموتاز در تبدیل سوپراکسید به آب اکسیژنه دخالت دارد. این آنزیم از اتصال یک اتم روی و یک اتم مس با نیتروژن هیستیدینی ساخته شده است. در تنفس نوری، اکسیژن آزاد تولید می‌شود و این اکسیژن آزاد توسط اتم مس در سازوکار سم زدایی O^{-}_{2} (رادیکال آزاد) دخالت دارد. نقش آنزیم سوپراکسیددیسموتاز این است که از اکسیده شدن غشای لیپیدها جلوگیری می‌کند. در برگ‌های گیاه پسته، افزایش غلظت عنصر روی از صفر تا ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک باعث افزایش فعالیت آنزیم SOD در شرایط بدون تنش شد (Tavallali *et al.*, 2010). از طرف دیگر، افزایش در فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی در گیاهان تلقیح شده با قارچ میکوریز ممکن است به دلیل کمک در جذب عناصری مانند روی و مس باشد (Liang *et al.*, 2005). مشخص شده که قارچ میکوریز با تولید میسلیوم میزان جذب عنصر مس را به مقدار ٦٢ درصد

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.27.10.1]



شکل ٦- اثر اصلی عنصر روی بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز. در روی هر ستون، حروف متفاوت، نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشند.

شکل ۷- اثر اصلی عنصر روی بر میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز. در روی هر ستون، حروف متفاوت، نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشند.

در شرایط کمبود روی افزایش داده و موجب فعال شدن آنزیم های آنتی اکسیدانی شده است (Li *et al.*, 1991). در ریشه و اندام هوایی گیاه ذرت، همزیستی با قارچ میکوریز باعث افزایش فعالیت آنزیم SOD تحت غلظت‌های مختلف عنصر روی در خاک شد (Subramanian *et al.*, 2011). از پژوهش های گذشته و نتایج حاصل چنین می‌توان استنباط کرد که قارچ *P. indica* با میسلیوم‌هایی که تولید می‌کند جذب عناصری مثل مس و روی را افزایش داده و به طور غیر مستقیم در افزایش فعالیت آنزیمی نقش دارد. از آنجا که عنصر روی کوفاکتور آنزیم SOD می‌باشد، جذب روی توسط قارچ می‌تواند دلیل اصلی این افزایش آنزیمی باشد.

فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و گایاکول پراکسیداز: اثر اصلی روی بر فعالیت آنزیم CAT و GPOX با توجه به جدول تجزیه واریانس، در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ٤). فعالیت آنزیم‌های CAT و GPOX با افزایش سطح روی در بستر کشت کاهش یافته و بیشترین فعالیت آنزیم CAT (شکل ٦) و GPOX (شکل ۷) در غلظت روی صفر و۲/۵ میلی گرم بر لیتر حاصل گردید. یک مولکول از کاتالاز قادر است در یک ثانیه یک میلیون H_2O_2 را به آب و اکسیژن تبدیل کند و وجود این آنزیم برای حذف H_2O_2 که در نتیجه تنفس نوری به وجود می‌آید، لازم و ضروری می‌باشد (Liang *et al.*, 2005). Lin و Kao (۲۰۰۲) در بیان اهمیت گایاکول پراکسیداز در رشد و نمو درختان و سبزی‌ها بیان کرد که پراکسیدازها در اندامک‌های همه سلول‌های گیاهی وجود دارند و یکی از ترکیب‌های عادی

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.27.10.1]

گیاهان می‌باشند بطوریکه فعالیت این آنزیم‌ها می‌تواند در اثر تولید رادیکال‌های آزاد، افزایش و از طریق کاهش رادیکال‌های آزاد، کاهش یابد آنزیم گایاکول پراکسیداز از آنزیم‌های مهم از بین برنده پراکسید هیدروژن در گیاهان می‌باشد که به عنوان شاخص زیستی، جهت بررسی خسارت وارده ناشی از غلظت های سمی فلزات سنگین مختلف، استفاده می‌شود (Parida *et al.*, 2003). در پژوهش حاضر، فعالیت هردو آنزیم (CAT و GPOX) با افزایش سطح روی کاهش یافته است و در بیشتر بررسی‌های مربوط به تأثیر روی در گیاهان، کاهش فعالیت کاتالاز گزارش شده است (Saeidi-Sar *et al.*, 2007). اما اطلاعات مربوط به تیمار روی بر فعالیت‌های GPOX و SOD در گیاهان متناقض هستند به خاطر این که هردو تحریک و ممانعت فعالیت این آنزیم‌ها گزارش شده است (Pandey and Sharma, 2002). آنزیم CAT و GPOX دارای محتوی آهن در ساختارشان هستند. از آنجایی‌که نتایج تحقیقات قبلی نشان می‌دهد که غلظت بالای روی، مقدار آهن را در بافت‌های گیاهی کاهش می‌دهد احتمالاً، کاهش در فعالیت این آنزیم‌ها در برگ‌های گیاهان کلزا تحت افزایش غلظت روی ، نتیجه‌ای از کمبود آهن برای بیوسنتز این مولکول‌های آنزیمی می‌باشد(Sandalio *et al.*, 2002). با اینکه نقش قارچ *P. indica* در مورد این صفت مورد مطالعه معنی‌دار نبود، ولی احتمال می‌رود این قارچ با کمک به جذب بیشتر روی و مقاوم سازی گیاه، نقش تعدیل کردن این آنزیم‌ها را برعهده دارد و با متعادل کردن شرایط برای گیاه، تولید چنین آنزیم‌هایی را کنترل می‌کند. همچنین در گیاه گندم، همزیستی با قارچ *P. indica*، تأثیر معنی دار روی فعالیت دو آنزیم CAT و GPOX در شرایط کفایت عنصر روی (Zn-sufficiency)، نداشت (Abadi and Sepehri, 2015).

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که همزیستی قارچ *P. indica* همراه با کاربرد عنصر روی (بخصوص در سطح ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر) در گیاه کاهو رقم سیاهو علاوه بر اثر مثبت روی رشد و افزایش وزن تر و خشک اندام هوایی گیاه و همچنین میزان پروتئین محلول کل، باعث تغییر معنی‌داری در فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان آن شد. در نتیجه می‌توان گفت قارچ *P. indica* با بهبود شرایط محیطی و داخلی برای گیاه (از طریق سازوکارهایی که نیاز به بررسی بیشتر دارد)، می‌تواند جهت افزایش زیست‌توده و به‌عنوان عامل محافظتی زیستی با تغییر میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاه مهم و غذایی کاهو بکار رود. با توجه به اینکه این قارچ می‌تواند بدون نیاز به گیاه میزبان رشد کند، پیشنهاد ما استفاده از این قارچ اندوفیت در استراتژی‌های مربوط به مباحث کشاورزی پایدار است.

منابع

Abadi, V. A. J. M., Sepehri, M. (2015) Effect of *Piriformospora indica* and *Azotobacter chroococcum* on mitigation of zinc deficiency stress in wheat (*Triticum aestivum* L.). Symbiosis 69: 9–19.

Aebi, H. (1984) Catalase in vitro. Methods in Enzymology 105: 121–126.

Alam, S. M., Khan, M. A., Ali, M., Anseri, R. (2001) Effect of different levels of Zinc and Phosphorous on seedling growth, chlorophyll and peroxidase contents of rice. Journal of Biological Sciences 1:49-51.

Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.

Cakmak, I. (2000) possible roles of zinc in protecting plant cells from damage by reactive oxygen species. New Phytologist 146:185–205.

Cakmak, I., Marschner, H. (1993) Effect of zinc nutritional status on activities of superoxide radical and hydrogen peroxide scavenging enzymes in bean leaves. Plant Soil 155:127–130.

Chance, B. and Maehly, A. C. (1955) Assay of catalase and peroxidase. In: Methods in enzymology (eds. Colowick, S. P. and Kaplan, N. O.) Pp. 764-775. Academic Press, New York.

Druege, U., Baltruschat, H. and Francen, P. (2007) *Piriformospora indica* promotes adventitious root formation in cuttings. Scientia Horticulturae 112: 422-426.

Giannopolitis, C. N., and Ries, S. K. (1997) Superoxid dismutase. I. occurrence in higher plants. Plant Physiology 59: 309-314.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.27.10.1]

Harinasut, P., Poonsopa, D., Roengmongkol, K. and Charoensataporn, R. (2003) Salinity effects on antioxidant enzymes in mulberry cultivar. Science Asia 29:109–113.

Heath, R. L. and Packer, L. (1969) Photoperoxidation in isolated chloroplast. I. kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Archives of Biochemistry and Biophysics 125: 189-198.

Hill, T. W., Kafer, E. (2001) Improved protocols for Aspergillus minimal medium: trace element and minimal medium salt stock solutions. Fungal Genetics Newsletter 48: 20–21.

Jordao, C. P., Nascentes, C. C., Fontes, R. L. F., Cecon, P. R. and Pereira J. L. (2007) Effects of composted urban solid wastes addition on yield and metal contents of lettuce. Journal of the Brazilian Chemical Society 18: 195–204.

Kumar, K., Yadav, V., Tuteja, N. and Johri, A. K. (2009) Antioxidant enzyme activities in maize plants colonized with Piriformospora indica. Microbiology 155: 780–790.

Lehmann, A., Veresoglou, S. D., Leifheit, E. F. and Rillig, M. C. (2014) Arbuscular mycorrhizal influence on zinc nutrition in crop plants a meta-analysis. Soil Biology and Biochemistry 69: 123–131.

Li, X. L., Marschner, H. and Romheld, V. (1991) Acquisition of phosphorus and copper by VA-mycorrhizal hyphae and root to shoot transport in white clover. Plant Soil 136:49–57.

Liang, Y.C., Wong, J.W.C., Long, W. (2005) Silicon-mediated enhancement of cadmium tolerance in maize (*Zea mays* L.) grown in cadmium contaminated soil. Chemosphere 58, 475-483.

Lin, C. C. and Kao, H. (2002) Effect of NaCl stress on H_2O_2 metabolism in rice leaves. Plant Growth Regulation 30: 151-155.

Marschner, H. (1995) Mineral Nutrition of Higher Plants. 2nd Ed., Academic Press. Harcourt Brace Company, New York. p.889

Pandey, N. and Sharma,C. P. (2002) Effect of heavy metals Co_2^+, Ni_2^+ and Cd_2^+ on growth and metabolism of cabbage. Plant Science 163: 753-758.

Parida, B. K., Chhibba, M. and Nayyar, V. K. (2003) Influence of nickel contaminated soil on fenugreek growth and meneral composition. Scientia Horticulturae 98: 113-119.

Pawlowska, T. E., Charvat, I. (2004) Heavy-metal stress and developmental patterns of arbuscular mycorrhizal fungi. Applied and Environmental Microbiology 70: 6643-6649.

Phillips, J. M., Hayman, D. S. (1970) Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. Transactions of the British Mycological Society 55: 158-18.

Saeidi-Sar, S., Khavari-Nejad, R. A., Fahimi, H., Ghorbanli, M. and Majd, A. (2007) Interactive effects of gibberellin A3 and ascorbic acid on lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in Glycine max seedlings under nickel stress. Russian Journal of Plant Physiology 54: 74-79.

Sandalio, L. M., Dalurzo, H. C., Gomez, M., Romero-Puertas, M. C. and Del Rio, L. A. (2001) Cadmium- induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. Journal of Experimental Botany 52: 2115-2126.

Shi, S. M., Chen, K., Gao, Y., et al. (2016) Arbuscular mycorrhizal fungus species dependency governs better plant physiological characteristics and leaf quality of mulberry (*Morus alba* L.) seedlings. Frontiers in Microbiology 7:1030.

Singh B., Senthil Kumar, A., Natesan, B., Singh, K. and Usha, K. (2005) Improving zinc use efficiency of cereals under zinc deficiency. Current Science 88: 36–44.

Subramanian, K. S., Tenshia, V. J. S., Jayalakshmi, K. and Ramachandran, V. (2011) Antioxidant enzyme activities in arbuscular mycorrhizal (*Glomus intraradices*) fungus inoculated and non-inoculated maize plants under zinc deficiency. Indian Journal of Microbiology 51: 37-43·

Sun, C., Johnson, J. M., Cai, D., Sherameti, I., Oelmuller, 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.

Tavallali, V., Rahemi, M., Eshghi, S., Kholdebarin, B. and Ramezanian, A. (2010) Zinc alleviates salt stress and increases antioxidant enzyme activity in the leaves of pistachio (*Pistacia vera* L. 'Badami') seedlings. Turkish Journal of Agriculture and Forestry 34: 349-359.

Varma, A., Bakshi, M., Lou, B., Hartmann, A., and Oelmueller, R. (2012) *Piriformospora indica:* A novel plant growth-promoting mycorrhizal fungus. Agricultural Research 1: 117-131.

Verma, S., Varma, A., Rexer, K. H., Kost, G., Sarbhoy, A., Bisen, P., Butehorn, B., and Franken, P. (1998) *Piriformospora indica* gen. et sp. Nov., A new root-colonizing fungus. Mycologia 95: 896-903.

Watts-Williams, S. J., Patti, A. F. and Cavagnaro, T. R. (2013) Arbuscular mycorrhizas are beneficial under both deficient and toxic soil zinc conditions. Plant and Soil 371: 299-312.

Zare , M. J., Chordia, P. and Varma, A. (2013) *Piriformospora indica* versus salt stress. In: *Piriformospora indica* (eds. Varma, A., Kost, G. and Oelmuller, R.) Pp.263–281. Springer, Berlin.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1397.7.27.10.1]