

## اثر قارچ *Piriformospora indica* بر رنگیزه‌های فتوسنتزی و کارکرد سیستم آنتی‌اکسیدانی استویا تحت تنش شوری و خشکی

فهیمة سراج، همت‌اله پیردشتی\*، یاسر یعقوبیان و ولی‌اله قاسمی عمران

پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۳/۰۳، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۵/۱۰/۰۱)

### چکیده

به منظور بررسی اثر همزیستی قارچ *Piriformospora indica* بر سیستم آنتی‌اکسیدانی و رنگیزه‌های فتوسنتزی گیاه دارویی استویا (*Stevia rebaudiana* Bertoni) تحت تنش شوری و خشکی، آزمایشی درون‌شیشه‌ای به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی و در سه تکرار انجام شد. تیمارهای آزمایشی شامل سه سطح پتانسیل اسمزی (صفر، ۵- و ۱۰- بار)، سه منبع اسمزی شامل NaCl (Na)، مانیتول (M) و NaCl + مانیتول (Na+M) و تیمار همزیستی قارچی در دو سطح عدم تلقیح و تلقیح قارچ *P. indica* بود. نتایج نشان داد که در مجموع، در بین منابع اسمزی مورد مطالعه تنش شوری ناشی از NaCl بیشترین اثر بازدارندگی را بر رنگیزه‌های فتوسنتزی استویا داشت. از طرفی، با افزایش غلظت مانیتول فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسیددیسموتاز در گیاهان همزیست نشده افزایش نشان داد. در شرایط بدون تنش (سطح اسمزی صفر)، قارچ *P. indica* سبب بهبود قابل توجه رنگیزه‌های فتوسنتزی شامل کلروفیل *a*، *b* کل و کاروتنوئید شد. همچنین، میزان کلروفیل *b* و *a+b* در سطح اسمزی ۵- بار ناشی از تنش همزمان شوری و خشکی (Na+M)، در گیاهچه‌های همزیست شده نسبت به شاهد به ترتیب حدود ۴۱ و ۵۷ درصد افزایش یافت. از سوی دیگر، همزیستی قارچی سبب افزایش فعالیت بیشتر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نسبت به شرایط عدم تلقیح شد. بر این اساس، در سطح اسمزی ۵- بار، در تنش شوری و ترکیب شوری و خشکی (Na+M) فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز به ترتیب ۶۲ و ۱۸۵ درصد نسبت به شاهد بیشتر شد. در مجموع، نتایج بیانگر اثر مثبت قارچ *P. indica* در افزایش تحمل به تنش، به ویژه تنش همزمان خشکی و شوری بود.

کلمات کلیدی: پتانسیل اسمزی، فعالیت آنزیمی کلروفیل، منابع اسمزی، همزیستی قارچی

### مقدمه

شرایط نامساعد محیطی دارای اهمیت است (فلاحی و همکاران، ۱۳۸۷؛ نظامی و همکاران، ۱۳۸۷). در بین تنش‌های غیرزنده، تنش‌های خشکی و شوری در سطح جهان با توجه به آسیب‌های گسترده به از اهمیت بیشتری برخوردارند (میرمحمدی میبیدی و قره‌یاضی، ۱۳۸۱). گیاهان با کاهش شاخص‌های رشد، بستن روزنه‌ها، کاهش فتوسنتز، تغییر در

با افزایش وسعت اراضی تحت تنش شوری و خشکی در ایران و با در نظر گرفتن روند رو به رشد جمعیت جهان همراه با کاهش و تخریب منابع آب و خاک، تحقیق در خصوص گیاهان مقاوم به شرایط نامساعد و بررسی پاسخ گیاهان به این تنش‌ها و همچنین امکان کشت آن‌ها، به ویژه گیاهان دارویی در

\* نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: h.pirdashti@sanru.ac.ir

قارچ *P. indica* یکی از ریزجاندارانی است که در این زمینه مورد استفاده قرار می‌گیرد. این قارچ با ریشه بسیاری از گونه‌های گیاهی همزیستی داشته و رشد رویشی و عملکرد آن‌ها را افزایش می‌دهد (Oelmüller *et al.*, 2009) و علاوه بر تحمل سطوح شوری و خشکی زیاد قادر است موجب القای مقاومت در گیاهان میزبان شده و از اثرات سوء این تنش‌ها بکاهد (Zarea *et al.*, 2012a; Trivedi *et al.*, 2016). در همین راستا، گزارش شده است که قارچ *P. indica* از راه‌های مختلف نظیر افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، اسمولیت‌ها (به‌ویژه پرولین) و حفظ رنگیزه‌های کلروفیلی، موجب کاهش خطرات ناشی از تنش و افزایش تحمل گیاه میزبان به تنش‌های محیطی زنده و غیرزنده از قبیل خشکی (Sun *et al.*, 2010)، شوری (Waller *et al.*, 2005; Kumar *et al.*, 2009) و بیماری‌ها (Baltruschat *et al.*, 2008) می‌شود.

اهمیت و جایگاه گیاهان دارویی در حفظ و پایداری اکوسیستم‌ها، توسعه اقتصادی در سطح کلان، شاخص‌های زیست‌محیطی، ذخایر ژنتیکی، خودکفایی و امنیت دارویی بر کسی پوشیده نیست (میرحسینی و سابقی، ۱۳۸۴). در همین راستا، استویا با نام علمی *Stevia rebaudiana* Bertoni گیاهی علفی متعلق به خانواده کلپرک‌سانان (Asteraceae)، بومی مناطق شمالی آمریکای جنوبی، پاراگوئه و برزیل است (Mishra *et al.*, 2010). همچنین، این گیاه سرشار از پروتئین، کلسیم، فسفر و سایر مواد غذایی است که ضرورت استفاده از آن را به عنوان گیاه دارویی به اثبات می‌رساند (Viana and Metivier, 1998). ماده شیرین‌کننده استویا به سبب فاقد کالری بودن برای افرادی که از دیابت، هیپوگلیسمی، فشار خون بالا، چاقی و عفونت‌های قارچی مزمن رنج می‌برند یک شیرین‌کننده مطلوب است (Woelwer-Riek *et al.*, 2010).

بنابراین باتوجه به مطالب فوق، این پژوهش با هدف بررسی تأثیر قارچ *P. indica* بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و رنگیزه‌های فتوسنتزی گیاه دارویی استویا تحت تأثیر جداگانه و همزمان تنش شوری و خشکی در شرایط

فرایندهای تنظیم‌کننده انتقال یون‌ها و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان با تنش خشکی مقابله می‌نمایند. با این وجود، تنش خشکی با کاهش سطح برگ و هدایت روزنه‌ای می‌تواند به طور مستقیم بر فرایندهای بیوشیمیایی مربوط به فتوسنتز اثر گذاشته و با کاهش ورود دی‌اکسیدکربن به داخل روزنه‌ها منجر به کاهش فتوسنتز شود (Safarnejad, 2008; Hojati *et al.*, 2011; Sajedi *et al.*, 2012). اگرچه پاسخ گیاهان در بیشتر موارد به تنش خشکی و شوری مشابه ارزیابی می‌شوند (Shaheen *et al.*, 2005)، اما، تنش شوری علاوه بر تنش اسمزی از طریق سمیت یونی، برهم‌زدن تعادل یونی و پتانسیل اسمزی و همچنین به‌وسیله تنش‌های ثانویه‌ای چون اختلال تغذیه‌ای، سمیت متابولیک و جلوگیری از فعالیت فتوسنتزی بر رشد و نمو گیاهان تأثیر می‌گذارد (Baisakh *et al.*, 2008).

تنش‌های محیطی باعث تخریب رنگیزه‌های فتوسنتزی می‌گردند، به‌طوری‌که گزارش‌های متعددی مبنی بر کاهش مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی در گیاهان تحت تنش شوری و خشکی وجود دارد، از جمله می‌توان به گزارش‌هایی روی لوبیا (*Phaseolus vulgaris* L.) تحت تنش خشکی و سویا (*Glycin max* L.) تحت تنش شوری اشاره کرد (Sheteawi, 2007; Yu *et al.*, 2007). از سوی دیگر، شوری و خشکی از مهم‌ترین عوامل ایجاد تنش اکسیداتیو و افزایش گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) هستند که تجمع آن‌ها سبب پراکسیداسیون چربی‌ها، انفعال آنزیم‌ها، خسارت به اسیدهای نوکلئیک و تخریب غشاهای سلول می‌شود، هر چند، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان سبب حذف و غیرفعال شدن برخی رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌شوند (Mittler, 2002; Bailly, 2004). پاسخ آنتی‌اکسیدانی، فرآیندی مهم برای محافظت گیاهان در مقابل آسیب‌های اکسیداتیوی است که در اثر طیف وسیعی از تنش‌های محیطی شامل شوری، خشکی و سرما ایجاد می‌شود (Mittler *et al.*, 2004).

امروزه استفاده از روش‌های زیستی مبتنی بر استفاده از پتانسیل ریزجانداران مفید خاکزی در برقراری روابط همزیستی با گیاهان، به عنوان راهکاری مؤثر در افزایش تحمل گیاه به تنش‌های محیطی عنوان شده است (Bacilio *et al.*, 2004).

$$Chl_a (\mu\text{g} / \text{ml}) = 16.72 A_{665.2} - 9.16 A_{652.4} \quad (1)$$

$$Chl_b (\mu\text{g} / \text{ml}) = 34.09 A_{652.4} - 15.28 A_{665.2} \quad (2)$$

$$C_{(x+c)} (\mu\text{g} / \text{ml}) = (1000A_{470} - 1.63C_a - 104.96C_b) / 221 \quad (3)$$

که در این رابطه‌ها  $Chl_a$ ،  $Chl_b$  و  $C_{(x+c)}$  به ترتیب کلروفیل  $a$ ،  $b$  و کاروتنوئید و همچنین  $A_{470}$ ،  $A_{652.4}$ ،  $A_{665.2}$  میزان نور جذبی محلول در طول موج‌های ۶۶۵/۲، ۶۵۲/۴ و ۴۷۰ نانومتر می‌باشد.

میزان پراکسید هیدروژن با استفاده از روش Alexieva و همکاران (۲۰۰۱) و براساس واکنش  $H_2O_2$  با یدیدپتاسیم (KI) تعیین گردید. در این روش ۵۰۰ میلی‌گرم از بافت تازه برگ در پنج میلی TCA ۰/۱ درصد در حمام آب یخ ساییده شد. عصاره حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰g سانتیفریژ گردید. سپس به ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول رویی، ۰/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰ میلی‌مولار و اسیدیته ۷/۵ و یک میلی‌لیتر یدید پتاسیم یک مولار اضافه گردید. مخلوط واکنش به مدت یک ساعت در تاریکی در دمای اتاق نگهداری و سپس جذب نمونه‌ها در ۳۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز بر اساس روش Beauchamp و Fridovich (۱۹۷۱) انجام شد. محلول واکنش در حجم نهایی شامل ۸۳۵ میکرولیتر بافر فسفات سدیم ۵۰ میلی‌مولار (pH=۸)، ۳۳ میکرولیتر نیتروبلوترازولیوم ۰/۷۵ میلی‌مولار، ۳۳ میکرولیتر ریوفلاوین و ۳۳ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. تغییرات جذب محلول واکنش نسبت به شاهد در طول موج ۵۶۰ نانومتر اندازه‌گیری و فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز براساس واحد بر میلی‌گرم پروتئین بیان گردید.

فعالیت آنزیم کاتالاز به روش Abi (۱۹۸۴) و بر پایه تجزیه پراکسید هیدروژن توسط آنزیم کاتالاز اندازه‌گیری شد. مخلوط واکنش شامل سه میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار، ده میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۱۵ میلی‌مولار و ۵۰ میکرولیتر عصاره بود. پس از اضافه کردن عصاره، کاهش جذب در طول موج ۲۴۰ نانومتر به مدت یک دقیقه با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد.

مخلوط واکنش آنزیم پراکسیداز شامل یک میلی‌لیتر بافر

کنترل شده طراحی و اجرا گردید.

## مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر در زمستان ۱۳۹۴ در آزمایشگاه کشت بافت پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی و در سه تکرار انجام شد. تیمارهای آزمایشی شامل سه سطح پتانسیل اسمزی (صفر، ۵- و ۱۰- بار)، سه منبع اسمزی شامل NaCl (Na)، مانیتول (M) و +NaCl (M+Na) و تیمار همزیستی قارچی شامل دو سطح (عدم تلقیح و تلقیح قارچ اندوفیت *P. indica*) بود. مقدار NaCl و مانیتول برای هریک از سطوح شوری و خشکی به ترتیب از روش Poljakoff mayber و همکاران (۱۹۹۴) و Pant و همکاران (۲۰۱۴) محاسبه شد. برای تیمارهای ترکیب شوری و خشکی (+NaCl مانیتول) نیز از پنجاه درصد مقادیر محاسبه شده برای هریک از آنها استفاده شد.

قارچ *P. indica* در محیط کشت مایع کفر (Kaefer, 1977) و در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد به مدت دو هفته کشت شد. به‌منظور فراهم‌سازی نمونه‌های گیاهی مورد استفاده در این تحقیق، ریزنمونه‌های جوانه انتهایی به طول دو سانتی‌متر از گیاهچه‌های رشدیافته در شرایط درون‌شیشه‌ای تحت شرایط استریل جداسازی و در محیط MS (Murashige and Skoog, 1962) کشت گردید. ریزنمونه‌ها در اتاق کشت با فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از رشد و ریشه‌دهی گیاهان در مدت ۱۴ روز، ریشه این گیاهان به مدت ۳۰ ثانیه با سوسپانسیون قارچ *P. indica* آغشته و در محیط کشت‌های حاوی تیمارهای مختلف شوری و خشکی واکنش شدند. یک ماه پس از رشد، نمونه‌برداری از برگ‌های بالای گیاه صورت گرفته و رنگیزه‌های فتوسنتزی با استفاده از روش Lichtenthaler و Buschmann (۲۰۰۱) اندازه‌گیری و میزان کلروفیل  $a$  و  $b$  و کاروتنوئید به ترتیب براساس معادله‌های ۱ تا ۳ زیر محاسبه گردید.

قارچی قرار نگرفت ولی اثر آن بر غلظت کلروفیل  $a$  و  $a/b$  ( $P \leq 0/01$ ) معنی‌دار بود. در میان صفات مورد مطالعه، تنها از نظر غلظت کلروفیل  $a$  و  $a+b$  بین تیمار سطوح، منبع اسمزی و همزیستی قارچی برهمکنش معنی‌داری ( $P \leq 0/05$ ) مشاهده شد (جدول ۱).

براساس نتایج حاصل از مقایسه میانگین، با افزایش سطوح پتانسیل اسمزی، غلظت رنگیزه‌های فتوسنتزی شامل کلروفیل  $a$ ،  $b$ ،  $a+b$  و کاروتنوئید کاهش نشان داد که میزان کاهش در تیمار شوری ناشی از NaCl نسبتاً بیشتر بود. به طوری که در تیمار عدم همزیستی افزایش تنش اسمزی ناشی از NaCl از صفر به  $-10$  بار، غلظت کلروفیل  $a$ ،  $b$ ،  $a+b$  و کاروتنوئید را نسبت به سطح صفر به ترتیب حدود  $31$ ،  $40$ ،  $34$  و  $42$  درصد کاهش داد (جدول ۲). شوری با تسریع زوال رنگیزه‌های کلروفیلی، کوچکتر شدن فضای بین سلولی و کاهش هدایت دی‌اکسیدکربن موجب کاهش فتوسنتز در گیاهان می‌گردد. همچنین از دیگر اثرات سوء شوری بر محتوی کلروفیل کاهش در جذب عناصر معدنی (مانند منیزیم) مورد نیاز جهت بیوسنتز کلروفیل است (کرمی و زارع، ۱۳۹۳). با توجه به مشاهدات رضوی‌زاده و محققیان (۱۳۹۴) تنش شوری مقدار کلروفیل  $a$ ،  $b$ ، کل و کاروتنوئید را در گیاهچه‌های آویشن در شرایط کشت درون شیشه به‌طور معنی‌داری کاهش داد.

در پژوهش حاضر، همزیستی قارچی غلظت کلروفیل  $a$  را در سطح اسمزی صفر نسبت به شاهد (عدم همزیستی) حدود  $37$  درصد افزایش داد (جدول ۲). در همین راستا، محققین افزایش محتوای کلروفیل  $a$ ،  $b$  و کل در گیاهان تلقیح شده با  $P. indica$  را به دلیل بهبود وضعیت آبی گیاه و جذب عناصر معدنی مانند منیزیم دانسته‌اند (Jenschke et al., 2000; Giri et al., 2002). همچنین، نقش مثبت این قارچ در بهبود رنگدانه‌های فتوسنتزی از جمله کلروفیل و در نتیجه فتوسنتز در گیاهچه‌های سجافی (*Chlorophytum borivilianum*) توسط Gosál و همکاران (۲۰۱۰) بیان شده است. از سوی دیگر، غلظت کلروفیل  $a$  در تنش اسمزی ناشی از NaCl و ترکیب همزمان NaCl و مایتول (Na+M) در سطح اسمزی  $-5$  بار در

فسفات  $100$  میلی مولار ( $pH=7$ )،  $250$  میکرولیتر EDTA  $0/1$  میلی مولار، یک میلی لیتر گایاگول  $5$  میلی مولار، یک میلی لیتر پراکسید هیدروژن  $15$  مولار و  $50$  میکرولیتر از محلول آنزیمی استخراج شده بود. واکنش با اضافه کردن محلول آنزیمی شروع شده و افزایش جذب در طول موج  $470$  نانومتر به مدت یک دقیقه ثبت شد (Tang and Newton, 2005).

اندازه‌گیری میزان پروتئین محلول کل به روش Bradford (۱۹۷۶) صورت گرفت. بدین منظور کمپلکس واکنش شامل  $200$  میکرولیتر از عصاره استخراجی نمونه با  $500$  میکرولیتر معرف بردفورد و  $1800$  میکرولیتر آب دیونیزه می‌باشد. بعد از پنج دقیقه میزان جذب مخلوط در طول موج  $595$  نانومتر قرائت شد و با قراردادن عدد بدست آمده در منحنی استاندارد میزان پروتئین نمونه مجهول بر حسب میکروگرم بر میلی لیتر بدست آمد.

در نهایت داده‌ها با استفاده از نرم‌افزارهای آماری SAS نسخه  $9/1$  (سلطانی، ۱۳۹۱) و MSTATC تجزیه شده و میانگین‌ها توسط آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد مورد مقایسه قرار گرفت.

## نتایج و بحث

رنگیزه‌های فتوسنتزی: نتایج تجزیه واریانس داده‌های حاصل از آزمایش نشان داد (جدول ۱) که اثر ساده سطوح و منبع اسمزی بر تمام صفات مربوط به رنگیزه‌های فتوسنتزی در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. همزیستی قارچی نیز بر تمام رنگیزه‌های فتوسنتزی به غیر از نسبت کلروفیل  $a/b$  اثر معنی‌داری ( $P \leq 0/01$ ) داشت. براساس نتایج، برهمکنش سطوح و منبع اسمزی موجب اختلاف معنی‌داری بر غلظت کلروفیل  $b$  و کاروتنوئید در سطح احتمال پنج درصد و کلروفیل  $a/b$  در سطح احتمال یک درصد گردید، اما بر غلظت کلروفیل  $a$  و کل ( $a+b$ ) اثر معنی‌داری نداشت. در این میان، برهمکنش سطوح اسمزی و همزیستی قارچی بر غلظت کلروفیل  $a$  و  $a+b$  معنی‌دار بود. غلظت کلروفیل  $b$ ، کل ( $a+b$ ) و کاروتنوئید تحت تأثیر برهمکنش منبع اسمزی و همزیستی

جدول ۱- میانگین مربعات اثر سطوح، منبع اسمزی و قارچ *Piriformospora indica* بر رنگیزه‌های فتوستتزی گیاه دارویی استویا

| منابع تغییر                    | درجه آزادی | غلظت کلروفیل <i>a</i> | غلظت کلروفیل <i>b</i> | غلظت کلروفیل <i>a+b</i> | کلروفیل <i>a/b</i>  | کاروتنوئید          |
|--------------------------------|------------|-----------------------|-----------------------|-------------------------|---------------------|---------------------|
| سطوح اسمزی                     | ۱          | ۱۰۰/۰۳**              | ۳۲/۳۹**               | ۲۶۱/۹۵**                | ۲/۰۴**              | ۷۳۴/۹۵**            |
| منبع اسمزی                     | ۲          | ۴۷/۷۹**               | ۱۶/۹۴**               | ۱۱۷/۲۲**                | ۰/۴۵**              | ۳۲۹/۶۹**            |
| قارچ                           | ۱          | ۴۱/۴۵**               | ۶/۵۵**                | ۸۷/۹۱**                 | ۰/۰۷ <sup>ns</sup>  | ۱۴۳/۸۴**            |
| سطوح اسمزی × منبع اسمزی        | ۲          | ۱/۰۴ <sup>ns</sup>    | ۳/۰۳*                 | ۱/۴۹ <sup>ns</sup>      | ۰/۵۵**              | ۵۸/۴۰*              |
| سطوح اسمزی × قارچ              | ۱          | ۳۶/۵۸**               | ۱/۷۹ <sup>ns</sup>    | ۷۱/۸۲**                 | ۰/۰۰۴ <sup>ns</sup> | ۴۶/۵۵ <sup>ns</sup> |
| منبع اسمزی × قارچ              | ۲          | ۶/۴۱**                | ۲/۲۶ <sup>ns</sup>    | ۹/۶۶ <sup>ns</sup>      | ۰/۲۶**              | ۳۶/۹۷ <sup>ns</sup> |
| سطوح اسمزی × منبع اسمزی × قارچ | ۲          | ۵/۲۶*                 | ۱/۳۵ <sup>ns</sup>    | ۱۱/۶۴*                  | ۰/۰۱ <sup>ns</sup>  | ۲۵/۵۸ <sup>ns</sup> |
| خطای آزمایش                    | ۲۸         | ۱/۰۲                  | ۰/۷۹                  | ۳/۰۶                    | ۰/۰۴                | ۱۶/۳۰               |
| ضریب تغییرات (درصد)            | -          | ۸/۳۳                  | ۱۷/۷۳                 | ۱۰/۱۰                   | ۸/۴۷                | ۱۸/۷۲               |

ns, \*\* و \* به ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال پنج و یک درصد

جدول ۲- مقایسه میانگین برهمکنش سطوح، منبع اسمزی و قارچ *P. indica* (Pi) بر رنگیزه‌های فتوستتزی گیاه دارویی استویا

| سطوح اسمزی | منبع اسمزی | قارچ | غلظت کلروفیل <i>a</i> | غلظت کلروفیل <i>b</i> | غلظت کلروفیل <i>a+b</i> | کلروفیل <i>a/b</i>  | کاروتنوئید (میکروگرم در میلی‌لیتر) |
|------------|------------|------|-----------------------|-----------------------|-------------------------|---------------------|------------------------------------|
| صفر        |            | -Pi  | ۱۲/۹۹ <sup>c</sup>    | ۵/۷۱ <sup>b-e</sup>   | ۱۸/۷۱ <sup>c</sup>      | ۲/۳۳ <sup>c-f</sup> | ۲۴/۶۱ <sup>b-e</sup>               |
|            |            | +Pi  | ۱۷/۷۸ <sup>a</sup>    | ۸/۸۲ <sup>a</sup>     | ۲۶/۶۰ <sup>a</sup>      | ۲/۰۳ <sup>fg</sup>  | ۳۸/۷۷ <sup>a</sup>                 |
|            | Na         | -Pi  | ۱۰/۱۱ <sup>de</sup>   | ۴/۳۵ <sup>e-h</sup>   | ۱۴/۴۵ <sup>de</sup>     | ۲/۳۳ <sup>c-f</sup> | ۱۸/۴۷ <sup>efg</sup>               |
|            |            | +Pi  | ۱۲/۴۳ <sup>c</sup>    | ۳/۷۰ <sup>f-i</sup>   | ۱۷/۱۵ <sup>cd</sup>     | ۲/۶۴ <sup>bcd</sup> | ۱۷/۰۲ <sup>efg</sup>               |
| -۵         | M          | -Pi  | ۱۵/۲۵ <sup>b</sup>    | ۶/۵۹ <sup>bcd</sup>   | ۲۱/۸۴ <sup>b</sup>      | ۲/۳۱ <sup>c-f</sup> | ۲۸/۵۷ <sup>bcd</sup>               |
|            |            | +Pi  | ۱۶/۲۳ <sup>ab</sup>   | ۶/۶۶ <sup>bc</sup>    | ۲۳/۴۶ <sup>b</sup>      | ۲/۲۴ <sup>efg</sup> | ۲۸/۸۸ <sup>bc</sup>                |
|            | Na+M       | -Pi  | ۹/۶۴ <sup>de</sup>    | ۵/۱۰ <sup>c-f</sup>   | ۱۴/۷۴ <sup>de</sup>     | ۱/۸۹ <sup>g</sup>   | ۲۲/۰۹ <sup>cde</sup>               |
|            |            | +Pi  | ۱۵/۹۱ <sup>b</sup>    | ۷/۲۰ <sup>b</sup>     | ۲۳/۱۱ <sup>b</sup>      | ۲/۲۴ <sup>efg</sup> | ۳۱/۳۷ <sup>b</sup>                 |
|            | Na         | -Pi  | ۸/۹۹ <sup>ef</sup>    | ۳/۴۳ <sup>ghi</sup>   | ۱۲/۴۲ <sup>ef</sup>     | ۲/۶۶ <sup>bc</sup>  | ۱۴/۱۸ <sup>fgh</sup>               |
|            |            | +Pi  | ۷/۶۱ <sup>f</sup>     | ۲/۴۰ <sup>i</sup>     | ۱۰/۰۱ <sup>f</sup>      | ۳/۱۷ <sup>a</sup>   | ۹/۳۰ <sup>h</sup>                  |
|            | M          | -Pi  | ۱۲/۰۲ <sup>c</sup>    | ۴/۹۷ <sup>d-g</sup>   | ۱۷/۰۰ <sup>cd</sup>     | ۲/۴۴ <sup>b-e</sup> | ۲۱/۲۳ <sup>def</sup>               |
| -۱۰        |            | +Pi  | ۱۱/۴۳ <sup>cd</sup>   | ۵/۱۶ <sup>c-f</sup>   | ۱۶/۶۰ <sup>cd</sup>     | ۲/۲۶ <sup>d-g</sup> | ۲۲/۱۹ <sup>cde</sup>               |
|            | Na+M       | -Pi  | ۱۰/۰۴ <sup>de</sup>   | ۳/۲۸ <sup>hi</sup>    | ۱۳/۹۱ <sup>de</sup>     | ۲/۸۰ <sup>b</sup>   | ۱۳/۴۲ <sup>gh</sup>                |
|            |            | +Pi  | ۹/۴۸ <sup>e</sup>     | ۲/۹۷ <sup>hi</sup>    | ۱۲/۴۵ <sup>ef</sup>     | ۳/۱۹ <sup>a</sup>   | ۱۱/۸۴ <sup>gh</sup>                |

میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه براساس آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

-Pi: عدم تلقیح با قارچ *P. indica* (شاهد)، +Pi: تلقیح با قارچ *P. indica*، NaCl: Na، M: مانیتول، Na+M: NaCl+مانیتول

تیمار تلقیح قارچ به طور معنی داری بیشتر از تیمار بدون تلقیح بود به طوری که، قارچ *P. indica* به ترتیب سبب افزایش حدود ۲۳ و ۶۵ درصدی این صفت نسبت به شاهد شد (جدول ۲). براساس مطالعات، Sharma و همکاران (۱۹۹۴) محتوای کلروفیل برگ یکی از عوامل مهم در حفظ ظرفیت فتوسنتزی و تولید ماده خشک است. از این رو، براساس مشاهدات حاجی نیا و همکاران (۱۳۹۰)، افزایش محتوای کلروفیل در برگ گیاهان تلقیح شده با قارچ *P. indica* تحت تنش شوری در گندم گزارش شده است.

مطابق نتایج، در سطح اسمزی صفر نتایج اثر همزیستی قارچی بیانگر بهبود قابل توجه غلظت کلروفیل  $b$  و  $a+b$  در گیاهچه‌های همزیست شده نسبت به گیاهچه‌های شاهد بود. در همین زمینه، Zarea و همکاران (۲۰۱۲b) بیان کردند که بالا بودن میزان کلروفیل در گیاهان تلقیح شده با قارچ می‌تواند به علت وجود رابطه مثبت بین غلظت فسفر و مقدار کلروفیل در گیاهان تلقیح شده باشد. همچنین، سپهری (۱۳۸۸) نیز گزارش کرد که قارچ اندوفیت *P. indica* با تأثیر بر پروتئین‌های مهم درگیر در فرایند فتوسنتز و چرخه کالوین و افزایش بیان آن‌ها، نقش مؤثری در حفظ و پایداری فتوسنتز ایفا می‌نماید.

غلظت کلروفیل  $b$  و  $a+b$  در ترکیب همزمان دو منبع اسمزی NaCl و مانتول (Na+M) در سطح اسمزی ۵- بار در تیمار همزیستی قارچی نسبت به شاهد به ترتیب حدود ۴۱ و ۵۷ درصد افزایش یافت در حالی که میزان این صفات، در ترکیب NaCl و مانتول (Na+M) در سطح ۱۰- بار تفاوت معنی داری نداشتند (جدول ۲). براساس یافته‌های Yaghoubian و همکاران (۲۰۱۴) در گندم غلظت کلروفیل  $a$  و کلروفیل کل ( $a+b$ ) در گیاهان تیمار شده با قارچ‌های میکوریزا و *P. indica* تحت شرایط تنش خشکی افزایش معنی داری نسبت به گیاهان تیمار نشده داشتند، در همین راستا، افزایش محتوای کلروفیل یونجه تلقیح شده با قارچ‌های میکوریزا در تنش شوری توسط کرمی و زارع (۱۳۹۳) نیز گزارش شده است.

براساس یافته‌های حاصل از مقایسه میانگین، در تنش ناشی

از NaCl و ترکیب همزمان NaCl و مانتول (Na+M) کلروفیل  $a/b$  در سطح اسمزی ۱۰- بار تحت تأثیر همزیستی قارچی افزایش یافت که این افزایش به ترتیب حدود ۱۹ و ۱۴ درصد نسبت به شرایط عدم همزیستی بود (جدول ۲). در همین زمینه، Gill و Tuteja (۲۰۱۰) بیان کردند کاروتنوئید به عنوان آنتی‌اکسیدان‌های بیولوژیکی نقش بسیار مهمی در حفاظت از بافت گیاهی ایفا می‌نمایند و عدم حضور آنها ممکن است سبب آسیب فتواکسیداتیو شدید در بافت‌های گیاهی گردد. در پژوهش حاضر، در سطح اسمزی صفر قارچ *P. indica* موجب افزایش معنی دار کاروتنوئید نسبت به شاهد شد. همچنین، در ترکیب همزمان دو منبع اسمزی NaCl و مانتول (Na+M) در سطح ۵- بار افزایش ۴۲ درصدی این رنگیزه در گیاهچه‌های همزیست شده در مقایسه با ترکیب‌های تیماری بدون تلقیح مشاهده گردید (جدول ۲).

**فعالیت آنزیمی:** نتایج تجزیه و تحلیل میانگین مربعات صفات مورد مطالعه حاکی از آن بود که سطوح اسمزی اثر معنی داری بر فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و گایاکول پراکسیداز در سطح احتمال یک درصد داشت. از طرفی منبع اسمزی اثر معنی داری بر فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز و محتوی پروتئین محلول نداشت ولی اثر آن بر فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز ( $P \leq 0/01$ ) و غلظت پراکسید هیدروژن ( $P \leq 0/05$ ) معنی دار بود. از طرفی، همزیستی قارچی تنها بر فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و گایاکول پراکسیداز معنی دار بود. براساس نتایج، برهمکنش سطوح و منبع اسمزی اثر معنی داری بر صفات مورد مطالعه شامل فعالیت آنزیم‌های کاتالاز ( $P \leq 0/05$ )، پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز، غلظت پراکسید هیدروژن و پروتئین محلول ( $P \leq 0/01$ ) نشان داد. اثر متقابل سطوح اسمزی و همزیستی قارچی نیز بر تمام صفات مورد مطالعه به جز فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز معنی دار بود. از طرفی، برهمکنش منبع اسمزی و همزیستی قارچی بر صفات کاتالاز، پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز و پروتئین محلول در سطح احتمال یک درصد و بر غلظت پراکسید هیدروژن در سطح احتمال پنج درصد معنی دار گردید.

جدول ۳ - میانگین مربعات اثر سطوح، منبع اسمزی و قارچ *Piriformospora indica* بر فعالیت آنزیمی و غلظت پراکسید هیدروژن در گیاه دارویی استویا

| منابع تغییر                    | درجه آزادی | فعالیت آنزیم کاتالاز | فعالیت آنزیم پراکسیداز | فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز | غلظت پراکسید هیدروژن | پروتئین محلول       |
|--------------------------------|------------|----------------------|------------------------|---------------------------------|----------------------|---------------------|
| سطوح اسمزی                     | ۱          | ۱/۰۹**               | ۱۷۹۵۲/۹۱**             | ۰/۰۶ <sup>ns</sup>              | ۰/۳۶ <sup>ns</sup>   | ۱/۰۱ <sup>ns</sup>  |
| منبع اسمزی                     | ۲          | ۰/۰۹**               | ۱۰۵۵/۰۸ <sup>ns</sup>  | ۰/۱۷**                          | ۲/۵۷*                | ۱/۰۴ <sup>ns</sup>  |
| قارچ                           | ۱          | ۰/۱۰**               | ۹۸۱۹/۰۱**              | ۰/۰۵ <sup>ns</sup>              | ۰/۸۰ <sup>ns</sup>   | ۰/۰۱ <sup>ns</sup>  |
| سطوح اسمزی × منبع اسمزی        | ۲          | ۰/۰۵*                | ۲۶۳۶/۱۹**              | ۰/۳۱**                          | ۳/۸۰**               | ۱۱/۳۵**             |
| سطوح اسمزی × قارچ              | ۱          | ۰/۲۵**               | ۸۴۲/۴۰ <sup>ns</sup>   | ۱/۲۱**                          | ۳/۷۵*                | ۳/۵۲*               |
| منبع اسمزی × قارچ              | ۲          | ۰/۷۵**               | ۳۳۴۲/۱۰**              | ۰/۲۴**                          | ۲/۸۷*                | ۱۲/۶۴**             |
| سطوح اسمزی × منبع اسمزی × قارچ | ۲          | ۰/۳۲**               | ۸۷۲۳/۹۲**              | ۰/۱۴*                           | ۱/۴۰ <sup>ns</sup>   | ۰/۰۶۶ <sup>ns</sup> |
| خطای آزمایش                    | ۲۸         | ۰/۰۱                 | ۴۱۲/۸۸                 | ۰/۰۲                            | ۰/۶۲                 | ۰/۸۳                |
| ضریب تغییرات (درصد)            | -          | ۱۸/۸۴                | ۲۲/۶۳                  | ۲۴/۳۱                           | ۱۸/۳۴                | ۱۳/۱۳               |

ns, \*\*, \* و \* به ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال پنج و یک درصد

ترتیب حدود ۶۵ و ۱۲۰ درصد کاهش داد. از سوی دیگر، در سطح اسمزی ۱۰- بار و تنش همزمان شوری و خشکی، در گیاهچه‌های همزیست کاهش ۸۳ درصدی فعالیت این آنزیم مشاهده شد (جدول ۴). مشاهدات Baltruschat و همکاران (۲۰۰۸) نشان داد که قارچ *P. indica* از طریق تأثیر بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی موجب بهبود رشد و کاهش اثرات تنش شوری در گیاه جو شد. همچنین، نوری آکندی (۱۳۹۴) گزارش کرد که تلقیح قارچ *P. indica* در سطوح پایین شوری کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی از جمله کاتالاز را به دنبال داشت.

بر اساس نتایج حاصل از مقایسه میانگین (جدول ۴)، در تیمار بدون همزیستی با افزایش سطوح اسمزی از صفر تا ۱۰- بار، فعالیت آنزیم پراکسیداز در تنش همزمان شوری و خشکی (Na+M) افزایش یافت به طوری که، در سطح ۱۰- بار نسبت به سطح صفر میزان این صفت افزایش بیش از سه برابری نشان داد. افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز تحت تنش خشکی در ذرت توسط Kumar و همکاران (۲۰۰۹) و گندم

با توجه به نتایج، برهمکنش معنی‌داری نیز بین سطوح، منبع اسمزی و همزیستی قارچی از نظر فعالیت آنزیم کاتالاز، پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز مشاهده شد (جدول ۳).

بر طبق نتایج، فعالیت آنزیم کاتالاز با افزایش تنش اسمزی افزایش یافت، به طوری که با افزایش غلظت مانیتول در سطح ۱۰- بار فعالیت این آنزیم نسبت به سطح صفر بیش از سه برابر بیشتر شد (جدول ۴). آنزیم کاتالاز نقش مهمی در جمع‌آوری پراکسید هیدروژن و کاهش اثرات تخریبی آن در پراکسی‌زوم و گلی‌اکسی‌زوم ایفا می‌نماید (Seckin et al., 2010). نتایج این پژوهش با یافته‌های Ye و همکاران (۲۰۰۰) مبنی بر افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاه آرابیدوپسیس تحت تنش خشکی و در نتیجه افزایش مقاومت گیاه و در نهایت عملکرد محصول مطابقت دارد. از طرفی، در شرایط بدون تنش (سطح اسمزی صفر) میزان فعالیت این آنزیم در همزیستی قارچی افزایش معنی‌داری در مقایسه با شاهد نشان داد. ولی در تنش ۵- و ۱۰- بار و در تیمار خشکی ناشی از مانیتول، قارچ *P. indica* فعالیت این آنزیم را نسبت به شاهد به

جدول ۴- مقایسه میانگین اثر متقابل سه گانه سطوح، منبع اسمزی و قارچ *P. indica* (Pi) بر فعالیت آنزیمی و غلظت پراکسید هیدروژن در گیاه استویا

| سطوح اسمزی | منبع اسمزی | قارچ | فعالیت آنزیمی (واحد آنزیمی بر میلی گرم پروتئین در دقیقه) |                        |                                  | پراکسید هیدروژن (نانومول بر گرم وزن تر) | پروتئین محلول (میلی گرم در گرم وزن تر) |                    |
|------------|------------|------|--|------------------------|----------------------------------|---|--|--------------------|
|            |            |      | فعالیت آنزیم کاتالاز                                     | فعالیت آنزیم پراکسیداز | فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز |   |  |                    |
| صفر        | -Pi        |      | ۰/۳۳ <sup>efg</sup>                                      | ۴۳/۲۴ <sup>gh</sup>    | ۱/۰۴ <sup>ab</sup>               | ۴/۵۵ <sup>ab</sup>                      | ۸/۳۹ <sup>abc</sup>                    |                    |
|            | +Pi        |      | ۰/۶۶ <sup>bc</sup>                                       | ۸۴/۵۲ <sup>def</sup>   | ۰/۵۳ <sup>cd</sup>               | ۴/۱۶ <sup>b</sup>                       | ۷/۸۳ <sup>bcd</sup>                    |                    |
| -۵         | -Pi        | Na   | ۰/۲۵ <sup>fg</sup>                                       | ۴۹/۰۸ <sup>fgh</sup>   | ۰/۵۶ <sup>cd</sup>               | ۴/۲۷ <sup>ab</sup>                      | ۹/۶۰ <sup>a</sup>                      |                    |
|            | +Pi        |      | ۰/۴۳ <sup>def</sup>                                      | ۶۹/۶۷ <sup>d-h</sup>   | ۰/۹۱ <sup>ab</sup>               | ۵/۷۸ <sup>a</sup>                       | ۶/۶۴ <sup>de</sup>                     |                    |
|            | -Pi        | M    | ۰/۵۴ <sup>cd</sup>                                       | ۶۸/۰۳ <sup>d-h</sup>   | ۰/۵۵ <sup>cd</sup>               | ۴/۷۹ <sup>ab</sup>                      | ۶/۶۰ <sup>de</sup>                     |                    |
|            | +Pi        |      | ۰/۱۹ <sup>g</sup>  | ۱۰۰/۷۳ <sup>cd</sup>   | ۰/۷۵ <sup>bc</sup>               | ۴/۱۶ <sup>b</sup>                       | ۶/۴۳ <sup>de</sup>                     |                    |
|            | -Pi        | Na+M | ۰/۴۸ <sup>de</sup>                                       | ۴۰/۳۷ <sup>h</sup>     | ۰/۴۰ <sup>de</sup>               | ۱/۷۳ <sup>c</sup>                       | ۴/۶۷ <sup>f</sup>                      |                    |
|            | +Pi        |      | ۰/۴۱ <sup>def</sup>                                      | ۱۰۲/۷۶ <sup>cd</sup>   | ۱/۱۴ <sup>a</sup>                | ۴/۳۵ <sup>ab</sup>                      | ۶/۶۵ <sup>de</sup>                     |                    |
|            | -۱۰        | -Pi  | Na   | ۰/۳۳ <sup>efg</sup>    | ۸۱/۳۳ <sup>d-g</sup>             | ۰/۷۴ <sup>bc</sup>                      | ۴/۲۲ <sup>b</sup>                      | ۶/۳۶ <sup>de</sup> |
|            |            | +Pi  |  | ۰/۸۱ <sup>b</sup>      | ۱۵۰/۳۶ <sup>ab</sup>             | ۰/۸۷ <sup>ab</sup>                      | ۴/۳۲ <sup>ab</sup>                     | ۵/۷۴ <sup>ef</sup> |
| -Pi        |            | M    | ۱/۱۹ <sup>a</sup>  | ۶۰/۳۵ <sup>e-h</sup>   | ۱/۱۵ <sup>a</sup>                | ۴/۶۴ <sup>ab</sup>                      | ۶/۳۸ <sup>de</sup>                     |                    |
| +Pi        |            |      | ۰/۵۴ <sup>cd</sup>                                       | ۱۳۰/۲۸ <sup>bc</sup>   | ۰/۴۲ <sup>de</sup>               | ۴/۱۴ <sup>b</sup>                       | ۶/۹۶ <sup>cde</sup>                    |                    |
| -Pi        |            | Na+M | ۱/۳۰ <sup>a</sup>  | ۱۷۸/۸۱ <sup>a</sup>    | ۰/۴۶ <sup>cde</sup>              | ۴/۴۷ <sup>ab</sup>                      | ۶/۱۳ <sup>def</sup>                    |                    |
| +Pi        |            |      | ۰/۲۲ <sup>g</sup>  | ۹۷/۴۸ <sup>cde</sup>   | ۰/۱۷ <sup>e</sup>                | ۴/۵۰ <sup>ab</sup>                      | ۸/۷۸ <sup>ab</sup>                     |                    |

میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه براساس آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد اختلاف معنی داری با یکدیگر ندارند.

Pi: عدم تلقیح با قارچ *P. indica* (شاهد)، +Pi: تلقیح با قارچ *P. indica*، NaCl: Na، M: مانیتول، Na+M: NaCl+مانیتول

از بین بردن رادیکال‌های آزاد اکسیژن و ایجاد مقاومت نسبت به تنش‌های اکسایشی، پاسخ به تنش آلودگی هوا و ترمیم زخم در گیاهان ایفا می‌کنند و نقش اساسی در سیستم دفاعی گیاهان در مواجهه با تنش‌های محیطی دارند. از طرفی، Sun و همکاران (۲۰۱۰) نیز علت افزایش مقاومت گیاهان شبه میکوریزی را ناشی از بیان ژن‌های مربوط به تولید و فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های گیاهی دانستند که باعث جمع‌آوری بهتر گونه‌های اکسیژن فعال و جلوگیری از تنش اکسیداتیو می‌شوند. *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 این قارچ سبب افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان

توسط Yaghoubian و همکاران (۲۰۱۴) نیز گزارش شد. همزیستی قارچی در شرایط بدون تنش (سطح اسمزی صفر) میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز را نسبت به شاهد حدود ۹۵ درصد افزایش داد (جدول ۴). افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز گیاه توسط قارچ‌های همزیست مانند میکوریزا می‌تواند به علت افزایش جذب فسفر باشد (Mathur and Vyas, 1996). همچنین، همزیستی قارچی در تنش شوری و خشکی ۱۰-بار سبب افزایش قابل توجه فعالیت آنزیم پراکسیداز در مقایسه با ترکیب تیماری بدون تلقیح شد، به طوری که این افزایش در تنش شوری و خشکی به ترتیب حدود ۸۵ و ۱۱۶ درصد بود (جدول ۴). براساس مطالعات Kankok و همکاران (۲۰۰۱) پراکسیدازها، نقش مهمی از جمله دخالت در متابولیسم اکسین،



(جدول ۴). مطابق با نتایج مقایسه میانگین، میزان پروتئین محلول با افزایش تنش شوری (NaCl) کاهش یافت (جدول ۴). تنش شوری به صورت منفی بر متابولیسم پروتئین تاثیر می‌گذارد که می‌تواند به علت کاهش سنتز پروتئین، تسریع پروتئولیز، کاهش در اسیدهای آمینه فراهم و یا واسرشته شدن آنزیم‌های درگیر در سنتز پروتئین باشد (Muthukumarasamy et al., 2000). نتایج مشابهی نیز در تربچه (*Raphanus sativus*) (L. Muthukumarasamy et al., 2000) و لوبیا (*Phaseolus vulgaris*) (Khadri et al., 2007) مشاهده شده است. همچنین، در سطح اسمزی ۵- و ۱۰- بار در ترکیب همزمان NaCl و مانیتول (Na+M) همزیستی قارچی میزان پروتئین محلول را به ترتیب حدود ۴۲ و ۴۳ درصد بهبود بخشید (جدول ۴).

#### نتیجه‌گیری

در مجموع، در بین منابع اسمزی مورد مطالعه تنش شوری ناشی از NaCl بیشترین اثر بازدارندگی را بر رنگیزه‌های فتوستتزی استویا با افزایش سطوح اسمزی داشت. از طرفی، با افزایش غلظت مانیتول فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسیددیسموتاز بیشتر شد. از طرفی، قارچ *P. indica* نیز، با بهبود غلظت رنگیزه‌های فتوستتزی به‌خصوص کاروتنوئید و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نظیر پراکسیداز و سوپراکسیددیسموتاز سبب افزایش تحمل به تنش در استویا شد. در این میان، همزیستی قارچ تأثیر بیشتری را در ترکیب همزمان NaCl و مانیتول (Na+M) در مقایسه با سایر منابع نشان داد.

#### سپاسگزاری

بدین‌وسیله از پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری طبرستان و دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری به‌خاطر حمایت‌های مالی جهت انجام این پژوهش قدردانی می‌گردد.

می‌شود که در سم‌زدایی گونه‌های اکسیژن فعال نقش دارند (Kumar et al., 2012; Varma et al., 2013). از سوی دیگر، افزایش غلظت مانیتول در تیمار شاهد فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز را تحت تأثیر قرار داده و سبب افزایش حدود ۱۱ درصدی فعالیت این آنزیم در سطح اسمزی ۱۰- بار نسبت به سطح صفر شد (جدول ۴). آنزیم سوپراکسیددیسموتاز در گیاهان نقش حفاظتی را برعهده داشته و به‌عنوان دفاع اولیه در مقابل رادیکال‌های آزاد اکسیژن در نظر گرفته می‌شود. این آنزیم یک آنتی‌اکسیدان قوی است که اولین ماده تولید شده از احیای یک ظرفیتی اکسیژن، یعنی رادیکال سوپراکسید را از بین برده و تبدیل به اکسیژن و پراکسید هیدروژن می‌کند و در نتیجه باعث پایداری غشا سلول‌های گیاهی تحت تنش خشکی می‌شود (Alscher et al., 2002). در این میان، در سطح اسمزی ۵- بار ناشی از شوری (NaCl) و ترکیب شوری و خشکی (Na+M) میزان فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز در گیاهچه‌های همزیست با قارچ به ترتیب حدود ۶۲ و ۱۸۵ درصد افزایش یافت (جدول ۴). براساس نظر Sun و همکاران (۲۰۱۰) ساز و کار اثر قارچ *P. indica* بر سیستم آنتی‌اکسیدانی گیاهان تلقیح شده تحت شرایط تنش شناخته شده نیست اما به‌نظر می‌رسد که قارچ *P. indica* به‌طور مستقیم باعث خنثی‌کردن فعالیت رادیکال‌های آزاد اکسیژن در گیاه می‌شود. همچنین Khalafallah و Abo-Ghalia (۲۰۰۸) نیز افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در گیاهچه‌های گندم همزیست‌شده با قارچ را گزارش دادند.

میزان پراکسید هیدروژن در سطح اسمزی ۵- بار در گیاهان تیمار شده با قارچ *P. indica* در ترکیب همزمان دو منبع اسمزی (Na+M) دارای اختلاف معنی‌داری با گیاهان تیمارنشده بود ولی تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای عدم همزیستی و همزیستی قارچی برای سایر منابع مشاهده نشد و همه تیمارها در هر یک از منابع اسمزی در یک گروه آماری قرار گرفتند

#### منابع

حاجی‌نیا، س.، زارع، م. ج.، محمدی گل‌تپه، ا. و رجال، ف. (۱۳۹۰) بررسی سودمندی قارچ اندوفیت *Piriformospora indica* و باکتری *Azospirillum* Sp. در افزایش تحمل گندم رقم سرداری (*Triticum aestivum*) به تنش شوری، مجله تنش‌های محیطی در

علوم زراعی ۴: ۳۱-۲۱.

- رضوی زاده، ر. و محققیان، ن. (۱۳۹۴) بررسی تغییرات فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و متابولیت‌های ثانویه گیاهچه‌های آویشن (*Thymus vulgaris*) تحت تنش شوری در شرایط کشت درون شیشه، مجله زیست‌شناسی گیاهی ایران ۷: ۵۸-۴۱.
- سپهری، م. (۱۳۸۸) شناسایی مکانیسم‌های مولکولی مقاومت القاء شده توسط قارچ *Piriformospora indica* به گیاه جو در شرایط تنش شوری و خشکی. پایان‌نامه دکتری مهندسی علوم خاک، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
- سلطانی، ا. (۱۳۹۱) کاربرد نرم‌افزار SAS در تجزیه‌های آماری. انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد.
- فلاحی، ج.، عبادی، م. ت. و قربانی، ر. (۱۳۸۷) اثر تنش‌های اسمزی و شوری بر خصوصیات جوانه‌زنی مریم گلی کبیر، مجله تنش‌های محیطی در علوم زراعی ۱: ۶۷-۵۷.
- کرمی، ع. و زارع، م. ج. (۱۳۹۳) پاسخ فیزیولوژیک و تغذیه‌ای گیاه یونجه (*Medicago sativa*. cv. Hamedani) در تلقیح با قارچ درون‌زی *Piriformospora indica* و باکتری *Azospirillum* spp. تحت تنش شوری، نشریه تولید گیاهان زراعی ۷: ۱۲۹-۱۰۹.
- نظامی، ا.، نباتی، ج.، کافی، م. و محسنی، م. (۱۳۸۷) ارزیابی تحمل به شوری کوشیا (*Kochia scoparia* (L.) Schrad) در مرحله سبز شدن و گیاهچه‌ای تحت شرایط کنترل شده، مجله تنش‌های محیطی در علوم زراعی ۱: ۷۷-۶۹.
- نوری آکندی، ز. (۱۳۹۴) اثر قارچ شبه‌میکوریز *Piriformospora indica* بر تحمل به شوری گیاه استویا *Stevia rebaudiana* Bertoni در شرایط کنترل شده. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران.
- میرحسینی، م. و سابقی، ح. (۱۳۸۴) بررسی اقتصادی تجارت و صادرات گیاهان دارویی ایران. همایش ملی توسعه پایدار گیاهان دارویی، مشهد، ایران.
- میرمحمدی میدی، س. ع. م. و قره یاضی، ب. (۱۳۸۱) جنبه‌های فیزیولوژیک و به‌نژادی تنش شوری گیاهان. انتشارات دانشگاه صنعتی اصفهان.

Abi, H. (1984) Catalase in vitro. *Method of Enzymology* 105: 121-126.

Alexieva, V., Sergiev, I., Mapelli, S. and Karanov, E. (2001) The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant Cell and Environment* 24: 1337-1344.

Alscher, R. G., Erturk, N. and Heath, L. S. (2002) Role of superoxide dismutases (SOD) in controlling oxidative stress in plant. *Journal of Experimental Botany* 153: 1331-1341.

Bacilio, M., Rodriguez, H., Moreno, M., Hernandez, J. P. and Bashan, Y. (2004) Mitigation of salt stress in wheat seedlings by a gfp-tagged *Azospirillum lipoferum*. *Biology and Fertility of Soils* 40: 188-193.

Bailly, C. (2004). Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Science Research* 14: 93-107.

Baisakh, N., Subudhi, P. K. and Bhardwaj, P. (2008) Primary response to salt stress in halophyte smooth cordgrass (*Spartina alterniflora* Loisel). *Functional and Integrative Genomics* 8: 287-300.

Baltruschat, H., Fodor, J. B. D., Harrach, E., Niemczyk, B., Barna, G., Gullner, A., Janeczko, K., Kogel, H., Schafer, P., Schwarczinger, I., Zuccaro, A. and Skoczowski, A. (2008) Salt tolerance of barley induced by the root endophyte *Piriformospora indica* is associated with a strong increase in antioxidants. *New Phytologist* 180: 501-510.

Beauchamp, C. and Fridovich, I. (1971) Superoxide dismutase: Improved assay and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 44: 276-287.

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

Gill, S. S. and Tuteja, N. (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48: 909-930.

Giri, B., Kapoor, R. and Mukerji, K. G. (2002) VA Mycorrhizal techniques VAM technology in establishment of plants under salinity stress condition. In: *Techniques in Mycorrhizal Studies* (eds. Mukerji, K. G., Manoharachary, C., Chamola B. P.) Pp.313-327. Springer, Netherlands.

Gosal, S., Karlupia, A., Gosal, S., Chhibba, I. and Varma, A. (2010) Biotization with *Piriformospora indica* and *Pseudomonas fluorescens* improves survival rate, nutrient acquisition, field performance and saponin content of micropropagated chlorophytum sp. *Indian Journal of Biotechnology* 9: 289-297.

- Hojati, M., Modarres-Sanavya, S. A. M., Ghanati, F. and Panahi, M. (2011) Hexaconazole induces antioxidant protection and apigenin-7-glucoside accumulation in *Matricaria chamomilla* plants subjected to drought stress. *Plant Physiology* 168: 782-791.
- Jenschke, G., Brandes, B., Kuhn, A. J., Schoder, W. H., Becker, J. S. and Godlbbd, D. L. (2000) The Mycorrhizal fungus *Paxillus* in volutes magnesium to Norway spruce seedlings. Evidence from stable isotope labeling. *Plant and Soil* 220:243-246.
- Kaefer, E. (1977) Meiotic and mitotic recombination in *Aspergillus* and its chromosomal aberrations. *Advances in Genetics* 19: 33-131.
- Kanzok, S. M., Fechner, A., Bauer, H., Ulschmid, J. K., Muller, H. M., Botella- Munoz, J., Schneuwly, S., Schirmer, R. and Becker, K. (2001) Substitution of the thioredoxin system for glutation reductase in *Drosophila melanogaster*. *Science* 291: 643-646.
- Khadri, M., Tejera, N. A. and Lluch, C. (2007) Sodium chloride-ABA interaction in tw common bean (*Phaseolus vulgaris*) cultivars differing in salinity tolerance. *Environmental and Experimental Botany* 60: 211-218.
- Khalafallah, A. A. and Abo-Ghalia, H. H. (2008) Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on the metabolic products and activity of antioxidant system in wheat plants subjected to short-term water stress, followed by recovery at different growth stages. *Journal of Applied Science Research* 4: 559-569
- Kumar, M., Sharma, R., Jogawat, A., Singh, P., Dua, M., Gill, S. S., Trivedi, D. K., Tuteja, N., Varma, A. K., Oelmuller, 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, A. K. (2009) Antioxidant enzyme activities in mays plants colonized with *Piriformospora indica*. *Microbiology* 155: 780-790.
- Lichtenthaler, H. K. and Buschmann, C. (2001) Chlorophylls and carotenoids measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* P. F4.3.1-F4.3.8.
- Mathur, N. and Vyas, A. (1996) Biochemical changes in *Ziziphus xylopyrus* by VA mycorrhizae. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 37: 209-212.
- Mishra, P. K., Singh, R., Kumar, U. and Prakash, V. (2010) *Stevia rebaudiana* - A Magical Sweetener. *Global Journal of Biotechnology and Biochemistry* 5: 62-74.
- Mittler, R. (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7: 405-410.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M. and Vanbreusegem, F. (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Science* 9: 490-498.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology* 15: 437-497.
- Muthukumarasamy, M., Dutta Gupta, S. and Panneerselvam, R. (2000) Influence of triadimefon on the metabolism of NaCl stressed radish. *Biologia Plantarum* 43: 67-72.
- Oelmuller, R., Sherameti, I., Tripathi, S. and Varma, A. (2009) *Piriformospora indica*, a cultivable root endophyte with multiple biotechnological applications. *Symbiosis* 19: 1-19.
- Pant, N., Agrawal, R. and Agrawal, S. (2014) Mannitol-induced calli of *Trigonella foenum-graecum* L. Var. RMT-303. *Indian journal of experimental biology* 52: 1128-1137.
- Poljakoff mayber, A., Somers, G. F., Werker, E. and Gallagher, J. I. (1994) Seeds of *Kosteletzkya virginica* (Malvaceae), their structure, germination and salt tolerance. *American Journal of Botany* 81: 54-59.
- Safarnejad, A. (2008) Morphological and biochemical response to osmotic stress in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Botany* 40: 735-746.
- Sajedi, N. A., Ferasat, M., Mirzakhani, M. and Mashhadi Akbar Boojar, M. (2012) Impact of water deficit stress on biochemical of safflower cultivars. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 18: 323-329.
- 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.
- Shaheen, R., Rebecca, C. and Hood, N. (2005) Effect of drought and salinity on carbon isotope discrimination in wheat cultivars. *Plant Science* 168: 901-909.
- Sharma, P. N., Kumar, N. and Bisht, S. S. (1994) Effect of zinc deficiency on chlorophyll content, photosynthesis and water relations of cauliflower plants. *Photosynthetica* 30: 353-359.
- Sheteawi, S. A. (2007) Improving growth and yield of salt-stressed soybean by exogenous application of jasmonic acid and ascobin. *International Journal of Agriculture and Biology* 9: 473-478.
- 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 droughtrelated genes and the plastid-localized CAS protein. *Journal of Plant Physiology* 167: 1009-1017.

- Tang, W. and 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. *Plant Physiology and Biochemistry* 43: 760–769.
- Trivedi, D. K., Verma, P. K., Srivastava, A., Gill, S. S. and Tuteja, N. (2016) *Piriformospora indica*: a friend in need is a friend in deed. *Research and Reviews: Journal of Botanical Sciences* 5:16-19.
- Varma, A., Kost, G. and Oelmuller, R. (2013) *Piriformospora indica*. *Sebacinales and Their Biotechnological Applications Series: Soil Biology* 33: 397.
- Viana, A. M. and Metivier, J. (1998) Changes in the levels of total soluble proteins and sugars during leaf ontogeny in *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Annal of Botany Fennici* 45: 469-474.
- Waller, F., Achatz, B., Baltruschat, H., Fodor, J., Becker, K., Fischer, M., Heier, T., Huckelhoven, R., Neumann, Ch., Wettstein, D., Franken, P. and Kogel, K. H. (2005) The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 13386-91.
- Woelwer-Rieck, U., Lankes, C., Wawrzun, A. and Wust, M. (2010) Improved HPLC method for the evaluation of the major steviol glycosides in leaves of *Stevia rebaudiana*. *European Food Research and Technology* 231: 581-588.
- Yaghoobian, Y., Mohammadi Goltapeh, E., Pirdashti, H., Esfandiari, E., Feiziasl, V., Kari Dolatabadi, H., Varma, A. and Haryani Hassim, M. (2014) Effect of *Glomus mosseae* and *Piriformospora indica* on growth and antioxidant defense responses of wheat plants under drought stress. *Agricultural Research* 3: 239–245.
- Ye, Z., Rodriguez, R. and Tran, A. (2000) The development transition of flowering represses ascorbate peroxidase activity and induces enzymatic lipid peroxidation in leaf tissue in *Arabidopsis thaliana*. *Plant science* 158: 115-127.
- Yu, X., Du, X. and Song, L. (2007) Effects of water stress on the growth and ecophysiology of seedlings of the *Rhus typhina*. *Scientia Silvae Sinicae* 43: 57-61
- Zarea, M. J., Chordia, P. and Varma, A. (2012a) *Piriformospora indica* versus Salt Stress. In: *Sebacinales* (eds. Varma, A. Kost, G. and Oelmuller, R.) Pp263-281. Springer, Verlag.
- Zarea, M. J., Hajinia, S., Karimi, N., Mohammadi Goltapeh, E., Rejali, F. and Varma, A. (2012b) Effect of *Piriformospora indica* and *Azospirillum* strains from saline or non-saline soil on mitigation of the effects of NaCl. *Soil Biology and Biochemistry* 45: 139-146.