

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

اکبر پاداش<sup>۱</sup>، صالح شهابی‌وند<sup>۲\*</sup>، فرهاد بهتاش<sup>۱</sup>، احمد آقایی<sup>۲</sup>، علی اصغر علیلو<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه مراغه، <sup>۲</sup> گروه زیست‌شناسی سلولی ملکولی، دانشکده علوم، دانشگاه مراغه، <sup>۳</sup> گروه

زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه مراغه

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۰/۲۰، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۶/۰۵/۱۴)

### چکیده

این پژوهش که در آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه مراغه در بهار سال ۱۳۹۵، به صورت 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 و ۱۰ 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 قرار گرفتند. 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 گایاکول‌پراکسیداز 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 به دست آمد. بیشترین غلظت مالون‌دی‌آلدئید، فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و گایاکول‌پراکسیداز 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 (به خصوص در سطح ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر)، نقش مهمی در افزایش شاخص‌های رشدی و تعدیل فعالیت‌های آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان گیاه کاهو دارد.

کلمات کلیدی: آنزیم آنتی‌اکسیدان، عنصر روی، قارچ آندوفیت، *Lettuce*

### مقدمه

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 آنتی‌اکسیدانی، ویتامین‌های A، B<sub>6</sub>، C و K و همچنین عناصر غذایی آهن، پتاسیم، منگنز، کلسیم و منیزیوم است (Jordao et al., 2007). با توجه به مصرف روز

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

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

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 رادیکال‌های 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 آنتی‌اکسیدان 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 تعدیل‌کنندگی 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

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 خشکی‌پسند، 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 آنتی‌اکسیدان 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 آنتی‌اکسیدان گیاهان اثر می‌گذارد. به عنوان مثال قارچ *P. indica* در گیاه ذرت آلوده شده به قارچ *Fusarium verticillioides* باعث کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان 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

مرحله‌ی دوبرگی رسیدند، آنها با قارچ *P.indica* 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 ۱ cm ادر 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 به مدت ۴۸ 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 دیجیتال 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 ریشه‌های 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 شده بودند، شمارش شده و در مرحله‌ی بعد

رقم سیاهو از گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه مراغه تهیه گردید و سوبیه‌ی مربوط به قارچ *P. indica* از آزمایشگاه زیست‌شناسی 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 (به ترتیب با نسبت ۱:۲) به عنوان 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  $20 \pm 2$  و  $18 \pm 2$  درجه‌ی سانتی‌گراد، و رطوبت نسبی ۶۰ درصد کشت شدند. محلول غذایی مورد استفاده محلول هوگلند تغییر یافته بود. pH محلول غذایی در ۶/۵ 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 اسپرژیلوس (Hill and Kafer, 2001)، استفاده شد این محیط دارای عناصر ماکرو، عناصر میکرو، پپتون، گلوکز، عصاره مخمر و ویتامین‌ها می‌باشد. 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  $29 \pm 1$  درجه سانتیگراد و به مدت ۲ هفته قرار گرفتند. زمانی که بذور کشت شده به

جدول ۱- ترکیبات و مقادیر آنها در محلول هوکلند آزمایش

غلظت (میلی گرم بر لیتر)	نوع نمک	غلظت (گرم بر لیتر)	نوع نمک
۲/۸۶	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	۰/۴۷	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O
۱/۸۱	MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	۰/۳	KNO <sub>3</sub>
۰/۲۲	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	۰/۲۵	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O
۰/۰۲	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	۰/۰۶	NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
۰/۰۸	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	۰/۱	شلات آهن (سکوسترین)

در ۱۵۰۰۰ rpm 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 (۱۹۷۶) اندازه‌گیری شد. جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد و آلبومین سرم گاوی (BSA) جهت ترسیم منحنی استاندارد مورد استفاده قرار گرفت.

**اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان: فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT)** با روش Aebi (۱۹۸۴) اندازه‌گیری شد. مخلوط واکنش شامل ۷۵۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم ۲۵ میلی مولار (pH=۷)، ۷۵۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ۱۰ میلی مولار و ۲۰ میکرولیتر عصاره پروتئینی خام بود. واکنش با اضافه نمودن H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> به مخلوط مورد نظر آغاز شد و فعالیت آنزیم به دلیل مصرف H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> با کاهش جذب در طول موج ۲۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. ضریب خاموشی معادل  $39/4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  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<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (۷۰ میلی مولار)، ۷۵۰ میکرولیتر گایاکول (۱۰ میلی مولار) و عصاره پروتئینی خام بود. فعالیت آنزیم GPX در طول موج ۴۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. ضریب

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

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

**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 ۴ 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  $10000 \times \text{g}$  و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد (Eppendorf 5810 R). به ۰/۵ میلی لیتر از محلول رویی، ۱ میلی لیتر محلول ۰/۵٪ تیوباربتوئیک اسید (TBA) به اضافه ۲۰٪ TCA اضافه شد. مخلوط واکنش به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد درون حمام بخار قرار گرفت. بعد از ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ نمونه‌ها در  $10000 \times \text{g}$  جذب محلول رویی حاصل در دو طول موج ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. ضریب خاموشی  $\text{mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  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 ۰/۲۵ گرم پلی‌وینیل‌پیرولیدون اضافه شد و ورتکس گردید. عصاره حاصله

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 (۲۰۰۴) 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 میلی‌گرم 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 میلی‌گرم بر لیتر حاصل گردید

خاموشی معادل  $26/6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  در محاسبه فعالیت آنزیم در نظر گرفته شد. فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز بر حسب تعداد واحدهای آنزیم بر میلی‌گرم 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 میلی‌مولار با  $\text{pH} = 7/5$  تهیه و سپس برای تهیه محلول واکنش، ترکیبات EDTA ۰/۱ میلی‌مولار، نیتروبلوتترازولیوم (NBT) ۷۵ میلی‌مولار، متیونین ۱۳ میلی‌مولار و ریبولوین ۴ 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 میلی‌لیتر از محلول فوق به آن اضافه گردید و با قرار دادن آنها تحت روشنایی لامپ فلورسنت (۴۰W) 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 میلی‌لیتر 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 اندازه‌گیری و محاسبه شدند. فعالیت آنزیم سوپر اکسیددیسموتاز بر حسب واحد آنزیمی بر میلی‌گرم 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 داده‌ها نشان داد که اثر متقابل تیمارهای قارچ *P. indica* و عنصر روی بر درصد کلونیزاسیون ریشه در سطح احتمال ۱ درصد

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس داده‌های تأثیر قارچ *P. indica* و عنصر روی بر درصد همزیستی، وزن تر و وزن خشک در گیاه کاهو

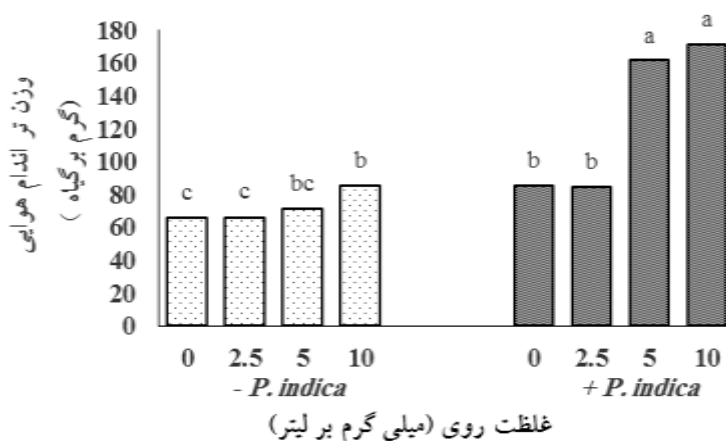
میانگین مربعات				
منابع تغییرات	درجه آزادی	درصد همزیستی	وزن تر	وزن خشک
قارچ	۱	۱۵۶۵۷**	۱۷۰۱۳/۳**	۳۷۲/۸**
روی (Zn)	۳	۱۱۴/۳**	۴۵۶۹/۸**	۱۲۲/۱**
قارچ × روی	۳	۱۱۴/۳**	۲۳۷۴/۷**	۷۱/۵**
خطا	۱۶	۴	۸۷/۵	۱/۱
ضریب تغییرات (درصد)	-	۸	۵	۸/۵

\*\* معنی دار در سطح احتمال ۱ درصد

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

کلونیزه شدن ریشه (%)	تیمار عنصر روی (میلی گرم بر لیتر)	تیمار قارچ ( <i>P. indica</i> )
۰ <sup>e</sup>	صفر	بدون قارچ
۰ <sup>e</sup>	۲/۵	
۰ <sup>e</sup>	۵	
۰ <sup>e</sup>	۱۰	
۶۱/۳ <sup>a</sup>	صفر	با قارچ
۵۵ <sup>b</sup>	۲/۵	
۴۶ <sup>c</sup>	۵	
۴۲ <sup>d</sup>	۱۰	

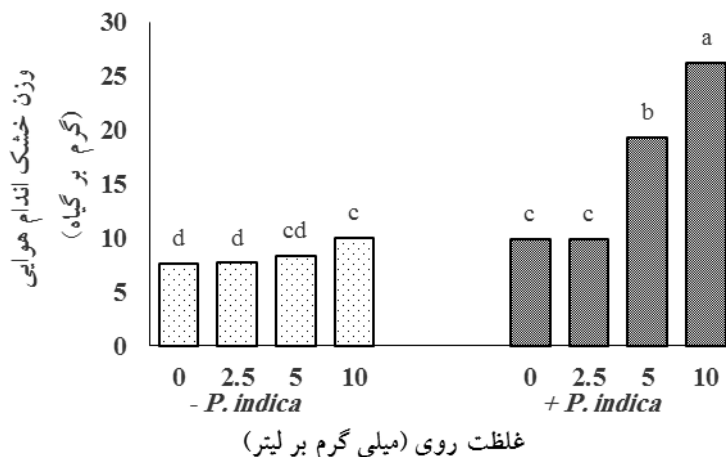
حروف متفاوت، نشان‌دهنده اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشند.



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 معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشند.

یک کود بیولوژیک قلمداد می‌شود به طوری که تلقیح گیاه کلم چینی (Sun et al., 2010) و ذرت (Kumar et al., 2009) با

(شکل ۳). یکی از ویژگی‌های مهم قارچ *P. indica* این است که رشد را در اکثر گیاهان همزیست افزایش داده و به عنوان



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.

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 لیپیدها 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 آنزیم‌ها، 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 آنتی‌اکسیدانی را داشته و شرایط را برای گیاه بهبود ساخته است. همچنین در برگ‌های گیاه گندم تیمار شده با این قارچ آندوفیت، 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 آنتی‌اکسیدانی مانع از پراکسیداسیون لیپیدها

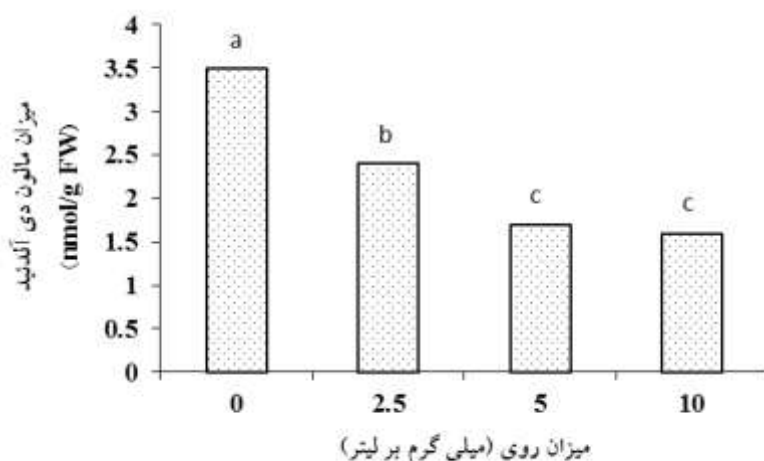
این قارچ موجب افزایش در میزان وزن خشک و تر گردید. گیاهانی که با قارچ *P. indica* تیمار شده‌اند، میزان اکسین بیشتری نسبت به شاهد دارند. با توجه به نقش اکسین در انگیزش ریشه‌ی نابجا در گیاه سالم و قلمه‌ها افزایش ریشه‌های جانبی می‌تواند ساده‌ترین دلیل از نحوه‌ی اثر قارچ بر رشد گیاهان باشد (Druege et al., 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 آنتی‌اکسیدانی معنی‌دار نبوده ولی اثر اصلی روی برای غلظت مالون‌دی‌آلدئید در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ۴). 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

جدول ۴- تجزیه واریانس تیمار با قارچ *P. indica* و فلز روی بر فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، گایاکول پراکسیداز، کاتالاز، میزان مالوندی آلدهاید و میزان پروتئین در گیاه کاهو

میانگین مربعات						
منابع تغییرات	درجه آزادی	مالون دی آلدهاید (MDA)	پروتئین (Protein)	سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)	کاتالاز (CAT)	گایاکول پراکسیداز (GPOX)
قارچ	۱	۰/۵ <sup>ns</sup>	۳/۴ <sup>**</sup>	۲۰/۶ <sup>**</sup>	۰/۰۰۵ <sup>ns</sup>	۰/۵ <sup>ns</sup>
روی (Zn)	۳	۴/۷ <sup>**</sup>	۱/۹ <sup>**</sup>	۸۵/۳ <sup>**</sup>	۰/۰۱ <sup>**</sup>	۴/۴ <sup>**</sup>
قارچ × روی	۳	۰/۰۷ <sup>ns</sup>	۰/۳ <sup>**</sup>	۴/۳ <sup>**</sup>	۰/۰۰۴ <sup>ns</sup>	۰/۱ <sup>ns</sup>
خطا	۱۶	۰/۲	۰/۰۲	۰/۷	۰/۰۰۳	۰/۳
ضریب تغییرات (درصد)		۱۹/۴	۱۷/۷	۵/۵	۱۸/۳	۱۹/۷

ns غیر معنی دار، \*\* معنی دار در سطح احتمال ۱ درصد



شکل ۳- تأثیر اصلی عنصر روی بر غلظت مالوندی آلدهاید در گیاه کاهو. در روی هر ستون، حروف متفاوت، نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد می باشند.

می شود.

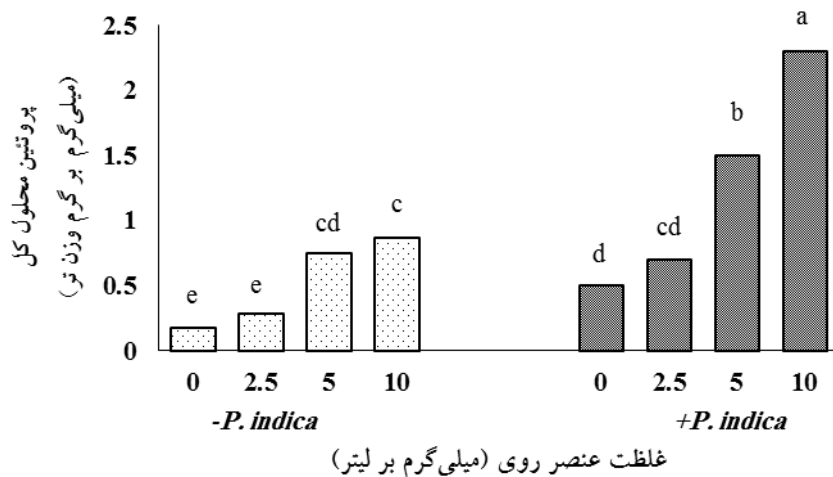
شرایط بدون تنش شد (Shi et al., 2016). در گیاهانی که کمبود روی دارند ساخته شدن پروتئین کاهش می یابد و انباشته شدن اسیدهای آمینه در این گیاهان نشان دهنده اهمیت روی در سنتز پروتئین است (Marschner, 1995). افزایش در میزان پروتئین در گیاهان تلقیح شده با قارچ *P. indica* ممکن است به دلیل افزایش جذب روی باشد. چون روی از عوامل مؤثر بر سنتز اسید آمینه هایی مانند تریتوفان و آسپارژین است.

فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز: 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

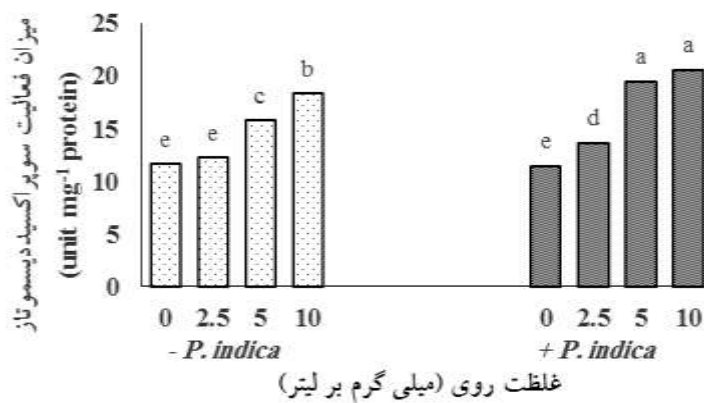
میزان پروتئین محلول: اثر متقابل قارچ *P. indica* و عنصر روی بر شاخص میزان پروتئین محلول در سطح احتمال ۱ درصد معنی دار بود (جدول ۴). پروتئین موجود در برگ گیاه کاهو همزیست شده با قارچ *P. indica* با افزایش غلظت روی در بستر کشت افزایش معنی داری یافت، به طوریکه در غلظت روی ۱۰ میلی گرم بر لیتر، میزان پروتئین برگ ۱۴ برابر نسبت به شاهد افزایش یافته بود (شکل ۴).

همزیستی با قارچ های مختلف میکوریز باعث افزایش معنی دار در میزان پروتئین محلول در برگ های گیاه شاه توت در





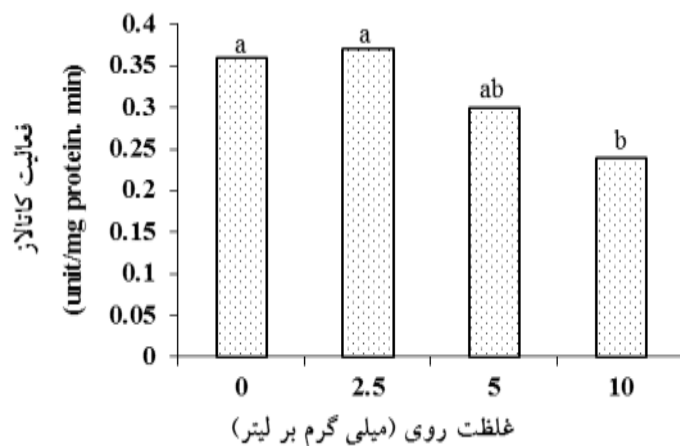
شکل ۴- تأثیر متقابل قارچ *P. indica* و روی بر پروتئین محلول کل در گیاه کاهو. در روی هر ستون، حروف متفاوت، نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشند.



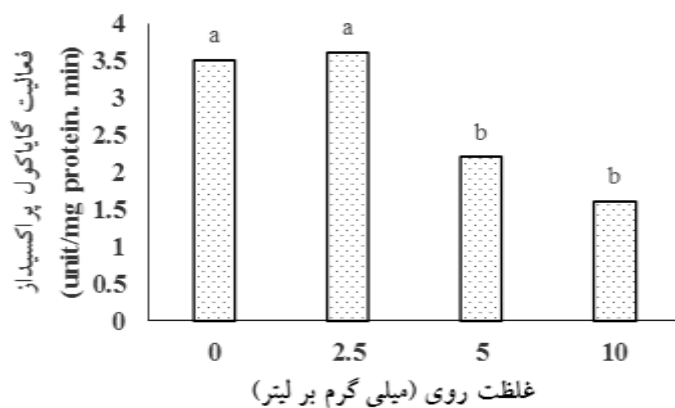
شکل ۵- اثر متقابل قارچ *P. indica* و روی بر میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز. در روی هر ستون، حروف متفاوت، نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشند.

(رادیکال آزاد) دخالت دارد. نقش آنزیم سوپراکسید دیسموتاز این است که از اکسید 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 آنتی‌اکسیدانی 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 میسلیم میزان جذب عنصر مس را به مقدار ۶۲ درصد

(جدول ۴). استفاده از قارچ *P. indica* همراه با کاربرد روی به طور قابل توجهی فعالیت آنزیم SOD را افزایش داده و در غلظت روی ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر بیشترین میزان فعالیت دیده شد (شکل ۵). تحقیقات محققان نشان داده است که Zn حداقل در ساختمان چهار آنزیم کربنیک آنهیدراز، الکل‌دهیدروژناز، SOD و RNA پلی‌مراز بکار رفته است. سوپراکسید دیسموتاز 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  $O_2$



شکل ۶- 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.

روی بر فعالیت آنزیم CAT و GPOX با توجه به جدول تجزیه واریانس، در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ۴). فعالیت آنزیم‌های CAT و GPOX با افزایش سطح روی در بستر کشت کاهش یافته و بیشترین فعالیت آنزیم CAT (شکل ۶) و GPOX (شکل ۷) در غلظت روی صفر و ۲/۵ 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

در شرایط کمبود روی افزایش داده و موجب فعال شدن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی 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 پژوهش‌های گذشته و نتایج حاصل چنین می‌توان استنباط کرد که قارچ *P. indica* با میسلیم‌هایی 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

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 آنتی‌اکسیدان 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.

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 آنجایی که 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 بیوستز این مولکول‌های آنزیمی می‌باشد (Sandialio et al., 2002). با اینکه نقش قارچ *P. indica* در مورد این صفت مورد مطالعه معنی دار نبود، ولی احتمال می‌رود این قارچ با کمک به جذب

### 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.

- 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub> metabolism in rice leaves. *Plant Growth Regulation* 30: 151-155.
- Marschner, H. (1995) *Mineral Nutrition of Higher Plants*. 2<sup>nd</sup> Ed., Academic Press. Harcourt Brace Company, New York. p.889
- Pandey, N. and Sharma, C. P. (2002) Effect of heavy metals Co<sub>2</sub><sup>+</sup>, Ni<sub>2</sub><sup>+</sup> and Cd<sub>2</sub><sup>+</sup> 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 mineral composition. *Scientia Horticulturae* 98: 113-119.
- Pawłowska, 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 Ramezani, 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 Oelmuller, 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.