Archive of SID

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 11:02 IRST on Monday January 27th 2020

پاسخ‌های مورفوفیزیولوژیک و سیستم آنتی‌اکسیدانی گیاه دارویی استویا (*Stevia rebaudiana* B.) به تلقیح قارچ *Piriformospora indica* تحت تنش کادمیم

ندا سلیمی‌تملی[۱]، همت‌اله پیردشتی*[۱]، یاسر یعقوبیان[۲]، ولی‌اله قاسمی عمران[۲]

[۱] گروه زراعت، پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

[۲] پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۲/۰۸، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۶/۱۰/۰٤)

چکیده

به‌منظور بررسی نقش قارچ اندوفیت *Piriformospora indica* در بهبود صفات رویشی، فیزیولوژیک، مورفولوژیک و فعالیت آنزیمی گیاه دارویی استویا (*Stevia rebaudiana* Bertoni) تحت تنش عنصر سنگین کادمیم، آزمایشی درون‌شیشه‌ای به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد. تیمارهای آزمایشی شامل پنج سطح عنصر کادمیم (صفر، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میلی‌گرم در لیتر از منبع کادمیم کلرید) و دو سطح همزیستی قارچی (عدم تلقیح و تلقیح قارچ *Piriformospora indica*) بود. پس از گذشت ۳۰ روز، برخی صفات رویشی، رنگیزه‌های فتوسنتزی، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، نشت الکترولیت و پروتئین محلول اندازه‌گیری گردید. براساس نتایج تجزیه رگرسیون در تیمار عدم‌تلقیح وزن خشک ساقه (۷٦ درصد) بیشترین حساسیت را در بین صفات وزن خشک اندام‌های رویشی با افزایش غلظت کادمیم نشان داد. از طرفی همزیستی قارچی سبب بهبود وزن خشک ریشه (۵۷ درصد) در گیاهچه‌های همزیست شد. در بین صفات مورفولوژیک، سطح برگ با کاهش ۹٦ درصدی بیشترین حساسیت را به افزایش غلظت کادمیم نشان داد، اما در شرایط تلقیح قارچ درصد برگ سبز (با حدود ۵۱ درصد کاهش) مقاوم‌ترین صفت نسبت به تنش کادمیم بود. در بین رنگیزه‌های فتوسنتزی همزیستی قارچی توانست افت محتوی کارتنوئید را از ۷۷ درصد به ٤۰ درصد و کلروفیل a/b را از ۳۷ درصد به ۱۱ درصد کاهش دهد. در مجموع، نتایج این تحقیق نشان داد که قارچ *P. indica* در سطوح پایین کادمیم، احتمالاً از طریق کاهش غلظت هیدروژن پراکسید (حدود ۱٦ درصد) و بهبود میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی سبب افزایش نسبی تحمل به تنش در گیاهان تلقیح شده نسبت به گیاهان شاهد شد.

کلمات کلیدی: تجزیه رگرسیونی، رنگیزه فتوسنتزی، فعالیت آنزیمی، قارچ همزیست

مقدمه

امروزه آلودگی خاک به فلزات سنگین یکی از مشکلات زیست‌محیطی عمده در جوامع بشری است که علاوه بر کاهش رشد و عملکرد گیاهان، با ورود به زنجیره غذایی سلامت انسان و دیگر موجودات زنده را به مخاطره می‌اندازد (یعقوبیان و همکاران، ۱۳۹۵). یون‌های فلزات سنگین زمانیکه در مقادیر زیاد در محیط وجود داشته باشند، به‌وسیله ریشه گیاهان جذب و به اندام هوایی منتقل می‌شوند که این امر موجب اختلال در سوخت و ساز گیاه و کاهش رشد می‌گردد (Frossard, 1993). آثار سمی فلزات سنگین بر گیاهان ناشی از تولید انواع مختلف

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

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 11:02 IRST on Monday January 27th 2020

اکسیژن فعال مانند سوپراکسید، هیدروژن پراکسید و رادیکال هیدروکسیل می‌باشد (Antoniadis and Alloway, 2001) که معمولاً با ایجاد آسیب‌های غشایی فرآیندهای مختلف سلولی را دچار اختلال می‌کنند (Pereira *et al.*, 2002). در این بین، کادمیم (Cd) یکی از سمی‌ترین عناصر است که هیچ‌گونه نقش زیستی ندارد و عمدتاً از طریق فرآیندهای صنعتی، کودهای فسفره و آفت‌کش‌ها وارد خاک‌های کشاورزی می‌شود (یعقوبیان و همکاران، ۱۳۹۵). کادمیم به‌دلیل حلالیت بالایی که در آب دارد ممکن است سمیت شدیدی برای گیاهان و حیوانات و یا انسان‌ها ایجاد کند. این عنصر سنگین در انسان باعث از دست‌دادن حس بویایی، سرطان، سکته مغزی، آمفیزم و پوکی استخوان (Lalor, 2008)، و در گیاهان نیز سبب اختلال در متابولیسم عناصر کم‌مصرف، تثبیت دی‌اکسید کربن، تعرق و فتوسنتز می‌شود (Kabata-Pendias and Pendias, 2001). همچنین کادمیم سبب کلروز و نکروز برگ (Zhang *et al.*, 2002) و کاهش مقدار کلروفیل a، b وکارتنوئیدها و فرآیند جوانه‌زنی، رشد و نمو گیاه می‌شود (Yaghoubian *et al.*, 2016; Ramos *et al.*, 2002). کادمیم به‌ویژه در غلظت‌های بالا موجب بروز تنش اکسیداتیو می‌شود. با این وجود سلول‌های گیاهی برای حفاظت در مقابل آسیب‌های اکسیداتیو مجهز به یک سیستم جاروب‌کننده رادیکال‌های آزاد می‌باشند. این سیستم شامل آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند کاتالاز و گایاکول پراکسیداز و نیز سیستم آنتی‌اکسیدانی غیرآنزیمی می‌باشد (Cho and Park, 2000).

از طرف دیگر، ریزجانداران ریزوسفری از طریق ساز و کارهای مستقیم و غیرمستقیم می‌توانند زیست‌توده گیاه و تحمل گیاهان را به فلزات سنگین افزایش دهند (Glick, 2003). اندوفیت‌های میکروبی که از مهم‌ترین میکروارگانیسم‌های خاک محسوب می‌شوند، با ایجاد تغییرات ژنتیکی، فیزیولوژیکی و بوم‌شناختی در گیاهان میزبان خود، عملکرد آنها را در واحد سطح افزایش می‌دهند (امامی، ۱۳۷۵). یک نوع از قارچ‌های اندوفیت ریشه به نام *Piriformospora indica* از بازیدیومایست‌ها بوده و دارای ویژگی‌هایی همانند قارچ‌های آربوسکولار میکوریزا است، اما برخلاف میکوریزای آربوسکولار که همزیست اجباری گیاهان میزبان هستند، همزیست اختیاری است و توانایی رشد در غیاب میزبان در محیط کشت و قابل کشت‌بودن در محیط کشت درون‌شیشه‌ای را دارند (Varma *et al.*, 1999 and 2001). قارچ‌های اندوفیت با برقراری روابط همیاری و هم‌زیستی در تعامل با گیاهان بوده و با انجام فعالیت‌هایی نظیر تغییر متابولیت‌های ثانویه، تجزیه ترکیبات مختلف آلی، تثبیت نیتروژن، تولید محرک‌های رشد گیاه و افزایش قابلیت جذب عناصر غذایی و معدنی و مقاومت به تنش‌های زیستی و غیرزیستی، سبب بهبود رشد می‌گردند (سجادی و عاصمی، ۱۳۸۷؛ Yaghoubian *et al.*, 2014).

از سوی دیگر امروزه مصرف روزافزون داروهای شیمیایی باعث مشکلاتی حاد از قبیل پدیده خودایمنی بر اثر مصرف مداوم داروهای شیمیایی، مقاومت عوامل بیماری‌زا به برخی از داروها می‌شود که بروز مشکلاتی از این دست توجه به گیاهان دارویی را بیش از پیش نمایان می‌کند (قاسمی، ۱۳۸۸). یکی از گونه‌های گیاهی با ارزش که تکنیک کشت‌بافت، به سبب قوه نامیه بسیار کم بذور، به‌عنوان کارآمدترین روش ازدیاد آن مطرح است گیاه دارویی استویا (*Stevia rebaudiana* Bertoni) است (Ibrahim *et al.*, 2008). استویا گیاهی است علفی و چندساله از تیره Asteracea که از پاراگوئه منشاء گرفته است. از مزیت این گیاه شیرینی زیاد برگ‌ها و عصاره آبی آن است. ماده شیرین‌کننده استویا به‌سبب فاقد کالری‌بودن برای افرادی که از دیابت، هیپوگلیسمی (افت قند خون)، فشارخون بالا، فنیل کتون اوری (نوعی اختلال متابولیک ارثی)، ناراحتی‌های قلبی، چاقی و عفونت‌های قارچی مزمن رنج می‌برند، یک شیرین‌کننده مطلوب است (Mishra *et al.*, 2010). این گیاه دارای ترکیباتی است که به‌عنوان ضدفشارخون (Chan *et al.*, 2000)، ضدپوسیدگی و ضدقند خون (Jappesen *et al.*, 2000) مطرح هستند. همچنین، استویا سرشار از پروتئین، کلسیم، فسفر و سایر مواد غذایی است که ضرورت استفاده از آن را به‌عنوان گیاه دارویی به‌اثبات می‌رساند (Viana *et al.*, 1998). بنابراین باتوجه به مخاطره‌های ایجاد شده در اثر

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 11:02 IRST on Monday January 27th 2020

آلودگی عناصر سنگین به‌ویژه کادمیم و توانایی قارچ‌های اندوفیت در افزایش تحمل گیاهان و همچنین اهمیت گیاه استویا، این پژوهش با هدف بررسی اثر قارچ اندوفیت *Piriformospora indica* بر تحمل به تنش عنصر سنگین کادمیم بر گیاه دارویی استویا در شرایط کنترل‌شده با تأکید بر پارامترهای رشدی و فیزیولوژیکی انجام شد.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر در پاییز ۱۳۹٤ در آزمایشگاه کشت‌بافت پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری در قالب طرح کاملاً تصادفی به‌صورت فاکتوریل در سه تکرار انجام شد. تیمارهای آزمایشی شامل پنج سطح عنصر کادمیم (صفر، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میلی‌گرم در لیتر از منبع کادمیم کلرید) و تیمار همزیستی قارچی شامل دو سطح (عدم‌تلقیح و تلقیح قارچ اندوفیت *Piriformospora indica*) بود. قارچ *P. indica* در محیط‌کشت مایع کفر (Kafer, 1997) و در دمای ۲٤ درجه سانتی‌گراد به‌مدت دو هفته کشت شد. به‌منظور فراهم‌سازی نمونه‌های گیاهی مورد استفاده در این تحقیق، ریزنمونه‌های جوانه‌ی انتهایی به‌طول دو سانتی‌متر از گیاهچه‌های رشدیافته در شرایط درون شیشه‌ای تحت شرایط استریل جداسازی شد و در محیط MS کشت گردید. ریزنمونه‌ها در اتاق کشت با فتوپریود ۱٦ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از رشد و ریشه‌دهی گیاهان در مدت ۱٤ روز، ریشه‌ی این گیاهان به‌مدت ۳۰ ثانیه با سوسپانسیون قارچ *P. indica* آغشته و در محیط‌کشت‌های حاوی تیمارهای مختلف کادمیم واکشت شدند. گیاهچه‌های شاهد (عدم‌تلقیح) نیز قبل واکشت به‌مدت ۳۰ ثانیه در سوسپانسیون اتوکلاوشده قرار گرفتند. گیاهچه‌ها ۳۰ روز پس از رشد، از محیط‌کشت حاوی عنصر کادمیم خارج و صفات مورفولوژیک شامل ارتفاع بوته، قطر ساقه (با استفاده از کولیس دیجیتالی)، تعداد برگ سبز، درصد برگ سبز و سطح برگ (با نرم‌افزار Digimizer نسخه ٤/۱) و همچنین وزن تر و خشک گیاه شامل برگ، ساقه، ریشه، بخش هوایی و کل بوته اندازه‌گیری گردید. جهت تعیین وزن خشک اندام‌های گیاهی، نمونه‌ها به‌مدت ٤۸ ساعت در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. همچنین صفات فیزیولوژیک شامل نشت الکترولیت و رنگیزه‌های فتوسنتزی و همچنین صفات بیوشیمیایی شامل میزان پروتئین، هیدروژن پراکسید و فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز مورد اندازه‌گیری قرار گرفت.

رنگیزه‌های فتوسنتزی با نمونه‌برداری از آخرین برگ گسترش‌یافته گیاه و با استفاده از روش Lichtenthaler و Buschmann (۲۰۰۱) اندازه‌گیری و میزان کلروفیل a، b و کارتنوئید بر اساس رابطه‌های ۱ تا ۳ محاسبه گردید.

$$C_a\ (\mu g/ml) = 16.72\ A_{665.2} - 9.16\ A_{652.4} \quad (۱$$

$$C_b\ (\mu g/ml) = 34.09\ A_{652.4} - 15.28\ A_{665.2} \quad (۲$$

$$Car\ (\mu g/ml) = (1000\ A_{470} - 1.63\ C_a - 104.96\ C_b)/221 \quad (۳$$

که در این رابطه‌ها C_a و C_b به‌ترتیب کلروفیل a و b و همچنین $A_{665.2}$، $A_{652.4}$، A_{470} میزان نور جذبی محلول در طول‌موج‌های ٦٦۵/۲، ٦۵۲/٤ و ٤۷۰ نانومتر است.

به‌منظور اندازه‌گیری نشت الکترولیت، نمونه برگی در لوله‌های آزمایش حاوی ۱۰ میلی‌لیتر آب‌مقطر قرار گرفت. پس از گذشت ۲٤ ساعت، هدایت الکتریکی هر نمونه با استفاده از دستگاه EC متر (CON 410، ساخت کشور سنگاپور) انـدازه‌گیری شد (EC_1). جهت اندازه‌گیری میزان کل نشت الکترولیت‌ها در اثر مرگ سلول، لوله‌های آزمایش به‌مدت ۲۰ دقیقه در دستگاه بن‌ماری با دمای ۹۰ درجه قرار داده و مجدداً هدایت الکتریکی نمونه‌ها ثبت گردید (EC_2). سپس درصد نشت الکترولیت‌ها با استفاده از معادله ٤ محاسبه شد (Teutonica *et al.*, 1993).

$$\text{درصد نشت الکترولیت} = \frac{EC_1}{EC_2} \times 100 \quad (٤$$

اندازه‌گیری میزان پروتئین محلول کل به‌روش Bradford (۱۹۷٦) صورت گرفت. کمپلکس واکنش شامل ۲۰۰ میکرولیتر از عصاره استخراجی نمونه با ۵۰۰ میکرولیتر معرف بردافورد و ۱۸۰۰ میکرولیتر آب دیونیزه بود که بعد از پنج دقیقه میزان جذب مخلوط در طول‌موج ۵۹۵ نانومتر خوانده

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 11:02 IRST on Monday January 27th 2020

شد و با قراردادن عدد به‌دست آمده در منحنی استاندارد میزان پروتئین نمونه مجهول بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌دست آمد.

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

فعالیت کاتالاز بـه‌روش Abi (۱۹۸٤) اندازه‌گیری شد که بر پایه تجزیه هیدروژن پراکسید با آنزیم کاتالاز استوار است. مخلوط واکنش شامل ۳ میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار، ۱۰ میکرولیتر هیدروژن پراکسید ۱۵ میلی‌مولار و ۵۰ میکرولیتر عصاره بود. پس از اضافه‌کردن عصاره، کاهش جذب در طول‌موج ۲٤۰ نانومتر به‌مدت یک دقیقه با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد.

کمپلکس واکنش آنزیم پراکسیداز (دو میلی‌لیتر) شامل یک میلی‌لیتر بافر فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار (pH=۷)، ۲۵۰ میکرولیتر EDTA ۰/۱ میلی‌مولار، یک میلی‌لیتر گایاگول ۵ میلی‌مولار، یک میلی‌لیتر هیدروژن پراکسید ۱۵ مولار و ۵۰ میکرولیتر از محلول آنزیمی استخراج‌شده بود. واکنش با اضافه‌کردن محلول آنزیمی شروع شده و افزایش جذب در طول‌موج ٤۷۰ نانومتر به‌مدت یک دقیقه ثبت شد (Tang and Newton, 2005).

در نهایت، داده‌های هر یک از صفات مورد بررسی با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS نسخه ۹/۱ (SAS Institute 2004) تجزیه و تحلیل شدند. جهت کمی‌سازی و توصیف معادلات از تجزیه رگرسیونی و برازش معادلات خطی (معادله ۵) و دو تکه‌ای (معادله ٦) پیشنهادشده توسط Bakhshandeh و همکاران (۲۰۱۲) استفاده شد.

$$y=b_1x+a \quad (۵$$

$$y=b_1x+a \quad \text{if} \quad x \le x_0 \quad (٦$$

$$y=(b_1x_0+a)+b_2(x-x_0) \quad \text{if} \quad x > x_0$$

y مقدار پیش‌بینی‌شده برای صفات مورد نظر، a مقدار ثابت در غلظت صفر کادمیم، x غلظت کادمیم، x_0 نقطه چرخش بین دو فاز معادله و b_1 و b_2 شیب تغییرات صفات (کاهشی یا افزایشی) به‌ترتیب در فاز یک و دو معادله هستند. رسم منحنی‌ها با استفاده از نرم‌افزار Excel انجام شد.

نتایج و بحث

صفات مورفولوژیک: نتایج تجزیه رگرسیون داده‌های حاصل از آزمایش نشان داد که اثر تنش کادمیم بر صفات مورفولوژیک شامل ارتفاع بوته، قطر ساقه، تعداد برگ سبز، درصد برگ سبز و سطح برگ هم در تیمار شاهد (عدم‌تلقیح) و هم در تیمار تلقیح با قارچ *P. indica* در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۱).

براساس نتایج حاصل از برازش منحنی، دو صفت ارتفاع بوته و قطر ساقه در تیمار عدم‌تلقیح و تلقیح با قارچ *P. indica* با افزایش غلظت کادمیم به‌صورت معادله خطی کاهش یافتند (شکل b و a – ۱ و جدول ۲). در غلظت‌های بالای کادمیم (۱۰ تا ۲۰ میلی‌گرم در لیتر) بوته‌های تلقیح‌شده با قارچ *P. indica* ارتفاع بیشتری داشتند به‌طوریکه در غلظت کادمیم ۲۰ میلی‌گرم در لیتر افزایش ٦ درصدی در ارتفاع بوته گیاهان تلقیح‌شده نسبت به عدم‌تلقیح مشاهده شد (شکل a – ۱). Rai و Varma (۲۰۰۵) نیز در تحقیقات خود نشان دادند که قارچ *P. indica* باعث افزایش رشد و عملکرد گیاه دارویی کنگر (*Adhatoda vasica*) شد. همچنین Sylvia و Wiliams (۱۹۹۲) در آزمایشی روی آفتابگردان نشان دادند که همزیستی قارچ میکوریزا در گیاهان به‌دلیل اینکه عناصر غذایی و آب بیشتری از خاک جذب می‌نمایند سبب افزایش رشد گیاه، عملکرد و مقاومت بیشتر در برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی می‌شود. از طرفی قطر ساقه نیز در این آزمایش در تمام سطوح کادمیم به‌وسیله تلقیح قارچ تحت تأثیر قرار

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 11:02 IRST on Monday January 27th 2020

جدول ۱- تجزیه رگرسیون اثر قارچ *P. indica* و سطوح مختلف کادمیم بر صفات ارتفاع بوته، قطر ساقه، تعداد و درصد برگ سبز گیاه استویا

منابع تغییر	df	ارتفاع بوته		قطر ساقه		تعداد برگ سبز		درصد برگ سبز		سطح برگ	
		شاهد	تلقیح	شاهد	تلقیح	شاهد	تلقیح	شاهد	تلقیح	شاهد	تلقیح
رگرسیون	۱	۵۳/۹۶۳**	۷۷/۲۲۸**	۰/۵۵۲**	۰/۵۴۲**	۲۵۰/۸۶۶**	۲۵۰**	۲۲۲۱/۴۹۴**	۱۳۶۵/۵۳۲**	۱۰/۱۸۴**	۳/۳۳۹**
باقی‌مانده	۳	۰/۴۲۹	۱/۵۸۳	۰/۰۰۱۲۱	۰/۰۱۲۵	۰/۰۵۵۵	۴/۶۱۹	۲/۱۱۰۳	۱۴/۳۹۶	۰/۰۲۶	۰/۰۷۰۵
ضریب تغییرات		۸/۲۰	۱۵/۸۸	۴/۳۰	۱۰/۹۳	۱/۴۲	۱۵/۰۶	۱/۸۳	۵/۵۶	۱۰/۳۰۹	۱۲/۳۶

* و ** به‌ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال پنج و یک درصد

جدول۲- معادله مناسب توصیف‌کننده اثر همزیستی قارچ اندوفیت *P. indica* بر روند تغییرات ارتفاع بوته، قطر ساقه، تعداد و درصد برگ سبز در بوته و سطح برگ گیاه استویا در سطوح مختلف کادمیم

صفات	شاهد	تلقیح با قارچ
ارتفاع بوته	$y = -0.4646x + 12.642$ $R^2 = 0.976$ P<0.001 CV= 8.20	$y = -0.5558x + 13.478$ $R^2 = 0.942$ P= 0.006 CV=15.88
قطر ساقه	$y = -0.047x + 1.278$ $R^2 = 0.993$ P<0.001 CV= 4.305	$y = -0.0466x + 1.49$ $R^2 = 0.935$ P=0.007 CV= 10.93
تعداد برگ سبز دربوته	$y = -0.4x+ 24$ if $x\leq 9.84$ $y = -1.5x+ 20.06$ if $x> 9.84$ $R^2 = 0.999$ P<0.001 CV= 1.419	$y = -1x + 24.268$ $R^2 = 0.947$ P=0.005 CV= 15.06
درصد برگ سبز	$y = -0.911x+ 98.97$ if $x\leq 10$ $y = -6.344x+ 87.398$ if $x> 10$ $R^2 = 0.997$ P<0.001 CV= 1.828	$y = -2.3371x + 91.575$ $R^2 = 0.969$ P=0.0023 CV= 5.56
سطح برگ	$y = -0.461x+ 4.151$ if $x\leq 5$ $y = -0.123x+ 1.843$ if $x> 5$ $R^2 = 0.992$ *P*<0.001 CV= 10.30	$y = -0.1156 + 3.303$ $R^2 = 0.940$ P=0.0063 CV= 12.366

گرفت، به‌طوریکه میزان کاهش این صفت با افزایش غلظت کادمیم از صفر تا ۲۰ میلی‌گرم در لیتر در تیمار عدم‌تلقیح حدود ۷۲ درصد و در تیمار همزیستی با قارچ حدود ۶۰ درصد بود و این نشان‌دهنده افزایش رشد و تحمل گیاهان تلقیح‌شده تحت تنش است (شکل b – ۱).

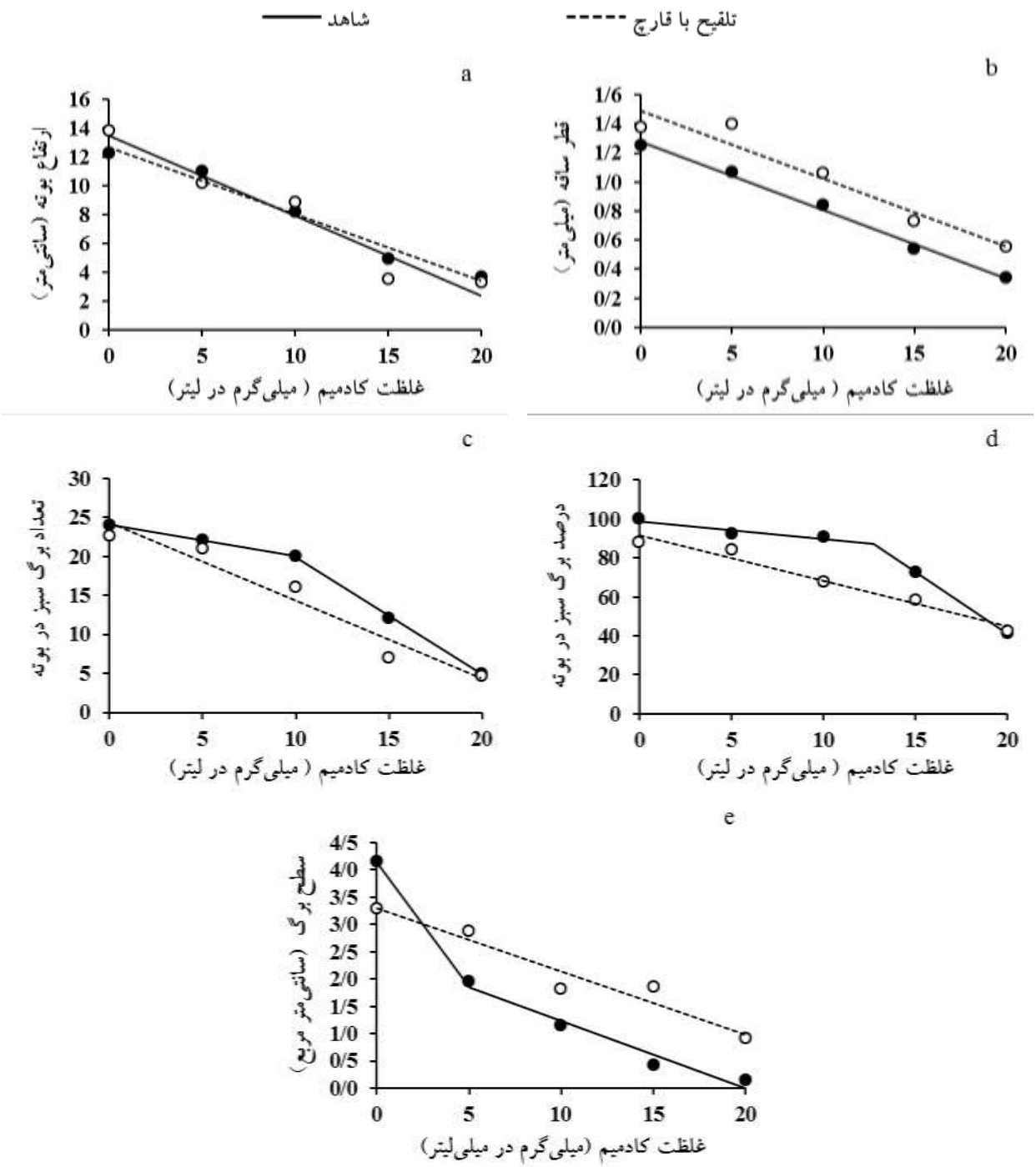
روند تغییرات نمودار در صفت تعداد برگ سبز در تیمار عدم‌تلقیح با قارچ *P. indica* به‌صورت معادله دوتکه‌ای و کاهشی بود، به‌طوریکه با افزایش غلظت کادمیم از صفر تا حدود ۱۰ میلی‌گرم در لیتر، شیب کاهش ۰/۴- واحد بود و با افزایش غلظت کادمیم تا ۲۰ میلی‌گرم در لیتر میزان شیب کاهش به ۱/۵- واحد رسید. در حالیکه همزیستی قارچی تعداد برگ سبز در بوته را به‌صورت معادله خطی با شیب ۱/۰- واحد کاهش داد، با این وجود، میزان کاهش صفت در هر دو تیمار حدود ۸۰ درصد بود (شکل c – ۱). درصد برگ سبز در بوته نیز در تیمار عدم‌تلقیح با افزایش غلظت کادمیم از صفر تا ۲۰ میلی‌گرم در لیتر به‌صورت معادله دوتکه‌ای و حدود ۶۰ درصد نسبت به سطح صفر کادمیم کاهش یافت و در تیمار همزیستی قارچی در اثر افزایش غلظت کادمیم روند کاهش نمودار به‌صورت خطی و حدود ۵۱ درصد بود (شکل d – ۱).

از طرفی، کادمیم باعث کاهش گسترش برگ نیز می‌شود (Vassilev, 1997). نتایج حاصل از این تحقیق نیز مؤید این موضوع است به‌طوریکه سطح برگ تحت تأثیر افزایش غلظت کادمیم در هر دو تیمار تلقیح و عدم‌تلقیح کاهش یافت هر چند میزان کاهش و حساسیت در گیاهان شاهد (۹۲ درصد) نسبت

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 11:02 IRST on Monday January 27th 2020



شکل ۱- روند پاسخ صفات ارتفاع بوته (a)، قطر ساقه (b)، تعداد (c) و درصد برگ سبز (d) و سطح برگ (e) گیاه استویا به سطوح مختلف کادمیم در شرایط تلقیح و عدم‌تلقیح با قارچ اندوفیت *P. indica*

به گیاهان همزیست‌شده (۷۲ درصد) بیشتر بود. در همین زمینه، Vassilev و همکاران (۱۹۹۷) اثرات منفی کادمیم بر سطح برگ را به‌دلیل اختلال در جذب آب و درنتیجه کاهش فشار تورگر دانستند که این کاهش همراه با کاهش قابلیت ارتجاعی دیواره سلول باعث کوچک‌شدن سلول‌ها و کاهش فضای بین‌سلولی در گیاهان تحت تنش کادمیم می‌شود.

وزن خشک اندام رویشی: نتایج حاصل از تجزیه رگرسیون مربوط به وزن خشک اندام‌های رویشی گیاه استویا

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 11:02 IRST on Monday January 27th 2020

جدول ۳- تجزیه رگرسیون اثر قارچ *P. indica* و سطوح مختلف کادمیم بر وزن خشک برگ، ساقه، بخش هوایی، ریشه و بوته گیاه استویا

منابع تغییر	df	وزن خشک									
		برگ		ساقه		بخش هوایی		ریشه		بوته	
		شاهد	تلقیح	شاهد	تلقیح	شاهد	تلقیح	شاهد	تلقیح	شاهد	تلقیح
رگرسیون	۱	۳۰۹۸/۲۹**	۲۸۵۸/۹۲**	۱۲۳۲/۱۰**	۳۶۳۹/۵۶**	۷۶۵۰/۸٤**	۱۳۰٦۵**	۱۵۷۸/۹٦**	٤۹۷٤/۷۳**	۱۵۵۹٦**	۳۳۵۹۳**
باقی‌مانده	۳	۵۲/۱۰	۱۵/۵۵	۱۱/۳۰	۱۰۳/٦٤	٤۵/۵۸	۲۰۳/۹۹	۷/۹۸	۳۲/٦۹	۲٤/۷۸۱	۳/۵۵٤
ضریب تغییرات		۱۸/٤۱	۷/۳۲	۸/٦۱۹	۱٤/۱٤	۸/٦۳	۱۱/۳۳	۱۲/٤۹	۱۵/۱۲	٤/۹٤	۱/۱۵

نشان داد که اثر تنش کادمیم چه در سطح تیمار شاهد (عدم‌تلقیح) و چه در تیمار تلقیح با قارچ *P. indica* بر وزن خشک برگ، ساقه، ریشه، بخش هوایی و بوته در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۳).

روند تغییرات وزن خشک اندام‌های رویشی گیاه استویا شامل وزن خشک برگ، ساقه، بخش هوایی، ریشه و بوته در پاسخ به افزایش غلظت کادمیم محیط در تیمار شاهد (عدم‌تلقیح) و تلقیح با قارچ *P. indica* به‌صورت معادله دوتکه‌ای و کاهشی بوده و تنها وزن خشک ساقه در تیمار شاهد روند خطی داشت. بیشترین وزن خشک اندام‌های رویشی گیاه در غلظت صفر کادمیم مشاهده‌شد که با افزایش غلظت کادمیم تا ۲۰ میلی‌گرم در لیتر روند کاهشی داشت، به‌طوریکه در سطوح پایین و متوسط کادمیم با شیب بالا و سپس با شیب کمتری کاهش یافت (شکل e و a – ۲ و جدول ٤). در آزمایش Yaghoubian و همکاران (۲۰۱٦) در گیاه خرفه نیز عکس‌العمل صفات رویشی نسبت به سمیت کادمیم به‌صورت معادله درجه دوم بود. در پژوهشی دیگر، قادریان و جمالی‌حاجیانی (۱۳۸۹) در گیاه *Matthiola chenopodiifolia* نشان دادند که افزایش غلظت کادمیم باعث کاهش وزن خشک ریشه و بخش هوایی می‌شود. در همین زمینه، Khan و همکاران (۲۰۰٦) کاهش وزن خشک بخش هوایی در اثر سمیت کادمیم در ارقام گندم را به‌طور مستقیم در اثر مهار فتوسنتز و در نتیجه تأثیر کادمیم بر میزان ماده‌سازی خالص (NAR) و میزان رشد نسبی (RGR) و یا اختلال و به‌هم خوردن تعادل آبی در سلول‌های گیاهی و یا درنتیجه تأثیر کادمیم بر سوخت و ساز عناصر ضروری دانستند.

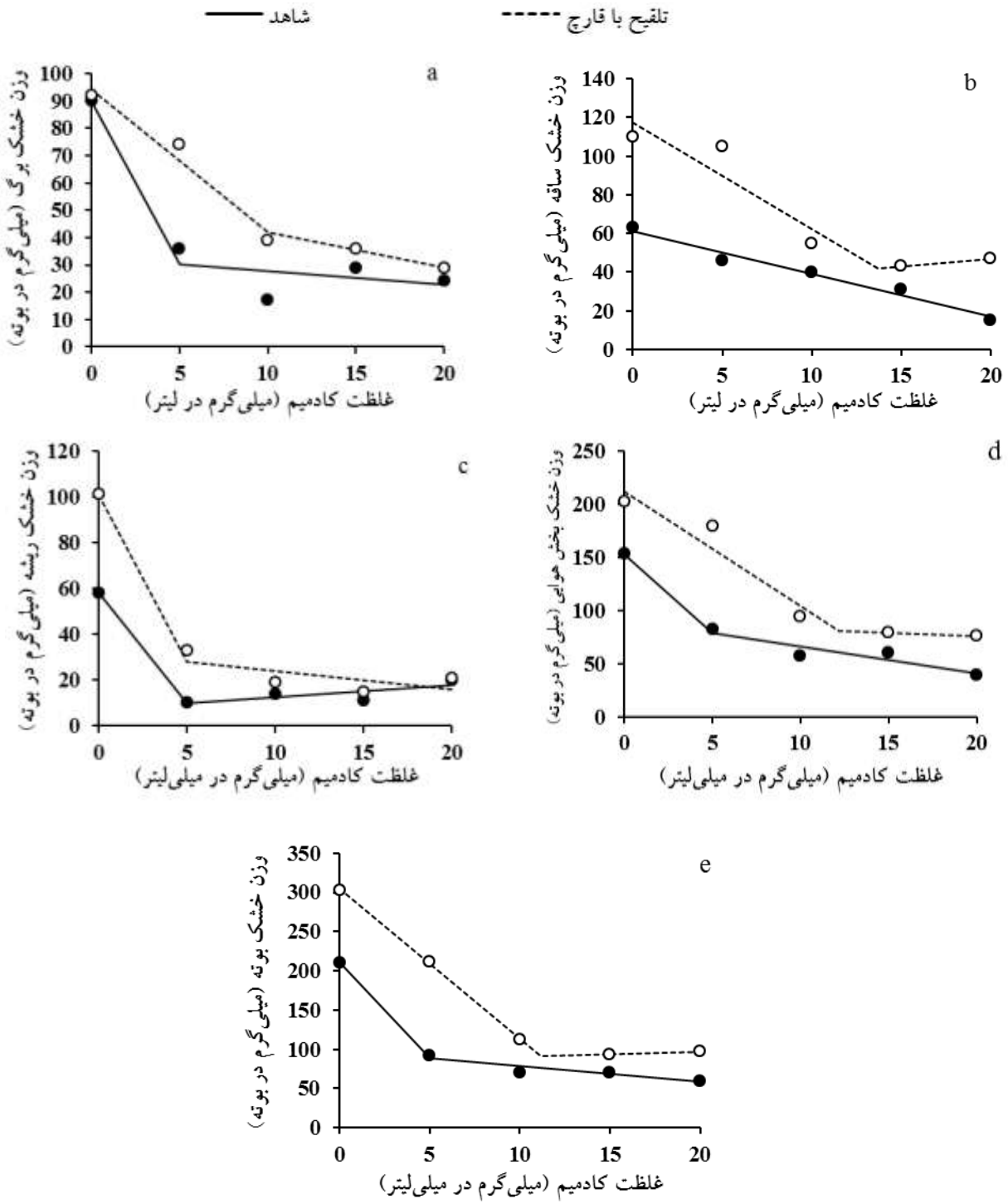
براساس یافته‌ها، تقریباً در تمام سطوح کادمیم گیاهان تلقیح‌شده با قارچ *P. indica* رشد رویشی بیشتری داشته و وزن خشک اندام‌های رویشی در این گیاهان بیشتر از گیاهان تلقیح‌نشده با قارچ بود. این افزایش در سطوح صفر و ۲۰ میلی‌گرم در لیتر کادمیم برای وزن خشک برگ به‌ترتیب ۲/۱۷ و ۲۰/۸۳ درصد، برای وزن خشک ساقه به‌ترتیب ۷٤/٦۰ و بیش از دو برابر و برای وزن خشک بوته به‌ترتیب ٤۳/٦۰ و ٦٤/٤۰ درصد بود (شکل e و a – ۲ و جدول ٤). این نتایج بیانگر بهبود تحمل بیشتر گیاهان تلقیح‌شده با قارچ نسبت به تنش کادمیم در مقایسه با گیاهان تلقیح‌نشده است. در پژوهش حاجی‌نیا و همکاران (۱۳۹۱) بر گیاه گندم نیز، زیتوده تر و خشک در گیاهان تلقیح‌شده با قارچ *P. indica* به‌طور متوسط حدود ٤۸/۹٦ و ٤۱/۵۸ درصد بیشتر از گیاهان تلقیح‌نشده بود. یعقوبیان (۱۳۹٤) نشان داد که در خاک‌های آلوده به عنصر کادمیم، حضور قارچ *P. indica* موجب تجمع بیشتر این عنصر در ریشه‌ها و انتقال کمتر به بخش هوایی شده است. در پژوهش‌های دیگر همزیستی گیاهان با قارچ *P. indica* افزایش ریشه‌دهی گیاهان (Verma *et al.*, 1999)، گلدهی (Rai and Varma, 2005)، عملکرد و اجزای عملکرد (Waller *et al.*, 2005؛ یعقوبیان و همکاران، ۱۳۹۱) و همچنین افزایش قدرت تحمل گیاهان به تنش‌های محیطی زیستی و غیرزیستی (Waller *et al.*, 2005) در پی داشته است.

صفات فیزیولوژیک: براساس نتایج تجزیه رگرسیون اثر سطوح مختلف کادمیم در شرایط تلقیح و عدم‌تلقیح قارچ *P. indica* بر صفات فیزیولوژیک شامل رنگیزه‌های فتوسنتزی و نشت الکترولیت نشان داد که اثر سمیت کادمیم در کلروفیل

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 11:02 IRST on Monday January 27th 2020



شکل ۲- منحنی پاسخ صفات وزن خشک برگ (a)، ساقه (b)، ریشه (c)، بخش هوایی (d) و بوته (e) گیاه استویا به سطوح مختلف کادمیم در شرایط تلقیح و عدم‌تلقیح با قارچ اندوفیت *P. indica*.

a، b، و a + b معنی‌دار بود. همچنین اثر کادمیم بر کارتنوئید در شرایط عدم‌تلقیح قارچ و بر کلروفیل a/b و نشت الکترولیت در شرایط تلقیح قارچ در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد. با این وجود، برای تیمار عدم‌تلقیح در دو صفت کلروفیل a/b و نشت الکترولیت و برای تیمار تلقیح با قارچ در کارتنوئید اثر معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۵).

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 11:02 IRST on Monday January 27th 2020

جدول ٤- معادله مناسب توصیف‌کننده اثر همزیستی قارچ اندوفیت *P. indica* بر روند تغییرات وزن خشک برگ، ساقه، بخش هوایی، ریشه و بوته گیاه استویا در سطوح مختلف کادمیم.

صفات	شاهد	تلقیح با قارچ
وزن خشک برگ	y = -11.98x+ 90 if x≤ 5 y = -0.48x+ 30.1 if x> 5 R^2 = 0.952 P=0.004 CV= 18.41	y = -5.196x+ 94.14 if x≤ 10 y = -1.302x+ 42.177 if x> 10 R^2 = 0.983 P<0.001 CV=7.32
وزن خشک ساقه	y = -2.22x+ 61.2 R^2 = 0.973 P<0.001 CV= 8.619	y =- 5.50x+ 117.5 x≤ 13.73 y = 0.8x+ 41.985 if x> 13.73 R^2 = 0.921 P=0.0096 CV= 14.139
وزن خشک ریشه	y = -9.66x+ 58 if x≤ 5 y = -0.54x+ 9.7 if x> 5 R^2 = 0.985 P=0.0008 CV= 12.49	y = -14.6x+ 101 if x≤ 5 y = -0.08x+ 28 if x> 5 R^2 =0.980 P<0.001CV=15.125
وزن خشک بخش‌هوایی	y = -14.92x+ 153 if x≤ 5 y = -2.52x+ 78.40 if x> 5 R^2 = 0.982 P<0.001 CV= 8.63	y = -10.8x+ 212.3 if x≤12.189 y = -0.6x+ 80.65 if x> 12.189 R^2 = 0.955 P=0.004CV=11.33
وزن خشک بوته	y = -24.5x+ 211 if x≤ 5 y = -1.98x+ 88.1 if x> 5 R^2 = 0.995 P<0.001 CV= 4.938	y = -19x+ 304.3 if x≤ 10 y = -0.6x+ 91.680 if x> 10 R^2 = 0.999 P<0.001 CV= 1.15

جدول ٥- تجزیه رگرسیون اثر قارچ *P. indica* و سطوح مختلف کادمیم بر میزان کلروفیل a، b، a + b، a/b، کارتنوئید و نشت الکترولیت در گیاه استویا

منابع تغییر	df	کلروفیل a		کلروفیل b		کلروفیل a+b	
		شاهد	تلقیح	شاهد	تلقیح	شاهد	تلقیح
رگرسیون	۱	۱۰۰/۵۱۹*	۱۱۸/۰۸۸*	۲۸/۰٤۲*	۳٦/۵۷۹**	۲۳۷/۳٦۳*	۲٦۵/۰۱۹*
باقی‌مانده	۳	۳/۰۵۷	۵/۰۹۷	۲/۲۰٦	۰/۰۰۱۲	۱۳/۰۵۲	۱۰/۷٤۱
ضریب تغییرات (%)		۱۵/۵۰	۱۹/۹۷	۲۲/۵۱	۰/٦۷۸	۲۰/۲۱	۱۹/۸٤

* و ** به‌ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال پنج و یک درصد

ادامه جدول- ۵

منابع تغییر	df	کلروفیل a/b		کارتنوئید		نشت الکترولیت	
		تلقیح	شاهد	تلقیح	شاهد	تلقیح	شاهد
رگرسیون	۱	۰/۲۰۳۸**	۰/۲۷۲	۰/۳۲۵	۲/٤٦۰**	٦۳۲/۵۰۲**	۱٦۰/۷۸٤
باقی مانده	۳	۰/۰۰۵۷	۰/۰۳۰	۰/۰۳۲۷	۰/۰۳۰	۱۲/۷۲۲	۱٦/٤۷
ضریب تغییرات (%)		۳/۵۷	۹/٤۱	۱۱/۰۰٤	۹/۸٤	٤/٦۲۱	۵/۱۰۵

*** و ** به‌ترتیب معنی‌داری در سطح احتمال پنج و یک درصد**

منحنی روند تغییرات صفات فیزیولوژیک گیاه استویا شامل کلروفیل a، b، a+b، a/b، کارتنوئید و نشت الکترولیت در پاسخ به افزایش غلظت کادمیم در دو تیمار تلقیح و عدم‌تلقیح با قارچ از معادلات خطی و دوتکه‌ای تبعیت کردند (شکل f و a – ۳ و جدول ٦). میزان کلروفیل a با افزایش غلظت کادمیم روند کاهشی نشان داد. روند تغییرات کلروفیل a در تیمار عدم‌تلقیح به‌صورت معادله دوتکه‌ای و در تیمار تلقیح قارچ *P. indica* به‌صورت خطی بود که با افزایش غلظت

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 11:02 IRST on Monday January 27th 2020

کادمیم از صفر تا ۲۰ میلی‌گرم در لیتر به‌ترتیب حدود ۷٦ و ٦۷ درصد کاهش یافت (شکل a – ۳). در همین راستا، Prasad و همکاران (۲۰۰٤) نشان دادند که عنصر کادمیم از تشکیل کلروفیل از طریق تداخل با تولید پروتوکلروفیلید جلوگیری می‌کنند. Vassilev و همکاران (۲۰۰۲) نیز گزارش کردند که کادمیم باعث بروز کلروز در برگ‌ها، قهوه‌ای‌شدن ریشه و کاهش مقدار کلروفیل برگ‌های جو شده است. کاهش رنگیزه‌های فتوسنتزی به‌واسطهٔ افزایش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و پراکسیداسیون و درنتیجهٔ تجزیهٔ کلروفیل‌ها است (Schutz and Fangmier., 2001).

میزان کلروفیل b و a+b نیز در پاسخ به افزایش سمیت کادمیم روند کاهشی داشتند. تقریباً در تمام سطوح کادمیم غلظت کلروفیل b و a+b در تیمارهای تلقیح قارچ نسبت به تیمار عدم‌تلقیح کمتر بود. نسبت کلروفیل a/b با افزایش غلظت کادمیم محیط در تیمار عدم‌تلقیح روند کاهشی و در تیمار تلقیح قارچ روند افزایشی داشت (شکل d و b – ۳ و جدول ٦). Hegedus و همکاران (۲۰۰۱) بیان کردند در برگ–های تحت تنش کادمیم، تشکیل LHCII به‌علت مهار سنتز پروتئین LHCII در مرحله نسخه‌برداری مختل شده و باعث فتواکسید شدن کلروفیل تازه تشکیل شده می‌گردد. براساس یافته‌ها، تلقیح قارچ *P. indica* اثر چندانی بر افزایش میزان کلرفیل تحت تنش کادمیم نداشت. از طرفی، کاری دولت‌آبادی و همکاران (۱۳۹۱) در پژوهشی روی گیاه کنگر فرنگی نشان دادند گیاهان تلقیح‌یافته با قارچ *P. indica* برگ‌های پهن‌تری در مقایسه با گیاه شاهد تولید کردند. آنها همچنن بیان کردند افزایش پهنای برگ منجر به افزایش میزان کلروفیل و درنهایت راندمان فتوسنتزی برگ شد. بالابودن میزان کلروفیل در گیاهان تلقیح‌شده با قارچ، احتمالاً به‌علت وجود رابطه مثبت بین غلظت فسفر و مقدار کلروفیل در گیاهان تلقیح‌شده باشد زیرا گزارش‌های مکرر از افزایش جذب فسفر توسط این قارچ به گیاه میزبان ارائه گردیده است (Zarea *et al*., 2012)؛ که با نتایج این پژوهش مطابقت نداشت.

کارتنوئید نیز با افزایش غلظت کادمیم با روند کاهشی روبرو گردید، با این‌حال، تیمار تلقیح قارچی حساسیت کمتری داشته و با شیب کمتری (۰/۰۳٦–) نسبت به تیمار عدم‌تلقیح (۰/۰۹۹–) کاهش یافت (شکل e– ۳ و جدول ٦). در گیاهان عالی کارتنوئیدها باعث حفاظت از دستگاه فتوسنتزی در برابر فوتون‌های اضافی و تنش اکسیداتیو می‌شوند (Young, 1991). Sanitata و Gabbriella (۱۹۹۹) گزارش کردند کارتنوئیدها نقش حفاظتی در برابر تنش اکسیداتیو دارند به‌همین علت از بین می‌روند.

نشت الکترولیت با افزایش غلظت کادمیم از صفر تا ۲۰ میلی‌گرم در لیتر در هر دو تیمار شاهد و تیمار قارچی روند افزایشی داشت. در سطوح پایین کادمیم تا غلظت حدود ۱۳ میلی‌گرم در لیتر درصد نشت الکترولیت در برگ گیاهان تلقیح‌شده با قارچ کمتر از تیمار عدم‌تلقیح بود که نشان از تحمل بیشتر گیاهان تلقیح‌شده با قارچ در سطوح پایین و متوسط کادمیم دارد اما با افزایش کادمیم تا ۲۰ میلی‌گرم در لیتر تلقیح قارچ توانایی القای تحمل به سمیت کادمیم را از دست داده است (شکل f – ۳). عموآقایی و همکاران (۱۳۹۱) در بررسی اثر متقابل سالیسیلیک اسید و کادمیم در گیاه سویا نشان دادند که کادمیم در گیاهان شاهد درصد نشت الکترولیت را به‌میزان ۵۸/۱ درصد افزایش داد.

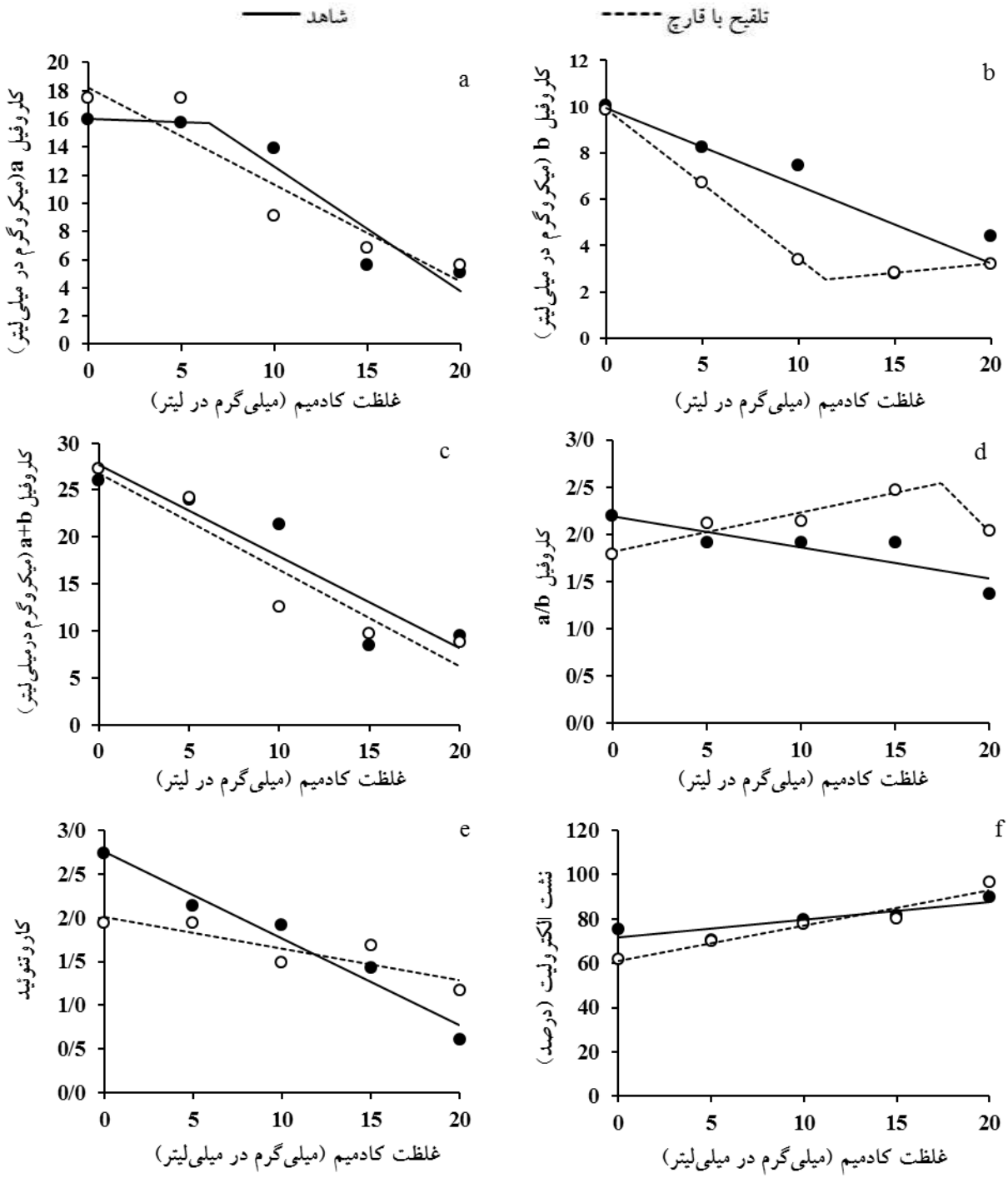
فعالیت آنزیمی: نتایج تجزیه رگرسیون داده‌های حاصل از آزمایش نشان داد که اثر سمیت کادمیم چه در تیمار شاهد (عدم‌تلقیح) و چه در تیمار تلقیح با قارچ *P. indica* بر فعالیت آنزیم کاتالاز و میزان هیدروژن پراکسید و پروتئین محلول در سطح احتمال یک درصد و بر فعالیت آنزیم پراکسیداز در سطحاحتمال پنج درصد معنی‌دار بود (جدول ۷).

براساس یافته‌ها، با افزایش غلظت کادمیم روند تغییرات غلظت هیدروژن پراکسید در تیمار تلقیح و عدم‌تلقیح قارچ به صورت دوتکه‌ای بود. غلظت هیدروژن پراکسید در سطوح پایین کادمیم تغییر چندانی نداشت ولی در ادامه و با افزایش غلظت کادمیم محیط به‌بیش از ۱۰ میلی‌گرم در لیتر برای تیمار عدم‌تلقیح و بیش از ۱۵ میلی‌گرم در لیتر برای تیمار تلقیح قارچ میزان آن به‌ترتیب با شیب ۰/۱۷۸ و ۰/۰۷۸ واحد افزایش

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 11:02 IRST on Monday January 27th 2020



شکل ۳- روند پاسخ کلروفیل a (a)، b (b)، a + b (c)، a/b (d)، کارتنوئید (e) و نشت الکترولیت (f) گیاه استویا به سطوح مختلف کادمیم در شرایط تلقیح و عدم‌تلقیح با قارچ اندوفیت *P. indica*

یافت. در مجموع گیاهان تلقیح‌شده با *P. indica* هیدروژن پراکسید پایین‌تری داشتند (شکل a – ٤ و جدول ۸). Duman و Ozturk (۲۰۱۰) در آزمایشی در رابطه با اثر فلزات سنگین بیان کردند تیمار گیاه ذرت با نیکل موجب افزایش قابل توجه هیدروژن پراکسید درون‌زا و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در این گیاه می‌گردد.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 11:02 IRST on Monday January 27th 2020

جدول ٦- معادله مناسب توصیف‌کننده اثر همزیستی قارچ اندوفیت *P. indica* بر روند تغییرات کلروفیل a، b، a+b، a/b، کارتنوئید و نشت الکترولیت گیاه استویا در سطوح مختلف کادمیم

صفات	شاهد	Pi
کلروفیل a	y = -0.048x+ 16.00 if x≤ 6.536 y = -0.883x+ 15.68 if x> 6.536 R^2 = 0.916 P=0.0105 CV= 15.5	y = -0.687x + 18.178 R^2 = 0.885 P= 0.017 CV= 19.97
کلروفیل b	y = -0.3349x + 9.9476 R^2 = 0.809 P= 0.037 CV= 22.51	y = -0.643x+ 9.878 if x≤ 11.403 y = -0.081x+ 2.537 if x> 11.403 R^2 = 0.999 P<0.001 CV= 0.678
کلروفیل a+b	y = -0.974x + 27.61 R^2 = 0.858 P= 0.023 CV= 20.21	y = -1.029x + 26.809 R^2 = 0.891 P= 0.015 CV= 19.84
کلروفیل a/b	y = -0.033x + 2.1912 R^2 = 0.747 P= 0.058 CV= 9.415	y = 0.041x+ 1.821 if x≤ 17.40 y = -0.195x+ 2.541 if x> 17.40 R^2 = 0.922 P=0.009 CV= 3.57
کارتنوئید	y = -0.0992x + 2.753 R^2 = 0.9647 P= 0.0002 CV= 9.841	y = -0.036x + 2.0054 R^2 = 0.767 P= 0.051 CV= 11.004
نشت الکترولیت	y = 0.802x + 71.487 R^2 = 0.764 P= 0.0523 CV= 5.105	y = 1.590x + 61.272 R^2 = 0.943 P<0.001 CV= 4.621

جدول ۷- تجزیه رگرسیون اثر قارچ *P. indica* و سطوح مختلف کادمیم بر میزان هیدروژن پراکسید، فعالیت کاتالاز، پراکسیداز و پروتئین محلول در گیاه استویا

منابع تغییر	df	هیدروژن پراکسید		کاتالاز		پراکسیداز		پروتئین محلول	
		شاهد	تلقیح	شاهد	تلقیح	شاهد	تلقیح	شاهد	تلقیح
رگرسیون	۱	۰/٤٦۲۱**	۰/۱۳٤٥**	۰/۰۷۲۹**	۰/۰۰٦**	٤۷۱/٥۱۰	۱٤۹۸/۹۸	٤/۲٦۸**	۱/۹۳٦**
باقی‌مانده	۳	۰/۰۰۰۰	۰/۰۰۰۱۷	۰/۰۰۰۲۳	۰/۰۰۰۱**	۳۷۲/۹۱۰	۱۸٤/۷۲٦	۰/۰۷٥۱	۰/۰۲۹۱
ضریب تغییرات (%)		۰/۰۰۰۰	۰/٤٤۷	٦/۰۰۹	٥/۸٥	۱٤/٤۷	۱۷/۰۰٥	٤/٥۸	۲/۲۹

* و ** به‌ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال پنج و یک درصد

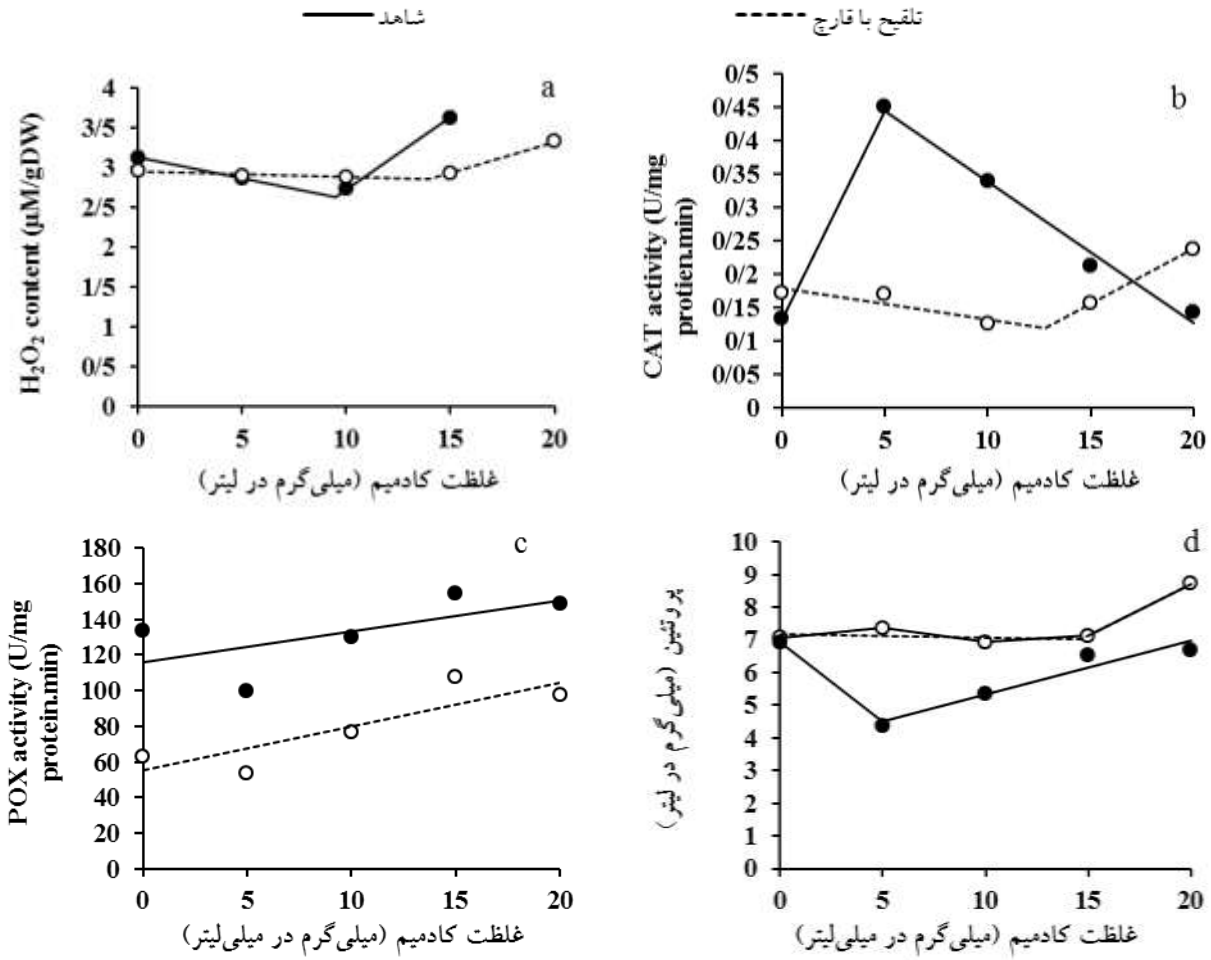
جدول۸- معادله مناسب توصیف‌کننده اثر همزیستی قارچ اندوفیت *P. indica* میزان هیدروژن پراکسید، فعالیت کاتالاز، پراکسیداز و پروتئین محلول گیاه استویا در سطوح مختلف کادمیم

صفات	شاهد	Pi
هیدروژن پراکسید	y = -0.0518x+ 3.128 if x≤ 9.46 y = 0.178x+ 2.638 if x> 9.46 R^2 = 1 P<0.0001 CV= 0	y = -0.0067x+ 2.945 if x≤ 13.97 y = 0.0784x+ 2.851 if x> 13.97 R^2 = 0.996 P<0.001 CV= 0.447
کاتالاز	y = 0.0618x+ 0.134 if x≤ 5 y = -0.0210x+ 0.443 if x> 5 R^2 = 0.990 P<0.001 CV= 6.009	y = -0.0046x+ 0.1793 if x≤12.75 y = 0.0162x+ 0.1206 if x>12.75 R^2 = 0.951 P<0.001 CV= 5.85
پراکسیداز	y = 1.722x+ 116.19 R^2 = 0.398 P=0.253 CV= 14.47	y = 2.448 + 55.435 R^2 = 0.730 P=0.065 CV= 17.005
پروتئین	y = -0.485x+ 6.94 if x≤ 5 y = -0.163x+ 4.512 if x> 5 R^2 = 0.949 P<0.001 CV= 4.58	y = -0.012x+ 7.183 if x≤ 14.64 y = -0.318x+ 7.0075 if x> 14.64 R^2 = 0.956 P<0.001 CV= 2.29

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 11:02 IRST on Monday January 27th 2020



شکل ٤- روند پاسخ هیدروژن پراکسید (a)، کاتالاز (b)، پراکسیداز (c)، پروتئین (d) و گیاه استویا به سطوح مختلف کادمیم در شرایط تلقیح و عدم‌تلقیح با قارچ اندوفیت *P. indica*

فعالیت آنزیم کاتالاز نیز در هر دو تیمار به‌صورت معادله دوتکه‌ای بود، به‌این‌صورت که در تیمار عدم‌تلقیح با افزایش غلظت کادمیم از صفر تا پنج میلی‌گرم در لیتر روند تغییرات فعالیت آن به‌صورت افزایشی (۰/۰٦۲ واحد) بوده و سپس با شیب ۰/۰۲۱- واحد کاهش یافت. از طرفی، فعالیت کاتالاز در تیمار همزیستی قارچی تحت تنش کادمیم با شیب حدود ۰/۰۰۵- با روند کاهشی روبه‌رو شد و با افزایش غلظت کادمیم با شیب حدود ۰/۰۱٦ واحد افزایش یافت (شکل b - ٤). نتایج پژوهش Galleco و همکاران (۱۹۹٦) روی گیاه آفتابگردان نشان داد که رادیکال‌های آزاد اکسیژن که در شرایط تنش ناشی از فلزات سنگین به‌وجود می‌آیند با حمله به آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و آسیب‌های اکسیداتیو باعث مهار این آنزیم‌ها می‌شود. همچنین با کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز، تجمع H_2O_2 افزایش می‌یابد که این فرآیند نیز باعث مهار آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز می‌گردد (Dell Rio *et al.*, 2003). Vajpaee و همکاران (۲۰۰۰) علت کاهش فعالیت کاتالاز همراه با افزایش غلظت کادمیم در برخی گیاهان را کاهش در میزان پروتئین‌های گیاه در اثر سمیت این فلز و تنش اکسیداتیو بیان کردند.

میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز با افزایش تنش چه در تیمار عدم‌تلقیح و چه در تیمار تلقیح با قارچ به‌طور خطی افزایش یافت؛ حال آنکه در گیاهان بدون قارچ فعالیت این آنزیم شیب افزایشی (۱/۷۲ واحد) کمتری نسبت به گیاهان همزیست‌شده با قارچ (۲/٤٤ واحد) داشت. با این‌حال فعالیت این آنزیم همواره در گیاهان تلقیح‌شده با قارچ کمتر از گیاهان تلقیح‌نشده

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 11:02 IRST on Monday January 27th 2020

بود (شکل c – ٤). به طور کلی سازوکار اثر قارچ *P. indica* بر سیستم آنتی‌اکسیدانی گیاهان تلقیح‌شده تحت شرایط تنش شناخته شده نیست اما می‌توان اظهار داشت که قارچ *P. indica* به‌طور مستقیم باعث خنثی‌کردن فعالیت رادیکال‌های آزاد اکسیژن در گیاه می‌شود (Yaghoubian *et al.*, 2014).

میزان پروتئین محلول نیز در تیمار تلقیح با افزایش غلظت کادمیم از صفر تا ۲۰ میلی‌گرم در لیتر به‌میزان ۲۱/۳۵ درصد نسبت به گیاهان شاهد افزایش یافت، درحالیکه تیمار عدم‌تلقیح با ۰/۳۳ درصد افزایش کمتری را از خود نشان داد (شکل d – ٤). در مجموع، میزان پروتئین در تیمار تلقیح قارچ نسبت به تیمار عدم‌تلقیح بالاتر بود. Wang و همکاران (۲۰۰۸) در بررسی روی گیاه تاجریزی نشان دادند که تنش کادمیم با اختلال در متابولیسم نیتروژن از طریق مهار فعالیت آنزیم‌هایی مانند گلوتامین سینتاز، گلوتامات سینتاز و نیترات ردوکتاز و فرآیند احیاء نیترات سبب کاهش تولید پروتئین شده و رشد را متوقف می‌کند.

نتیجه‌گیری

به‌طورکلی از نتایج به‌دست آمده چنین استنباط می‌شود که تأثیر تنش ناشی از افزایش غلظت کادمیم بر فرآیندهای فیزیولوژیک گیاه استویا متفاوت است. در این آزمایش گیاهان تلقیح‌شده با قارچ اندوفیت *P. indica* فعالیت بهتری را نسبت به گیاهان شاهد در شرایط تنش از خود نشان دادند براساس نتایج با افزایش تدریجی غلظت کادمیم سطح برگ با حدود ۹٦ درصد کاهش بیشترین حساسیت را از خود نشان داد. از طرفی قارچ اندوفیت *P. indica* سبب افزایش قابل توجه صفت پراکسیداز در گیاهچه‌های همزیست نسبت به سایر صفات مورد بررسی شد به‌طوریکه این افزایش حدود ٥٤ درصد بود. همچنین کاهش میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی و آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز برگ‌ها نشان از آثار سمیت کادمیم و تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌باشد که آسیب‌های اکسیداتیو و کاهش رشد را به‌دنبال دارد. این نتایج، بیانگر اهمیت ارتباط همزیستی قارچ *P. indica* با گیاه استویا و افزایش تحمل آن به سمیت کادمیم است که می‌تواند در تحقیقات آینده مورد استفاده قرار گیرد. با این وجود، برای تعیین سازوکارهای مرتبط در افزایش تحمل گیاه به سمیت کادمیوم نیاز به انجام پژوهش‌های بیشتری است.

سپاسگزاری

بدین وسیله از پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان به‌خاطر حمایت‌های مالی جهت انجام این پژوهش تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

امامی، ع. (۱۳۷۵) روش‌های تجزیه گیاه. سازمان تحقیقات آموزش ترویج کشاورزی، مؤسسه تحقیقات آب و خاک، نشریه فنی ۹۸۲.

حاجی‌نیا، س.، زارع، م. ج.، محمدی گل‌تپه، ا. و رجالی، ف. (۱۳۹۱) 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 ٤: ۳۱-۲۱.

سجادی، س. ا. و عاصمی، ه. (۱۳۸۷) ارزیابی پتانسیل کنترل بیولوژیک گونه‌های Trichoderma برعلیه بیماری پوسیدگی یقه توتون در استان مازندران. مجله یافته‌های نوین کشاورزی ۳: ۲۷۰-۲۵۳.

عموآقایی، ر.، معرفت، ا. و شبانی، ل. (۱۳۹۱) تأثیر متقابل سالیسیلیک اسید و کادمیوم بر رشد، رنگیزه‌های فتوسنتزی و تجمع برخی عناصر در بخش هوایی گیاهچه‌های سویا. زیست شناسی گیاهی٤: ۸۸-۷۵.

قادریان، س. م. و جمالی حاجیانی، ن. (۱۳۸۹) بررسی مقاومت جذب و انباشتگی کادمیم در گیاه *Matthiola chenopodiifolia* Fisch and C. A. Mey (Brassicaceae). زیست شناسی گیاهی ۲: ۹۸-۸۷.

قاسمی، ع. (۱۳۸۸) گیاهان دارویی و معطر، شناخت وبررسی اثرات آنها. انتشارات دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 11:02 IRST on Monday January 27th 2020

کاری دولت‌آبادی، ح.، محمدی گل‌تپه، ا.، معینی، ا. و ورما، آ. (۱۳۹۱) ارزیابی تأثیر غلظت‌های مختلف اکسین و قارچ‌های *Piriformospora indica* و *Sebacina vermifera* روی نعناء فلفلی (*Mentha piperita*) و آویشن (*Thymus vulgaris*) در شرایط درون شیشه‌ای. فصلنامه گیاهان دارویی ۲: ۲۲-۱۳.

یعقوبیان، ی. (۱۳۹٤) اثر قارچ‌های *Piriformospora indica* و .*Trichoderma* spp در تحمل به سمیت کادمیوم در گیاهان دارویی بادرنجبویه (.*Melissa officinalis* L) و خرفه (*Portulaca oleracea* L.). پایان‌نامه دکتری، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان، اهواز، ایران.

یعقوبیان، ی.، پیردشتی، ه.، محمدی گلتپه، ا.، فیضی‌اصل، و. و اسفندیاری، ع. (۱۳۹۱) ارزیابی واکنش گندم دیم (*Triticum aestivum* L.) رقم آذر ۲ به همزیستی با قارچ‌های میکوریزای آربوسکولار و شبه‌میکوریزا در سطوح مختلف تنش خشکی. نشریه بوم شناسی کشاورزی ٤: ۷۳-٦۳.

یعقوبیان، ی.، سیادت، س. ع.، مرادی‌تلاوت، م. ر. و پیردشتی، ه. (۱۳۹۵) کمی‌سازی پاسخ رشد رویشی و مؤلفه‌های فلورسانس کلروفیل گیاه دارویی بادرنجبویه (.*Melissa officinalis* L) به غلظت کادمیوم در خاک. نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی ۲۳: ۱۸۵-۱٦۵.

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.

Antoniadis, N. and Alloway, B. J. (2001) Availability of Cd, Ni and Zn to rye grass in seawage sludge treated soils at different temperatures. Water, Air and Soil Pollut 132: 201–204.

Bakhshandeh, E., Soltani, A., Zeinali, E. and Kallate-Arabi, M. (2012) Prediction of plant height by allometric relationships in field-grown wheat. Cereal Reserch Communications 40: 487-496.

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.

Chan, P., Tomlinson, B., Chen, Y., Liu, J., Herish, J. and Cheng, J. (2000) A double blind placebo-controlled study of effectiveness and tolaribility of the stevioside in human hypertensive. British Journal of Clinical Pharmacology 50: 215-220.

Cho, V. H. and Park, J. O. (2000) Mercury - induced oxidative stress in tomato seedlings. Plant Science 126: 1-9.

Dell Rio, L. A., Copas, F. J., Sandalio, L. M., Palma, J. M. and Barroso, J. B. (2003) Plant peroxisomes, reactive oxygen metabolism and nitric oxide. International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life 55: 71-81.

Duman, F. and Ozturk, F. (2010) Nickel accumulation and its effect on biomass, protein content and antioxidative enzymes in roots and leaves of watercress (*Nasturtium officinale* R. Br.). Journal of Environmental Sciences 22: 526-532.

Frossard, R. (1993) Contaminant uptake by plants. In: Soil Monitoring (eds Schulin, R., Desaules, A., Webster, R. and von Steiger, B.) Pp. 157-178. Monte Verita Birkhauser, Basel.

Galleco, S. M., Benavides, M. P. and Tomaro, M. L. (1996) Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress. Plant Science 121: 151-159.

Glick, B. R. (2003) Phytoremediation: synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment. Biotechnology Advances 21: 383-393.

Hegedus, A., Erdi, S. and Horvath, G. (2001) Comparative studies of H_2O_2 detoxifying enzymes in green and greening barley seedling under cadmium stress. Plant Science 160:1085-1093.

Ibrahim, I. A., Nasr, M. I., Mohammed, B. R., Zefzafi, M. M. E. L. (2008) Nutrient factors affecting in vitro cultivation of *Stevia rebaudiana*. Sugar Technology 10: 248-253

Jappesen, P. B., Gregersen, S., Poulsen, C. R. and Hermansen, k. (2000) Stevioside acts directly on pancreaticcells to secrete insolin. Metabolism 49: 208-214.

Kabata-Pendias, A. and Pendias, H. (2001) Trace element in soils and plants. 3nd Ed., CRC Press, Boca Raton, London.

Kafer, E. (1977) Meiotic and mitotic recombination in Aspergillus and its chromosomal aberrations. Advances in Genetics 19: 33-131.

Khan, N. A., Ahmad, I., Singh, S. and Nazar, R. (2006) Variation in growth, photosynthesis and yield of five wheat cultivars exposed to cadmium stress. World Journal of Agricultural Science 2: 223-226.

Lalor, G. C. (2008) Review of cadmium transfers from soil to humans and its health effects and Jamaican environment. Scienceof the Total Environment 400: 162-72.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 11:02 IRST on Monday January 27th 2020

Lichtenthaler, H. K. and Buschmann, C. (2001) Chlorophylls and Carotenoids Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. 1nd Ed. Current Protocols Food Analyt Chemistry.

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.

Pereira, G. J. G., Molina, S. M. G., Lea, P. J. and Zevedo, R. A. (2002) Activity of antioxidant enzymes in response to Cd in *Crotalaria juncea*. Plant and Soil 239: 123-132.

Prasad, S., Dwivedi, R., Zeeshan, M. and Singh, R. (2004) UV-B and cadmium induced changes in pigments, photosynthetic electron transport activity, antioxidant levels and antioxidative enzyme activities of Riccia sp. Acta Physiology Plant 26: 423-430.

Rai, M. and Varma, A. (2005) Arbuscular mycorrhiza-like biotechnological *Piriformospora indica*, which promotes the growth of *Adhatoda vasica*. Electronic Journal of Biotechnology 8: 107-111.

Ramos, I., Esteban, E., Lucena, J. J. and Garate, A. (2002) Cd uptake and sub cellular distribution in plant of Lactuca sp. Cd- Mn intraction. Plant Science 162: 761-767.

Sanitata, L. and Gabbriella, R. (1999) Response to Cd in higher plant- review. Environmental and Exprimental Botany 45: 105-130.

SAS Institute (2004) SAS/STAT user's guide. SAS Institute, Cary.

Schutz, H. and Fangmier, E. (2001) Growth and yield responses of spring Wheat (*Triticum aestivum* L.) to elevated Co_2 and water limitation. Environmental Pollution 114: 187-194.

Sylvia, D. M. and Williams, S. E (1992) Vesicular arbuscular mycorrhizae and environmental stress. ASA special publication, Madison Wisconsin.

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.

Teutonica, R. A., Palta, J. P. and Osborn, T. C. (1993) In vitro freezing tolerance in relation to winter survival of rapeseed cultivars. Crop Science 33: 103-107.

Vajpaee, P., Tripathi, R. D., Rai, U. N., Ali, M. B. and Singh, S. N. (2000) Cd Accumulation reduces chlorophyll biosynthesis, Nitrate reductase activity and protein content in *Nymphaea alba* L. Chemosphere 41: 1075-1082.

Varma, A., Verma, S., Sudha, N., Sahay, S., Butehorn, B. and Franken, P. (1999) *Piriformospora indica*, a cultivable plant growth-promoting root endophyte. Applied and Environmental Microbiology 65: 2741-4.

Vassilev, A. and Yordanov, I. (1997) Reductive analysis of factors limiting growth of cadmiumtreated plants-review. Plant Physiology 23: 114-133.

Vassilev, A., Lidon, C. F., Matos, M. D. C., Ramalho, J. C. and Yordanov, I. (2002) Phytosynthetic performance and content of some nutrients in cadmium-and copper- treated barley plants. Journal of Plant Nutrition 25: 2343-2360.

Verma, A., Sudha, S. and Franken, P. (1999) *Piriformospora indica* a cultivable plant growth promoting root endophyte with similarities to arbuscular mycorrhizalfungi. Applied and Environmental Microbiology 65: 2741-2744.

Viana, A. M. and Metivier, J. (1998) Changes in the levels of total soluble proteins and sugars during leaf ontogeny in *Stevia rebaudiana* Bertoni. Annales Botanici 45: 469-474.

Waller, F., Achatz, B., Baltruschat, H., Fodor, J., Becker, K., Fischer, M., Heier, T., Huckelhoven, R., Neumann, C., 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. Proceedings of the National Academy of Science of the United States America 102: 13386-13391.

Wang, L., Zhou, Q., Ding, L., Sun, Y. (2008) Effect of cadmium toxicity on nitrogen metabolism in leaves of *Solanum nigrum* L. Journal of Hazardous Materials 154: 818-825.

Yaghoubian, Y., Mohammadi Goltapeh, E., Pirdashti, H., Esfandiari, E., Feiziasl, V., Kari Dolatabadi, H., Varma, A., 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.

Yaghoubian, Y., Siadat. S. A., Moradi Telavat, M. R. and Pirdashti, H. (2016) Quantify the response of purslane plant growth, photosynthesis pigments and photosystem II photochemistry to cadmium concentration gradients in the soil. Russian Journal of Plant Physiology 63: 77-84.

Young, A. J. (1991) The photoprotective role of carotenoids in higher plants. Plant Physiology 83: 702-708.

Zarea, M. J., Hajinia, S., Karimi, N., Mohammadi Goltapeh, E., Rejali, F. and Varma, A. (2012) 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.

Zhang, G., Fukami, M. and Sekimoto, H. (2002) Influence of cadmium on minral concentration and yield components in wheat genotypes differing in Cd tolerance at seedling stage. Field Crops Research 77:93-98.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 11:02 IRST on Monday January 27th 2020

Response of morphophysiological parameters and antioxidants system of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) medicinal plant to inoculation of *Piriformospora indica* under cadmium stress

Neda salami Tamali[1], Hemmatollah Pirdashti[1*], Yasser Yaghoubian[2], Valiollah Ghasemi Omran[2]

[1] Department of Agronomy, Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran.
[2] Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran.
(Received: 27/04/2016, Accepted: 25/12/2017)

Abstract

In order to investigate the role of *Piriformospora indica* endophyte fungi on some vegetative, physiological and morphological parameters along with antioxidant activity of stevia (*Stevia rebaudiana*) under cadmium (Cd) stress, an *in vitro* experiment was conducted. Experiment was arranged in completely randomized design with three replicates. Treatments were five levels of Cd (0, 5, 10, 15 and 20 mg/L from cadmium chloride source) and two levels of fungi inoculation (including control and inoculation with *P. indica*). After 30 days, some growth characteristics, photosynthetic pigments, antioxidant enzyme activity, electrolyte leakage and soluble protein were measured. Regression analysis indicated that among vegetative dry weights, stem dry weight in the uninoculated plants showed the maximum sensitivity (76%) to Cd concentration gradients. Fungi inoculation, however, markedly improved root dry weight up to 57%. Among morphological parameters, leaf area showed the highest reduction when Cd increased in the growing medium. By contrast, where *P. indica* was inoculated, green leaf percentage (51% reduction) was the most tolerant parameter. In terms of photosynthetic pigments, fungi inoculation could ameliorate reduction of carotenoid and chlorophyll *a*/b contents from 77 and 37 to 40 and 11%, respectively. In conclusion, results of the present study indicated that *P. indica* inoculation particularly at lower Cd concentrations could relatively improve stevia tolerance by decreasing H_2O_2 accumulation and enhancing photosynthetic pigments.

Key words: Regression analysis, Enzyme activity, Endophyte fungi, Photosynthetic pigments

Corresponding author, Email: h.pirdashti@sanru.ac.ir

www.SID.ir