

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشکده کشاورزی

رساله دکتری مهندسی زراعت

اثر قارچ‌های اندوفیت *Trichoderma virens* و *Piriformospora indica* به همراه کاربرد پلی آمین اسپرمیدین در افزایش تحمل به شوری گیاه دارویی استویا (*Stevia rebaudiana* Bertoni)

نگارنده:

سیده حدیثه بهاری ساروی

استادان راهنما:

دکتر احمد غلامی

دکتر همت‌اله پیردشتی

استادان مشاور:

دکتر مهدی برادران فیروزآبادی

دکتر حمیدرضا اصغری

دی ماه ۱۳۹۸

شماره: ۰۴
تاریخ: ۱۳۹۹/۰۷/۱۷
ویرایش:

باسمه تعالی



فرم شماره ۱۲: صورت جلسه نهایی دفاع از رساله دکتری (Ph.D)

بدینوسیله گواهی می شود آقای/خانم سیده حدیثه بهاری ساروی دانشجوی دکتری رشته زراعت- فیزیولوژی گیاهان زراعی به شماره دانشجویی ۹۳۰۰۲۹۵ ورودی مهر ماه سال ۱۳۹۳ در تاریخ ۹۸/۱۰/۲۵ از رساله نظری/ عملی خود با عنوان: اثر قارچ‌های اندوفیت *Piriformospora indica* و *Trichoderma virens* به همراه کاربرد پلی آمین اسپرمیدین در افزایش تحمل به شوری گیاه دارویی استویا (*Stevia rebaudiana* Bertoni) دفاع و با اخذ نمره به درجه: عالی نائل گردید.

جدول تعیین درجه نمره رساله برای ورودیه‌های ۹۴ و ماقبل

الف) درجه عالی: نمره ۱۹-۲۰ <input checked="" type="checkbox"/>	ب) درجه خیلی خوب: نمره ۱۸/۹۹-۱۷ <input type="checkbox"/>
ج) درجه خوب: نمره ۱۶/۹۹-۱۵ <input type="checkbox"/>	د) مردود: کمتر از ۱۵ <input type="checkbox"/>

جدول تعیین درجه نمره رساله برای ورودیه‌های ۹۵ و مابعد

الف) درجه عالی: نمره ۱۹-۲۰ <input type="checkbox"/>	ب) درجه خیلی خوب: نمره ۱۸/۹۹-۱۸ <input type="checkbox"/>
ج) درجه خوب: نمره ۱۷/۹۹-۱۶ <input type="checkbox"/>	د) مردود: کمتر از ۱۶ <input type="checkbox"/>

ردیف	هیئت داوران	نام و نام خانوادگی	مرتبه علمی	امضاء
	دکتر احمد غلامی	استاد راهنما	دانشیار	
	دکتر همت اله پیردشتی	استاد راهنما	استاد	
	دکتر مهدی برادران فیروزآبادی	استاد مشاور	دانشیار	
	دکتر حمیدرضا صغری	استاد مشاور	دانشیار	
	دکتر عباس بیابانی	استاد مدعو خارجی	دانشیار	
	دکتر محمدرضا عامریان	استاد مدعو داخلی	دانشیار	
	دکتر مصطفی حیدری	استاد مدعو داخلی	دانشیار	
	دکتر حسن مکاریان	سرپرست (نماینده) تحصیلات تکمیلی دانشکده	دانشیار	

مدیر محترم تحصیلات تکمیلی دانشگاه:

ضمن تأیید مراتب فوق مقرر فرمائید اقدامات لازم در خصوص انجام مراحل دانش آموختگی خانم سیده حدیثه بهاری ساروی بعمل آید.

نام و نام خانوادگی رئیس دانشکده:

تاریخ و امضاء و مهر دانشکده:

۹۹/۰۷/۱۷

تقدیم بہ خانوادہ عزیزم؛

کسانی کہ تمام وجود مدیون گذشتہ، فداکاری، و محبت ہای بی دریغشان است.

تقدیم بہ تمامی معلمان زندگیم؛

کسانی کہ از آہنا آموختم، چگونه یاد بگیرم و چگونه زندگی کنم.

تقدیر و تشکر

سپاس و ستایش پروردگار بی‌همتایی را که ذات بی‌کرانش از علم و دانش است. صمیمانه‌ترین مراتب قدردانی خود را به همه بزرگانی که به نحوی در تکمیل و تنظیم این پایان‌نامه دلسوزانه یاری‌ام کردند تقدیم می‌دارم.

از اساتید راهنمای گرانقدرم جناب آقای دکتر غلامی و آقای دکتر پیردشتی به خاطر تمام راهنمایی‌ها و مساعدت‌های بی‌دریغ و ارزشمندشان در طی مراحل انجام و تدوین پایان‌نامه کمال تشکر و قدردانی را دارم. از اساتید مشاور بزرگوام آقای دکتر برادران و آقای دکتر اصغری به خاطر تمامی راهنمایی‌هایشان صمیمانه سپاسگزارم.

از اساتید محترم جناب آقای دکتر بیابانی، آقای دکتر عامریان و آقای دکتر حیدری داوران محترم پایان‌نامه که موجبات بهبود نگارش پایان‌نامه را فراهم آوردند و همچنین از نماینده محترم تحصیلات تکمیلی دانشگاه آقای دکتر مکاریان که مدیریت جلسه دفاع را بر عهده گرفتند، تشکر و قدردانی می‌نمایم.

از همکلاسی‌ها و دوستان خوبم در دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود و همچنین دوستان عزیزم در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری که در این مدت در کنارم بوده‌اند نهایت تشکر و سپاس را دارم.

از مسئولین دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود و دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری و به‌ویژه پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان که در این راه یاریم نمودند سپاسگزاری می‌نمایم.

در پایان از خانواده عزیزم که همواره تکیه‌گاه، همراه و مشوقم بوده‌اند، تشکر و سپاسگزاری می‌نمایم و از خداوند متعال فرصت جبران زحماتشان را خواهانم.

تعهد نامه

اینجانب سیده حدیثه بهاری ساروی دانشجوی دوره دکتری رشته زراعت گرایش فیزیولوژی گیاهان زراعی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود نویسنده پایان نامه اثر قارچ های اندوفیت *Piriformospora indica* و *Trichoderma virens* به همراه کاربرد پلی آمین اسپرمیدین در افزایش تحمل به شوری گیاه دارویی استویا (*Stevia rebaudiana Bertoni*) تحت راهنمایی دکتر احمد غلامی و دکتر همت‌اله پیردشتی متعهد می‌شوم.

- تحقیقات در این پایان نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است .
- در استفاده از نتایج پژوهشهای محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است .
- مطالب مندرج در پایان نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نشده است .
- کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می‌باشد و مقالات مستخرج با نام « دانشگاه صنعتی شاهرود » و یا « Shahrood University of Technology » به چاپ خواهد رسید .
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان نامه تأثیرگذار بوده اند در مقالات مستخرج از پایان نامه رعایت می‌گردد.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه ، در مواردی که از موجود زنده (یا بافتهای آنها) استفاده شده است ضوابط و اصول اخلاقی رعایت شده است .
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسی یافته یا استفاده شده است اصل رازداری ، ضوابط و اصول اخلاق انسانی رعایت شده است .

تاریخ

امضای دانشجو

مالکیت نتایج و حق نشر

کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج ، کتاب ، برنامه های رایانه ای ، نرم افزار ها و تجهیزات ساخته شده است) متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می‌باشد . این مطلب باید به نحو مقتضی در تولیدات علمی مربوطه ذکر شود . استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمی‌باشد.

چکیده

امروزه تنش شوری در سطح جهان خسارت‌های گسترده‌ای به گیاهان وارد نموده و از مشکلات عمده در بخش کشاورزی می‌باشد. از سوی دیگر، در سال‌های اخیر نقش قارچ‌های همزیست و همچنین پلی‌آمین‌ها در افزایش تحمل گیاهان در شرایط شور مورد توجه قرار گرفته است. بنابراین پژوهش حاضر با هدف ارزیابی اثر همزیستی قارچ‌های اندوفیت و محلول‌پاشی اسپرمیدین بر بهبود رشد گیاه استویا در واکنش به تنش شوری در قالب دو آزمایش گلخانه‌ای و مزرعه‌ای اجرا شد. در بخش گلخانه، آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با سه تکرار و سه فاکتور شوری (صفر، ۶ و ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر)، همزیستی قارچی (عدم تلقیح، تلقیح *Piriformospora indica*، تلقیح *Trichoderma virens* و تلقیح هم‌زمان دو قارچ) و محلول‌پاشی اسپرمیدین (صفر، ۰/۷۵ و ۱/۵ میلی‌مولار) انجام شد. براساس نتایج آزمایش گلخانه‌ای، فاکتورهای آزمایش مزرعه‌ای شامل شوری (صفر، شش و ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر) به‌عنوان کرت اصلی و تیمار همزیستی قارچی (عدم تلقیح و تلقیح هم‌زمان دو قارچ *P. indica* و *T. virens*) و محلول‌پاشی اسپرمیدین (صفر و ۰/۷۵ میلی‌مولار) به‌عنوان کرت فرعی تعیین شد. نتایج بخش گلخانه‌ای و مزرعه‌ای این پژوهش نشان داد، تلقیح با قارچ‌های اندوفیت و کاربرد اسپرمیدین در شرایط تنش شوری موجب بهبود معنی‌دار صفات رویشی استویا مانند ارتفاع بوته، سطح برگ، وزن تر و خشک برگ، ساقه و شاخساره شد. همزیستی قارچی در شرایط تنش شوری در گلخانه و مزرعه بر اکثر پارامترهای فلورسانس کلروفیل شامل *Fv*، *Fm*، *Fv/Fm*، *Y(II)*، *Y(NO)* و *NPQ* اثر مثبت نشان داد. تیمار همزیستی قارچی و کاربرد اسپرمیدین موجب افزایش پرولین و محتوای نسبی آب برگ و کاهش نشت الکتروولت شد. همچنین یافته‌ها حاکی از افزایش قابل توجه در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی از جمله *SOD*، *CAT*، *POD* و *APX* و کاهش میزان پراکسید هیدروژن به‌دنبال همزیستی قارچی و محلول‌پاشی اسپرمیدین در هر دو آزمایش بود که منجر به کاهش اثرات نامطلوب ناشی از تنش شوری بر لیپیدهای غشایی گردید. آبیاری با آب شور به‌ویژه با شوری شش دسی‌زیمنس بر متر غلظت استویوزید و ربادیوزید *A* برگ را افزایش داد و تیمار همزیستی قارچی و کاربرد اسپرمیدین نیز موجب تحریک تجمع بیشتر این ترکیبات گردید. در مجموع، به‌نظر می‌رسد کاربرد قارچ‌های همزیست همراه با محلول‌پاشی اسپرمیدین بتواند با افزایش میزان تحمل گیاه تا حدود زیادی ویژگی‌های رشدی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه دارویی استویا را در شرایط وقوع تنش شوری بهبود بخشیده و میزان تولید ترکیبات گلیکوزیدی را افزایش دهد.

کلمات کلیدی: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، استویوزید، شوری آب دریا، ربادیوزید *A*، فلورسانس کلروفیل

فهرست مطالب

فصل اول: مقدمه

۲-۱-۱- ضرورت انجام تحقیق	۲
۲-۱-۲- فرضیه‌های پژوهش	۵
۳-۱- اهداف پژوهش	۵
فصل دوم: بررسی منابع	
۱-۲- گیاهشناسی استویا	۸
۱-۲-۱- ویژگی‌های گیاه استویا	۸
۱-۲-۲- دامنه‌ی انتشار و نیازهای اکولوژیکی	۹
۲-۲- کود زیستی	۱۰
۱-۲-۲- قارچ اندوفیت <i>Piriformospora indica</i>	۱۰
۱-۲-۲-۱- منشأ قارچ <i>P. indica</i>	۱۲
۱-۲-۲-۲- چگونگی همزیستی با گیاه	۱۲
۱-۲-۲-۳- اثر <i>P. indica</i> در رشد رویشی و جذب مواد غذایی	۱۳
۱-۲-۲-۴- اثر قارچ <i>P. indica</i> در تحمل به تنش‌های زیستی و غیرزیستی	۱۶
۱-۲-۲-۲- قارچ تریکودرما	۱۸
۱-۲-۲-۲- مشخصات قارچ‌های تریکودرما	۱۸
۱-۲-۲-۲- قارچ تریکودرما و تحریک رشد گیاهان	۱۸
۱-۲-۲-۲- اثر قارچ تریکودرما در تحمل به تنش‌های محیطی	۲۰
۱-۲-۲-۳- تنش‌های محیطی غیرزیستی	۲۱
۱-۲-۳-۱- تنش شوری	۲۲
۱-۲-۳-۲- تأثیر تنش شوری بر گیاهان	۲۲
۱-۲-۳-۲- سازوکارهای دفاعی گیاهان در شرایط تنش	۲۵
۱-۲-۳-۲- سیستم آنتی‌اکسیدانی گیاه	۲۶
۱-۲-۳-۲-۱- اکسیژن‌های فعال	۲۷
۱-۲-۳-۲-۲- چگونگی تولید انواع اکسیژن فعال (ROS)	۲۷
۱-۲-۳-۲-۲- اثرات عمومی گونه‌های فعال اکسیژن	۲۸
۱-۲-۳-۲-۲- تعدادی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و وظایف آن‌ها	۲۹
۱-۲-۳-۲-۲- آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD)	۲۹
۱-۲-۳-۲-۲- آنزیم کاتالاز (CAT)	۲۹
۱-۲-۳-۲-۲- آنزیم گایاکول پراکسیداز (GPX)	۲۹
۱-۲-۳-۲-۲- آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX)	۳۰
۱-۲-۳-۲-۲- پایداری غشا	۳۰

- ۳۱ ۲-۳-۴-اسید آمینه پرولین
- ۳۲ ۲-۳-۴-۵-قند
- ۳۲ ۲-۳-۴-۶-پراکسید هیدروژن
- ۳۳ ۲-۳-۴-۷-پروتئین
- ۳۴ ۲-۳-۵-فلورسانس کلروفیل
- ۳۷ ۲-۳-۵-۱-معرفی پارامترهای فلورسانس کلروفیل
- ۴۰ ۲-۳-۵-۲-اثر تنش‌های محیطی بر پارامترهای فلورسانس کلروفیل *a*
- ۴۱ ۲-۴-پلی آمین‌ها
- ۴۲ ۲-۴-۱-نقش پلی آمین‌ها در تنش‌های غیرزیستی
- ۴۳ ۲-۴-۲-اثر پلی آمین‌ها بر مقاومت به تنش شوری در گیاه
- فصل سوم: مواد و روش‌ها
- ۴۶ ۳-۱-بخش گلخانه‌ای
- ۴۶ ۳-۱-۱-تهیه و ضدعفونی خاک
- ۴۷ ۳-۱-۲-تیمارهای مورد استفاده
- ۴۷ ۳-۱-۳-اعمال تیمارهای فارچی
- ۴۸ ۳-۱-۴-محلول پاشی پلی آمین اسپرمیدین
- ۴۹ ۳-۱-۵-اعمال تیمار شوری
- ۴۹ ۳-۲-بخش مزرعه‌ای
- ۵۰ ۳-۲-۱-آماده‌سازی زمین
- ۵۰ ۳-۲-۲-کشت استویا
- ۵۰ ۳-۳-صفات مورد بررسی
- ۵۱ ۳-۳-۱-پارامترهای فیزیولوژیک
- ۵۱ ۳-۳-۱-۱-فلورسانس کلروفیل *a*
- ۵۴ ۳-۳-۱-۲-اندازه‌گیری غلظت کلروفیل و کارتنوئید برگ
- ۵۵ ۳-۳-۱-۳-شاخص کلروفیل
- ۵۵ ۳-۳-۱-۴-نشت الکترولیت
- ۵۵ ۳-۳-۱-۵-محتوای نسبی آب برگ
- ۵۶ ۳-۳-۲-پارامترهای بیوشیمیایی
- ۵۶ ۳-۳-۱-۱-آنزیم‌های آنتی اکسیدان
- ۵۶ الف-استخراج آنزیمی
- ۵۶ ب-ثبت فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان
- ۵۶ - سوپراکسید دیسموتاز (SOD):
- ۵۷ - کاتالاز (CAT):
- ۵۸ - پراکسیداز (POD):

۵۸	- آسکوربات پراکسیداز (APX):
۵۹	-۲-۲-۳-۳ پروتئین محلول
۵۹	-۳-۲-۳-۳ اسیدآمینو پرولین
۶۰	-۴-۲-۳-۳ پراکسیداسیون لیپیدی یا مالون دی آلدئید (MDA)
۶۰	-۵-۲-۳-۳ قند محلول
۶۱	-۳-۳-۳ استخراج و سنجش گلیکوزیدها
۶۱	-۴-۳-۳ رنگ آمیزی و مطالعه همزیستی ریشه و قارچ
۶۲	-۴-۳ تجزیه و تحلیل داده‌های آزمایش
		فصل چهارم: نتایج و بحث
۶۴	-۱-۴ بخش گلخانه‌ای
۶۴	-۱-۱-۴ کلونیزاسیون ریشه
۶۴	-۱-۱-۱-۴ بررسی همزیستی ریشه استویا با قارچ‌های اندوفیت
۶۴	-۲-۱-۱-۴ درصد کلونیزاسیون ریشه
۶۶	-۲-۱-۴ صفات رویشی
۶۶	-۱-۲-۱-۴ ارتفاع بوته
۶۷	-۲-۲-۱-۴ سطح برگ
۶۸	-۳-۲-۱-۴ وزن تر برگ، ساقه و شاخساره
۷۰	-۴-۲-۱-۴ وزن خشک برگ
۷۲	-۵-۲-۱-۴ وزن خشک ساقه
۷۳	-۶-۲-۱-۴ وزن خشک شاخساره
۷۴	-۳-۱-۴ صفات فیزیولوژیک
۷۴	-۱-۳-۱-۴ فلورسانس کلروفیل <i>a</i>
۸۱	-۲-۳-۱-۴ رنگدانه‌های فتوسنتزی
۸۲	-۱-۲-۳-۱-۴ محتوای کلروفیل برگ (عدد SPAD)
۸۳	-۲-۲-۳-۱-۴ کلروفیل <i>a</i>
۸۵	-۳-۲-۳-۱-۴ کلروفیل <i>b</i>
۸۶	-۴-۲-۳-۱-۴ کلروفیل <i>a+b</i>
۸۷	-۵-۲-۳-۱-۴ کارتنوئید
۸۸	-۳-۳-۱-۴ نشت الکترولیت و محتوای نسبی آب برگ
۸۸	-۱-۳-۳-۱-۴ نشت الکترولیت
۸۹	-۲-۳-۳-۱-۴ محتوای نسبی آب برگ
۹۱	-۴-۱-۴ صفات بیوشیمیایی
۹۱	-۱-۴-۱-۴ فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی
۹۱	-۱-۱-۴-۱-۴ آنزیم سوپراکسید دیسموتاز

۹۳ آنزیم کاتالاز	۱-۴-۱-۲- آنزیم کاتالاز
۹۴ آنزیم پراکسیداز	۱-۴-۱-۳- آنزیم پراکسیداز
۹۵ آنزیم آسکوربات پراکسیداز	۱-۴-۱-۴- آنزیم آسکوربات پراکسیداز
۹۶ سایر صفات بیوشیمیایی	۱-۴-۲- سایر صفات بیوشیمیایی
۹۷ پراکسیداسیون لیپیدی غشا	۱-۴-۲-۱- پراکسیداسیون لیپیدی غشا
۹۸ پراکسید هیدروژن	۱-۴-۲-۲- پراکسید هیدروژن
۹۹ محتوای پرولین	۱-۴-۲-۳- محتوای پرولین
۱۰۱ قند محلول	۱-۴-۲-۴- قند محلول
۱۰۲ NPQ و Fv/Fm، مالون دی آلدئید،	۱-۴-۵- رابطه بین وزن خشک شاخساره با نشت الکترولیت، مالون دی آلدئید، NPQ و Fv/Fm
۱۰۴ بخش مزرعهای	۲-۴-۲- بخش مزرعهای
۱۰۴ صفات رویشی	۲-۴-۱- صفات رویشی
۱۰۴ ارتفاع بوته	۲-۴-۱-۱- ارتفاع بوته
۱۰۵ سطح برگ	۲-۴-۱-۲- سطح برگ
۱۰۶ وزن تر برگ، ساقه و شاخساره	۲-۴-۱-۳- وزن تر برگ، ساقه و شاخساره
۱۰۸ وزن خشک برگ	۲-۴-۱-۴- وزن خشک برگ
۱۰۹ وزن خشک ساقه	۲-۴-۱-۵- وزن خشک ساقه
۱۱۰ وزن خشک شاخساره	۲-۴-۱-۶- وزن خشک شاخساره
۱۱۱ صفات فیزیولوژیک	۲-۴-۲- صفات فیزیولوژیک
۱۱۱ کلروفیل a	۲-۴-۲-۱- فلورسانس کلروفیل a
۱۱۷ رنگدانه های فتوسنتزی	۲-۴-۲-۲- رنگدانه های فتوسنتزی
۱۱۷ محتوای کلروفیل برگ (SPAD)	۲-۴-۲-۲-۱- محتوای کلروفیل برگ (SPAD)
۱۱۸ کلروفیل a	۲-۴-۲-۲-۲- کلروفیل a
۱۱۹ کلروفیل b	۲-۴-۲-۲-۳- کلروفیل b
۱۲۰ کلروفیل a+b	۲-۴-۲-۲-۴- کلروفیل a+b
۱۲۱ کارتنوئید	۲-۴-۲-۲-۵- کارتنوئید
۱۲۲ نشت الکترولیت و محتوای نسبی آب برگ	۲-۴-۲-۳- نشت الکترولیت و محتوای نسبی آب برگ
۱۲۲ نشت الکترولیت	۲-۴-۲-۳-۱- نشت الکترولیت
۱۲۴ محتوای نسبی آب برگ	۲-۴-۲-۳-۲- محتوای نسبی آب برگ
۱۲۵ صفات بیوشیمیایی	۲-۴-۳- صفات بیوشیمیایی
۱۲۵ فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی	۲-۴-۳-۱- فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی
۱۲۵ آنزیم سوپراکسید دیسموتاز	۲-۴-۳-۱-۱- آنزیم سوپراکسید دیسموتاز
۱۲۶ کاتالاز	۲-۴-۳-۱-۲- کاتالاز
۱۲۷ فعالیت آنزیم پراکسیداز	۲-۴-۳-۱-۳- فعالیت آنزیم پراکسیداز
۱۲۸ فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز	۲-۴-۳-۱-۴- فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز

۱۳۰ سایر صفات بیوشیمیایی	۲-۳-۲-۴
۱۳۱ پراکسیداسیون لیپیدی غشا	۱-۲-۳-۲-۴
۱۳۲ پراکسید هیدروژن	۲-۲-۳-۲-۴
۱۳۳ پرولین	۳-۲-۳-۲-۴
۱۳۴ قند محلول	۴-۲-۳-۲-۴
۱۳۵ گلیکوزیدهای استویوزید و ربادیوزید A	۴-۲-۴
۱۳۸ رابطه بین وزن خشک شاخساره با نشت الکترولیت، مالون دی آلدئید، Fv/Fm و NPQ	۵-۲-۴
۱۳۹ نتیجه گیری کلی	۳-۴
۱۴۰ پیشنهادات	۴-۴
۱۴۱ پیوست‌ها	
۱۴۸ منابع	

فهرست جدول‌ها

- جدول ۱-۳-۱- خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک مورد استفاده در آزمایش ۴۶
- جدول ۲-۳-۲- تجزیه شیمیایی آب دریا ۴۹
- جدول ۳-۳-۳- مؤلفه‌های بیوفیزیکی اندازه‌گیری شده فلورسانس کلروفیل (اسکرپیر و همکاران، ۱۹۹۶، جنتی و همکاران، ۱۹۸۹، کلاچی و همکاران، ۲۰۱۱ و کلوگرامر و اسکرپیر، ۲۰۰۸) ۵۳
- جدول ۱-۴-۱- مقایسه میانگین برهمکنش تنش شوری، قارچ و محلول پاشی پلی‌آمین اسپرمیدین در سطح برگ (Cm^2) گیاه استویا ۶۸
- جدول ۲-۴-۲- مقایسه میانگین برهمکنش تنش شوری و همزیستی قارچی بر مؤلفه‌های فلورسانس کلروفیل در برگ گیاه استویا ۷۷
- جدول ۳-۴-۳- مقایسه میانگین برهمکنش همزیستی قارچی و محلول پاشی پلی‌آمین اسپرمیدین بر مؤلفه‌های فلورسانس کلروفیل در برگ گیاه استویا ۸۰
- جدول ۴-۴-۴- مقایسه میانگین برهمکنش تنش شوری، همزیستی قارچی و محلول پاشی پلی‌آمین اسپرمیدین بر کارایی کوانتومی غیرفتوشیمیایی تنظیم نشده $[Y(\text{NO})]$ گیاه استویا ۸۱
- جدول ۴-۴-۵- مقایسه میانگین برهمکنش تنش شوری، قارچ و محلول پاشی پلی‌آمین اسپرمیدین بر غلظت کلروفیل b ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) در برگ گیاه استویا ۸۶
- جدول ۴-۴-۶- مقایسه میانگین برهمکنش تنش شوری، قارچ اندوفیت و پلی‌آمین اسپرمیدین بر غلظت کلروفیل $a+b$ ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) در برگ گیاه استویا ۸۷
- جدول ۴-۴-۷- مقایسه میانگین برهمکنش تنش شوری، همزیستی قارچی و محلول پاشی پلی‌آمین اسپرمیدین بر فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز گیاه استویا ۹۲
- جدول ۴-۴-۸- مقایسه میانگین برهمکنش تنش شوری، همزیستی قارچی و محلول پاشی پلی‌آمین اسپرمیدین بر فعالیت آنزیم پراکسیداز برگ گیاه استویا ۹۵
- جدول ۴-۴-۹- مقایسه میانگین برهمکنش تنش شوری، همزیستی قارچی و محلول پاشی پلی‌آمین اسپرمیدین بر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز برگ گیاه استویا ۹۶
- جدول ۴-۴-۱۰- مقایسه میانگین برهمکنش تنش شوری، همزیستی قارچی و محلول پاشی پلی‌آمین اسپرمیدین بر سطح برگ گیاه استویا (cm^2) ۱۰۶
- جدول ۴-۴-۱۱- مقایسه میانگین برهمکنش تنش شوری و همزیستی قارچی بر مؤلفه‌های فلورسانس کلروفیل در برگ گیاه استویا ۱۱۴
- جدول ۴-۴-۱۲- مقایسه میانگین برهمکنش تنش شوری، همزیستی قارچی و محلول پاشی پلی‌آمین اسپرمیدین بر غلظت کلروفیل b ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) ۱۲۰
- جدول ۴-۴-۱۳- مقایسه میانگین برهمکنش تنش شوری، همزیستی قارچی و محلول پاشی پلی‌آمین اسپرمیدین بر فعالیت آنزیم کاتالاز ($\text{unit mg protein}^{-1}$) برگ گیاه استویا ۱۲۷
- جدول ۴-۴-۱۴- مقایسه میانگین برهمکنش تنش شوری، همزیستی قارچی و محلول پاشی پلی‌آمین اسپرمیدین بر محتوای مالون دی‌آلدئید (nmol. g FW^{-1}) ۱۳۲

جدول ۴-۱۵- مقایسه میانگین برهمکنش تنش شوری، همزیستی قارچی و محلول پاشی پلی آمین اسپرمیدین بر غلظت استوبویزید (درصد) در برگ گیاه استویا.....	۱۳۷
جدول پیوست ۱- میانگین مربعات اثر شوری، همزیستی قارچی و اسپرمیدین بر درصد کلونیزاسیون ریشه گیاه استویا (آزمایش گلخانه‌ای).....	۱۴۱
جدول پیوست ۲- میانگین مربعات اثر شوری، همزیستی قارچی و پلی آمین اسپرمیدین بر صفات رویشی گیاه دارویی استویا (آزمایش گلخانه‌ای).....	۱۴۱
جدول پیوست ۳- میانگین مربعات اثر شوری، قارچ اندوفیت و پلی آمین اسپرمیدین بر پارامترهای فلورسانس کلروفیل در گیاه استویا (آزمایش گلخانه‌ای).....	۱۴۲
جدول پیوست ۴- میانگین مربعات اثر تیمارهای مورد بررسی بر رنگیزه‌های فتوسنتزی در برگ گیاه استویا (آزمایش گلخانه‌ای).....	۱۴۲
جدول پیوست ۵- میانگین مربعات اثر شوری، همزیستی قارچی و اسپرمیدین بر نشت الکترولیت و محتوای نسبی آب برگ گیاه استویا (آزمایش گلخانه‌ای).....	۱۴۳
جدول پیوست ۶- میانگین مربعات اثر شوری، همزیستی قارچی و پلی آمین اسپرمیدین بر فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی در استویا (آزمایش گلخانه‌ای).....	۱۴۳
جدول پیوست ۷- میانگین مربعات اثر شوری، همزیستی قارچی و اسپرمیدین بر برخی صفات فیزیولوژیک گیاه استویا (آزمایش گلخانه‌ای).....	۱۴۴
جدول پیوست ۸- میانگین مربعات اثر شوری، همزیستی قارچی و پلی آمین اسپرمیدین بر صفات رویشی گیاه دارویی استویا (آزمایش مزرعه‌ای).....	۱۴۴
جدول پیوست ۹- میانگین مربعات اثر شوری، قارچ اندوفیت و پلی آمین اسپرمیدین بر پارامترهای فلورسانس کلروفیل در گیاه استویا (آزمایش مزرعه‌ای).....	۱۴۵
جدول پیوست ۱۰- میانگین مربعات اثر تیمارهای مورد بررسی بر رنگیزه‌های فتوسنتزی در برگ گیاه استویا (آزمایش مزرعه‌ای).....	۱۴۵
جدول پیوست ۱۱- میانگین مربعات اثر شوری، همزیستی قارچی و اسپرمیدین بر برخی صفات فیزیولوژیک گیاه استویا (آزمایش مزرعه‌ای).....	۱۴۶
جدول پیوست ۱۲- میانگین مربعات اثر شوری، همزیستی قارچی و محلول پاشی اسپرمیدین بر فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی، پراکسیداسیون لیپیدی، پراکسید هیدروژن در استویا (آزمایش مزرعه‌ای).....	۱۴۶
جدول پیوست ۱۳- میانگین مربعات اثر شوری، همزیستی قارچی و اسپرمیدین بر برخی صفات فیزیولوژیک گیاه استویا (آزمایش مزرعه‌ای).....	۱۴۷
جدول پیوست ۱۴- میانگین مربعات اثر شوری، همزیستی قارچی و اسپرمیدین بر گللیکوزیدهای استوبویزید و ربادیوزید A در برگ (درصد) گیاه استویا (آزمایش مزرعه‌ای).....	۱۴۷

فهرست شکل‌ها

- شکل ۱-۲-۱- شمای کلی از ساختار و همزیستی قارچ‌های شبه‌میکوریزا (والر و همکاران، ۲۰۰۶)..... ۱۳
- شکل ۲-۲-۲- مسیر های احیای اکسیژن ۲۷
- شکل ۳-۲-۳- مدل کلی نحوه عمل آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان ۳۰
- شکل ۳-۱-۳- قارچ‌های *P. indica* (الف) و *T. virens* (ب) کشت شده در محیط کشت مایع جهت استفاده در آزمایش و آماده سازی سوسپانسیون قارچی جهت تلقیح با نشاهای گیاه دارویی استویا (ج)..... ۴۸
- شکل ۳-۲-۳- دستگاه فلورومتر (PAM-2500, Walz, Germany) (الف) و اندازه‌گیری فلورسانس کلروفیل a در برگ‌های گیاه استویا (ب) و (ج)..... ۵۳
- شکل ۳-۳-۳- اندازه‌گیری رنگیزه‌های فتوسنتزی ۵۴
- شکل ۴-۱-۴- قارچ‌های اندوفیت *P. indica* (الف) و *T. virens* (ب) در ریشه گیاه استویا به ترتیب با بزرگنمایی ۱۰۰ و ۴۰۰ برابر ۶۴
- شکل ۴-۲- برهمکنش شوری و قارچ‌های اندوفیت بر میزان کلونیزاسیون ریشه گیاه استویا. *Pi*: *P. indica* و *Trich*: *T. virens* در هر شکل میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند. ۶۶
- شکل ۴-۳- اثر ساده همزیستی قارچی (الف) و برهمکنش شوری و پلی‌آمین اسپرمیدین (ب) بر ارتفاع بوته استویا. *Pi*: *P. indica* و *Trich*: *T. virens* در هر شکل میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند. ۶۷
- شکل ۴-۴- اثر ساده پلی‌آمین اسپرمیدین (الف) و برهمکنش شوری و همزیستی قارچی (ب) بر وزن تر برگ، اثر ساده پلی‌آمین اسپرمیدین (ج) و برهمکنش شوری و همزیستی قارچی (د) بر وزن تر ساقه و اثر ساده پلی‌آمین اسپرمیدین (ه) و برهمکنش شوری و همزیستی قارچی (و) بر وزن تر شاخساره گیاه استویا. *Pi*: *P. indica* و *Trich*: *T. virens* در هر شکل میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند. ۷۰
- شکل ۴-۵- برهمکنش شوری و همزیستی قارچی (الف) و شوری و پلی‌آمین اسپرمیدین (ب) بر وزن خشک برگ. *Pi*: *P. indica* و *Trich*: *T. virens* در هر شکل میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند. ۷۲
- شکل ۴-۶- اثر ساده پلی‌آمین اسپرمیدین (الف) و برهمکنش شوری و همزیستی قارچی (ب) بر وزن خشک برگ. *Pi*: *P. indica* و *Trich*: *T. virens* در هر شکل میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند. ۷۲
- شکل ۴-۷- برهمکنش شوری و همزیستی قارچی بر وزن خشک شاخساره گیاه استویا. *Pi*: *P. indica* و *Trich*: *T. virens* در هر شکل میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند. ۷۳
- شکل ۴-۸- اثر ساده تنش شوری (الف) و همزیستی قارچی (ب) بر فلورسانس حداقل (*Fo*) در برگ گیاه استویا. *Pi*: *P. indica* و *Trich*: *T. virens* در هر شکل میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند. ۷۵
- شکل ۴-۹- اثر همزیستی قارچی بر تغییرات مکمل پارامترهای *Y(II)*، *Y(NPQ)* و *Y(NO)* در سطوح شوری صفر (الف)، ۶ (ب) و ۱۲ (ج) دسی زیمنس بر متر. *Pi*: *P. indica* و *Trich*: *T. virens* ۷۸

- شکل ۴-۱۰- برهمکنش شوری و همزیستی قارچی بر خاموشی غیرفتوشیمیایی (NPQ) برگ گیاه استویا. *P. indica* : Pi و *Trich: T. virens*. در هر شکل میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند. ۷۹.....
- شکل ۴-۱۱- برهمکنش تنش شوری و همزیستی قارچی (الف) و تنش شوری و اسپرمیدین (ب) بر محتوای کلروفیل برگ گیاه استویا. *P. indica* : Pi و *Trich: T. virens*. در هر شکل میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند. ۸۳.....
- شکل ۴-۱۲- برهمکنش تنش شوری و همزیستی قارچی (الف)، شوری و اسپرمیدین (ب) و برهمکنش همزیستی قارچ و اسپرمیدین (ج) بر غلظت کلروفیل a در برگ گیاه استویا. *P. indica* : Pi و *Trich: T. virens*. در هر شکل میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند. ۸۵.....
- شکل ۴-۱۳- اثر ساده تنش شوری (الف) و پلی‌آمین اسپرمیدین (ب) بر غلظت کارتنوئید در برگ گیاه استویا. در هر شکل میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند. ۸۸.....
- شکل ۴-۱۴- اثر ساده پلی‌آمین اسپرمیدین (الف) و برهمکنش شوری و همزیستی قارچی (ب) بر نشت الکترولیت در برگ گیاه استویا. *P. indica* : Pi و *Trich: T. virens*. در هر شکل میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند. ۸۹.....
- شکل ۴-۱۵- برهمکنش شوری و همزیستی قارچی (الف) و همزیستی قارچی و اسپرمیدین (ب) بر محتوای نسبی آب برگ استویا. *P. indica* : Pi و *Trich: T. virens*. در هر شکل میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند. ۹۰.....
- شکل ۴-۱۶- برهمکنش شوری و همزیستی قارچی (الف)، همزیستی قارچی و اسپرمیدین (ب) و شوری و اسپرمیدین (ج) بر فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانی کاتالاز. *P. indica* : Pi و *Trich: T. virens*. در هر شکل میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند. ۹۴.....
- شکل ۴-۱۷- برهمکنش شوری و همزیستی قارچی (الف) شوری و اسپرمیدین (ب) بر میزان مالون دی‌آلدهید در برگ گیاه استویا. *P. indica* : Pi و *Trich: T. virens*. در هر شکل میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند. ۹۸.....
- شکل ۴-۱۸- برهمکنش شوری و همزیستی قارچی (الف) شوری و اسپرمیدین (ب) بر محتوای پراکسید هیدروژن در برگ گیاه استویا. *P. indica* : Pi و *Trich: T. virens*. در هر شکل میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند. ۹۹.....
- شکل ۴-۱۹- اثر ساده پلی‌آمین اسپرمیدین (الف) و برهمکنش شوری و همزیستی قارچی (ب) بر محتوای پرولین در برگ گیاه استویا. *P. indica* : Pi و *Trich: T. virens*. در هر شکل میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند. ۱۰۰.....
- شکل ۴-۲۰- برهمکنش شوری و پلی‌آمین اسپرمیدین (الف) و همزیستی قارچی و اسپرمیدین (ب) بر محتوای قند محلول در برگ گیاه استویا. *P. indica* : Pi و *Trich: T. virens*. در هر شکل میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند. ۱۰۲.....
- شکل ۴-۲۱- رابطه بین وزن خشک شاخساره با نشت الکترولیت (الف)، محتوای مالون دی‌آلدهید (ب)، *Fv/Fm* (ج) و NPQ (د) در گیاه استویا. ۱۰۳.....

- شکل ۴-۲۲- اثر ساده همزیستی قارچی بر ارتفاع بوته گیاه استویا. در هر شکل میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند. ۱۰۵.....
- شکل ۴-۲۳- برهمکنش شوری و همزیستی قارچی بر وزن تر برگ (الف)، اثر ساده شوری (ب) و اثر ساده همزیستی قارچی (ج) بر وزن تر ساقه، اثر ساده پلی‌آمین اسپرمیدین (د) و برهمکنش شوری و همزیستی قارچی (ه) بر وزن تر شاخساره گیاه استویا. در هر شکل میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند. ۱۰۸.....
- شکل ۴-۲۴- اثر ساده پلی‌آمین اسپرمیدین (الف) و برهمکنش شوری و همزیستی قارچی (ب) بر وزن خشک برگ گیاه استویا. در هر شکل میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند. ۱۰۹.....
- شکل ۴-۲۵- اثر ساده همزیستی قارچی بر وزن خشک ساقه گیاه استویا. در هر شکل میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند. ۱۱۰.....
- شکل ۴-۲۶- اثر ساده همزیستی قارچی بر وزن خشک شاخساره گیاه استویا. در هر شکل میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند. ۱۱۱.....
- شکل ۴-۲۷- اثر ساده تنش شوری (الف) و همزیستی قارچی (ب) بر فلورسانس حداقل (Fo) در برگ گیاه استویا. در هر شکل میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند. ۱۱۲.....
- شکل ۴-۲۸- اثر ساده پلی‌آمین اسپرمیدین بر فلورسانس متغیر (Fv) (الف)، حداکثر کارایی کوانتومی فتوسیستم II (Fv/Fm) II (ب) و کارایی کوانتومی غیرفتوشیمیایی تنظیم نشده فتوسیستم II [Y(NO)] (ج). در هر شکل میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند. ۱۱۳.....
- شکل ۴-۲۹- اثر همزیستی قارچی بر تغییرات مکمل پارامترهای Y(II)، Y(NPQ) و Y(NO) در سطوح مختلف شوری. ۱۱۵.....
- شکل ۴-۳۰- برهمکنش همزیستی قارچی و پلی‌آمین اسپرمیدین بر فلورسانس حداکثر (Fm) در برگ استویا. در هر شکل میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند. ۱۱۶.....
- شکل ۴-۳۱- برهمکنش همزیستی قارچ و اسپرمیدین (الف) و شوری و اسپرمیدین بر خاموشی غیرفتوشیمیایی (NPQ) در برگ استویا. در هر شکل میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند. ۱۱۷.....
- شکل ۴-۳۲- برهمکنش شوری و همزیستی قارچی بر محتوای کلروفیل برگ (SPAD) استویا. در هر شکل، میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند. ۱۱۸.....
- شکل ۴-۳۳- اثر ساده شوری (الف) و همزیستی قارچی (ب) بر محتوای کلروفیل a در برگ گیاه استویا. در هر شکل میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند. ۱۱۹.....
- شکل ۴-۳۴- اثر ساده شوری (الف) و همزیستی قارچی (ب) و پلی‌آمین اسپرمیدین (ج) بر محتوای کلروفیل a+b در برگ گیاه استویا. در هر شکل میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند. ۱۲۱.....
- شکل ۴-۳۵- اثر ساده شوری (الف) و همزیستی قارچی بر محتوای کارتنوئید در برگ گیاه استویا. در هر شکل میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند. ۱۲۲.....

- شکل ۴-۳۶- اثر ساده پلی‌آمین اسپرمیدین (الف) و برهمکنش شوری و همزیستی قارچی (ب) بر نشت الکتروولت در گیاه استویا. در هر شکل میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند. ۱۲۳.....
- شکل ۴-۳۷- اثر ساده پلی‌آمین اسپرمیدین (الف) و برهمکنش شوری و همزیستی قارچی (ب) بر محتوای نسبی آب برگ در گیاه استویا. در هر شکل میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند. ۱۲۵.....
- شکل ۴-۳۸- برهمکنش شوری و همزیستی قارچی (الف)، شوری و اسپرمیدین (ب) بر فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز. در هر شکل میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند. ۱۲۶.....
- شکل ۴-۳۹- اثر ساده پلی‌آمین اسپرمیدین (الف) و برهمکنش شوری و همزیستی قارچی (ب) بر فعالیت آنزیم پراکسیداز در برگ گیاه استویا. ۱۲۸.....
- شکل ۴-۴۰- اثر ساده پلی‌آمین اسپرمیدین (الف) و برهمکنش شوری و همزیستی قارچی (ب) بر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز. در هر شکل میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند. ۱۲۹.....
- شکل ۴-۴۱- اثر ساده پلی‌آمین اسپرمیدین (الف) و برهمکنش شوری و همزیستی قارچی (ب) بر محتوای پراکسید هیدروژن. در هر شکل میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند. ۱۳۳.....
- شکل ۴-۴۲- اثر ساده پلی‌آمین اسپرمیدین (الف) و برهمکنش شوری و همزیستی قارچی (ب) بر محتوای پرولین در برگ گیاه استویا. در هر شکل میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند. ۱۳۴.....
- شکل ۴-۴۳- اثر ساده تنش شوری (الف) و برهمکنش همزیستی قارچی و اسپرمیدین (ب) بر محتوای قند محلول در برگ استویا. در هر شکل میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند. ۱۳۵.....
- شکل ۴-۴۴- رابطه بین وزن خشک شاخساره با نشت الکتروولت (الف)، محتوای مالون دی‌آلدئید (ب)، Fv/Fm (ج) و NPQ (د) در گیاه استویا. ۱۳۹.....

فصل اول: مقدمه

۱-۱- ضرورت انجام تحقیق

امروزه در عصر فناوری‌های نوین و پیشرفت چشمگیر علوم و فنون، شاهد توسعه فراگیر در زمینه بهره‌مندی از طب سنتی و نیز فرآورده‌های گیاهی و طبیعی هستیم. از سوی دیگر سازمان بهداشت جهانی به طور مکرر بر رویکرد جامع به طب سنتی و گیاهان دارویی و نیز ضرورت کاربرد علمی و اقتصادی آن تأکید دارد. این رویکرد یکی از مباحث مهم جهانی در چند دهه اخیر به‌ویژه در کشورهای در حال توسعه به‌شمار می‌آید (امیدبگی و همکاران، ۱۳۸۸؛ حضرتی و همکاران، ۱۳۹۴).

با توجه به پیشینه‌ی استفاده از گیاهان دارویی، افزایش تقاضای جهانی در خصوص استفاده از این گیاهان در درمان بیماری‌ها به‌دلیل تغییر نگرش انسان نسبت به داروهای شیمیایی، نیاز مبرم صنایع داروسازی به مواد اولیه، عوارض جانبی و ناخواسته ناشی از مصرف داروهای شیمیایی و ناتوانی در تولید تعدادی از داروهای حیاتی به شکل شیمیایی و همچنین، اهمیت روزافزون مواد مؤثره‌ی گیاهان دارویی در صنایع غذایی، آرایشی و بهداشتی سبب شده پژوهش‌های بسیاری از محققان علوم گیاهی به جنبه‌های مختلف تولید، مصرف و کاربرد این گیاهان معطوف شود. خوشبختانه در سال‌های اخیر، تلاش‌های فراوانی برای شناخت همه‌جانبه گیاهان دارویی از نظر تنوع و پراکنش گیاهان در ایران، شرایط بوم‌شناسی، استفاده‌های دارویی، استخراج و شناسایی مواد مؤثره و بررسی شیوه‌های نوین در افزایش عملکرد آن‌ها انجام شده و نتایج جالب توجهی نیز، به‌دست آمده است (امیدبگی و همکاران، ۱۳۸۴).

در این میان، گیاه دارویی استویا با نام علمی *Stevia rebaudiana* Bertoni گیاهی بوته‌ای و چندساله متعلق به خانواده کاسنی (Asteraceae) بوده که خاستگاه آن مناطق شمالی آمریکای جنوبی، پاراگوئه و برزیل می‌باشد (گویال، ۲۰۱۰). برگ‌های استویا دارای گلیکوزیدهای دی‌ترین با عنوان گلیکوزیدهای استویول از جمله استویوزید و ربادیوزید است که حدود ۱۰۰-۳۰۰ بار از قند ساکارز شیرین‌ترند. گلیکوزیدهای موجود در این گیاه جذب بدن نمی‌شوند و فاقد کالری هستند (تاوانی و آنجلینی، ۲۰۱۳)، بنابراین، این گیاه برای بیماران دیابتی و افرادی که از اضافه وزن و چاقی رنج می‌برند، مطلوب است.

تنش‌های محیطی زنده و غیرزنده از عوامل محدودکننده تولید گیاهان زراعی می‌باشند که با اختلال در متابولیسم طبیعی گیاه، رشد را محدود و در نهایت محصول را کاهش می‌دهند (جمیل و همکاران، ۲۰۱۲؛ شائو و همکاران، ۲۰۰۸). در بین تنش‌های غیرزنده، تنش شوری در سطح جهان خسارت‌های گسترده‌ای به گیاهان وارد نموده و از مشکلات عمده در بخش کشاورزی می‌باشد (راشد و همکاران، ۲۰۱۴). محیط‌های شور با دو ویژگی اصلی پتانسیل اسمزی بالا و غلظت بالای املاح مشخص می‌شوند که به صورت بالقوه برای بیشتر گیاهان زراعی سمی هستند (قرینه و همکاران، ۲۰۰۹). آب‌های شور یا آب‌های با کیفیت پایین برای آبیاری، موجب افزایش شوری خاک می‌شود که این مسئله تولید محصول را از طریق کاهش رشد گیاهان، برهم خوردن تعادل در جذب آب و عناصر ضروری و ایجاد تنش اکسیداتیو تحت تأثیر قرار می‌دهد. کمبود منابع آب شیرین و استفاده از روش‌هایی که موجب تخفیف اثر تنش شوری شده و تا حد ممکن از افت عملکرد گیاهان جلوگیری نماید، یکی از روش‌های مبارزه با این معضل می‌باشد. زیست‌فناوری‌های نوین مبنی بر کاربرد ریزجانداران مفید خاکزی در برقراری روابط همزیستی با گیاهان، نقش مؤثری بر عهده دارند که سبب بهبود در رشد، فرآیندهای فیزیولوژیک و بیوشیمیایی گیاهان می‌گردد (اولمولر و همکاران، ۲۰۰۹). در میان راهکارهای زیستی برای افزایش مقاومت گیاهان در شرایط شور، نقش قارچ‌ها برجسته است، این قارچ‌ها از مهم‌ترین ریزجانداران خاک محسوب می‌شوند که با ایجاد تغییرات فیزیولوژیک، ژنتیکی و بوم‌شناختی در گیاه میزبان، عملکرد آنها را در واحد سطح افزایش داده، همچنین در تحمل به تنش، گیاه‌پالایی، سلامت مواد غذایی و تولید پایدار محصولات کشاورزی نقش داشته و امکان توسعه کشت گیاهان را در خاک‌های شور، خشک یا اقلیم‌هایی با تنش‌های زنده و غیرزنده فراهم می‌آورند (هرموسا و همکاران، ۲۰۱۲). از جمله این ریزجانداران می‌توان به دو قارچ *Trichoderma virens* و *Piriformospora indica* اشاره کرد (وارما و همکاران، ۲۰۱۲؛ سان و همکاران، ۲۰۱۰). قارچ *P. indica* جزء قارچ‌های خانواده *Sebacinaceae* بوده (وارما و همکاران، ۱۹۹۹) که رابطه‌ی همزیستی آن با گیاهان مختلف در بهبود رشد گیاه و افزایش تحمل گیاه به تنش‌های زیستی و غیرزیستی از جمله شوری، خشکی و عوامل بیماری‌زا گزارش شده است (یعقوبیان و همکاران، ۲۰۱۴). همچنین قارچ اندوفیت *T. virens* از طریق کنترل زیستی

در برابر عوامل بیماریزای خاکزی با تولید آنتی‌بیوتیک، افزایش جذب عناصر غذایی به دلیل حلالیت عناصر، ایجاد مقاومت القایی در برابر تنش‌های محیطی و القای رشد گیاه از طریق ترشح هورمون‌های رشد و تولید اتیلن، منجر به افزایش مقاومت به تنش‌ها و بهبود رشد گیاه می‌شود (ولازکوز، ۲۰۱۱).

از سوی دیگر، در سال‌های اخیر نقش پلی‌آمین‌ها در افزایش تحمل گیاهان به تنش‌ها از جمله شوری مورد توجه قرار گرفته است. پلی‌آمین‌ها هیدروکربن‌های آلفاتیک با وزن مولکولی کم می‌باشند که در طیف وسیعی از فرآیندهای فیزیولوژیک از جمله تثبیت غشاء، فعال کردن آنزیم‌ها، تقسیم سلولی و فرآیندهای درگیر در رشد و نمو سلول‌ها (کور- آهوانی، ۲۰۰۳) جنین‌زایی، جوانه‌زنی بذر و واکنش به تنش‌ها نقش دارند (باچراخ، ۲۰۰۵). کاربرد خارجی پلی‌آمین‌ها می‌تواند فرآیندهای فیزیولوژیک، مورفولوژیک و بیوشیمیایی گیاهان را تحت تأثیر قرار داده و به‌عنوان تنظیم‌کننده رشد مورد استفاده قرار گیرد (کور- آهوانی، ۲۰۰۳). تعدیل تنش‌ها توسط پلی‌آمین‌ها را می‌توان به‌دلیل نقش آن‌ها در تنظیم اسمزی، پایداری غشا و حذف رادیکال‌های فعال و جلوگیری از تجمع این ترکیبات مضر دانست که باعث ایجاد تنش در سلول‌ها می‌شوند (لی و همکاران، ۲۰۰۷؛ خان و همکاران، ۲۰۰۷). همچنین پلی‌آمین‌ها از نسخه‌برداری تولید و فعالیت آنزیم ACC سینتتاز جلوگیری کرده و منجر به کاهش سطوح ACC اکسیداز و کاهش تولید اتیلن شده و به‌دنبال آن باعث افزایش مقاومت گیاهان در شرایط تنش‌های محیطی می‌گردند (لی و همکاران، ۱۹۹۷). اسپرمیدین یکی از پلی‌آمین‌های رایج در همه سلول‌های گیاهی است که از طریق آنزیم اسپرمیدین سنتاز (SPDS) و با افزودن یک نیمه آمینو پروپیل به پلی‌آمین پوترسین حاصل می‌شود (لئو و همکاران، ۲۰۰۷).

براساس آنچه گفته شد و با توجه به اینکه کشور ما ایران از نظر اقلیمی در منطقه خشک و نیمه خشک دنیا قرار دارد و شوری خاک و آب آبیاری یکی از مشکلات عمده پیش روی زراعت کشور است و از سوی دیگر، به دلیل اهمیت روز افزون شیوه‌های جدید دوستدار طبیعت در به‌حداقل رساندن تأثیرات مخرب تنش‌های محیطی بر گیاهان و بالا بردن تولید محصولات کشاورزی، همچنین افزایش تقاضای بازار جهانی

برای فرآورده‌های بی‌شمار گیاهان دارویی در صنایع مختلفی نظیر داروسازی، غذایی و آرایشی بهداشتی نیاز به مطالعات در این زمینه و کاربردی شدن یافته‌های پژوهش‌های علمی، بیش از همیشه احساس می‌شود.

۲-۱- فرضیه‌های پژوهش

- ۱) تلقیح قارچ‌های *P. indica* و *T. virens* در افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و تحمل به تنش شوری در گیاه استویا مؤثر خواهد بود.
- ۲) کاربرد اسپرمیدین با بهبود فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی باعث افزایش تحمل به تنش شوری گیاه دارویی استویا خواهد شد.
- ۳) برهمکنش مثبت و معنی‌داری بین قارچ‌های *P. indica* و *T. virens* با پلی‌آمین اسپرمیدین از نظر تحمل به شوری در استویا وجود دارد.

۳-۱- اهداف پژوهش

- ۱) تعیین اثر قارچ‌های اندوفیت *P. indica* و *T. virens* در تحمل به تنش شوری در گیاه دارویی استویا.
- ۲) بررسی کاربرد پلی‌آمین اگزوزن (اسپرمیدین) در تحمل به تنش شوری در گیاه دارویی استویا.
- ۳) ارزیابی برهمکنش قارچ‌های *P. indica* و *T. virens* همراه با پلی‌آمین اسپرمیدین بر سازوکارهای آنتی‌اکسیدانی مؤثر در تحمل تنش شوری گیاه استویا.

فصل دوم: بررسی منابع

۲-۱- گیاهشناسی استویا

استویا (*Stevia rebaudiana* Bertoni) گیاهی است علفی، چند ساله و درختچه‌ای از خانواده کاسنی‌ها (Astraceae) و جنس *Stevia*، با عدد پایه‌ی کروموزومی $n=11$ ، که گیاه برگ‌عسلی، گیاه شیرین و علف شیرین نیز نامیده می‌شود. ارتفاع گیاه استویا بسته به شرایط اقلیمی ۸۰-۶۰ سانتی‌متر متغیر بوده و طول عمرش ۳-۵ سال می‌باشد. ساقه‌ی گیاه ترد، شکننده و کرکدار، برگ‌ها بیضوی، دندانه‌دار، نیزه‌ای و متقابل هستند. همچنین استویا دارای گل‌های سفید کوچک به اندازه‌ی ۷-۱۵ میلی‌متر می‌باشد و سیستم ریشه‌ای گیاه گسترده است (کوجار و همکاران، ۲۰۱۰). ترکیب وزن خشک استویا بدین صورت گزارش شده است: پروتئین حدود ۶/۲ درصد، لیپید حدود ۵/۶ درصد، کربوهیدرات‌های کلی حدود ۵۲/۸ درصد، استویوزید حدود ۱۵ درصد و نیز حاوی حدود ۴۲ درصد مواد محلول در آب می‌باشد (کینگورن، ۲۰۰۲؛ احمد و همکاران، ۲۰۰۷). در قرن ۱۶ با شناخت ارزش پزشکی این گیاه و سپس استفاده از آن در چای، کشت آن به‌طور وسیعی در سراسر اروپا و آسیا رایج شد. گرچه این گیاه در بسیاری از بخش‌های برزیل، پاراگوئه، اروگوئه، آمریکای مرکزی، فلسطین، تایلند و چین رشد می‌کند، اما هم‌اکنون کشت آن در تمام دنیا رواج دارد (کاردلو و همکاران، ۱۹۹۹).

۲-۱-۱- ویژگی‌های گیاه استویا

ویژگی جالب توجه این گیاه شیرینی زیاد برگ‌ها و عصاره آبی آن است که حدوداً ۳۰۰-۲۰۰ بار شیرین‌تر از ساکارز است. ماده شیرین‌کننده استویا به سبب فاقد کالری بودن برای افرادی که از دیابت، هیپوگلیسمی (افت قند خون)، فشارخون بالا، فنیل‌کتون‌وری (نوعی اختلال متابولیک ارثی)، ناراحتی‌های قلبی، چاقی و عفونت‌های قارچی مزمن رنج می‌برند، یک شیرین‌کننده‌ی مطلوب است (میشرا و همکاران، ۲۰۱۰). قند استویا به‌دلیل نداشتن اثرات سوء مصرف قندهای مصنوعی می‌تواند جایگزین شیرین‌کننده‌های مصنوعی همچون آسپارتام، سدیم‌ساکارین و سیکلامات شود، بدون اینکه اثرات سوء ناشی از مصرف این شیرین‌کننده‌ها و اثرات جانبی کلیوی یا نورولوژیکی آن‌ها را داشته باشد. همچنین می‌توان آن را به‌عنوان قند

رژیمی در صنایع غذایی و شیرینی‌جات و تولیدات دارویی و بهداشتی استفاده کرد (لایلد و همکاران، ۲۰۰۴؛ مادان و همکاران، ۲۰۱۰). نتایج بررسی‌ها حاکی از آن است که گلیکوزیدهای دی‌ترپنی به‌عنوان عامل اصلی ایجاد طعم بسیار شیرین در عصاره‌های گیاه استویا شناخته شده‌اند. از مهمترین این ترکیبات می‌توان استویوزید و ربادیوزید را نام برد که از بقیه گلیکوزیدها شیرین‌تر می‌باشند (یاروسلاو و همکاران، ۲۰۰۷).

۲-۱-۲- دامنه‌ی انتشار و نیازهای اکولوژیکی

استویا بومی مناطق شمالی آمریکای جنوبی و دارای ۳۰۰-۱۵۰ گونه علف‌های پایا و درختچه‌ای است که اغلب در ارتفاعات ۳۰۰-۵۰۰ متری ناحیه‌ی کوهستانی نیمه خشک می‌رویند. این گیاه در ابتدا در مناطق حاره‌ای و نیمه حاره‌ای چین، تایوان، تایلند، کره، برزیل و مالزی کشت شد و امروزه علاوه بر کشورهای ذکر شده، در کشورهای همچون بریتانیا، فیلیپین، کانادا، هاوایی، کالیفرنیا و همه قسمت‌های آمریکای جنوبی نیز کشت می‌شود (کینگورن، ۲۰۰۲؛ احمد و همکاران، ۲۰۰۷). همچنین به تازگی این گیاه دارویی در ایران نیز معرفی شده و مورد کشت و کار قرار می‌گیرد. با این وجود، آمار دقیقی از سطح زیر کشت این گیاه در ایران موجود نیست. با این حال افزایش تقاضا برای کشت این محصول ارزشمند در ایران وجود دارد (کاردلو و همکاران، ۱۹۹۹). استویا در تمام مناطق و در تمام طول سال به‌جز در مناطق برفی یا دارای دمای هوای زیر ۵ درجه سانتی‌گراد و به‌جز در زمستان می‌تواند به‌طور موفقیت‌آمیز کشت شود. این گیاه به خاک با زهکشی بسیار خوب نیاز دارد و خاک‌های دارای شرایط ماندآبی برای کشت استویا مناسب نیستند. همچنین به عنوان یک گیاه پایا در مناطق نیمه حاره‌ای شامل قسمت‌های مرکزی ایالات متحده آمریکا رشد می‌نماید، بنابراین به‌عنوان یک گیاه یکساله در مناطق با عرض جغرافیایی بالا، جایی که روزهای طولانی برای تولید برگ و محتوای استویوزید مناسب است، می‌روید. بهترین شرایط رشدی برای استویا مناطقی با اراضی مرتفع در شرایط آب و هوایی نیمه‌حاره‌ای است. حدود ۹۰ وارپته از استویا در سرتاسر جهان نمو یافته که اصولاً تمامی این وارپته‌ها برای شرایط و نیازهای اقلیمی بومی و طبیعی زیستگاهی که در آن می‌رویند سازگار

شده‌اند. غالباً این وارپته‌ها در شرایط آب و هوایی متفاوت نیز رشد می‌یابند. استویا در طول رشد به سرما و خشکی حساس بوده و در طول سال نیازمند به آب کافی است، به طوری که در کشت آن بایستی به این نکته توجه نمود که این گیاه به آب بسیار زیاد نیاز دارد و خاک آن باید همیشه مرطوب باشد (اینترپرنر، ۲۰۰۴).

۲-۲- کود زیستی

کود زیستی ماده‌ای متشکل از یک یا چند نوع ریزجاندار مفید نظیر قارچ و باکتری به همراه مواد نگهدارنده و یا فرآورده‌های متابولیک آن‌هاست که باعث تحریک رشد گیاه، افزایش دسترسی به مواد غذایی اولیه در گیاه میزبان و افزایش تحمل گیاه به تنش‌های محیطی می‌گردد (حمیدی و همکاران، ۱۳۸۶). گرچه استفاده از کودهای زیستی در کشاورزی قدمت زیادی دارد، ولی بهره‌برداری علمی از این گونه منابع سابقه‌ی چندانی ندارد. هر چند، کاربرد این کودها در چند دهه گذشته کاهش یافته است، ولی امروزه با توجه به مشکلاتی که کودهای شیمیایی به وجود آورده است، استفاده از آن‌ها در کشاورزی دوباره مطرح شده است (فلاحی و همکاران، ۱۳۸۸)، به طوری که امروزه به کارگیری کودهای زیستی به عنوان طبیعی‌ترین و مطلوب‌ترین راه حل برای زنده و فعال نگه‌داشتن سیستم حیاتی خاک در اراضی کشاورزی مطرح می‌باشد (وسی، ۲۰۰۳). تأمین عناصر غذایی به صورت کاملاً متناسب با تغذیه‌ی طبیعی گیاهان، کمک به تنوع زیستی، تشدید فعالیت‌های حیاتی، بهبود کیفیت و حفظ سلامت محیط زیست از مهم‌ترین مزایای کودهای زیستی محسوب می‌شود (صالح راستین، ۱۳۸۰). همچنین قابلیت جذب عناصر غذایی، با استفاده از فرآیندهای زیستی برای گیاهان شده (هان و همکاران، ۲۰۰۶) و سبب توسعه‌ی ریشه گیاهان می‌شوند (هایات و همکاران، ۲۰۱۰).

۲-۲-۱- قارچ اندوفیت *Piriformospora indica*

قارچ *Piriformospora indica* به قارچ‌های خانواده *Sebacinaceae*، رده *Hymenomycetes* راسته *Sebacinales* و شاخه بازیدیومیکوتا تعلق دارد (خارکوال و همکاران، ۲۰۰۷؛ سان و همکاران، ۲۰۱۰؛ کومار و همکاران، ۲۰۱۱) این قارچ همزیست داخل گیاهی بوده و زندگی اندوفیتی دارد (والر و همکاران، ۲۰۰۵) و

از آنجایی که مانند قارچ‌های میکوریزای آربوسکولار (AM) همزیست داخلی ریشه گیاهان بوده و ویژگی‌های آنها را تقلید می‌کند (خارکوال و همکاران، ۲۰۰۷؛ والر و همکاران، ۲۰۰۵)، همراه با گونه *Sebacina vermifera* به عنوان قارچ‌های شبه‌میکوریزا (MLF¹) شناخته می‌شوند (بلدی و همکاران، ۲۰۰۸) و در حقیقت می‌توانند نقش میکوریزا را برای گیاه بازی کرده و باعث افزایش رشد و تولید گیاه شوند (ورما و همکاران، ۱۹۹۸). دو قارچ *Sebacina vermifera sencu* و *Piriformospora indica* دو گونه اصلی خانواده Sebacinaceae هستند (خارکوال و همکاران، ۲۰۰۷، سان و همکاران، ۲۰۱۰؛ کومار و همکاران، ۲۰۱۱) که تعامل سودمندی با ریشه‌ی گیاهان برقرار می‌کنند. اعضای Sebacinaceae نیز مانند قارچ‌های میکوریز با بسیاری از گیاهان تک‌لپه و دولپه همزیست می‌شوند و گستره میزبانی وسیعی دارند (خارکوال و همکاران، ۲۰۰۷). مزیت اصلی این قارچ‌ها نسبت به AM، همزیست اختیاری بودن این قارچ‌ها است، زیرا قارچ‌های AM همزیست اجباری هستند و تنها در حضور گیاه میزبان امکان کشت و تکثیر آنها وجود دارد و این یک محدودیت بزرگ برای استفاده از این قارچ‌ها می‌باشد (الگواسیل و همکاران، ۲۰۰۴؛ کاراواکا و همکاران، ۲۰۰۳)، ولی قارچ‌های MLF می‌توانند به راحتی در محیط‌های کشت مصنوعی مختلف و بدون نیاز به همزیستی کشت شوند (دشموخ و همکاران، ۲۰۰۶؛ وارما و همکاران، ۲۰۰۱)، و به این دلیل به‌عنوان ریزجاندار مدل برای مطالعه اسرار نهفته دنیای میکوریزایی مطرح شده‌اند (خارکوال و همکاران، ۲۰۰۷). از گونه *P. indica* می‌توان به عنوان مهم‌ترین گونه خانواده Sebacinaceae نام برد که قدرت بالایی را در القای افزایش رشدی طی همزیستی با گیاهانی نظیر جو، گندم، کنگرفرنگی و گیاهان دیگر نشان داده است (سپهری و همکاران، ۱۳۸۸؛ قاسم‌نژاد و بابایی‌زاد، ۱۳۹۰؛ یعقوبیان و همکاران، ۱۳۹۱ و ۲۰۱۴) و بهترین مورد از این گروه برای مطالعه می‌باشد (آچاتز و همکاران، ۲۰۱۰). دامنه میزبانی این قارچ و توان کشت روی محیط کشت مصنوعی نقطه روشنی در علم میکوریزا ایجاد کرده و محققان فعال در عرضه میکوریز را امیدوار به کشت و تکثیر این قارچ بدون نیاز به کشت همراه با گیاه میزبان نموده است (وارما و همکاران، ۱۹۹۸).

¹ Mycorrhizal-like fungi

۲-۱-۱-۲-۱- منشأ قارچ *P. indica*

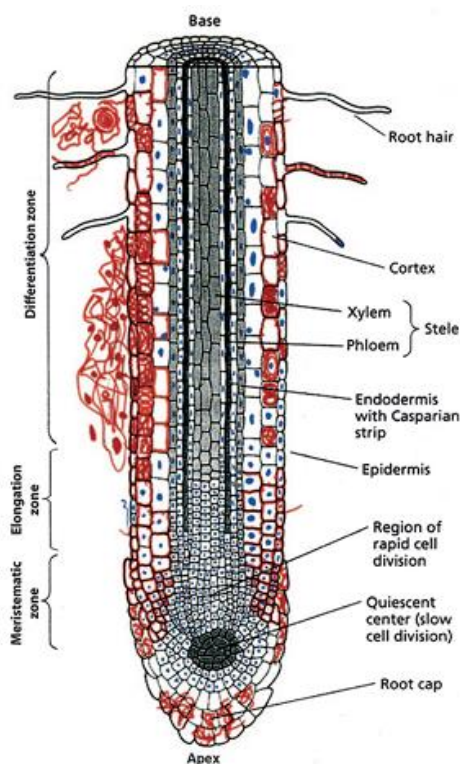
قارچ *P. indica*، قارچ اندوفیت جدیدی است که برای اولین بار در سال ۱۹۹۸ توسط ورما و همکاران (۱۹۹۸) از خاک ریزوسفری گیاهان خشکی پسند کهور (*Prosopis juliflora*) و کنار (*Zizyphus nummularia*) از صحرای تار ایالت راجستان در کشور هندوستان جداسازی و پس از بررسی‌هایی که بر روی توالی DNA ریبوزومی آن صورت گرفت نشان داد که متعلق به خانواده Sebacinaceae از راسته Sebacinales است (والر و همکاران، ۲۰۰۶؛ وارما و همکاران، ۱۹۹۹؛ ویس و همکاران، ۲۰۰۴).

از گونه *P. indica* می‌توان به عنوان مهمترین گونه خانواده Sebacinaceae نام برد که قدرت بالایی را در القای افزایش رشدی طی همزیستی با طیف وسیعی از گیاهان نشان داده است. این قارچ اندوفیت گسترده‌ی میزبانی وسیعی داشته و با ریشه بسیاری از گونه‌های گیاهی همزیست شده و در فضای بین‌سلولی و داخل سلولی ریشه گیاه رشد می‌کند (اولمولر و همکاران، ۲۰۰۹). قارچ *P. indica* دارای پراکندگی وسیع جغرافیایی است و از آسیا، آمریکای جنوبی و استرالیا گزارش شده است (اولمولر و همکاران، ۲۰۰۹). همچنین بررسی توالی ژن 18s rDNA نشان داد که نوع مشابهی از این قارچ ظاهراً در خاک‌های ریزوسفر *Leptochloa fusca* یا *Oriza minuta* به ترتیب در پاکستان و فیلیپین وجود دارد. بعد از آن نیز در کوهپایه‌های هیمالیا در هند، پاکستان، فیلیپین، استرالیا، پرتغال، ایتالیا و چند کشور آمریکای جنوبی یافت شد (وارما و همکاران، ۲۰۱۳).

۲-۱-۲-۲- چگونگی همزیستی با گیاه

قارچ *P. indica* ناحیه‌ی اپیدرم و پوست ریشه را کلونیزه می‌کند. در پی جوانه‌زنی کلامیدوسپور، ریشه‌های قارچ پس از برخورد با سلول‌های سطح ریشه، منشعب شده و از انتهای هر انشعاب، ساختاری به نام آپرسوریوم - که اندامی متورم بر روی لوله تندش یا هیف جهت تماس با میزبان در مرحله اولیه آلودگی است روی سطح ریشه تشکیل می‌شود. سپس ریشه نازکی به درون سلول‌های اپیدرم ریشه نفوذ کرده و

پوست ریشه را به صورت درون سلولی و بین سلولی کلونیزه می‌کند و به دنبال آن نیز قارچ تکثیر شده و اسپور تشکیل می‌شود (سپهری و همکاران، ۱۳۸۸؛ کاری و گل‌تپه، ۱۳۸۹). پژوهش‌های دیگر، آنزیم‌های هیدرولیتیک مانند کربوکسی متیل سلولاز، گزیلاناز و پلی‌گالاکتوناز را در نفوذ قارچ به درون ریشه مؤثر می‌دانند، از این رو می‌توان اظهار داشت که نفوذ قارچ به ریشه نتیجه عمل توأم آنزیم‌های مذکور و فشار مکانیکی اعمال شده از طریق آپرسریوم یا یکی از این دو عامل می‌باشد (بونفانتو و پروتو، ۱۹۹۵). شکل ۱-۲ نمای کلی از ریشه و همزیستی شبه‌میکوریزایی را نشان می‌دهد.



شکل ۱-۲- شمای کلی از ساختار و همزیستی قارچ‌های شبه‌میکوریزا (والر و همکاران، ۲۰۰۶)

۲-۲-۱-۳- اثر *P. indica* در رشد روبشی و جذب مواد غذایی

ریزجانداران خاک از جمله قارچ‌های اندوفیت با برقراری روابط همیاری و همزیستی در تعامل با گیاهان بوده و با انجام فعالیت‌هایی نظیر تولید انواع بی‌شماری از متابولیت‌ها، تجزیه ترکیبات مختلف آلی، تثبیت نیتروژن جوئی، تولید مواد افزایش‌دهنده رشد گیاه، افزایش قابلیت فراهمی عناصر غذایی معدنی برای گیاه، سبب

بهبود رشد گیاه می‌گردند (سپهری و همکاران، ۱۳۸۸). قارچ *P. indica* نیز رشد و زیست‌توده تولیدی را در گیاهان مختلف مانند گیاهان علفی تک‌لپه و دولپه، درختان و چندین محصول اقتصادی مهم را بهبود می‌بخشد (دروگه و همکاران، ۲۰۰۷)، به طوری که اثر تحریک‌کنندگی و افزایش زیست‌توده گیاهان ذرت (*Zea mays* L.)، تنباکو (*Nicotiana tabacum* L.)، جعفری (*Petroselinum crispum* L.)، درمنه (*Artemisia annula* L.) و درخت سپیدار (*Bacopa monnieri*) در اثر تلقیح با قارچ *P. indica* به وسیله ورما و همکاران (۱۹۹۸) گزارش شده است. همچنین در آزمایشی که روی سه گیاه خردل، کدو و اسفناج انجام شد، تلقیح قارچ *P. indica* افزایش رشد رویشی گیاه را در پی داشت (کریمی و همکاران، ۲۰۰۳). تأثیر این قارچ در افزایش زیست‌توده گیاهان جو (*Hordeum vulgare*) و آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana* L.) نیز گزارش شده است (شاهولاری و همکاران، ۲۰۰۷؛ والر و همکاران، ۲۰۰۵). در همین راستا، پژوهش‌های مشابهی مبنی بر تأثیر مثبت تلقیح قارچ *P. indica* در افزایش زیست‌توده گیاهان ذرت (کومار و همکاران، ۲۰۰۹)، جو (دشموخ و همکاران، ۲۰۰۶) و گندم (یعقوبیان و همکاران، ۲۰۱۴) نیز انجام شده است.

رای و وارما (۲۰۰۵) در پژوهشی نشان دادند که تیمار ریشه گیاه دارویی *Adhatoda vasica* با قارچ *P. indica* با افزایش قابل توجه در تراکم ریشه گیاه همراه بوده است. قاسم‌نژاد و بابایی‌زاد (۱۳۹۰) در پژوهشی روی گیاه کنگر فرنگی نشان دادند گیاهان تلقیح یافته با قارچ *P. indica* برگ‌های پهن‌تری در مقایسه با گیاهان شاهد تولید کردند. آنها همچنین بیان داشتند افزایش پهنای برگ در واقع منجر به افزایش میزان کلروفیل و در نهایت راندمان فتوسنتزی برگ می‌شود. شهابی‌وند و همکاران (۲۰۱۲) نیز در پژوهش مشابهی روی گیاه گندم بیان نمودند که گیاهان تلقیح یافته با قارچ *P. indica* دارای بیشترین میزان کلروفیل کل در مقایسه با تیمار شاهد بودند.

دولت‌آبادی و همکاران (۲۰۱۱) در پژوهشی روی گیاه رازیانه، اثر قارچ *P. indica* و *S. vermifera* را بر رشد رویشی و درصد روغن آن مورد بررسی قرار دادند و گزارش نمودند که استفاده از مایه تلقیح این قارچ‌ها

افزایش رشد رویشی و درصد روغن استخراجی آن را در پی دارد و در بین دو قارچ نیز، میزان رشد و درصد روغن گیاه در تلقیح *P. indica* بیشتر از *S. vermifera* بوده است.

روابط میکوریزی بیشتر به دلیل جذب کارآمدتر مواد غذایی از خاک به دلیل نفوذ بهتر هیفها به خاک، نسبت به ریشه‌های مویین ضخیم، شناخته شده‌اند. اثرات مشابهی نیز برای *P. indica* گزارش شده است (اولمولر و همکاران، ۲۰۰۹). مالا و همکاران (۲۰۰۴) نشان دادند که *P. indica* حاوی مقدار قابل توجهی اسید فسفاتاز است که پتانسیل محلول‌سازی فسفر در خاک و تحویل آن به گیاه میزبان را دارد. شاهولاری و همکاران (۲۰۰۵) نیز دریافتند که بهبود رشدی گیاهچه‌های آرابیدوپسیس در مجاورت *P. indica* مربوط به جذب زیاد فسفر از محیط رشد است. با مطالعات وسیع‌تر روی آرابیدوپسیس مشخص شده است که تعدادی (نه همه) از آنزیم‌هایی که در متابولیسم فسفر نقش دارند در ریشه‌های کلونیزه شده با *P. indica* افزایش می‌یابند (اولمولر و همکاران، ۲۰۰۹). اثرات مفید قارچ برای گیاه حداقل در عرضه بهتر مواد مغذی توسط هیفهای قارچی ایجاد می‌شود و حتی در شرایط زندگی سخت، گیاهان قوی‌تر و سالم‌تر اجازه انتشار و زنده ماندن بهتر را به قارچ‌ها می‌دهند و در مقابل قارچ‌ها نیز مقاومت گیاه را افزایش می‌دهند (اولمولر و همکاران، ۲۰۰۹).

ژانگ و همکاران (۲۰۰۶) در پژوهشی نشان دادند اندوفیت‌های ریشه مانند *P. indica* می‌توانند سبب افزایش توان سازگاری و رقابتی بالای میزبان‌شان شوند، این کار با افزایش میزان رشد از طریق مسیرهای بیوشیمیایی درگیر در تولید هورمون‌های رشد و یا تشدید جذب عناصر غذایی توسط میزبان امکان‌پذیر می‌شود. همچنين وارما و همکاران (۲۰۱۲) نیز بیان کردند که همزیستی *P. indica* به جذب بهتر عناصر غذایی توسط گیاه کمک می‌کند، اگرچه سازوکار تأثیر *P. indica* به درستی مشخص نیست، ولی می‌توان بیان کرد که این قارچ از طریق تحریک تولید ریشه و افزایش تعداد آن و بالابردن قدرت جذب مواد غذایی، رشد گیاه را افزایش می‌دهد.

۲-۲-۱-۴- اثر قارچ *P. indica* در تحمل به تنش‌های زیستی و غیرزیستی

تولید محصولات کشاورزی پایدار در تنش‌های زیستی و غیرزیستی، یک مشکل جهانی زیست‌محیطی است که نیاز به راهبرد دقیق، برنامه‌ریزی، پژوهش و اقدام به پاسخگویی به نیازهای جمعیت رو به رشد جهان است. یک مسیر ممکن برای غلبه بر این مشکلات بهره‌برداری از همزیستی بین گیاهان و ریزجاندارانی چون قارچ میکوریزای آربوسکولار (آدیا و همکاران، ۲۰۱۳) و سایر قارچ‌های اندوفیت از جمله *P. indica* (یعقوبیان و همکاران، ۲۰۱۴) برای تحریک رشد گیاه است. قارچ *P. indica* جذب مواد غذایی را افزایش می‌دهد و باعث افزایش مقاومت گیاه به تنش‌های محیطی زیستی و غیرزیستی از قبیل شوری، خشکی و بیماری‌ها می‌شود و می‌تواند به عنوان محافظ زیستی در برابر بعضی از عوامل بیماری‌زا استفاده شود و همچنین مقاومت سیستمیک به مواد سمی، یون‌های فلزات سنگین و نیز تحریک رشد و تولید بذر را در گیاه باعث می‌شود (وارما و همکاران، ۲۰۱۲؛ یعقوبیان و همکاران، ۲۰۱۴). به طوری که تلقیح طیف گسترده‌ای از گیاهان با *P. indica* اثر مثبتی روی زیست توده تولیدی گذاشته و اثرات فیزیولوژیک متعددی شامل افزایش گلدهی، افزایش عملکرد و بهبود تغذیه‌ای گیاه و ایجاد تغییرات سیستمیکی (آمادگی دفاعی) وابسته به فعالیت سازوکارهای آنتی‌اکسیدانی و افزایش رشد و مقاومت گیاه به تنش‌های زیستی و غیرزیستی محیطی را به دنبال داشته است (دروگه و همکاران، ۲۰۰۷؛ دشموخ و همکاران، ۲۰۰۶؛ والر و همکاران، ۲۰۰۵). به عنوان مثال والر و همکاران (۲۰۰۵) اثر *P. indica* را در مقاومت به شوری‌های متوسط (100 mM) و بالا (300 mM) در گیاه جو بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که تلقیح قارچ *P. indica* اثرات مضر ناشی از شوری متوسط را کاملاً از بین برد و حتی گیاهان تحت تنش شوری متوسط و همزیست با *P. indica* زیست توده بیشتری نسبت به گیاهان شاهد بدون شوری تولید کردند. اگرچه در شوری بالا، زیست توده گیاهان همزیست شده و غیرهمزیست به شدت کاهش یافت. نتایج حاصل از پژوهش سپهری و همکاران (۱۳۸۸) نیز بر نقش مؤثر این قارچ در بهبود رشد و عملکرد گیاه جو تحت شرایط تنش شوری دلالت دارد، به طوری که تلقیح قارچ سبب افزایش زیست توده قسمت‌های هوایی و ریشه گیاهان نسبت به تیمار شاهد شده بود. همچنین زارع و همکاران (۲۰۱۲) نیز در بررسی اثر قارچ *P. indica* بر رشد گیاه

گندم در شرایط تنش شوری بیان داشتند که با افزایش سطوح شوری، گیاهان همزیست با قارچ رشد بهتری از خود نشان دادند.

شرامتی و همکاران (۲۰۰۸) در بررسی اثر *P. indica* بر تنش خشکی در آرابیدوپسیس به این نتیجه رسیدند که در مجاورت تنش خشکی ملایم، گیاهچه‌های همزیست شده با قارچ به رشد خود ادامه دادند، در حالی که گیاهچه‌های بدون همزیستی پژمرده شده و رشد نکردند. آنها همچنین در بررسی پروتئین‌هایی که در انتقال پیام‌ها یا بیان ژن‌های مقاومت به خشکی درگیر هستند دریافتند که پس از قرار گرفتن گیاه در معرض تنش خشکی، در برگ گیاهانی که با *P. indica* همزیست بودند ارسال این پیام‌ها سریع‌تر و افزایش سطوح پروتئین‌های مقاومت به خشکی بیشتر بود. سان و همکاران (۲۰۱۰) نیز در پژوهشی روی کلم چینی (*Brassica campestris* L. ssp. *Chinensis*) در شرایط تنش خشکی ناشی از پلی‌اتیلن‌گلیکول (PEG) نشان دادند که همزیستی با قارچ *P. indica* باعث افزایش رشد رویشی و مقاومت گیاه به خشکی می‌شود. همچنین یعقوبیان و همکاران (۱۳۹۱) گزارش دادند که تنش رطوبتی باعث کاهش رشد و عملکرد گندم گردید، ولی تلقیح قارچ‌های *P. indica* و *Glomus mossea* به‌خصوص در تلقیح هم‌زمان دو قارچ، اثرات مخرب تنش رطوبتی را کاهش و رشد و عملکرد را افزایش داد.

در تنش سرما نیز حسنی (۱۳۹۲) در بررسی اثر تنش سرمای هوا و آب در گیاه برنج و علی‌زاده فروتن (۱۳۹۲) در بررسی اثر تنش سرما در گیاه لوبیا سبز، اثر تلقیح *P. indica* را در بهبود تحمل به تنش سرما گزارش نمودند. قارچ *P. indica* همچنین قدرت مقاومت به بیماری‌های ریشه‌ای و برگ‌گی را به گیاه القا می‌کند، به‌طوری که دولت‌آبادی و همکاران (۲۰۱۲) القای مقاومت به بیماری پژمردگی فوزاریومی عدس و همچنین قهفرخی و گل‌تپه (۲۰۱۰) و قهفرخی و همکاران (۲۰۱۱) مقاومت به بیماری‌های گندم را در شرایط گلخانه‌ای گزارش کردند.

۲-۲-۲- قارچ تریکودرما

۲-۲-۲-۱- مشخصات قارچ‌های تریکودرما

قارچ‌های تریکودرما از هیفومیست‌های خاکزی هستند که در اغلب خاک‌های کشاورزی یافت می‌شوند. فرم جنسی این قارچ متعلق به شاخه Ascomycota، رده Pyrenomycetes، راسته Hypocereales، خانواده Hypocereaceae و جنس Trichoderma می‌باشد. (جبارزاده و همکاران، ۱۳۸۹؛ هارمان، ۲۰۰۶). محققین طبقه‌بندی جنس تریکودرما را به‌طور دقیق مورد بررسی قرار داده و در مجموع بیش از ۳۰ گونه را در این جنس معرفی کرده‌اند. در ایران در مجموع ۱۶ گونه از تریکودرما شامل *T. hamatum*، *T. parceramosum*، *T. pseudokoningi*، *T. saturnisporum*، *T. virens*، *T. harzianum*، *T. aureoviride*، *T. koningi*، *T. tomentosum*، *T. inhamatum*، *T. Citrinoviride*، *T. viride*، *T. longibrachiatum*، *polysporum* و *asperellum* گزارش شده است (مؤیدی و مستوفی‌زاده قلم‌فرسا، ۱۳۹۱).

۲-۲-۲-۲- قارچ تریکودرما و تحریک رشد گیاهان

اهمیت جوامع میکروبی برای کارکرد یک اکوسیستم به‌دلیل نقش مهمی است که در فرآیندهای خاک که تعیین کننده تولید گیاه می‌باشند، ایفا می‌کنند. تعداد قابل توجهی از گونه‌های باکتریایی و قارچی خاک دارای روابط تعاملی با گیاهان بوده و اثرات مفیدی بر رشد آن‌ها دارند (وسی، ۲۰۰۳).

در بین ریزجانداران خاکزی، تریکودرما (*Trichoderma spp.*) قارچی است که به‌طور معمول در همه خاک‌ها و در اطراف ریشه گیاهان حضور دارد (ونکر و باجپای، ۲۰۰۸). گونه‌های تریکودرما قارچ‌های آزادی، هم‌زیست فرصت طلب و غیربیماری‌زای گیاهی هستند که در زیستگاه‌های خاکی نقش کلیدی ایفا می‌کنند و به عنوان افزاینده رشد گیاهی (PGP) شناخته شده‌اند (مینکه و همکاران، ۲۰۱۰؛ وینال و همکاران، ۲۰۰۸). این قارچ‌ها در بسیاری از خاک‌هایی که گیاه در آن کشت می‌شود وجود دارند و نقش اصلی آنها در تبدیل بازمانده‌های آلی و تولید کمپوست می‌باشد (برانر و همکاران، ۲۰۰۵). قارچ‌های مذکور با کلونیزاسیون و اسپورزایی در محیط خاک و به ویژه اطراف ریشه اغلب گیاهان با سطوح ریشه گیاه کلونی‌های قوی و

پایداری برقرار کرده و به درون اپیدرم و سلول‌های زیر آن نفوذ می‌کنند و با سازوکارهای بیوشیمیایی خاصی سبب بهبود رشد و نمو گیاهان می‌شوند (کاواس، ۲۰۰۶؛ وینال و همکاران، ۲۰۰۸؛ هارمان و همکاران، ۲۰۰۴). از جمله مکانیسم‌های بیان شده می‌توان به تولید هورمون‌های تنظیم‌کننده رشد، افزایش حلالیت و قابلیت جذب و انتقال عناصر ریز مغذی مانند آهن، منگنز، منیزیم، کاتیون‌های معدنی و فسفات‌ها از طریق ترشح اسیدهای آلی از قبیل گلوکونیک اسید، سیتریک اسید و اسید فوماریک و کاهش pH خاک، دفع مسمومیت و افزایش انتقال قند و اسید آمینه در ریشه گیاهان، ایجاد مقاومت القایی در برابر تنش‌های محیطی اشاره نمود (انجا و همکاران، ۲۰۰۵، شارما و همکاران، ۱۹۹۹؛ گراول و همکاران، ۲۰۰۷؛ مذهبی و همکاران، ۲۰۱۱؛ وینال و همکاران، ۲۰۰۸). جذب کلسیم نیز در حضور تریکودرما افزایش می‌یابد، چراکه جذب این عنصر ارتباط مستقیم با حجم ریشه و جذب آب داشته و به علت افزایش حجم ریشه توسط تریکودرما، جذب کلسیم افزایش می‌یابد (جبارزاده و همکاران، ۱۳۸۹). اگرچه هنوز ساز و کار ژنتیکی و ملکولی این فرایندها شناخته نشده است (هارمان و همکاران، ۲۰۰۴).

گونه‌های تریکودرما از متداول‌ترین قارچ‌های قابل کشت هستند، به طوری که امروزه به عنوان اصلاح‌کننده‌های خاک در سطح تجاری تولید می‌شوند (سان و همکاران، ۲۰۱۰). تریکودرما تنوع ژنتیکی بالایی دارد که می‌توان از آن‌ها برای تولید طیف وسیعی از محصولات تجاری و زیست‌محیطی استفاده کرد. این قارچ‌ها در بسیاری از خاک‌هایی که گیاه در آن کشت می‌شود وجود دارند و نقش اصلی آنها در تبدیل بازمانده‌های آلی و تولید کمپوست، تولید پروتئین‌های خارج سلولی و توانایی زیاد در تولید آنزیم‌های تجزیه‌کننده سلولز و کیتین می‌باشد (برانر و همکاران، ۲۰۰۵؛ هارمان و همکاران، ۲۰۰۴).

تشکیل کلونی روی ریشه‌ها موجب افزایش رشد ریشه، رشد کل گیاه و به موازات آن افزایش تولیدات گیاهی می‌شود (ایران‌نژاد و همکاران، ۱۳۸۹). طی آزمایش‌های متعددی اثر مثبت تریکودرما در تحریک رشد گیاه و بهبود شرایط خاک از طریق افزایش فعالیت ریزجانداران خاک به اثبات رسیده است. در این راستا می‌توان به آزمایشاتی که روی گیاهانی مانند زیره (هاگاک و ابو-صدرا، ۲۰۰۵)، خیار (یدیدا و همکاران، ۲۰۰۱)، اسفناج

(مقیان و همکاران، ۲۰۰۹) و نخودفرنگی (کوچاک و همکاران، ۲۰۰۷) در تیمار با گونه‌های مختلف قارچ تریکودرما مانند *T. hamatam*، *T. viridae*، *T. koningii* و *T. harzianum* انجام شده است اشاره کرد.

یزدانی و همکاران (۱۳۸۷) طی آزمایشی افزایش رشد و نمو گیاهچه سویا را در شرایط استفاده از تریکودرما به‌ویژه در حضور کودهای آلی گزارش کردند. همچنین بهبود ظهور و بنیه گیاهچه، رشد رویشی و در نهایت عملکرد گندم در تیمار تلفیقی کمپوست دامی و گونه‌های قارچ تریکودرما گزارش شده است (شاهسوار و همکاران، ۲۰۱۰). در یک آزمایش گلخانه‌ای اضافه کردن سوسپانسیون کنیدیایی *Trichoderma spp* به خاک باعث افزایش معنی‌داری در وزن خشک گیاهان گوجه‌فرنگی، فلفل و خیار گردید (چانگ و همکاران، ۱۹۸۶). تقوی قاسمخیلی و همکاران (۱۳۹۳) نیز در بررسی اثر کاربرد تریکودرما در گیاه گندم، افزایش معنی‌دار زیست‌توده گیاه را گزارش کردند. کاربرد این قارچ در گیاه برگ بیدی (*Tradescantia sp.*) باعث افزایش سطح برگ، وزن تر و خشک اندام هوایی و زیرزمینی، تعداد شاخه جانبی و میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی شد (جلالی و همکاران، ۱۳۹۳). چاکون و همکاران (۲۰۰۷) نیز نشان دادند که تیمار قارچ تریکودرما بر ریشه نشاء توتون سبب افزایش وزن تر، سطح برگ، ریشه‌های جانبی و برگ آن می‌شود. علاوه بر این، در گیاه ذرت سطح برگ و مقدار فتوسنتز افزایش می‌یابد (هارمن، ۲۰۰۶). اثر تحریک‌کنندگی این قارچ‌ها در مرحله جوانه‌زنی و رشد گیاهچه نیز به ویژه در شرایط تنش‌های شوری، خشکی، سرما و عناصر سنگین به اثبات رسیده است (مستوری و همکاران، ۲۰۱۰). البته گونه قارچ تریکودرما، جدایه‌های مختلف یک گونه و حتی میزان غلظت و نوع مایه تلقیح استفاده شده نیز باعث تفاوت در میزان اثرات رشدی قارچ بر روی گیاهان مختلف می‌شود (لینچ و همکاران، ۱۹۹۱).

۲-۲-۳- اثر قارچ تریکودرما در تحمل به تنش‌های محیطی

قارچ تریکودرما علاوه بر اینکه باعث تحریک رشد رویشی گیاه می‌گردد، گستره وسیعی از ترکیباتی را تولید می‌کند که موجب مقاومت‌های موضعی یا سیستمیک می‌شوند (هارمان و همکاران، ۲۰۰۴). گونه‌های تریکودرما بیشتر به عنوان عوامل کنترل زیستی در برابر عوامل بیماری‌زای خاکزی شناخته شده اند (کلاوس،

۲۰۰۶). این قارچ‌ها دارای خاصیت آنتاگونیستی بوده و باعث تخریب میسلیوم قارچ‌های بیماری‌زا می‌شوند و یا از طریق رقابت بر سر منابع کربن و آهن با قارچ‌های بیماری‌زا در ریزوسفر، توانایی کاهش بیماری‌های گیاهی را دارند (رضوان و همکاران، ۲۰۰۶)، بنابراین با کنترل فلور میکروبی خاک در ناحیه ریزوسفر گیاهان به افزایش رشد آن‌ها کمک می‌کنند (رضوان و همکاران، ۲۰۰۶). از این‌رو به دلیل موفقیت آن‌ها در این زمینه امروزه به طور وسیع به عنوان مهمترین عامل قارچی در کنترل زیستی مورد توجه قرار گرفته‌اند (تیجاموس و همکاران، ۱۹۹۲). در این زمینه دویی و همکاران (۲۰۰۷) با بررسی ایزوله‌های مختلف قارچ تریکودرما، کاهش خسارت ناشی از فوزاریوم و افزایش رشد گیاه را گزارش نمودند.

علاوه بر این گونه‌های تریکودرما در شرایط تنش‌های غیر زیستی نیز باعث بهبود رشد و افزایش تحمل گیاه می‌شوند، به عنوان مثال گونه‌های متعددی از قارچ تریکودرما شناخته شده که می‌توانند سمیت عناصر سنگین در خاک‌های آلوده را تحمل کنند، همچنین این گونه‌ها مقاومت بالایی به مواد سمی مختلف از جمله آنتی‌بیوتیک‌ها و قارچ‌کش‌ها دارند (حاجی‌اقراری، ۲۰۱۰). مستوری و همکاران (۲۰۱۰) افزایش جوانه‌زنی و رشد گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی را در اثر تلقیح قارچ تریکودرما، تحت تنش‌های محیطی از جمله شوری، خشکی، سرما و پیری گزارش نمودند. علی‌زاده فروتن و همکاران (۱۳۹۳) نیز اثر *T. virens* را بر جوانه‌زنی و رشد گیاهچه گیاه دارویی رازیانه مثبت ارزیابی کردند.

۲-۳- تنش‌های محیطی غیرزیستی

تنش به مفهوم تغییر شرایط طبیعی و بهینه فیزیولوژیک گیاه است که از تأثیر مجموعه‌ای از عوامل زیستی و محیطی حاصل شده و باعث کاهش رشد و نمو، افت بازده و مرگ قسمتی از گیاه گردد. در طی سالیان متمادی تغییرات اقلیم به صورت پی‌درپی ظهور پیدا کرده و در حال حاضر این پدیده یکی از بزرگترین چالش‌های پیش روی بشر است. درجه حرارت، میزان شدت تابش نور، بارندگی، آب‌های زیرزمینی و دی اکسید کربن جهان به طور قابل ملاحظه‌ای در حال تغییر می‌باشند که همین عوامل باعث تغییرات اقلیمی گسترده در جهان و اختلال در چرخه زیستی گیاهان شده اند (پولو و لئو، ۲۰۱۴). گیاهان معمولاً در طول

دوره رشد خود به طور همزمان با چند تنش محیطی مختلف مواجه می‌شوند که به طور گسترده باعث کاهش تولیدات محصولات کشاورزی در دنیا می‌گردد (ژانگ و همکاران، ۲۰۱۶).

۲-۳-۱- تنش شوری

شوری به مفهوم حضور بیش از اندازه نمک‌های قابل حل و عناصر معدنی در محلول آب و خاک که منجر به تجمع نمک در ناحیه ریشه شده و گیاه در جذب آب کافی از محلول خاک با اشکال روبرو می‌شود. به علاوه واژه تنش شوری برای بیان وجود بیش از حد یون‌ها به ویژه یون‌های سدیم و کلر نیز استفاده می‌شود (رنگاسامی، ۲۰۱۰). از دیدگاه خاکشناسی، خاکی شور نامیده می‌شود که هدایت الکتریکی عصاره اشباع آن در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد (EC) معادل چهار دسی‌زیمنس بر متر (معادل ۴۰ میلی‌مولار نمک کلرید سدیم)، درصد ظرفیت تبادل کاتیونی به وسیله سدیم کمتر از ۱۵ و فشار اسمزی ۰/۲ مگاپاسکال باشد. یک خاک شور می‌تواند رشد، توسعه و بهره‌وری گیاهان را تحت تأثیر قرار داده و منجر به کاهش عملکرد در بیشتر گیاهان شود (مانس و تستر، ۲۰۰۸).

۲-۳-۲- تأثیر تنش شوری بر گیاهان

تنش شوری یکی از موانع تولید در کشاورزی محسوب می‌شود که از طریق تغییرات آناتومیک، موفولوژیک، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی بر جنبه‌های مختلف رشد و نمو گیاه تأثیر می‌گذارد که این تغییرات به صورت کاهش جوانه‌زنی، کاهش درصد سبز شدن، کلروزه شدن برگ، پیری و کاهش رشد نسبی بروز خواهد کرد. شدت خسارت حاصل از شوری به طول مدت تنش و مرحله رشد گیاه متفاوت است (سیرینگام و همکاران، ۲۰۱۱). همچنین اثر زبان‌بار شوری در رشد گیاه به پتانسیل اسمزی پایین در خاک، تغذیه غیرمتعادل، اثرهای یونی خاص و یا مجموعه‌ای از این عوامل بستگی دارد (کایا و همکاران، ۲۰۱۳). پاسخ گیاهان به تنش شوری پیچیده است و بستگی به عوامل گوناگونی نظیر نوع و غلظت املاح، مرحله رشد گیاه، پتانسیل ژنتیکی گیاه و عوامل محیطی دارد. شوری به روش‌های مختلف سبب کاهش رشد گیاهان می‌شود، هر چند

سهم هر کدام از این عوامل به درستی مشخص نیست (دریجا و همکاران، ۲۰۰۳). در شرایط تنش شوری، بسته شدن روزنه‌ها در واکنش به تنش کمبود آب منجر به کاهش تثبیت دی‌اکسیدکربن خواهد شد، در حالی که واکنش نوری و انتقال الکترون در مقادیر طبیعی صورت می‌گیرد. در چنین شرایطی انرژی نورانی جذب شده توسط برگ نمی‌تواند به طور کارآمدی برای فتوسنتز مورد استفاده قرار گیرد و به‌طور بالقوه دستگاه فتوسنتزی آسیب می‌بیند، زیرا در چنین شرایطی به دلیل عدم اکسیده شدن مولکول NADPH مصرف NADP⁺ جهت دریافت الکترون کاهش می‌یابد بنابراین مولکول اکسیژن در مسیر زنجیره انتقال الکترون به‌عنوان گیرنده ثانوی الکترون عمل کرده و در نتیجه انواع مختلفی از اکسیژن فعال در سلول تولید می‌شود که گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) نامیده می‌شوند (اگنس و همکاران، ۱۹۷۵). گونه‌های فعال اکسیژن در مقادیر مختلف و در نتیجه متابولیسم طبیعی تولید می‌شوند اما افزایش و تجمع بیش از حد آنها منجر به تنش و آسیب اکسیداتیو می‌گردد (اسفندیاری و همکاران، ۲۰۱۲). اکسیژن فعال از طریق فرآیندهای اکسیدکنندگی محتویات سلول، اثرات مخرب جبران‌ناپذیری بر گیاه می‌گذارند که برای بقا گیاه مضر می‌باشند. اما گیاهان تحت تنش، راهکار دفاعی متفاوت و پیچیده‌ای برای حذف و یا کاهش این ترکیبات مخرب به کار می‌گیرند که یکی از این سیستم‌های تدافعی، شامل مولکول‌ها و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی است. آنزیم آنتی‌اکسیدانی اولیه که O₂⁻ را به H₂O₂ و اکسیژن تبدیل می‌کند سوپراکسیددیسموتاز (SOD) می‌باشد (آلچر و همکاران، ۲۰۰۲). دو آنزیم مهم بعدی که در دفع H₂O₂ و تبدیل آن به آب و اکسیژن دخالت دارند، کاتالاز (CAT) و آسکوربات پراکسیداز (APX) نام دارند (بوو و همکاران، ۲۰۱۲). در شرایط تنش شوری، سیستم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانی گیاهان می‌توانند با فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی افزایش یافته و به‌دنبال آن مقاومت به تنش‌های محیطی نیز افزایش یابد (بوو و همکاران، ۲۰۱۲). از طرفی اسیدآمینو پرولین تحت شرایط نامطلوب محیطی در گیاه تجمع می‌یابد. نقش پرولین در تنش، جلوگیری از تخریب آنزیم‌ها، جلوگیری از تجزیه ماکرومولکول‌ها و دخالت در حفظ استحکام دیواره سلولی و پاکسازی رادیکال‌های هیدروکسیل (OH[•]) تولید شده تحت تنش در گیاهان عنوان شده است (هونگ و همکاران، ۲۰۱۰).

اگرچه رشد گیاه نتیجه فرآیندهای فیزیولوژیک منظم و کامل است و مهار رشد گیاه توسط عوامل محیطی را نمی‌توان تنها به یک فرآیند خاص نسبت داد، اما پدیده فیزیولوژیک غالب فتوسنتز است (پریدا و داس، ۲۰۰۵) و تنش شوری بسته به شدت آن بر فتوسنتز تأثیر می‌گذارد. کارایی فتوسنتز به توالی فرآیندهای متابولیسمی نظیر واکنش‌های فتوشیمیایی، آنزیم‌های دخیل در تثبیت کربن، ساختار دستگاه فتوسنتزی و انتقال حدواسط‌های فتوسنتزی بین اجزای سلولی بستگی دارد. بنابراین در تنش شوری آن‌چه فتوسنتز را تحت تأثیر قرار می‌دهد، کاهش میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی، کاهش سطح برگ (کاهش سطح فتوسنتزی)، کاهش فراهمی CO_2 به علت بسته شدن روزنه‌ها (کاهش هدایت روزنه‌ای)، کاهش هدایت مزوفیلی (به علت کاهش نفوذپذیری غشا به CO_2 به علت دهیدراته شدن غشاهای سلولی)، تغییر در فعالیت آنزیم‌ها به علت تغییرات در ساختار سیتوپلاسمی (آنزیم‌های روبیسکو و چرخه کلونین)، سمیت نمک، افزایش پیری القا شده توسط شوری و آسیب اکسیداتیو به غشاهای فتوسنتزی می‌باشد (اورکات و نیلسن، ۲۰۰۰). شوری بر آناتومی برگ و زیرساختارهای کلروپلاستی نیز تأثیر می‌گذارد، بنابراین فتوسنتز تحت تأثیر این عوامل نیز قرار می‌گیرد. علاوه بر این بسیاری از آنزیم‌های دخیل در مراحل گلیکولیز و آنزیم‌های تنفسی و زنجیره انتقال الکترون میتوکندریایی و به طور کلی متابولیسم کربن تحت تأثیر شوری قرار می‌گیرد (اورکات و نیلسن، ۲۰۰۰؛ پریدا و داس، ۲۰۰۵).

پژوهش‌های گسترده‌ای در رابطه با اثر تنش شوری بر شاخص‌های رشدی، صفات مورفولوژیکی، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی گیاهان دارویی از جمله استویا (نوری آکندی و همکاران، ۱۳۹۴، سراج و همکاران، ۱۳۹۵)، ریحان (بهاری ساروی و همکاران، ۱۳۹۶، کرامتی و همکاران، ۱۳۹۵، علیرضایی نقدر و همکاران، ۱۳۹۱)، بخردی و همکاران، ۲۰۱۵، باربیری و همکاران، ۲۰۱۲)، نعنای فلفلی (خالوندی و همکاران، ۱۳۹۵) و زیره سیاه (علیرضایی نقدر و همکاران، ۱۳۹۱) انجام گرفته است.

۲-۳-۳- سازوکارهای دفاعی گیاهان در شرایط تنش

اجتناب^۲ و تحمل^۳ دو سازوکار اصلی گیاهان برای محافظت خود در برابر تنش‌های محیطی می‌باشد. هنگامی که گیاهان در شرایط تنش‌های محیطی از جمله تنش شوری قرار می‌گیرند قادر به اجتناب از تنش نخواهند بود. گیاهان از نظر تحمل به شوری دو دسته می‌شوند: گیاهان Ion- Exclusion (ممانعت‌کننده) از ورود نمک به بخش هوایی گیاه جلوگیری می‌کنند و گیاهان Ion- Inclusion (حبس‌کننده) مقادیر زیادی از نمک را جذب و به بخش هوایی منتقل می‌کنند و بسیاری از گیاهان آنها را در واکوئل خود ذخیره کرده و آبدار یا گوشتی می‌شوند. بعضی از گیاهان حبس‌کننده، اگرچه املاح را جذب می‌کنند ولی توسط غدد نمکی اختصاصی در برگ مقدار زیادی از املاح را دفع می‌نمایند. نمکی که بدین نحو دفع شده است در سطح برگ به‌صورت کریستال تجمع پیدا کرده و نمی‌تواند آسیبی به گیاه برساند (اشرف و وو، ۱۹۹۴). گیاهان مقاوم به شوری با استفاده از جذب مقادیر زیادی از یون‌ها و جای دادن آنها در واکوئل‌هایشان تورژانس سلول خود را در شرایط پتانسیل پایین آب خاک حفظ کرده و از مسمومیت یونی اجتناب می‌کنند (مانس، ۲۰۰۲). همچنین گیاهان می‌توانند یون‌ها را در اندام‌های مختلف مانند ریشه‌ها، برگ‌های مسن، ساقه‌ها و تراکئیدهای خود انباشته کنند که با این عمل از آسیب به اندام‌های حساس و مهم گیاه مانند پهنک‌های جوان و فعال و بافت‌های مریستمی جلوگیری کرده و یا آسیب آنها را به تأخیر اندازد (حق‌نیا، ۱۳۶۸).

گیاهان در شرایط تنش شوری، پتانسیل اسمزی را از طریق تجمع آمینواسیدها، یون‌ها، پرولین، پروتئین محلول و کربوهیدرات کاهش می‌دهند (قافیه‌سنج و همکاران، ۲۰۱۳). یکی از پاسخ‌های بیوشیمیایی گیاهان در برابر تنش شوری، تجمع مواد محلول سازگار از جمله قند و پرولین می‌باشد. نقش این مواد در سلول، علاوه بر دخالت در تنظیم اسمزی سلول، ممانعت از تولید رادیکال آزاد، جاروب کردن گونه‌های فعال اکسیژن، حفاظت از یکپارچگی غشا و ثبات پروتئین‌ها می‌باشد که باعث ایجاد سازوکارهای مقاومت در برابر خسارات ناشی از تنش می‌شوند. همچنین، تعدادی از اسمولیت‌ها ترکیبات سلولی را از آسیب ناشی از دست رفتن آب حفظ می‌کنند (اشرف و فولاد، ۲۰۰۷).

^۲ Avoidance

^۳ Tolerance

۲-۳-۴- سیستم آنتی‌اکسیدانی گیاه

در گیاهان متابولیسم انواع اکسیژن فعال (ROS)، از جمله رادیکال سوپراکسید (O_2^-)، پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و رادیکال هیدروکسیل (OH^-) به صورت دینامیک در توازن نگه داشته می‌شوند (فویر و هاربینسون، ۱۹۹۴). با این حال اکسیژن‌های فعال از محصولات اجتناب‌ناپذیر متابولیسم سلولی بوده و حتی در شرایط مطلوب محیطی نیز به میزان کم تولید و به مولکول‌های حیاتی آسیب می‌رسانند (میتلر، ۲۰۰۲)، در شرایط تنش‌های زنده و غیرزنده محیطی از جمله شوری، خشکی، تنش دمایی، بیماری‌ها و عناصر سنگین تعادل موجود بین تولید و تخریب انواع اکسیژن فعال از بین می‌رود که باعث افزایش انواع اکسیژن فعال شده و پراکسیداسیون لیپیدی را در پی خواهد داشت (جلیل و همکاران، ۲۰۰۹؛ سان و همکاران، ۲۰۱۰). در مقابل، سلول‌های گیاهی جهت مقابله با انواع اکسیژن فعال به یکسری مکانیسم‌های دفاعی مجهز می‌باشند که بتوانند این ترکیبات را جمع‌آوری و یا خنثی نمایند (اسادا، ۲۰۰۶؛ جوبانی-ماری و همکاران، ۲۰۱۰). این مکانیسم‌های دفاعی از دو بخش آنتی‌اکسیدان‌ها و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان تشکیل شده‌اند (جیانگ و یانگ، ۲۰۰۹). از مهمترین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان می‌توان به سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، آسکوربات پراکسیداز (APX)، گایاکول پراکسیداز (GPX)، گلوکاتایون ردوکتاز (GR)، دهیدروآسکوربات ردوکتاز (DHAR) و گلوکاتایون S-ترانسفراز اشاره کرد (اسادا، ۲۰۰۶؛ بلوخینا و فگرستد، ۲۰۱۰؛ سایرام و همکاران، ۲۰۰۲). از مهمترین آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی نیز می‌توان به آسکوربات، گلوکاتایون، توکوفرول، ملاتونین، ترکیبات فلاونوئیدی و کارتنوئیدها اشاره کرد (آجیلا و همکاران، ۲۰۰۸؛ سایرام و همکاران، ۲۰۰۲).

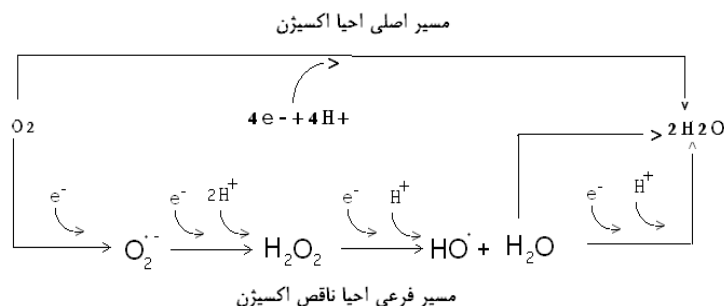
در شرایط تنش، گیاه با افزایش آنتی‌اکسیدان‌ها و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی از افزایش انواع اکسیژن فعال جلوگیری کرده و در برابر زیان‌های اکسیداتیوی از خود محافظت می‌کند (اسادا، ۱۹۹۹؛ سان و همکاران، ۲۰۱۰)، چنان‌چه تنش بیش از حد افزایش یابد تولید انواع اکسیژن فعال زیاد شده و سیستم آنتی‌اکسیدانی قادر به جمع‌آوری آن نخواهد بود و در نهایت آسیب به سلول و مرگ آن را به دنبال خواهد داشت (لیو و همکاران، ۲۰۰۹).

۲-۳-۴-۱- اکسیژن‌های فعال

چگونگی تولید انواع اکسیژن فعال (ROS)

بروز تنش‌های محیطی باعث اختلال در فرآیند فتوسنتز و کاهش تثبیت CO_2 (ژانگ و همکاران، ۲۰۰۶) و عدم مصرف NADPH, H^+ در چرخه کالوین و در نتیجه کاهش نسبت NADPH^+ به‌عنوان گیرنده نهایی الکترون خواهد بود. در این حالت ناچاراً O_2 به‌عنوان پذیرنده الکترون در زنجیره انتقال الکترون بوده و به رادیکال‌های سوپراکسید و انواع اکسیژن فعال (ROS) تبدیل می‌شود (کادناس، ۱۹۸۹).

احیای کامل اکسیژن و تبدیل آن به آب در مسیر اصلی فرآیندهای متابولیسمی صورت می‌گیرد. جهت انجام این عمل، اکسیژن باید به‌طور هم‌زمان چهار الکترون و چهار پروتون دریافت نموده تا دو مولکول آب تولید نماید (شکل ۲-۲). اگر ناقل‌های مسیر اصلی انتقال الکترون به هر دلیلی به حالت احیاء در آیند و مسیر اصلی مسدود گردد، مسیر فرعی دیگری برای انتقال الکترون فعال شده و جریان الکترون در مسیرهای فرعی صورت می‌گیرد. در مسیرهای فرعی چون الکترون‌ها تک تک روی اکسیژن منتقل می‌شود منجر به احیاء ناقص آن می‌شود، به طوری که با گرفتن ۱، ۲ و ۳ الکترون به ترتیب رادیکال سوپراکسید (O_2^-)، پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و رادیکال هیدروکسیل (HO^\cdot) تشکیل می‌شود (اگروال و همکاران، ۲۰۰۵). این رادیکال‌ها به دلیل داشتن الکترون‌های جفت نشده در اوربیتال‌های خود میل ترکیبی بسیار بالای دارند (میتلر، ۲۰۰۲).



شکل ۲-۲- مسیر های احیاء اکسیژن

اثرات عمومی گونه‌های فعال اکسیژن

انواع اکسیژن فعال علاوه بر اثرات اختصاصی خود، اثرات زیان‌بار مشترکی نیز دارند که از جمله می‌توان به میل ترکیبی شدید آنها در واکنش با اسیدهای نوکلئیک، پروتئین‌ها و لیپیدها اشاره کرد (جوبانی-ماری و همکاران، ۲۰۱۰؛ میتلر، ۲۰۰۲) که به ترتیب سبب جهش در ساختار DNA، دناتوره شدن پروتئین‌ها و آسیب به غشاها می‌شوند (بروسگم و همکاران، ۲۰۰۱؛ کیولس و لویز، ۲۰۰۴). برآیند این عوامل سبب کاهش یا غیرفعال شدن فرآیندهای حیاتی سلول می‌گردد که در پی آن اختلالات متابولیکی اتفاق می‌افتد. به طور کلی افزایش تولید انواع اکسیژن فعال در شرایط نامساعد محیطی سبب تجمع صدمات وارده به نقاط کلیدی شده و در نهایت مرگ سلول را در پی دارد (میتلر، ۲۰۰۲).

ازجمله آسیب‌های وارده به سلول توسط این اکسیژن‌های فعال، پراکسیداسیون لیپیدی غشا می‌باشد. غشاهای زیستی یکی از نقاط اصلی کنترل و تنظیم متابولیسم به‌شمار می‌آید. این غشاها عمدتاً از چربی‌ها، پروتئین‌ها و مقادیر کمی کربوهیدرات‌ها تشکیل شده‌اند. وجود این ترکیبات به غشای سلول خاصیت سیالیت و نفوذپذیری انتخابی داده است. از طرفی فراوان‌ترین چربی‌ها در غشا، فسفولیپیدها می‌باشند که توسط انواع اکسیژن فعال آسیب می‌بینند (بلوخینا و فگرستد، ۲۰۱۰) و این امر نفوذ پذیری انتخابی غشا را تحت تاثیر قرار می‌دهد (یامازاکی و همکاران، ۲۰۰۳). بنابراین با عبور پروتون‌ها از غشاها و تغییر pH، گرادیان الکتروشیمیایی لازم برای بیوسنتز ATP در کلروپلاست و میتوکندری به طور چشمگیری کاهش می‌یابد. در نهایت فضای داخل و خارج اندامک‌ها به تعادل می‌رسند که این امر سبب مرگ سلول می‌شود (اسفندیاری و همکاران، ۱۳۸۸). مالون‌دی‌آلدئید (MDA) یک شاخص برای پراکسیداسیون لیپیدی و یک نشانگر برای تنش اکسیداتیو است که افزایش آن نشان دهنده آسیب به لیپیدهای غشایی می‌باشد (ژانگ و همکاران، ۲۰۰۷). افزایش گونه‌های اکسیژن فعال باعث افزایش فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز شده که اکسیداسیون اسیدهای چرب غشایی را به دنبال دارد (لاکان و باکوا، ۱۹۹۸).

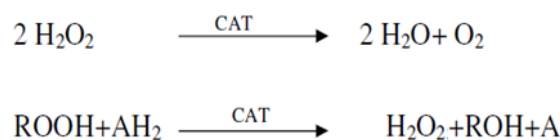
۲-۳-۴-۲- تعدادی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و وظایف آن‌ها

آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD)

آنزیم سوپراکسید دیسموتاز از آنزیم‌های کلیدی در سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدان در گیاهان بوده و نخستین آنزیم در رفع مسمومیت می‌باشد (بلوخینا و فگرستد، ۲۰۱۰)، با فعالیت این آنزیم رادیکال سوپراکسید به پراکسید هیدروژن تبدیل می‌شود (لومونته و همکاران، ۲۰۱۰). این واکنش در طبیعت به صورت خودبخودی نیز انجام می‌گیرد ولی وجود این آنزیم سرعت واکنش را ۱۰ تا ۱۰۰۰۰ مرتبه نسبت به حالت معمول افزایش می‌دهد (نوواک و همکاران، ۲۰۰۴).

آنزیم کاتالاز (CAT)

کاتالاز از شناخته شده ترین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان است که نقش مهمی در جمع آوری پراکسید هیدروژن و کاهش اثرات تخریبی آن در پراکسی‌زوم و گلی‌اکسی‌زوم (سکین و همکاران، ۲۰۱۰) و میتوکندری (فویر و نکتور، ۲۰۰۰) ایفاء می‌کند، همچنین پراکسید هیدروژن تولید شده در اثر فعالیت SOD را به آب و اکسیژن تبدیل می‌کند (بلوخینا و فگرستد، ۲۰۱۰). این آنزیم از میل ترکیبی بسیار بالایی با پراکسید هیدروژن برخوردار است و در هیچ غلظتی از پراکسید هیدروژن به حد اشباع نمی‌رسد. مدل زیر نحوه عمل آنزیم کاتالاز را نشان می‌دهد.



آنزیم گایاکول پراکسیداز (GPX)

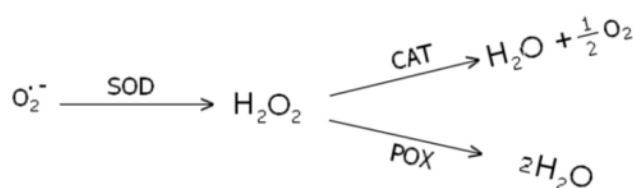
آنزیم گایاکول پراکسیداز (گلوتاتیون پراکسیداز) در سیتوسول فعالیت داشته و از گلوتاتیون به‌عنوان کوفاکتور خود استفاده می‌کند (دیکسون، ۱۹۹۸). این آنزیم پراکسید هیدروژن را تجزیه و به آب تبدیل

می‌کند. افزایش فعالیت این آنزیم به همراه سایر سازوکارهای دفاعی در سیتوسول به حفظ پایداری در این بخش کمک شایانی می‌نماید (اسفندیاری و همکاران، ۱۳۸۶).

آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX)

آسکوربات پراکسیداز یک نقش حیاتی در سازوکارهای دفاعی گیاه در مقابل تنش اکسیداتیو دارد. این آنزیم، پراکسید هیدروژن را در کلروپلاست، سیتوسول، میتوکندری و پراکسیزوم سلول‌های گیاهی از بین می‌برد (اسادا، ۲۰۰۶؛ شیگئوکا و همکاران، ۲۰۰۲). بعلاوه آنزیم آسکوربات پراکسیداز در چرخه گلووتاتیون-آسکوربات، چرخه مهلر و گزانتوفیل نقش کلیدی ایفا کرده و همانند گلووتاتیون پراکسیداز، پراکسید هیدروژن را به آب تبدیل می‌کند. با این تفاوت که پتانسیل هیدروژن لازم برای اجرای این عمل از احیای آسکوربات تأمین می‌شود (فویر و نکتور، ۲۰۰۵).

مدل زیر (شکل ۲-۳) نحوه عمل آنزیم‌های آنتی اکسیدان را نشان می‌دهد. براساس مدل، ابتدا رادیکال سوپراکسید توسط آنزیم سوپراکسید دیسموتاز به پراکسید هیدروژن تبدیل می‌شود. سپس پراکسید هیدروژن بر اساس محل تولید خود به وسیله کاتالاز و یا پراکسیدازها به طور کامل احیاء شده و به آب تبدیل می‌گردد (اسادا، ۲۰۰۰).



شکل ۲-۳- مدل کلی نحوه عمل آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان

۲-۳-۴-۳- پایداری غشا

لیپیدهای غشا از دو نوع اسیدهای چرب اشباع و غیراشباع تشکیل شده‌اند که اسیدهای چرب غیراشباع در سیالیت غشاء بسیار مهم می‌باشند. گونه‌های فعال اکسیژن می‌توانند با اسیدهای چرب غیرساختاری واکنش داده سبب پراکسیداسیون لیپیدهای اصلی غشا در پلاسما یا اندامک‌های داخل سلول شوند. گیاهان برای

کاهش دادن اثر مخرب گونه‌های فعال اکسیژن سازوکارهای متفاوتی دارند، از جمله این سازوکار می‌توان به سیستم غیردفاعی به‌وسیله مارکرهای شیمیایی نظیر مالون‌دی‌آلدئید اشاره کرد (دونگ و همکاران، ۲۰۱۳). بررسی غلظت مالون‌دی‌آلدئید بافت گیاهی می‌تواند بیانگر میزان تخریب غشاء سلولی باشد زیرا این ترکیب تحت تأثیر تخریب و پراکسیده شدن غشاء سلولی آزاد می‌شود (باتاچارجی و مخرجی، ۲۰۰۲).

۲-۳-۴-۴- اسید آمینه پرولین

بین تحمل گیاهان به تنش و تولید شاخص‌های بیوشیمیایی مختلف در گیاه همبستگی مثبتی وجود دارد. از بهترین شاخص‌های بیوشیمیایی شناسایی شده در سلول‌های گیاهی گلیسین بتایین (ترکیب آمونیوم کواترنری) و پرولین (اسید آمینه) است که نقش متفاوتی را در تنظیم اسمزی و محافظت از ساختارهای سلولی در گیاهان تحت تنش بر عهده دارند (پرویز و ستیواتی، ۲۰۰۸). پرولین یکی از رایج‌ترین ترکیبات محافظ اسمزی است که در تنش شوری تجمع می‌یابد. پرولین نقش‌هایی از قبیل تنظیم اسمزی، تنظیم واکنش‌های اکسایش و کاهش، تنظیم pH و تورژسانس را به عهده دارد که زمینه سازش و یا تحمل در برابر شوری را فراهم می‌نماید. پرولین همچنین به عنوان منبع کربن و نیتروژن برای ترمیم و رشد پس از تنش، برای تثبیت غشاء، تشکیلات سنتز پروتئین و آنزیم‌های سیتوپلاسمی و به عنوان یک جاروب کننده رادیکال‌های آزاد عمل می‌کند (ویسانی و همکاران، ۲۰۱۲). تجمع پرولین آزاد در سلول باعث از بین رفتن رادیکال‌های آزاد اکسیژن، حلالیت پروتئین‌های مختلف و واکنش با قسمت‌های سطحی آب‌گریز و افزایش سطح آب دوستی پروتئین (که افزایش حلالیت در یک محیط کم آب را سبب می‌شود)، جلوگیری از تجزیه شدن آنزیم‌ها، تنظیم اسمزی و حفظ حالت طبیعی غشاء می‌شود (کونستانینوا و همکاران، ۲۰۰۲). مسیر اصلی سنتز پرولین در گیاهان به این صورت است که L - گلوتامیک اسید با آنزیم دلتا-۱-پرولین-۵ کربوکسیلات سنتتاز (P5CR) و مصرف یک ATP و احیاء شدن NADPH تبدیل به گلوتامیک-۷-سمی آلدئید می‌شود که به‌طور خود به خودی تبدیل به دلتا-۱-پرولین-۵ کربوکسیلات می‌گردد. این ماده به کمک آنزیم P5CR و احیاء شدن NADPH به L - پرولین تبدیل می‌شود (ویسانی، ۲۰۱۲). بر این اساس

مسیر سنتز پرولین یک سازوکار سازگاری برای کاهش تجمع NADPH است. در اثر کاهش سرعت فتوسنتز گیاه مقدار NADPH افزایش می‌یابد. مسیر سنتز پرولین نسبت سرعت فتوسنتز به مقدار NADPH را در حدی که برای متابولیسم گیاه مناسب است، حفظ می‌کند. همچنین این مسیر برای کم کردن حالت اسیدی سیتوپلاسم به شمار می‌رود (دروند و همکاران، ۲۰۰۰). بعد از اتمام شرایط تنش، کاتابولیسم پرولین آغاز شده و باعث تولید ATP می‌شود. در اثر این فرآیند، گیاه از حالت تنش خارج شده و خسارت ناشی از تنش در گیاه جبران می‌شود. محققین بیان نمودند که افزایش تنش شوری سبب افزایش میزان پرولین در گیاهان جو (کیانی و همکاران، ۲۰۱۷)، گندم (بابایی و همکاران، ۲۰۱۷) برنج (لی و همکاران، ۲۰۱۷) و نعنای فلفلی (عسکری و همکاران، ۲۰۱۷) شده است.

۲-۳-۴-۵- قند

از راه کارهای دیگر که گیاهان برای مقاومت در برابر تنش شوری از خود نشان می‌دهند تجمع قندهای محلول شامل ساکارز، فروکتوز، گلوکز، ترهالوز و رافینوز می‌باشد (رحمانی و همکاران، ۲۰۱۷). تجمع کربوهیدرات‌ها تحت تنش شوری نقش برجسته‌ای را در حفاظت و تنظیم اسمزی، نگهداری کربن و جمع‌آوری رادیکال‌های آزاد بازی می‌کند. این افزایش می‌تواند به دلیل اثر تنش شوری بر کاهش قدرت انتقال آوندهای آبکش و یا تقلیل در مصرف اندام‌های مصرف کننده به دلیل کاهش فتوسنتز باشد (پرویز و ستیواتی، ۲۰۰۸). در همین زمینه پنگ و همکاران (۲۰۱۶) طی تحقیقات خود روی گیاه پنبه دریافتند پس از اعمال تیمار شوری فعالیت آنزیم ساکاروز فسفاتاز افزایش می‌یابد. آنان دلیل افزایش قندهای محلول را حاصل افزایش فعالیت این آنزیم در گیاه دانستند.

۲-۳-۴-۶- پراکسید هیدروژن

در اثر تنش‌های محیطی گونه‌های فعال اکسیژن مانند H_2O_2 ، O_2^- ، OH^- تولید می‌شوند. به نظر می‌رسد در میان گونه‌های مختلف فعال اکسیژن، پراکسید هیدروژن برای پیام‌رسانی از مابقی فرم‌های فعال اکسیژن

مناسب‌تر باشد، زیرا پایداری و نیمه عمر بالاتری دارد. گونه‌های فعال اکسیژن از طریق واکنش‌های انتقال الکترون در میتوکندری و کلروپلاست تشکیل شده و سریعاً به پراکسید هیدروژن تبدیل می‌شود. همچنین در سلول‌ها، پراکسید هیدروژن از طریق واکنش‌هایی که واسطه آنزیمی دارند، مانند گلیکولات اکسیداز در تنفس نوری ایجاد می‌شود و اگسالات اکسیداز و اگسالات، اکسیژن را به پراکسید هیدروژن و دی‌اکسید کربن تبدیل می‌کند (حسیبی و همکاران، ۱۳۸۷).

اگر پراکسید هیدروژن به‌عنوان پیام تنش عمل کند باید مقدار آن در معرض تنش محیطی تغییر کند. گونه‌های فعال اکسیژنی که در تنش شوری تولید می‌شوند، به‌عنوان یک پیام رسان برای القاء سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی در سلول عمل می‌کنند. پراکسید هیدروژن با سیستم‌های درون پروتئین واکنش می‌دهد که این فرآیند باعث تغییر شکل پروتئین شده و روی فعالیت آن تأثیر می‌گذارد. پراکسید هیدروژن تولید شده در شرایط تنش بسیار سمی است و باعث خسارت یا حتی مرگ سلول می‌شود. علاوه بر ویژگی ذکر شده، پراکسید هیدروژن پیام مولکولی فعال‌کننده سیستم دفاعی برای برقراری مجدد حالت هموستازی سلول به‌شمار می‌رود (هونگ و همکاران، ۲۰۰۵).

۲-۳-۴-۷- پروتئین

هنگامی که گیاه در معرض تنش قرار می‌گیرد تغییرات کمی و کیفی پروتئین‌ها از جمله تغییر در بیان، تجمع و سنتز آن‌ها مشاهده می‌شود. پروتئین‌های سنتز شده در پاسخ به تنش شوری دهیدرین نامیده می‌شوند، و شامل ویژگی‌هایی مانند آبدوستی، برخوردار بودن سیستم‌های تریپتوفان آزاد، حساس بودن به ABA و غنی بودن از لیزین می‌باشند. این پروتئین‌ها ممکن است نقش حفاظتی در پایداری ماکرومولکول‌ها را از طریق اتصال مولکول‌های آب به سطح آبدوستشان داشته باشند که از دنا توره شدن پروتئین‌های سلولی جلوگیری می‌کند (محمدخانی و حیدری، ۲۰۰۸).

۲-۳-۵- فلورسانس کلروفیل

فلورسانس کلروفیل بازتاب واکنش‌های اولیه فتوسنتز است که رابطه پیچیده بین روند فلورسانس و فتوسنتز به درک فرایندهای بیوفیزیکی فتوسنتز کمک می‌کند (ساید، ۲۰۰۳). بررسی کارایی فتوسنتزی روی گیاهان به‌خصوص در شرایط محیطی تنش‌زا بدون اطلاع در مورد فلورسانس کلروفیل ناقص به نظر می‌رسد (ماکسول و جانسون، ۲۰۰۰). امروزه پتانسیل استفاده از تکنیک فلورسانس کلروفیل برای غربالگری گونه‌های گیاهی در تحمل به تنش‌های محیطی به اثبات رسیده است و اخیراً نیز از این تکنیک به صورت گسترده‌ای در مطالعات اکوفیزیولوژیکی روی گیاهان زراعی مهم و سایر گونه‌های گیاهی استفاده می‌شود (اسفندیاری و همکاران، ۱۳۸۶).

در زنجیره انتقال الکترون $NADP^+$ به‌عنوان گیرنده نهایی الکترون برانگیخته می‌شود. در شرایط مطلوب رشدی، بین مصرف محصولات زنجیره انتقال الکترون (ATP و $NADPH, H^+$)، واکنش نوری فتوسنتز و تثبیت دی‌اکسید کربن تعادل وجود دارد. بنابراین نسبت $NADP^+/NADPH, H^+$ بالا می‌ماند و جریان الکترون مسیر عادی خود را طی می‌کند (اسفندیاری، ۱۳۸۶). در شرایط بروز تنش، سرعت فتوسنتز کاهش می‌یابد و سبب افت نسبت $NADP^+/NADPH, H^+$ می‌گردد، در نتیجه به دلیل عدم وجود $NADP^+$ ، مسیر خطی انتقال الکترون با اشکال مواجه شده و الکترون اجباراً روی O_2 منتقل و در نتیجه تولید انواع اکسیژن فعال افزایش می‌یابد. در نهایت این ترکیبات سبب تخریب پروتئین‌های تشکیل دهنده PSI و $PSII$ شده و با اختلال در زنجیره انتقال الکترون، اغلب بازدارندگی نوری اتفاق می‌افتد (اسکولتز، ۲۰۰۳ و اسفندیاری، ۱۳۸۶).

هر کوانتوم جذب شده به وسیله‌ی مولکول کلروفیل یک الکترون را از حالت پایه به حالت برانگیخته می‌رساند. قسمتی از این انرژی نوری جذب شده به وسیله‌ی مولکول‌های کلروفیل برگ برای اجرای فرآیند فتوسنتز (خاموشی فتوشیمیایی) مصرف می‌شود، انرژی اضافی به صورت گرما هدر می‌رود (خاموشی غیر فتوشیمیایی) یا اینکه به صورت نور قرمز بازتاب داده می‌شود (فلورسانس کلروفیل) (ناینایاک، ۲۰۰۷). در زیر به شرح مختصری در مورد هر یک از آنها پرداخته خواهد شد.

خاموشی فتوشیمیایی

خاموشی فتوشیمیایی کارایی گیاه در استفاده از محصولات نوری فتوسنتز می‌باشد یعنی اجرای چرخه کالوین و تثبیت دی‌اکسید کربن که در طی آن NADPH^+ و ATP مصرف می‌شود. هر چه شاخص مذکور بیشتر باشد فتوسنتز با وضعیت مطلوب‌تری در حال جریان است (بیساتی و همکاران، ۲۰۰۰).

خاموشی غیرفتوشیمیایی

خاموشی غیرفتوشیمیایی توانایی گیاه را در به هدر دادن انرژی اضافی به شکل گرما نشان می‌دهد. در شرایط تنش خاموشی فتوشیمیایی کاهش می‌یابد (اسفندیاری، ۱۳۸۶؛ باکو و کارپنتیر، ۲۰۰۳؛ دهاسه و همکاران، ۲۰۰۴). خاموشی غیر فتوشیمیایی از سه جزء تغییر حالت تیلاکوئید، بازدارندگی نوری و خاموشی انرژی تشکیل شده است.

تغییر حالت تیلاکوئیدها باعث کاهش میزان انرژی دریافتی توسط تیلاکوئیدهای کلروپلاستی می‌گردد (سوبرامانیام و همکاران، ۲۰۰۶؛ لی و همکاران، ۲۰۰۶).

بازدارندگی نوری یک سازوکار تحمل به شدت‌های بالای نور است، در این سازوکار در واقع فتوسنتز متوقف می‌شود که دلیل آن آسیب به تیلاکوئید است. در این حالت دیگر جریان الکترون وجود ندارد تا انواع اکسیژن فعال تولید شوند (سرودیف و همکاران، ۲۰۰۵، مولر و همکاران، ۲۰۰۱).

خاموشی انرژی مهمترین بخش خاموشی غیرفتوشیمیایی است که طی آن چرخه گزانتوفیل فعال شده و باعث مصرف NADPH و H^+ می‌شود. با این عمل علاوه بر تعدیل نسبت $\text{NADP}^+/\text{NADPH}, \text{H}^+$ ، اکسیژن را نیز که سوبسترای اولیه تولید انواع اکسیژن فعال است مصرف می‌کند (اورت، ۲۰۰۱؛ مولر و همکاران، ۲۰۰۱).

فلورسانس کلروفیل *a*

انرژی حاصل از نور بعد از جذب به وسیله مولکول‌های کلروفیل برگ، در طول زنجیره انتقال الکترون منتقل و برای اجرای فرآیند فتوسنتز (خاموشی فتوشیمیایی) مصرف می‌گردد و انرژی اضافی یا به صورت گرما هدر می‌رود (خاموشی غیرفتوشیمیایی) یا به صورت نور قرمز بازتاب داده می‌شود که فلورسانس کلروفیل نامیده می‌شود (بیکر، ۲۰۰۸). در گیاهان سالم ۸۰ درصد از انرژی جذب شده توسط برگ به مسیر فتوشیمیایی انتقال می‌یابد و از ۲۰ درصد باقی‌مانده بخش بیشتر آن (۱۵-۱۸ درصد) بصورت گرما هدر می‌رود (خاموشی غیرفتوشیمیایی) و ۵-۲ درصد باقی‌مانده بصورت فلورسانس انتشار می‌یابد (بوسکمن، ۱۹۹۵؛ والکر، ۱۹۸۷). این سه فرایند به صورت رقابتی اتفاق می‌افتند، بنابراین از طریق اندازه‌گیری عملکرد فلورسانس کلروفیل، می‌توان اطلاعاتی در مورد تغییرات در کارایی فتوشیمیایی و هدر رفت گرمایی به دست آورد (لازر، ۱۹۹۹). بر اساس پژوهش‌های انجام شده، جریان الکترون در فتوسنتز، شاخصی برای میزان کلی فتوسنتز می‌باشد به طوری که اندازه‌گیری فلورسانس کلروفیل، تخمین میزان جریان الکترون و نحوه‌ی عمل فتوسنتز را امکان‌پذیر می‌سازد (ماکسول و جانسون، ۲۰۰۰). از سوی دیگر، فلورسانس کلروفیل به عنوان بازتاب واکنش‌های اولیه فتوسنتز (ساید، ۲۰۰۳)، یک شاخص فیزیولوژیک معتبر برای مشخص نمودن تغییرات القایی در دستگاه فتوسنتزی می‌باشد که عملیات ارزیابی آن، بدون تخریب بافت گیاهی و در کمترین زمان صورت می‌گیرد (مهاتا و همکاران، ۲۰۱۰). تاکنون از فلورسانس کلروفیلی برای مطالعه‌ی واکنش گیاهان در شرایط تنش‌های مختلف از جمله شوری (یامان و همکاران، ۲۰۰۸)، خشکی (زلاتیو، ۲۰۰۹؛ یعقوبیان، ۱۳۹۱)، سرما (حسینی و همکاران، ۱۳۹۳؛ جنابیان و همکاران، ۱۳۹۰) و عناصر سنگین (شهابی‌وند و همکاران، ۲۰۱۲) استفاده گردیده است.

فلورسانس حداقل (F_0)

وقتی به برگ سازگار به تاریکی نور تابانیده می‌شود، در آن لحظه همه مراکز واکنشی باز است (مهاتا و همکاران، ۲۰۱۰) بنابراین توان استفاده از انرژی برانگیخته در حداکثر میزان ممکن آن می‌باشد. از این رو قسمت بیشتری از انرژی مولکول برانگیخته در واکنش فتوشیمیایی مصرف و فلورسانس را به حداقل ممکن می‌رساند که به عنوان فلورسانس حداقل شناخته می‌شود (ماکسول و جانسون، ۲۰۰۰).

فلورسانس حداکثر (F_m)

وقتی تابش فتون‌های نوری به برگ سازگار به تاریکی ادامه می‌یابد، همه ناقل‌های الکترون به فرم احیا در آمده و همه مراکز واکنشی بسته می‌شوند، در این حالت فلورسانس به حداکثر خود می‌رسد که به آن فلورسانس حداکثر اطلاق می‌گردد (ماکسول و جانسون، ۲۰۰۰). میزان فلورسانس حداکثر در شرایط تنش به علت کاهش فعالیت کمپلکس تجزیه کننده و کاهش فعالیت فتوسیستم II کاهش می‌یابد (ارو و همکاران، ۱۹۹۳).

فلورسانس متغیر (F_v)

فلورسانس متغیر از تفاضل فلورسانس ماگزیمم و فلورسانس حداقل محاسبه می‌شود ($F_v = F_m - F_0$)، بیشتر بودن F_v نشان دهنده عملکرد خوب سازوکار فلورسانس کلروفیل در شرایط تنش و کاهش سرعت واکنش‌های فتوشیمیایی است (بیکر و روسنکوئیست، ۲۰۰۴).

حداکثر کارایی کوانتومی فتوسیستم II (F_v/F_m)

پارامتر F_v/F_m حداکثر کارایی کوانتومی فتوسیستم II برای تبدیل نور جذب شده به انرژی شیمیایی را نشان می‌دهد (کوچوا و همکاران، ۲۰۰۴). مقدار این پارامتر برای بیشتر گونه‌های گیاهی در شرایط معمول محیط در حدود ۰/۸۳ می‌باشد و در شرایط تنش کاهش می‌یابد (فرچبودف، ۲۰۰۶)، افت این شاخص

نتیجه خسارت به مراکز واکنشی فتوسیستم II است و نشان‌دهنده بروز بازدارندگی نوری در اثر تنش‌های محیطی می‌باشد (بیکر و روزنکوئیست، ۲۰۰۴؛ گونکوس و همکاران، ۲۰۰۷). از جمله عوامل کنترل‌کننده این شاخص می‌توان به فتوشیمی اولیه PSII (شامل جدا کردن شارژ، ترکیب و پایداری)، از دست دادن انرژی برانگیخته در آنتن‌های برداشت‌کننده نور به شکل غیرتشنه‌شی و خاموشی مولکول‌های برانگیخته با استفاده از احیای مولکول‌های پلاستوکینون اکسید موجود در خزانه کینون‌ها اشاره کرد (لازر، ۲۰۰۳).

فلورسانس حداقل (F_o') در مرحله روشنایی

حداقل سطح فلورسانس در برگ سازگار به روشنایی را نشان می‌دهد. در این شرایط فتوسنتز فعال است و مادون قرمز به کار برده شده باعث تحریک مراکز واکنش فتوسیستم I شده بنابراین سیستم انتقال الکترون و مراکز فتوسیستم II بطور متناوب تحریک می‌شوند (بیکر، ۲۰۰۸).

فلورسانس حداکثر (F_m') در مرحله روشنایی

حداکثر فلورسانس در برگ سازگار به روشنایی را نشان می‌دهد که با تابش پالس اشباع نوری که بطور موقتی تمام مراکز واکنشی فتوسیستم II را می‌بندد، اندازه‌گیری می‌شود. میزان F_m' نسبت به F_m به دلیل فرایند خاموشی غیرفتوشیمیایی کمتر می‌باشد (فرچبود، ۱۹۹۹).

عملکردهای کوانتومی

براساس پژوهش کرامر و همکاران (۲۰۰۴) جریان انرژی برانگیختگی در فتوسیستم II در سه مسیر اصلی متفاوت قرار می‌گیرد که عبارتند از کاربرد فتوشیمیایی، هدر رفت گرمایی تنظیم‌شده که یک فرایند اتلافی برای حفاظت فتوسیستم II محسوب می‌شود و هدر رفت گرمایی تنظیم نشده که یک فرایند اتلافی است که موجب غیر فعال شدن فتوسیستم II می‌شود. این سه جریان به ترتیب به‌عنوان عملکردهای کوانتومی $Y(NO)$ و $Y(NPQ)$ ، $Y(II)$ شناخته می‌شوند.

Y(II)

کارایی کوانتومی فتوشیمیایی مؤثر فتوسیستم II [Y(II)]، نسبت نور استفاده شده در فرآیند فتوسنتز به کل نور جذب شده به وسیله کلروفیل مربوط به فتوسیستم II را نشان می‌دهد که به طور مستقیم به سرعت اسیمیلاسیون CO₂ در برگ وابسته است (جنتی و همکاران، ۱۹۸۹؛ لی و همکاران، ۲۰۰۸).

Y(NPQ)

کارایی کوانتومی غیرفتوشیمیایی تنظیم شده فتوسیستم II [Y(NPQ)]، در حقیقت هدر رفت گرمایی مربوط به سیستم حفاظت نوری را نشان می‌دهد که وابسته به فعالیت چرخه گزانتوفیل و مصرف NADPH, H⁺ و همچنین مصرف اکسیژن به عنوان سوسترای اولیه تولید انواع اکسیژن فعال، می‌باشد (اورت، ۲۰۰۱؛ مولر و همکاران، ۲۰۰۱).

Y(NO)

کارایی کوانتومی غیرفتوشیمیایی تنظیم نشده فتوسیستم II [Y(NO)] نیز سایر اجزای غیرمرتبط با حفاظت نوری است که منجر به بازدارندگی نوری و توقف فتوسیستم II و همچنین فتوسنتز می‌گردد (سرودیف و همکاران، ۲۰۰۵؛ مولر و همکاران، ۲۰۰۱).

NPQ

خاموشی غیرفتوشیمیایی (NPQ) اساساً مربوط به هدر رفت گرمایی است و گستره‌ی آن بین صفر تا بی‌نهایت است. مقدار معمول آن برای گیاه بین ۰/۵ تا ۳/۵ در شدت نور اشباع است (ماکسول و جانسون، ۲۰۰۰). افزایش این پارامتر بیانگر ظرفیت بالای چرخه گزانتوفیل و توانایی گیاه در دفع تنش از طریق هدر دادن انرژی به صورت گرما می‌باشد (بیکر و روزنکوئیست ۲۰۰۴؛ ماکسول و جانسون، ۲۰۰۰).

۲-۳-۵-۲- اثر تنش‌های محیطی بر پارامترهای فلورسانس کلروفیل *a*

در مطالعات متعدد ثابت شده است که اندازه‌گیری فلورسانس کلروفیل برگ‌ها، روش معتبر و قابل اطمینانی برای مطالعه فرآیندهای فتوسنتزی و ارزیابی وضعیت فیزیولوژیک گیاه به‌ویژه در ارتباط با تنش‌های محیطی می‌باشد و مطالعات زیادی نیز در مورد اثرات تنش‌های محیطی بر فلورسانس کلروفیل *a* صورت گرفته است. به‌عنوان مثال بهاری ساروی و همکاران (۱۳۹۶) اثر تنش شوری بر پارامترهای فلورسانس کلروفیل در گیاه دارویی ریحان را بررسی و بیان داشتند که با افزایش تنش شوری پارامتر F_0 کاهش و پارامترهای F_v ، F_m و F_v/F_m افزایش معنی‌داری نشان دادند. در همین راستا طی پژوهش‌هایی که در گیاه برنج (یامان و همکاران، ۲۰۰۸)، چغندر قند (ماسوجیدک و همکاران، ۱۹۹۱)، ارقام مختلف گندم (چا-نوم و همکاران، ۲۰۰۹)، گیاه دارویی ریحان (بهاری ساروی و همکاران، ۱۳۹۶)، نعنای فلفلی (خالوندی و همکاران، ۱۳۹۶)، بادام (مومن‌پور و همکاران، ۱۳۹۳)، کرچک (*Ricinus communis*) (لی و همکاران، ۲۰۱۰) و رزماری (*Rosmarinus officinalis*) انجام شد نشان داد که شوری موجب کاهش پارامترهایی چون F_v ، F_m و عملکرد کوانتومی فتوسیستم II و افزایش خاموشی غیرفتوشیمیایی افزایش می‌شود. همچنین در گیاه لوبیا تنش خشکی باعث افزایش فلورسانس حداقل (F_0)، کاهش فلورسانس حداکثر (F_m) و در نتیجه کاهش کارایی کوانتومی شد (زلاتیف و یوردانو، ۲۰۰۴). زلاتیف (۲۰۰۹) نیز اظهار داشت که در گیاهچه‌های گندم زمستانه که تحت تنش خشکی قرار گرفتند، F_0 افزایش و F_v ، F_m و همچنین F_v/F_m کمتر شد. حسنی و همکاران (۱۳۹۳) در بررسی در گیاه برنج و جنابیان و همکاران (۱۳۹۴) در سویا، تحت تنش سرما کاهش F_v/F_m ، F_v ، F_m و همچنین افزایش $Y(NPQ)$ و $Y(NO)$ و NPQ را گزارش نمودند. همچنین در تنش دمایی بالا در گیاه ذرت نیز کاهش عملکرد کوانتومی فتوسیستم II مشاهده گردید (بیکر و روزنکوئیست، ۲۰۰۴).

۲-۴- پلی آمین‌ها

پلی آمین‌ها دسته وسیعی از ترکیبات طبیعی با وزن مولکولی کم می‌باشند که اولین بار در سال ۱۶۷۸ شناخته شدند (کویر- آوهانی و همکاران، ۲۰۰۳). این مولکول‌های کوچک علی‌رغم سادگی ساختار آن‌ها، در بخش وسیعی از فعالیت‌های زیستی سلول‌های زنده شامل پروکاریوت‌ها، یوکاریوت‌ها، گیاهان و جانوران یافت می‌شوند. پلی آمین‌ها در تمامی بخش‌های سلول گیاهی از جمله هسته وجود دارند بنابراین، طیف وسیعی از فرآیندهای زیستی شامل تقسیم سلولی، رشد، تمایز، پیری، جنین‌زایی سوماتیک، تشکیل ریشه و اندام هوایی، تکامل گرده، گلدهی، رسیدگی میوه و پاسخ به تنش‌های محیطی را در بر می‌گیرند. این ترکیبات ضروری سلول‌های گیاهی همانند فیتوهورمون‌ها موجب تنظیم فرآیندهای حیاتی مختلف در گیاه از جمله همانندسازی، رونویسی، تثبیت غشاء، تعدیل فعالیت آنزیمی گیاهان تحت شرایط تنش و نرمال و باعث افزایش سنتز پروتئین، RNA و DNA می‌شوند. شکل‌های عمده و مهم پلی آمین‌ها شامل پوتریسین، اسپرمیدین و اسپرمین می‌باشند. در سلول‌های یوکاریوتی پلی آمین‌ها از اسید آمینه‌های L- آرژینین و L- متیونین به وسیله یکسری از واکنش‌های وابسته به هم سنتز می‌شوند. آرژینین و اورنیتین به‌عنوان پیش‌سازهای پلی آمین‌ها محسوب می‌شوند. اورنیتین توسط آنزیم آرژیناز از اسید آمینه آرژینین سنتز می‌شود. آنزیم اورنیتین دکربوکسیلاز (ODC) به‌طور مستقیم با دکربوکسیله کردن اورنیتین تولید پوتریسین می‌نماید. مسیر دیگر بیوسنتزی پوتریسین از آرژینین دکربوکسیلاز (ADC) می‌باشد که شامل تولید ترکیب حدواسط آگماتین است و به دنبال آن با تأثیر آنزیم‌های آگماتین ایمینو هیدرولاز و N-کرباموئیل پوتریسین آمیدو هیدرولاز پوتریسین تولید می‌شود. البته در باکتری‌ها علاوه بر این مسیر تولیدی، پوتریسین می‌تواند به صورت مستقیم از فعالیت آنزیم آگماتیناز نیز تولید شود. در حیوانات و قارچ‌ها پوتریسین ابتدا از طریق فعالیت ODC سنتز می‌شود، در حالی که در گیاهان و باکتری‌ها مسیر عمده تولید پلی آمین‌ها مسیر ADC می‌باشد. بنابراین، در گیاهان مسیر تولید پوتریسین و به دنبال آن سایر پلی آمین‌ها از طریق آرژینین و به‌وسیله آنزیم آرژینین دکربوکسیلاز به‌عنوان یک مسیر فرعی در کنار مسیر اورنیتین انجام می‌شود (کویر- آوهانی و همکاران، ۲۰۰۳). گروه‌های آمینوپروپیل به‌وسیله ترکیب s-آدنوزیل متیونین به پوتریسین -

پوترسین دی هیدرو کلراید اضافه شده و تولید اسپرمیدین می نمایند و به دنبال آن آنزیم اسپرمین سنتاز نیز تولید اسپرمین - اسپرمین هیدرات می نماید.

۲-۴-۱- نقش پلی آمین ها در تنش های غیرزیستی

کاربرد خارجی پلی آمین ها می تواند فرآیندهای فیزیولوژیک، مورفولوژیکی و بیوشیمیایی گیاهان را تحت تأثیر قرار داده و به عنوان یک تنظیم کننده رشد مورد استفاده قرار گیرند (کویر - آوهانی و همکاران، ۲۰۰۳). پلی آمین ها به عنوان یکی از مهمترین ترکیبات ثانویه گیاهان در شرایط تنش به خصوص تنش های غیرزیستی عمل می کنند. اخیراً نقش پلی آمین ها در افزایش تحمل گیاهان به تنش ها از جمله شوری و خشکی مورد توجه قرار گرفته است. تعدیل تنش ها توسط پلی آمین ها را می توان به دلیل نقش آن ها در تنظیم اسمزی، پایداری غشا و حذف رادیکال های فعال و جلوگیری از تجمع این ترکیبات مضر دانست که باعث ایجاد تنش در سلول ها می شوند (لئو و همکاران، ۲۰۰۷؛ خان و همکاران، ۲۰۰۷).

اسپرمیدین یکی از پلی آمین های رایج در همه سلول های گیاهی است که از طریق آنزیم اسپرمیدین سنتاز (SPDS) و با افزودن یک نیمه آمینو پروپیل به پلی آمین پوترسین حاصل می شود (لئو و همکاران، ۲۰۰۷). در مطالعات گذشته گزارش شده است که کاربرد پلی آمین اسپرمیدین در گیاه فلفل (نوح پیشه و کلانتری، ۱۳۹۰)، نخودفرنگی (حسین و همکاران، ۲۰۰۶) و برنج (رای و همکاران، ۲۰۰۵) منجر به تخفیف شوری شده و رشد گیاه را بهبود بخشید. همچنین پلی آمین ها از نسخه برداری، تولید و فعالیت آنزیم ACC سینتتاز جلوگیری کرده و منجر به کاهش سطوح ACC اکسیداز و کاهش تولید اتیلن شده و به دنبال آن باعث افزایش مقاومت گیاهان در شرایط تنش های محیطی می گردد (لی و همکاران، ۱۹۹۷). در همین راستا، تومادس و ریچاردسون (۱۹۹۸) بیان داشتند، تیمار اگزوزن پلی آمین ها در گوجه فرنگی، آووکادو و گلابی با ممانعت از فعالیت آنزیم ACC سینتتاز بیوسنتز اتیلن را به شدت کاهش می دهد.

۲-۴-۲- اثر پلی آمین ها بر مقاومت به تنش شوری در گیاه

پلی آمین ها نقش مهمی در پاسخ به تنش در گیاهان بازی می کنند که به گونه گیاهی و نوع تنش بستگی دارد، به طوری که خصوصیات چربی دوستی پلی آمین ها نقش ویژه ای در تعادل یونی سلول و تنش شوری ایفا می کند (شارما و همکاران، ۲۰۱۱). از سوی دیگر، افزایش تولید پلی آمین ها می تواند با حذف رادیکال های آزاد، تثبیت غشاء و ساختارهای سلولی و افزایش مقدار انرژی سلول به وسیله تحریک ساخت ATP، موجب افزایش مقاومت به شوری شده و از گیاهان در برابر تنش شوری محافظت کنند (گالستون و همکاران، ۱۹۹۷).

قابلیت اتصال پلی آمین ها به پروتئین ها، اسیدهای نوکلئیک و لیپیدها می تواند از ساختار این ماکرومولکول ها در مقابل تنش های غیرزیستی از جمله شوری و خشکی محافظت نموده و سبب پایداری آن ها گردد. به عنوان مثال، بیان شده است که تیمار گیاهان قرار گرفته در معرض تنش شوری با پلی آمین ها موجب پایداری پروتئین های D₁ و D₂ تیلاکوئیدها، سیتوکروم ها و روبیسکو می شود (احمد و همکاران، ۲۰۱۳؛ آروز و احمد، ۲۰۱۵).

گزارش های متعددی در مورد نقش پلی آمین ها در کاهش اثرات ناشی از تنش شوری وجود دارد، برای مثال گزارش شده که کاربرد اسپرمیدین روی گیاهچه های برنج در معرض تنش شوری، موجب کاهش آسیب به غشای پلاسمایی و پمپ ATPase و مقاومت گیاه در شرایط شور گردید (کریشناموری و باقوت، ۱۹۸۹؛ رای و همکاران، ۲۰۰۵). همچنین در گیاه فلفل کاربرد اسپرمیدین در شرایط شور، موجب کاهش مقدار مالون دی آلدئید، افزایش مقدار پروتئین کل، طول ریشه و آنزیم های آنتی اکسیدانی جهت از بین بردن رادیکال های فعال اکسیژن گردید که منجر به کاهش پراکسیداسیون لیپیدها در غشاء شد و بدین صورت توانست علائم ناشی از تنش و آسیب ها را در گیاه بهبود بخشد (نوح پیشه و همکاران، ۱۳۹۰). همچنین نقش پلی آمین در کاهش خسارت ناشی از تنش شوری در سویا به افزایش محتوای پروتئین، وزن تر غلاف ها و دانه ها، کاهش نشت الکتروولیت و افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی مربوط می شود (رادهاکریشنان و لی، ۲۰۱۳).

با وجود تمامی آنچه گفته شد، مطالعه هم‌زمان تلقیح با قارچ‌های اندوفیت پریفورموسپورا و تریکودرما و کاربرد پلی‌آمین اسپرمیدین و مقایسه تأثیر آن‌ها بر مقاومت به تنش شوری در گیاه دارویی استویا تاکنون صورت نپذیرفته است. بنابراین پژوهش حاضر با هدف شناخت بیشتر برهمکنش این قارچ‌ها و گیاه استویا در شرایط تنش شوری و هم‌در شرایط کنترل‌شده گلخانه و هم‌در شرایط مزرعه طراحی و اجرا شد.

فصل سوم: مواد و روش‌ها

برای دستیابی به اهداف این تحقیق، آزمایش‌ها در دو بخش گلخانه‌ای و مزرعه‌ای اجرا گردید:

۳-۱- بخش گلخانه‌ای

آزمایش گلخانه‌ای در بهار و تابستان سال ۱۳۹۵ در پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان واقع در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا شد. در این بخش، گیاه استویا با شرایط نور طبیعی، دمای مطلوب (۲۰ تا ۲۴ درجه سانتی‌گراد) و رطوبت ۷۰ درصد رشد یافت.

۳-۱-۱- تهیه و ضدعفونی خاک

خاک مورد استفاده برای گلدان‌ها از عمق صفر تا ۳۰ سانتی‌متری خاک مزرعه تحقیقاتی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری تهیه شد. برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک گلدان‌ها و مزرعه در جدول ۳-۱ آورده شده است. خاک مورد استفاده در گلدان‌ها پس از عبور از الک دو میلی‌متری با نسبت ۱:۲ با پیت‌ماس مخلوط گردید.

جدول ۳-۱- برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک مورد استفاده در آزمایش

مقدار	واحد	خصوصیات
۰/۹۱	دسی‌زیمنس بر متر	هدایت الکتریکی
۷/۲	-	اسیدیته
۲/۱۹	درصد	کربن آلی
۹/۷۰	میلی‌گرم بر کیلوگرم	فسفر قابل جذب
۲۵۵	میلی‌گرم بر کیلوگرم	پتاسیم قابل جذب
۰/۲۱	درصد	نیتروژن
رسی-سیلتی	-	بافت خاک

به منظور جلوگیری از اثر ناخواسته سایر ریزجانداران موجود در خاک و بررسی دقیق‌تر اثر قارچ‌های *P. indica* و *T. virens*، خاک مورد استفاده درون کیسه‌های کنفی در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و به مدت یک ساعت با سه مرحله تکرار (با فاصله‌ی یک روز) استریل شد. گلدان‌های مورد استفاده با ارتفاع

۲۰ سانتی‌متر و قطر ۱۸ سانتی‌متر ابتدا با آب و صابون شسته و سپس با هیپوکلریت سدیم دو درصد ضدعفونی شده و سپس خاک به گلدان‌ها اضافه شد. نشاهای استویا مورد نیاز در این تحقیق، از آزمایشگاه کشت بافت پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان تهیه گردید.

۳-۱-۲- تیمارهای مورد استفاده

فاکتورهای آزمایش شامل تنش شوری در سه سطح (صفر، ۶ و ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر)، تیمار همزیستی قارچی شامل چهار سطح (عدم تلقیح، تلقیح *Piriformospora indica*، تلقیح *Trichoderma virens* و تلقیح هم‌زمان *P. indica* و *T. virens*) و تیمار پلی‌آمین اسپرمیدین در سه سطح (صفر، ۰/۷۵ و ۱/۵ میلی‌مولار) بود.

۳-۱-۳- اعمال تیمارهای قارچی

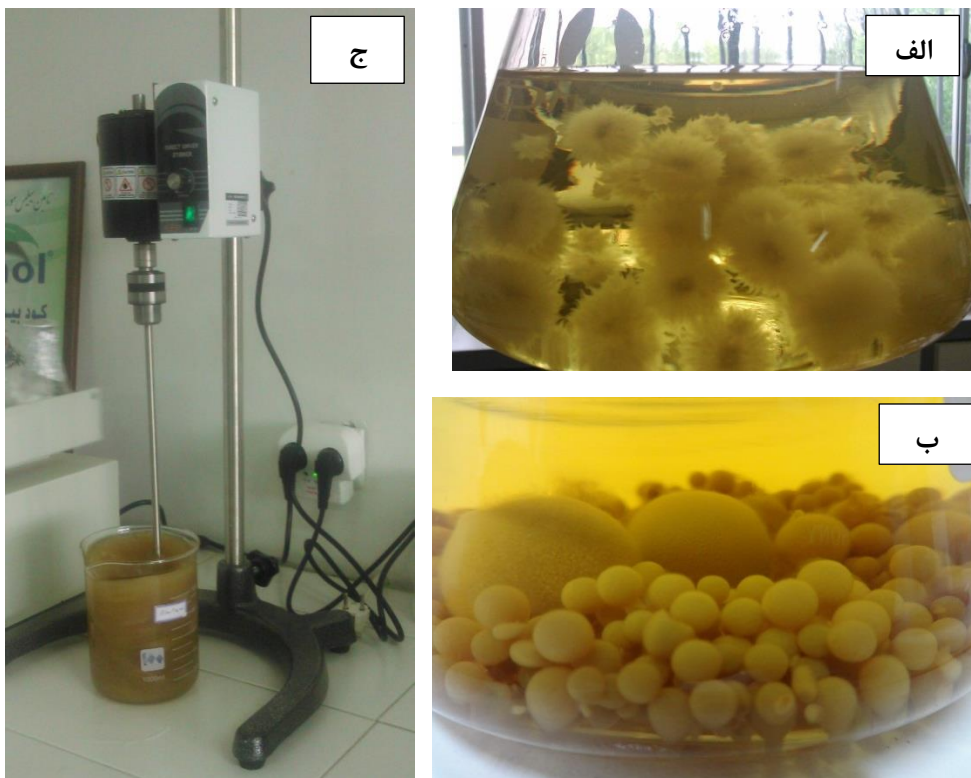
قارچ اندوفیت *Piriformospora indica* در محیط کشت جامد^۴ کفر کشت شده و به مدت ده روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. سپس به محیط کشت مایع کفر منتقل و به مدت دو هفته در شیکرانکوباتور با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و سرعت چرخش ۱۲۰ دور در دقیقه قرار داده شد تا رشد میسلیوم‌ها و اسپورزایی قارچ به حداکثر خود برسد. سپس زیست‌توده زنده آن که شامل میسلیوم‌ها و اسپورهای قارچی بود، توسط کاغذ صافی از محیط کشت جدا شده و با استفاده از محلول آب-توئین ۰/۰۵ درصد، سوسپانسیونی با غلظت حدود ۱۰^۹ واحد کلونی‌ساز در میلی‌لیتر تهیه و جهت تلقیح با گیاه استویا استفاده شد. قارچ *T. virens* نیز در ابتدا در محیط کشت PDA^۵ و سپس در محیط PDB^۶ و در شرایط مشابه با *P. indica* کشت شده و سوسپانسیون آن با غلظت حدود ۱۰^۹ کلونی در میلی‌لیتر جهت تلقیح با استویا تهیه شد (شکل ۳-۱). به منظور تلقیح قارچ‌ها، ابتدا ریشه‌ی گیاه استویا با سوسپانسیون قارچ *P. indica* و *T. virens* آغشته و سپس به گلدان‌های پلاستیکی کوچکی انتقال داده شده و مرحله سازگاری

^۴ Kefer

^۵ Potato Dextrose Agar

^۶ Potato Dextrose Broth

گیاه به مدت ۴۰ روز در اتاقک سازگاری سپری شد. در ادامه، نشاهای استویا در مرحله ۶ برگه (۹۵/۲/۲۷) به گلدان‌های اصلی (با ارتفاع ۲۰ سانتی‌متر، قطر ۱۸ سانتی‌متر و گنجایش سه کیلوگرم خاک خشک) منتقل و در گلخانه با شرایط نور طبیعی و دمای مطلوب (۲۰ تا ۲۴ درجه سانتی‌گراد) و رطوبت ۷۰ درصد قرار گرفت.



شکل ۳-۱- قارچ‌های *P. indica* (الف) و *T. virens* (ب) کشت شده در محیط کشت مایع جهت استفاده در آزمایش و آماده‌سازی سوسپانسیون قارچی جهت تلقیح با نشاهای گیاه دارویی استویا (ج).

۳-۱-۴- محلول پاشی پلی آمین اسپرمیدین

در اواخر مرحله رویشی (۹۰ روز بعد از تلقیح)، پلی آمین اسپرمیدین در سه غلظت متفاوت (صفر، ۰/۷۵ و ۱/۵ میلی‌مولار) روی استویا اسپری شد. برای تیمار شاهد (سطح صفر اسپرمیدین) به‌منظور یکسان‌سازی شرایط تیماری از آب مقطر استفاده شد.

۳-۱-۵- اعمال تیمار شوری

یک هفته پس از محلول‌پاشی اسپرمیدین، گیاهان استویا تحت تیمار شوری قرار گرفتند. تیمار شوری با افزودن آب شور دریای خزر (جدول ۳-۲) به آب آبیاری برای رسیدن به شوری مورد نظر، تهیه شد. جهت تهیه تیمارهای آب شور، آب دریا به وسیله آب مقطر رقیق شد و همزمان هدایت الکتریکی آب با دستگاه EC متر (مدل SyberScan CON 410، شرکت EUTECH، سنگاپور) کنترل گردید تا شوری آب به مقادیر مورد نظر (شش و ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر) برسد. پس از استقرار گیاه و در انتهای دوره‌ی رویشی اعمال تیمار شوری آغاز گردید. در این مدت به‌منظور اطمینان از رسیدن شوری به سطوح مورد نظر، در مقاطع مختلف چندین نمونه از خاک گلدان‌های تیمارهای مختلف تهیه و عصاره‌گیری شده و هدایت الکتریکی آنها مشخص گردید. نحوه اعمال تنش با توجه به عصاره اشباع خاک، هر یک روز در میان به میزان ۱۵۰ میلی‌لیتر برای هر گلدان صورت گرفت و برای گلدان‌های شاهد، از آب مقطر استفاده شد.

جدول ۳-۲- تجزیه شیمیایی آب دریا

مقدار	واحد	خصوصیات
۱۵	دسی‌زیمنس بر متر	هدایت الکتریکی
۸/۲	-	اسیدیته
۳۷۶۸/۴	میلی‌گرم در لیتر	سدیم
۷۷/۱۱	میلی‌گرم در لیتر	پتاسیم
۱۷	میلی‌گرم در لیتر	کلسیم
۵۴/۵	میلی‌گرم در لیتر	منیزیم

۳-۲- بخش مزرعه‌ای

آزمایش مزرعه‌ای در بهار و تابستان ۱۳۹۶ در مزرعه پژوهشی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری انجام شد. مزرعه پژوهشی در نه کیلومتری شمال شهر ساری با عرض جغرافیایی ۳۶ درجه و ۳۹ دقیقه شمالی و طول جغرافیایی ۵۳ درجه و ۴ دقیقه شرقی و ارتفاع ۱۴ متر پایین‌تر از سطح دریای آزاد است. در طول دوره اجرای آزمایش (اردیبهشت ماه تا انتهای شهریور ۱۳۹۶) میانگین دما ۲۵/۸ درجه سانتی‌گراد، مجموع بارندگی ۴۹/۹ میلی‌متر، متوسط رطوبت نسبی ۷۲/۹ درصد و میانگین ساعات آفتابی ۸/۶ ساعت در

روز بود. آزمایش به صورت اسپلنت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار انجام شد. سطوح فاکتورهای آزمایش مزرعه‌ای براساس نتایج به دست آمده از بخش گلخانه‌ای انتخاب شد. فاکتورهای آزمایش شامل تنش شوری در سه سطح (صفر، شش و ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر) به عنوان کرت اصلی و تیمار همزیستی قارچی شامل دو سطح (عدم تلقیح و تلقیح هم‌زمان دو قارچ *P. indica* و *T. virens*) و دو سطح تیمار پلی‌آمین اسپرمیدین (صفر و ۰/۷۵ میلی‌مولار) به عنوان کرت فرعی در نظر گرفته شدند.

۳-۲-۱- آماده‌سازی زمین

مزرعه پژوهشی دو بار در اسفند و فروردین ماه شخم زده و بعد از دو مرتبه روتیواتور در اردیبهشت ماه آماده کشت شد.

۳-۲-۲- کشت استویا

نشاهای استویا بعد از تلقیح ریشه آن با تیمارهای قارچی (همان‌طور که در بخش آزمایش گلخانه‌ای توضیح داده شد) در کرت‌هایی با ابعاد $۱/۶ \times ۲$ متر در اواخر اردیبهشت (۱۳۹۶/۲/۲۵) کشت شدند. فاصله بین ردیف‌ها ۴۰ سانتی‌متر (سه ردیف کاشت در هر کرت) و فاصله بوته روی ردیف ۲۰ سانتی‌متر در نظر گرفته شد. زمان اعمال تنش شوری همانند بخش گلخانه‌ای در انتهای دوره‌ی رویشی بود. قبل از اعمال تنش شوری، محلول پاشی با اسپرمیدین انجام شده و یک هفته پس از آن تنش شوری اعمال گردید. در آزمایش مزرعه‌ای نیز جهت اعمال تنش شوری از آب دریا استفاده شد که با توجه به تیمارهای اسمزی مورد نظر با آب آبیاری رقیق شد. تمام پارامترهای اندازه‌گیری شده در آزمایش‌گلدانی در آزمایش مزرعه‌ای تکرار شد.

۳-۳- صفات مورد بررسی

پس از گذشت دو هفته از اعمال تنش شوری، نمونه‌برداری و اندازه‌گیری صفات رویشی، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی انجام شد. بنابراین، پارامترهای فلورسانس کلروفیل و همچنین محتوای کلروفیل برگ (عدد SPAD) در آخرین برگ گسترش‌یافته گیاه به ترتیب با استفاده از دستگاه فلورومتر (PAM-2500, Walz, Germany) و کلروفیل‌متر (SPAD-502, Minolta, Japan) اندازه‌گیری شد. همچنین جهت اندازه‌گیری رنگی‌های کلروفیلی (شامل کلروفیل *a*، *b* و کارتنوئید)، محتوای نسبی آب برگ و نشت الکتروولت از

آخرین برگ گسترش یافته نمونه برداری صورت گرفته و به صورت تازه اندازه گیری شد. همچنین برای اندازه گیری صفات بیوشیمیایی از جمله فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان، پراکسید هیدروژن، پراکسیداسیون لیپیدی و پرولین، نمونه برگ از برگ های بالای گیاه تهیه و در فویل های آلومینیومی قرار گرفت و بلافاصله در نیتروژن مایع غوطه ور شده و تا زمان اندازه گیری در دمای ۴۰ درجه زیر صفر نگهداری شد. پس از نمونه برداری برای صفات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی، بوته های باقی مانده کفبر شده و صفات مورفولوژیک شامل ارتفاع بوته، قطر ساقه (با کولیس دیجیتالی)، تعداد برگ در بوته و سطح برگ بوته (با نرم افزار Digimizer نسخه ۴/۱) و همچنین وزن تر و خشک اندام های رویشی گیاه شامل ساقه، برگ و بخش هوایی اندازه گیری گردید. جهت تعیین وزن خشک اندام های گیاهی، نمونه ها به مدت ۷۲ ساعت در آون و در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت. به منظور بررسی همزیستی قارچ *T. virens* و *P. indica* با ریشه گیاه، نمونه برداری از ریشه ها صورت گرفته و در محلول ^{14}C FAA فیکس گردید. جهت استخراج استویوزید و ربادیوزید موجود در گیاه استویا، ابتدا برگ های گیاه در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد به مدت ۷۲ ساعت خشک و در هاون ساییده شده و از پودر آن استفاده شد.

اندازه گیری صفات و پارامترهای مورد مطالعه

۳-۳-۱- پارامترهای فیزیولوژیک

۳-۳-۱-۱- فلورسانس کلروفیل *a*

پارامترهای فلورسانس کلروفیل با استفاده از دستگاه فلورومتر (PAM-2500, Walz, Germany) و به روش جنتی و همکاران (۱۹۸۹) اندازه گیری گردید. برای این منظور، آخرین برگ گسترش یافته گیاه با استفاده از گیره مخصوص دستگاه (2030-B, Walz) به مدت ۲۰ دقیقه در تاریکی قرار گرفت. فلورسانس حداقل (F_0) با همی مراکز واکنشی باز فتوسیستم II، توسط نور مدوله شده ای با شدت پایین ($0.1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) و فلورسانس حداکثر (F_m) با تابش پالس اشباع نوری ($8000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) به مدت یک ثانیه در برگ های سازگار به تاریکی اندازه گیری شد. میزان فلورسانس متغیر (F_v)، کارایی کمپلکس تجزیه کننده آب در سمت

فرمالین، اسید استیک، الکل: FAA⁷

دهنده فتوسیستم II (Fv/Fo) و حداکثر کارایی کوانتومی فتوسیستم II (Fv/Fm) به ترتیب با استفاده از معادلات ۱-۳ تا ۳-۳ محاسبه گردید (اسکریبر و همکاران، ۱۹۸۶). در مرحله بعد نور مرئی سفید رنگ (685 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) به صورت متوالی به برگ تابانیده و بعد از آن میزان فلورسانس پایدار (Ft) ثبت و مجدداً پالس اشباع نوری ($8000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) اعمال و میزان فلورسانس حداکثر (Fm') در برگ‌های سازگار به روشنایی تعیین شد. سپس پرتو نوری مرئی قطع و با تابش نور قرمز دور فلورسانس حداقل در مرحله روشنایی (Fo') ثبت گردید. فرکانس نوری برای اندازه‌گیری Fo و Fo' ۶۰۰ هرتز و برای Fm و Fm' ۲۰ کیلوهرتز بود. در نهایت با استفاده از پارامترهای تعیین شده در برگ‌های سازگار به تاریکی و روشنایی، کارایی کوانتومی فتوشیمیایی موثر فتوسیستم II [Y(II)]، کارایی کوانتومی غیرفتوشیمیایی تنظیم شده فتوسیستم I [Y(NPQ)]، کارایی کوانتومی غیرفتوشیمیایی تنظیم نشده فتوسیستم II [Y(NO)] و خاموشی غیرفتوشیمیایی (NPQ) براساس معادلات ۳-۴ تا ۳-۷ (کلوگرامر و اسکریبر، ۲۰۰۸) و سرعت انتقال الکترون (ETR) با استفاده از معادله ۳-۸ (جنتی و همکاران، ۱۹۸۹) محاسبه گردید. عنوان فارسی و انگلیسی مؤلفه‌های بیوفیزیکی اندازه‌گیری شده فلورسانس کلروفیل در جدول ۳-۳ آورده شده است. در شکل ۳-۲ نیز دستگاه فلورومتر و نحوه اندازه‌گیری فلورسانس کلروفیل *a* در برگ‌های گیاه استویانسان داده شده است.

$$Fv = Fm - Fo \quad \text{معادله ۱-۳}$$

$$Fv/Fo = (Fm - Fo)/Fo \quad \text{معادله ۲-۳}$$

$$Fv/Fm = (Fm - Fo)/Fm \quad \text{معادله ۳-۳}$$

$$Y(II) = (Fm' - Ft)/Fm' \quad \text{معادله ۴-۳}$$

$$Y(NPQ) = (Ft/Fm') - (Ft/Fm) \quad \text{معادله ۵-۳}$$

$$Y(NO) = Ft/Fm \quad \text{معادله ۶-۳}$$

$$NPQ = Fm - Fm'/Fm' \quad \text{معادله ۷-۳}$$

$$ETR = Y(II) \times PFDa \times (0.5) \quad \text{معادله ۸-۳}$$



شکل ۲-۳ دستگاه فلورومتر (PAM-2500, Walz, Germany) (الف) و اندازه‌گیری فلورسانس کلروفیل a در برگ‌های گیاه استویا (ب) و (ج). جدول ۳-۳- مؤلفه‌های بیوفیزیکی اندازه‌گیری شده فلورسانس کلروفیل (اسکرپیر و همکاران، ۱۹۹۶، جنتی و همکاران، ۱۹۸۹، کلاچی و همکاران، ۲۰۱۱ و کلگرامر و اسکرپیر، ۲۰۰۸).

شناسه	عنوان انگلیسی	عنوان فارسی
Fo	Minimum fluorescence	فلورسانس حداقل
Fm	Maximum fluorescence	فلورسانس حداکثر
Fo'	Minimum fluorescence in light-adapted leaves	سپس فلورسانس حداقل در برگ‌های سازگار به روشنایی
Fm'	Maximum fluorescence in light-adapted leaves	فلورسانس حداکثر در برگ‌های سازگار به روشنایی
Ft	Steady state fluorescence	فلورسانس پایدار
Fv	Variable fluorescence	فلورسانس متغیر
Fv/Fo	A value that is proportional to the activity of the water-splitting complex on the donor side of the PSII	کارایی کمپلکس تجزیه‌کننده آب در سمت‌دهنده فتوسیستم II
Fv/Fm	Maximum photochemical quantum yield of PSII	حداکثر کارایی کوانتومی فتوسیستم II
Y(II)	Effective photochemical quantum yield of PSII	کارایی کوانتومی فتوشیمیایی موثر فتوسیستم II
Y(NPQ)	Quantum yield of regulated non-photochemical of PSII	کارایی کوانتومی غیرفتوشیمیایی تنظیم‌شده فتوسیستم II
Y(NO)	Quantum yield of non-regulated non-photochemical of PSII	کارایی کوانتومی غیرفتوشیمیایی تنظیم‌نشده فتوسیستم II
NPQ	Non-photochemical quenching	خاموشی غیرفتوشیمیایی

۳-۱-۲- اندازه‌گیری غلظت کلروفیل و کارتنوئید برگ

جهت اندازه‌گیری کلروفیل برگ از آخرین برگ گسترش یافته گیاه شش عدد پانچ از برگ‌های استویا برداشته و در لوله‌های آزمایش دردار حاوی هشت میلی‌لیتر متانول غوطه‌ور گردید. سپس نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی و دمای اتاق قرار گرفتند. میزان جذب نمونه‌ها با استفاده از کوت‌های پلاستیکی و در طول موج‌های ۶۶۵/۲ و ۶۵۲/۴ و ۴۷۰ نانومتر با دستگاه اسپکتوفتومتر مدل (Spekol 1300, Japan) قرائت گردید (شکل ۳-۳). میزان کلروفیل a, b, a+b و کارتنوئید به ترتیب با استفاده از روابط ۳-۹، ۳-۱۰ و ۳-۱۱ محاسبه و در نهایت بر حسب میکروگرم در سانتی‌متر مربع گزارش گردید (لیچنتنالر و بوسکمن، ۲۰۰۱).

$$\text{Chl}_a (\mu\text{g. ml}^{-1}) = 16.72 A_{665.2} - 9.16 A_{652.4} \quad (\text{معادله ۳-۹})$$

$$\text{Chl}_b (\mu\text{g. ml}^{-1}) = 34.09 A_{652.4} - 15.28 A_{665.2} \quad (\text{معادله ۳-۱۰})$$

$$\text{Carotenoid } (\mu\text{g. ml}^{-1}) = (1000 A_{470} - 1.63 \text{Chl}_a - 104.96 \text{Chl}_b) / 221 \quad (\text{معادله ۳-۱۱})$$

در این رابطه‌ها A_{470} ، $A_{652.4}$ ، $A_{665.2}$ میزان نور جذبی محلول در طول موج‌های ۶۶۵/۲، ۶۵۲/۴ و ۴۷۰ نانومتر می‌باشد.



شکل ۳-۳- اندازه‌گیری رنگیزه‌های فتوسنتزی

۳-۱-۳-۳- شاخص کلروفیل

به منظور اندازه‌گیری محتوای کلروفیل برگ از دستگاه SPAD (SPAD-502 Minolta Japan) استفاده شد. اندازه‌گیری از چهار نقطه برگ انجام و میانگین آن‌ها در محاسبه‌ها استفاده شد.

۳-۱-۳-۴- نشت الکتروولیت

برای اندازه‌گیری نشت الکتروولیت یک نمونه برگ از آخرین برگ گسترش‌یافته گیاه برداشت شده و با آب مقطر شستشو گردید تا الکتروولیت‌های سطحی آن‌ها شسته شود. نمونه‌ها در لوله‌های آزمایش حاوی ده میلی‌لیتر آب مقطر غوطه‌ور شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق نگهداری گردید. سپس میزان هدایت الکتریکی آن (EC_1) با استفاده از دستگاه EC متر اندازه‌گیری شد. پس از آن نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در بن‌ماری با دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده و پس از کاهش دمای آن به دمای محیط، مجدداً هدایت الکتریکی آن‌ها (EC_2) اندازه‌گیری گردید. درصد نشت الکتروولیت با استفاده از رابطه ۳-۱۲ محاسبه گردید (لوتس و همکاران، ۱۹۹۶).

$$EL(\%) = \frac{EC_1}{EC_2} \times 100 \quad \text{(معادله ۳-۱۲)}$$

۳-۱-۳-۵- محتوای نسبی آب برگ

برای تعیین محتوای نسبی آب برگ (RWC) از آخرین برگ توسعه‌یافته گیاه نمونه برگ تهیه و برای تعیین وزن تر نمونه‌ها، بلافاصله وزن شدند (FW)، سپس تمامی نمونه‌های برگ به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق و در تاریکی در لوله‌های درب‌دار حاوی آب مقطر غوطه‌ور شده و وزن اشباع آن‌ها اندازه‌گیری شد (TW). در ادامه نمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد به آون منتقل و وزن خشک آنها تعیین شد (DW). در نهایت محتوای رطوبت نسبی برگ‌ها با استفاده از معادله ۳-۱۳ محاسبه شد (ریتچی و نگوین، ۱۹۹۰).

$$RWC = (Fw - Dw) / (Tw - Dw) \times 100 \quad \text{(معادله ۳-۱۳)}$$

۳-۲-۲- پارامترهای بیوشیمیایی

۳-۲-۱- آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان

الف- استخراج آنزیمی

جهت استخراج سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گایاکول پراکسیداز، ۰/۵ گرم از نمونه برگ با استفاده از هاون چینی کاملاً سرد و نیتروژن مایع (حدود ۵ میلی‌لیتر) هموژن شده و سپس به آن پنج میلی‌لیتر از بافر فسفات سرد (pH 7.5) محتوی EDTA ۰/۵ میلی‌مولار اضافه گردید. هموژن‌ها پس از انتقال به لوله‌های آزمایش در $15000 \times g$ و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. جهت پیشگیری از اثرات مضر انجماد و ذوب متوالی نمونه‌ها سوپرناتانت حاصل، به سه قسمت تقسیم و تا زمان اندازه‌گیری آنزیم‌های فوق در فریزر منفی ۴۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (سایرام و همکاران، ۲۰۰۲).

آنزیم آسکوربات پراکسیداز دوام کمی در محیط خارج از سلول دارد. به طوری که برخی از آیزویم‌های آن، نیمه‌عمر کمتر از دو دقیقه در محیط‌هایی با غلظت پائین آسکوربات دارند. به همین دلیل جهت حفظ ساختار و پایداری آن به محلول استخراج آنزیم پلی وینیل پیرولیدین (۰/۵٪) و اسکوربات دو میلی‌مولار اضافه گشته و در سایر موارد استخراج آنزیم آسکوربات پراکسیداز مشابه آنزیم‌های فوق می‌باشد.

ب- ثبت فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان

فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، پراکسیداز (POD) و آسکوربات پراکسیداز (APX) به ترتیب با استفاده از روش‌های جیانوپولیتیس و رایس (۱۹۷۷)، ابی (۱۹۸۴)، تانگ و نیوتن (۲۰۰۵) و یوشیمورا (۲۰۰۰) اندازه‌گیری شد.

- سوپراکسید دیسموتاز (SOD):

اساس سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز مهار واکنش رادیکال سوپراکسید با نیتروبلوتترازولیوم و ممانعت از تشکیل سوپراکسید- نیتروبلوتترازولیوم توسط آنزیم مذکور می‌باشد. به عبارت دیگر کمپلکس

واکنشی حاصل در حضور نور تولید رادیکال سوپراکسید نموده که با معرف نیتروبلوتترازولیوم واکنش می‌دهد، بنابراین حضور آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، رادیکال حاصل را بلافاصله به پراکسید هیدروژن تبدیل و از واکنش آن با نیتروبلوتترازولیوم ممانعت می‌کند. کمپلکس واکنشی بدون آنزیم به دلیل واکنش مداوم این دو شدیدترین رنگ را ایجاد می‌کند که رنگ حاصل نوک مدادی می‌باشد. هرچه فعالیت آنزیم بیشتر باشد رنگ حاصل روشن‌تر و جذب کمتر خواهد بود.

مخلوط واکنش آنزیمی جهت سنجش فعالیت آنزیم SOD شامل ۹۳۵ میکرولیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار حاوی EDTA ۰/۱ میلی‌مولار، متیونین ۱۳ میلی‌مولار و نیتروبلو-تترازولیوم (NBT) ۷۵ میکرومولار و ۱۵ میکرولیتر ریپوفلاوین ۰/۱۲ میلی‌مولار و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی استخراج شده بود.

پس از آماده‌سازی مخلوط واکنش، نمونه‌ها به‌منظور انجام واکنش به مدت ۱۵ دقیقه در شیکر نوری با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و دارای دو عدد لامپ فلورسنت ۲۰ وات با ۱۰۰ دور در دقیقه شیک شدند و پس از قطع نور واکنش متوقف گردید. از کمپلکس واکنشی بدون آنزیم (شامل تمام اجزای واکنش ذکر شده به‌جز محلول آنزیمی) که به مدت ۱۵ دقیقه در نور قرار گرفته بود برای ارزیابی توان تولید کمپلکس سوپراکسید-نیتروبلوتترازولیوم و معیار سنجش فعالیت آنزیمی استفاده شد. همچنین از کمپلکس واکنشی (شامل تمام اجزای واکنش ذکر شده) کامل دیگری که از ابتدا در تاریکی مطلق قرار گرفته بود، به عنوان شاهد استفاده گردید. سپس مقدار جذب در طول موج ۵۶۰ نانومتر با استفاده دستگاه اسپکتروفتومتر (Spekol 1300, Japan) خوانده شد. یک واحد SOD به مقدار آنزیمی که سبب مهار ۵۰ درصد از واکنش کمپلکس سوپراکسید-نیتروبلوتترازولیوم و تبدیل NBT به فورمازان شود، در نظر گرفته می‌شود (جیانوپولیتیس و رایس، ۱۹۷۷).

- کاتالاز (CAT):

فعالیت این آنزیم طبق روش ابی (۱۹۸۴) اندازه‌گیری شد. کمپلکس واکنشی شامل ۱/۵ میلی لیتر از بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی مولار (pH 7)، ۰/۵ میلی‌لیتر از پراکسید هیدروژن ۷/۵ میلی مولار و ۵۰

میکرولیتتر از محلول آنزیمی می‌باشد که حجم نمونه‌ها با اضافه کردن آب مقطر به سه میلی‌لیتر رسانده شد. با افزودن پراکسید هیدروژن واکنش آغاز و کاهش در جذب نمونه‌ها در طول موج ۲۴۰ نانومتر در مدت یک دقیقه ثبت گردید. فعالیت آنزیمی از محاسبه میزان پراکسید هیدروژن تجزیه شده توسط آنزیم محاسبه گردید.

– پراکسیداز (POD):

کمپلکس واکنشی (دو میلی لیتر) شامل یک میلی‌لیتر بافر فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار (pH= 7)، ۲۵۰ میکرولیتتر از EDTA ۰/۱ میلی‌مولار، یک میلی‌لیتر گایاکول پنج میلی‌مولار، یک میلی‌لیتر پراکسید هیدروژن ۱۵ میلی‌مولار و ۵۰ میکرولیتتر از محلول آنزیمی استخراج شده است. واکنش با اضافه کردن محلول آنزیمی شروع شده و افزایش جذب در طول موج ۴۷۰ نانومتر به مدت یک دقیقه ثبت شد. فعالیت آنزیمی براساس میزان تترایاکول تشکیل شده و با استفاده از ضریب خاموشی $26/6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ به دست آمد. (تانگ و نیوتن، ۲۰۰۵).

– آسکوربات پراکسیداز (APX):

کمپلکس واکنشی (یک میلی‌لیتر) شامل ۲۵۰ میکرولیتتر از محلول بافر فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار (pH= 7)، ۲۵۰ میکرولیتتر از آسکوربات یک میلی‌مولار، ۲۵۰ میکرولیتتر از EDTA ۰/۴ میلی‌مولار، ۱۹۰ میکرولیتتر آب دو بار تقطیر، ده میکرولیتتر از پراکسید هیدروژن ده میلی‌مولار و ۵۰ میکرولیتتر از محلول آنزیمی استخراج شده است. واکنش با کامل شدن اجزای ضروری آن یعنی آنزیم استخراج شده، سوبسترا و کوفاکتور شروع به فعالیت خواهد کرد.

جذب کمپلکس واکنشی در طول موج ۲۹۰ نانومتر در زمان شروع و پس از یک دقیقه یادداشت و با استفاده از ضریب خاموشی $2/8 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ میزان فعالیت آنزیم محاسبه شد. عدد حاصل میزان فعالیت آنزیم

آسکوربات پراکسیداز را بر اساس میکرومول آسکوربات اکسید شده در دقیقه نشان می‌دهد (یوشیمورا و همکاران، ۲۰۰۰).

۳-۲-۲- پروتئین محلول

میزان پروتئین موجود در نمونه‌های آنزیمی استخراج شده به روش بردفورد (۱۹۷۶) اندازه‌گیری شد. کمپلکس واکنش شامل ۱۰۰ میکرولیتر از محلول آنزیمی استخراج شده، ۲۰۰ میکرولیتر معرف بردفورد و ۷۰۰ میکرولیتر آب دیونیزه بود. پس از گذشت دو دقیقه از تشکیل کمپلکس فوق، معرف بردفورد حداکثر ترکیب را با اسیدهای آمینه آروماتیک نظیر آرژنین از خود نشان می‌دهد. ترکیب حاصل، تا یک ساعت پس از تشکیل پایدار بوده و سپس شروع به تجزیه و جدا شدن می‌نماید. لذا در این فاصله زمانی نمونه‌ها حداکثر جذب را داشته و جذب آنها در طول موج ۵۳۵ نانومتر یادداشت شد. میزان پروتئین نمونه‌ها، از روی منحنی استاندارد حاصل از آلبومین سرم گاوی بدست آمد.

فعالیت ویژه آنزیم نشان دهنده تعداد واحد آنزیمی در یک میلی‌گرم پروتئین است، بنابراین، پس از محاسبه تعداد واحدهای آنزیمی هر یک از آنزیم‌های مورد مطالعه، بر میزان پروتئین حاصل تقسیم شد تا فعالیت ویژه آن‌ها به دست آید.

۳-۲-۳- اسید آمینه پرولین

برای استخراج و سنجش پرولین از روش نین هیدرین اسید (بیتس و همکاران، ۱۹۷۳) استفاده گردید. به این منظور، ۰/۵ گرم از برگ تازه استویا در دو میلی‌لیتر اسیدسولفوسالسیلیک سه درصد (W/V) کاملاً ساییده شد تا همگن شود و پس از سانتریفیوژ در $5000 \times g$ به مدت ده دقیقه، یک میلی‌لیتر از محلول بالایی با یک میلی‌لیتر از معرف نین‌هیدرین و یک میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال مخلوط و به مدت یک ساعت در حمام آب ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. مخلوط واکنش با دو میلی‌لیتر تولون جدا شده و در

طول موج ۵۲۰ نانومتر قرائت شد. در نهایت با استفاده از منحنی استاندارد، مقدار پرولین براساس میکرومول پرولین در گرم وزن تر برگ محاسبه گردید.

۳-۲-۴- پراکسیداسیون لیپیدی یا مالون دی آلدئید (MDA)

این شاخص بر اساس روش استوارت و بولی (۱۹۸۰) اندازه گیری شد. در حدود ۰/۵ گرم از برگ‌های استویا در ده میلی‌لیتر از محلول ۰/۱٪ تری‌کلرواستیک‌اسید هموزن و به مدت ده دقیقه در $15000 \times g$ سانتریفوژ گردید. دو میلی‌لیتر از سوپرناتانت حاصل با چهار میلی‌لیتر از محلول ۲۰٪ تری‌کلرواستیک‌اسید محتوی ۰/۵٪ تیوباربیتوریک‌اسید مخلوط شد. کمپلکس حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری و سپس به حمام آب سرد منتقل گردید. نمونه‌ها مجدداً به مدت ده دقیقه در $10000 \times g$ سانتریفوژ شدند. جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر ثبت گردید. میزان پراکسید شدن لیپیدها از اختلاف بین موج‌های جذبی در در ضریب خاموشی $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ به دست آمد.

۳-۲-۵- قند محلول

برای عصاره‌گیری و استخراج قند محلول از روش اوموکولو و همکاران (۱۹۹۶) استفاده شد. برای این منظور مقدار ۰/۱ گرم از بافت تر بخش‌های هوایی گیاه را با پنج میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد گرم در هاون چینی خرد کرده و سپس به مدت ده دقیقه در بن ماری در دمای ۷۰ درجه قرار داده شد. بعد از این مدت عصاره الکلی حاوی قندهای محلول جدا و قسمت پایینی همراه با ۵ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد دوباره برای تکرار عصاره‌گیری به حمام آب جوش منتقل گردید. عمل استخراج با اتانول چهار بار تکرار شد. بعد از استخراج به منظور تبخیر الکل، عصاره‌ی حاصل در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. برای حذف کلروفیل عصاره بدست آمده به نسبت یک به پنج با کلروفورم مخلوط و بعد از ورتکس کردن به مدت پنج دقیقه به حال سکون رها شد. قسمت شفاف بالایی جدا شده و برای اندازه‌گیری مقدار قندهای محلول مورد استفاده قرار گرفت. اندازه‌گیری قندهای محلول به وسیله انترون و با استفاده از روش مک‌کریدی و همکاران (۱۹۵۰)

انجام شد. برای ساخت محلول انترن مقدار ۱۵۰ میلی گرم انترن در ۱۰۰ میلی لیتر اسید سولفوریک رقیق گردید. برای تهیه ۱۰۰ میلی لیتر اسید سولفوریک رقیق مقدار ۷۶ میلی لیتر اسید سولفوریک غلیظ با ۳۸ میلی لیتر آب مقطر مخلوط شد. برای اندازه گیری قندهای محلول مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره در لوله آزمایش ریخته و به آن سه میلی لیتر محلول انترن اضافه شد. مخلوط به دست آمده به مدت ۲۰ دقیقه در درجه حرارت ۱۰۰ درجه سانتی گراد در حمام آب جوش قرار گرفت. اندازه گیری قندهای محلول با استفاده از روش اسپکتروفتومتری و در طول موج ۶۲۰ نانومتر انجام شد.

۳-۳-۳- استخراج و سنجش گلیکوزیدها

جهت استخراج استویوزید و ربادیوزید موجود در گیاه استویا، پس از گذشت دو هفته از اعمال تنش شوری برگ های گیاه در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد به مدت ۷۲ ساعت خشک و در هاون ساییده شد. سپس ۰/۵ گرم از پودر برگ خشک گیاه با ۲ میلی لیتر حلال اتانول ۷۰ درصد مخلوط شد و در حمام آب گرم به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سلسیوس قرار گرفت. برای جداسازی تفاله های موجود در نمونه از فیلتر کاغذ صافی استفاده شد. در ادامه محلول استخراج شده از فیلتر سرنگ $0/2 \mu\text{m}$ عبور داده شد تا مواد جامد و زائد موجود در آن گرفته شود. در این زمان نمونه ها آماده برای تزریق در دستگاه HPLC هستند. سنجش استویوزید و ربادیوزید به روش هرن و سابدی (۲۰۰۹) و با دستگاه HPLC (مدل Knauer آلمان) با طول موج ۲۱۰ نانومتر تنظیم شد. مقدار عصاره استفاده شده در هر تزریق ۴۰ میکرولیتر بود و میزان دو گلیکوزید استویوزید و ربادیوزید A براساس سطح زیر منحنی و استانداردهای تزریق شده (شرکت Sigma آلمان) به دست آمد.

۳-۳-۴- رنگ آمیزی و مطالعه همزیستی ریشه و قارچ

برای مطالعه همزیستی قارچ با ریشه گیاه استویا، پس از برداشت گیاه ریشه ها از خاک خارج و خاک آنها شسته و سپس قطعات یک سانتی متری ریشه (به میزان حدود یک گرم) از هر گیاه جدا شد. نمونه ها در

محلول FAA (ترکیب فرمالدهید، استون و اتانول به نسبت ۱:۱:۱) فیکس شد. قطعات ریشه برای رنگ‌آمیزی ابتدا در محلول KOH ده درصد به مدت هفت دقیقه رنگ‌بری شده و سپس به مدت سه دقیقه با محلول جوهر پلیکان و سرکه پنج درصد جوشان رنگ‌آمیزی شد (وییرهیلیگ و همکاران، ۱۹۹۸). نمونه‌های رنگ‌آمیزی شده برای بررسی همزیستی و عکس‌برداری استفاده شد. تعیین درصد کلونیزاسیون ریشه‌ها براساس روش بیرمن و لیندرمن (۱۹۸۰) انجام شد. براساس این روش ۴۰ قطعه یک سانتی‌متری از ریشه‌های رنگ‌آمیزی شده به منظور ارزیابی درصد کلونیزاسیون قارچ به صورت تصادفی انتخاب شدند. قطعات ریشه در روی لام در زیر میکروسکوپ مشاهده و میزان کلونیزاسیون با برآورد طولی از ریشه که به ساختمان‌های قارچی (هیف و میسیلیوم) آلوده می‌باشند، به صورت مشاهده‌ای مشخص شده و میانگین کلونیزاسیون ریشه برای این ۴۰ قطعه تعیین گردید.

۳-۴- تجزیه و تحلیل داده‌های آزمایش

پس از پایان آزمایش، داده‌های بدست آمده به وسیله نرم‌افزار آماری SAS (نسخه ۹/۱) تجزیه و تحلیل شدند. آزمون نرمال بودن داده‌ها به روش کولموگروف-اسمیرنوف و مقایسه میانگین‌ها براساس آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) در سطح احتمال پنج درصد انجام شد.

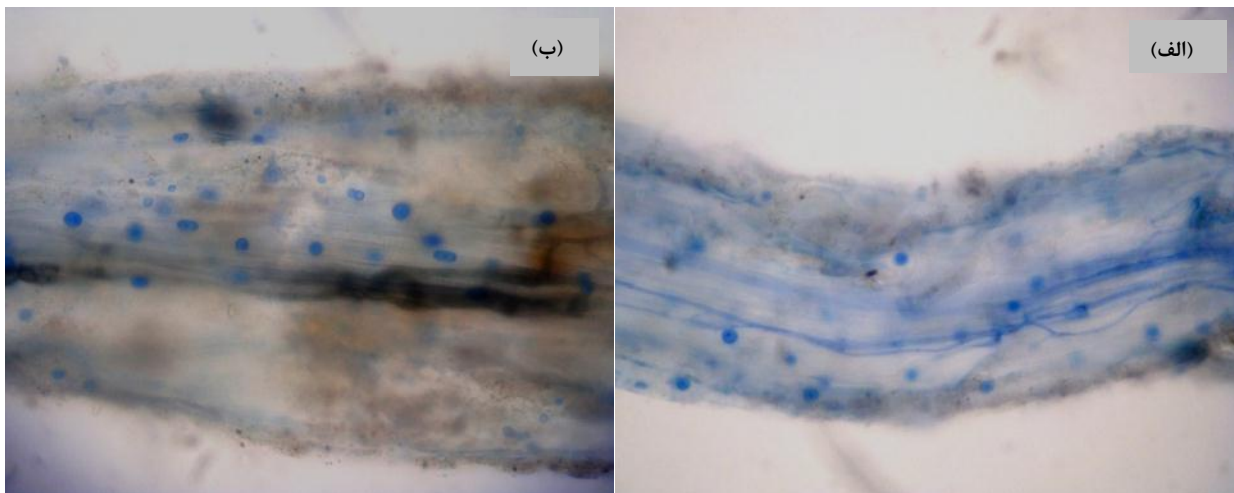
فصل چهارم: نتایج و بحث

۱-۴- بخش گلخانه‌ای

۱-۱-۴- کلونیزاسیون ریشه

۱-۱-۱-۴- بررسی همزیستی ریشه استویا با قارچ‌های اندوفیت

نتایج رنگ‌آمیزی ریشه گیاهان تلقیح شده با قارچ‌های اندوفیت *Trichoderma* و *Piriformospora indica* با بزرگنمایی $10\times-40\times$ در شکل ۱-۴ آورده شده است. بررسی میکروسکوپی ریشه‌های استویا نشان داد که قارچ *P. indica* و *T. virens* قابلیت جوانه‌زنی، کلونیزاسیون و فعالیت در ریشه استویا را دارند. بر اساس مشاهدات، میسلیوم قارچ‌های *P. indica* و *T. virens* در اپیدرم و سلول‌های قشر ریشه نفوذ کرده و کلامیدوسپوره‌های قارچ *P. indica* به‌صورت گروهی همراه با شبکه گسترده‌ای از هیف‌های متورم شده و اسپور جوانه‌زده در اطراف ریشه مشاهده شد.



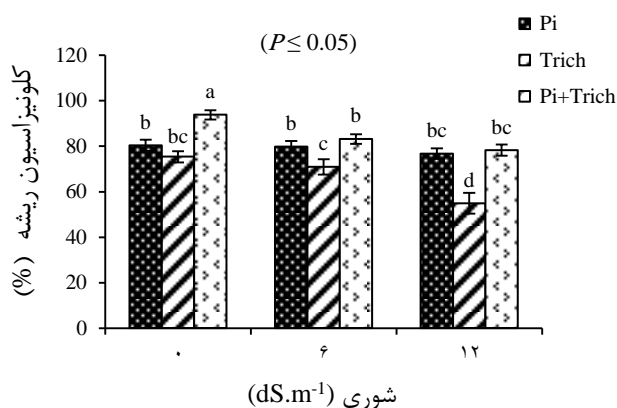
شکل ۱-۴- قارچ‌های اندوفیت *P. indica* (الف) و *T. virens* (ب) در ریشه گیاه استویا به‌ترتیب با بزرگنمایی ۱۰۰ و ۴۰۰ برابر

۱-۱-۲- درصد کلونیزاسیون ریشه

نتایج میانگین مربعات درصد کلونیزاسیون ریشه در گیاه استویا (جدول پیوست ۱) نشان داد اثر ساده شوری و همزیستی قارچی بر صفت مورد نظر در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. همچنین، برهمکنش شوری و همزیستی قارچ‌های اندوفیت در سطح احتمال پنج درصد بر کلونیزاسیون ریشه اثر معنی‌داری نشان

داد. با این حال، برهمکنش معنی‌داری بین سطوح مختلف شوری و محلول‌پاشی اسپرمیدین و همچنین همزیستی قارچی و پلی‌آمین اسپرمیدین در صفت مورد نظر مشاهده نشد. اثر متقابل سه‌گانه شوری، قارچ و اسپرمیدین نیز اثر معنی‌داری بر کلونیزاسیون ریشه نداشت.

نتایج حاصل از آزمایش گلدانی نشان داد درصد کلونیزاسیون ریشه گیاه استویا با قارچ‌های اندوفیت مورد نظر بین ۵۴/۹ تا ۹۳/۸ درصد متغیر بود (شکل ۴-۲). درصد کلونیزاسیون ریشه به‌طور معنی‌داری ($P \leq 0.05$) تحت تأثیر تنش شوری قرار گرفت، به‌طوری‌که با افزایش سطوح شوری از صفر تا ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر میزان توسعه قارچ‌ها و درصد کلونیزه شدن ریشه کاهش یافت، هرچند این کاهش در مورد قارچ Pi معنی‌دار نبود. میزان کلونیزاسیون ریشه در تیمارهای قارچی با یکدیگر تفاوت نشان داده و در تمام سطوح شوری میزان توسعه قارچ در ریشه گیاهان تلقیح شده با دو قارچ (Pi+Trich) بیشتر از تلقیح جداگانه Pi و Trich بود (شکل ۴-۲). کاهش کلونیزاسیون ریشه در اثر تنش شوری نشان دهنده اثر بازدارنده شوری بر توسعه قارچ در ریشه گیاه می‌باشد، چراکه از جوانه‌زنی اسپورها و رشد هیف‌ها به‌دلیل اثر مهارکنندگی سدیم و کلر جلوگیری کرده و نیز فراهمی کربن به قارچ‌ها را از طریق محدود کردن میزان فتوسنتز گیاه کاهش می‌دهد، در نتیجه میزان کلونیزه شدن ریشه توسط قارچ کاهش می‌یابد (جرگ و مانچاندا، ۲۰۰۹). این نتایج با همزیستی قارچ شبه‌میکوریز در برنج (پیردشتی و همکاران، ۲۰۱۲)، کنجد (خادمیان و همکاران، ۲۰۱۹) و سورگوم (قاسمی و زاهدی، ۱۳۹۷) در شرایط شور مطابقت دارد.



شکل ۴-۲- برهمکنش شوری و قارچ‌های اندوفیت بر میزان کلونیزاسیون ریشه گیاه استویا. *Pi*: *P. indica* و *Trich*: *T. virens*. در هر شکل میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند.

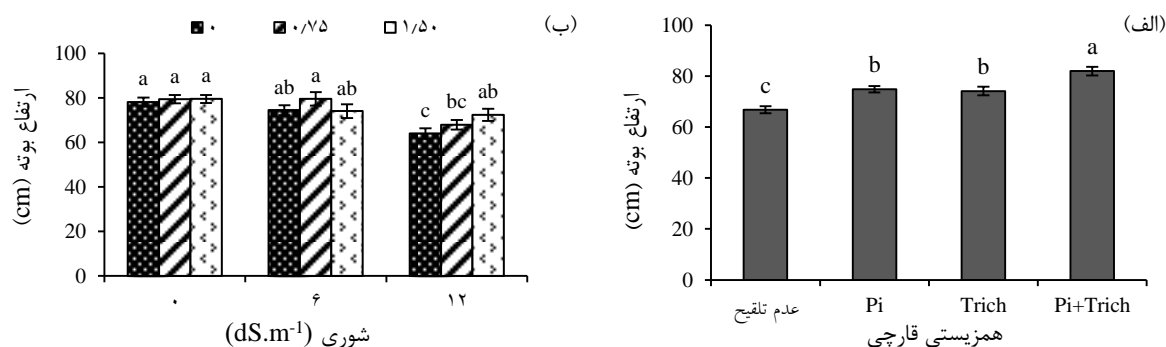
۴-۱-۲- صفات رویشی

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های مربوط به صفات رویشی (جدول پیوست ۲) نشان داد اثر ساده شوری، همزیستی قارچ‌های اندوفیت و اسپرمیدین بر ارتفاع بوته، سطح برگ و وزن تر و خشک برگ، ساقه و شاخساره معنی‌دار بود. بین سطوح مختلف شوری و قارچ‌های مورد مطالعه در وزن تر و خشک برگ، ساقه و شاخساره برهمکنش معنی‌داری مشاهده شد. همچنین، بین سطوح مختلف شوری و محلول‌پاشی اسپرمیدین در ارتفاع بوته و وزن خشک برگ برهمکنش معنی‌داری وجود داشت. برهمکنش بین همزیستی قارچی و محلول‌پاشی اسپرمیدین در هیچ یک از صفات رویشی معنی‌دار نبود و اثر متقابل سه‌گانه شوری، قارچ و اسپرمیدین نیز تنها بر سطح برگ در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار شد.

۴-۱-۲-۱- ارتفاع بوته

بر اساس یافته‌ها (شکل ۴-۳ الف)، تلقیح با قارچ‌های اندوفیت، به‌ویژه تلقیح هم‌زمان دو قارچ *Pi+Trich* توانست ارتفاع بوته گیاه استویا را نسبت به تیمار عدم تلقیح به‌میزان حدود ۱۹ درصد بهبود بخشد. ریزجانداران خاک از جمله قارچ‌های اندوفیت با برقراری رابطه همزیستی در تعامل با گیاهان بوده و با انجام فعالیت‌هایی نظیر تولید انواع بی‌شماری از متابولیت‌ها، تجزیه ترکیبات آلی، تولید مواد افزایش‌دهنده رشد گیاه و افزایش قابلیت فراهمی عناصر غذایی معدنی سبب بهبود رشد گیاه می‌گردند (اولمولر و همکاران، ۲۰۰۹). از سوی دیگر، محلول‌پاشی اسپرمیدین نیز در شرایط تنش شور ارتفاع بوته را بهبود بخشید. به‌طوری‌که افزایش تنش شوری از صفر تا ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر کاهش چشمگیر ارتفاع بوته را در پی داشت، ولی کاربرد اسپرمیدین به‌ویژه در غلظت ۱/۵ میلی‌مولار از کاهش معنی‌دار آن جلوگیری نمود (شکل ۴-۳ ب). پلی‌آمین‌ها نقش حیاتی در فرآیندهای رشدی، چرخه‌های زیستی و فیزیولوژیک گیاهان داشته و با تأثیر

مثبت بر تقسیم و طولی شدن سلول‌ها، افزایش در رشد گیاه را به دنبال خواهند داشت (عبدل و همکاران، ۲۰۰۹).



شکل ۴-۳- اثر ساده همزیستی قارچی (الف) و برهمکنش شوری و پلی‌آمین اسپرمیدین (ب) بر ارتفاع بوته استویا. Pi: *P. indica* و Trich: *T. virens*. در هر شکل میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند.

۴-۱-۲-۲- سطح برگ

براساس نتایج جدول ۴-۱، در مجموع با افزایش میزان شوری آب آبیاری سطح برگ گیاه کاهش یافت. با این حال، در هر سه سطح شوری و سطوح پلی‌آمین اسپرمیدین، تلقیح با قارچ‌های اندوفیت منجر به افزایش سطح برگ گیاه شد که این افزایش در سطوح صفر و شش دسی‌زیمنس بر متر شوری و محلول‌پاشی اسپرمیدین ۰/۷۵ میلی‌مولار در شرایط تلقیح هم‌زمان دو قارچ نسبت به عدم تلقیح معنی‌دار بوده و بالاترین میزان سطح برگ نیز در تنش شوری صفر و شش دسی‌زیمنس بر متر و اسپرمیدین ۰/۷۵ میلی‌مولار، در شرایط تلقیح هم‌زمان دو قارچ Pi+Trich مشاهده شد. همچنین در تمامی سطوح شوری و تیمارهای قارچی، کاربرد اسپرمیدین با غلظت‌های ۰/۷۵ و ۱/۵ میلی‌مولار اثر مثبتی بر سطح برگ استویا نشان داده و باعث افزایش آن گردید و بیشترین اثر افزایشی آن در غلظت ۰/۷۵ میلی‌مولار مشاهده شد. به‌طوری که این افزایش در سطح شوری شش دسی‌زیمنس بر متر و کاربرد هم‌زمان دو قارچ در محلول‌پاشی اسپرمیدین ۰/۷۵ میلی‌مولار نسبت به سطح صفر اسپرمیدین معنی‌دار بود. سریع‌ترین واکنش در مقابله با تنش شوری کاهش توسعه سطح برگ به علت کاهش فتوسنتز جاری گیاه است و چنان‌چه شدت تنش افزایش یابد رشد و توسعه برگ متوقف می‌گردد، بنابراین سطح برگ نیز تحت تنش کاهش می‌یابد (ژو، ۲۰۱۱). قارچ‌های

اندوفیت به دلیل تحریک ریشه‌زایی در گیاه، افزایش قدرت جذب عناصر غذایی و افزایش سنتز هورمون‌ها، رشد گیاه و به‌دنبال آن سطح برگ را افزایش می‌دهند (فنگ و همکاران، ۲۰۰۲).

جدول ۴-۱- مقایسه میانگین برهمکنش تنش شوری، قارچ و محلول پاشی پلی‌آمین اسپرمیدین در سطح برگ (Cm²) گیاه استویا

شوری (dS.m ⁻¹)	اسپرمیدین (mM)	قارچ اندوفیت		
		عدم تلقیح	<i>P. indica</i> (Pi)	<i>T. virens</i> (Trich)
۰	۰	۱۹/۱ ^{d-i}	۲۳/۹ ^{a-f}	۲۴/۹ ^{a-e}
۰	۰/۷۵	۲۲/۳ ^{b-g}	۲۴/۳ ^{a-f}	۲۲/۷ ^{a-g}
۱/۵۰	۱/۵۰	۲۰/۵ ^{b-i}	۲۲/۸ ^{a-g}	۲۷/۸ ^{abc}
۰	۰	۱۳/۹ ⁱ	۱۹/۳ ^{d-i}	۲۱/۱ ^{b-i}
۶	۰/۷۵	۲۰/۶ ^{b-i}	۲۴/۵ ^{a-e}	۲۱/۴ ^{b-i}
۱۲	۱/۵۰	۲۰/۹ ^{b-i}	۲۵/۶ ^{a-d}	۲۱/۳ ^{b-i}
۰	۰	۱۴/۳ ^{hi}	۱۸/۷ ^{d-i}	۱۸/۱ ^{d-i}
۱۲	۰/۷۵	۱۷/۶ ^{e-i}	۱۹/۹ ^{d-i}	۲۳/۰ ^{a-g}
۱/۵۰	۱/۵۰	۱۵/۴ ^{ghi}	۲۰/۴ ^{e-i}	۱۶/۶ ^{f-i}

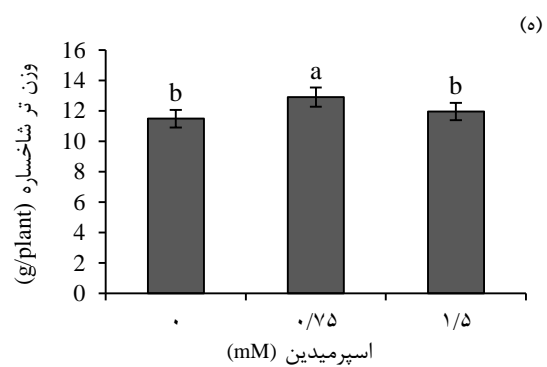
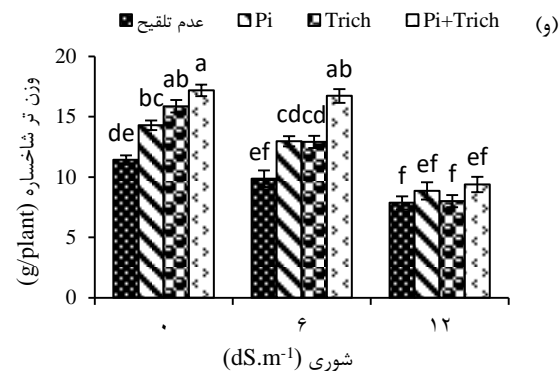
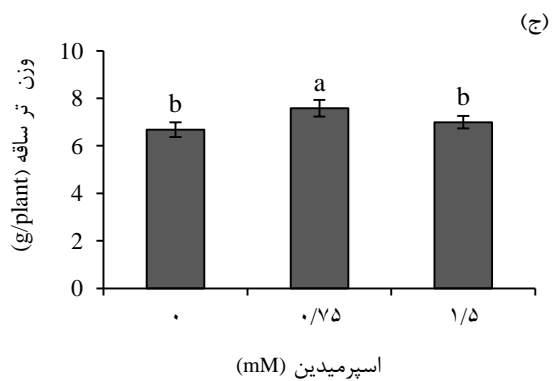
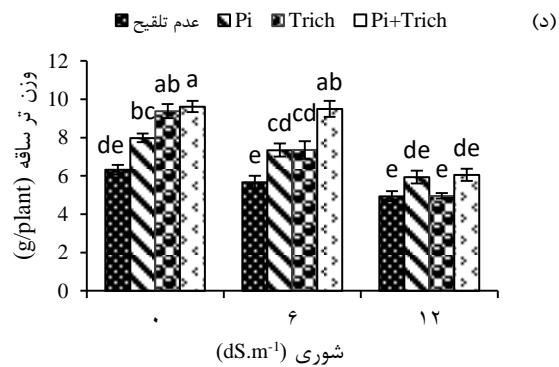
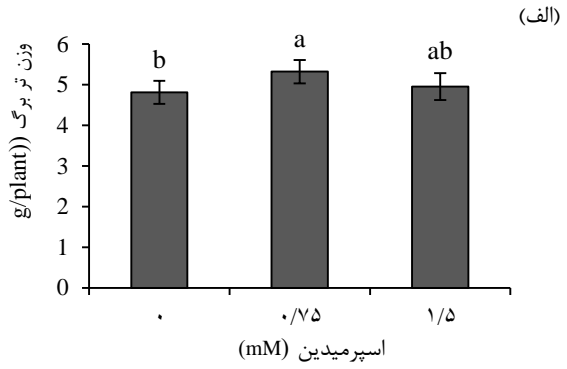
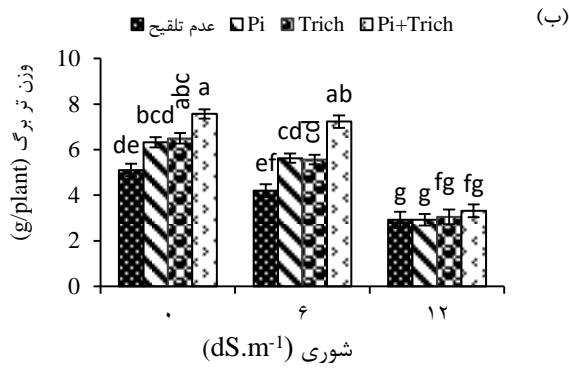
میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند.

۴-۱-۲-۳- وزن تر برگ، ساقه و شاخساره

نتایج نشان داد محلول پاشی پلی‌آمین اسپرمیدین در غلظت ۰/۷۵ میلی‌مولار منجر به افزایش وزن تر برگ (حدود ۱۱ درصد)، ساقه (حدود ۱۴ درصد) و شاخساره (حدود ۱۳ درصد) گیاه استویا نسبت به غلظت صفر اسپرمیدین گردید (شکل ۴-۴). عنوان شده است که کاربرد پلی‌آمین‌های اگزوزن می‌تواند در درجات مختلفی موجب بازگشت رشد یا کاهش مه‌پاره‌رشد طی تنش‌گرد که نشان‌دهنده تأثیر پلی‌آمین‌ها در کاهش آسیب سلولی ناشی از تنش است (مارکو و همکاران، ۲۰۱۱). در این رابطه، نقش پلی‌آمین‌ها در افزایش رشد گیاهان به اثر آنتی‌اکسیدانی، کمک به تعادل کاتیون-آنیون و یا احتمالاً استفاده از آن به‌عنوان منبع نیتروژن نسبت داده می‌شود (طلعت و همکاران، ۲۰۰۵). محققان نقش مثبت کاربرد اسپرمیدین و پوترسین را در بهبود شاخص‌های رشدی گیاه تاتوره (کیمیرین و همکاران، ۲۰۱۰) و توت‌فرنگی (حسینی‌فرهی و همکاران، ۱۳۹۶) گزارش کردند.

از سوی دیگر، تنش شوری در تمام تیمارهای همزیستی وزن تر برگ، ساقه و شاخساره را به‌صورت چشمگیری کاهش داد. با این‌حال، در سطوح شوری صفر و شش دسی‌زیمنس بر متر تلقیح با قارچ‌های

اندوفیت به‌ویژه در شرایط تلقیح همزمان دو قارچ افزایش وزن تر برگ، ساقه و شاخساره را به‌دنبال داشت، به‌طوری که بیشترین مقدار آن‌ها در هر دو سطح صفر و شش دسی‌زیمنس بر متر در شرایط تلقیح همزمان دو قارچ حاصل شد (شکل ۴-۴). شوری از جمله تنش‌هایی است که رشد و نمو بسیاری از گیاهان را تحت تأثیر قرار می‌دهد. اثرات زیانبار شوری بر گیاهان ناشی از کاهش پتانسیل اسمزی خاک و ایجاد تنش آب در گیاه، عدم اعتدال یون‌ها و نامتعادل شدن جذب مواد مغذی است. در این راستا، گزارش شده که شوری با کاهش فعالیت هیدرولازهای پیوند شده به دیواره سلولی، منجر به کاهش انعطاف‌پذیری دیواره و در نهایت کاهش رشد گیاه می‌شود (سینگ و پراساد، ۲۰۰۹؛ سیلر و راثول، ۲۰۰۵). از سوی دیگر تلقیح با قارچ‌های اندوفیت توانست وزن تر گیاه استویا را در شرایط شور بهبود بخشد. اگرچه سازوکار این قارچ‌ها در افزایش رشد گیاه به‌خوبی شناخته نشده است، اما در همکاری این قارچ‌ها در ساخت بسیاری از متابولیت‌ها، هورمون‌ها و آنزیم‌های کمک‌کننده شکی نیست (جامپونن، ۲۰۰۱). به‌نظر می‌رسد همزیستی قارچ‌های اندوفیت با ریشه گیاه از طریق افزایش در جذب آب و عناصر غذایی سبب افزایش فتوسنتز شده و این امر موجب تولید فرآورده فتوسنتزی بیشتر و بهبود پارامترهای رشدی نظیر وزن تر برگ می‌گردد. آل طه و همکاران (۱۳۹۷) در بررسی گیاه اسفناج در شرایط خشکی بیان داشتند که تلقیح با قارچ‌های *P. indica* و میکوریزا وزن تر و خشک گیاه را بهبود بخشید. زارع حسینی و همکاران (۱۳۹۴) نیز بیان داشتند تلقیح گیاه استویا با قارچ میکوریز منجر به افزایش در وزن تر و خشک اندام هوایی شد.



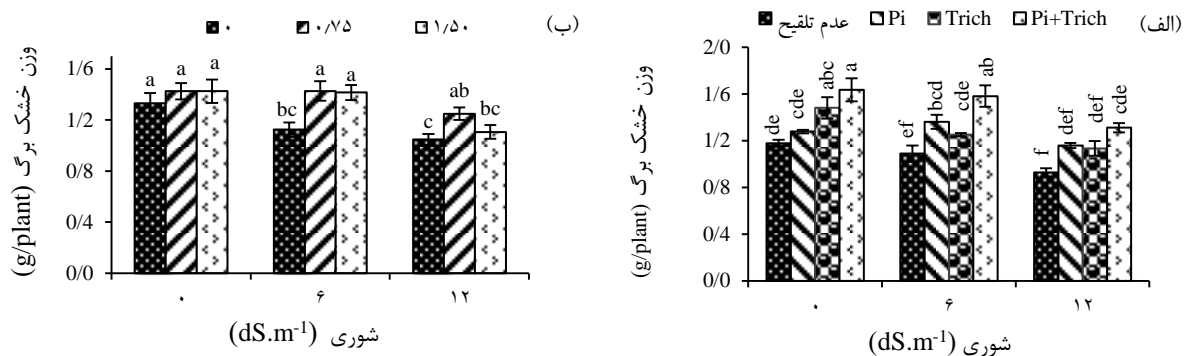
شکل ۴-۴- اثر ساده پلی آمین اسپرمیدین (الف) و برهمکنش شوری و همزیستی قارچی (ب) بر وزن تر برگ، اثر ساده پلی آمین اسپرمیدین (ج) و برهمکنش شوری و همزیستی قارچی (د) بر وزن تر ساقه و اثر ساده پلی آمین اسپرمیدین (ه) و برهمکنش شوری و همزیستی قارچی (و) بر وزن تر شاخساره گیاه استویا. *P. indica*: Pi و *T. virens*: Trich. در هر شکل میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD سطح احتمال پنج درصد ندارند.

۴-۲-۱-۴- وزن خشک برگ

نتایج حاکی از آن بود که آبیاری با آب شور وزن خشک برگ در گیاه استویا را چه در تیمارهای همزیستی قارچی و چه در محلول‌پاشی غلظت‌های مختلف اسپرمیدین کاهش داد (شکل ۴-۵ الف و ب). در تمام سطوح تنش شوری همزیستی با قارچ‌های اندوفیت افزایش وزن خشک برگ را به دنبال داشته و باعث

تعدیل اثرات مضر شوری و در نتیجه ممانعت از کاهش وزن خشک برگ در اثر تنش گردید، به طوری که نه تنها در هیچ یک از سطوح شوری نسبت به تیمار شاهد (شوری صفر و عدم تلقیح قارچ) کمتر نشد، بلکه در شوری شش دسی‌زیمنس بر متر مقدار این صفت افزایش یافت (شکل ۴-۵ الف). کاهش پتانسیل اسمزی محلول خاک در شرایط شور، منجر به کاهش جذب آب شده و در نتیجه روزنه‌ها بسته و تنفس و فتوسنتز و در نتیجه رشد گیاه کاهش می‌یابد (بن‌عاشر و همکاران، ۲۰۰۶). نقش مثبت همزیستی قارچ‌های اندوفیت در تحمل گیاهان در شرایط شور را می‌توان به بهبود جذب عناصر غذایی به خصوص فسفر و تنظیم پتانسیل اسمزی در گیاه نسبت داد (کادین و همکاران، ۲۰۱۳). بنابراین در شرایط شور گیاهان همزیست شده با قارچ‌های اندوفیت دارای وزن خشک بیشتری نسبت به گیاهان غیرهمزیست می‌باشند. ژیل و همکاران (۲۰۱۶) فو و همکاران (۲۰۱۶) نیز افزایش وزن خشک گیاه را به ترتیب در زمان تلقیح با قارچ‌های *P. indica* و *T. virens* تحت تنش شوری گزارش کردند.

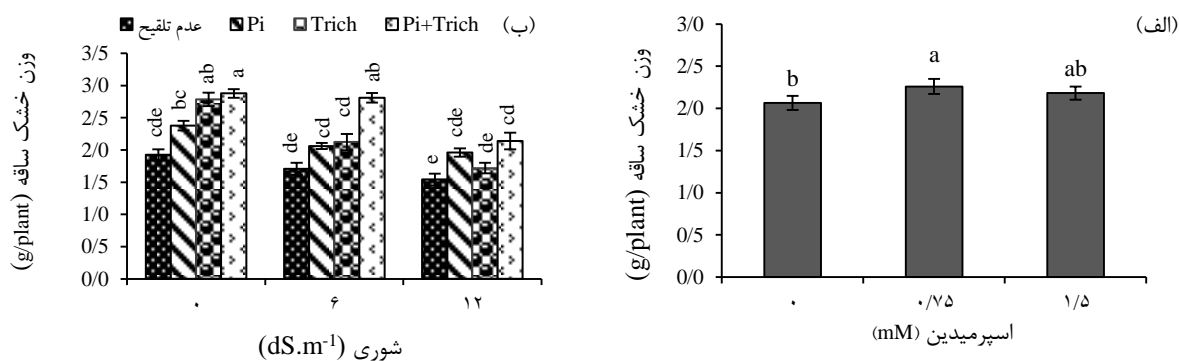
از سوی دیگر، محلول‌پاشی اسپرمیدین نیز در شرایط تنش شور وزن خشک برگ را بهبود بخشید. استفاده از هر دو غلظت اسپرمیدین وزن خشک برگ را در تمام سطوح شوری افزایش داد که این افزایش در سطح شوری شش دسی‌زیمنس بر متر در هر دو غلظت ۰/۷۵ و ۱/۵ میلی‌مولار اسپرمیدین (به ترتیب با ۲۷ و ۲۵ درصد افزایش نسبت به غلظت صفر) و در سطح شوری ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر تنها در غلظت ۰/۷۵ میلی‌مولار (با ۱۱ درصد افزایش نسبت به غلظت صفر) معنی‌دار بود (شکل ۴-۵ ب). پلی‌آمین‌ها به عنوان یک منبع نیتروژنی محسوب شده و در تحریک رشد گیاه نقش دارند. از سوی دیگر به دلیل نقش مثبت آن‌ها در تقسیم و بزرگ شدن سلول، کمک به تعادل کاتیون و آنیون و اثر اکسیداتیوی منجر به افزایش رشد گیاهان می‌شوند (طلعت و همکاران، ۲۰۰۵).



شکل ۴-۵- برهمکنش شوری و همزیستی قارچی (الف) و شوری و پلی آمین اسپرمیدین (ب) بر وزن خشک برگ. *P. indica*: Pi و *T. virens*: Trich در هر شکل میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند.

۴-۱-۲-۵- وزن خشک ساقه

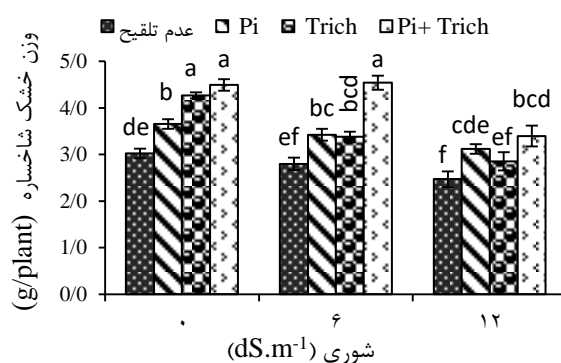
نتایج نشان داد محلول پاشی پلی آمین اسپرمیدین در غلظت ۰/۷۵ میلی مولار منجر به افزایش حدود ۱۰ درصدی وزن خشک ساقه استویا گردید که با غلظت ۱/۵ میلی مولار اسپرمیدین در یک گروه آماری قرار گرفت (شکل ۴-۶ الف). از طرفی، در تمام سطوح شوری تلقیح با قارچ‌های اندوفیت به‌ویژه در شرایط تلقیح همزمان دو قارچ منجر به افزایش وزن خشک ساقه گیاه استویا شد و از کاهش آن در اثر تنش شوری ممانعت گردید (شکل ۴-۶ ب). نتایج این پژوهش با نتایج ژیل و همکاران (۲۰۱۶) در بررسی اثر قارچ *P. indica* و فو و همکاران (۲۰۱۶) در اثر قارچ *T. virens* بر افزایش وزن خشک گیاه تحت تنش شوری مطابقت دارد.



شکل ۴-۶- اثر ساده پلی آمین اسپرمیدین (الف) و برهمکنش شوری و همزیستی قارچی (ب) بر وزن خشک برگ. *P. indica*: Pi و *T. virens*: Trich در هر شکل میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند.

۴-۱-۲-۶- وزن خشک شاخساره

وزن خشک شاخساره گیاه استویا در اثر تنش شوری کاهش یافت (شکل ۴-۷). با این حال در هر سه سطح صفر، شش و ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر شوری، همزیستی با قارچ‌های اندوفیت وزن خشک شاخساره را بهبود بخشید و باعث تعدیل اثر تنش شوری و در نتیجه ممانعت از کاهش رشد گیاه شد. در این راستا تلقیح همزمان دو قارچ نسبت به تلقیح جداگانه آن‌ها مؤثرتر بود، به طوری که بیشترین وزن خشک شاخساره به میزان ۴/۴۹ گرم در بوته در سطح صفر تنش شوری و تلقیح همزمان دو قارچ مشاهده شد. آبیاری با آب شور با تأثیر منفی بر فعالیت‌های آنزیمی، رنگدانه‌های فتوسنتزی و هورمون‌های رشد منجر به کاهش رشد در گیاه و به دنبال آن کاهش وزن خشک می‌گردد (قادوس، ۲۰۱۱). احتمالاً در شرایط شور قارچ‌های اندوفیت از طریق سازوکارهای ناشناخته فیزیولوژیک یا مولکولی موجب تجمع یون‌های سدیم در ریشه گیاه شده و از ورود آن‌ها به اندام‌های هوایی جلوگیری کرده و بدین ترتیب موجب تخفیف و بهبود اثرات منفی ناشی از شوری می‌گردند (سپهری، ۱۳۸۸). پژوهشگران نتایج مشابهی در افزایش وزن خشک در زمان تلقیح با قارچ *P. indica* (ژیل و همکاران، ۲۰۱۶) و تلقیح با قارچ *T. virens* (فو و همکاران، ۲۰۱۶) تحت تنش شوری گزارش کردند.



شکل ۴-۷- برهمکنش شوری و همزیستی قارچی بر وزن خشک شاخساره گیاه استویا. Pi: *P. indica* و Trich: *T. virens*. در هر شکل میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند.

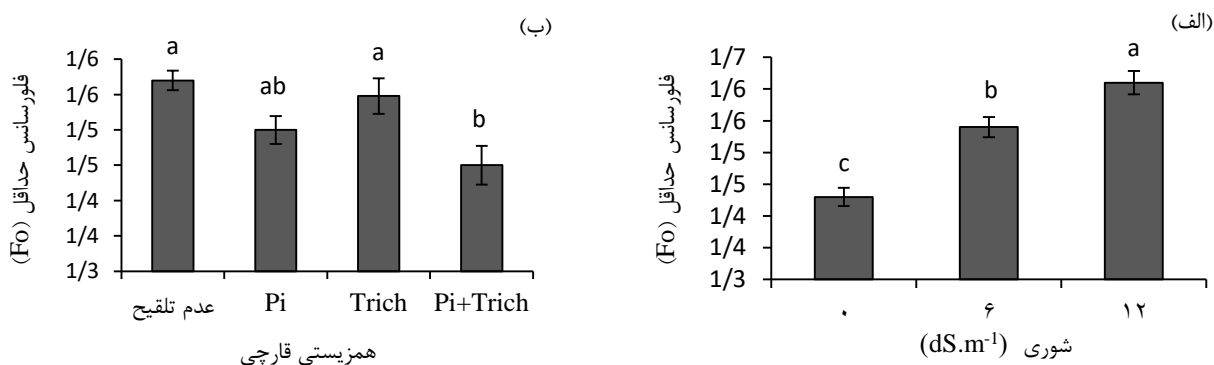
۴-۱-۳- صفات فیزیولوژیک

۴-۱-۳-۱- فلورسانس کلروفیل *a*

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های مربوط به فلورسانس کلروفیل (جدول پیوست ۳) نشان داد که اثر ساده شوری و همزیستی قارچ‌های اندوفیت بر تمامی پارامترهای فلورسانس کلروفیل شامل فلورسانس حداقل (F_0)، فلورسانس حداکثر (F_m)، فلورسانس متغیر (F_v)، حداکثر کارایی کوانتومی فتوسیستم II (F_v/F_m)، کارایی کوانتومی فتوشیمیایی مؤثر فتوسیستم II $[Y(II)]$ ، کارایی کوانتومی غیرفتوشیمیایی تنظیم شده فتوسیستم II $[Y(NPQ)]$ ، کارایی کوانتومی غیرفتوشیمیایی تنظیم نشده فتوسیستم II $[Y(NO)]$ و خاموشی غیرفتوشیمیایی (NPQ) و همچنین اثر ساده پلی‌آمین اسپرمیدین در F_v ، F_m ، F_v/F_m و $Y(NO)$ در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. بین قارچ‌های اندوفیت مورد مطالعه و سطوح مختلف شوری در تمامی پارامترهای مورد نظر به جز فلورسانس حداقل (F_0) برهمکنش معنی‌داری مشاهده شد. همچنین، بین همزیستی قارچی و پلی‌آمین اسپرمیدین در F_v ، F_m ، F_v/F_m و $Y(NO)$ در سطح احتمال پنج درصد برهمکنش معنی‌داری وجود داشت و بین سطوح مختلف شوری و اسپرمیدین برهمکنش معنی‌داری مشاهده نشد. اثر متقابل سه‌گانه شوری، قارچ و اسپرمیدین نیز تنها بر $Y(NO)$ در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار شد (جدول پیوست ۳).

بر اساس یافته‌ها، فلورسانس حداقل در برگ‌های سازگار به تاریکی (F_0) با افزایش تنش شوری افزایش قابل توجهی نشان داد، به طوری که در سطح شوری ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر با حدود ۱۱ درصد افزایش نسبت به شاهد به بالاترین میزان خود رسید (شکل ۴-۸ الف). همچنین تلقیح با قارچ‌های اندوفیت به ویژه تلقیح هم‌زمان دو قارچ $Pi+Trich$ توانست F_0 را نسبت به شاهد حدود هشت درصد کاهش دهد (شکل ۴-۸ ب). فلورسانس حداقل تحت تأثیر تنش‌های محیطی که موجب تغییر ساختار در مراکز واکنش اولیه فتوسیستم II می‌شوند، قرار می‌گیرد (جوادی‌پور و همکاران، ۱۳۹۳). خسارت‌های ناشی از تنش‌های محیطی به مراکز واکنش فتوسیستم II موجب افزایش F_0 می‌شود، لذا هر چه مقدار فلورسانس حداقل کمتر باشد بدین معنی است که فعالیت‌های فتوسنتزی به نحو مطلوبی در جریان است (اندرسون و همکاران، ۱۹۹۵). در

مطالعه حاضر، افزایش میزان Fo با افزایش سطح شوری (شکل ۴-۸ الف) بیانگر تخریب زنجیره انتقال الکترون فتوسیستم II در اثر کاهش ظرفیت کوئینون آ (QA) و عدم اکسیداسیون کامل آن به دلیل جریان کند الکترون در طول مسیر فتوسیستم II و در مجموع غیرفعال شدن فتوسیستم II می‌باشد (گوهانگ و همکاران، ۲۰۱۱؛ گوماراز و همکاران، ۲۰۱۴). افزایش Fo در اثر تنش شوری در بادام (مومن‌پور و همکاران، ۱۳۹۳) و آفتابگردان (صفاری و همکاران، ۱۳۹۲) و همچنین افزایش این پارامتر در تنش خشکی در گیاه دارویی گل گاوزبان (رحیمی و همکاران، ۱۳۹۵) و ذرت (همایونی و همکاران، ۱۳۹۵) و کاهش Fo در اثر تلقیح با ریزجانداران افزاینده رشد در گیاه ریحان تحت تنش شوری (بهاری ساروی و همکاران، ۱۳۹۶) نیز پیش‌تر گزارش شده بود.



شکل ۴-۸- اثر ساده تنش شوری (الف) و همزیستی قارچی (ب) بر فلورسانس حداقل (Fo) در برگ گیاه استویا. Pi: *P. indica* و Trich: *T. virens* در هر شکل میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند.

بر اساس نتایج جدول ۴-۲ مشخص گردید که با افزایش سطوح شوری در بیشتر تیمارهای قارچی و به‌ویژه تیمار عدم تلقیح، فلورسانس حداکثر (Fm)، فلورسانس متغیر (Fv) و حداکثر کارایی کوانتومی فتوسیستم II (Fv/Fm) کاهش یافت. به‌طوری که میزان Fm، Fv و Fv/Fm در تیمار عدم تلقیح با افزایش تنش شوری از صفر تا ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر به ترتیب ۲۴، ۳۳ و ۱۳ درصد کاهش نشان داد. به‌نظر می‌رسد تنش شوری با تغییرات ساختاری در فتوسیستم II، به‌خصوص در پروتئین D₁، بازدارندگی نوری و کاهش پذیرنده‌های الکترون موجب افزایش تولید رادیکال‌های فعال می‌شود که می‌تواند منجر به صدمات اکسیداتیو، تخریب

کلروفیل، افزایش آسیب به اجزای فتوسیستم II و غیرفعال شدن آنزیم‌های کلروپلاست شود (گوماراز و همکاران، ۲۰۱۴). تنش‌های محیطی با اثرات نامطلوبی که بر تثبیت کربن می‌گذارند، ظرفیت پذیرش و انتقال الکترون را کاهش داده در نتیجه سیستم به سرعت به F_m می‌رسد که نتیجه آن کاهش در میزان F_v خواهد بود، از این رو کارایی فتوشیمیایی فتوسیستم II (F_v/F_m) تحت تأثیر تنش کاهش می‌یابد (ما و همکاران، ۱۹۹۵).

از سوی دیگر، نتایج بیانگر اثر مثبت تلقیح با قارچ‌های اندوفیت در شرایط شور بر مقدار F_m ، F_v و F_v/F_m بود، به طوری که هر سه پارامتر مورد نظر در سطوح شوری شش و ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر و در شرایط تلقیح جداگانه و هم‌زمان با قارچ‌های *P. indica* و *T. virens* نسبت به عدم تلقیح افزایش معنی‌داری نشان دادند. در هر سه پارامتر مورد مطالعه (به جز پارامتر F_v/F_m در سطح شوری شش دسی‌زیمنس بر متر) بیشترین افزایش مربوط به تلقیح هم‌زمان دو قارچ بود که در سطح شوری ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر با تلقیح جداگانه قارچ‌ها نیز تفاوت معنی‌داری داشت (جدول ۴-۲). محققان بیان داشتند همزیستی با قارچ می‌تواند اثرات مضر تنش را بر عملکرد کوانتومی فتوسیستم II از طریق کاهش آسیب به مراکز واکنشی فتوسیستم کاهش داده و باعث افزایش مقاومت گیاه به تنش‌های محیطی از جمله شوری و خشکی گردد (حبیبی و همکاران، ۲۰۱۴؛ مهتا و همکاران، ۲۰۱۰؛ یامان و همکاران، ۲۰۰۸). نسبت F_v/F_m نیز نشان‌دهنده‌ی ظرفیت انتقال الکترون فتوسیستم II می‌باشد و به‌عنوان شاخصی معتبر برای نشان دادن اختلال ناشی از تنش در مراکز فتوشیمیایی و بازدارندگی نوری استفاده می‌شود (لی و همکاران، ۲۰۱۰؛ بیکر، ۲۰۰۸). کاهش این شاخص در شرایط تنش نشانه کاهش میزان حفاظت نوری و در نتیجه بازدارندگی تنش شوری بر کارایی فتوسنتز است. از آنجایی که بالاتر بودن نسبت F_v/F_m در سطوح بالای شوری بیانگر توانایی انجام محافظت نوری در شرایط تنش است، بنابراین، در آزمایش حاضر افزایش این شاخص در بوته‌های تلقیح شده با قارچ‌های اندوفیت (جدول ۴-۲) نشان‌دهنده نقش مثبت این ریزجانداران در بهبود سیستم حفاظتی گیاه و افزایش تحمل به تنش شوری است.

جدول ۴-۲- مقایسه میانگین برهمکنش تنش شوری و همزیستی قارچی بر مؤلفه‌های فلورسانس کلروفیل در برگ گیاه استویا

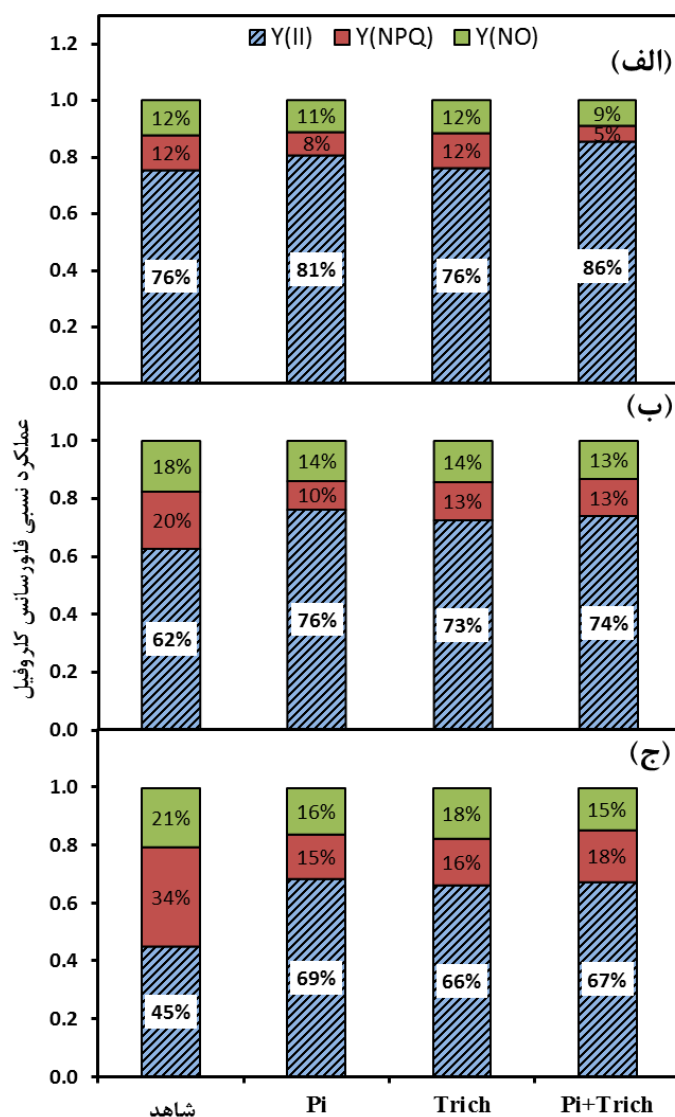
قارچ اندوفیت				شوری (dS.m ⁻¹)
Pi+Trich	<i>T. virens</i> (Trich)	<i>P. indica</i> (Pi)	عدم تلقیح	
فلورسانس حداکثر (Fm)				
۶/۸۴ ^a	۶/۵۳ ^{bc}	۶/۳۰ ^{bcd}	۶/۵۶ ^b	۰
۶/۲۱ ^{de}	۶/۰۷ ^{de}	۶/۱۹ ^{de}	۵/۲۱ ^g	۶
۶/۲۷ ^{cde}	۵/۷۸ ^f	۶/۰۳ ^{ef}	۴/۹۹ ^g	۱۲
فلورسانس متغیر (Fv)				
۵/۴۷ ^a	۵/۱۴ ^b	۴/۸۴ ^{cd}	۵/۰۵ ^{bc}	۰
۴/۵۷ ^{de}	۴/۴۸ ^{ef}	۴/۶۴ ^{def}	۳/۶۴ ^h	۶
۴/۷۴ ^{de}	۴/۱۲ ^g	۴/۴۱ ^f	۳/۳۵ ⁱ	۱۲
حداکثر کارایی کوانتومی فتوسیستم II (Fv/Fm) II				
۰/۷۹ ^a	۰/۷۸ ^{ab}	۰/۷۶ ^{bc}	۰/۷۷ ^{bc}	۰
۰/۷۶ ^{cd}	۰/۷۳ ^{ef}	۰/۷۹ ^{def}	۰/۶۹ ^h	۶
۰/۷۵ ^{cde}	۰/۷۱ ^{gh}	۰/۷۳ ^{fg}	۰/۶۶ ⁱ	۱۲

برای هر پارامتر میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند.

نتایج نشان داد با افزایش تنش شوری از صفر به شش و ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر، کارایی کوانتومی فتوشیمیایی مؤثر فتوسیستم II [Y(II)] به‌ترتیب از ۰/۷۶ به ۰/۶۲ و ۰/۴۵ کاهش یافت (شکل ۴-۹). از آنجایی که Y(II) نسبت نور استفاده شده در فرآیند فتوسنتز به کل نور جذب شده به‌وسیله کلروفیل مربوط به فتوسیستم II بوده و مستقیماً با سرعت آسیمیلایون CO₂ در برگ ارتباط دارد (جنتی و همکاران، ۱۹۸۹)، کاهش این پارامتر در زمان تنش احتمالاً بیانگر کاهش فرآیند فتوسنتزی و آسیمیلایون CO₂ در اثر تنش شوری می‌باشد. از سوی دیگر، باتوجه به اینکه مقدار Y(II) با کارایی کوانتومی غیرفتوشیمیایی تنظیم شده فتوسیستم II [Y(NPQ)] و کارایی کوانتومی غیرفتوشیمیایی تنظیم‌نشده فتوسیستم II [Y(NO)] به‌عنوان عملکردهای کوانتومی رابطه مکملی وجود دارد (استفان و همکاران، ۲۰۰۸)، با کاهش مقدار Y(II)، مقدار Y(NPQ) و Y(NO) افزایش یافت. به‌طور مشابهی حسنی و همکاران (۱۳۹۲) کاهش پارامتر Y(II) در شرایط تنش سرما را در ژنوتیپ‌های گیاه برنج گزارش کردند.

همچنین، نتایج حاکی از اثربخشی تیمار همزیستی قارچی در افزایش Y(II) و کاهش Y(NPQ) و Y(NO) در سطوح مختلف شوری می‌باشد، به‌طوری‌که در شرایط شوری شش و ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر، به‌ترتیب

افزایش ۱۲ و ۲۲ درصدی در پارامتر $Y(II)^8$ در اثر تلقیح Pi+Trich نسبت به سطح شوری مشابه و تیمار عدم تلقیح مشاهده شد. همچنین، تلقیح همزمان دو قارچ در شوری صفر منجر به کاهش هفت درصدی پارامتر $Y(NPQ)$ نسبت به شاهد گردید. بهاری ساروی و همکاران (۱۳۹۶) با کاربرد باکتری‌های افزایش‌دهنده رشد در گیاه ریحان نشان دادند که استفاده این ریزجاندارن مفید خاکزی منجر به افزایش $Y(II)$ و کاهش $Y(NO)^9$ و $Y(NPQ)^9$ در شرایط شوری شد (شکل ۴-۹).



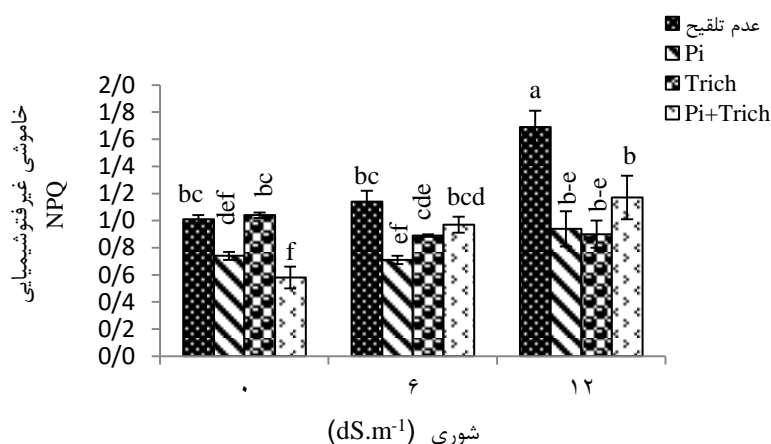
شکل ۴-۹- اثر همزیستی قارچی بر تغییرات مکمل پارامترهای $Y(II)$ ، $Y(NPQ)$ و $Y(NO)$ در سطوح شوری صفر (الف)، ۶ (ب) و ۱۲ (ج) دسی زیمنس بر متر. Pi: *P. indica* و Trich: *T. virens*

⁸ Effective photochemical quantum yield of PSII

⁹ Quantum yield of regulated non-photochemical of PSII

¹⁰ Quantum yield of non-regulated non-photochemical of PSII

یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد با تلقیح قارچ‌های اندوفیت خاموشی غیرفتوشیمیایی (NPQ)¹¹ هم در شرایط نرمال و هم شرایط شور کاهش یافت (شکل ۴-۱۰)، این کاهش در شرایط شوری صفر در تیمار قارچی Pi+Trich نسبت به عدم تلقیح به ۴۴ درصد رسید. افزایش پارامتر NPQ به‌عنوان شاخص هدررفت گرمایی بیانگر ظرفیت بالای چرخه گزانتوفیل و توانایی گیاه در دفع تنش از طریق هدررفت انرژی به صورت گرما می‌باشد (چاوز و همکاران، ۲۰۰۹). با این وجود، با افزایش بیشتر سطوح تنش ممکن است افزایش در NPQ برای مصرف انرژی مازاد و حفظ اکسیداسیون پذیرنده‌های الکترون فتوسیستم II ناکافی باشد (اورت و بکر، ۲۰۰۲). تنش‌های محیطی با اشباع زنجیره انتقال الکترون و تجمع پروتون‌ها منجر به کاهش pH لومن شده و در نهایت افزایش در NPQ را به دنبال خواهد داشت (کستل و همکاران، ۲۰۱۴). ریزجانداران مفید خاکزی از جمله قارچ‌های همزیست در زمان وقوع تنش‌های محیطی با تولید موادی همچون اکسین، آنتی‌اکسیدان‌ها، سیتوکنین‌ها، اسانس‌ها و آنزیم ACC دامیناز به رشد گیاه و تحمل شرایط نامساعد کمک می‌کنند (جونگوک و همکاران، ۲۰۰۹). در همین راستا، به‌کارگیری قارچ میکوریز به‌عنوان کود زیستی تحت تنش‌های محیطی از جمله تنش شوری و خشکی توانست تأثیر مثبتی بر پارامترهای فلورسانس کلروفیل داشته باشد. در این خصوص می‌توان به مطالعات رویز سانچز و همکاران (۲۰۱۱) در گیاه برنج و ژو و همکاران (۲۰۱۲) در گیاه ذرت تحت تنش خشکی اشاره نمود.



شکل ۴-۱۰ - برهمکنش شوری و همزیستی قارچی بر خاموشی غیرفتوشیمیایی (NPQ) برگ گیاه استویا. Pi: *P. indica* و Trich: *T. vires*. در هر شکل میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند.

¹¹ Non-photochemical quenching

براساس یافته‌ها (جدول ۳-۴) همزیستی قارچی به‌ویژه Pi+Trich و محلول‌پاشی اسپرمیدین با غلظت ۰/۷۵ میلی‌مولار منجر به افزایش Fv، Fm و Fv/Fm گردید. در هر سه پارامتر مورد نظر بیشترین افزایش در تیمار قارچی Pi+Trich و محلول‌پاشی ۰/۷۵ میلی‌مولار اسپرمیدین مشاهده شد که نسبت به تیمار عدم‌تلقیح و اسپرمیدین صفر میلی‌مولار به ترتیب ۲۸، ۴۶ و ۱۵ درصد بود. محلول‌پاشی اسپرمیدین هر سه پارامتر مذکور را در تیمارهای عدم‌تلقیح و تلقیح *P. indica* و *T. virens* افزایش داد که این افزایش به‌جز اسپرمیدین ۰/۷۵ میلی‌مولار در تیمار تلقیح *T. virens* در سایر موارد معنی‌دار بود. کاربرد پلی‌آمین اسپرمیدین به‌طور قابل‌توجهی با افزایش کارایی فتوشیمیایی فتوسیستم II موجب بهبود فلورسانس کلروفیل گیاه شد. بنابراین، می‌توان چنین بیان کرد که کاربرد اسپرمیدین با حفظ غلظت کلروفیل در مراکز واکنشی فتوشیمیایی (جدول ۳-۴) موجب افزایش کارایی فتوسیستم II شد.

جدول ۳-۴- مقایسه میانگین برهمکنش همزیستی قارچی و محلول‌پاشی پلی‌آمین اسپرمیدین بر مؤلفه‌های فلورسانس کلروفیل در برگ گیاه استویا

قارچ اندوفیت				اسپرمیدین (mM)
Pi+Trich	<i>T. virens</i> (Trich)	<i>P. indica</i> (Pi)	عدم‌تلقیح	
فلورسانس حداکثر (Fm)				
۶/۳۷ ^{ab}	۵/۹۵ ^{cd}	۵/۹۶ ^{cd}	۵/۱۰ ^e	۰
۶/۵۵ ^a	۶/۱۶ ^{bc}	۶/۳۳ ^{ab}	۵/۷۸ ^d	۰/۷۵
۶/۴۱ ^{ab}	۶/۲۷ ^b	۶/۲۳ ^b	۵/۸۷ ^d	۱/۵
فلورسانس متغیر (Fv)				
۴/۸۷ ^{abc}	۴/۳۸ ^{de}	۴/۳۹ ^{de}	۳/۴۹ ^f	۰
۵/۱۱ ^a	۴/۶۱ ^{cd}	۴/۷۹ ^{bc}	۴/۲۲ ^e	۰/۷۵
۴/۹۷ ^{ab}	۴/۷۵ ^{bc}	۴/۷۱ ^{bc}	۴/۳۲ ^e	۱/۵
حداکثر کارایی کوانتومی فتوسیستم II (Fv/Fm) II				
۰/۷۶۴ ^{abc}	۰/۷۳۴ ^{de}	۰/۷۳۵ ^{de}	۰/۶۷۵ ^f	۰
۰/۷۸۰ ^a	۰/۷۴۶ ^{cd}	۰/۷۵۷ ^{bc}	۰/۷۲۵ ^e	۰/۷۵
۰/۷۷۳ ^{ab}	۰/۷۵۵ ^{bc}	۰/۷۵۵ ^{bc}	۰/۷۳۳ ^{de}	۱/۵

میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند.

مقایسه میانگین اثر متقابل سه گانه تیمارهای آزمایشی (جدول ۴-۴) نشان داد، میزان کارایی کوانتومی غیرفتوشیمیایی تنظیم نشده [Y(NO)] در مجموع در اثر تنش شوری روند افزایشی داشت. همچنین، میزان این پارامتر در تمام سطوح شوری با تلقیح قارچ‌های *P. indica*، *T. virens* و Pi+Trich نسبت به تیمار عدم تلقیح کاهش یافت. با این وجود، در سطوح تنش شوری شش و ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر و تیمارهای مختلف قارچی، محلول‌پاشی اسپرمیدین به‌ویژه غلظت ۰/۷۵ میلی‌مولار آن کاهش معنی‌دار Y(NO) را به دنبال داشت. کاهش Y(NO) نشانگر افزایش نسبت نور استفاده شده در فرآیند فتوشیمیایی و کاهش اتلاف انرژی و به دنبال آن افزایش در سرعت آسیمیلاسیون CO₂ می‌باشد (لی و همکاران، ۲۰۰۸).

جدول ۴-۴- مقایسه میانگین برهمکنش تنش شوری، همزیستی قارچی و محلول پاشی پلی‌آمین اسپرمیدین بر کارایی کوانتومی غیرفتوشیمیایی تنظیم نشده [Y(NO)] گیاه استویا

قارچ اندوفیت				اسپرمیدین (mM)	شوری (dS.m ⁻¹)
Pi+Trich	<i>T. virens</i> (Trich)	<i>P. indica</i> (Pi)	عدم تلقیح		
۰/۱۰۵ ^{v-w}	۰/۱۲۳ ^{p-t}	۰/۱۲۲ ^{q-u}	۰/۱۲۷ ^{o-t}	۰	
۰/۰۹۱ ^w	۰/۱۱۵ ^{s-v}	۰/۱۱۲ ^{t-v}	۰/۱۲۰ ^{r-u}	۰/۷۵	۰
۰/۰۷۱ ^x	۰/۱۱۲ ^{t-v}	۰/۱۰۰ ^{v-w}	۰/۱۱۸ ^{r-u}	۱/۵۰	
۰/۱۳۱ ^{n-s}	۰/۱۵۰ ^{h-m}	۰/۱۴۲ ^{k-o}	۰/۲۰۲ ^b	۰	
۰/۱۲۶ ^{o-t}	۰/۱۴۶ ⁱ⁻ⁿ	۰/۱۳۵ ^{m-r}	۰/۱۶۴ ^{e-h}	۰/۷۵	۶
۰/۱۴۴ ^{j-n}	۰/۱۳۹ ^{l-p}	۰/۱۳۹ ^{l-q}	۰/۱۶۲ ^{e-i}	۱/۵۰	
۰/۱۵۴ ^{g-k}	۰/۱۸۴ ^{cd}	۰/۱۷۳ ^{def}	۰/۲۳۳ ^a	۰	
۰/۱۵۰ ^{h-m}	۰/۱۷۵ ^{de}	۰/۱۵۸ ^{f-k}	۰/۱۹۷ ^{bc}	۰/۷۵	۱۲
۰/۱۴۳ ^{j-o}	۰/۱۷۰ ^{d-g}	۰/۱۶۰ ^{e-j}	۰/۱۸۷ ^{bcd}	۱/۵۰	

میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند.

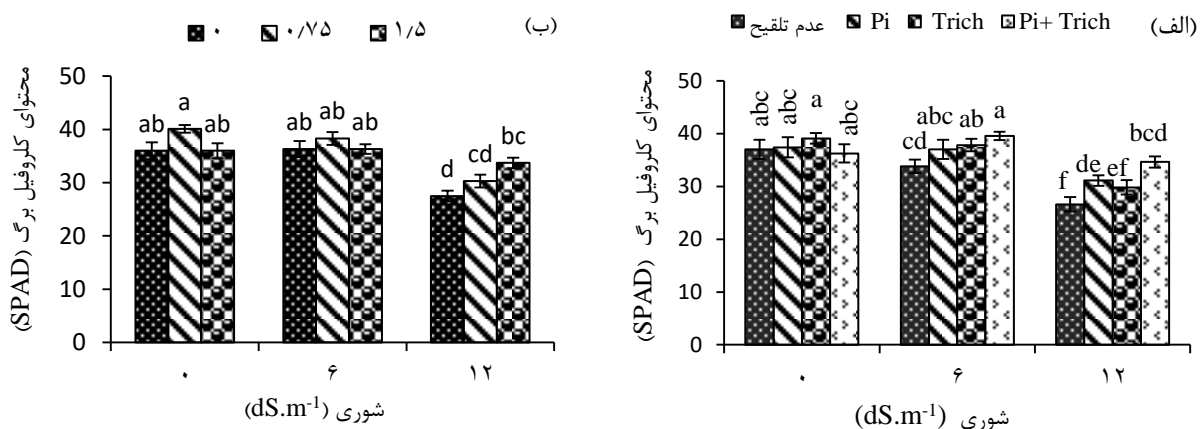
۴-۱-۳-۲- رنگدانه‌های فتوسنتزی

تجزیه واریانس داده‌های حاصل از سنجش رنگیزه‌های فتوسنتزی (جدول پیوست ۴) نشان داد که اثر ساده شوری و پلی‌آمین اسپرمیدین بر تمامی صفات مورد بررسی شامل محتوای کلروفیل برگ (عدد SPAD)، کلروفیل *a*، *b*، *a+b*، کارتنوئید و همچنین اثر ساده همزیستی قارچ بر تمامی صفات به‌غیر از کارتنوئید معنی‌دار بود. در محتوای کلروفیل برگ (عدد SPAD) و غلظت کلروفیل *a* بین سطوح مختلف شوری و قارچ‌های اندوفیت و نیز در غلظت کلروفیل *a* بین همزیستی قارچی و اسپرمیدین برهمکنش معنی‌داری

مشاهده شد. برهمکنش شوری و اسپرمیدین نیز در محتوای کلروفیل و غلظت کلروفیل a در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. همچنین اثر سه‌گانه شوری، قارچ و اسپرمیدین نیز بر دو صفت کلروفیل b و $a+b$ معنی‌دار شد.

۴-۱-۲-۳-۱-۴- محتوای کلروفیل برگ (عدد SPAD)

محتوای کلروفیل برگ (SPAD) با افزایش تنش شوری از صفر تا ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر کاهش یافت و تلقیح با تیمارهای قارچی به‌ویژه تلقیح هم‌زمان دو قارچ (Pi+Trich) منجر به افزایش این صفت گردید (شکل ۴-۱۱ الف). کاهش در محتوای کلروفیل برگ در شرایط شور را می‌توان به تخریب رنگدانه‌های فتوسنتزی و بی‌ثبات شدن کمپلکس پروتئین رنگدانه در نتیجه انباشت یون‌های سدیم و کلر و همچنین تخریب کلروفیل برگ در اثر فعالیت گونه‌های فعال اکسیژن مرتبط دانست. میزان بالای محتوای کلروفیل در برگ گیاهان تلقیح شده با قارچ‌های اندوفیتی و میکوریزی تحت تنش شوری توسط محققین در گیاه استویا (نوری و همکاران، ۱۳۹۵)، ذرت (شنگ و همکاران، ۲۰۰۸)، یونجه (کرمی و زارع، ۱۳۹۳) و گندم (حاجی‌نیا و همکاران، ۱۳۹۰) گزارش شده است. از سوی دیگر، نتایج نشان داد اختلاف معنی‌داری بین سطوح مختلف محلول‌پاشی اسپرمیدین در شوری صفر و شش دسی‌زیمنس بر متر در صفت محتوای کلروفیل برگ مشاهده نشد، اما در شرایط تنش شوری بالا (۱۲ دسی‌زیمنس بر متر) محلول‌پاشی اسپرمیدین به‌ویژه ۱/۵ میلی‌مولار باعث افزایش محتوای کلروفیل گردید (شکل ۴-۱۱ ب).



شکل ۴-۱۱- برهمکنش تنش شوری و همزیستی قارچی (الف) و تنش شوری و اسپرمیدین (ب) بر محتوای کلروفیل برگ گیاه استویا. Pi: *P. indica* و *T. virens*. در هر شکل میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند.

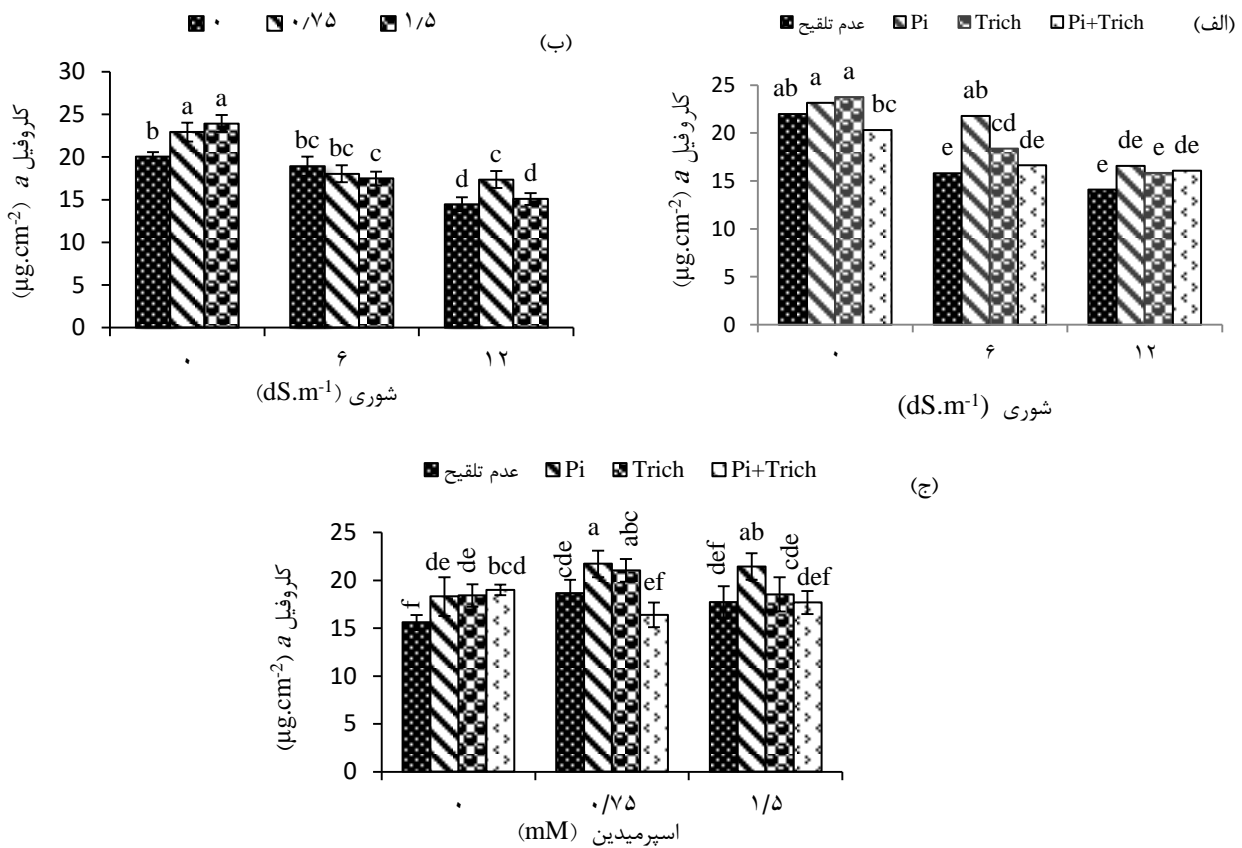
۴-۱-۳-۲-۲-۲-۱-۴ کلروفیل a

در مجموع، آبیاری با آب شور باعث کاهش غلظت کلروفیل *a* در برگ گیاه استویا گردید. در تمام سطوح شوری، تلقیح با تیمارهای قارچی (به جز Pi+Trich در سطح شوری صفر) افزایش غلظت کلروفیل *a* را به دنبال داشت که بیشترین افزایش آن (حدود ۳۷ درصد) مربوط به همزیستی قارچ *P. indica* در سطح شوری شش دسی‌زیمنس بر متر بود (شکل ۴-۱۲ الف). شوری با کاهش جذب عناصر معدنی از جمله منیزیم موجب کاهش بیوسنتز کلروفیل و فتوسنتز در گیاهان می‌شود (کرمی و همکاران، ۱۳۹۳). سمیت بیش از حد یون‌های سدیم و کلر نیز موجب آسیب به غشاء پلاسمایی، اندامک‌های سلولی و اختلال در فتوسنتز، تنفس و سنتز پروتئین‌ها (فنگ و همکاران، ۲۰۰۹) و نیز موجب عدم پایداری ترکیب رنگیزه - پروتئین در گیاه می‌گردد (سینگ و همکاران، ۱۹۹۴). گرچه کلروفیل *a* در مقایسه با کلروفیل *b* از تراکم بالاتری در دستگاه فتوسنتزی برخوردار است، اما این رنگدانه نسبت به کلروفیل *b* و سایر رنگدانه‌های سیستم فتوسنتزکننده گیاه در مقابل تنش‌های محیطی به‌ویژه تنش شوری و خشکی حساس‌تر است (میترا و بنرجی، ۲۰۱۰). کاهش میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی در شرایط تنش شوری می‌تواند به دلیل افزایش فعالیت آنزیم کلروفیل‌لاز، القای تخریب ساختار کلروپلاستی و بی‌ثباتی کمپلکس‌های پروتئینی رنگدانه باشد (دالال و تریپاتی، ۲۰۱۲). در همین راستا، محققین افزایش کلروفیل *a* در گیاهان تلقیح‌شده با قارچ‌های

اندوفیت را به دلیل بهبود وضعیت آبی و جذب عناصر معدنی فسفر و منیزیم دانسته‌اند (گری و همکاران، ۲۰۰۲).

از طرفی، در سطح شوری صفر و ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر، محلول پاشی اسپرمیدین بر غلظت کلروفیل a اثر مثبت نشان داد. در سطح صفر شوری استفاده از غلظت ۰/۷۵ و ۱/۵ میلی‌مولار اسپرمیدین منجر به افزایش معنی‌دار کلروفیل a گردید. بیشترین غلظت کلروفیل a در برگ گیاه استویا در اسپرمیدین ۱/۵ میلی‌مولار مشاهده شد که با محلول پاشی اسپرمیدین ۰/۷۵ میلی‌مولار در یک سطح آماری قرار گرفت. همچنین در سطح ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر محلول پاشی ۰/۷۵ میلی‌مولار باعث افزایش ۲۴ درصدی غلظت کلروفیل a نسبت به سطح صفر اسپرمیدین گردید (شکل ۴-۱۲ ب).

همچنین، برهمکنش قارچ و محلول پاشی اسپرمیدین اثر مثبتی را در غلظت کلروفیل a به‌دنبال داشت، به‌طوری‌که مقدار کلروفیل a در زمان تلقیح با قارچ *P. indica* و محلول پاشی اسپرمیدین ۰/۷۵ میلی‌مولار افزایش ۳۹ درصدی را نسبت به شاهد (عدم تلقیح قارچ و اسپرمیدین صفر) به‌دنبال داشت (شکل ۴-۱۲ ج). در همین راستا، محققین افزایش کلروفیل a در گیاهان تلقیح‌شده با قارچ‌های اندوفیت را به دلیل بهبود وضعیت آبی و جذب عناصر معدنی فسفر و منیزیم دانسته‌اند (گری و همکاران، ۲۰۰۲). از سوی دیگر، به‌نظر می‌رسد، پلی‌آمین اسپرمیدین با نقش آنتی‌اکسیدانی خود موجب ثبات غشای تیلاکوئیدی و حفظ پروتئین و لیپیدهای آن در مقابل تنش اکسیداتیو ناشی از تنش شوری می‌گردد که نتیجه آن ثبات کلروفیل از صدمات ناشی از تنش می‌باشد (نیاکان و همکاران، ۱۳۹۴).



شکل ۴-۱۲- برهمکنش تنش شوری و همزیستی قارچی (الف)، شوری و اسپرمیدین (ب) و برهمکنش همزیستی قارچ و اسپرمیدین (ج) بر غلظت کلروفیل *a* در برگ گیاه استویا. *Trich*: *T. virens* و *Pi*: *P. indica*. در هر شکل میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند.

۴-۱-۳-۲-۳- کلروفیل *b*

براساس یافته‌های حاصل از مقایسه میانگین اثر متقابل سه‌گانه تیمارهای آزمایشی (جدول ۴-۵)، غلظت کلروفیل *b* در تمام سطوح شوری در اثر تلقیح با قارچ‌های *P. indica* و *T. virens* بهبود یافت. هر چند افزایش آن در برخی موارد معنی‌دار نبود. همچنین، در بیشتر سطوح تنش شوری و تلقیح قارچی نیز محلول‌پاشی اسپرمیدین به‌ویژه غلظت ۰/۷۵ میلی‌مولار آن افزایش معنی‌دار کلروفیل *b* را به دنبال داشت. بیشترین غلظت کلروفیل *b* (۱۰/۷۴ میکروگرم در سانتی‌متر مربع) در سطح شوری صفر، تلقیح *Pi+Trich* و محلول‌پاشی ۰/۷۵ میلی‌مولار اسپرمیدین و کمترین آن (۲/۴۰ میکروگرم در سانتی‌متر مربع) در سطح شوری ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر، تیمار عدم‌تلقیح و اسپرمیدین صفر به‌دست آمد. در همین زمینه، زارا و همکاران (۲۰۱۲) بیان کردند که بالا بودن میزان کلروفیل در گیاهان تلقیح‌شده با قارچ اندوفیت می‌تواند به

علت وجود رابطه مثبت بین غلظت فسفر و مقدار کلروفیل در گیاهان تلقیح شده باشد. همچنین در شرایط تنش، تلقیح قارچی با تأثیر بر سیستم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانی، گونه‌های فعال اکسیژن را جمع‌آوری و از تخریب کلروفیل جلوگیری خواهد کرد (کاپور و همکاران، ۲۰۰۸). از سوی دیگر، پلی‌آمین‌ها نقش محافظت از کلروفیل و پروتئین را بر عهده داشته و با کاهش پراکسیداسیون لیپیدها سبب ثبات در غشای تیلاکوئید می‌شوند (نیاکان و همکاران، ۱۳۹۴). در این خصوص گزارش شده که محلول پاشی پلی‌آمین در گیاه پریوش (*Catharanthus roseus*) موجب بهبود کلروفیل *a*، *b* و کارتنوئید شد (طلعت و همکاران، ۲۰۰۵).

جدول ۴-۵- مقایسه میانگین برهمکنش تنش شوری، قارچ و محلول پاشی پلی‌آمین اسپرمیدین بر غلظت کلروفیل *b* در برگ گیاه استویا ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$)

قارچ اندوفیت				اسپرمیدین (mM)	شوری ($\text{dS}\cdot\text{m}^{-1}$)
Pi+Trich	<i>T. virens</i> (Trich)	<i>P. indica</i> (Pi)	عدم تلقیح		
۸/۸۳ ^{a-c}	۴/۴۹ ^{h-m}	۳/۵۸ ^{j-m}	۳/۰۵ ^{lm}	۰	۰
۱۰/۷۴ ^a	۵/۴۴ ^{e-k}	۷/۳۲ ^{c-f}	۵/۴۰ ^{e-k}	۰/۷۵	۰
۷/۲۷ ^{c-g}	۵/۹۵ ^{d-i}	۵/۲۶ ^{e-k}	۴/۳۷ ^{h-m}	۱/۵۰	۰
۸/۲۶ ^{b-d}	۳/۹۰ ^{h-m}	۵/۹۵ ^{d-i}	۲/۴۸ ^m	۰	۰
۱۰/۷۰ ^a	۷/۴۶ ^{c-e}	۷/۲۷ ^{c-g}	۴/۹۰ ^{h-l}	۰/۷۵	۶
۱۰/۰۱ ^{ab}	۶/۲۲ ^{d-h}	۴/۹۹ ^{g-l}	۳/۸۴ ^{i-m}	۱/۵۰	۰
۵/۶۹ ^{e-j}	۵/۰۲ ^{f-l}	۳/۱۵ ^{k-m}	۲/۴۰ ^m	۰	۰
۹/۱۵ ^{a-c}	۶/۱۱ ^{d-i}	۹/۱۳ ^{a-c}	۳/۵۵ ^{j-m}	۰/۷۵	۱۲
۹/۱۲ ^{a-c}	۵/۳۵ ^{e-l}	۳/۳۰ ^{k-m}	۳/۴۸ ^{j-m}	۱/۵۰	۰

میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند.

۴-۱-۳-۲-۴- کلروفیل *a+b*

نتایج جدول ۴-۶ نشان داد در مجموع، با افزایش سطوح شوری غلظت کلروفیل *a+b* کاهش یافت. شوری با تسریع زوال رنگیزه‌های کلروفیلی، کوچکتر شدن فضای بین سلولی و کاهش هدایت دی‌اکسیدکربن موجب کاهش فتوسنتز در گیاهان می‌گردد (کریمی و زارع، ۱۳۹۳). با این حال، در بیشتر سطوح شوری و محلول‌پاشی اسپرمیدین، تلقیح تیمارهای قارچی، افزایش غلظت کلروفیل *a+b* را به دنبال داشت که بیشترین اثر در تنش شوری صفر و اسپرمیدین ۱/۵ میلی‌مولار، در شرایط تلقیح قارچ *T. virens* مشاهده شد که معادل حدود ۳۲ درصد بود. محلول‌پاشی سطوح پلی‌آمین نیز اثر مثبتی بر میزان کلروفیل *a+b*

نشان داد که بیشترین اثر افزایشی آن در سطح شوری ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر و تیمار قارچی Pi مشاهده شد که این افزایش در محلول‌پاشی پلی‌آمین ۰/۷۵ میلی‌مولار نسبت به غلظت صفر آن حدود دو برابر بود. به نظر می‌رسد، پلی‌آمین‌ها به‌عنوان تنظیم‌کننده رشد با تنظیم تعادلی هورمونی و متابولیسم اسیدهای آمینه نقش مثبتی در توسعه هیف‌های قارچی و گسترش کلونی قارچ در ریشه بر عهده دارند (وو و همکاران، ۲۰۱۰).

جدول ۴-۶- مقایسه میانگین برهمکنش تنش شوری، قارچ اندوفیت و پلی‌آمین اسپرمیدین بر غلظت کلروفیل $a+b$ ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) در برگ گیاه استویا

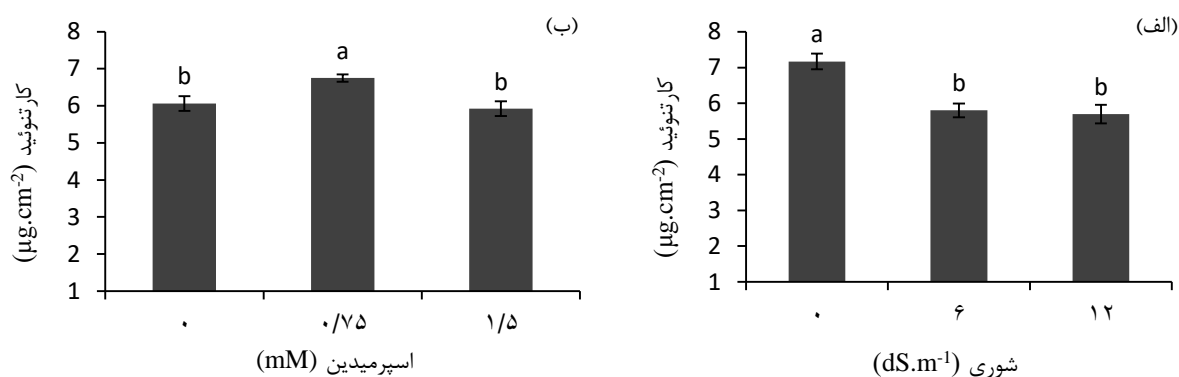
قارچ اندوفیت				اسپرمیدین (mM)	شوری ($\text{dS}\cdot\text{m}^{-1}$)
Pi+Trich	<i>T. virens</i> (Trich)	<i>P. indica</i> (Pi)	عدم تلقیح		
۲۸/۹۵ ^{a-d}	۲۵/۸۹ ^{a-g}	۲۳/۷۸ ^{d-j}	۲۱/۶۴ ^{f-l}	.	.
۳۱/۲۰ ^a	۲۹/۹۰ ^{a-c}	۳۰/۹۲ ^a	۲۸/۵۹ ^{a-d}	۰/۷۵	.
۲۷/۷۰ ^{a-e}	۳۱/۴۱ ^a	۳۰/۹۰ ^a	۲۸/۶۱ ^{a-d}	۱/۵۰	.
۲۶/۳۸ ^{a-f}	۲۳/۷۶ ^{d-j}	۲۹/۱۱ ^{a-d}	۱۶/۹۴ ^{k-m}	.	.
۲۴/۸۲ ^{b-h}	۲۷/۰۰ ^{a-f}	۲۷/۸۹ ^{abcde}	۲۲/۸۰ ^{e-j}	۰/۷۵	۶
۲۷/۷۱ ^{a-e}	۲۲/۰۰ ^{f-k}	۲۶/۳۵۵ ^{a-f}	۱۸/۹۶ ^{i-m}	۱/۵۰	.
۲۴/۴۵ ^{c-i}	۱۹/۰۱ ^{i-m}	۱۴/۵۶ ^m	۱۶/۱۳ ^{lm}	.	.
۲۳/۷۴ ^{d-j}	۲۵/۲۵ ^{b-h}	۳۰/۰۵ ^{ab}	۱۸/۳۸ ^{j-m}	۰/۷۵	۱۲
۲۴/۰۳ ^{d-i}	۱۹/۷۲ ^{h-m}	۲۰/۶۵ ^{g-l}	۱۷/۲۳ ^{k-m}	۱/۵۰	.

میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند.

۴-۱-۳-۲-۵- کارتنوئید

غلظت کارتنوئید در برگ گیاه استویا در شرایط شوری شش و ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر به ترتیب ۲۳ و ۲۵ درصد نسبت به شاهد کاهش یافت (شکل ۴-۱۳ الف). محلول‌پاشی اسپرمیدین تنها در غلظت ۰/۷۵ میلی‌مولار منجر به افزایش ده درصدی میزان کارتنوئید برگ گردید (شکل ۴-۱۳ ب). کارتنوئیدها به‌عنوان رنگیزه کمکی و حفاظتی در جذب و انتقال انرژی نورانی دریافتی به کلروفیل *a* نقش داشته و قادرند سیستم فتوسنتزی را در شرایط تنش‌های محیطی محافظت کنند، همچنین از طریق چرخه گزانتوفیل باعث مصرف NADPH و محافظت از کلروفیل در مقابل فتواکسیداسیون می‌شوند (یعقوبیان و همکاران، ۲۰۱۶). بنابراین

به نظر می‌رسد افزایش میزان کارتنوئید به دنبال محلول پاشی اسپرمیدین می‌تواند به عنوان راهکاری در جهت مقابله با تنش شوری باشد.



شکل ۴-۱۳- اثر ساده تنش شوری (الف) و پلی آمین اسپرمیدین (ب) بر غلظت کارتنوئید در برگ گیاه استویا. در هر شکل میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند.

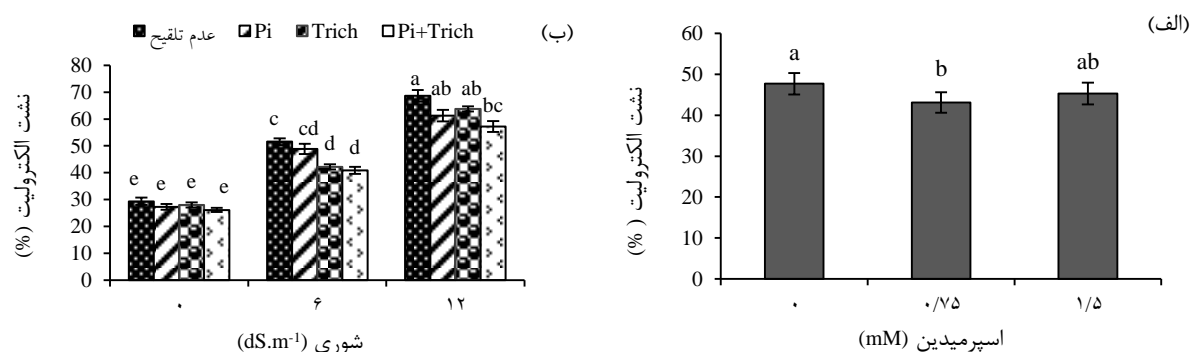
۴-۱-۳-۳- نشت الکترولیت و محتوای نسبی آب برگ

بر اساس نتایج جدول پیوست ۵ اثر ساده شوری، همزیستی قارچی و محلول پاشی پلی آمین اسپرمیدین بر درصد نشت الکترولیت و محتوای نسبی آب برگ در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. از سوی دیگر، برهمکنش شوری و قارچ‌های اندوفیت نیز بر هر دو صفت مذکور اثر معنی‌داری نشان داد. همچنین تأثیر برهمکنش همزیستی قارچی و محلول پاشی اسپرمیدین بر محتوای نسبی آب برگ در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. برهمکنش شوری، قارچ و اسپرمیدین در هیچ یک از صفات مذکور اثر معنی‌داری نشان نداد.

۴-۱-۳-۱- نشت الکترولیت

کاربرد پلی آمین اسپرمیدین منجر به کاهش نشت الکترولیت به ویژه در غلظت 0.75 میلی مولار نسبت به سطح صفر اسپرمیدین (حدود ۱۰ درصدی) در برگ استویا گردید (شکل ۴-۱۴ الف). پلی آمین‌ها از طریق اتصال به مولکول‌های آنیونی از جمله فسفولیپیدهای غشا و پلی ساکاریدهای پکتینی باعث پایداری غشا و

افزایش تحمل گیاهان در شرایط تنش شده و کاهش نشت یونی را به دنبال خواهند داشت (سارفرز و همکاران، ۲۰۱۱). از سوی دیگر، در شرایط شور میزان نشت الکترولیت در برگ گیاه استویا افزایش نشان داد، با این حال در دو سطح شوری شش و ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر، تلقیح با تیمارهای قارچی به‌ویژه تلقیح همزمان دو قارچ توانست مقدار نشت الکترولیت را کاهش دهد (شکل ۴-۱۴ ب). یکی از اولین بخش‌های سلول که در شرایط تنش آسیب می‌بیند غشای سلولی است، به‌طوری‌که نفوذپذیری غشای سلولی افزایش یافته و سبب نشت الکترولیت‌های سلول به خارج می‌گردد (لویت، ۱۹۸۰). بنابراین، نشت الکترولیت به عنوان شاخص پایداری غشاء تحت تنش شوری افزایش می‌یابد، چراکه تنش‌های محیطی از طریق افزایش تولید گونه‌های اکسیژن فعال در داخل سلول، موجب پراکسیداسیون لیپیدی و کاهش پایداری غشاء و در نتیجه نشت مواد سیتوپلاسمی از آن شده و افزایش نسبت هدایت الکتریکی را به دنبال خواهند داشت (مانچاندا و گارج، ۲۰۰۸). افزایش نشت الکترولیت در اثر شوری در گیاهانی چون ریحان (بهراری ساروی و همکاران، ۱۳۹۶) و گندم (فاروق و اعظم، ۲۰۰۶) نیز گزارش شده است.



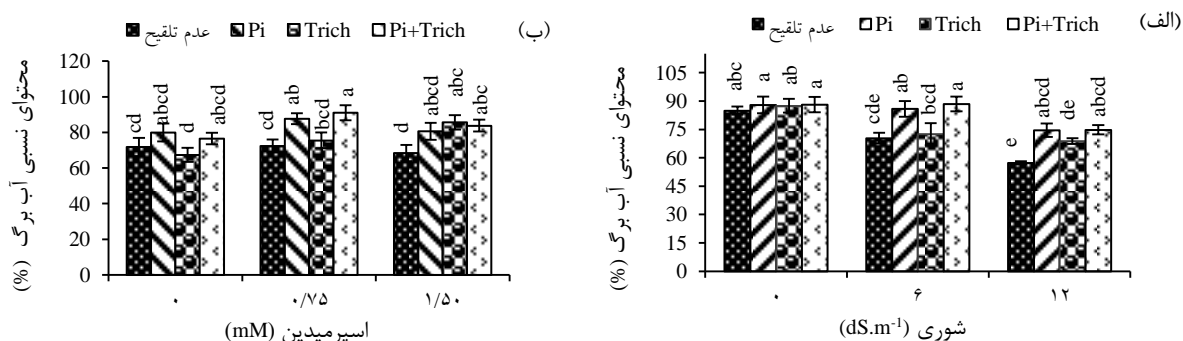
شکل ۴-۱۴ اثر ساده پلی‌آمین اسپرمیدین (الف) و برهمکنش شوری و همزیستی قارچی (ب) بر نشت الکترولیت در برگ گیاه استویا. *P. indica*: Pi و *T. virens*: Trich. در هر شکل میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند.

۴-۱-۳-۲- محتوای نسبی آب برگ

با بررسی مقایسه میانگین اثر همزیستی قارچ‌های اندوفیت بر محتوای نسبی آب برگ در شرایط شور (شکل ۴-۱۵ الف) مشخص گردید با افزایش شوری محتوای نسبی آب برگ در گیاه استویا کاهش یافت. در مقایسه، در هر سه سطح شوری در اثر حضور قارچ‌های اندوفیت به‌ویژه کاربرد همزمان دو قارچ افزایش در

محتوای نسبی آب برگ را نشان داد که این افزایش در سطح شش و ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر نسبت به عدم تلقیح معنی‌دار بود. بر این اساس، بیشترین محتوای نسبی آب برگ در سطح صفر شوری در زمان تلقیح هم‌زمان دو قارچ و کمترین میزان، در شوری ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر و عدم تلقیح قارچ مشاهده شد. افزایش فشار اسمزی محلول اطراف ریشه در اثر افزایش شوری، موجب کاهش پتانسیل آب در آن محیط و در نتیجه کاهش جذب آب توسط ریشه شده، به‌طوری‌که گیاه قادر به حفظ محتوای آب برگ‌های خود نبوده و محتوای نسبی آب برگ‌ها کاهش می‌یابد (فریک و پیتز، ۲۰۰۲). احتمالاً قارچ‌ها از طریق تغییر در ساختار مورفولوژی ریشه و افزایش در طول ریشه گیاهان موجب افزایش در سطح جذب ریشه از طریق ریشه‌های خود شده، در نتیجه سرعت حرکت آب به داخل گیاه میزبان افزایش یافته و منجر به تغییرات در آبیگری بافت و فعالیت‌های فیزیولوژیک برگ شده و در نهایت میزان جذب آب و عناصر غذایی و روابط آبی گیاه را بهبود می‌بخشد (اوگو و همکاران، ۲۰۰۱).

همچنین، با بررسی برهمکنش قارچ‌های اندوفیت و محلول‌پاشی اسپرمیدین بر محتوای نسبی آب برگ (شکل ۴-۱۵ ب) مشخص گردید، همزیستی با قارچ‌های اندوفیت به‌ویژه کاربرد هم‌زمان دو قارچ و محلول‌پاشی اسپرمیدین به‌ویژه در غلظت ۰/۷۵ میلی‌مولار منجر به افزایش محتوای نسبی آب برگ نسبت به شاهد گردید. نتایج به‌دست آمده با نتایج سایر پژوهش‌ها مبنی بر اینکه پلی‌آمین‌ها در حفظ یکپارچگی غشای سیتوپلاسمی، اسیدهای نوکلئیک و اندام‌های سلولی نقش اساسی ایفا می‌کنند، همخوانی دارد (ژانگ و جان، ۲۰۰۵، حسین و همکاران، ۲۰۰۶).



شکل ۴-۱۵- برهمکنش شوری و همزیستی قارچی (الف) و همزیستی قارچی و اسپرمیدین (ب) بر محتوای نسبی آب برگ استویا. *P. indica*: Pi و *T. virens*: Trich. در هر شکل میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند.

۴-۱-۴- صفات بیوشیمیایی

۴-۱-۴-۱- فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های به‌دست آمده از اندازه‌گیری صفات بیوشیمیایی شامل فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، پراکسیداز (POD) و آسکوربات پراکسیداز (APX) در گیاه دارویی استویا در جدول پیوست ۶ آورده شده است. در تمامی صفات بیوشیمیایی مورد نظر، اثر ساده شوری، همزیستی قارچی و محلول‌پاشی اسپرمیدین در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. برهمکنش شوری و همزیستی قارچی نیز بر فعالیت آنزیم کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز در سطح احتمال یک درصد اثر معنی‌داری داشت. همچنین، بین شوری و محلول‌پاشی اسپرمیدین در تمامی صفات مورد بررسی و نیز بین همزیستی قارچی و پلی‌آمین اسپرمیدین در آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز در سطح احتمال یک درصد برهمکنش معنی‌داری مشاهده شد. اثر سه‌گانه شوری، قارچ و اسپرمیدین نیز بر سه آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز معنی‌دار بود (جدول پیوست ۶).

۴-۱-۴-۱- آنزیم سوپراکسید دیسموتاز

بر اساس یافته‌ها (جدول ۴-۷) در مجموع، با افزایش سطوح شوری میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز افزایش یافت. همچنین، در بیشتر سطوح شوری و محلول‌پاشی اسپرمیدین، تلقیح تیمارهای قارچی افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز را به دنبال داشت که بیشترین فعالیت آن در سطح شوری ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر و اسپرمیدین ۰/۷۵ میلی‌مولار در شرایط تلقیح هم‌زمان قارچ Pi+Trich مشاهده شد که نسبت به شاهد خود (عدم تلقیح و اسپرمیدین صفر) به حدود دو برابر رسید. محلول‌پاشی پلی‌آمین نیز اثر مثبتی بر میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز نشان داد، به طوری که بیشترین اثر افزایشی آن در سطح شوری صفر و تیمار عدم تلقیح مشاهده شد. این افزایش در محلول‌پاشی

پلی‌آمین ۰/۷۵ میلی‌مولار نسبت به غلظت صفر آن بیش از سه برابر بود (جدول ۴-۷). آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز از آنزیم‌های کلیدی در سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدان در گیاهان بوده و نخستین آنزیم در رفع مسمومیت می‌باشد (بلوخینا و فگرستد، ۲۰۱۰) که با فعالیت این آنزیم رادیکال سوپراکسید به پراکسید هیدروژن تبدیل می‌شود (لومونته و همکاران، ۲۰۱۰).

در مطالعه حاضر، قارچ‌های اندوفیت به‌منظور جبران خسارت ناشی از تنش شوری، سیستم دفاعی گیاه را تعدیل و از آسیب اکسیداتیو ناشی از تنش ممانعت می‌کنند. بنابراین، در گیاهان تلقیح شده با قارچ‌های اندوفیت، آثار سوء اکسیداسیون سلولی از طریق افزایش فعالیت آنزیمی کاهش یافت. شهابی‌وند (۱۳۹۱) نیز افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز را در گیاهان گندم تلقیح شده با قارچ‌های *P. indica* و *G. mosseae* و تلقیح همزمان دو قارچ که در شرایط تنش عناصر سنگین کشت شده بودند، گزارش نمود. همچنین، ژو و همکاران (۲۰۱۱) گزارش کردند، در شرایط تنش، تلقیح گیاه ذرت با قارچ میکوریز میزان فعالیت سوپراکسید دیسموتاز را افزایش داد. همچنین، پژوهشگران گزارش کردند که کاربرد پلی‌آمین اسپرمیدین فعالیت آنزیم مذکور را در شرایط تنش شوری و تنش دما افزایش داد (تیان و همکاران، ۲۰۱۲؛ ژانگ و همکاران، ۲۰۱۲).

جدول ۴-۷- مقایسه میانگین برهمکنش تنش شوری، همزیستی قارچی و محلول پاشی پلی‌آمین اسپرمیدین بر فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز ($\text{unit mg protein}^{-1}$) گیاه استویا

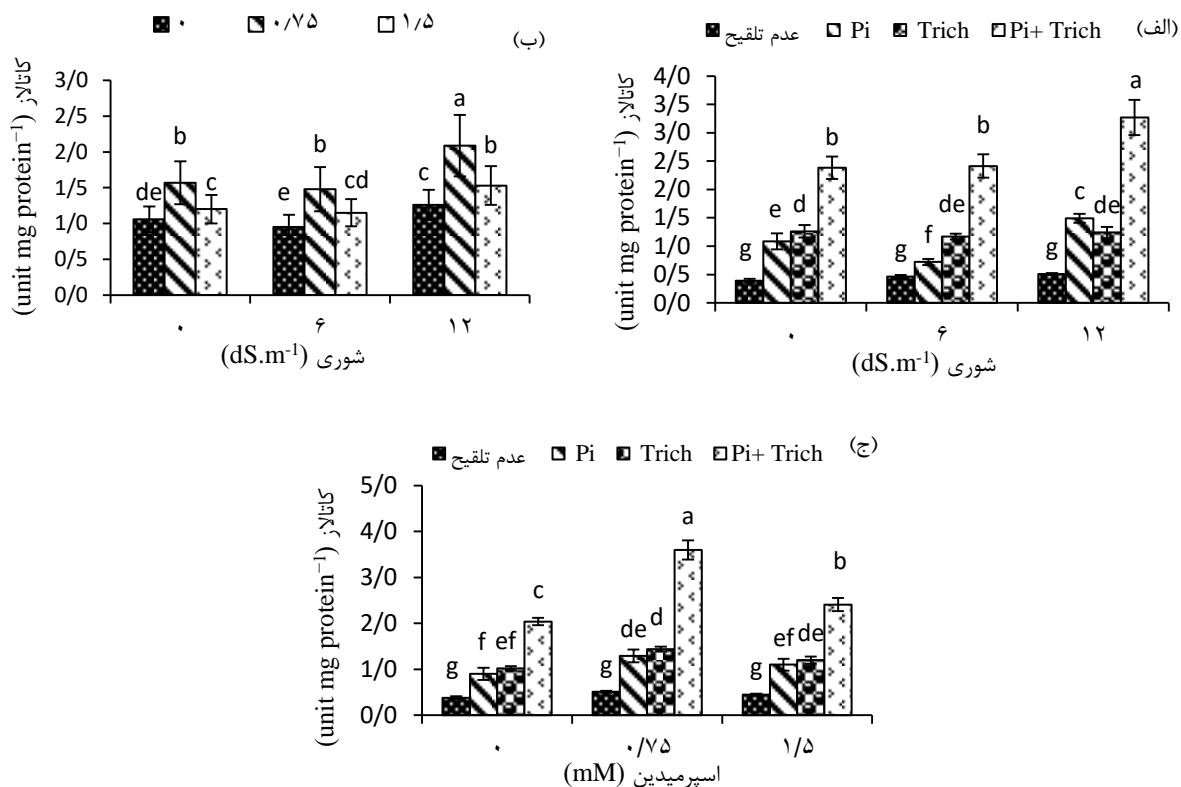
قارچ اندوفیت				اسپرمیدین	شوری ($\text{dS}\cdot\text{m}^{-1}$)
Pi+Trich	<i>T. virens</i> (Trich)	<i>P. indica</i> (Pi)	عدم تلقیح	(mM)	
۶/۴۲۷ d-h	۳/۷۲۳ op	۴/۴۶۶ nop	۱/۱۲۹ q	۰	
۵/۸۵۷ f-k	۴/۶۲۹ mno	۵/۳۷۸ h-n	۳/۴۳۰ p	۰/۷۵	۰
۷/۰۷۶ b-e	۵/۶۲۰ g-m	۶/۰۱۴ e-j	۴/۷۱۴ mno	۱/۵۰	
۷/۵۶۴ bc	۵/۱۹۰ i-n	۵/۷۹۶ f-l	۴/۷۷۶ l-o	۰	
۷/۱۸۶ bcd	۵/۴۲۵ g-n	۶/۳۹۱ d-h	۴/۷۲۶ mno	۰/۷۵	۶
۷/۱۰۸ bcd	۴/۸۹۱ k-n	۶/۷۴۱ c-f	۳/۷۱۲ op	۱/۵۰	
۸/۰۲۷ b	۵/۱۹۵ i-n	۶/۴۸۳ d-g	۴/۹۷۰ j-n	۰	
۹/۹۰۱ a	۶/۱۶۵ d-i	۷/۰۲۰ b-e	۴/۸۳۸ k-n	۰/۷۵	۱۲
۶/۴۳۴ d-h	۵/۳۰۶ i-n	۵/۸۵۹ f-k	۴/۵۹۵ mno	۱/۵۰	

میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند.

۴-۱-۴-۱-۲- آنزیم کاتالاز

یافته‌ها نشان داد فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاهان تلقیح شده با قارچ‌های اندوفیت به‌ویژه تلقیح هم‌زمان دو قارچ (Pi+Trich) در تمام سطوح شوری افزایش نشان داد به طوری که در سطح شوری ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر به حداکثر مقدار خود (پنج برابر افزایش نسبت به سطح شوری ۱۲ و عدم تلقیح) رسید (شکل ۴-۱۶ الف). به‌هنگام تنش شوری، گیاهان محلول‌پاشی شده با پلی‌آمین اسپرمیدین به‌ویژه غلظت ۰/۷۵ میلی‌مولار آن منجر به افزایش ۹۷ درصدی فعالیت آنزیم کاتالاز نسبت به سطح شوری صفر و بدون اسپرمیدین گردید (شکل ۴-۱۶ ب). همزیستی قارچ‌های اندوفیت و کاربرد پلی‌آمین اسپرمیدین بر فعالیت آنزیم کاتالاز اثر هم‌افزایی داشته و فعالیت این آنزیم را افزایش دادند، به طوری که در گیاهان تلقیح‌شده با قارچ‌های اندوفیت کاربرد پلی‌آمین اسپرمیدین نیز افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز را به‌دنبال داشت (شکل ۴-۱۶ ج).

آنزیم کاتالاز نقش مهمی در جمع‌آوری پراکسید هیدروژن و کاهش اثرات تخریبی آن در پراکسی‌زوم و گلی‌اکسی‌زوم ایفا می‌کند (سکین و همکاران، ۲۰۱۰). در پژوهش حاضر، نتایج نشان داد فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاهان همزیست شده با قارچ‌های اندوفیت افزایش چشمگیری داشت. ژو و همکاران (۲۰۱۱) در مطالعه اثر تنش خشکی در گیاه ذرت دریافتند که قارچ میکوریز با افزایش فعالیت کاتالاز و تقویت سیستم آنتی‌اکسیدانی اثرات منفی ناشی از تنش خشکی را کاهش داد. از سوی دیگر، کاربرد اسپرمیدین سبب افزایش معنی‌دار آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی شد. نقش پلی‌آمین‌ها در کاهش صدمات ناشی از تنش‌های متعدد گزارش شده است. به‌عنوان مثال یو و همکاران (۲۰۰۹) گزارش کردند که کاربرد پلی‌آمین تخریب اکسیداتیو القا شده در گیاه پیازچه تحت تنش خشکی را از طریق افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاه کاهش می‌دهد. فرزانه و همکاران (۱۳۹۶) افزایش در فعالیت آنزیم کاتالاز را در گیاه خیار تحت تنش شوری گزارش کردند.



شکل ۴-۱۶- برهمکنش شوری و همزیستی قارچی (الف)، همزیستی قارچی و اسپرمیدین (ب) و شوری و اسپرمیدین (ج) بر فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانی کاتالاز: *Pi*: *P. indica* و *Trich*: *T. virens*. در هر شکل میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند

۴-۱-۴-۳- آنزیم پراکسیداز

اثر متقابل سه‌گانه شوری، تلقیح قارچی و کاربرد اسپرمیدین بر فعالیت آنزیم پراکسیداز معنی‌دار بود (جدول پیوست ۶). تیمار تلقیح قارچی و کاربرد اسپرمیدین در تمام سطوح تنش شوری موجب افزایش قابل‌توجه فعالیت آنزیم پراکسیداز گردید. بر این اساس، بالاترین فعالیت آنزیم پراکسیداز در زمان تلقیح هم‌زمان دو قارچ و محلول‌پاشی اسپرمیدین ۱/۵ میلی‌مولار در سطح شوری ۱۲ دسی‌زیمنس با بیش از ۱۰۰ درصد افزایش نسبت به تیمار عدم تلقیح و اسپرمیدین صفر مشاهده شد (جدول ۴-۸). افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز در گیاهان تلقیح‌شده با قارچ‌های همزیست نظیر میکوریز می‌تواند به دلیل افزایش در جذب فسفر باشد (ماتور و یواس، ۱۹۹۶). همچنین، علت افزایش مقاومت گیاهان شبه‌میکوریزایی می‌تواند ناشی از بیان ژن‌های مربوط به تولید و فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های گیاهی باشد که باعث جمع‌آوری بهتر گونه‌های اکسیژن فعال و جلوگیری از تنش اکسیداتیو می‌شوند (سان و همکاران، ۲۰۱۰). از سوی دیگر، پلی‌آمین‌ها صدمات

اکسایشی ناشی از تنش شوری را به وسیله افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاهش می‌دهند (انجم، ۲۰۱۰). در همین راستا پژوهشگران گزارش کردند که کاربرد پلی‌آمین اسپرمیدین در نهال‌های هلو و بادام باعث افزایش تحمل به تنش شوری شد (زریگ و همکاران، ۲۰۱۱). همچنین کاربرد پلی‌آمین در برنج تحت تنش کم آبی باعث فعالسازی آنزیم‌های پاکسازی پراکسید هیدروژن شد و از این طریق، ضمن جلوگیری از تخریب پروتئین‌ها و پراکسیداسیون غشاء، تحمل به کم‌آبی را افزایش داد (فاروق و همکاران، ۲۰۰۹).

جدول ۴-۸- مقایسه میانگین برهمکنش تنش شوری، همزیستی قارچی و محلول پاشی پلی‌آمین اسپرمیدین بر فعالیت آنزیم پراکسیداز (unit mg protein⁻¹) برگ گیاه استویا

قارچ اندوفیت				اسپرمیدین (mM)	شوری (dS.m ⁻¹)
Pi+Trich	<i>T. virens</i> (Trich)	<i>P. indica</i> (Pi)	عدم تلقیح		
۷/۳۱۴ lmn	۴/۱۸۰ rs	۵/۶۵۱ opq	۲/۷۳۹ s	۰	
۸/۶۴۶ kl	۵/۷۷۲ opq	۵/۱۱۳ pqr	۳/۴۶۵ s	۰/۷۵	۰
۸/۶۲۹ kl	۴/۹۴۰ qr	۶/۴۷۳ nop	۳/۶۹۲ rs	۱/۵۰	
۱۱/۹۱۸ fgh	۸/۲۰۰ klm	۹/۱۷۵ jk	۵/۱۵۲ pqr	۰	
۱۱/۵۸۹ fghi	۹/۱۷۱ jk	۱۲/۸۰۹ efg	۷/۰۶۴ mno	۰/۷۵	۶
۱۴/۵۸۹ cd	۱۲/۸۴۶ efg	۱۱/۴۷۴ ghi	۷/۴۳۲ lmn	۱/۵۰	
۱۱/۷۳۳ fgh	۱۱/۰۷۶ hi	۱۵/۷۱۵ c	۱۰/۲۵۴ ij	۰	
۱۷/۳۰۵ b	۱۳/۰۰۳ ef	۱۵/۳۵۲ cd	۱۱/۰۶۴ hi	۰/۷۵	۱۲
۲۰/۹۰۶ a	۱۳/۹۸۵ de	۱۷/۲۸۵ b	۱۱/۸۶۱ fgh	۱/۵۰	

میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند.

۴-۱-۴-۱-۴- آنزیم آسکوربات پراکسیداز

یافته‌ها (جدول ۴-۹) نشان داد در مجموع، با افزایش تنش شوری میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز افزایش یافت. همچنین، در بیشتر سطوح شوری و محلول پاشی اسپرمیدین، تلقیح تیمارهای قارچی به‌ویژه تلقیح هم‌زمان دو قارچ (Pi+Trich) افزایش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز را به دنبال داشت که بیشترین افزایش آن در سطح شوری ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر و اسپرمیدین ۰/۷۵ میلی‌مولار، در شرایط تلقیح هم‌زمان دو قارچ (با حدود سه برابر افزایش نسبت به تیمار عدم تلقیح) مشاهده شد. محلول پاشی پلی‌آمین اسپرمیدین نیز اثر مثبتی بر میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز نشان داد، به طوری که در بیشتر سطوح شوری و تیمارهای همزیستی قارچی، بالاترین فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در غلظت

۰/۷۵ میلی‌مولار اسپرمیدین مشاهده شد (جدول ۴-۹). سان و همکاران (۲۰۱۰) علت افزایش مقاومت گیاهان تلقیح شده با قارچ‌های اندوفیت را ناشی از بیان ژن‌های مربوط به تولید و فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های گیاهی دانستند که باعث جمع‌آوری بهتر گونه‌های فعال اکسیژن و ممانعت از تنش اکسیداتیو می‌گردد. سازوکار اثر قارچ‌های اندوفیت بر سیستم آنتی‌اکسیدانی گیاهان تلقیح شده تحت شرایط تنش شناخته شده نیست، اما به نظر می‌رسد که به‌طور مستقیم باعث خنثی کردن فعالیت رادیکال‌های آزاد اکسیژن در گیاه می‌شوند.

جدول ۴-۹- مقایسه میانگین برهمکنش تنش شوری، همزیستی قارچی و محلول پاشی پلی‌آمین اسپرمیدین بر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز برگ گیاه استویا

قارچ اندوفیت				اسپرمیدین (mM)	شوری (dS.m ⁻¹)
Pi+Trich	<i>T. virens</i> (Trich)	<i>P. indica</i> (Pi)	عدم تلقیح		
۳/۲۶۵ c-f	۲/۶۱۲ g-j	۲/۲۱۱ j-m	۱/۰۹۲ q	۰	
۳/۴۸۸ cd	۲/۶۷۸ g-j	۲/۴۱ h-k	۱/۸۱۱ m-p	۰/۷۵	.
۳/۵۱۶ cd	۲/۹۳۹ efg	۲/۵۵۶ g-j	۱/۳۳۹ pq	۱/۵۰	
۳/۲۴۸ c-f	۲/۳۲۳ jkl	۲/۸۲۷ f-i	۱/۶۰۱ nop	۰	
۴/۱۰۶ b	۲/۵۵۵ g-j	۳/۱۷۵ def	۱/۹۹۳ k-n	۰/۷۵	۶
۳/۷۰۷ bc	۲/۶۵۴ g-j	۲/۹۳۰ efg	۱/۶۵۱ nop	۱/۵۰	
۳/۳۸۳ cde	۲/۰۰۳ k-n	۲/۶۴۱ g-j	۱/۵۰۰ opq	۰	
۵/۳۸۳ a	۲/۵۱۱ g-j	۳/۲۱۲ def	۱/۸۸۸ l-o	۰/۷۵	۱۲
۴/۰۱۲ b	۲/۳۵۷ i-l	۲/۸۴۵ fgh	۱/۷۳۱ nop	۱/۵۰	

میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند.

۴-۱-۴- سایر صفات بیوشیمیایی

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های به‌دست آمده از اندازه‌گیری سایر صفات بیوشیمیایی شامل میزان پراکسیداسیون لیپیدی غشا (مالون‌دی‌آلدئید)، پراکسید هیدروژن، محتوای پرولین و قند محلول در گیاه دارویی استویا در جدول پیوست ۷ آورده شده است. در تمامی صفات بیوشیمیایی مورد نظر، اثر ساده شوری، همزیستی قارچی و محلول پاشی اسپرمیدین در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. برهمکنش شوری و همزیستی قارچی بر میزان پراکسیداسیون لیپیدی غشا و محتوای پرولین در سطح احتمال یک درصد و پراکسید هیدروژن در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود. همچنین، بین سطوح مختلف شوری و

محلول پاشی اسپرمیدین در تمامی صفات مورد بررسی به جز محتوای پرولین برهمکنش معنی داری مشاهده شد. تأثیر برهمکنش همزیستی قارچی و محلول پاشی اسپرمیدین نیز بر محتوای قند محلول در سطح احتمال یک درصد معنی دار بود. با این حال، برهمکنش شوری، قارچ و اسپرمیدین در هیچ یک از صفات مذکور اثر معنی داری نشان نداد (جدول پیوست ۷).

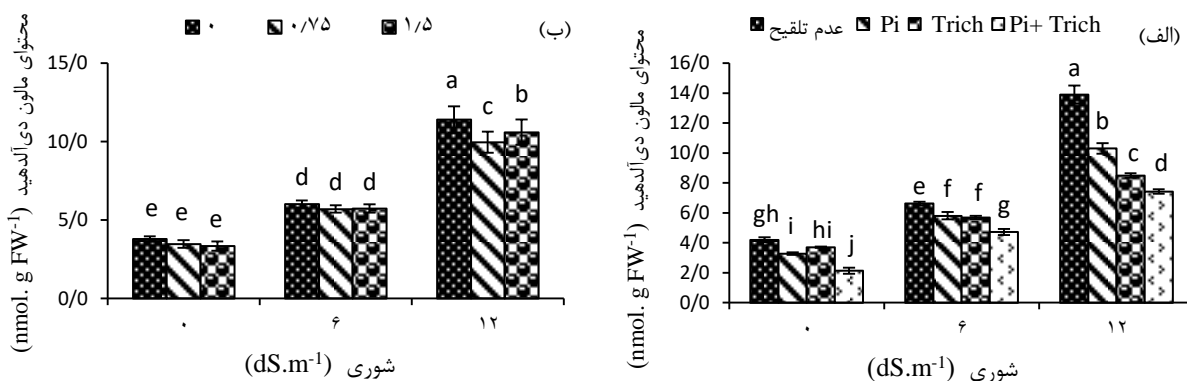
۴-۱-۲-۱-۴- پراکسیداسیون لیپیدی غشا

در آزمایش گلخانه‌ای، میزان مالون دی‌آلدهید با افزایش سطوح شوری افزایش یافت که این افزایش در سطح ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر با بیش از سه برابر افزایش نسبت به سطح صفر شوری به حداکثر میزان خود رسید (شکل ۴-۱۷ الف). همزیستی گیاه استویا با قارچ‌های اندوفیت به خصوص تلقیح هم‌زمان دو قارچ به گیاه امکان مقاومت بهتر در برابر آسیب‌های وارده به لیپیدهای غشایی ناشی از تنش شوری را داد به طوری که افزایش در میزان مالون دی‌آلدهید در اثر تنش، به طور چشمگیری در تیمار عدم تلقیح بالاتر از تیمارهای همزیستی قارچی بود. میزان مالون دی‌آلدهید در گیاهان همزیست با قارچ به ویژه Pi+Trich در تمام سطوح شوری نسبت به تیمار عدم تلقیح کاهش چشمگیری نشان داد، به طوری که این کاهش در سطوح شوری صفر، شش و ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر به ترتیب ۵۰، ۲۸ و ۴۶ درصد بود.

افزایش پراکسیداسیون لیپیدی در برگ‌های گیاه استویا تحت تنش شوری نشانگر القای تنش اکسیداتیو توسط تنش ناشی از آب شور می‌باشد. ساوور و همکاران (۱۹۹۹) گزارش کرده‌اند که لیپیدها به رادیکال‌های هیدروکسیل بسیار حساس هستند و پراکسیداسیون لیپیدها اولین نشانه‌ی تنش اکسیداتیو است. تنش شوری با افزایش تولید H_2O_2 که همانند رادیکال‌های آزاد عمل می‌کند موجب پراکسیداسیون چربی و تخریب تمامیت غشا و در نتیجه افزایش نشت یون می‌گردد. نتایج مشابهی را دی‌تویی و گابریلی (۱۹۹۹) و هم‌چنین اوزونیدو و همکاران (۱۹۹۸) به دست آورده‌اند.

از طرفی، کاربرد پلی‌آمین اسپرمیدین توانست اثرات نامطلوب ناشی از تنش شوری را بر لیپیدهای غشایی به طور قابل ملاحظه‌ای بهبود بخشد. محلول پاشی اسپرمیدین در تمامی سطوح شوری منجر به کاهش میزان

مالون دی‌آلدئید شد به‌طوری که در شوری ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر غلظت ۰/۷۵ و ۱/۵ میلی‌مولار اسپرمیدین به‌ترتیب موجب کاهش ۱۳ و ۷ درصدی میزان مالون دی‌آلدئید گردید (شکل ۴-۱۷ ب). پلی‌آمین‌ها از طریق اتصال به مولکول‌های آنیونی از جمله فسفولیپیدهای غشاء و پلی‌ساکاریدهای پکتینی باعث پایداری غشا شده و منجر به کاهش پراکسیداسیون لیپیدی غشا می‌شوند (سارفرز و همکاران، ۲۰۱۱). تأثیر مثبت پلی‌آمین‌ها بر کاهش پراکسیداسیون لیپیدی غشا تحت تنش خشکی در بوته‌های برنج نیز پیش‌تر گزارش شده بود (فاروق و همکاران، ۲۰۰۹).

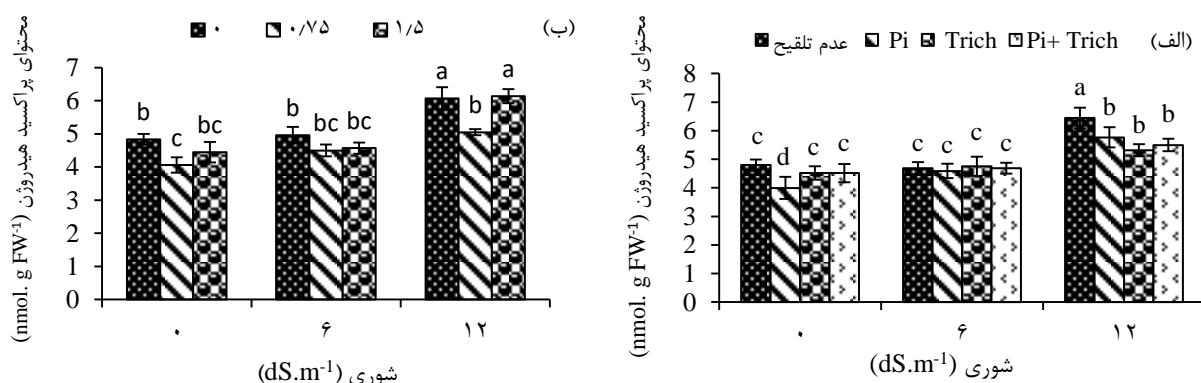


شکل ۴-۱۷- برهمکنش شوری و همزیستی قارچی (الف) شوری و اسپرمیدین (ب) بر میزان مالون دی‌آلدئید در برگ گیاه استویا. *P. indica* Pi: *T. virens*: Trich. در هر شکل میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند.

۴-۱-۲-۴-۲- پراکسید هیدروژن

نتایج این پژوهش نشان داد که محتوای پراکسید هیدروژن در شرایط تنش شوری افزایش یافت. با این حال، در تنش شوری بالا (۱۲ دسی‌زیمنس بر متر) در گیاهان تلقیح شده با قارچ نسبت به عدم‌تلقیح محتوای پراکسید هیدروژن به‌طور معنی‌داری کاهش نشان داد به‌طوری که این کاهش در تلقیح Pi، Trich و تلقیح Pi+Trich به‌ترتیب ۱۱، ۱۸ و ۱۵ درصد بود (شکل ۴-۱۸ الف). محلول‌پاشی اسپرمیدین نیز در سطوح مختلف تنش شوری بر پراکسید هیدروژن مؤثر بود. در تمامی سطوح شوری بیشترین تأثیر اسپرمیدین بر محتوای پراکسید هیدروژن در محلول‌پاشی ۰/۷۵ میلی‌مولار مشاهده شد، به‌طوری که در سطح شوری صفر و ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر کاهش معنی‌دار آن را در پی داشت و توانست میزان اثر شوری در افزایش این

ترکیب اکسنده را در گیاه استویا کاهش دهد (شکل ۴-۱۸ ب). نتایج مشابهی در گیاه جنسینگ (پروین و همکاران، ۲۰۰۹)، برنج (رویچهری و همکاران، ۲۰۱۱) و گیاه چای (ژینگ و همکاران، ۲۰۱۶) گزارش شده است. با افزایش تولید H_2O_2 احتمال افزایش تنش اکسیداتیو وجود دارد، چراکه پراکسید هیدروژن یک بخش سازنده اکسیداتیو متابولیسم گیاهی است و یک محصول عمده تولید شده واکنش‌های اکسیداتیو کلروپلاستی و پراکسی‌زومی است (دل ریو و همکاران، ۱۹۹۲). H_2O_2 همانند گونه‌ی فعال اکسیژن عمل می‌کند، زیرا می‌تواند با رادیکال سوپراکسید وارد واکنش شود و رادیکال‌های هیدروکسیل فعال شده بیش‌تری را شکل دهد. رادیکال‌های آزاد هیدروکسیل آغازگر واکنش‌هایی است که موجب پراکسیداسیون لیپیدها می‌شود (چن و همکاران، ۲۰۰۷).



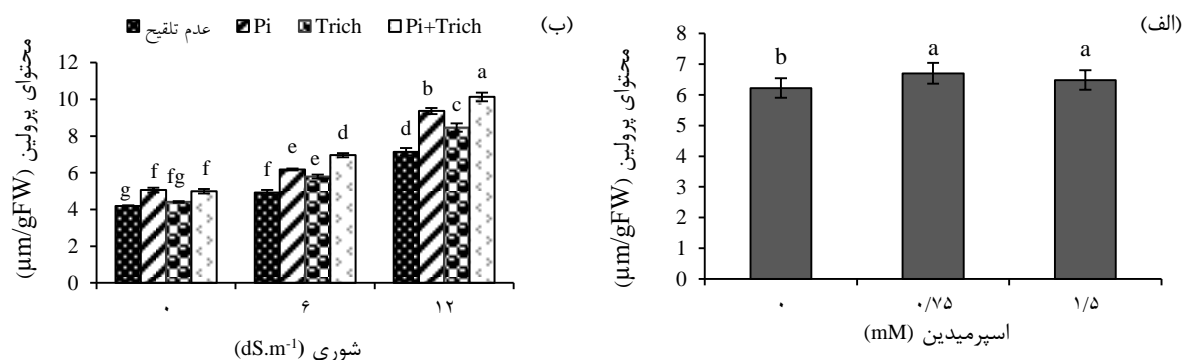
شکل ۴-۱۸- برهمکنش شوری و همزیستی قارچی (الف) شوری و اسپرمیدین (ب) بر محتوای پراکسید هیدروژن در برگ گیاه استویا *P. indica* و *T. virens*: Trich. در هر شکل میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند.

۴-۱-۴-۲-۳- محتوای پرولین

کاربرد پلی‌آمین اسپرمیدین در دو سطح ۰/۷۵ و ۱/۵ میلی‌مولار محتوای پرولین برگ‌های استویا را نسبت به شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش داد (شکل ۴-۱۹ الف). بیش‌تر افزایش در محتوای پرولین با کاربرد پلی‌آمین‌ها نظیر اسپرمین و اسپرمیدین در بادمجان (یان- پینگ و همکاران، ۲۰۱۱)، برنج (فاروق و همکاران، ۲۰۰۹) و بادام (امرای‌تبار و همکاران، ۲۰۱۶) نیز گزارش شده است. بر اساس نتایج، در سطوح مختلف تیمار همزیستی قارچی، با افزایش سطوح شوری محتوای پرولین برگ افزایش یافت به‌طوری‌که در

شوری ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر به بالاترین میزان خود رسید (شکل ۴-۱۹ ب). گیاهان در مقابل تنش‌های محیطی سازوکارهای دفاعی متفاوتی از جمله تولید ترکیبات تنظیم‌کننده اسمزی داشته و با افزایش این ترکیبات، نقش مهمی در سازگاری سلول‌ها در شرایط تنش دارند (آلن و اورت، ۲۰۰۱). در این میان، پرولین به‌عنوان یک اسیدآمینو سازگار نسبت به شرایط نامطلوب محیطی به‌ویژه تنش شوری، مقاومت گیاهان را افزایش داده و موجب حفاظت و تثبیت غشا سلول می‌گردد (کلاس، ۲۰۰۵).

یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد، همزیستی با قارچ‌های اندوفیت به‌خصوص کاربرد همزمان دو قارچ در سطوح شش و ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر افزایش محتوای پرولین برگ را به دنبال داشت (شکل ۴-۱۹ ب). افزایش پرولین در شرایط تنش، به‌علت القای آنزیم‌های بیوسنتز پرولین، کاهش اکسیداسیون پرولین به گلوتامات و کاهش استفاده از پرولین در سنتز پروتئین گزارش شده است (دلانی و ورنه، ۱۹۹۳). از سوی دیگر، افزایش تجمع پرولین در زمان تلقیح با قارچ‌های همزیست در گیاهان ممکن است به‌علت تأثیر مستقیم آن بر متابولیسم این ترکیب باشد (آبر و همکاران، ۲۰۱۶). افزایش محتوای پرولین در گیاهان تلقیح شده با قارچ اندوفیت و تنش شوری در گیاه گوجه‌فرنگی (قربانی و همکاران، ۱۳۹۷) و تلقیح میکوریزی و تنش خشکی در گیاه زنجبیل (بسال و شایند، ۲۰۱۱) و نیز تنش شوری در گیاه لوبیا (عبداله و همکاران، ۲۰۱۶) گزارش شده است.



شکل ۴-۱۹- اثر ساده پلی‌آمین اسپرمیدین (الف) و برهمکنش شوری و همزیستی قارچی (ب) بر محتوای پرولین در برگ گیاه استویا. *P. indica*: Pi و *T. virens*: Trich. در هر شکل میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند.

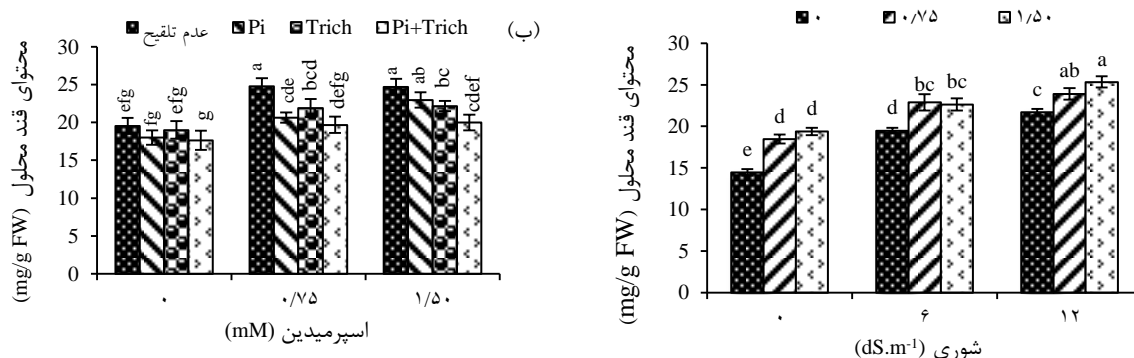
۴-۱-۴-۲-۴- قند محلول

مقایسه میانگین‌ها نشان داد، در سطوح مختلف محلول پاشی اسپرمیدین، با افزایش سطح شوری محتوای قند محلول در برگ گیاه استویا روند صعودی داشت (شکل ۴-۲۰ الف). به طوری که در مقایسه بین سطوح صفر و ۱۲ دسی زیمنس بر متر، افزایش ۳۰ تا ۵۰ درصدی در محتوای قند محلول برگ دیده شد. همچنین، محلول پاشی اسپرمیدین به ویژه در غلظت ۱/۵ میلی مولار در تمامی سطوح شوری موجب افزایش معنی داری در مقدار قند محلول نسبت به عدم مصرف پلی آمین گردید. در مقایسه کلی و بررسی اثر متقابل نیز بیشترین مقدار قند محلول در بالاترین سطح شوری (۱۲ دسی زیمنس بر متر) و اسپرمیدین (۱/۵ میلی مولار) مشاهده شد.

محلول‌های سازگار از جمله قندهای محلول توسط همه گیاهان در پاسخ به تعدادی از عوامل محیطی تجمع می‌یابند (اورکات و نیلسن، ۲۰۰۰). یکی از سازوکارهای مقاومت به شوری در گیاهان نیز تجمع مواد اسمزی سازگار در سیتوپلاسم آن‌ها است. در شرایط تنش کربوهیدرات‌هایی از قبیل گلوکز، فروکتوز، سوکروز و فروکتان تولید می‌شود که عملکرد عمده این ترکیبات شامل حفاظت اسمزی، تعدیل اسمزی و ذخیره کربن می‌باشد. در واقع قندها از سلول‌ها از طریق تنظیم اسمزی و نگه‌داری تورژسانس و همچنین پایداری غشاها و پروتئین‌ها محافظت می‌کنند (پاریدا و داس، ۲۰۰۵). افزایش در مقدار کربوهیدرات‌ها در گیاه همیشه بهار (بنی‌اسدی و همکاران، ۱۳۹۴)، گندم (کرپسی و گالیبا، ۲۰۰۰) و برخی از واریته‌های برنج (پاریدا و داس، ۲۰۰۵) در شرایط تنش شوری گزارش شده است. همچنین مطالعات متعددی نشان داد که پلی آمین‌ها باعث افزایش کربوهیدرات‌ها در گیاهانی مانند همیشه بهار (بنی‌اسدی و همکاران، ۱۳۹۴)، داودی (مهقوب و همکاران، ۲۰۱۱) و کوب (مهروس و همکاران، ۲۰۱۱) گردید. پلی آمین‌ها در سنتز قندها و کربوهیدرات‌ها نقش مؤثری دارند زیرا این ترکیبات همچون تنظیم‌کننده‌های رشد عمل کرده و ممکن است در برخی فرآیندهای زیستی که مرتبط با سنتز کربوهیدرات‌ها دخالت داشته باشند (مهقوب و همکاران، ۲۰۱۱).

محلول پاشی پلی آمین اسپرمیدین در هر دو غلظت ۰/۷۵ و ۱/۵ میلی مولار در برهمکنش با قارچ افزایش قندهای محلول را در مقایسه با شاهد به دنبال داشت. از سوی دیگر به کارگیری قارچ‌های اندوفیت به ویژه

تلقیح هم‌زمان دو قارچ منجر به کاهش محتوای قند در برگ استویا شد (شکل ۴-۲۰ ب). گزارش شده است که محلول‌پاشی پلی‌آمین‌ها، به‌ویژه اسپرمیدین، در حفظ فتوسنتز گیاهان بسیار مؤثر بوده و موجب تثبیت pH جهت فعالیت آنزیم‌های فتوسنتزی و افزایش فعالیت کربوکسیلازی رویسکو و در نتیجه افزایش تولید قندهای محلول می‌شود (اونال، ۲۰۰۷). از طرفی، محققین بیان داشتند احتمالاً قارچ‌ها با بهبود سیستم دفاعی گیاه از قبیل کارتنوئید از پراکسیداسیون لیپیدی غشا جلوگیری می‌کنند. همچنین قارچ‌ها با افزایش میزان جذب آب و عناصر غذایی از طریق ریشه‌های خود باعث بهبود روابط آبی گیاه و پایداری غشای سلول و تیلاکوئید شده و به حفاظت از کلروفیل کمک می‌نماید که به نوبه خود موجب افزایش عملکرد فتوسنتزی و افزایش سرعت رشد و تخصیص مواد فتوسنتزی بین ساقه و ریشه شده و از افزایش بیشتر قند در برگ‌ها جلوگیری می‌کند (خالوندی و همکاران، ۱۳۹۶).

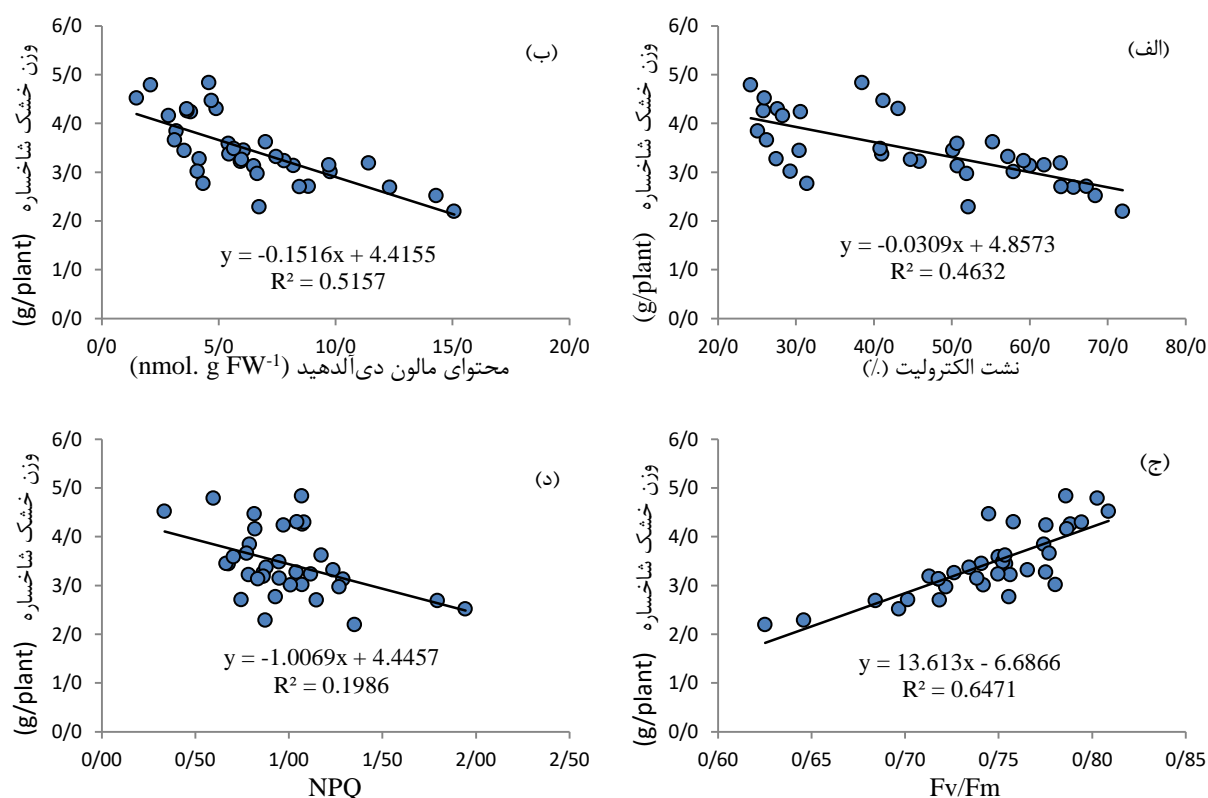


شکل ۴-۲۰- برهمکنش شوری و پلی‌آمین اسپرمیدین (الف) و همزیستی قارچی و اسپرمیدین (ب) بر محتوای قند محلول در برگ گیاه استویا. Pi: P. indica و Trich: *T. virens*. در هر شکل میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند.

۴-۱-۵- رابطه بین وزن خشک شاخساره با نشت الکتروولیت، مالون دی‌آلدهید، Fv/Fm و NPQ

نتایج نشان داد، بین وزن خشک شاخساره با نشت الکتروولیت و محتوای مالون دی‌آلدهید در برگ گیاه استویا رابطه خطی و منفی (به‌ترتیب با ضریب تبیین ۰/۴۶ و ۰/۵۱) برقرار بود، به‌طوری‌که با افزایش نشت الکتروولیت و محتوای مالون دی‌آلدهید، وزن خشک شاخساره (به‌ترتیب با شیب ۰/۰۳۰- و ۰/۱۵۱-) گرم در بوته) کاهش یافت (شکل ۴-۲۱ الف و ب). از سوی دیگر، بین وزن خشک شاخساره و حداکثر کارایی

کوانتومی فتوسیستم II (Fv/Fm) رابطه مثبت برقرار بوده به طوری که با افزایش Fv/Fm وزن خشک شاخساره نیز روند افزایشی نشان داد (شکل ۴-۲۱ ج). این در حالی است که مابین وزن خشک شاخساره و خاموشی غیرفتوشیمیایی در گیاه استویا رابطه خطی و منفی با شیب ۱/۰۱ گرم در بوته وجود داشت و با افزایش NPQ، وزن خشک شاخساره کاهش نشان داد (شکل ۴-۲۱ د). مالون دی‌آلدئید همانند نشت الکترولیت به‌عنوان شاخص آسیب‌گشایی برای اندازه‌گیری غیرمستقیم انسجام سلولی مورد توجه قرار گرفته و می‌تواند کاهش انسجام‌گشای سلولی و وقوع آسیب تنش در محصول را نشان دهد، بنابراین انتظار می‌رود با افزایش در مقدار نشت الکترولیت و محتوای مالون دی‌آلدئید، وزن خشک در گیاه کاهش یابد (طریق الاسلامی و همکاران، ۱۳۹۵). زاهدی و همکاران (۱۳۹۷) نیز رابطه منفی و معنی‌داری بین محتوای مالون دی‌آلدئید و نشت الکترولیت با وزن خشک اندام‌های رویشی گیاه گزارش نمودند.



شکل ۴-۲۱- رابطه بین وزن خشک شاخساره با نشت الکترولیت (الف)، محتوای مالون دی‌آلدئید (ب)، Fv/Fm (ج) و NPQ (د) در گیاه استویا.

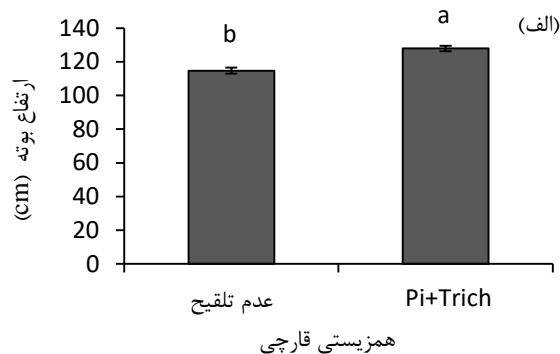
۴-۲- بخش مزرعه‌ای

۴-۲-۱- صفات رویشی

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های مربوط به صفات رویشی شامل ارتفاع بوته، سطح برگ و وزن تر و خشک برگ، ساقه و شاخساره (جدول پیوست ۸) نشان داد اثر ساده شوری بر سطح برگ، وزن تر ساقه، وزن تر شاخساره و وزن خشک برگ در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. همزیستی قارچ‌های اندوفیت بر تمامی صفات رویشی به جز وزن تر برگ در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد. اثر ساده پلی‌آمین اسپرمیدین بر سطح برگ، وزن تر شاخساره و وزن خشک برگ معنی‌دار بود. بین سطوح مختلف شوری و قارچ‌های مورد مطالعه در وزن تر و خشک برگ و وزن تر شاخساره و همچنین بین سطوح مختلف شوری و محلول‌پاشی اسپرمیدین در سطح برگ گیاه استویا برهمکنش معنی‌داری مشاهده شد. برهمکنش معنی‌داری بین همزیستی قارچ و محلول‌پاشی اسپرمیدین در هیچ یک از صفات رویشی مشاهده نشد. اثر متقابل سه‌گانه شوری، قارچ و اسپرمیدین تنها بر سطح برگ در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار شد (جدول پیوست ۸).

۴-۲-۱-۱- ارتفاع بوته

نتایج پژوهش حاضر نشان داد، همزیستی قارچی بر ارتفاع بوته گیاه استویا (شکل ۴-۲۲) اثر مثبت داشت به طوری که بالاترین ارتفاع بوته (۱۲۷/۹ سانتی‌متر) در زمان تلقیح هم‌زمان دو قارچ (Pi+Trich) مشاهده شد که نسبت به تیمار عدم تلقیح ۱۱/۵ درصد افزایش یافت. قارچ‌های اندوفیت با افزایش جذب عناصر غذایی به‌ویژه فسفر افزایش رشد گیاه را به دنبال دارند (کومار و همکاران، ۲۰۰۵). نتایج گلخانه‌ای این پژوهش نیز حاکی از اثربخشی قارچ‌های اندوفیت در افزایش ارتفاع بوته در گیاه استویا بود (شکل ۴-۳ الف).



شکل ۴-۲۲- اثر ساده همزیستی قارچی بر ارتفاع بوته گیاه استویا. در هر شکل میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند.

۴-۲-۱-۲- سطح برگ

براساس نتایج جدول ۴-۱۰ در مجموع با افزایش میزان شوری سطح برگ گیاه استویا کاهش یافت. سریع‌ترین واکنش در مقابله با تنش شوری به‌علت کاهش فتوسنتز جاری گیاه، کاهش توسعه سطح برگ است و چنان‌چه شدت تنش افزایش یابد رشد و توسعه برگ متوقف شده و سطح برگ کاهش می‌یابد (ژو، ۲۰۱۱). در هر سه سطح شوری و پلی‌آمین اسپرمیدین تلقیح با قارچ‌های اندوفیت منجر به افزایش معنی‌دار سطح برگ گیاه شد. همچنین در تمامی سطوح شوری و تیمارهای قارچی، کاربرد اسپرمیدین با غلظت ۰/۷۵ میلی‌مولار سطح برگ گیاه را افزایش داد که این افزایش در شوری شش دسی‌زیمنس بر متر و تیمار عدم تلقیح و همچنین سطح شوری ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر و هردو تیمار قارچی (تلقیح و عدم تلقیح) معنی‌دار بود. بالاترین میزان سطح برگ نیز در تنش شوری صفر، در شرایط همزیستی قارچی و کاربرد اسپرمیدین مشاهده شد. قارچ‌های اندوفیت به‌دلیل تحریک ریشه‌زایی در گیاه، افزایش قدرت جذب عناصر غذایی و افزایش سنتز هورمون‌های رشد گیاه و به‌دنبال آن سطح برگ را افزایش می‌دهند (فنگ و همکاران، ۲۰۰۲). این نتایج در مطابقت با نتایج بخش گلخانه‌ای این پژوهش بود (جدول ۴-۱).

جدول ۴-۱۰- مقایسه میانگین برهمکنش تنش شوری، همزیستی قارچی و محلول پاشی پلی آمین اسپرمیدین بر سطح برگ (cm²) گیاه استویا

شوری (dS.m ⁻¹)	اسپرمیدین (mM)	قارچ اندوفیت
	عدم تلقیح	Pi+Trich
۰	۰	۲۱۴/۶ ab
۰/۷۵	۰/۷۵	۲۲۸/۶ a
۰	۰	۱۷۶/۱ cd
۶	۰/۷۵	۱۹۰/۳ c
	۰	۱۵۹/۹ de
۱۲	۰/۷۵	۱۹۳/۶ bc
	۱۹۴/۸ bc	۱۹۴/۸ bc
	۱۹۵/۶ bc	۱۹۵/۶ bc
	۱۱۱/۱ f	۱۱۱/۱ f
	۱۶۴/۸ d	۱۶۴/۸ d
	۱۱۴/۱ f	۱۱۴/۱ f
	۱۴۰/۹ e	۱۴۰/۹ e

میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه تفاوت معنی داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند.

۴-۲-۱-۳- وزن تر برگ، ساقه و شاخساره

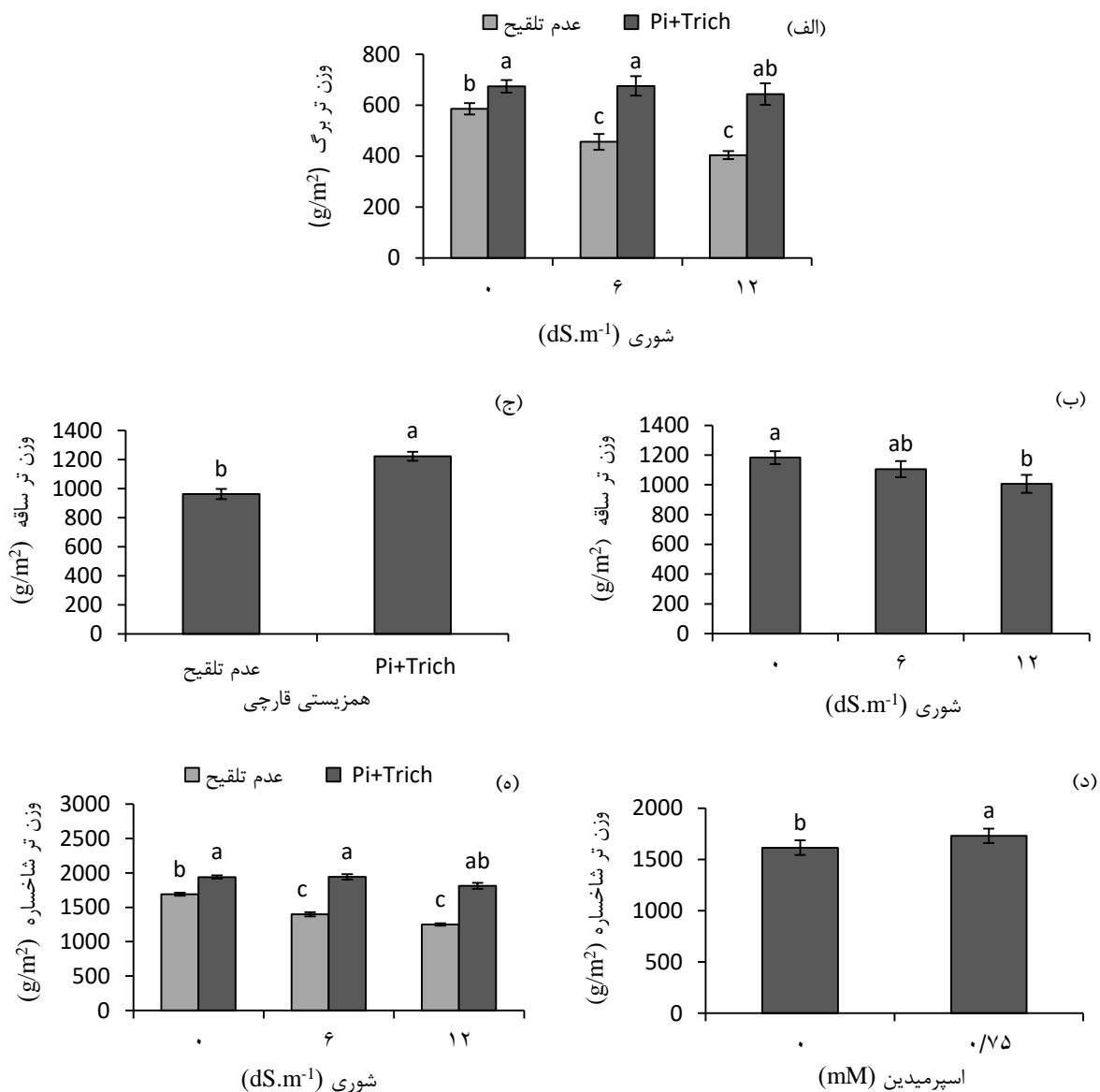
آبیاری با آب شور وزن تر اندام‌های رویشی گیاه استویا از جمله وزن تر برگ را کاهش داد (شکل ۴-۲۳). از طرفی، در تمام سطوح تنش شوری همزیستی با قارچ‌های اندوفیت افزایش رشد رویشی گیاه را به دنبال داشت به طوری که بیشترین وزن تر برگ در هر سه سطح شوری در تلقیح هم‌زمان دو قارچ مشاهده شد. همچنین، همزیستی قارچی باعث تعدیل اثرات مضر شوری و در نتیجه ممانعت از کاهش رشد گیاه در اثر تنش گردید، به طوری که افزایش شوری آب آبیاری از صفر به ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر در تیمار عدم تلقیح کاهش حدود ۳۱ درصدی را نشان داد در حالی که این کاهش در تیمار همزیستی قارچی تنها حدود چهار درصد بود (شکل ۴-۲۳ الف). این نتیجه می‌تواند به دلیل افزایش جذب آب توسط هیف‌های قارچی و جلوگیری از بسته شدن روزنه‌ها در شرایط تنش و در نتیجه افزایش فعالیت فتوسنتزی گیاه باشد (یعقوبیان، ۱۳۹۰).

بر اساس یافته‌ها مشخص گردید، وزن تر ساقه در گیاه استویا با افزایش تنش شوری کاهش یافت، به طوری که در سطح شوری ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر با حدود ۱۵ درصد کاهش نسبت به شاهد به کمترین میزان خود رسید (شکل ۴-۲۳ ب). محققین علت کاهش وزن تر گیاه تحت تنش شوری را کاهش آب قابل دسترس برای گیاه، تجمع یون سدیم، کاهش در فرآیند فتوسنتز و تخریب غشای سلولی بیان کردند (مونس و جیمز، ۲۰۰۳؛ تافو و همکاران، ۲۰۰۹). از سوی دیگر، نتایج پژوهش حاضر نشان داد تلقیح با قارچ‌های اندوفیت

وزن تر ساقه را بهبود بخشید به طوری که صفت مورد نظر را نسبت به تیمار عدم تلقیح ۲۷ درصد افزایش داد (شکل ۴-۲۳ ج). تلقیح با این ریزجانداران علاوه بر افزایش قابلیت جذب فسفر محلول، با ترشح هورمون‌ها و فاکتورهای تحریک کننده رشد گیاه از جمله هورمون اکسین (هلموت و همکاران، ۲۰۰۸)، سبب افزایش محتوای کلروفیل و کارایی فتوسنتز شده و در نهایت وزن گیاه را افزایش می‌دهد (وارما و همکاران، ۲۰۱۲).

محلول‌پاشی پلی‌آمین اسپرمیدین وزن تر شاخساره را به صورت معنی‌داری افزایش داد، به طوری که میزان این افزایش نسبت به سطح صفر اسپرمیدین ۱۹ درصد بود (شکل ۴-۲۳ د). پلی‌آمین‌ها نقش حیاتی در فرآیندهای رشدی، چرخه‌های زیستی و فیزیولوژیک گیاهان داشته و با افزایش میزان تبادل گاز در برگ و تجمع رنگدانه‌های پلاستییدی و پروتئین محلول و همچنین با تأثیر مثبت بر تقسیم و طول شدن سلول‌ها افزایش در رشد گیاه را به دنبال خواهند داشت (یامامورا و همکاران، ۲۰۱۶).

برهمکنش شوری و همزیستی قارچی نشان داد، آبیاری با آب شور وزن تر شاخساره را کاهش داد در حالی که همزیستی با قارچ‌های اندوفیت منجر به افزایش صفت مذکور شد (شکل ۴-۲۳ ه). قارچ‌های همزیست گیاهی از جمله *P. indica* و *T. virens* چه در شرایط مطلوب رشدی و چه تحت تنش‌های محیطی جذب مواد غذایی را افزایش می‌دهند و باعث افزایش رشد و سازگاری گیاه به شرایط مختلف به‌ویژه تنش‌های محیطی زنده و غیر زنده از جمله تنش شوری می‌شوند (ژانگ و همکاران، ۲۰۰۶). علاوه بر آن در نتیجه تغییرات فیزیولوژیکی که ایجاد می‌کنند، کارایی گیاهان را تحت شرایط تنش افزایش می‌دهند (جانوسکووا و همکاران، ۲۰۰۶). همچنین عبدالهی و همکاران (۱۳۹۴) که اثر قارچ‌های *P. indica* و *T. virens* را در گیاه ریحان و در سطوح مختلف نیترات مس مورد مطالعه قرار دادند، افزایش رشد رویشی گیاه را در اثر همزیستی با میکروارگانیسم‌های مذکور و به‌ویژه در تلقیح همزمان دو قارچ گزارش کردند که نتایج این آزمایش نیز با نتایج ایشان مطابقت دارد.

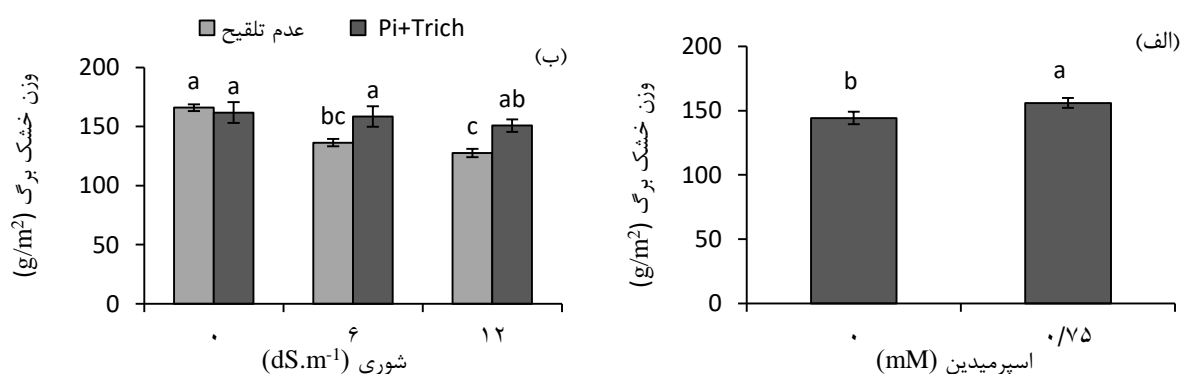


شکل ۴-۲۳- برهمکنش شوری و همزیستی قارچی بر وزن تر برگ (الف)، اثر ساده شوری (ب) و اثر ساده همزیستی قارچی (ج) بر وزن تر ساقه، اثر ساده پلی آمین اسپریمیدین (د) و برهمکنش شوری و همزیستی قارچی (ه) بر وزن تر شاخساره گیاه استویا. در هر شکل میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند.

۴-۱-۲-۴- وزن خشک برگ

نتایج پژوهش حاضر نشان داد، محلول‌پاشی پلی‌آمین اسپریمیدین اثر مثبت و معنی‌داری بر وزن خشک برگ داشته و منجر به افزایش ۸ درصدی آن نسبت به سطح صفر اسپریمیدین گردید (شکل ۴-۲۴ الف). پلی‌آمین‌ها به‌عنوان یک منبع نیتروژنی محسوب شده و در تحریک رشد گیاه نقش دارند و همچنین به‌دلیل نقش مثبت آن‌ها در تقسیم و بزرگ شدن سلول، کمک به تعادل کاتیون و آنیون و اثر اکسیداتیوی منجر به

افزایش رشد گیاهان می‌شوند (طلعت و همکاران، ۲۰۰۵). از سوی دیگر، آبیاری با آب شور وزن خشک برگ را کاهش داد، در حالی که در تمام سطوح تنش شوری همزیستی با قارچ‌های اندوفیت افزایش وزن خشک برگ را به دنبال داشته و باعث تعدیل اثرات مضر شوری و در نتیجه ممانعت از کاهش وزن خشک برگ در اثر تنش گردید (شکل ۴-۲۴ ب). کاهش پتانسیل اسمزی محلول خاک در شرایط شور، منجر به کاهش جذب آب شده و در نتیجه روزنه‌ها بسته و به دنبال آن تنفس و فتوسنتز و در نهایت رشد گیاه کاهش می‌یابد (بن آشر و همکاران، ۲۰۰۶). نقش مثبت همزیستی قارچ‌های اندوفیت در تحمل گیاهان در شرایط شور را می‌توان به بهبود جذب عناصر غذایی به‌خصوص فسفر و تنظیم پتانسیل اسمزی در گیاه نسبت داد (کادین و همکاران، ۲۰۱۳). نتایج حاضر در تأیید نتایج آزمایش گلخانه‌ای این پژوهش می‌باشد که همزیستی قارچی در شرایط شور سبب بهبود وزن خشک برگ گیاه استویا گردید (شکل ۴-۵ الف).

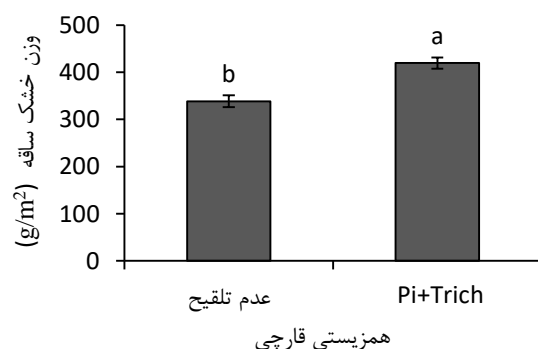


شکل ۴-۲۴- اثر ساده پلی آمین اسپرمیدین (الف) و برهمکنش شوری و همزیستی قارچی (ب) بر وزن خشک برگ گیاه استویا. در هر شکل میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند.

۴-۲-۱-۵- وزن خشک ساقه

تلقیح با قارچ‌های اندوفیت بر وزن خشک ساقه اثر مثبت و معنی‌داری داشت، به طوری که مقدار آن را ۲۴ درصد افزایش داد (شکل ۴-۲۵). قارچ‌های اندوفیت با جذب عناصر غذایی به‌ویژه فسفر موجب کاهش اثر تنش‌های محیطی در گیاه میزبان شده (کومار و همکاران، ۲۰۰۵) و افزایش رشد در ریشه، ساقه و برگ (والر و همکاران، ۲۰۰۹) را به دنبال دارند. تلقیح با این ریزجانداران علاوه بر افزایش قابلیت جذب فسفر محلول،

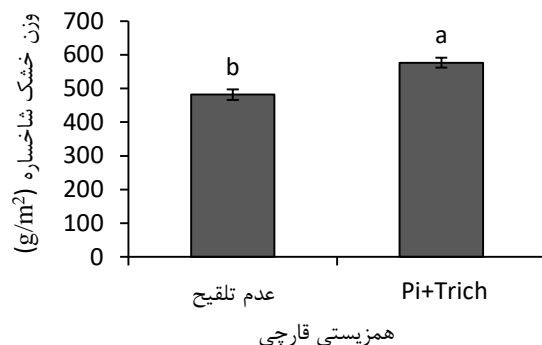
سبب ترشح هورمون‌های افزایش‌دهنده رشد و فاکتورهای تحریک کننده رشد گیاه از جمله هورمون اکسین (هلموت و همکاران، ۲۰۰۸) شده و با افزایش کارایی فتوسنتز، رشد را افزایش خواهند داد (وارما و همکاران، ۲۰۱۲).



شکل ۴-۲۵- اثر ساده همزیستی قارچی بر وزن خشک ساقه گیاه استویا. در هر شکل میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند.

۴-۲-۱-۶- وزن خشک شاخساره

همزیستی گیاه استویا با قارچ‌های اندوفیت منجر به افزایش معنی‌دار در وزن خشک شاخساره گردید، به طوری که این افزایش نسبت به شرایط عدم تلقیح با قارچ حدود ۱۷ درصد بود (شکل ۴-۲۶). زیست فراهمی بیشتر فسفر در حضور ریزجانداران همزیست گیاهی از جمله قارچ‌های اندوفیت به دلیل نقش مؤثر عنصر فسفر در افزایش رشد گیاهان تلقیح شده منجر به افزایش در رشد ریشه، ساقه و برگ می‌شود. نتایج به دست آمده از پژوهش‌های محققانی نظیر کومار و همکاران (۲۰۰۹) در گیاه ذرت و لی و همکاران (۲۰۰۶) در گیاه گندم بر نقش برجسته قارچ‌ها در افزایش رشد گیاهان دلالت دارد.



شکل ۴-۲۶- اثر ساده همزیستی قارچی بر وزن خشک شاخساره گیاه استویا. در هر شکل میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند.

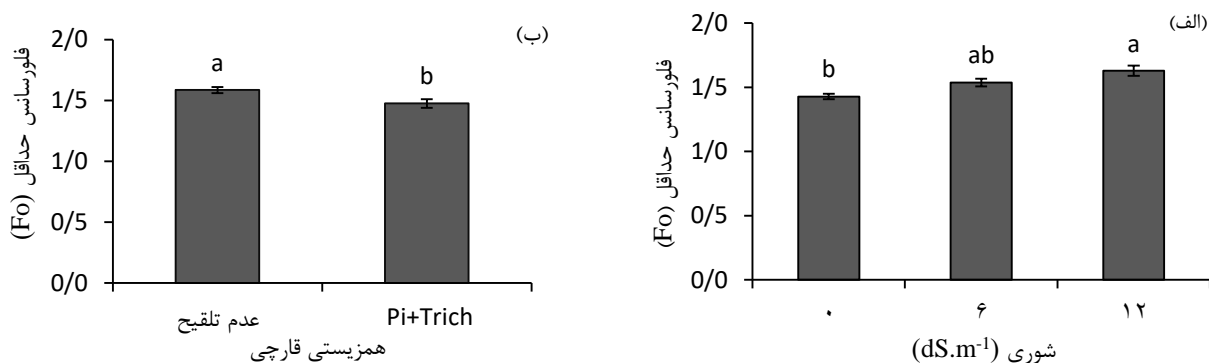
۴-۲-۲- صفات فیزیولوژیک

۴-۲-۲-۱- فلورسانس کلروفیل a

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های مربوط به فلورسانس کلروفیل (جدول پیوست ۹) نشان داد که اثر ساده شوری و همزیستی قارچ‌های اندوفیت بر تمامی پارامترهای فلورسانس کلروفیل شامل فلورسانس حداقل (F_o)، فلورسانس حداکثر (F_m)، فلورسانس متغیر (F_v)، حداکثر کارایی کوانتومی فتوسیستم II (F_v/F_m)، کارایی کوانتومی فتوشیمیایی مؤثر فتوسیستم II [$Y(II)$]، کارایی کوانتومی غیرفتوشیمیایی تنظیم نشده فتوسیستم II [$Y(NPQ)$]، [$Y(NO)$] و خاموشی غیر فتوشیمیایی (NPQ) و همچنین اثر ساده پلی‌آمین اسپرمیدین در F_m ، F_v ، F_v/F_m و ($Y(NO)$) و NPQ در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. بین همزیستی قارچی و سطوح مختلف شوری در تمامی پارامترهای مورد بررسی به جز F_o و $Y(NPQ)$ و بین سطوح مختلف شوری و محلول‌پاشی اسپرمیدین تنها در پارامتر NPQ برهمکنش معنی‌داری مشاهده شد. همچنین، بین همزیستی قارچی و پلی‌آمین اسپرمیدین در F_m و NPQ به ترتیب در سطح احتمال پنج درصد و یک درصد برهمکنش معنی‌داری وجود داشت. اثر متقابل سه‌گانه شوری، قارچ و اسپرمیدین در هیچ یک پارامترهای فلورسانس کلروفیل معنی‌دار نبود (جدول پیوست ۹).

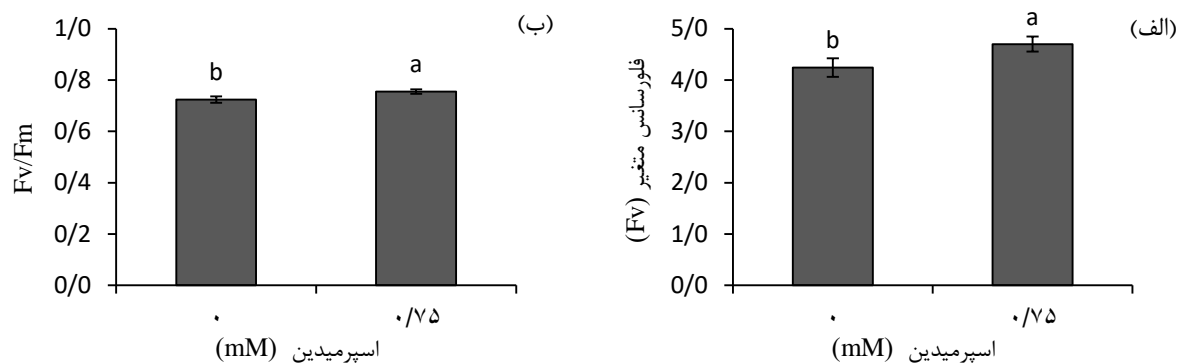
بر اساس یافته‌ها، فلورسانس حداقل در برگ‌های سازگار به تاریکی (F_o) با افزایش تنش شوری افزایش قابل توجهی نشان داد، به طوری که در سطح شوری ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر با حدود ۱۴ درصد افزایش نسبت

به شاهد به بالاترین میزان خود رسید (شکل ۴-۲۷ الف). همچنین تلقیح با قارچ اندوفیت توانست فلورسانس حداقل را نسبت به شاهد حدود هفت درصد کاهش دهد (شکل ۴-۲۷ ب).



شکل ۴-۲۷- اثر ساده تنش شوری (الف) و همزیستی قارچی (ب) بر فلورسانس حداقل (Fo) در برگ گیاه استویا. در هر شکل میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند.

محلول‌پاشی پلی‌آمین اسپرمیدین باعث افزایش معنی‌دار فلورسانس متغیر و حداکثر کارایی کوانتومی فتوسیستم II در گیاه استویا گردید که این افزایش به ترتیب ۱۱ و پنج درصد بود (شکل ۴-۲۸ الف). با این حال، کارایی کوانتومی غیرفتوشیمیایی تنظیم نشده فتوسیستم II [Y(NO)] در زمان کاربرد اسپرمیدین ۰/۷۵ میلی‌مولار به‌طور قابل توجهی (نه درصد) کاهش نشان داد (شکل ۴-۲۸ ب). کاهش در Y(NO) نشان دهنده افزایش نسبت نور مورد استفاده در فرآیند فتوشیمیایی و کاهش اتلاف انرژی است که به دنبال آن افزایش فتوسنتز و آسیمیلایسیون دی‌اکسید کربن را در پی خواهد داشت (یعقوبیان و همکاران، ۲۰۱۶). در شرایط تنش شوری گونه‌های فعال اکسیژن تولید شده با تخریب پروتئین‌های مراکز واکنشی فتوسیستم II منجر به کاهش Fv/Fm و افزایش Y(NO) می‌شوند (خادمیان و همکاران، ۲۰۱۹). در مجموع، نتایج پژوهش حاضر بیانگر اثر مثبت کاربرد پلی‌آمین اسپرمیدین بر بهبود پارامترهای فلورسانس کلروفیل و افزایش کارایی سیستم فتوسنتزی گیاه بود که با نتایج ژانگ و همکاران (۲۰۰۹) نیز مطابقت دارد.



شکل ۴-۲۸- اثر ساده پلی آمین اسپرمیدین بر فلورسانس متغیر (Fv) (الف)، حداکثر کارایی کوانتومی فتوسیستم II (Fv/Fm) (ب) و کارایی کوانتومی غیرفتوشیمیایی تنظیم نشده فتوسیستم II [Y(NO)] (ج). در هر شکل میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند.

براساس نتایج جدول ۴-۱۱ مشخص گردید که با افزایش سطوح شوری در هر دو تیمار قارچی به‌ویژه تیمار تلقیح قارچی (Pi+Trich)، Fv، Fm و Fv/Fm کاهش یافت. به‌طوری که میزان Fv، Fm و Fv/Fm در تیمار عدم تلقیح با افزایش تنش شوری از صفر تا ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر به ترتیب ۲۱، ۳۰ و ۱۲ درصد کاهش نشان داد، درحالی که این کاهش در تیمار همزیستی قارچی کمتر بود. این نتیجه می‌تواند بیانگر تعدیل اثر تنش شوری به‌وسیله تیمار قارچی باشد. به‌طوری که، در هر سه سطح شوری تلقیح با قارچ‌های اندوفیت توانست میزان Fv، Fm و Fv/Fm را افزایش دهد. بنابراین نتایج ما نشان می‌دهد همزیستی قارچی باعث افزایش توانایی گیاه برای محافظت برگ از آسیب القاء شده توسط نور تحت تنش شوری می‌شود. پارامتر Fv/Fm نشان دهنده ظرفیت فتوشیمیایی اولیه فتوسیستم II می‌باشد که تا حدی حساس به تنش‌های محیطی است (کراس و ویز، ۱۹۹۱). نتایج این تحقیق نشان داد میزان Fv/Fm و دیگر پارامترهای فتوشیمیایی اندازه‌گیری شده در این تحقیق، در گیاه تلقیح شده نسبت به گیاه عدم تلقیح در سطوح مشابه شوری، بالاتر بود که این نتایج با نتایج قربانی و همکاران (۱۳۹۶) و سینگ و همکاران (۲۰۰۸) مطابقت دارد. یافته‌های این تحقیق نشان داد NPQ با افزایش شوری افزایش یافت. پارامتر NPQ نشان دهنده اتلاف انرژی به‌صورت گرما است و این افزایش باعث محافظت گیاه در برابر فتواکسیداسیون نوری تحت تنش شوری می‌شود. افزایش این شاخص تحت تنش در ذرت (مومنی و همکاران، ۱۳۹۱)، چغندر قند (اسدی‌نسب و همکاران، ۱۳۹۳)، کلزا (اطلسی و همکاران، ۲۰۰۹) و گندم (آبادشاهی و همکاران، ۲۰۱۰) گزارش شده

است. از سوی دیگر، تلقیح قارچ اندوفیت مقدار NPQ را نسبت به تیمار عدم تلقیح در هر سه سطح شوری کاهش داد (جدول ۴-۱۱). این نتیجه می‌تواند به دلیل اثر مثبت همزیستی قارچی در تعدیل میزان تنش وارد شده به گیاه توسط آب شور باشد. نتایج آزمایش گلخانه‌ای نیز با نتایج این بخش همخوانی داشت.

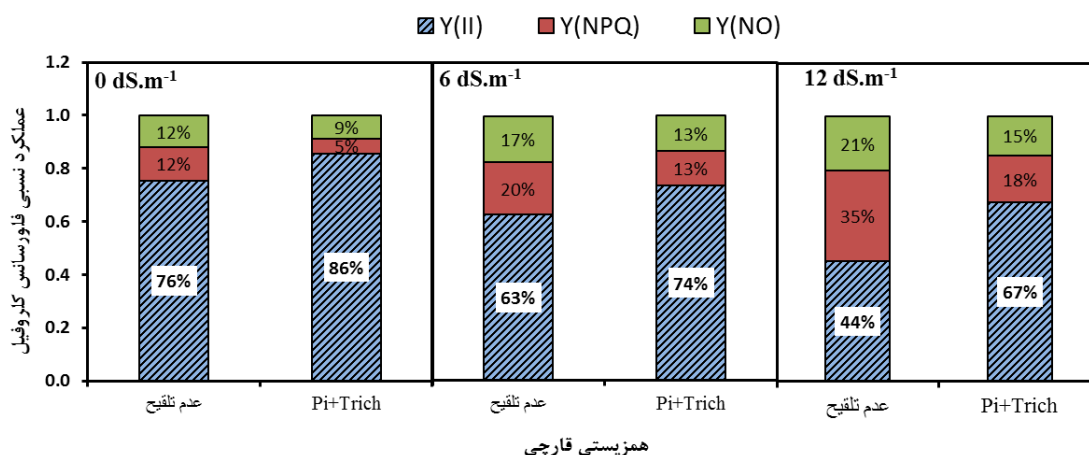
جدول ۴-۱۱- مقایسه میانگین برهمکنش تنش شوری و همزیستی قارچی بر مؤلفه‌های فلورسانس کلروفیل در برگ گیاه استویا

قارچ اندوفیت		شوری (dS.m ⁻¹)
Pi+Trich	عدم تلقیح	
فلورسانس حداکثر (Fm)		
۶/۵۶ ^a	۶/۴۷ ^a	۰
۶/۳۷ ^a	۵/۳۵ ^c	۶
۶/۱۲ ^b	۵/۱۲ ^d	۱۲
فلورسانس متغیر (Fv)		
۵/۱۹ ^a	۴/۹۹ ^{ab}	۰
۴/۸۹ ^b	۳/۷۶ ^d	۶
۴/۵۵ ^c	۳/۴۳ ^e	۱۲
حداکثر کارایی کوانتومی فتوسیستم II (Fv/Fm) II		
۰/۸۰ ^a	۰/۷۷ ^a	۰
۰/۷۷ ^{ab}	۰/۷۰ ^c	۶
۰/۷۴ ^b	۰/۶۷ ^d	۱۲
خاموشی غیرفتوشیمیایی (NPQ)		
۰/۷۱ ^c	۰/۹۹ ^b	۰
۰/۹۳ ^b	۰/۹۹ ^b	۶
۱/۰۱ ^b	۱/۲۰ ^a	۱۲

برای هر پارامتر میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند.

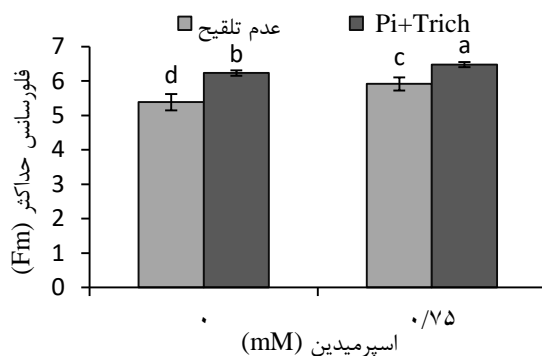
نتایج حاکی از اثربخشی تیمار همزیستی قارچی در افزایش Y(II)، کاهش Y(NPQ) و Y(NO) در سطوح مختلف شوری می‌باشد (شکل ۴-۲۹). گیاهان همزیست شده با قارچ‌های اندوفیت همواره کارایی کوانتومی فتوشیمیایی بالاتری نسبت به گیاهان همزیست نشده داشتند و برعکس میزان Y(NO) در آن‌ها کمتر بود. نظر به اینکه Y(II) عملکرد فتوشیمیایی بوده و مستقیماً با سرعت آسیمیلایسیون دی‌اکسید کربن در ارتباط است (کرامر و همکاران، ۲۰۰۴ و لی و همکاران، ۲۰۰۸)، افزایش آن در همزیستی با قارچ‌های اندوفیت

بیانگر بهبود آسیمیلاسیون دی‌اکسید کربن می‌باشد. در این آزمایش در شرایط شوری شش و ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر، به ترتیب افزایش ۱۱ و ۲۳ درصدی در پارامتر Y(II) در اثر تلقیح Pi+Trich نسبت به سطوح شوری مشابه و عدم تلقیح مشاهده شد. در حقیقت Y(NPQ) بیانگر عملکرد هدر رفت گرمایی تنظیم شده و Y(NO) عملکرد هدر رفت گرمایی تنظیم نشده است که بازتاب فرایند خاموشی غیر فتوشیمیایی می‌باشند (کرامر و همکاران، ۲۰۰۴). از آنجایی که این سه فرایند [Y(II)، Y(NPQ) و Y(NO)] به‌عنوان عملکردهای کوانتومی، مکمل یکدیگر بوده و افزایش مقدار یکی از آن‌ها با کاهش یک یا هر دو پارامتر دیگر همراه خواهد بود (کرامر و همکاران، ۲۰۰۴ و لی و همکاران، ۲۰۰۸)، بنابراین در این آزمایش با افزایش Y(II) در اثر تیمارهای قارچی، میزان Y(NO) کاهش یافت. این نتایج بیانگر آن است که به دلیل بهبود سیستم فتوسنتزی گیاه در همزیستی با قارچ‌های اندوفیت، انرژی دریافتی از خورشید به‌جای هدر روی به‌عنوان انرژی مازاد صرف راه انداختن سیستم فتوسنتزی و آسیمیلاسیون CO₂ می‌گردد. همچنین با مصرف این انرژی از تولید رادیکال‌های آزاد و در نتیجه بازدارندگی نوری جلوگیری به عمل می‌آید. این نتایج در تأیید نتایج آزمایش گلخانه‌ای است که نشان می‌دهد همزیستی قارچ‌های اندوفیت سبب افزایش Y(II) و کاهش پارامترهای Y(NPQ) و Y(NO) می‌گردد.



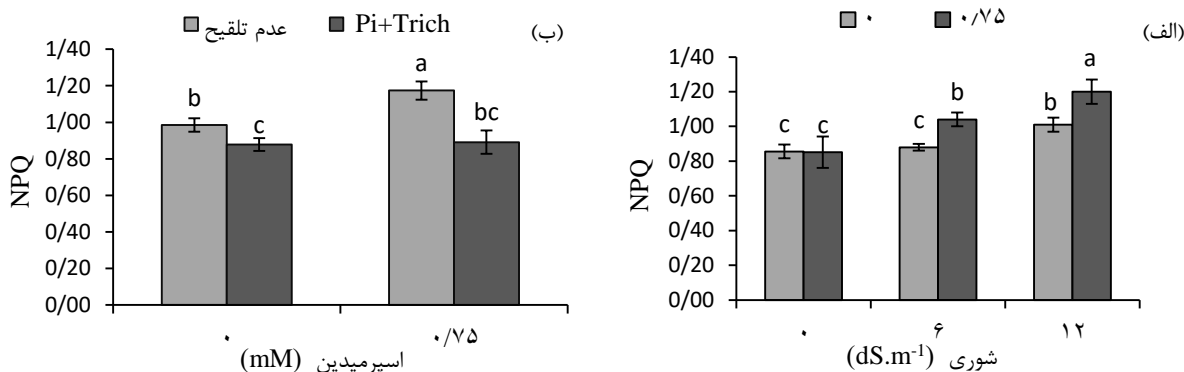
شکل ۴-۲۹- اثر همزیستی قارچی بر تغییرات مکمل پارامترهای Y(II)، Y(NPQ) و Y(NO) در سطوح مختلف شوری.

همزیستی قارچی و کاربرد پلی‌آمین اسپرمیدین باعث افزایش پارامتر F_m شد که بالاترین مقدار آن در تلقیح قارچ و محلول‌پاشی اسپرمیدین با ۲۰ درصد افزایش نسبت به تیمار عدم‌تلقیح و سطح صفر اسپرمیدین مشاهده شد (شکل ۴-۳۰). همزیستی قارچ‌های اندوفیت از طریق بهبود سیستم آنتی‌اکسیدانی و در نتیجه کاهش رادیکال‌های اکسیژن از میزان آسیب به ساختار پروتئین‌های مراکز واکنش فتوسیستم II می‌کاهد (کرامتی و همکاران، ۱۳۹۶). همچنین، پلی‌آمین‌ها به‌عنوان ترکیبات کاتیونی می‌توانند ساختار پروتئین‌های فتوسیستم II از جمله پروتئین D1 و D2 را در شرایط بازدارندگی نوری حفظ کنند و در نتیجه فعالیت فتوسنتزی را بهبود دهند (خوشبخت و همکاران، ۲۰۱۸).



شکل ۴-۳۰- برهمکنش همزیستی قارچی و پلی‌آمین اسپرمیدین بر فلورسانس حداکثر (F_m) در برگ استویا. در هر شکل میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند.

در پژوهش حاضر، تنش شوری موجب افزایش NPQ شد که بیانگر تلاش گیاه برای دفع انرژی مازاد جذب شده از طریق خاموشی غیر فتوشیمیایی می‌باشد. از سوی دیگر، در شرایط آبیاری با آب آبیاری ۶ و ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر محلول‌پاشی اسپرمیدین ۰/۷۵ میلی‌مولار به‌طور معنی‌داری NPQ را افزایش داد (شکل ۴-۳۱ الف). همچنین، یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد با تلقیح قارچ‌های اندوفیت پارامتر NPQ در هر دو سطح کاربرد پلی‌آمین اسپرمیدین کاهش یافت. این کاهش در سطوح صفر و ۰/۷۵ اسپرمیدین و تیمار قارچی Pi+Trich نسبت به تیمار عدم‌تلقیح به ترتیب ۱۱ و ۲۴ درصد بود (شکل ۴-۳۱ ب).



شکل ۴-۳۱- بر همکنش همزیستی قارچ و اسپرمیدین (الف) و شوری و اسپرمیدین بر خاموشی غیرفتوشیمیایی (NPQ) در برگ استویا. در هر شکل میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند.

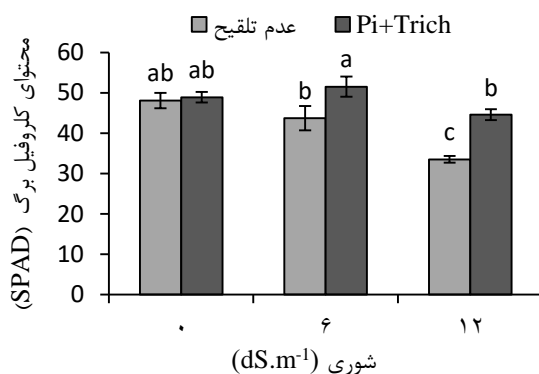
۴-۲-۲-۲-۲-۴- رنگدانه‌های فتوسنتزی

تجزیه واریانس داده‌های حاصل از سنجش رنگیزه‌های فتوسنتزی شامل محتوای کلروفیل برگ (SPAD)، کلروفیل *a*، *b* و *a+b* و کارتنوئید (جدول پیوست ۱۰) نشان داد که اثر ساده شوری بر تمامی صفات مورد بررسی به‌غیر از کلروفیل *b* در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود. اثر ساده همزیستی قارچی بر تمامی رنگیزه‌های فتوسنتزی و اثر ساده پلی‌آمین اسپرمیدین بر دو صفت کلروفیل *b* و کلروفیل *a+b* معنی‌دار بود. بین سطوح مختلف شوری و قارچ‌های اندوفیت تنها در محتوای کلروفیل برگ برهمکنش معنی‌داری مشاهده شد. بین سطوح مختلف شوری و محلول‌پاشی اسپرمیدین و همچنین همزیستی قارچی و محلول‌پاشی اسپرمیدین در هیچ یک از صفات مذکور تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. اثر سه‌گانه شوری، قارچ و اسپرمیدین نیز تنها بر صفت کلروفیل *b* معنی‌دار شد (جدول پیوست ۱۰).

۴-۲-۲-۲-۱-۲-۲-۴- محتوای کلروفیل برگ (SPAD)

محتوای کلروفیل برگ (SPAD) با افزایش تنش شوری از صفر تا ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر کاهش یافت، ولی تلقیح قارچی (Pi+Trich) منجر به افزایش ۱۷-۳۳ درصدی محتوای کلروفیل برگ گردید، به‌طوری که بیشترین محتوای کلروفیل برگ در سطح شوری شش دسی‌زیمنس بر متر و همزیستی قارچی به‌دست آمد که با سطح صفر شوری و تلقیح قارچی و عدم‌تلقیح در یک گروه آماری قرار گرفت. کمترین محتوای

کلروفیل برگ نیز در سطح شوری ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر و تیمار عدم تلقیح قارچ مشاهده شد (شکل ۴-۳۲). کاهش در محتوای کلروفیل برگ در شرایط شور را می‌توان به تخریب رنگدانه‌های فتوسنتزی و بی‌ثبات شدن کمپلکس پروتئین رنگدانه در نتیجه انباشت یون‌های سدیم و کلر و همچنین تخریب کلروفیل برگ در اثر فعالیت گونه‌های فعال اکسیژن مرتبط دانست. میزان بالای محتوای کلروفیل در برگ گیاهان تلقیح شده با قارچ‌های اندوفیتی و میکوریزی تحت تنش شوری توسط محققین در گیاه استویا (نوری و همکاران، ۱۳۹۵)، ذرت (شنگ و همکاران، ۲۰۰۸)، یونجه (کرمی و زارع، ۱۳۹۳) و گندم (حاجی‌نیا و همکاران، ۱۳۹۰) گزارش شده است.

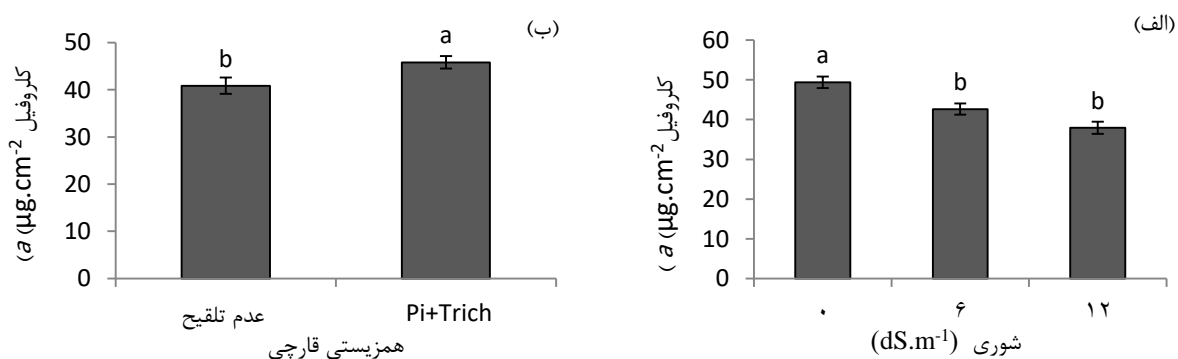


شکل ۴-۳۲- برهمکنش شوری و همزیستی قارچی بر محتوای کلروفیل برگ (SPAD) استویا. در هر شکل، میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند.

۴-۲-۲-۲-۲-۴ کلروفیل *a*

غلظت کلروفیل *a* با افزایش تنش شوری کاهش قابل توجهی نشان داد، به طوری که در سطح شوری ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر با حدود ۲۳ درصد کاهش نسبت به شاهد به کمترین میزان خود رسید (شکل ۴-۳۳ الف). شوری با کاهش جذب عناصر معدنی از جمله منیزیم موجب کاهش بیوسنتز کلروفیل و فتوسنتز در گیاهان می‌شود (کرمی و همکاران، ۱۳۹۳). سمیت بیش از حد یون‌های سدیم و کلر نیز موجب آسیب به غشاء پلاسمایی، اندامک‌های سلولی و اختلال در فتوسنتز، تنفس و سنتز پروتئین‌ها (فنگ و همکاران، ۲۰۰۹) و نیز موجب عدم پایداری ترکیب رنگیزه - پروتئین در گیاه می‌گردد (سینگ و همکاران، ۱۹۹۴). از

طرفی، تلقیح با قارچ اندوفیت توانست غلظت کلروفیل a را نسبت به شاهد حدود ۱۳ درصد افزایش دهد (شکل ۴-۳۳ ب). در همین راستا، محققین افزایش کلروفیل a در گیاهان تلقیح شده با قارچ‌های اندوفیت را به دلیل بهبود وضعیت آبی و جذب عناصر معدنی فسفر و منیزیم دانسته‌اند (گری و همکاران، ۲۰۰۲).



شکل ۴-۳۳- اثر ساده شوری (الف) و همزیستی قارچی (ب) بر محتوای کلروفیل a در برگ گیاه استویا. در هر شکل میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند.

۴-۲-۲-۲-۳- کلروفیل b

براساس یافته‌های حاصل از مقایسه میانگین اثر متقابل سه‌گانه تیمارهای آزمایشی (جدول ۴-۱۲)، غلظت کلروفیل b در تمام سطوح شوری در اثر تلقیح با قارچ‌های *P. indica* و *T. virens* بهبود یافت. همچنین، در بیشتر سطوح تنش شوری و تلقیح قارچی، محلول‌پاشی اسپرمیدین با غلظت ۰/۷۵ میلی‌مولار افزایش کلروفیل b را به دنبال داشت. در همین زمینه، زارا و همکاران (۲۰۱۲) بیان داشتند که بالا بودن میزان کلروفیل در گیاهان تلقیح شده با قارچ اندوفیت می‌تواند به علت وجود رابطه مثبت بین غلظت فسفر و مقدار کلروفیل در گیاهان تلقیح شده باشد. همچنین در شرایط تنش، تلقیح قارچی با تأثیر بر سیستم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانی، گونه‌های فعال اکسیژن را جمع‌آوری و از تخریب کلروفیل جلوگیری خواهد کرد (کاپور و همکاران، ۲۰۰۸). از سوی دیگر، پلی‌آمین‌ها نقش محافظت از کلروفیل و پروتئین را بر عهده داشته و با کاهش پراکسیداسیون لیپیدها سبب ثبات در غشای تیلاکوئید می‌شوند (نیاکان و همکاران، ۱۳۹۴).

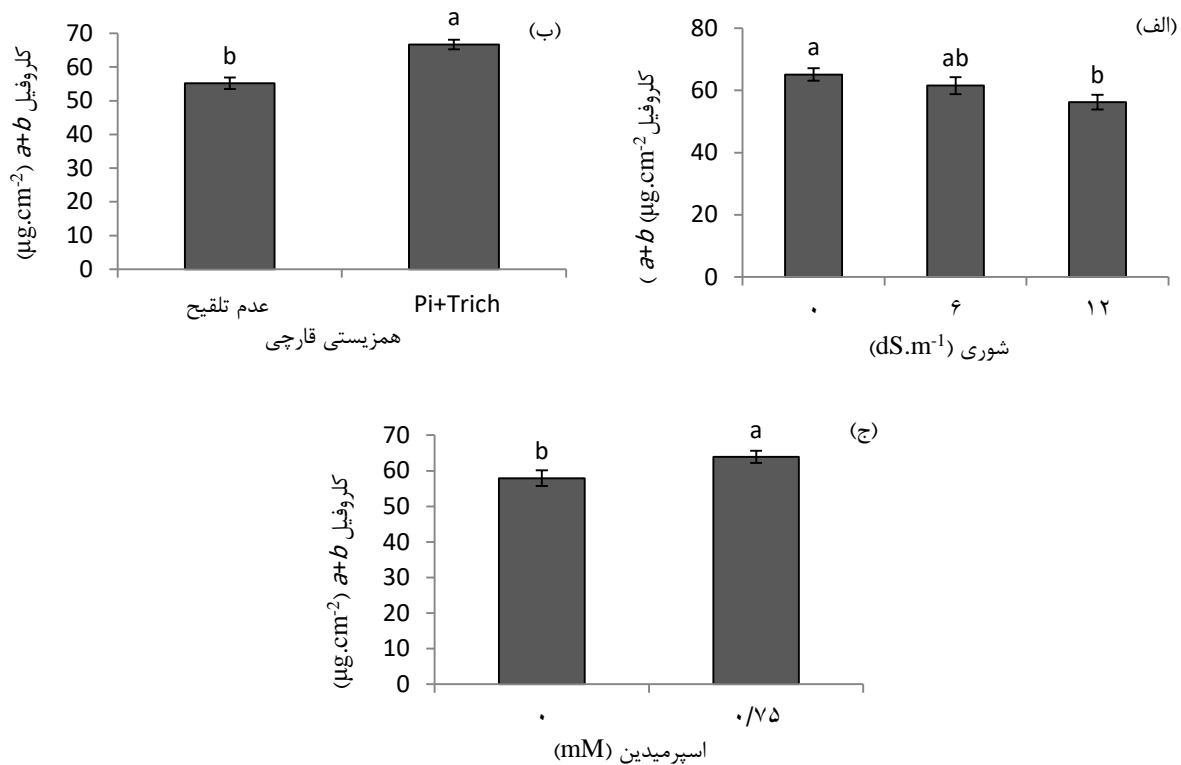
جدول ۴-۱۲- مقایسه میانگین برهمکنش تنش شوری، همزیستی قارچی و محلول پاشی پلی آمین اسپرمیدین بر غلظت کلروفیل b ($\mu\text{g.cm}^{-2}$)

قارچ اندوفیت		اسپرمیدین (mM)	شوری (dS.m^{-1})
Pi+Trich	عدم تلقیح		
۲۰/۱۲bc	۱۰/۰۱e	۰	۰
۱۷/۰۵cd	۱۵/۶۱cd	۰/۷۵	۰
۱۹/۶۵bc	۱۲/۷۲de	۰	۶
۲۶/۰۹a	۱۷/۱۴cd	۰/۷۵	۶
۱۹/۳۱bc	۱۴/۱۴de	۰	۱۲
۲۳/۲۹ab	۱۶/۴۲cd	۰/۷۵	۱۲

میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند.

۴-۲-۲-۲-۴- کلروفیل $a+b$

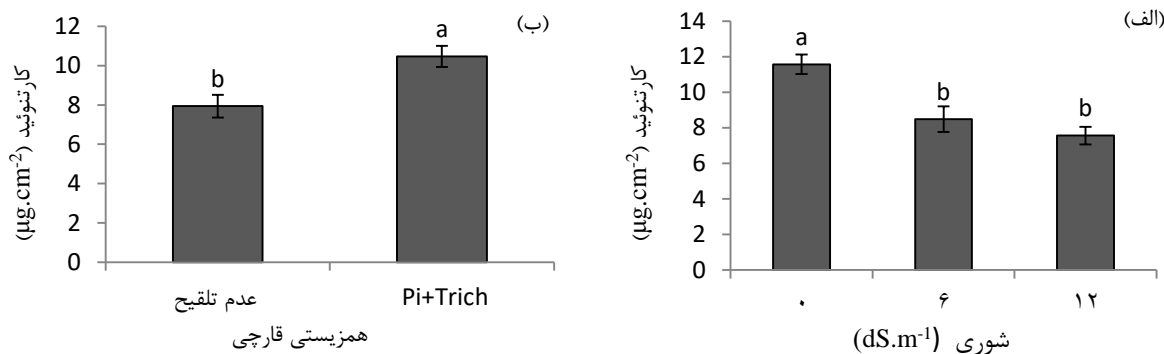
نتایج آزمایش مزرعه‌ای حاکی از کاهش غلظت کلروفیل $a+b$ با افزایش شوری آب آبیاری بود (شکل ۴-۳۴ الف). شوری با تسریع زوال رنگیزه‌های کلروفیلی، کوچکتر شدن فضای بین سلولی و کاهش هدایت دی‌اکسیدکربن موجب کاهش فتوسنتز در گیاهان می‌گردد (کرمی و زارع، ۱۳۹۳). با این حال، تلقیح با قارچ اندوفیت بر غلظت کلروفیل $a+b$ اثر مثبتی نشان داد، به طوری که صفت مذکور را در گیاهان تلقیح شده نسبت به گیاهان تلقیح نشده (عدم تلقیح) حدود ۲۱ درصد افزایش داد (شکل ۴-۳۴ ب). تلقیح قارچی می‌تواند به گیاه در مواجهه با بازدارندگی و تخریب نوری کمک کرده و سنتز کلروفیل را افزایش دهد (سان و همکاران، ۲۰۱۰). همچنین با کمک به گیاه در جذب هر چه بیشتر آب و کاهش تنش اکسیداتیو، اثر مخرب تنش را بر کلروفیل و سایر رنگیزه‌ها کاهش می‌دهد (یعقوبیان و همکاران، ۲۰۱۴). محلول پاشی پلی آمین اسپرمیدین نیز موجب افزایش حدود ۱۱ درصدی غلظت کلروفیل $a+b$ نسبت به سطح صفر اسپرمیدین گردید (شکل ۴-۳۴ ج).



شکل ۴-۳۴- اثر ساده شوری (الف) و همزیستی قارچی (ب) و پلی آمین اسپرمیدین (ج) بر محتوای کلروفیل a+b در برگ گیاه استویا. در هر شکل میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند.

۴-۲-۲-۲-۵- کارتنوئید

تنش شوری غلظت کارتنوئید را در برگ گیاه کاهش داد، به طوری که این کاهش در سطح شش و ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر نسبت به سطح صفر شوری به ترتیب ۲۷ و ۳۵ درصد بود (شکل ۴-۳۵ الف). از طرفی، تلقیح با قارچ اندوفیت غلظت کارتنوئید را نسبت به شرایط عدم تلقیح افزایش داد (شکل ۴-۳۵ ب). کارتنوئیدها به عنوان رنگدانه‌های کمکی و حفاظتی از کلروفیل در جذب و انتقال انرژی نورانی دریافتی به کلروفیل نقش مؤثری دارند. به نظر می‌رسد افزایش در غلظت کارتنوئید برگ به دنبال همزیستی قارچی راهکاری در جهت مقاومت به تنش شوری باشد (کرامتی و همکاران، ۱۳۹۶).



شکل ۴-۳۵- اثر ساده شوری (الف) و همزیستی قارچی بر محتوای کارتنوئید در برگ گیاه استویا. در هر شکل میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند.

۴-۲-۲-۳- نشت الکترولیت و محتوای نسبی آب برگ

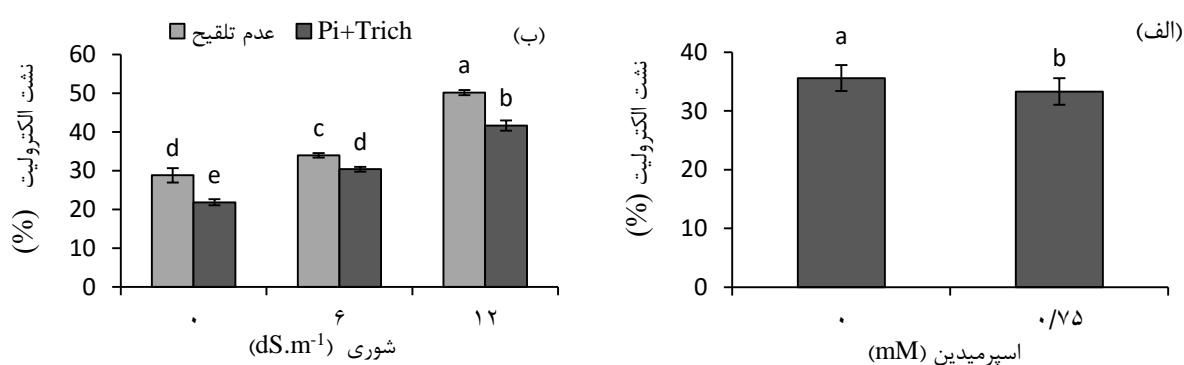
بر اساس نتایج (جدول پیوست ۱۱)، اثر ساده شوری، همزیستی قارچی و محلول‌پاشی پلی‌آمین اسپرمیدین بر درصد نشت الکترولیت و محتوای نسبی آب برگ در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. از سوی دیگر، برهمکنش شوری و قارچ‌های اندوفیت بر میزان نشت الکترولیت (در سطح احتمال یک درصد) و محتوای نسبی آب برگ (در سطح احتمال پنج درصد) معنی‌دار بود. بین سطوح مختلف شوری و محلول‌پاشی اسپرمیدین و همچنین برهمکنش همزیستی قارچی و پلی‌آمین اسپرمیدین بر صفات مذکور تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. برهمکنش شوری، قارچ و اسپرمیدین در هیچ یک از صفات مذکور اثر معنی‌داری نشان نداد (جدول پیوست ۱۱).

۴-۲-۲-۳-۱- نشت الکترولیت

بر اساس یافته‌های پژوهش حاضر کاربرد اسپرمیدین درصد نشت یونی را نسبت به تیمار شاهد (سطح صفر اسپرمیدین) به‌طور معنی‌داری کاهش داد (شکل ۴-۳۶ الف). روبینسکا و همکاران (۲۰۱۲) عنوان کردند که پلی‌آمین‌ها ممکن است کانال‌های یونی خاصی را تعدیل و نفوذپذیری غشاء به کلسیم را افزایش دهند که در ادامه مقدار این عنصر در سیتوپلاسم سلولی بالا رفته و منجر به غیرفعال شدن ورود یک سویه پتاسیم در

غشای پلازما شود که نتیجه آن تحریک انسداد روزنه و کاهش خروج آب از آن خواهد بود (حریرفروش و همکاران، ۱۳۹۸).

با بررسی برهمکنش شوری و همزیستی قارچی در مقدار نشت الکترولیت مشخص گردید تنش شوری افزایش چشمگیر نشت الکترولیت را به دنبال داشت. با این حال، در هر سه سطح شوری تلقیح با قارچ توانست مقدار نشت الکترولیت را به طور معنی داری نسبت به شرایط عدم تلقیح کاهش دهد که این کاهش به ترتیب ۲۴، ۱۱ و ۱۷ درصد بود (شکل ۴-۳۶ ب). تنش شوری با افزایش گونه‌های فعال اکسیژن نظیر رادیکال‌های سوپراکسید و هیدروکسیل سبب پراکسیداسیون چربی‌ها و پروتئین‌های غشای سلولی شده و با آسیب به غشای پلاسمایی سلول تراوایی غشای سلولی را افزایش داده و منجر به نشت الکترولیت‌های داخل سلول به بیرون سلول می‌شود (پسرکلی، ۱۹۹۹). عمواقایی و همکاران (۱۳۹۳) با بررسی اثر شوری بر کلزا دریافتند شوری موجب القای تنش اکسیداتیو ثانویه شده و با تولید گونه‌های اکسیژن فعال سبب تخریب غشا و افزایش نشت الکترولیت می‌گردد. از سوی دیگر، تیمار همزیستی قارچ اندوفیت از طریق جلوگیری از پراکسیداسیون غشا به پایداری غشای سلولی کمک کرده و کاهش نشت الکترولیت را به دنبال خواهد داشت. در همین زمینه، خالوندی و همکاران (۱۳۹۶) بیان کردند کاربرد قارچ شبه‌میکوریزا سبب کاهش نشت الکترولیت در برگ‌های گیاه نعنای فلفلی گردید.

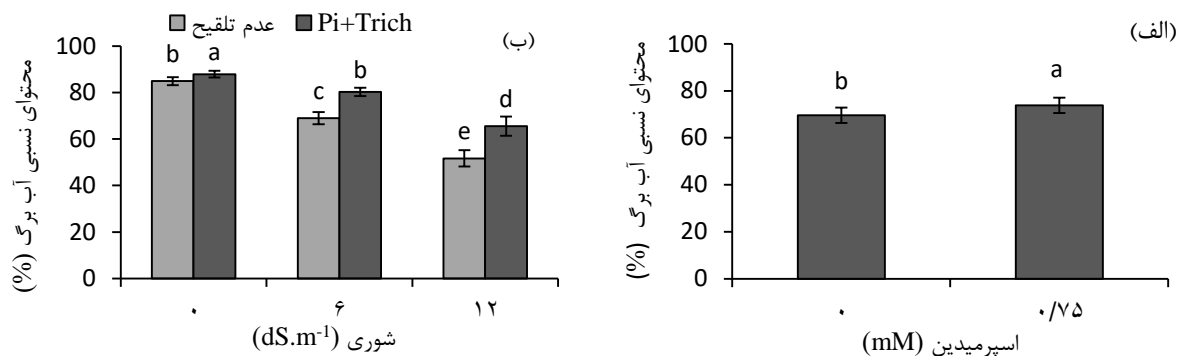


شکل ۴-۳۶- اثر ساده پلی‌امین اسپرمیدین (الف) و برهمکنش شوری و همزیستی قارچی (ب) بر نشت الکترولیت در گیاه استویا. در هر شکل میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه تفاوت معنی داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند.

۴-۲-۲-۳-۲- محتوای نسبی آب برگ

محلول پاشی پلی آمین اسپرمیدین در غلظت ۰/۷۵ میلی مولار سبب افزایش شش درصدی محتوای نسبی آب برگ نسبت به تیمار شاهد (اسپرمیدین صفر) گردید (شکل ۴-۳۷ الف). افزایش در محتوای نسبی آب در زمان کاربرد پلی آمین ها ممکن است به تنظیم اسمزی گیاه با افزایش پرولین نسبت داده شود (دان و همکاران، ۲۰۰۸).

در مقایسه میانگین اثر همزیستی قارچ های اندوفیت بر محتوای نسبی آب برگ در شرایط شور (شکل ۴-۳۷ ب) مشخص گردید، با افزایش شوری محتوای نسبی آب برگ در گیاه استویا کاهش یافت. با این حال، در هر سه سطح شوری در اثر حضور قارچ های اندوفیت مقدار آن افزایش یافت که این افزایش در تمام سطوح شوری نسبت به تیمار عدم تلقیح معنی دار بود. به خوبی اثبات شده است که حتی در گیاهانی که از نظر اسمزی تعدیل می شوند شوری باعث کاهش هدایت هیدرولیکی ریشه و در نتیجه کاهش جریان آب از ریشه به اندام هوایی می شود. این کاهش در جذب آب باعث کاهش محتوای آب برگ و بسته شدن روزنه برای جلوگیری از تلفات بیشتر آب می شود (روبینسون و همکاران، ۱۹۹۷). در پژوهش حاضر، نتایج نشان داد محتوای نسبی آب برگ در گیاه همزیست با هر دو قارچ های اندوفیت و بدون همزیست (عدم تلقیح) با افزایش سطوح شوری کاهش یافت، اما میزان کاهش در شرایط تلقیح نسبت به عدم تلقیح در سطح شوری مشابه کمتر بود (شکل ۴-۳۷ ب). بر اساس یافته ها، رابطه همزیستی گیاه با قارچ های اندوفیت باعث بهبود جذب آب، پتانسیل آب برگ و تبادل گازی در گیاهان تحت تنش شوری شد. قربانی و همکاران (۱۳۹۶) گزارش کردند در گیاه گوجه فرنگی تحت تنش شوری، جذب آب توسط ریشه های قارچ اندوفیت *P. indica* باعث افزایش محتوای آب برگ می شود. همچنین، وجود قارچ های همزیست در ریشه گیاهان با تغییر در میزان ترکیبات اسمولیت مانند پرولین و هیدروکربن ها می تواند سبب بهبود جذب آب در شرایط تنش شود.



شکل ۴-۳۷- اثر ساده پلی‌امین اسپرمیدین (الف) و برهمکنش شوری و همزیستی قارچی (ب) بر محتوای نسبی آب برگ در گیاه استویا. در هر شکل میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند.

۴-۲-۳- صفات بیوشیمیایی

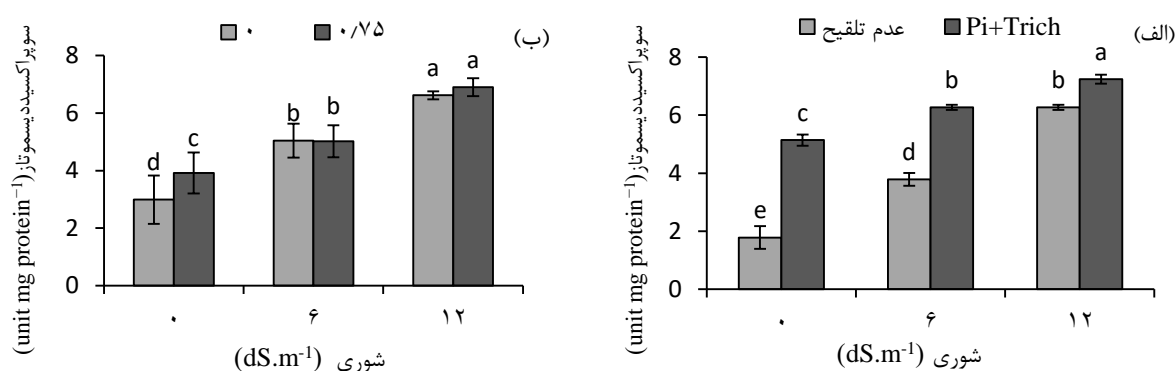
۴-۲-۳-۱- فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های به‌دست آمده از اندازه‌گیری صفات بیوشیمیایی در آزمایش مزرعه‌ای نشان داد، اثر ساده شوری و همزیستی قارچی و پلی‌امین اسپرمیدین بر فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. برهمکنش شوری و همزیستی قارچی بر تمام آنزیم‌های مورد بررسی در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. همچنین، بین سطوح مختلف شوری و محلول‌پاشی اسپرمیدین در فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال پنج درصد مشاهده شد. اثر متقابل همزیستی قارچی و پلی‌امین اسپرمیدین تنها بر آنزیم کاتالاز در سطح احتمال یک درصد و برهمکنش شوری، قارچ و اسپرمیدین نیز بر کاتالاز در سطح احتمال پنج تفاوت معنی‌داری نشان داد (جدول پیوست ۱۲).

۴-۲-۳-۱-۱- آنزیم سوپراکسید دیسموتاز

فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز با افزایش شوری آب آبیاری روند افزایشی داشت، همچنین در تمام سطوح شوری تلقیح با قارچ‌های اندوفیت (Pi+Trich) افزایش فعالیت این آنزیم را به دنبال داشت. به‌طوری که در سطح شوری ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز با ۱۶ درصد افزایش نسبت

به شرایط عدم تلقیح در همان سطح شوری، به بیشترین میزان خود رسید (شکل ۴-۳۸ الف). اثر محلول پاشی پلی آمین اسپرمیدین با غلظت ۰/۷۵ میلی مولار تنها در سطح شوری صفر معنی دار بوده و منجر به افزایش ۳۲ درصدی فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز نسبت به سطح صفر اسپرمیدین گردید (شکل ۴-۳۸ ب). در پژوهش حاضر قارچ‌های اندوفیت توانستند با افزایش سیستم دفاعی گیاه از طریق افزایش در فعالیت آنزیمی، آثار سوء اکسیداسیون سلولی را تعدیل نموده و بدین ترتیب خسارت ناشی از آسیب تنش اکسیداتیو را کاهش دهند. تلقیح گیاه کلم چینی با قارچ اندوفیت *P. indica* در شرایط تنش خشکی باعث افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز جهت کاهش گونه‌های فعال اکسیژن و کاهش یا تأخیر اثرات خشکی در گیاه گردید (سان و همکاران، ۲۰۱۰). افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در کاربرد قارچ *P. indica* توسط وارما و همکاران (۲۰۱۲) در شرایط تنش شوری و پراساد و همکاران (۲۰۱۳) و یعقوبیان و همکاران (۲۰۱۴) در تنش خشکی نیز گزارش شده است.



شکل ۴-۳۸- برهمکنش شوری و همزیستی قارچی (الف)، شوری و اسپرمیدین (ب) بر فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز. در هر شکل میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند.

۴-۲-۳-۱-۲- کاتالاز

اثر متقابل سه‌گانه شوری، تلقیح قارچی و کاربرد اسپرمیدین بر فعالیت آنزیم کاتالاز معنی‌دار بود (جدول پیوست ۱۲). تیمار تلقیح قارچی و کاربرد اسپرمیدین در تمام سطوح تنش شوری موجب افزایش قابل توجه فعالیت آنزیم کاتالاز گردید. بر این اساس، بالاترین فعالیت آنزیم در شرایط تلقیح قارچ و محلول پاشی

اسپرمیدین ۰/۷۵ میلی مولار در سطح شوری ۶ دسی‌زیمنس بر متر با بیش از دو برابر افزایش نسبت به عدم تلقیح مشاهده شد (جدول ۴-۱۳). آنزیم کاتالاز نقش مهمی در جاروبگری پراکسید هیدروژن تولید شده به وسیله‌ی فرآیندهایی مانند بتا-اکسیداسیون اسیدهای چرب دارد. بنابراین، قارچ‌های اندوفیت و پلی‌آمین اسپرمیدین از طریق افزایش در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نظیر کاتالاز و جمع‌آوری مؤثرتر گونه‌های فعال اکسیژن صدمات ناشی از تنش شوری را تعدیل می‌نمایند (فاروق و همکاران، ۲۰۰۹؛ انجم و همکاران، ۲۰۱۰).

جدول ۴-۱۳- مقایسه میانگین برهمکنش تنش شوری، همزیستی قارچی و محلول پاشی پلی‌آمین اسپرمیدین بر فعالیت آنزیم کاتالاز ($\text{unit mg protein}^{-1}$) برگ گیاه استویا

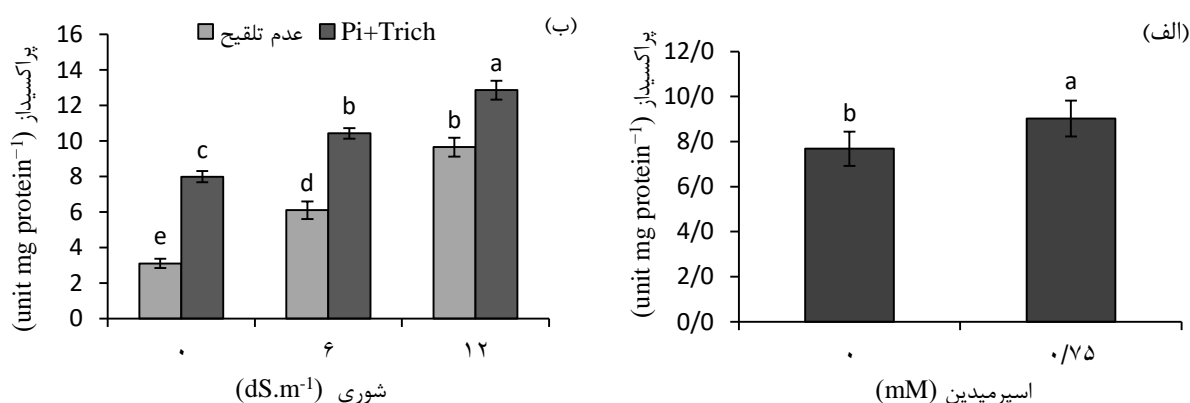
شوری (dS.m^{-1})	اسپرمیدین (mM)	قارچ اندوفیت	عدم تلقیح
		Pi+Trich	
	۰	۱/۳۴۰ efg	۰/۷۰۳ i
	۰/۷۵	۱/۹۲۰ cd	۰/۸۲۶ hi
۶	۰	۱/۵۶۳ def	۱/۰۷۳ gh
	۰/۷۵	۲/۷۱۶ a	۱/۲۳۶ fg
	۰	۱/۶۰۰ de	۱/۲۶۶ efg
۱۲	۰/۷۵	۲/۳۵۰ b	۲/۲۰۰ bc

میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند.

۴-۲-۳-۱-۳- فعالیت آنزیم پراکسیداز

کاربرد پلی‌آمین اسپرمیدین فعالیت آنزیم پراکسیداز را در برگ گیاه استویا نسبت به شاهد (سطح صفر پلی‌آمین اسپرمیدین) به‌طور معنی‌داری (حدود ۱۷ درصد) افزایش داد (شکل ۴-۳۹ الف). در گزارشات متعددی به نقش پلی‌آمین‌ها در کاهش صدمات اکسیداتیو ناشی از تنش‌های محیطی اشاره شده است. برای مثال، در بررسی اثر پلی‌آمین اسپرمیدین در گیاه خیار (فرزانه و همکاران، ۱۳۹۶) گزارش شده است که کاربرد اسپرمیدین سبب افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نظیر پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز می‌شود. یو و همکاران (۲۰۰۹) نیز گزارش کردند که پلی‌آمین پوترسین برون‌زاد تخریب اکسیداتیو القاء شده در گیاه پیازچه را از طریق افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاه کاهش می‌دهد. از سوی دیگر، نتایج

برهمکنش شوری و همزیستی قارچی نشان داد، با افزایش تنش شوری میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در برگ گیاه استویا افزایش یافت. همچنین تلقیح با قارچ‌های اندوفیت در تمام سطوح شوری سبب افزایش فعالیت آنزیم مورد نظر گردید، به طوری که در سطح شوری ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر افزایش حدود ۳۰ درصدی را به دنبال داشت (شکل ۴-۳۹ ب). آنزیم پراکسیداز بخشی از ساز و کار دفاعی سلول‌های گیاهی است که قادر است پراکسید هیدروژن را با استفاده از ترکیبات فنلی مانند گایاکول (به عنوان دهنده الکترون) کاتالیز کرده (کانزوک و همکاران، ۲۰۰۱) و بدین صورت سبب افزایش مقاومت گیاه در مقابل تنش‌های محیطی گردد.

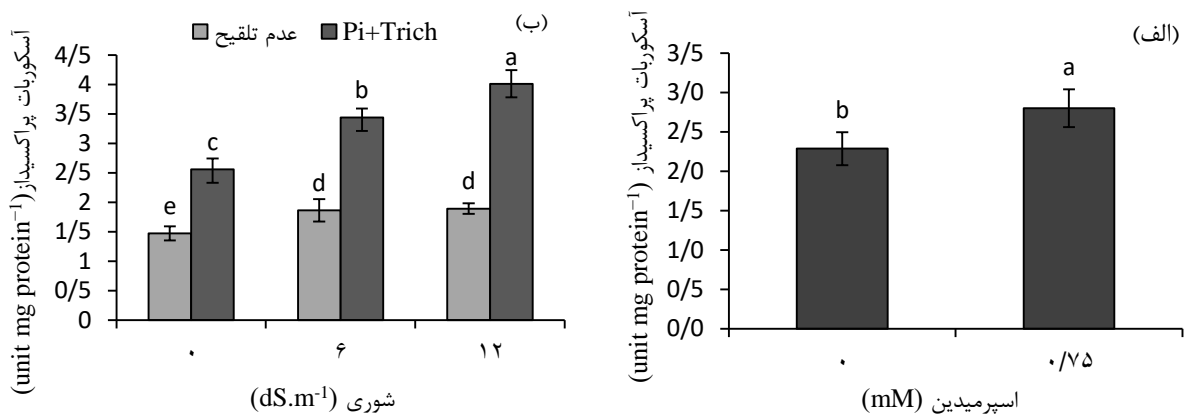


شکل ۴-۳۹- اثر ساده پلی‌آمین اسپرمیدین (الف) و برهمکنش شوری و همزیستی قارچی (ب) بر فعالیت آنزیم پراکسیداز در برگ گیاه استویا.

۴-۲-۳-۱-۴- فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز

نتایج پژوهش حاضر نشان داد، کاربرد پلی‌آمین اسپرمیدین فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز را نسبت به سطح صفر اسپرمیدین به طور معنی‌داری افزایش داد (شکل ۴-۴۰ الف). از سوی دیگر، با افزایش تنش شوری میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در برگ گیاه استویا افزایش یافت. همچنین تلقیح با قارچ‌های اندوفیت در تمام سطوح شوری افزایش در فعالیت آنزیم مورد نظر را به دنبال داشت به طوری که در سطح شوری ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر این افزایش حدود دو برابر نسبت به تیمار عدم تلقیح بود (شکل ۴-۴۰ ب). نتیجه افزایش در فعالیت آسکوربات پراکسیداز حذف پراکسید هیدروژن سیتوسولی و کلروپلاستی و به دنبال آن افزایش مقاومت گیاه به تنش اکسیداتیو است (سان و همکاران، ۲۰۱۰). افزایش فعالیت آنزیم

آسکوربات پراکسیداز در زمان کاربرد قارچ میکوریز در چمن مورد (اشراف و همکاران، ۱۳۹۶) و ذرت (ژو و همکاران، ۲۰۰۱) گزارش شده است. از سوی دیگر، پژوهشگران بیان داشتند قارچ‌های اندوفیت تجمع آسکوربات را در ریشه گیاه میزبان القاء نموده و اسید آسکوربیک به‌عنوان ماده اولیه در چرخه آسکوربات گلوکاتیون برای سم‌زدایی پراکسید هیدروژن عمل کرده و همچنین به‌صورت مستقیم رادیکال‌های آزاد اکسیژن را خنثی می‌کند. میزان بالای پراکسید هیدروژن موجب آسیب به مولکول‌های زیستی و غشا سلولی و در نهایت پراکسیداسیون لیپیدها می‌شود، بنابراین باید به بهترین نحو از سلول جمع‌آوری گردد (یعقوبیان و همکاران، ۲۰۱۴).



شکل ۴-۴- اثر ساده پلی‌آمین اسپرمیدین (الف) و برهمکنش شوری و همزیستی قارچی (ب) بر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز. در هر شکل میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند.

در مجموع، یافته‌های پژوهش حاضر در بخش گلخانه و مزرعه نشان داد با افزایش تنش شوری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نظیر سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز افزایش می‌یابد. همچنین، تلقیح با قارچ‌های اندوفیت و نیز محلول‌پاشی پلی‌آمین اسپرمیدین منجر به افزایش بیشتر فعالیت آنزیمی گردید. از تغییرات فیزیولوژیکی و متابولیکی که در پاسخ به شوری ممکن است رخ دهد، تولید گونه‌های اکسیژن فعال (ROS)، مانند رادیکال‌های سوپراکسید (O_2^-)، اکسیژن منفرد (O_1^-) و هیدروکسیل (OH^-) و همراه با آن‌ها پراکسید هیدروژن (H_2O_2) می‌باشد. گونه‌های اکسیژن فعال بر تعدادی از ترکیبات سلولی اثر گذاشته و باعث صدمه به غشاء و ساختارهای سلولی شده و مانع از رشد منظم گیاه

می‌شود (جاس پرس و کانگ‌سا، ۲۰۱۰). آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی رادیکال‌های آزاد را به متابولیت‌های بی‌ضرر تبدیل می‌کنند. در این بین کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و سوپراکسیداز دیسموتاز کارآمدترین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان هستند. افزایش فعالیت این آنزیم‌ها باعث افزایش مقاومت به تنش‌ها از جمله تنش شوری می‌شود (قربانلی و همکاران، ۱۳۹۱). در همین زمینه فرهودی (۱۳۹۲) همبستگی مثبت و معنی‌داری میان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان پراکسیداز و کاتالاز با تحمل به شوری در ارقام کلزا مشاهده نمود. کاتالاز یکی از انواع پراکسیدازهاست که در کلروپلاست وجود دارد و H_2O_2 را به آب و مولکول O_2 می‌شکند (کاکو و همکاران، ۲۰۰۰)، در حالی‌که پراکسیدازها H_2O_2 را با اکسید نمودن یک سوبسترای همراه نظیر ترکیبات فنلی و یا سایر آنتی‌اکسیدان‌ها نظیر آسکوربات تجزیه می‌کنند (لی و همکاران، ۲۰۰۷).

از سوی دیگر، قارچ‌های اندوفیت با افزایش سطح جذب در ریشه گیاه میزبان از طریق هیف‌های قارچی و نیز تأثیر بر بیان ژن‌ها و القای مقاومت در گیاهان تحت تنش و نیز با ایجاد تغییرات سیستمیکی وابسته به فعالیت مکانیسم‌های آنتی‌اکسیدانی سبب افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی شده که به دنبال آن منجر به افزایش در سازگاری گیاه میزبان به تنش‌های محیطی می‌شوند (وارما و همکاران، ۲۰۱۲). بنابراین می‌توان چنین نتیجه گرفت که قارچ‌های اندوفیت با بهبود شرایط محیطی و داخلی برای گیاه می‌تواند به‌عنوان عامل محافظتی زیستی برای بالا بردن فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی به‌کار رود.

پلی‌آمین‌ها نیز با تنظیم اسمزی، افزایش پایداری غشا و حذف رادیکال‌های فعال اکسیژن و جلوگیری از تجمع این ترکیبات مضر از طریق افزایش در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی باعث تعدیل اثرات تنش در گیاه می‌شوند (لئو و همکاران، ۲۰۰۷).

۴-۲-۳-۲- سایر صفات بیوشیمیایی

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های به‌دست آمده از اندازه‌گیری صفات بیوشیمیایی در آزمایش مزرعه‌ای نشان داد، اثر ساده شوری و همزیستی قارچی بر محتوای مالون‌دی‌آلدهید، پراکسید هیدروژن، پرولین و قند محلول در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. اثر ساده پلی‌آمین اسپرمیدین در تمام صفات مذکور به‌جز

مالون دی آلدھید در سطح احتمال یک درصد تفاوت معنی داری نشان داد. برهمکنش شوری و همزیستی قارچی بر محتوای مالون دی آلدھید و پرولین در سطح احتمال پنج درصد و بر محتوای پراکسید هیدروژن در سطح احتمال یک درصد معنی دار بود. همچنین، بین سطوح مختلف شوری و محلول پاشی اسپرمیدین در محتوای مالون دی آلدھید تفاوت معنی داری در سطح احتمال پنج درصد مشاهده شد. اثر متقابل همزیستی قارچی و پلی آمین اسپرمیدین تنها بر قند محلول در سطح احتمال پنج درصد و برهمکنش شوری، قارچ و اسپرمیدین نیز تنها بر مالون دی آلدھید به ترتیب در سطح احتمال یک درصد تفاوت معنی داری نشان داد (جدول پیوست ۱۳).

۴-۲-۳-۱- پراکسیداسیون لیپیدی غشا

یافته‌های آزمایش مزرعه‌ای نشان داد، اثر متقابل سه‌گانه تنش شوری، همزیستی قارچی و محلول پاشی اسپرمیدین بر محتوای مالون دی آلدھید معنی دار بود (جدول پیوست ۱۳). هرچند افزایش تنش شوری افزایش محتوای مالون دی آلدھید را به دنبال داشت، ولی در تمام سطوح شوری، تلقیح با قارچ‌های اندوفیت Pi+Trich و کاربرد اسپرمیدین موجب کاهش در محتوای مالون دی آلدھید نسبت به شرایط عدم تلقیح و اسپرمیدین صفر گردید. این کاهش در سطح شوری صفر، شش و ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر به ترتیب ۱۱، ۱۶ و ۲۴ درصد بود (جدول ۴-۱۴). پراکسیداسیون لیپیدی و تولید محصولی مانند مالون دی آلدھید نتیجه حمله رادیکال‌های فعال اکسیژن به اسیدهای چرب غبراشباع بوده که شاخصی زیستی برای سنجش میزان تأثیر تنش اکسیداتیو در گیاهان است (اشراف و همکاران، ۱۳۹۶). ژو و همکاران (۲۰۰۱) میزان مالون دی آلدھید موجود در برگ‌های ذرت همزیست با میکوریز در شرایط تنش خشکی را ۱۷ درصد کمتر از ذرت‌های غیرهمزیست بیان کردند. همچنین، میزان مالون دی آلدھید در برگ گیاه زوفا با افزایش تنش آبی در کلیه تیمارهای بدون میکوریز نسبت به زوفای همزیست شده با میکوریز افزایش بیشتری نشان داد (سلیمانی و پیرزاد، ۱۳۸۷).

از سوی دیگر، کاربرد پلی‌آمین اسپرمیدین توانست اثرات نامطلوب ناشی از تنش شوری را بر لیپیدهای غشایی به‌طور قابل ملاحظه‌ای بهبود بخشد (جدول ۴-۱۴). نقش پلی‌آمین‌ها در حفاظت گیاهان در مقابل پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء به‌عنوان یک مکانیسم دفاعی سلولی در ممانعت از آسیب اکسیداتیو است (لئو و همکاران، ۲۰۰۷). این گروه از ترکیبات با تأثیر بر فعالیت‌های آنزیم‌های پالایند رادیکال‌های آزاد اکسیژن موجب کاهش در محتوای رادیکال‌های سوپراکسید و پراکسید هیدروژن شده و از فعالیت لیپوکسیژناز و تجزیه اسیدهای چرب غشاء جلوگیری می‌کند (بارتلس و سارنکر، ۲۰۰۵). تأثیر مثبت پلی‌آمین‌ها بر کاهش پراکسیداسیون لیپیدها تحت تنش شوری در بوته‌های برنج (دمیرال و ترکان، ۲۰۰۵) و در گیاه عدس (کوکا و همکاران، ۲۰۰۷) گزارش شده است.

جدول ۴-۱۴- مقایسه میانگین برهمکنش تنش شوری، همزیستی قارچی و محلول پاشی پلی‌آمین اسپرمیدین بر محتوای مالون دی‌آلدهید (nmol. g FW^{-1})

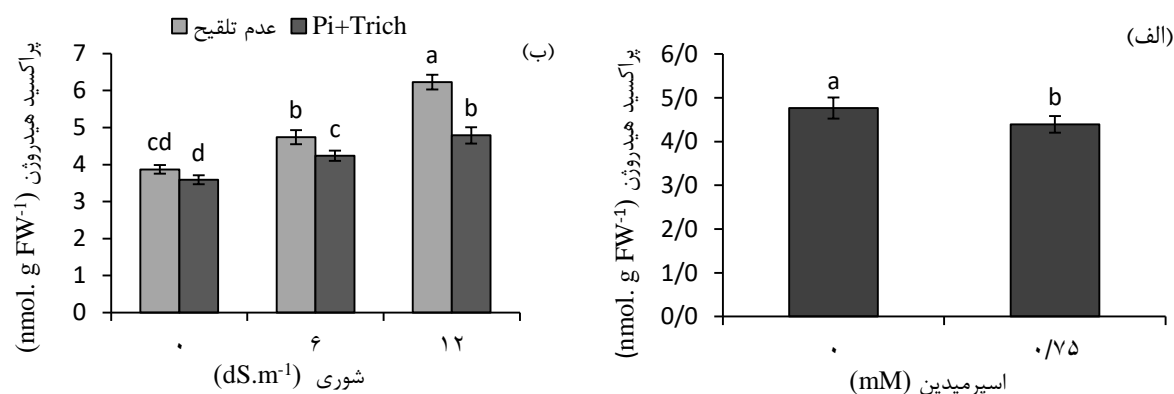
شوری (dS.m^{-1})	اسپرمیدین (mM)	قارچ اندوفیت
		عدم تلقیح
	۰	Pi+Trich
۰	۰/۷۵	۴/۳۲۲ fg
۰	۰/۷۵	۴/۱۸۲ fg
۶	۰	۳/۷۱۰ g
۶	۰/۷۵	۴/۶۷۱ ef
۱۲	۰	۴/۵۷۴ f
۱۲	۰/۷۵	۶/۲۷۳ bc
	۰	۵/۲۵۸ de
	۰/۷۵	۵/۹۱۴ cd
	۰	۶/۳۹۶ bc
	۰/۷۵	۷/۸۱۸ a
	۰/۷۵	۶/۷۸۷ b
		۵/۹۴۶ c

میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند.

۴-۲-۳-۲-۴- پراکسید هیدروژن

بر اساس یافته‌ها، محلول پاشی اسپرمیدین در برگ گیاه استویا توانست محتوای پراکسید هیدروژن را نسبت به سطح صفر آن حدود هشت درصد کاهش دهد (شکل ۴-۴۱ الف). نتایج برهمکنش شوری و همزیستی قارچی نشان داد شوری آب آبیاری محتوای پراکسید هیدروژن را افزایش داد در حالی که در هر سه سطح شوری تلقیح با قارچ‌های اندوفیت مقدار آن را نسبت به عدم تلقیح به ترتیب ۷، ۱۱ و ۲۳ درصد کاهش داد که این کاهش در سطح شش و ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر معنی‌دار بود (شکل ۴-۴۱ ب). همزیستی با

قارچ‌های اندوفیت سیستم آنتی‌اکسیدانی گیاه را فعال نموده و این آنزیم‌ها در پاسخ‌های دفاعی علیه گونه‌های فعال اکسیژن تولید شده می‌توانند با حذف رادیکال‌های آزاد سبب افزایش مقاومت گیاه به تنش‌های زیستی و غیرزیستی شوند (وارما و همکاران، ۲۰۱۲).



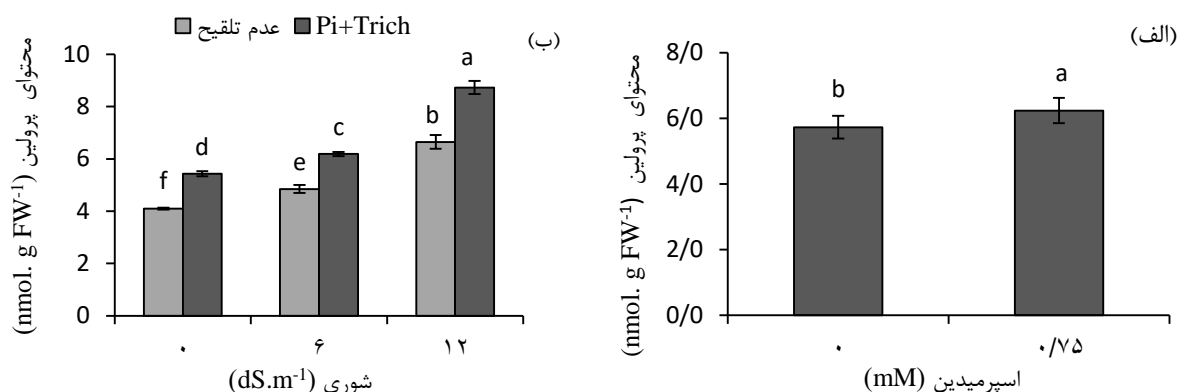
شکل ۴-۴۱- اثر ساده پلی‌آمین اسپرمیدین (الف) و برهمکنش شوری و همزیستی قارچی (ب) بر محتوای پراکسید هیدروژن. در هر شکل میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند.

۴-۲-۳-۲-۳- پرولین

بر اساس یافته‌های پژوهش حاضر، کاربرد اسپرمیدین محتوای پرولین را نسبت به تیمار شاهد به‌طور معنی‌داری (حدود ۹ درصد) افزایش داد (شکل ۴-۴۲ الف). محققان افزایش در محتوای پرولین با کاربرد پلی‌آمین‌ها نظیر اسپرمین و اسپرمیدین را در بادمجان (یان-پینگ و همکاران، ۲۰۱۱)، برنج (فاروق و همکاران، ۲۰۰۹) و بادام (امرایی‌تبار و همکاران، ۲۰۱۶) گزارش کردند.

با افزایش سطوح شوری محتوای پرولین برگ روند افزایشی داشت، به‌طوری‌که در شوری ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر به بالاترین میزان خود رسید. از سوی دیگر، همزیستی با قارچ‌های اندوفیت در سطوح صفر، شش و ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر افزایش محتوای پرولین برگ را به دنبال داشت (شکل ۴-۴۲ ب). تجمع پرولین یکی از روش‌های بارز گیاهان در پاسخ به تنش اسمزی و یا سایر تنش‌ها توسط گیاهان عالی است (سپهری و همکاران، ۱۳۸۸). در شرایط تنش شوری گیاه با کمک اسمولیت‌هایی مانند پرولین پتانسیل اسمزی خود را نسبت به پتانسیل اسمزی محیط ریشه افزایش می‌دهد تا از این طریق آب و املاح مورد نیاز را جذب

نماید (جلیلی مرندی، ۱۳۸۹). قارچ‌های همزیست نیز می‌توانند در شرایط تنش موجب بهبود تنظیم فشار اسمزی شوند. نتایج مشابهی نشان داد که همزیستی قارچ *P. indica* در شرایط شور توانست منجر به افزایش در محتوای پرولین گردد (زارا و همکاران، ۲۰۱۲؛ حاجی نیا و همکاران، ۲۰۱۱).

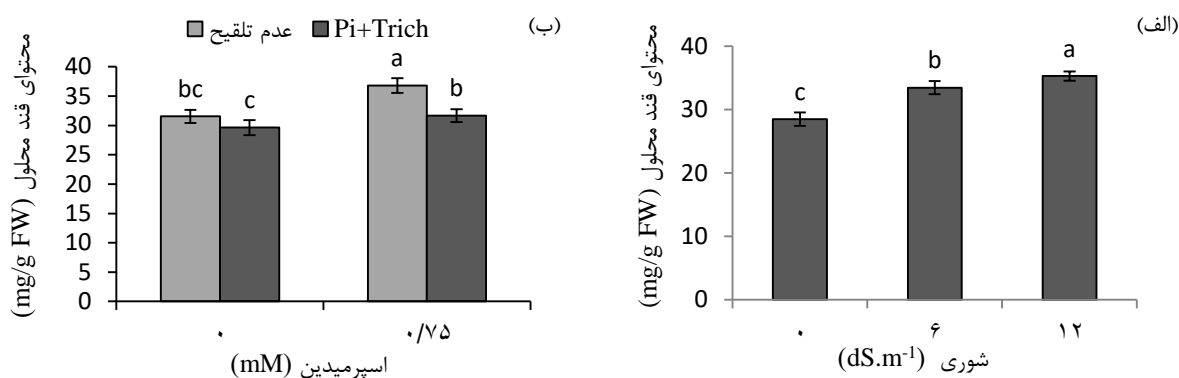


شکل ۴-۴-۲ اثر ساده پلی آمین اسپرمیدین (الف) و برهمکنش شوری و همزیستی قارچی (ب) بر محتوای پرولین در برگ گیاه استویا. در هر شکل میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند.

۴-۲-۳-۲-۴ قند محلول

مقایسه میانگین اثر ساده شوری بر محتوای قند محلول (شکل ۴-۴-۳ الف) نشان داد با افزایش سطح شوری از صفر به ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر میزان قند محلول ۲۴ درصد افزایش یافت. محلول‌پاشی پلی‌آمین اسپرمیدین در برهمکنش با قارچ افزایش قندهای محلول را در مقایسه با سطح صفر اسپرمیدین به دنبال داشت. از سوی دیگر به‌کارگیری قارچ‌های اندوفیت منجر به کاهش محتوای قند در هر دو سطح اسپرمیدین گردید (شکل ۴-۴-۳ ب). قندهای محلول به‌عنوان شاخص فیزیولوژیک مهم در تنظیم اسمزی برای حفظ تورژسانس سلول‌ها و پایدار نمودن غشای سلولی نقش عمده‌ای بر عهده دارند (پاتاکس، ۲۰۰۰). شرایط تنش‌زای محیطی بر متابولیسم قندها و پخش مواد فتوسنتزی در گیاهان در حال رشد اثر می‌گذارد، به‌طوری که در شرایط تنش، گیاه تجمع مواد محلول را در سلول‌ها به‌منظور دسترسی بیشتر به آب افزایش می‌دهد (یوردانو و همکاران، ۲۰۰۳). بدین ترتیب، افزایش قندهای محلول در واکنش به تنش احتمالاً مربوط به انتقال کمتر از برگ‌ها، مصرف آهسته‌تر مواد فتوسنتزی تحت تأثیر کاهش رشد و همچنین تغییراتی نظیر هیدرولیز می‌باشد (پاتاکس، ۲۰۰۰). از سوی دیگر، قارچ‌های اندوفیت با افزایش میزان جذب

آب و عناصر غذایی از طریق ریشه‌های خود باعث بهبود روابط آبی گیاه و پایداری غشاء سلول و تیلاکوئیدها شده و به حفاظت از کلروفیل کمک می‌کند و نیز موجب افزایش عملکرد فتوسنتزی، افزایش سرعت رشد و تخصیص مواد فتوسنتزی بین ساقه و ریشه شده و از افزایش بیشتر قند در برگ‌ها جلوگیری می‌کند (خالوندی و همکاران، ۱۳۹۶).



شکل ۴-۴- اثر ساده تنش شوری (الف) و برهمکنش همزیستی قارچی و اسپرمیدین (ب) بر محتوای قند محلول در برگ استویا. در هر شکل میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند.

۴-۲-۴- گلیکوزیده‌های استویوزید و ربادیوزید A

نتایج حاصل از تجزیه واریانس گلیکوزیده‌های استویوزید و ربادیوزید A در برگ استویا نشان داد اثر ساده شوری، همزیستی قارچی و محلول‌پاشی اسپرمیدین بر هر دو گلیکوزید مورد مطالعه در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. همچنین برهمکنش شوری و قارچ تنها بر استویوزید در سطح احتمال یک درصد تفاوت معنی‌داری نشان داد. برهمکنش شوری و محلول‌پاشی اسپرمیدین و همچنین برهمکنش قارچ و اسپرمیدین در هیچ یک از گلیکوزیده‌ها معنی‌داری نبود. برهمکنش سه‌گانه شوری، قارچ و اسپرمیدین بر استویوزید و ربادیوزید A در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود (جدول پیوست ۱۴).

در بررسی گلیکوزیده‌های موجود در برگ استویاهای حاصل از آزمایش مزرعه‌ای مشخص گردید، اثر متقابل سه‌گانه تنش شوری، همزیستی قارچی و محلول‌پاشی اسپرمیدین بر غلظت استویوزید و ربادیوزید A معنی‌دار بود (جدول پیوست ۱۴). یافته‌ها نشان داد، غلظت ترکیبات استویول گلیکوزید در برگ تحت تأثیر تنش شوری قرار گرفت، به طوری که بالاترین غلظت این ترکیبات در سطح شوری شش دسی‌زیمنس بر متر

مشاهده شد (جدول ۴-۱۵). گیاه استویا به دلیل داشتن استویوزید و ربادیوزید A به عنوان شیرین کننده ها از اهمیت بالایی برخوردار است. هنگامی که گیاهان در شرایط تنش شوری قرار می گیرند، ابتدا انرژی به فرآیند حفظ هموستاز متابولیکی مانند سنتز اسمولیت های ساده و تقویت فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی اختصاص داده می شود (ابرو و همکاران، ۲۰۱۲) و در ادامه سنتز متابولیت های ثانویه را در پی خواهد داشت (راماک ریشا و راویشامکار، ۲۰۱۱). به نظر می رسد افزایش در غلظت استویول های گلیکوزیدی در شرایط تنش یکی از مکانیسم های تحمل در گیاه باشد. یافته های پژوهش حاضر با نتایج پندی و چیگارا (۲۰۱۵) در بررسی گلیکوزیدهای استویول در برگ استویا در غلظت های مختلف NaCl مطابقت داشت. دلیل افزایش استویوزید و ربادیوزید A موجود در برگ با افزایش شوری را می توان به افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی گیاهان تحت تنش در مقایسه با شرایط نرمال دانست (پندی و چیگارا، ۲۰۱۵). برخی محققان از تأثیر مثبت استویول های گلیکوزید مانند استویوزید و ربادیوزید A به عنوان پروتئین های اسموتی در افزایش رشد گیاهان تحت تنش نام برده و بیان داشتند استویول های گلیکوزیدی منجر به تنظیم اسمزی در برگ استویاهای تحت تنش شوری می گردد (کانتابلا و همکاران، ۲۰۱۷). گوپتا و همکاران (۲۰۱۴) گزارش کردند که تنش های غیرزیستی از جمله شوری می تواند به طور قابل توجهی غلظت استویوزید و ربادیوزید A را افزایش دهد. محققان بیان داشتند گرچه گلیکوزیدهای استویول در برگ ها سنتز و تجمع می یابند اما در ریشه یک پیش ماده تولید می شود که سبب تحریک تولید گلیکوزیدهای استویول می گردد (سانسون و همکاران، ۱۹۹۱).

در تمام سطوح شوری، تلقیح با قارچ اندوفیت Pi+Trich و کاربرد اسپرمیدین موجب افزایش غلظت گلیکوزید استویوزید و ربادیوزید A در برگ گیاه استویا نسبت به شرایط عدم تلقیح و اسپرمیدین صفر گردید. بالاترین غلظت استویوزید و ربادیوزید (به ترتیب ۹/۶۵ و ۳/۰۴ درصد) در سطح شوری شش دسی زیمنس و تیمار همزیستی قارچی همراه با محلول پاشی ۰/۷۵ میلی مولار اسپرمیدین به دست آمد (جدول ۴-۱۵). کیلام و همکاران (۲۰۱۷) در تلقیح ریشه گیاه استویا با قارچ های اندوفیت *P. indica* بیان کردند، همزیستی قارچی سبب افزایش در گلیکوزیدهای استویول در برگ استویا در شرایط گلخانه گردید.

همچنین همزیستی با قارچ *P. indica* در گیاهان دارویی سبب افزایش در متابولیت‌های ثانویه این گیاهان شد. محققان در بررسی همزیستی گیاه استویا با قارچ‌های *P. indica* و میکوریز دریافتند، قارچ‌های همزیست با رونویسی از ژن‌های کلیدی در بیوسنتز استویول‌های گلیکوزید در ریشه گیاه استویا منجر به افزایش در غلظت این ترکیبات ثانویه در برگ گیاه می‌شوند (ماندال و همکاران، ۲۰۱۳: کیلام و همکاران، ۲۰۱۷). از سوی دیگر محلول‌پاشی پلی‌آمین اسپرمیدین افزایش در گلیکوزیدهای استویول را به دنبال داشت. مرادی و همکاران (۲۰۱۸) گزارش کردند، محلول‌پاشی پلی‌آمین در گیاه استویا تحت تنش سرما، غلظت استویوزید و ربادیوزید را افزایش داد. همچنین اسپرمیدین و پوترسین باعث افزایش کربوهیدرات در کدو سبز تحت تنش شوری شد (پالما و همکاران، ۲۰۱۶: صوفی و فودا، ۲۰۱۳). این افزایش در واقع تلاشی است از طرف گیاه برای مقابله با تنش. افزایش قند محلول و همچنین افزایش استویول گلیکوزید می‌تواند مکانیسمی برای بالا بردن فشار اسمزی گیاه در شرایط تنش باشد.

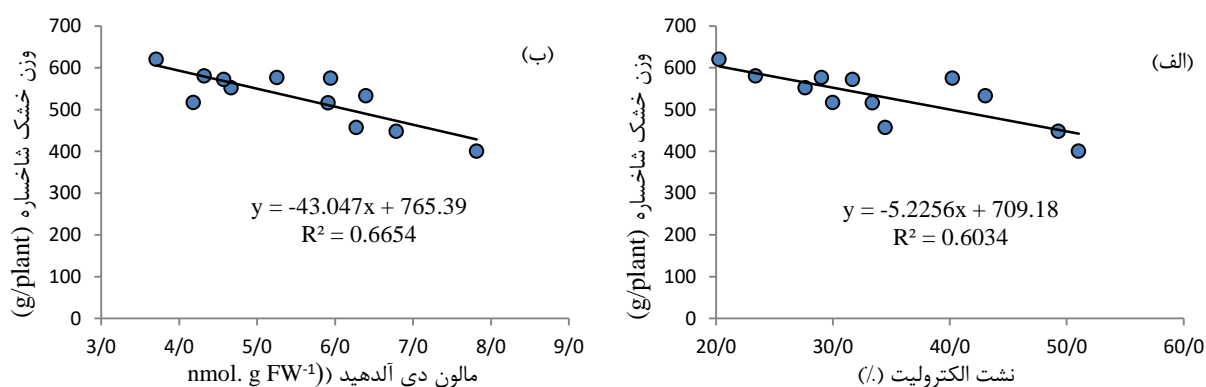
جدول ۴-۱۵- مقایسه میانگین برهمکنش تنش شوری، همزیستی قارچی و محلول‌پاشی پلی‌آمین اسپرمیدین بر غلظت استویوزید و ربادیوزید (درصد) در برگ گیاه استویا

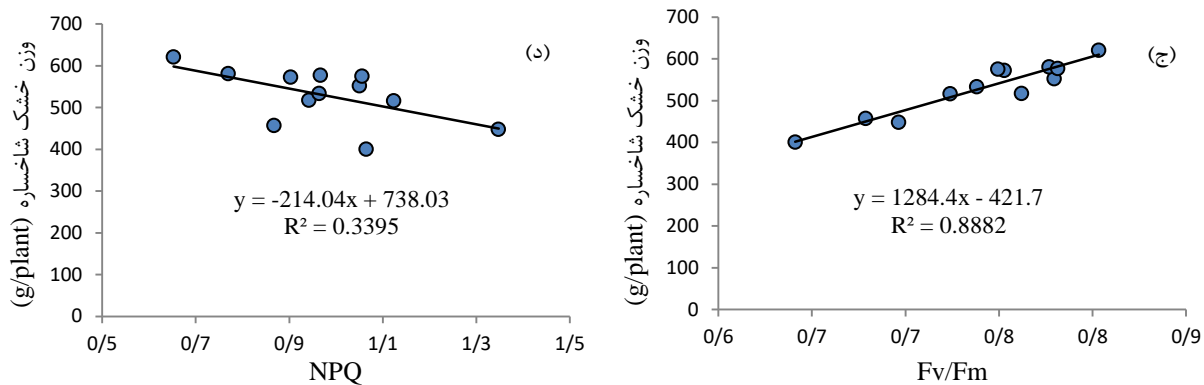
قارچ اندوفیت		اسپرمیدین (mM)	شوری (dS.m ⁻¹)
Pi+Trich	عدم تلقیح		
استویوزید (%)			
۸/۱۴ b	۶/۴۷ de	۰	۰
۹/۲۴ a	۷/۲۲ cd	۰/۷۵	
۹/۵۶ a	۷/۲۱ d	۰	۶
۹/۶۵ a	۸/۷۷ ab	۰/۷۵	
۸/۱۰ bc	۵/۵۳ f	۰	۱۲
۹/۳۸ a	۶/۰۸ ef	۰/۷۵	
ربادیوزید A (%)			
۲/۶۰ cd	۲/۱۵ g	۰	۰
۲/۸۹ ab	۲/۲۳ fg	۰/۷۵	
۲/۹۳ ab	۲/۳۶ ef	۰	۶
۳/۰۴ a	۲/۸۰ b	۰/۷۵	
۲/۴۶ de	۱/۷۶ h	۰	۱۲
۲/۷۵ bc	۲/۲۲ fg	۰/۷۵	

میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشابه تفاوت معنی‌داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد ندارند.

۴-۲-۵- رابطه بین وزن خشک شاخساره با نشت الکتروولت، مالون دی آلدئید، Fv/Fm و NPQ

نتایج در آزمایش مزرعه‌ای نشان داد، بین وزن خشک شاخساره با نشت الکتروولت در برگ گیاه استویا رابطه خطی و منفی ($R^2 = 0/60$) وجود دارد، به طوری که با افزایش نشت الکتروولت، وزن خشک شاخساره با شیب $5/22$ - گرم در متر مربع کاهش یافت (شکل ۴-۴ الف). از سوی دیگر، بین وزن خشک شاخساره و حداکثر کارایی کوانتومی فتوسیستم II (Fv/Fm) II رابطه مثبت برقرار بوده به طوری که با افزایش Fv/Fm وزن خشک شاخساره نیز روند افزایشی نشان داد (شکل ۴-۴ ج). این در حالی است که مابین وزن خشک شاخساره با محتوای مالون دی آلدئید و خاموشی غیرفتوشیمیایی در گیاه استویا رابطه خطی و منفی به ترتیب با شیب $43/0$ گرم در متر مربع (شکل ۴-۴ ب) و $214/0$ گرم در متر مربع (شکل ۴-۴ د) وجود داشت و با افزایش مالون دی آلدئید و NPQ، وزن خشک شاخساره کاهش نشان داد. Fv/Fm نشان دهنده ظرفیت پذیرش و انتقال الکترون و تثبیت کربن بوده و با افزایش در مقدار آن وزن خشک گیاه افزایش می‌یابد (پتريدیس و همکاران، ۲۰۱۲). افزایش وزن خشک گیاه با افزایش در پارامتر Fv/Fm توسط فهیمی و شمشیری (۱۳۹۵) در درخت پسته گزارش شده است.





شکل ۴-۴- رابطه بین وزن خشک شاخساره با نشت الکتروولت (الف)، محتوای مالون دی‌آلدهید (ب)، Fv/Fm (ج) و NPQ (د) در گیاه استویا.

۳-۴- نتیجه‌گیری کلی

در مجموع نتایج آزمایش گلخانه‌ای و مزرعه‌ای نشان داد شوری خصوصیات رشدی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه استویا را تحت تأثیر قرار می‌دهد. از سوی دیگر، کاربرد قارچ‌های اندوفیت به‌ویژه کاربرد هم‌زمان دو قارچ (Pi+Trich) چه در شرایط مطلوب رشدی و چه در سطوح مختلف شوری باعث بهبود پارامترهای مورفوفیزیولوژیکی و بیوشیمیایی و تعدیل اثر تخریبی شوری در گیاه شد. از طرفی، کاربرد غلظت‌های متفاوت پلی‌آمین اسپرمیدین به‌ویژه غلظت ۰/۷۵ میلی‌مولار آن با نقش آنتی‌اکسیدانی خود اثرات منفی ناشی از تنش شوری را بر مهمترین خصوصیات رشدی و فیزیولوژیکی گیاه کاهش داده و سبب مقاومت گیاه استویا در شرایط تنش شوری گردید. همچنین، هم‌افزایی بین قارچ اندوفیت و پلی‌آمین اسپرمیدین موجب بهبود بیشتر برخی از ویژگی‌های رشدی و فیزیولوژیک و همچنین افزایش غلظت ترکیبات گلیکوزیدی شامل استویوزید و ربادیوزید A در برگ گیاه استویا شد. در این پژوهش، تخفیف و بهبود اثرات منفی تنش شوری به‌دنبال تیمار زیستی و کاربرد اسپرمیدین در بیشتر صفات اندازه‌گیری شده مشهود بود. با این وجود، برای شناخت بهتر سازوکار چگونگی اثرات آن‌ها به پژوهش‌های بیشتری نیاز است.

۴-۴- پیشنهادات

آزمایشات تکمیلی از جمله بررسی‌های مولکولی مبنی بر مکانیسم اثر این قارچ‌ها و بیان ژن‌های مؤثر بر تولید ترکیبات گلیکوزیدی استویا انجام شود.

ساختار ریشه گیاه در تعامل با قارچ‌های اندوفیت و تنش شوری مورد بررسی قرار گیرد.

اعمال تنش آب شور در مراحل دیگری از رشد گیاه استویا مطالعه شود.

پویایی عناصر غذایی به‌ویژه سدیم، پتاسیم و فسفر در تعامل گیاه و قارچ در شرایط تنش شوری مورد بررسی قرار گیرد.

پیوست‌ها

جدول پیوست ۱- میانگین مربعات اثر شوری، همزیستی قارچی و اسپرمیدین بر درصد کلونیزاسیون ریشه گیاه استویا (آزمایش گلخانه‌ای)

منابع تغییر	درجه آزادی	کلونیزاسیون ریشه
شوری (A)	۲	۱۲۰۰/۳**
قارچ (B)	۲	۲۲۷۷/۲**
اسپرمیدین (C)	۲	۱۴۲/۷
A×B	۴	۲۲۳/۵**
A×C	۴	۴۸/۷۷
B×C	۴	۱۸/۰۹
A×B×C	۸	۱۲/۵۴
خطای آزمایشی	۵۴	۸۲/۳۱
ضریب تغییرات (درصد)		۱۱/۸

* و ** به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال پنج و یک درصد.

جدول پیوست ۲- میانگین مربعات اثر شوری، همزیستی قارچی و پلی‌آمین اسپرمیدین بر صفات رویشی گیاه دارویی استویا (آزمایش گلخانه‌ای)

منابع تغییر	درجه آزادی	ارتفاع بوته	سطح برگ	وزن تر برگ	وزن تر ساقه	وزن تر شاخساره	وزن خشک برگ	وزن خشک ساقه	وزن خشک شاخساره
شوری (A)	۲	۱۱۴۹/۶۸**	۲۳۷/۰۴**	۱۰۹/۴**	۷۷/۰۹**	۳۷۰/۰**	۰/۶۴۸**	۳/۸۱**	۷/۴۷**
قارچ (B)	۳	۱۰۴۱/۴۶**	۲۴۲/۲۲**	۱۷/۳۷**	۳۴/۳۷**	۱۰۰/۲**	۰/۸۹۴**	۳/۵۵۳**	۸/۵۹**
اسپرمیدین (C)	۲	۱۳۰/۱۱*	۱۱۰/۴**	۲/۴۷*	۷/۶۹**	۱۸/۸۵**	۰/۳۸۴**	۰/۳۴۴*	۰/۹۸۴**
A×B	۶	۳۱/۰۷	۶/۰۵	۲/۹۵**	۵/۹۹**	۱۵/۴۱**	۰/۰۴۶*	۰/۳۴۷**	۰/۷۴۸**
A×C	۴	۱۰۱/۲۶*	۱۸/۹۷	۱/۰۶	۱/۱۳۷	۲/۴۲	۰/۰۶۵*	۰/۰۳۰	۰/۰۴۸
B×C	۶	۵۴/۹۱	۱۱/۱۸	۰/۵۷۴	۰/۳۵۸	۱/۲۷	۰/۰۳۹	۰/۰۳۱	۰/۲۰۵
A×B×C	۱۲	۴۳/۵۵	۱۰/۲۱*	۰/۷۳۹	۰/۵۷۵	۱/۱۷	۰/۰۳۵	۰/۰۲۱	۰/۰۶۵
خطای آزمایشی	۷۲	۳۷/۲۹	۵/۲۳	۰/۵۳۸	۰/۸۳۵	۲/۵۶	۰/۰۲۰	۰/۰۸۰	۰/۱۷۹
ضریب تغییرات		۸/۲	۱۰/۴	۱۴/۶	۱۳/۰	۱۳/۲	۱۱/۱	۱۳/۱	۱۲/۳

* و ** به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال پنج و یک درصد.

جدول پیوست ۳- میانگین مربعات اثر شوری، قارچ اندوفیت و پلی آمین اسپرمیدین بر پارامترهای فلورسانس کلروفیل در گیاه استویا (آزمایش گلخانه‌ای)

منابع تغییر	درجه آزادی	Fo	Fm	Fv	Fv/Fm	Y(II)	Y(NPQ)	Y(NO)	NPQ
شوری (A)	۲	۰/۲۹**	۶/۲۹**	۹/۲۷**	۰/۰۳**	۰/۲۸**	۰/۱۱**	۰/۰۳**	۱/۰۷**
قارچ (B)	۳	۰/۰۷**	۳/۴۸**	۴/۳۸**	۰/۰۱**	۰/۱۲**	۰/۰۶**	۰/۰۰۹**	۱/۱۶**
اسپرمیدین (C)	۲	۰/۰۲	۱/۵۳**	۱/۹۴**	۰/۰۰۷**	۰/۰۰۱	۰/۰۰۰۵	۰/۰۰۰۲**	۰/۱۶
A×B	۶	۰/۰۰۹	۰/۹۱**	۰/۸۵**	۰/۰۰۲**	۰/۰۰۲**	۰/۰۱۵**	۰/۰۰۰۶**	۰/۳۶**
A×C	۴	۰/۰۰۱	۰/۱	۰/۰۹	۰/۰۰۰۲	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۰۱	۰/۰۹
B×C	۶	۰/۰۰۰۶	۰/۲۴*	۰/۲۴*	۰/۰۰۱*	۰/۰۰۰۹	۰/۰۰۱	۰/۰۰۰۲*	۰/۱۴
A×B×C	۱۲	۰/۰۰۱	۰/۱۳	۰/۱۴	۰/۰۰۰۴	۰/۰۰۰۵	۰/۰۰۰۲*	۰/۰۰۰۲*	۰/۰۱
خطای آزمایش	۷۲	۰/۰۰۹	۰/۰۷	۰/۰۸	۰/۰۰۰۳	۰/۰۰۰۲	۰/۰۰۱	۰/۰۰۰۱	۰/۰۷
ضریب تغییرات		۶/۲	۴/۶	۶/۴	۲/۷	۶/۳	۲۹/۳	۷/۴	۲۷/۱

* و ** به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال پنج و یک درصد.

جدول پیوست ۴- میانگین مربعات اثر تیمارهای مورد بررسی بر رنگی‌های فتوسنتزی در برگ گیاه استویا (آزمایش گلخانه‌ای)

منابع تغییر	درجه آزادی	کلروفیل برگ (SPAD)	کلروفیل <i>a</i>	کلروفیل <i>b</i>	کلروفیل <i>a+b</i>	کارتونوئید
شوری (A)	۲	۵۴۰/۲**	۴۰۸/۱**	۶/۷۵*	۴۶۵/۸**	۲۳/۳۴**
قارچ (B)	۳	۹۰/۰۵**	۵۹/۰۵**	۱۲۴/۲۸**	۱۶۷/۸۹**	۳/۳۳
اسپرمیدین (C)	۲	۸۲/۲۲**	۲۴/۰۸*	۵۸/۹۰**	۱۵۶/۰۶**	۶/۹۱*
A×B	۶	۳۶/۹۹*	۱۷/۱۴*	۱/۵۹	۱۸/۴۷	۳/۱۶
A×C	۴	۵۸/۲۹**	۲۹/۲۶**	۰/۴۵	۲۸/۲۱	۲/۶۰
B×C	۶	۴/۷۵	۲۱/۶۹*	۴/۰۲	۲۱/۶۲	۱/۱۹
A×B×C	۱۲	۱۳/۵۱	۱۲/۱۰	۴/۲۱*	۲۲/۶*	۱/۵۸
خطای آزمایشی	۷۲	۱۵/۶۴	۷/۴۲	۲/۰۴	۱۱/۶۷	۱/۶۴
ضریب تغییرات (درصد)		۱۱/۳	۱۴/۶	۲۴/۱	۱۳/۹	۲۰/۵

* و ** به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال پنج و یک درصد.

جدول پیوست ۵- میانگین مربعات اثر شوری، همزیستی فارچی و اسپرمیدین بر نشت الکترولیت و محتوای نسبی آب برگ گیاه استویا (آزمایش گلخانه‌ای)

محتوای نسبی آب برگ (RWC)	نشت الکترولیت	درجه آزادی	منابع تغییر
۳۰۲۰/۱**	۱۱۰۵۸/۷**	۲	شوری (A)
۹۸۵/۲**	۳۲۸/۴**	۳	فارچ (B)
۵۸۰/۷**	۱۹۴/۱**	۲	اسپرمیدین (C)
۱۹۹/۷*	۶۷/۰۷*	۶	A×B
۶۰/۷۵	۵/۵۵	۴	A×C
۲۸۴/۸**	۲/۱۰	۶	B×C
۱۳۸/۳۳	۲/۸۴	۱۲	A×B×C
۸۲/۲۲	۲۹/۹۳	۷۲	خطای آزمایشی
۱۱/۶	۱۲/۰۲		ضریب تغییرات (درصد)

* و ** به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال پنج و یک درصد.

جدول پیوست ۶- میانگین مربعات اثر شوری، همزیستی فارچی و پلی‌آمین اسپرمیدین بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در استویا (آزمایش گلخانه‌ای)

آسکوربات پراکسیداز	پراکسیداز	کاتالاز	سوپراکسید دیسموتاز	درجه آزادی	منابع تغییر
۰/۸۸۴**	۶۶۳/۰**	۱/۹۰۷**	۱۷/۳۲**	۲	شوری (A)
۲۱/۴۳**	۱۵۳/۶**	۲۴/۰۵**	۴۹/۴۰**	۳	فارچ (B)
۲/۶۵۰**	۶۰/۳۲**	۳/۶۵۴**	۳/۲۶۶**	۲	اسپرمیدین (C)
۰/۸۱۰**	۵/۲۳**	۰/۵۸۶**	۰/۵۳۰	۶	A×B
۰/۳۰۴**	۶/۵۱۱**	۰/۰۹۸*	۷/۱۳۷**	۴	A×C
۰/۳۰۵**	۴/۰۱۰**	۱/۰۴۷**	۰/۷۱۵	۶	B×C
۰/۱۷۳*	۶/۱۵۵**	۰/۰۳۸	۱/۴۹۴**	۱۲	A×B×C
۰/۰۸۴	۰/۸۰۵	۰/۰۳۳	۰/۴۲۹	۷۲	خطای آزمایشی
۱۰/۹	۹/۰۳	۱۳/۴	۱۱/۶		ضریب تغییرات (درصد)

* و ** به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال پنج و یک درصد.

جدول پیوست ۷- میانگین مربعات اثر شوری، همزیستی قارچی و اسپرمیدین بر برخی صفات فیزیولوژیک گیاه استویا (آزمایش گلخانه‌ای)

منابع تغییر	درجه آزادی	مالون دی آلدهید	پراکسید هیدروژن	پرولین	قند محلول
شوری (A)	۲	۴۱۵/۴۵**	۱۷/۳۹**	۱۵۸/۹**	۳۶۲/۸**
قارچ (B)	۳	۵۶/۲۸**	۱/۴۸۸**	۱۸/۹**	۷۰/۳۷**
اسپرمیدین (C)	۲	۵/۰۱۶**	۵/۳۹۹**	۲/۰۸**	۱۵۵/۹**
A×B	۶	۱۴/۳۱**	۰/۸۷۸*	۱/۹۵**	۳/۳۹
A×C	۴	۱/۳۶۷*	۰/۸۴۲*	۰/۱۰۷	۴/۹۰۸*
B×C	۶	۰/۴۳۷	۰/۵۸۷	۰/۱۲۰	۷/۶۶**
A×B×C	۱۲	۰/۴۸۶	۲/۴۰۴	۰/۰۴۸	۲/۰۳۰
خطای آزمایشی	۷۲	۰/۴۰۰	۰/۳۰۱	۰/۱۸۱	۱/۸۸۷
ضریب تغییرات (درصد)		۱۰/۰۱	۱۱/۱	۶/۶	۶/۷

* و ** به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال پنج و یک درصد.

جدول پیوست ۸- میانگین مربعات اثر شوری، همزیستی قارچی و پلی‌آمین اسپرمیدین بر صفات رویشی گیاه دارویی استویا (آزمایش مزرعه‌ای)

منابع تغییر	درجه آزادی	ارتفاع بوته	سطح برگ	وزن تر برگ	وزن تر ساقه	وزن تر شاخساره	وزن خشک برگ	وزن خشک ساقه	وزن خشک شاخساره
بلوک	۲	۱۲۴/۰۰	۲۵/۳	۱۹۳۰۴/۲	۳۴۲/۶	۱۴۹۵۳/۲	۲۳۴/۱	۳۷۳۴/۱	۵۲۷۷/۹
شوری (A)	۲	۱۵۳/۵۸	۱۱۰۵۲/۳**	۳۴۵۵۸/۰	۹۳۷۶۴/۰*	۲۴۰۳۴۷/۰**	۱۸۹۶/۴*	۸۸۷۷/۰	۱۸۵۶۵/۰
خطای کرت اصلی	۴	۴۰/۳۳	۴۲/۳	۵۰۱۷/۹	۹۷۷۵/۵	۱۵۷۶۷/۹	۲۶۲/۷	۲۵۸۱/۹	۴۳۳۸/۳
قارچ (B)	۱	۱۵۷۳/۴۴**	۱۴۶۱۶/۸**	۳۰۰۳۰/۰	۶۵۷۱۱۳/۰**	۱۸۴۵۱۸۳/۰**	۱۷۱۰/۰**	۵۹۰۳۶/۰**	۸۰۸۴۱/۰**
اسپرمیدین (C)	۲	۱۷۷/۷۸	۵۱۳۲/۸**	۱۸۲۹۳/۰	۴۴۷۱۵/۰	۱۲۰۲۰۷/۰*	۱۲۵۵/۰*	۶۱۱۶/۰	۱۲۹۱۲/۰
A×B	۲	۱۲/۸۶	۴۴۶/۳	۲۰۴۲۴/۰**	۲۶۹۲۸/۰	۹۳۷۷۵/۰*	۷۲۴/۱*	۱۵۲۱/۰	۳۱۸۳/۰
A×C	۲	۱۹/۶۹	۶۲۰/۵*	۲۵۱۴/۰	۱۹۱۷/۰	۸۶۷۵/۰	۱۹/۰	۱۷۹/۰	۱۲۵/۰
B×C	۱	۱/۰۰	۹۵/۴	۲۶۸۷/۰	۱۱۰۶۹/۰	۲۸۴۹/۰	۱۱/۴	۹۶۰/۰	۷۶۳/۰
A×B×C	۲	۱/۰۸	۶۲۲/۶*	۲۰۲۶/۰	۲۵۲۹/۰	۲۵۱۱/۰	۹/۸	۹۳۵/۰	۷۵۴/۰
خطای کل	۱۸	۴۴/۲۲	۱۵۴/۴	۴۴۲۹/۰	۱۶۳۷۸/۰	۲۴۱۲۱/۰	۱۹۱/۰	۲۴۵۲/۰	۲۹۳۷/۰
ضریب تغییرات		۵/۵	۷/۲	۱۱/۶	۱۱/۷	۹/۳	۹/۲	۱۳/۱	۱۰/۲

* و ** به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال پنج و یک درصد.

جدول پیوست ۹- میانگین مربعات اثر شوری، قارچ اندوفیت و پلی آمین اسپرمیدین بر پارامترهای فلورسانس کلروفیل در گیاه استویا (آزمایش مزرعه‌ای)

منابع تغییر	درجه آزادی	Fo	Fm	Fv	Fv/Fm	Y(II)	Y(NPQ)	Y(NO)	NPQ
بلوک	۲	۰/۰۰۰۲	۰/۰۱	۰/۰۴۷	۰/۰۰۰۴۲	۰/۰۰۰۴	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱۲	۰/۰۰۰۱
شوری (A)	۲	۰/۱۲۱**	۲/۵۶**	۳/۷۸۲**	۰/۰۱۶۸۵**	۰/۰۸۴۲**	۰/۰۳۱۲**	۰/۰۱۳۰۰**	۰/۱۹۵**
خطای کرت اصلی	۴	۰/۰۱۶	۰/۰۲	۰/۰۴۳	۰/۰۰۰۴۸	۰/۰۰۰۱۱	۰/۰۰۰۰۷	۰/۰۰۰۰۹	۰/۰۰۰۷
قارچ (B)	۱	۰/۱۰۹**	۴/۴۷**	۵/۹۹۲**	۰/۰۲۵۵۹**	۰/۰۷۵۷**	۰/۰۳۰۴**	۰/۰۱۰۱۷**	۰/۲۹۳**
اسپرمیدین (C)	۱	۰/۰۴۵	۱/۳۴**	۱/۸۸۰**	۰/۰۰۰۸۵۰**	۰/۰۰۰۰۴	۰/۰۰۰۰۴	۰/۰۰۱۶۳**	۰/۱۱۷**
A×B	۲	۰/۰۰۰۲	۰/۸۳**	۰/۸۵۱**	۰/۰۰۰۲۶۸**	۰/۰۰۰۳۲*	۰/۰۰۰۱۴	۰/۰۰۰۵۹**	۰/۰۳۸**
A×C	۲	۰/۰۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱۴	۰/۰۰۰۱۸	۰/۰۰۰۰۲	۰/۰۰۰۰۴	۰/۰۰۰۰۴	۰/۰۳۲*
B×C	۱	۰/۰۰۲	۰/۱۸*	۰/۱۴۷	۰/۰۰۰۶۵	۰/۰۰۰۰۳	۰/۰۰۰۱۰	۰/۰۰۰۰۲۳	۰/۰۹۲**
A×B×C	۲	۰/۰۰۷	۰/۰۴	۰/۰۵۵	۰/۰۰۰۵۲	۰/۰۰۰۰۲	۰/۰۰۰۰۲	۰/۰۰۰۰۱۳	۰/۰۰۰۰۲
خطای کل	۱۸	۰/۰۱۲	۰/۰۳	۰/۰۴۰	۰/۰۰۰۳۸	۰/۰۰۰۰۸	۰/۰۰۰۰۶۵	۰/۰۰۰۰۰۶	۰/۰۰۰۰۶
ضریب تغییرات		۷/۲	۳/۰	۴/۵	۲/۶	۴/۲	۱۶/۸	۵/۴	۸/۱

* و ** به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال پنج و یک درصد.

جدول پیوست ۱۰- میانگین مربعات اثر تیمارهای مورد بررسی بر رنگی‌ه‌های فتوسنتزی در برگ گیاه استویا (آزمایش مزرعه‌ای)

منابع تغییر	درجه آزادی	کلروفیل برگ (SPAD)	کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل a+b	کارتنوئید
بلوک	۲	۲۵/۷۵	۳/۰۴	۰/۷۹۴	۱۰/۸۶	۱/۹۸۱
شوری (A)	۲	۳۲۶/۶*	۳۹۸/۶۱*	۳۴/۴۸	۲۹۳/۶*	۵۲/۹۰۲*
خطای کرت اصلی	۴	۴۰/۳۴	۳۰/۷۸	۱۱/۰۶	۲۶/۵۶	۲/۹۶۶
قارچ (B)	۱	۳۸۸/۰۹**	۲۱۹/۶۹*	۳۹۱/۲**	۱۱۹۷/۳**	۵۷/۱۴۳**
اسپرمیدین (C)	۱	۶۷/۲۴	۶۸/۵۶	۹۵/۸۶*	۳۲۶/۵۷**	۷/۰۷۷
A×B	۲	۸۱/۸۰*	۱۲/۱۹	۴/۳۰	۲۸/۴۴	۶/۷۱۵
A×C	۲	۵/۶۷	۲/۴۳	۱۳/۰۳	۲۳/۳۸	۱/۶۶۲
B×C	۱	۱۶/۲۷	۱۹/۵۳	۵/۹۶	۴۷/۰۸	۱/۰۹۹
A×B×C	۲	۷/۱۶	۱۴/۲۶	۲۷/۷۶**	۲/۵۶	۳/۸۷۶
خطای آزمایشی	۱۸	۲۰/۴۵	۲۰/۳۰	۷/۱۶	۲۵/۰۷	۲/۱۳۸
ضریب تغییرات (درصد)		۱۰/۰	۱۰/۴	۱۵/۲	۸/۲	۱۵/۹

* و ** به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال پنج و یک درصد.

جدول پیوست ۱۱- میانگین مربعات اثر شوری، همزیستی قارچی و اسپرمیدین بر برخی صفات فیزیولوژیک گیاه استویا (آزمایش مزرعه‌ای)

منابع تغییر	درجه آزادی	نشت الکتروولت	محتوای نسبی آب برگ (RWC)
بلوک	۲	۴/۷۲۵	۱۸۱/۰۲
شوری (A)	۲	۱۲۱۶/۹**	۲۲۶۳/۶**
خطای کرت اصلی	۴	۶/۴۰۸	۴۸/۰۲
قارچ (B)	۱	۴۲۲/۵**	۷۳۵/۵**
اسپرمیدین (C)	۱	۷۰/۵۰**	۲۴۶/۵**
A×B	۲	۳۱/۰۸**	۱۳۷/۲*
A×C	۲	۲/۷۱۶	۱/۱۶
B×C	۱	۱۰/۳۰	۱۸/۵۴
A×B×C	۲	۲/۲۳۰	۲/۵۳
خطای کل	۱۸	۴/۵۷۲	۲۸/۵۶
ضریب تغییرات (درصد)		۶/۳	۷/۳

* و ** به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال پنج و یک درصد.

جدول پیوست ۱۲- میانگین مربعات اثر شوری، همزیستی قارچی و محلول‌پاشی اسپرمیدین بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، پراکسیداسیون لیپیدی، پراکسید هیدروژن در استویا (آزمایش مزرعه‌ای)

منابع تغییر	درجه آزادی	سوپراکسید دیسموتاز	کاتالاز	پراکسیداز	آسکوربات پراکسیداز
بلوک	۲	۰/۱۹۹	۰/۰۰۴	۱/۴۱۸	۰/۰۶۰
شوری (A)	۲	۳۲/۶۸**	۱/۳۵۶**	۹۸/۰۳**	۲/۷۴۶**
خطای کرت اصلی	۴	۰/۲۶۲	۰/۰۴۲	۰/۶۳۹	۰/۱۱۰
قارچ (B)	۱	۴۶/۴۲**	۴/۳۷۱**	۱۵۳/۳۴**	۲۲/۹۵۵**
اسپرمیدین (C)	۱	۱/۴۲۹**	۳/۴۳۱**	۱۶/۰۸**	۲/۳۷۷**
A×B	۲	۴/۳۷۴**	۰/۴۷۷**	۲/۲۰۵**	۰/۷۸۳**
A×C	۲	۰/۷۱۳*	۰/۱۸۱*	۰/۶۱۶	۰/۰۴۵
B×C	۱	۰/۰۲۶	۰/۴۰۰**	۰/۰۱۰	۰/۰۲۴
A×B×C	۲	۰/۴۲۳	۰/۲۵۸*	۱/۲۸۱	۰/۱۵۰
خطای کل	۱۸	۰/۱۷۹	۰/۰۴۴	۰/۴۴۲	۰/۱۰۲
ضریب تغییرات (درصد)		۸/۳	۱۳/۴	۸/۲	۱۲/۶

* و ** به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال پنج و یک درصد.

جدول پیوست ۱۳- میانگین مربعات اثر شوری، همزیستی قارچی و اسپرمیدین بر برخی صفات فیزیولوژیک گیاه استویا (آزمایش مزرعه‌ای)

منابع تغییر	درجه آزادی	مالون دی آلدهید	پراکسید هیدروژن	پرولین	قند محلول
بلوک	۲	۰/۹۴۹	۰/۵۶۷	۰/۰۱۹	۷/۶۲۷
شوری (A)	۲	۱۸/۹۸**	۹/۵۲۸**	۲۷/۶۸**	۱۴۹/۴**
خطای کرت اصلی	۴	۰/۸۹۱	۰/۳۳۷	۰/۱۷۶	۱/۶۰۸
قارچ (B)	۱	۷/۳۹**	۴/۹۴۵**	۲۲/۵۷**	۱۱۰/۸**
اسپرمیدین (C)	۱	۰/۴۰۹	۱/۲۵۵**	۲/۳۱۱**	۱۱۹/۱**
A×B	۲	۰/۵۵۴*	۱/۱۳۱**	۰/۵۵۵*	۵/۹۰
A×C	۲	۰/۶۶۲*	۰/۲۷۷	۰/۳۴۱	۱/۴۱۱
B×C	۱	۰/۰۶۸	۰/۰۴۸	۰/۰۰۱	۲۳/۰۹*
A×B×C	۲	۰/۹۵۴**	۰/۱۹۷	۰/۰۳۵	۱/۶۰۶
خطای کل	۱۸	۰/۱۴۷	۰/۱۱۰	۰/۱۱۱	۳/۸۵۱
ضریب تغییرات (درصد)		۷/۱	۷/۳	۵/۶	۶/۱

* و ** به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال پنج و یک درصد.

جدول پیوست ۱۴- میانگین مربعات اثر شوری، همزیستی قارچی و اسپرمیدین بر گلیکوزیدهای استویزید و ربادیوزید A در برگ (درصد) گیاه استویا (آزمایش مزرعه‌ای)

منابع تغییر	درجه آزادی	استویزید	ربادیوزید A
بلوک	۲	۰/۵۵۲۴	۰/۰۵۰۰
شوری (A)	۲	۷/۲۵۷**	۰/۷۲۴**
خطای کرت اصلی	۴	۰/۴۹۷	۰/۰۳۴
قارچ (B)	۱	۴۰/۹۵**	۲/۴۶۸**
اسپرمیدین (C)	۱	۷/۰۹۸**	۰/۶۹۵**
A×B	۲	۱/۴۸۱**	۰/۰۳۴
A×C	۲	۰/۰۰۹	۰/۰۲۷۷
B×C	۱	۰/۰۳۸	۰/۰۲۱۷
A×B×C	۲	۱/۰۴۰*	۰/۰۶۰*
خطای کل	۱۸	۰/۲۷۲	۰/۰۱۲
ضریب تغییرات (درصد)		۶/۶	۴/۵

* و ** به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال پنج و یک درصد.

- اسفندیاری، ع. ا. ۱۳۸۶. بررسی اثرات تنش خشکی بر روی ارقام پائیزه گندم با استفاده از پارامترهای فیزیولوژیک، بیوشیمیایی و زراعی. پایان نامه دکتری. دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز.
- اسفندیاری، ع. ا.، محبوب، س. و شکاری، ف. ۱۳۸۸. اصول فیزیولوژی گیاهی، تبریز، انتشارات عمیدی، ۱۵۶ صفحه.
- اشراف، ح.، زکی زاده، ه.، احتشامی، س. م. و بیگلویی، م. ح. ۱۳۹۶. ارزیابی همزیستی سه گونه قارچ میکوریزا بر ویژگی‌های بیوشیمیایی چمن‌های اگروپیرون و پوآی چندساله تحت تنش خشکی. نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی. جلد ۲۴۰ شماره ۳. ۲۵-۴۴.
- آل‌طه، ر.، صفری سنجانی، ع. ا.، ظفری، د. م. ۱۳۹۷. ارزیابی توان رشد در گیاه اسپناج مایه‌زنی شده با قارچ پیریفورموسپورا ایندیکا، میکوریزا و قارچ‌های دیواره تاریک در تنش خشکی. دوره ۲۰، شماره ۲، صفحه ۵۱۷-۵۳۱.
- امیدبیگی، ر. ۱۳۸۴. تولید و فرآوری گیاهان دارویی. انتشارات آستان قدس رضوی. ۴۳۸ صفحه.
- امیدبیگی، ر. ۱۳۸۸. تولید و فرآوری گیاهان دارویی، جلد اول. چاپ پنجم. انتشارات آستان قدس رضوی. ۳۴۷ صفحه.
- ایران‌نژاد، ا.، وطن‌پور ازغندی، ع.، رهنما، ح.، جلیانی، ن. و بزرگی‌پور، ر. ۱۳۸۹. بهبود ریشه‌زایی و سازگاری گیاهچه‌های کشت بافتی زیتون زرد با استفاده از باکتری *Agrobacterium rhizogenes* و قارچ *Trichoderma harzianum*. ۲: ۸۵-۹۳.
- بنی‌اسدی، ف.، صفاری، و. ر. و مقصودی‌مود، ع. ا. ۱۳۹۴. اثر پوتریسین بر برخی خصوصیات فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی گیاه همیشه بهار تحت تنش شوری. مجله تنش‌های محیطی در علوم زراعی. جلد ۸، شماره ۱. ۷۳-۸۲.
- بهاری ساروی، س. ح.، پیردشتی، ه. ا. و یعقوبیان، ی. ۱۳۹۶. پاسخ فلورسانس کلروفیل و پارامترهای فیزیولوژیکی ریحان (*Ocimum basilicum* L.) به ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه (PGPR) تحت تنش شوری. مجله فرآیند و کارکرد گیاهی. جلد ۶، شماره ۱۹. صفحه ۸۹-۱۰۴.
- تقوی قاسم‌خیلی، ف.، پیردشتی، ه. ا.، تاجیک قنبری، م. ع. و بهمنیار، م. ع. ۱۳۹۳b. تأثیر قارچ تریکودرما (*Trichoderma harzianum*) بر عملکرد دانه گندم (*Triticum aestivum* L.) در سطوح مختلف نیترات کادمیوم. نشریه پژوهش‌های زراعی ایران. ۱۲ (۳): ۴۶۲-۲۵۴.
- جبارزاده، ج.، کاویانی، م. ح.، قاسمی، ن.، مهندس، ا. ر. و صفریان، س. ۱۳۸۹. بررسی اثر قارچ *Trichoderma harzianum* بر کاهش خسارت بیماری‌های خاکزاد و بهبود عملکرد و کیفیت گوجه‌فرنگی (*Lycopersicon esculentum*) گلخانه‌ای منطقه تهران. خلاصه مقالات نوزدهمین کنگره گیاهپزشکی، تهران. ص ۸۲۳.
- جلالی، ز.، شور، م.، نعمتی، س. ح. و روحانی، ح. ۱۳۹۳. بررسی اثر قارچ تریکودرما و سطوح مختلف آهن بر صفات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی برگ بیدی. اولین کنگره ملی گل و گیاهان زینتی ایران. پژوهشکده ملی گل و گیاهان زینتی. کرج، ایران. ۲۹ و ۳۰ مهر. صفحات ۴-۱.
- جلیلی مرندی، ر. ۱۳۸۹. فیزیولوژی تنش‌های محیطی و مکانیزم‌های مقاومت در گیاهان باغی. جلد اول، انتشارات جهاد دانشگاهی واحد ارومیه، ارومیه. ۳۶۲ صفحه.

جنابیان، م.، پردشتی، ه. ا. و یعقوبیان، ی. ۱۳۹۴. اثر شدت تابش بر تحمل به سرمای سویا (*Glycine max* (L. Merr.) با استفاده از روش فلورسانس کلروفیل. مجله فرآیند و کارکرد گیاهی. ۴(۱۲): ۱۵۲-۱۴۱.

حریرفروش، م.، سروشزاده، ع. و قناتی، ف. ۱۳۹۸. بررسی تأثیر نیترات پتاسیم و پلی آمین پوترسین بر برخی از خصوصیات رویشی و بیوشیمیایی کلزا تحت تنش غرقابی. فرآیند و کارکرد گیاهی، جلد ۸، شماره ۳۰. صفحه ۲۱۵-۲۳۱.

حسینی، ز. ۱۳۹۲. اثر قارچ اندوفیت *Piriformospora indica* بر تحمل به تنش سرمایی در ژنوتیپ‌های مختلف برنج (*Oryza sativa* L.). پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشکده علوم زراعی. دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری.

حسیبی، پ.، مرادی، ف و نبی پور، م. ۱۳۸۷. اثر دمای پایین بر سازوکار آنتی اکسیدانهای ژنوتیپهای حساس و متحمل برنج در مرحله گیاهچه ای. مجله علوم زراعی ایران. ۱۰: ۳-۲۶۲.

حسینی فرهی، م.، دستیاران، م. و یوسفی، ف. ۱۳۹۶. اثر پلی آمین‌ها و هیومیک اسید بر رشد، عملکرد و غلظت عنصرهای معدنی در شاخساره و ریشه توت فرنگی. مجله علوم و فنون باغبانی ایران. جلد ۱۸، شماره ۲. صفحه ۲۰۹-۲۲۰.

حضرتی یادکوری، س. ۱۳۹۴. ارزیابی شدت نور و تنش کم آبیبا کاربرد زئولیت بر فرآیندهای فیزیولوژیک و فیتوشیمیایی گیاه دارویی (*Aloe vera* L.). رساله دکتری. ۱۹۳ صفحه.

حق‌نیا، غ. ۱۳۶۸. راهنمای تحمل گیاهان نسبت به تنش شوری. انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد. ۲۳۵ صفحه.

حمیدی، ا.، اصغرزاده، ا.، چوگان، ر.، دهقان شعار، م.، قلاوند، ا. و ملکوتی، م. ج. ۱۳۸۶. بررسی کاربرد کودهای ریزوباکتریایی افزایش دهنده رشد گیاه (PGPR) در زراعت ذرت با نهاده کافی. مجله علوم محیطی، ۴(۴): ۲۰-۱.

خالوندی، م.، عامریان، م.، پردشتی، ه. ا.، برادران فیروزآبادی، م. و غلامی، ا. ۱۳۹۶. اثر همزیستی قارچ پریفورموسپورا ایندیکا با گیاه نعنا فلفلی بر کمیت و کیفیت اسانس و برخی پارامترهای فیزیولوژیکی تحت تنش شوری. مجله فرآیند و کارکرد گیاهی. جلد ۶، شماره ۲۱. ۱۶۹-۱۸۴.

رحیمی، ع.، جهان‌بین، ش.، صالحی، ا. و فرجی، ه. ۱۳۹۵. تأثیر قارچ‌های میکوریزا بر خصوصیات موفولوژیکی، مقدار ترکیبات فنلی و فلورسانس کلروفیل در گیاه گاوزبان (*Borago officinalis* L.) تحت تنش خشکی. مجله پژوهش‌های اکوفیزیولوژی گیاهی ایران. ۱۱(۴۲): ۴۶-۵۵.

زارع حسینی، ر.، محمدی گل‌تپه، ا.، کلاته جاری، س. و دهقان، م. ر. ۱۳۹۴. بررسی تأثیر ورمی کمپوست و تلقیح قارچ بر خصوصیات رشدی و میزان استوبوزید گیاه (*Stevia rebaudiana* Bertoni) دارویی شیرین برگ. مجله علوم و فنون باغبانی ایران. جلد ۱۸، شماره ۲. صفحه ۲۰۹-۲۲۰.

زاهدی، س. م.، کریمی، م. و کیان ارثی، ف. ۱۳۹۷. تعیین مهمترین صفات موثر بر نشت الکترولیت گلایی وحشی تحت تنش خشکی با استفاده از روش‌های آماری چند متغییره. نشریه فیزیولوژی محیطی گیاهی. ۵۱(۱۳): ۹۳-۸۲.

سپهری، م.، صالح راستین، ن.، حسینی سالکده، ق. و خیام نکویی، م. ۱۳۸۸. بررسی تأثیر قارچ اندوفیت *Piriformospora indica* بر بهبود رشد و افزایش مقاومت گیاه جو به تنش شوری. مجله علمی پژوهشی. ۳(۲): ۵۰۸-۵۱۳.

سپهری، م.، صالح راستین، ن.، حسینی سالکده، ق. و خیام نکویی، م. ۱۳۸۸. بررسی تأثیر قارچ *Piriformospora indica* بر بهبود رشد و افزایش مقاومت گیاه جو *Hordeum vulgare* L. به تنش شوری. مجله علمی پژوهشی مرتع. ۳: ۵۰۸-۵۱۸.

سلیمانی، ف. و پیرزاد، ا. ۱۳۸۷. تأثیر قارچ میکوریز بر غلظت مالون دی‌آلدئید و برخی فرآیندهای متابولیکی در *Hyssopus officinalis* تحت تنش کمبود آب. مجله زیست‌شناسی گیاهی ایران. ۷: ۱۵-۲۶.

شهابی‌وند، ص. ۱۳۹۱. بررسی تاثیر قارچ‌های مایکوریزای آربوسکولار *Glomus mosseae* و اندوفیت ریشه *Piriformospora indica* روی گندم رقم سرداری ۳۹ تحت سمیت کادمیوم. رساله دکتری. دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس.

صالح راستین، ن. ۱۳۸۰. کودهای بیولوژیک و نقش آن در راستای نیل به کشاورزی پایدار. ضرورت تولید صنعتی کودهای بیولوژیک در کشور. نشر آموزش کشاورزی، وزارت جهاد کشاورزی، کرج. ایران.

صفاری، ر. مقصودی مود، ع. ا. و صفاری و. ر. ۱۳۹۲. اثر تنش شوری بر فلورسانس کلروفیل و عملکرد دانه برخی ارقام آفتابگردان (*Helianthus annuus* L.). مجله به زراعی نهال و بذر. ۲۹: ۱۰۹-۱۳۰.

طریق‌الاسلامی، م.، کافی، م.، نظامی، م. و ضرغامی، ر. ۱۳۹۵. اثر تنش سرما بر خصوصیات بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی سه هیبرید ذرت در مرحله گیاهچه‌ای. مجله فرآیند و کارکرد گیاهی. ۲۹ (۳): ۵۴۱-۵۵۳.

علی‌زاده فروتن، م. ۱۳۹۲. اثر پاکلوبوترازول و تلقیح قارچ شبه‌میکوریزا (*Piriformospora indica*) بر افزایش تحمل به تنش سرما در لوبیا سبز (*Phaseolus vulgaris* L.). پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشکده علوم زراعی. دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری.

علی‌زاده فروتن، م.، پیردشتی، ه. ا. و یعقوبیان، ی. ۱۳۹۳. اثر تیمارهای بیولوژیکی بذر بر مقاومت گیاه دارویی رازیانه (*Foeniculum vulgare*) به تنش عنصر سنگین مس در مرحله جوانه‌زنی و گیاهچه‌ای. نشریه تحقیقات بذر. ۴(۲): ۱-۱۲.

عموآقایی، ر. و نیک‌اندیش، ف. ۱۳۹۴. اثر تلقیح ریشه دو رقم یونجه (*Medicago sativa*) با جدایه‌هایی از گونه‌های سینوریزوبیوم و باسیلوس بر رشد، مقدار کلروفیل و تمامیت غشای سلول در شرایط تنش شوری. مجله پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست‌شناسی ایران). ۲۸: ۱۵۲-۱۴۰.

فرزانه، م.، قنبری، م. و عبدوسی، و. ۱۳۹۶. اثر محلولپاشی اسپرمیدین بر ویژگیهای بیوشیمیایی خیار در دوره‌های مختلف آبیاری. مجله علمی پژوهشی اکوفیزیولوژی گیاهی. سال ۹، شماره ۲۸.

فلاحی، ج.، کوچکی، ع. و رضوانی مقدم، پ. ۱۳۸۸. بررسی تاثیر کودهای بیولوژیک بر عملکرد کمی و کیفی گیاه دارویی بابونه آلمانی. مجله پژوهش‌های زراعی ایران، ۷: ۱۳۵-۱۲۷.

فهمی خویردی، ف. و شمشیری، م. ح. ۱۳۹۵. مقایسه عملکرد فتوسینتزم II در چهار رقم پایه‌ای پسته اهلی با استفاده از تکنیک فلورسانس کلروفیل در شرایط تنش خشکی. فرآیند و کارکرد گیاهی. ۱۷ (۵): ۱۰۸-۹۵.

قاسم‌نژاد، ع. و بابایی‌زاد، و. ا. ۱۳۹۰. رشد رویشی و میزان کافئیک اسید برگ کنگر فرنگی (*Cynara scolymus* L.). مجله پژوهش‌های تولید گیاهی. ۱۸: ۱۳۳-۱۴۰.

قاسمی، م. و زاهدی، م. ۱۳۹۷. اثر قارچ مایکوریزا بر تحمل شوری در برخی ژنوتیپ‌های سورگوم. فرآیند و کارکرد گیاهی. جلد ۷، شماره ۲۴. ۱۴۵-۱۵۳.

قربانی، ا.، رضوی، س. م.، قاسمی عمران، و. ا. و پیردشتی، ه. ا. ۱۳۹۷. تأثیر همزیستی قارچ اندوفیت بر برخی شاخص‌های فیزیولوژیک گیاه گوجه‌فرنگی تحت تنش شوری ۱۰ روزه. ۱۳۹۷. مجله فرآیند و کارکرد گیاهی. جلد ۷، شماره ۲۷. صفحه ۱۹۳-۲۰۸.

کاری دولت‌آبادی، ح. و محمدی گل‌تپه، ا. ۱۳۸۹. اثر بیولوژیکی *Piriformospora indica* *Sebacina vermifera* و *Trichoderma spp.* علیه بیماری پژمردگی فوزاریومی عدس در شرایط گلخانه‌ای. فصلنامه گیاه‌پزشکی. ۲: ۱۴۳-۱۲۷.

کرامتی، س. ۱۳۹۵. ارزیابی جنبه‌های مورفوفیزیولوژیکی همزیستی قارچ شبه‌میکوریزا پریفورموسپورا ایندیکا و کاربرد پاکلوبوترازول در ریحان تحت تنش شوری. رساله دکتری. دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری. ۱۵۸ صفحه.

مومن‌پور، ا.، ایمانی، ا.، بخشی، د. و رضایی، ح. ۱۳۹۳. ارزیابی تحمل به تنش شوری در برخی از زنوتیپ‌های بادام براساس خصوصیات مورفولوژیکی و فلورسانس کلروفیل. مجله فرآیند و کارکرد گیاهی. ۳(۱۰): ۲۸-۹.

مؤیدی، گ. و مستوفی‌زاده قلم‌فرسا، ر. ۱۳۹۱. معرفی روش‌های جداسازی و شناسایی هشت شبه‌گونه *Trichoderma*. دانش بیماری‌شناسی گیاهی. ۱(۲): ۳۹-۳۱.

نوح‌پیشه، ز. و منوچهری کلانتری، خ. ۱۳۹۰. اثرات کاربرد متقابل اسپرمیدین و تنش شوری در گیاه فلفل. مجله زیست‌شناسی ایران. جلد ۲۴، شماره ۶. ۸۴۸-۸۵۷.

همایونی، ح.، خزریان، و. و سعیدی، م. ۱۳۹۵. تأثیر کمبود آب بر فلورسانس کلروفیل، خصوصیات رویشی و عملکرد دانه برخی از هیبریدهای ذرت. مجله اکوفیزیولوژی گیاهی. ۸(۲۴): ۱۳-۲۴.

یزدانی، م.، پیردشتی، ه.، تاجیک، م. ع. و بهمنیار، م. ع. ۱۳۸۷. تأثیر تریکودرما (*Trichoderma spp.*) و انواع مختلف کودهای آلی بر رشد و نمو سویا (*Glycine max (L.) Merril*). مجله الکترونیک تولید گیاهان زراعی. ۱(۳): ۸۲-۶۵.

یعقوبیان، ی. ۱۳۹۰. تأثیر قارچ‌های آربوسکولار میکوریزا (*Glomus mosseae*) و شبه‌میکوریزا (*Piriformospora indica*) روی مقاومت به خشکی گندم دیم با استفاده از شاخص‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی. پایان‌نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری. ۱۸۳ صفحه.

یعقوبیان، ی.، پیردشتی، ه.، فیضی اصل، و.، محمدی گل‌تپه، ا.، اسفندیاری، ع. ا. و جعفرزاده، ج. ۱۳۹۱. اثر همزیستی میکوریزایی بر کارایی کوانتومی فتوسنتز II تحت تنش رطوبتی در گندم. دوازدهمین کنگره علوم زراعت و اصلاح نباتات ایران. کرج. ۱۴-۱۵ شهریور.

Abd_Allah, E.F., Abeer Hashem, A.A., Alqarawi, A., Bahkali H. and Mona, S. Alwhibi. 2015. Enhancing growth performance and systemic acquired resistance of medicinal plant *Sesbania sesban (L.) Merr* using arbuscular mycorrhizal fungi under salt stress. Saudi Journal of Biology Sciences. 22: 274-283

Abdel Aziz Nahed, G., Taha Lobna, S. and Ibrahim Soad, M.M. 2009. Some studies on the effect of putrescine, ascorbic acid and thiamine on growth, flowering and some chemical constituents of gladiolus plants at Nubaria. Ozean Journal of Applied Sciences. 2(2), 169-179

Abeer, H., Alterami Salwa, A., Alqarawi, A.A. and Elsayed Fathi., A.A. 2016. Arbuscular mycorrhizal fungi enhance basil tolerance to salt stress through improved physiological and nutritional status. Pakistan Journal of Botany. 48(1):37-45.

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

Adya, A.K., Gautam, A., Zhang, L. and Varma, A. 2013. Characterization of *Piriformospora indica* culture filtrate. In *Piriformospora indica*. Springer Berlin Heidelberg. . 345-375

Agarwal, S., Sairam R.K., Srivastava, G.C., Tyagi A. And Meena, R.C. 2005. Role of ABA, salicylic acid, calcium and hydrogen peroxide on antioxidant enzymes induction in wheat seedlings. Plant Science. 169:559-570.

Ahmad, P., Azooz, M.M. and Prasad, M.N.V. 2013. Ecophysiology and Responses of Plants under Salt Stress. Published by Springer.

Ahmed, B., Salahin, M., Karim, R., Razvy, M.A., Hannan, M.M., Sultana, R., Hossain, M. and Islam, R. 2007. An Efficient Method for in vitro Clonal Propagation of a Newly

- Introduced Sweetener Plant (*Stevia rebaudiana* Bertoni.) in Bangladesh. American-Eurasian Journal of Scientific Research. 2 (2): 121-125.
- Ajila, C.M. and Prasada Rao, U.J.S. 2008. Protection against hydrogen peroxide induced oxidative damage in rat erythrocytes by *Mangifera indica* L. peel extract. Food and Chemical Toxicology. 46:303-309.
- Alguacil, M.M., Caravaca, F., Diaz, G., Marin, P. and Roldan, A. 2004. Establishment of *Retama sphaerocarpa* L. seedlings on a degraded semi-arid soil as influenced by mycorrhizal inoculation and sewage sludge amendment. Journal of Plant Nutrition and Soil Science. 167:637-644.
- Allen, D.J. and Ort, D.R. 2001. Impacts of chilling temperatures on photosynthesis in warm-climate plants. Trends in Plant Science. 6:36-41.
- Alscher, R.G., Erturk, N. and Heath, L.S. 2002. Role of superoxide dismutases (SOD) in controlling oxidative stress in plant. Journal of Experiment Botany. 153: 1331-1341.
- Anderson, M.D., Prasad, T.K. and Stewart, C.R. 1995. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. Plant Physiology. 109(4): 1247-1257
- Aneja, M., Gianfagna, T.J. and Hebbar, P.K. 2005. *Trichoderma harzianum* produces nonanoic acid, an inhibitor of spore germination and mycelial growth of two cacao pathogens. Physiological and Molecular Plant Pathology. 67: 304-307.
- Anjum, M.A. 2010. Response of Cleopatra mandarin seedlings to a polyamine-biosynthesis inhibitor under salt stress. Acta Physiologiae Plantarum. 32: 951-959.
- Aro, E.M., Virgin, I. and Anderssen, B. 1993. Photoinhibition of photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1143:113-134.
- Asada, K. 1999. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology. 50:601-639.
- Asada, K. 2006. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. Plant Physiology. 141:391-396
- Ashraf, M.Y. and Wu, L. 1994. Breeding for salinity tolerance in plants. Critical Reviews in Plant Sciences. 13 (1), pp. 17-42.
- Ashraf, M. and Foolad, M.R. 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. Environmental and Experimental Botany. 59: 206-216.
- Askary, M., Talebi, S.M. and Amini F. 2017. Effects of iron nanoparticles on *Mentha piperita* L. under salinity stress. Biological. 63: 65-75, 2017
- Auge, R.M., Stodola, A.J.W., Times, J.E. and Saxton, A.M. 2001. Moisture retention properties of a mycorrhizal soil. Journal of Plant and Soil. 230: 87-97.
- Azooz, M.M. and Ahmad, P. 2015. Legumes under Environmental Stress: Yield, Improvement and Adaptations. Published by John Wiley & Sons, Ltd.
- Babaei, K., Sharifi, R. S. and Pirzad, A. 2017. Effects of bio fertilizer and nano Zn-Fe oxide on physiological traits, antioxidant enzymes activity and yield of wheat (*Triticum aestivum* L.) under salinity stress. Journal of Plant Interactions. 12: 381-389.
- Bachrach, U. 2005. Naturally occurring polyamines: interaction with macro-molecules. Current Protein Peptide Science. 6(6): 559-566.
- Baker, N. R. 2008. Chlorophyll fluorescence: A probe of photosynthesis in vivo. Annual Review of Plant Biology. 59: 89-113. Doi: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092759.
- Baker, N.R. and Rosenqvist, E. 2004. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. Journal of Experimental Botany. 55(403):1607-1621.
- Bartels, D. and Sunkar, R. 2005. Drought and salt tolerance in plants. Plant science. 24: 23-58.

- Ben-Asher, J., Tsuyuki, I., Bravdo, B. A. and Sagih, M. 2006. Irrigation of grape vines with saline water: Leaf area index, stomatal conductance, transpiration and photosynthesis. *Agricultural Water Management*. 83: 13-21.
- Bhattacharjee, S. and Mukherjee, A.K. 2002. Salt stress induced cytosolute accumulation, antioxidant response and membrane deterioration in three rice cultivars during early germination. *Seed Science and Technology*. 30: 279-287.
- Bhosale, K.S. and Shinde, B.P. 2011. Influence of arbuscular mycorrhizal fungi on proline and chlorophyll content in *Zingiber officinale* grown under water stress. *Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences*. 1:172-176.
- Bierman B. and Linderman R. G. 1980. Quantifying vesicular – *arbuscular mycorrhizae*: a proposed method towards standardization. *New Phytologist*. 87:63 – 67.
- Bissati, K.E., Delphin, E., Murata, N., Etienne, A.L. and Kirilovsky, D. 2000. Photosystem II fluorescence quenching in cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803: involvement of two different mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1457:229-242.
- Blokhina, O. And Fagerstedt, K.V. 2010. Oxidative metabolism, ROS and NO under oxygen deprivation. *Plant Physiology and Biochemistry*. 48(5):359-73.
- Bonfante, P. and Perotto, S. 1995. Tansley Review No. 82. Strategies of arbuscular mycorrhizal fungi when infecting host plants. *New Phytologist*. 130: 3-21.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitative titration of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254.
- Breusegem, F.V., Vranova, E., Dat, J.F. and Inze, D. 2001. The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Science*. 161:405-414.
- Btes, L.S. Waldren, R.P. and Teare, I.D. 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil*. 39 (1): 205-207.
- Bu, N., Li, X., Li, Y., Ma, C., Ma, L. and Zhang, C. 2012. Effect of Na₂CO₃ stress on photosynthesis and antioxidative enzymes in endophyte infected and non-infected rice. *Ecotoxicology and environmental safety*. 78. Pp. 35-40.
- Bukov, N.G. and Carpentier, R. 2003. Measurement of photochemical quenching of absorbed quanta in photosystem I of intact leaves using simultaneous measurements of absorbance changes at 830 nm and thermal dissipation. *Planta*. 216: 630-638.
- Buschmann, C. 1995, *Photosynthesis: From Light to Biosphere*, P. Mathis (Ed.), Vol. V, Kluwer, Dordrecht, P 913.
- Cadenas, E. 1989. Biochemistry of oxygen toxicity. *Annual Review of Biochemistry*. 58:79-110.
- Cantabella, D., Piqueras, A., Acosta-Motos, J.P., Bernal-Vicente, A., Hernandez, J.A. and Diaz- Vivancos, P. 2017. Salt-tolerance mechanisms induced in *Stevia rebaudiana* Bertoni: effects on mineral nutrition, antioxidative metabolism and steviol glycoside content. *Plant Physiology and Biochemistry*. 115, 484-496
- Caravaca, F., Alguacil, M.M., Figueroa, D., Barea, J.M. and Roldan, A. 2003 Re-establishment of *Retama sphaerocarpa* as a target species for reclamation of soil physical and biological properties in a semi-arid Mediterranean area. *Forest Ecology and Management*. 182:49-58.
- Cardello, H.M.A.B., Silva, M.A.P.A. and Damasio, M.H. 1999. Measurement of the relative sweetness of stevia extract, aspartame and cyclamate/saccharin blend as compared to sucrose at different concentrations. *Plant Food for Human Nutrition*. 54: 119-130.
- Chacon, M.R., Rodríguez-Galán, O., Benítez, T., Sousa, S., Rey, M., Llobell, A. and Delgado-Jarana, J. 2007. Microscopic and transcriptome analyses of early colonization of tomato roots by *T. Harzianum*. *International Microbiol*. 10:19-27.

- Chang, Y.C., Chang, Y.C., Baker, R., Kleifeld, O. and Chet, I. 1986. Increased growth of plants in the presence of the biological control agent *Trichoderma harzianum*. *Plant Disease*. 70: 145-148.
- Cha-Um, S., Supaibulwattana, K. and Kirdmanee, C. 2009. Comparative effect of salt stress and extreme pH stress combined on glycinebetaine accumulation, photosynthetic abilities and growth characters of two rice genotypes. *Rice Science*. 16(4): 247-282.
- Chaves, M.M., Flexas, J. and Pinheiro, C. 2009. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annual Botanical*. 103(4): 551-560.
- Chen, J., Zhu, C., Lin, D. and Sun, Z.X. 2007. The effects of Cd on lipid peroxidation, hydrogen peroxide content and antioxidant enzyme activities in Cd-sensitive mutant rice seedlings. *Canadian Journal of Plant Science*. 87(1): 49-57.
- Cimrin, K.M., Türkmen, O., Turan, M. and Tuncer, B. 2010. Phosphorus and humic acid application alleviate salinity stress of pepper seedlings. *Afr. J. Biotech.* 9:5845–5851.
- Claussen, W. 2005. Proline as a measure of stress in tomato plants. *Plant Science*. 168(1): 241-248.
- Cuevas, C. 2006. Soil inoculation with *Trichoderma pseudokoningii* rifai enhances yield of rice. *Philippine Journal of Science*. 135(1): 31-37.
- D'Haese, D., Vandermeiren, K., Caubergs, R. J., Guisez, Y., Temmerman, L. D. and Horemans, N. 2004. Non-photochemical quenching kinetics during the dark to light transition in relation to the formation of antheraxanthin and zeaxanthin. *Journal of Theoretical Biology*. 227:175-186.
- Delauney, A.J. and Verna, D.P.S. 1993. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant Journal*. 4: 215-223.
- Demiral, T. and Turkan, I. 2005. Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense system and proline content in root of two rice cultivars differing in salt tolerance. 2005. *Environmental and Experimental Botany*. 53: 247-257.
- DeRonde, J.A., Van Der Mescht, A. and Steyn, H.S.F. 2000. Proline accumulation in response to drought and heat stress in cotton. *African Crop Science Journal*. 8: 85-92.
- Deshmukh, S., Huckelhoven, R., Schafer, P., Imani J., Sharma M., Weiss M., Waller F. and Kogel K.H. 2006. The root endophytic fungus *Piriformospora indica* requires host cell death for proliferation during mutualistic symbiosis with barley. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 103:18450-18457.
- Di Toppi, L.S. and Gabbriellini, R. 1999. Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany*. 41(2): 105-130.
- Dieriga, D.A., Grieve, M.C. and Shannon, M.C. 2003. Selection for salt tolerance in *lesquerella fendleri*. *Industrial Crops and Products*. 17: 15-22.
- Dixon, D.P., Cummins, I., Cole, D.J. and Edwards, R. 1998. Glutathione-mediated detoxification systems in plants. *Current Opinion in Plant Biology*. 1:258-266.
- Dolatabadi, H.K., Goltapeh, E.M., Jaimand, K., Rohani, N. and Varma, A. 2011. Effects of *Piriformospora indica* and *Sebacina vermifera* on growth and yield of essential oil in fennel (*Foeniculum vulgare*) under greenhouse conditions. *Journal of Basic Microbiology*. 51:33-39.
- Dolatabadi, H.K., Goltapeh, E.M., Mohammadi, N., Rabiey, M., Rohani, N. and Varma, A. 2012. Biocontrol potential of root endophytic fungi and trichoderma species against fusarium wilt of lentil under in vitro and greenhouse conditions. *Journal of Agricultural Science and Technology*. 14: 407-420
- Dong, J.Z., Wang, Y. Wang, S.H. Yin, L.P. and Zhanga, M.Z. 2013. Selenium increases chlorogenic acid, chlorophyll and malondialdehyde of wheat leaves. *Journal Science Food Agriculture*. 93: 310-315.

- Druege, U., Baltruschat, H. and Franken, P. 2007. *Piriformospora indica* promotes adventitious root formation in cuttings. *Scientia Horticulturae*. 112: 422-426
- Dubey, S.C., Suresh, M. and Singh, B. 2007. Evaluation of *Trichoderma* species against *Fusarium oxysporum* f. sp. *Ciceris* for integrated management of chickpea wilt. *Biological Control*. 40: 118-127.
- Egneus, H., Heber, U. and Krik, M. 1975. Reduction of oxygen by the electron chain of chloroplasts during assimilation of carbon dioxide. *Biochimica et Biophysica Acta*. 408: 252-268.
- Evans, W.C. and J.F. Lampard. 1972. Alkaloids of *Datura suaveolens*. *Phytochemistry*. 11(11): 3293-3298.
- Farooq, M, Wahid, A. and Lee, D.J. 2009. Exogenously applied polyamines increase drought tolerance of rice by improving leaf water status, photosynthesis and membrane properties. *Acta Physiologiae Plantarum*. 31: 937-945
- Feng, G., Zhang, F. S. Li, X. L., Tian, C.Y. Tang, C. and Rengel, Z. 2002. Improved tolerance of maize plants to salt stress by arbuscular mycorrhiza is related to higher accumulation of soluble sugars in roots. *Mycorrhiza*. 12:185–190.
- Foyer, C.H. and Harbinson, J. 1994. Oxygen metabolism and the regulation of photosynthetic electron transport. In: Foyer, C.H. and Mul 1 ineaux, P.M. (Eds). “Causes of photooxidative stress and amelioration of defense system in plants”. CRC Press, Boca Raton. Pp: 1-14.
- Foyer, C.H. and Nector, G. 2000. Oxygen processing in photosynthesis regulation and signaling. *New Phytologist*. 46:359-388.
- Foyer, C.H. and Noctor, G. 2005. Oxidant and antioxidant signaling in plants: a re-evaluation of the concept oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell and Environment*. 28:1056-1071.
- Fracheboud, Y. 2006. Using chlorophyll fluorescence to study photosynthesis. Institute of Plant Sciences ETH, Universitatstress, CH-8092 Zurich.
- Fricke, W. and Peter, W.S. 2002. The biophysics of leaf growth in salt-stressed barley. A Study at the cell level. *Plant Physiology*. 1: 374–388.
- Galston, A.W., Kaur-Sawhney, R., Altabella, T. and Tiburcio, A.F. 1997. Plant polyamines in reproductive activity and response to abiotic stress. *Botanica Acta*. 110: 197-207.
- Garg, N. and Manchanda, G. 2009. Role of Arbuscular Mycorrhizae in the Alleviation of Ionic, Osmotic and Oxidative Stresses Induced by Salinity in *Cajanus cajan* (L.) Mill sp. (pigeon pea). *Journal Agronomy and Crop Science*. 195: 110–123.
- Genty, B., Briantais, J.M. and Baker, N.R. 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and photochemical quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 990: 87-92.
- Genty, B., Briantais, J.M. and Baker, N.R. 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and photochemical quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 990: 87-92.
- Ghafiyehsanj, E., Dilmaghani, K. and Hekmat Shoar, H. 2013. The effects of salicylic acid on some of biochemical characteristics of wheat (*Triticum aestivum* L.) under salinity stress. *Annals of Biological Research*. 4(6): 242-248.
- Ghahfarokhi, M.R., Goltapeh, E.M., Purjam, E., Pakdaman, B.S., Modarres Sanavy, S.A.M. and Varma, A. 2011. Potential of mycorrhiza-like fungi and *Trichoderma* species in biocontrol of Take-all Disease of wheat under greenhouse condition. *Journal of Agricultural Technology*. 7(1): 185-195.
- Ghahfarokhi, R.M. and Goltapeh, M.E. 2010. Potential of the root endophytic fungus *Piriformospora indica*; *Sebacina vermifera* and *Trichoderma* species in biocontrol of take-

- all disease of wheat *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* in vitro. *Journal of Agricultural Technology*. 6(1): 11-18.
- Gharineh, M.H., Nadian, H., Fathi G., Siadat, A. and Maadi, B. 2009. Role of *arbuscular mycorrhizae* in development of salt-tolerance of *Trifolium alexandrinum* plants under salinity stress. *Journal of Food Agriculture and Environment*. 7: 432-437.
- Giannopolitis, C.N. and Ries, S.K. 1977. Superoxide dismutases I. Occurrence in higher plants. *Plant physiology*. 59: 309-314.
- Glycoside content and expression level of vital genes in the steviol glycosides biosynthesis pathway of *Stevia rebaudiana* (Bertoni). *International Journal of Genetics*. 7 (1), 153-160.
- Goncalves, J.F. C., Santos, U.M., Nina, A. and Chevreuil, L.R. 2007. Energetic flux and performance index in copaiba (*Copaifera multijuga* Hayna) and mahogany (*Swietenia macrophylla* King) seedling grown under two irradiance environments. *Brazilian Journal of Plant Physiology*. 19:171-184.
- Goyal, S.K., Samsher, R. and Goyal, R.K. 2010. *Stevia (Stevia rebaudiana)* a bio-sweetener: A review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 61: 1-10.
- Gravel, V., Antoun, H. and Tweddell. R.J. 2007. Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: Possible role of indole acetic acid (IAA). *Soil Biology and Biochemistry*. 39: 1968-1977.
- Guimarães, P.S., Bernini, C.S., Pedroso, F. and Paterniani, M. 2014. Characterizing corn hybrids (*Zea mays* L.) for water shortage by principal components analysis. *Maydica*. 59: 72-79.
- Gupta, P., Sharma, S. and Saxena, S. 2014. Effect of salts (NaCl and Na₂CO₃) on callus and suspension culture of *Stevia rebaudiana* for steviol glycoside production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 172 (6), 2894-2906.
- Habibi, S., Mskrbashy, M., and Farzaneh, M. 2014. Effect of three species of mycorrhizal fungi (*Glomus spp.*) on physiological indices of wheat in saline conditions. *Plant Prod. Science Journal of Agricultural*. 37 (3): 53-36.
- Hajieghrari, B. 2010. Effect of some metal-containing compounds and fertilizers on mycoparasite *Trichoderma* species mycella growth response. *African Journal of Biotechnology*. 26: 4025- 4033.
- Hajinia, S, Zarea, M.J., Mohammadi Goltapeh, E. and Rejali, F.A. 2011. Investigating the efficacy of endophytic fungus *Piriformospora indica* and *Azospirillum* strains on alleviation of detrimental effect of salt stress on wheat (*Triticum aestivum* cv. *Sardari*). *Environmental Stresses in Crop Sciences*. 4(1): 21-31.
- Han, H.S., Supanjani, K. and Lee, D. 2006. Effect of co-inoculation with phosphate and potassium solubilizing bacteria on mineral uptake and growth of pepper and cucumber. *Plant Soil Environment*. 52: 130–136.
- Harman, G.E. 2006. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology*. 96: 190-194.
- Hayat R., Safdar Ali S., Amara U., Khalid R. and Ahmed I. (2010) Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Annals Microbiology*. 60:579–598.
- Hearn, L.K. and Subedi, P.P.2009. Determining levels of steviol glycosides in the leaves of *Stevia rebaudiana* by near infrared reflectance spectroscopy. *Journal of Food Composition and Analysis*. 22(2): 165-168.
- Helmut, B., Fodor, J. and Harrach, B. D. 2008. Blackwell Publishing Ltd Salt tolerance of barley induced by the root endophyte *Piriformospora indica* is associated with a strong increase in antioxidants. *New Phytologist*. 180: 501- 510.

- Hermossa, R., Viterbo, A., Chet, I. and Mont, E. 2012. Plant-beneficial effects of Trichoderma and of its genes. *Microbiology*. 158, 17–25.
- Hung, S.H., Yu, C.W., and Lin, C.H. 2005. Hydrogen peroxide function as a stress signal in plants. *Journal of Botanical Bulletin Academic Sinica*. 46(1), p. 10.
- Hussein, M., Nadia, M., EL-Geready, H.M., and EL-Desuki, M. 2006. Role of putrescine in resistance to salinity of pea plants (*Pisum sativum* L.). *Journal of Applied Science Research*. 2(9): 598-604.
- Jamil, M., Bashir, S., Anwar, S., Bibi, S., Bangash, A., Ullah, F. and Shikrha, E. 2012. Effect of salinity on physiological and biochemical characteristics of different varieties of rice. *Pakistan Journal Botany*. 44: 7-13.
- Jaroslov, P., Brabora, H. and Tuulia, H. 2007. Characterisation of Steviol Rebaudiana by Comprehensive Two Dimensional Liquid Chromatography Time of Flight Mass Spectrometry. 1150p.
- Jiang, L. and Yang, H. 2009. Promethylene-induced oxidative stress and impact on antioxidant enzymes in wheat. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 72:1687-1693.
- Jubany-Mari, T., Prinsen, E., Munne-Bosch, S. and Alegre, L. 2010. The timing of methyl jasmonate, hydrogen peroxide and ascorbate accumulation during water deficit and subsequent recovery in the Mediterranean shrub *Cistus albidus* L. *Environmental and Experimental Botany*. 69:47-55.
- Jumpponen, A. 2001. Dark septate endophytes are they mycorrhizal. *Mycorrhiza*. 11 (2): 207-211.
- Jungwook, Y., Kloepper, J.W. and Ryu, C.M. 2009. Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends in Plant Science*. 14(1): 1-4.
- Kadian, N., Yadav, K., Badda, N. and Aggarwal, A. 2013. AM fungi ameliorates growth, yield and nutrient uptake in *Cicer arietinum* L. Under salt stress. *Russian Agricultural Sciences*. 39: 321-329.
- Kanzok, S.M., Fechner, A., Bauer, H., Ulschmid, J.K, Muller, H.M., Botella, J., Schneuwly, S., Schirmer, R. and Becker, K. 2001. Substitution of the thioredoxin system for glutathione reductase in *Drosophila melanogaster*. *Science*. 291: 643-646.
- Karimi, F., Sepehri, M., Afyuni, M. and Hajabbasi, M.A. 2011. Proceedings of the international conference on environmental science and technology. Rhodes, Greece. 8-10 September.
- Kaur-awhney, R., Tiburcio, A., Altabella, T. and Galton, W. 2003. Polyamines in plants: An overview. *Journal of Cell and Molecular Biology*. 2(1): 1-12.
- Kaur-awhney, R., Tiburcio, A., Altabella, T. and Galton, W. 2003. Polyamines in plants: An overview. *Journal of Cell and Molecular Biology*. 2(1): 1-12.
- Kaya, C., Ashraf, M. and Dikilitas, M. 2013. Alleviation of salt stress-induced adverse effects on maize plants by exogenous application of indole acetic acid (IAA) and inorganic nutrients-A field trial. *Australian Journal Crop Science*. 7: 249–254
- Kerepesi, I. and Galiba, G. 2000. Osmotic and salt stress-induced alteration in soluble carbohydrate content in wheat seedlings. *Crop Science*. 40: 482-487.
- Khademian, R., Asghari, B., Sedaghati, B. and Yaghoobian, Y. 2019. Plant beneficial rhizospheric microorganisms (PBRMs) mitigate deleterious effects of salinity in sesame (*Sesamum indicum* L.): Physio-biochemical properties, fatty acids composition and secondary metabolites content. *Industrial Crops and Products*. Vol. 136, no., pp. 129-139.
- Khan, A.S., Zora, S. and Abbasi, N.A. 2007. Pre-storage putrescine application suppresses ethylene biosynthesis and retards fruit softening during low temperature storage in Angelino plum. *Postharvest Biology and Technology*. 46(1): 36-46.

- Khan, A.S., Zora, S., and Abbasi, N.A. 2007. Pre-storage putrescine application suppresses ethylenebiosynthesis and retards fruit softening during low temperature storage in Angelino plum. *Postharvest Biology and Technology*. 46(1): 36-46.
- Kharkwal, A. C., Prasad, R., Kharkwal, H., Das, A., Bhatnagar, K., Sherameti, I., Oelmüller, R. and Varma, A. 2007. Co-Cultivation with Sebaciniales. In: *Soil Biology*. (Volume 11. *Advanced Techniques in Soil Microbiology*). Eds. A. Varma, R. Oelmüller, Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Pp: 247-270.
- Khoshbakht, D., Asghari, M.R. and Haghghi, M. 2018. Effects of foliar applications of nitric oxide and 158permidine on chlorophyll fluorescence, photosynthesis and antioxidant enzyme activities of citrus seedlings under salinity stress. *Photosynthetica*. 56(4), pp. 1313-1325
- Kiani, D., Soltanloo, H. and Ramezanpour, S.S. 2017. A barley mutant with improved salt tolerance through ion homeostasis and ROS scavenging under salt stress. *Acta Physiologiae Plantarum*. 4(12): 197-203.
- Kilam, D., Saifi, M., Abdin, M.Z, Agnihotri, A. and Varma, A. 2017. Endophytic root fungus *Piriformospora indica* affects transcription of steviol biosynthesis genes and enhances production of steviol glycosides in *Stevia rebaudiana*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 1-9.
- Kinghorn, A.D., Yasukawa, K., Kitanaka, S. and Seo, S. 2002. Inhibitory effect of stevioside on tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in two-stage carcinogenesis in mouse skin. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 25(11): 1488–1490.
- Klughammer, Ch. And Schreiber, U. 2008. Complementary PS II quantum yields calculated from simple fluorescence parameters measured by PAM fluorometry and the Saturation Pulse method. *PAM Application Notes*. 1: 27-35.
- Koca, H., Bor, M., Ozdemir, F., Turkan, I. 2007. The effect of salt stress on lipid peroxidation, antioxidative enzymes and praline content of sesame cultivars. *Environmental and Experimental Botany*. 60:344-351.
- Kocheva, K., Lambrev, P., Georgiev, G., Goltsev, V. and Karabaliev, M. 2004. Evaluation of chlorophyll fluorescence and membrane injury in the leaves of barley cultivars under osmotic stress. *Bioelectrochemistry*. 63: 121-124
- Konstantinova, T., Parvanova, D., Atanassov, A. and Djilianov, D. 2002. Freezing tolerant tobacco, transformed to accumulate osmoprotectants. *Plant Science*. 163(1): 157-164.
- Kramer, D.M, Avenson, T.J., Kanazawa, A., Cruz, J.A., Ivanov, B. and Edwards, G.E. 2004. The relationship between photosynthetic electron transfer and its regulation. In: *“Chlorophyll a Fluorescence*. Springer Netherlands. Pp: 251-278.
- Krause, G. H. and Weis, E. 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 42: 313-349.
- Krishnamurthy, R. and Bhagwat, k.A. 1989. Polyamines as modulators of salt tolerance in rice cultivars. 91: 500-504.
- Kucuk, C., Kivanc, M., Kinaci, E. and Kinaci, G. 2007. Efficacy of *Trichoderma harzianum* (Rifaii) on inhibition of ascochyta blight disease of chickpea. *Annals of Microbiology*. 57: 665-668.
- Kujur, R.S., Singh, V., Ram, M., Yadava, H.N., Singh, K.K., Kumari, S. and Roy, B.K. 2010. Antidiabetic activity and phytochemical screening of crude extract of *Stevia rebaudiana* in alloxan-induced diabetic rats. *Pharmacognosy Research*. 2(4): 258–263.
- Kumar, M., Yadav, V., Tuteja, N. and Johri, A. K. 2009. Antioxidant enzyme activities in maize plants colonized with *Piriformospora indica*. *Microbiology*. 155: 780-790.
- Kumar, V., Sahai, V. and Bisaria, V.S. 2011. High-density spore production of *Piriformospora indica*, a plant growth-promoting endophyte, by optimization of nutritional and cultural parameters. *Bioresource Technology*. 102(3):3169-3175.

- Lacan, D. and Baccou, J.B. 1998. High levels of antioxidant enzymes correlate with delayed senescence in non-nettall muskmelon fruits. *Planta*. 204:377-382.
- Lailerd, N., Saengirisuwan, V., Sloniger, J.A., Toskulkao, C. and Henriksen, E.J. 2004. Effect of stevioside on glucose transport activity in insulin-sensitive and insulin-resistant rat skeletal muscle. *Metabolism*. 53:101-107.
- Lazar, D. 1999. Chlorophyll a fluorescence induction. *Biochemical and Biophysical Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. 1412:1-28.
- Lee, M.H., Lee, S.H. and Park, K.Y. 1997. Effects of spermine on ethylene biosynthesis in cut carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) flowers during senescence. *Journal of Plant Physiology*. 151: 68-73.
- Lee, M.H., Lee, S.H. and Park, K.Y. 1997. Effects of spermine on ethylene biosynthesis in cut carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) flowers during senescence. *Journal of Plant Physiology*. 151: 68-73.
- Levitt, J. 1980. *Responses of Plants to Environmental Stresses*. Academic Press, New York, 607p.
- Li, G., Wan, S. W., Zhou, J., Yang, Z. Y., and Qin, P. 2010. Leaf chlorophyll fluorescence, hyperspectral reflectance, pigments content, malondialdehyde and proline accumulation responses of castor bean (*Ricinus communis* L.) seedlings to salt stress levels. *Industrial Crop and Producta*. 31:13-19.
- Li, Q., Yang, A. and Zhang, W.H. 2017. Comparative studies on tolerance of rice genotypes differing in their tolerance to moderate salt stress. – *BMC Plant Biology*.: doi: 10.1186/s12870-017-1089-0.
- Lichtenthaler, H.K. and Buschmann, C. 2001. Chlorophylls and Carotenoids Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*.
- Liu, J. H., H. Kitashiba, J. Wang, Y. Ban and T. Moriguchi. 2007. Polyamines and their ability to provide environmental stress tolerance to plants. *Plant Biotechnology Journal*. 24: 117-126
- Liu, J.H., Kitashiba, H., Wang, J., Ban, Y. and Moriguchi, T. 2007. Polyamines and their ability to provide environmental stress tolerance to plants. *Plant Biotechnology*. 24: 117-126.
- Liu, J.H., Kitashiba, H., Wang, J., Ban, Y., and Moriguchi, T. 2007. Polyamines and their ability to provide environmental stress tolerance to plants. *Plant Biotechnology*. 24(1): 117-126.
- Liu, Z. J., Zhang, X. L., Bai, J. G., Suo, B. X., Xu, P. L. and Wang, L. 2009. Exogenous paraquat changes antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in drought-stressed cucumber leaves. *Scientia Horticulturae*. 121:138-143.
- Lomonte, C., Sgherri, C., Baker, A. J. M., Kolev, S.D. and Navari-Izzo, F. 2010. Antioxidative response of *Atriplex codonocarpa* to mercury. *Environmental and Experimental Botany*. 69:9–16.
- Lutts, S., Kinet, J.M., Bouharmont, J. 1996. NaCl-induced senescence in leaves of rice (*Oryza sativa* L) cultivars differing in salinity resistance. *Annales Botanici Fennici*. 78: 389-398.
- Lynch, J.M., Wilson, K.L., Ousley, M.A. and Whipps, J.M. 1991. Response of lettuce to *Trichoderma* treatment. *Letters Applied Microbiology*. 12: 59-61.
- Madan, S., Sayeed, A., Singh, G.N., Kohli, K., Singh, Y.K.R. and Garg, M. 2010. *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni-A Review. *Indian Journal of Natural Products and Resources*. 1(3): 267-287.

- Mahgoub, M.H., Abd El Aziz, N.G. and Mazhar, M.A. 2011. Response of *Dahlia pinnata* L. plant to foliar spray with putrescine and thiamine on growth, flowering and photosynthetic pigments. *American Journal of Agricultural Environmental Science*. 10: 769-775. 19.
- Mahros, K.M., El-Saady, M.B., Mahgoub, M.H., Afaf, M.H. and El-Sayed, M.I. 2011. Effect of putrescine and uniconazole treatments on flower characters and photosynthetic pigments of *Chrysanthemum indicum* L. *Plant. Journal of American Science*. 7(3), 399-408.
- Malla, R., Prasad, R., Kumari, R., Giang, P.H., Pokharel, U., Oelmüller, R. and Varma, A. 2004. Phosphorus solubilizing symbiotic fungus: *Piriformospora indica*. *Endocytobiosis Cell Research*. 15:579-600.
- Manchanda, G. and Garg, N. 2008. Salinity and its effects on the functional biology of legumes. *Acta Physiologia Plantarum*. 30: 595-618.
- Mandel, S., Upadhyay, S., Singh, V. P. and Kapoor, R. 2015. Enhanced production of steviol glycosides in mycorrhizal plants: A concerted effect of arbuscular mycorrhizal symbiosis on transcription of biosynthetic genes. *Plant Physiology and Biochemistry*. 89: 100-106
- Marco, F., R. Alcazar, A. F. Tiburcio and Carasco, P. 2011. Interactions between polyamines and abiotic stress pathway responses .*OMICS*. 15(11): 775-781
- Masojidek, J., Trivedi, S., Halshaw, L., Alexiou, A. and Hall, D. O. 1991. The synergetic effect of drought and light stress in sorghum and pearl millet. *Plant Physiology*. 96: 198-207.
- Mastouri, F., Björkman, T. and Harman, G.E. 2010. Seed treatment with *Trichoderma harzianum* alleviates biotic, abiotic, and physiological stresses in germinating seeds and seedlings. *Phytopathology*. 100(11):1213-1221.
- Mathur, N. and Vyas, A. 1996. Biochemical changes in *Ziziphus xylopyrus* by VA mycorrhizae. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*., 37.
- Maxwell, K. and Johnson, G.N. 2000. Chlorophyll fluorescence-a practical guide. *Journal of Experimental Botany*. 51(345): 659-668.
- Mazhabi, M., Nemati, H., Rouhani, H., Tehranifar, A., Moghadam, E.M., Kaveh, H. and Rezaee, A. 2011. The effect of *Trichoderma* on polianthes qualitative and quantitative properties. *Journal of Animal and Plant Sciences*. 21(3): 617-621.
- Mehta, P., Jajoo, A., Mathur, S. and Bharti, S. 2010. Chlorophyll a fluorescence study revealing effects of high salt stress on photosystem II in wheat leaves. *Plant Physiology and Biochemistry*. 48: 16-20.
- Meincke, R., Weinert, N., Radi, V., Schloter, M., Smallas, K. and Berg, G. 2010. Development of a molecular approach to describe the composition of *Trichoderma* communities. *Journal of Microbiological Methods*. 80: 63–69.
- 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.
- Mohammadkhani, N. and Heidari, R. 2008. Effects of drought stress on soluble proteins in two maize varieties. *Turkish Journal of Biology*. 32(1): 23-30.
- Moradi Peynevandi, K. Razavi, S. M. and Zahri, S. 2018. The ameliorating effects of polyamine supplement on physiological and biochemical parameters of *Stevia rebaudiana* Bertoni under cold stress. *Plant Production Science*. VOL. 21, NO. 2, 123–131
- Mottaghian, A, Pirdashti, H, Bahmanyar, M.A., Shahsavari, A. and Hasanpour, R. 2009. Effect of three *Trichoderma* species and different amounts of enriched municipal waste compost on growth parameters in spinach (*Spinacia oleracea*). 5th International Scientific Conference of Iran and Russia on Agricultural Development Problems. Saint Petersburg, Russia. Pp: 267-270.

- Muller, P., Li, X., Niyogi, K.K. 2001. Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiology*. 125:1558-1566.
- Munns, R. 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environmental*. 25: 239-250.
- Munns, R. and James, R.A. 2003. Screening methods for salinity tolerance: a case study with tetraploid wheat. *Plant and Soil*. 253: 201-218.
- Munns, R. and Tester, M. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology*. 59: 651–681.
- Nowak, G., Grant, D.F. and Moran, J.H. 2004. Linoleic acid epoxide promotes the maintenance of mitochondrial function and active Na⁺ transport following hypoxia. *Toxicology Letters*. 147:161-175.
- Oelmuller, R., Sherameti, I., Tripathi, S. and Varma, A. 2009. *Piriformospora indica*, a cultivable root endophyte with multiple biotechnological applications. *Symbiosis*. 49:1-17.
- Omokolo, N.D., Tsala, N.G. and Djocgoue, P.F. 1996. Changes in carbohydrate, amino acid and phenol content in cocoa pods from three clones after infection with *Phytophthora megakarya* Bra. And Grif. *Annales Botanici Fennici*. 77: 153-158.
- Orcutt, D.M., and Nilsen, E.T. 2000. Physiology of Plants under stress soil and biotic factors. John Wiley and Sons Inc. KA/PP, p.177-235.
- Ouzounidou, G., Ilias, I., Tranopoulou, H. and Karataglis, S. 1998. Amelioration of copper toxicity by iron on spinach physiology. *Journal of plant nutrition*. 21(10): 2089-2101.
- Overview. *Journal of Cell and Molecular Biology*. 2(1): 1-12.
- Palma, F., Carvajal, F., Jamilena, M. and Garrido, D. 2016. Putrescine treatment increases the antioxidant response and carbohydrate content in zucchini fruit stored at low temperature. *Postharvest Biology and Technology*. 118, 68–70.
- Pandey, M. and Chikara, S.K. 2015. Effect of salinity and drought stress on growth parameters,
- Parida, A.K. and Das, A.B. 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 60: 324-349.
- Parvaiz, A. and Satyawati, S. 2008. Salt stress and phyto-biochemical responses of plants. *Plant Soil and Environment*. 54: 89-99.
- Parvin, S., Lee, O.R., Sathiyaraj, G., Khorolragchaa, A., Kim, Y.J. and Yang, D.C. 2014. Spermidine alleviates the growth of saline-stressed ginseng seedlings through antioxidative defense system. *Gene*. 537, 70-78.
- Patakas, A. 2000. Changes in the solutes contributing to osmotic potential during leaf ontogeny in grapevine leaves. *American Journal of Enology and Viticulture*. 51 (3): 223-226.
- Peng, J., Liu, J., Zhang, L., Lou, J., Dong, H., Ma, Y., Zho, X., Chen, B., Sui, N., Zhou, Z. and Meng, Y. 2016. Effects of Soil Salinity on Sucrose Metabolism in Cotton Leaves. *National Libraray of Medicine*. 11(5): 156-162.
- Petridis, A., Therios, I., Samouris, G., Koundouras, S. and Giannakoula, A. 2012. Effect of water deficit on leaf phenolic composition, gas exchange, oxidative damage and antioxidant activity of four Greek olive (*Olea europaea* L.) cultivars. *Plant Physiology and Biochemistry*. 60: 1-11.
- Pirdashti, H., Yaghoubian, Y., Mohammadi Goltapeh, E. and Hosseini, S.J. 2012. Effect of mycorrhiza-like endophyte (*Sebacina vermifera*) on growth, yield and nutrition of rice (*Oryza sativa* L.) under salt stress. *Journal of Agricultural Technology*. 8(5): 1651-1661.
- Polle, A. and Luo, Z.B. 2014. Biotic and abiotic interactions in plants: Novel ideas for agriculture and forestry in a changing environment. *Environmental and Experimental Botany*. (108), pp. 1-3.

- Prasad, R., Kamal, S., Sharma, P.K., Oelmüller, R. and Varma, A. 2013. Root endophyte *Piriformospora indica* DSM 11827 alters plant morphology, enhances biomass and antioxidant activity of medicinal plant *Bacopa monniera*. *Journal of Basic Microbiology*. 53: 1016-1024
- Quiles, M.J. and López, N. I. 2004. Photoinhibition of photosystems I and II induced by exposure to high light intensity during oat plant grown effects on the chloroplastic NADH dehydrogenase complex. *Plant Science*. 166:815-823.
- Radhakrishnan, R. and Lee, I.J. 2013. Ameliorative effects of spermine against osmotic stress through antioxidants and abscisic acid changes in soybean pods and seeds. *Acta Physiologiae Plantarum*. 35:263-269.
- Radwan, M.B., Fadel, A.M. and Mohammad, I.A.M. 2006. Biological control of *Sclerotium rolfsii* by using indigenous *Trichoderma spp.* Isolates from 162permidin hebron university. *Hebron University Research Journal*. 2(2): 27-47.
- Rahmani, F., Peymani, A. and Hassanzadeh, A. 2017. Comparison of biochemical and molecular responses of two *Brassica napus* L. cultivars differing in drought tolerance to salt stress. *Journal of Plant Physiology*. 2(3): 321-330.
- Rai, M. and Varma, A. 2005. Arbuscular mycorrhiza-like biotechnological potential of *Piriformospora indica*, which promotes the growth of *Adhatoda vasica* Nees. *Electron Journal of Biotechnology*. 8:107-112.
- Rai, M., and Varma, A. 2005. Arbuscular mycorrhiza-like biotechnological potential of *Piriformospora indica*, which promotes the growth of *Adhatoda vasica*. *Electronic Journal of Biotechnology*. 8: 107-111.
- Rasheed, R., Ashraf, M.A., Parveen, S., Iqbal, M. and Iqbal, H. 2014. Effect of salt stress on different growth and biochemical attributes in two canolla (*Brassica napus* L.) Cultivars. *Communication in Soil Science and Plant Analysis*. 45: 669-679
- Rengasamy, P. 2010. Soil processes affecting crop production in salt-affected soils. *Functional Plant Biology*. 37(7), 613-620.
- Ritchie, S.W. and Nguyen H. T. 1990. Leaf water content and gas exchange parameters of two wheat genotypes differing in drought resistance. *Crop Science*. 30: 105-111.
- Roychoudhury, A., Basu, S. and Sengupta, D.N. 2011. Amelioration of salinity stress by exogenously applied 162permidine or spermine in three varieties of indica rice differing in their level of salt tolerance. *Journal of plant physiology*. 168, 317-328.
- Rubinowska, K., Pogroszewska, E. and Michalek, W. 2012. The effect of polyamines on physiological parameters of post-harvest quality of cut stems of *Rosa 'Red Berlin'*. *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus*. 11, 81-93.
- Sairam, R. K., Veerabhadra Rao, K. And Srivastava, G.C. 2002. Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. *Plant Science*. 163:1037-/1046
- Sairam, R.K., Veerabhadra Rao, K. And Srivastava, G.C. 2002. Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. *Plant Science*. 163:1037-/1046
- Savouré, A., Thorin, D., Davey, M., Hua, X.J., Mauro, S., Van Montagu, M., Inze, D. and Verbruggen, N. 1999. NaCl and CuSO₄ treatments trigger distinct oxidative defence mechanisms in *Nicotiana plumbaginifolia* L. *Plant, Cell and Environment*. 22(4): 387-396.
- Sayed, O. H. 2003. Chlorophyll fluorescence as a tool in cereal crop research. *Photosynthetica*. 41(3): 321-330.
- Schreiber, U., Schliwa, U. and Bilger, W. 1986. Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynthesis Research*. 10: 51-62.

- Schultz, H. 2003. Differences in hydraulic architecture account for near-isohydric and anisohydric 163permidi of two field-grown *Vitis vinifera* L. cultivars during drought. *Plant, Cell and Environment*. 26:1393-1405.
- 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 barleygrass*) and *Hordeum vulgare* L. (cultivated barley). *Environmental and Experimental Botany*. 69(1): 76-85.
- Seiler, N. and Raul, F. 2005. Polyamines and apoptosis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 9: 623-642. 27.
- Serodio, J., Cruz, S., Vierira, S. and Brotas, V. 2005. Non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence and operation of the xanthophyll cycle in estuarine microphytobenthos. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 326:157-169.
- Shahollari, B., Vadassery, J., Varma, A. and Oelmüller, R. 2007. A leucine-rich repeat protein is required for growth promotion and enhanced seed production mediated by the endophytic fungus *Piriformospora indica* in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*. 50: 1–13.
- Shahsavari, A., Pirdashti, H., Motaghiyan, A. and Tajik Ghanbari, M.A. 2010. Response of wheat (*Triticum aestivum* L.) growth parameters and yield to co-inoculation of farmyard manure, *Trichoderma* spp. And *Pseudomonas* spp. *Journal of Agroecology*. 2 (3), 448-458.
- Shao, H. B., Chu, L. Y. and Jaleel, C.A. 2008. Water-deficit stress-induced anatomical changes in higher plants. *Comptes Rendus Biologies*. 331: 215-25.
- Sharma, D.K., Dubey, A.K., Srivastav, M., Singh, A.K., Sairam, R.K., Pandey, R.N., Dahuja, A. and Kaur, C. 2011. Effect of putrescine and paclobutrazol on growth, physiochemical parameters, and nutrient acquisition of salt-sensitive citrus rootstock Karna khatta (*Citrus karna* Raf.) under NaCl Stress. *Journal of Plant Growth Regulation*. 30:301-311.
- Sharma, H. S. S., Kilpatrick, M., Ward, F., Lyons, G. and Burns, L. 1999. Colonization of phase II compost by biotypes of *Trichoderma harzianum* and their effect on mushroom yield and quality. *Applied Microbiology Biotechnology*. 51: 572-578.
- Sheng, M., Tang, M., Chen, H., Yang, B., Zhang, F., and Huang, Y. 2008. Influence of arbuscular mycorrhizae on photosynthesis and water status of maize plants under salt stress. *Mycorrhiza*. 18: 287—296
- Sherameti, I., Tripathi, S., Varma, A. and Oelmüller, R. 2008. The root-colonizing endophyte *Piriformospora indica* confers drought tolerance in *Arabidopsis* by stimulating the expression of drought stress-related genes in leaves. *Molecular Plant-Microbe Interaction*. 21:799-807.
- Shigeoka, S., Ishikawa, T., Tamoi, M., Miyagawa, Y., Takeda, T., Yabuta, Y. and Yoshimura, K. 2002. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *Journal of Experimental Botany*. 53:1305–1319
- Singh, A. and Prasad, R.. 2009. Salt stress effects growth and cell wall bound enzymes in *Arachis hypogaea* L. seedlings. *Int. J. Integ. Biol*. 7(2): 117-123.
- Siringam, K., Juntawong, N., Cha-um, S. and Kirdmanee, C. 2011. Salt stress induced ion accumulation, ion homeostasis, membrane injury and sugar contents in salt-sensitive rice (*Oryza sativa* L. spp. Indica) roots under 163permidin conditions. *African Journal of Biotechnology*.10: 8.1340-1346.
- Sofy, M.R., and Fouda, H.M. 2013. Spermidine as modulator of growth, some metabolic activities and reproductive development of *Helianthus tuberosus* plants grown in two types of soil. *Nature and Science*, 11, 161–171.
- Stefanov, D. and Terashima, I. 2008. Non-photochemical loss in PSII in high- and low-light-grown leaves of *Vicia faba* quantified by several fluorescence parameters including LNP, F0/Fm, a novel parameter. *Physiologia Plantarum*. 133:327-338.

- Stewart, R. R.C. and Bewley, J.D. 1980. Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes. *Plant Physiology*. 65:245–248.
- Subramanyam, R., Jolley, C., Brune, D.C., Fromme, P. and Webber, A.N. 2006. Characterization of a novel Photosystem I–LHCI supercomplex isolated from *Chlamydomonas reinhardtii* under anaerobic (State II) conditions. *FEBS Letters*. 580: 233–238.
- Sun, C., Johnson, J.M., Cai, D., Sherameti, I., Oelmüller, R. and Lou, B. 2010. *Piriformospora indica* confers drought tolerance in Chinese cabbage leaves by stimulating antioxidant enzymes, the expression of drought-related genes and the plastid-localized CAS protein. *Journal of Plant Physiology* 167: 1009-1017.
- Sun, Ch., 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.
- Sun, Y. M., Horng, C. Y., Chang, F.L., Cheng, L.C. and Tian, W.X. 2010. Biosorption of lead, mercury and cadmium ions by *Aspergillus terreus* immobilized in a natural matrix. *Polish Journal Microbiology*. 59(1): 37-44.
- Swanson, S.M., Mahady, G.B. and Beecher, C.W.W. 1992. Stevioside biosynthesis by callus, root, shoot and rooted-shoot cultures in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 28: 151-157.
- Syed Sarfraz, H, Muhammad, A., Maqbool, A. and Kadambot, H.M. 2011. Polyamines: Natural and engineered abiotic and biotic stress tolerance in plants. *Biotechnology Advances*. 29: 300-311.
- Taffouo, V.D., Kemdem Kouamou, J., Tchiengue Ngalangue, L.M., Nandjou Ndjeudji, B.A., and Amougou, A. 2009. Effects of salinity stress on growth, ions partitioning and yield of some cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) cultivars. *International Journal Botany*. 5: 2, 135-145.
- Talaat, I. M., M. A. Bekheta and M. H. Mahgoub. 2005. Physiological response of periwinkle plants (*Catharanthus roseus* L.) to tryptophan and putrescine. *Int. J. Agric. Biol.* 7(2): 210-213.
- 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 scorba* L.) zygotic embryos. *Plant Physiology Biochemistry*. 43:760-769.
- Tavarini, S. and Angelini, L.G. 2013. *Stevia rebaudiana* Bertoni as a source of bioactive compounds: the effect of harvest time, experimental site and crop age on steviol glycoside content and antioxidant properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 93(9), 2121-2129
- Tian, J., Wang, L.P., Yang, Y.J., Sun, J. and Guo, S.R. 2012. Exogenous spermidine alleviates the oxidative damage in cucumber seedlings subjected to high temperatures. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 137, 11-19.
- Tjamos, E.C., Papavizas, G.C. and Cook, R.J. 1992. Biological control of plant diseases. Progress and challenges for the future. Plenum Press, New York. 5.
- Toumadse, A., and Richardson, D.G. 1988. Endogenous polyamine concentrations during development, storage and ripening of pear fruits. *Phytochemistry*. 27: 335-338.
- Unal, D., Tuney, I., and Sukatar, A. 2007. The role of external polyamines on photosynthetic responses, lipid peroxidation, protein and chlorophyll a content under the UV-A (352 nm) stress in *Physica semipinnata*. *Journal of Photochemistry and Photobiology*. 90: 64-68.
- Varma, A., Bakshi, M., Lou, B., Hartmann, A. and Oelmüller, R. 2012. *Piriformospora indica*: A Novel Plant Growth-Promoting Mycorrhizal Fungus. *Journal of Agricultural Research*. 1(2):117-131.

- Varma, A., Sheramati, I., and Tripathi, S. 2012. The Symbiotic Fungus *Piriformospora indica*. Review. In Hock B (eds). Fungal Associations. 2nd Ed. Berlin: Springer pp. 231-154.
- Varma, A., Verma, S., Sudha Sahay, N. S., Bütehorn, B., and Franken, P. 1999. *Piriformospora indica*, a cultivable plant growth promoting root endophyte. Applied Environmental Microbiology. 65: 2741-4.
- Velázquez-Robledo, R., Contreras-Cornejo, H.A., Macías-Rodríguez, L., Hernández-Morales, A., Aguirre, J., Casas-Flores, S., López-Bucio, J. and Herrera-Estrella, A. 2011. Role of the 4-phosphopantetheinyl transferase of *Trichoderma virens* in secondary metabolism, and induction of plant defense responses. Molecular Plant-Microbe Interactions Journal. 24: 1459-1471.
- Verma, S.A., Varma, A., Rexer, K.H., Hassel, A., Kost, G., Sarbhoy, A., Bisen, P., Butehorn, B. and Franken, P.H. 1998. *Piriformospora indica*, gen. et sp. Nov., a new root-colonizing fungus. Mycologia. 90(5):896-903.
- Vessey, J.K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. Plant and Soil. 255: 571-586.
- Vierheilig, H. Coughlan, A.P. Wyss, U. and Piché, Y. 1998. Ink and vinegar, a simple staining technique for arbuscular-mycorrhizal fungi. Applied and Environmental Microbiology. 64: 5004-5007.
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E.L., Marra, R., Wooo, S.L. and Lorito, M. 2008. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. Soil Biology and Biochemistry. 40: 1-10.
- Waller, F., Achatz, B., Baltruschat, H., Fodor, J., Becker, K., Fischer, M., Heier, T., Hückelhoven, R., Neumann, C., Von 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 Sciences of the United States of America. 102(38): 13386-13391.
- Waller, F., Achatz, B., Baltruschat, H., Fodor, J., Becker, K., Fischer, M., Heier, T., Huckelhoven, R., Neumann, C., and Wettstein, D. 2005. The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higheryield. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United State of American. 102: 13386–13391.
- Weisany, W., Sohrabi, Y. and Heidari G.h. 2012. Changes in antioxidant enzymes activity and plant performance by salinity stress and zinc application in soybean (*Glycine max* L.). Plant Omics. 5: 60-67.
- Weiss, M., Selosse, M.A., Rexer, K.H., Urban, A. and Oberwinkler, F. 2004. Sebaciales: a hitherto overlooked cosm of heterobasidiomycetes with a broad mycorrhizal potential. Mycological Research. 108:1003-1010.
- Xiong, F., Liao, J., Ma, Y., Wang, Y., Fang, W. and Zhu, X. 2018. The Protective Effect of Exogenous Putrescine in the Response of Tea Plants (*Camellia sinensis*) to Salt Stress. HortScience. 53, 1640-1646.
- Yaghoubian, Y., Goltapeh, E.M., Pirdashti, H., Esfandiari, E., Feizias, V., Dolatabadi, H.K. and Varma, A.. 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.
- Yaman, K., Kawasaki, M., Taniguchi, M. and Miyake, H. 2008. Correlation between chloroplast ultrastructure and chlorophyll fluorescence characteristics in the leaves of rice (*Oryza sativa* L.) grown under salinity. Plant Production Science. 11(1): 139 – 145.
- Yamazaki, J., Ohashi, A., Hashimoto, Y., Negishi, E., Kumagai, S., Kubo, T., Oikawa, T., Maruta, E. and Kamimura, Y. 2003. Effects of high light and low temperature during harsh

- winter on needle photodamage of *Abies mariesii* growing at the forest limit on Mt. Norikura in Central Japan. *Plant Science*. 165:257-264.
- Yan-ping, Z., Hai-he, L., Shu-xing, S., Cheng-he, Z. and Xin-e, H. 2010. Effect of polyamine priming on seed vigor and seedling chilling tolerance in eggplant. *Acta Horticulturae Sinica*. 37: 1783–1788.
- Yiu, J. C., Juang, L. D., Yi-Tan Fang, D., Liu, C. W. and Wu, S. J. 2008. Exogenous putrescine reduces flooding-induced oxidative damage by increasing the antioxidant properties of Welsh onion. *Scientia Horticulturae*. 120: 306-314.
- Yiu, J., Juang, L.D., Fang, D. Liu, W. and Wu, J. 2009. Exogenous putrescine reduces flooding-induced oxidative damage by increasing the antioxidant properties of Welsh onion. *Scientia Horticulttae*. 120: 306-14.
- Yordanov, I., Velikova, V., and Tsonev, T. 2003. Plant responses to drought and stress tolerance. *Plant Physiology*. p. 187-206.
- Yoshimura, K., Yabuta, Y., Ishikawa, T. and Shigeoka, S. 2000. Expression of spinach ascorbate peroxidase isoenzymes in response to oxidative stresses. *Journal of Plant Physiology*. 123 (1): 223-233.
- Zarea MJ, Chordia P and Varma A 2012. *Piriformospora indica* versus Salt Stress. In: Varma A, Kost G and Oelmuller R (Eds.) *Piriformospora indica*. Soil Biology, vol 33. Springer, Berlin, Heidelberg
- 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 & Biochemistry*. 45: 139-146.
- Zhang, F., Li X., Wang, C. and Shen, Z. 2000. Effect of cadmium on antioxidation rate of tissue and inducing accumulation of free proline in seedlings of mung bean. *Journal of Plant Nutrition*. 23: 356-368.
- Zhang, H.W., Song, Y.C. and Tan, R.X. 2006. Biology and chemistry of endophytes. *Natural product reports*. 23(5), 753-771.
- Zhang, K. and John, P.C.L. 2005. Raised level of cyclin dependent kinase after prolonged suspension culture of *Nicotiana glauca* is associated with more rapid growth and division, diminished cytoskeleton and lost capacity for regeneration: implications for instability of cultured plant cells. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 82, 295-308.
- Zhang, M.C., Duan, L.S., Tian, X.L., He, Z.P., Li, J.M., Wang, B.M. and Li, Z.H. 2007. Uniconazole-induced tolerance of soybean to water deficit stress in relation to changes in photosynthesis, hormones and antioxidant system. *Journal of Plant Physiology*. 164:709-717.
- Zhang, Q.Y., Wang, L. Y., Kong, F. Y., Deng, Y.S., Li, B. and Meng, Q.W. 2012. Constitutive accumulation of zeaxanthin in tomato alleviates salt stress-induced photoinhibition and photooxidation. *Physiologia Plantarum*. 146, 363-373.
- Zhang, S., Gan, Y. and Xu, B. 2016. Application of plant-growth-promoting fungi *Trichoderma longibrachiatum* T6 enhances tolerance of wheat to salt stress through improvement of antioxidative defense system and gene expression. *Frontiers in plant science*. 7, 1405.
- Zhu, J.K. 2001. Plant salt tolerance. *Trends in Plant Science*. 6: 66–71.
- Zhu, X., Song, F. and Liu, S. 2011. Arbuscular mycorrhiza impacts on drought stress of maize plants by lipid peroxidation, proline content and activity of antioxidant system. *Journal Food Agriculture Environment*. 9, 583-587.
- Zlatev, Z. and Yordanov, T. 2004. Effect of soil Drought on photosynthesis and chlorophyll fluorescence in bean plants. *Bulgarian Journal of Plant Physiology*. 30(3-4):3-18.
- Zlatev, Z. S. 2009. Drought-induced changes in chlorophyll fluorescence of young wheat plants. *Biotechnol and Biotechnological Equipment*. 23:438-441.

Zrig, A, Tounekti, T., Vadel, A.M., Mohamed, H.B., Valero, D., Serrano, M., Chtara, C. and Khemira, H. 2011. Possible involvement of polyphenols and polyamines in salt tolerance of almond rootstocks. *Plant Physiology and Biochemistry*. 49: 1313-1322.

Abstract

Nowadays, salt stress causes widespread damage to plants worldwide and it is one of the most important problems in agriculture. On the other hand, in recent years the role of symbiotic fungi as well as polyamines in increasing plant tolerance to saline conditions has been considered. Therefore, the present study was conducted to evaluate the effect of endophytic fungi symbiosis and spermidine foliar application on the growth of Stevia plant in response to salinity stress in two greenhouse and field experiments. In the greenhouse section, a factorial arrangement based on completely randomized design (CRD) was carried out with three replications and three factors including salinity (0, 6 and 12 dS.m⁻¹), fungal symbiosis [(non-inoculation, *Piriformospora indica* (Pi), *Trichoderma virens* (Trich), and co-inoculation of two fungi (Pi+Trich)] and spermidine foliar application (0, 0.75 and 1.5 mM). The field experiment was conducted as a split factorial arrangement based on randomized complete block design (RCBD) with three replications. The levels of field experiment factors were selected based on the results obtained from the greenhouse section. Experimental factors included salinity (0, 6 and 12 dS.m⁻¹) as a main plots and fungal symbiosis (non-inoculation and inoculation of *P. indica* + *T. virens*) and polyamine spermidine foliar application (0 and 0.75 mM) as a sub plots. Results of greenhouse and field study showed that inoculation with endophytic fungi and application of spermidine under salinity stress significantly improved stevia growth traits such as plant height, leaf area, fresh and dry weight of leaf, stem and shoot. Fungal symbiosis under salinity stress in greenhouse and field experiments showed a positive effect on most chlorophyll fluorescence parameters including Fm, Fv, Fv/Fm, Y(II), Y(NO) and NPQ. Fungal symbiosis treatment and spermidine application increased proline accumulation and relative water content (RWC) and reduced electrolyte leakage (EL). The results also showed a significant increase in antioxidant enzymes activity such as SOD, CAT, POD and APX and a decrease in the amount of H₂O₂ due to fungal symbiosis and spermidine spraying in both experiments, which reduced the adverse effects of salt stress on membrane lipids. Irrigation with saline water, especially 6 dS.m⁻¹, increased the leaf stevioside and rebaudioside A concentration and also fungal symbiosis treatment and application of polyamine spermidine stimulated further accumulation of these compounds. Therefore, application of these fungi in combination with foliar application of polyamine spermidine can improve the growth, physiological and biochemical characteristics of stevia medicinal plant under salt stress conditions and increase the production of glycoside compounds by increasing plant tolerance.

Keywords: Antioxidant enzymes, chlorophyll fluorescence, rebaudioside A, sea water salinity, stevioside



Shahrood University of Technology

Faculty of Agriculture

Ph.D. Thesis in Agronomy

The effect of *Piriformospora indica* and *Trichoderma virens* endophytic fungi along with spermidin polyamine application on increasing salt tolerance of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) medicinal plant

By:

Hadiseh Bahari Saravi

Supervisors:

Dr. A. Gholami

Dr. H. Pirdashti

Advisores:

Dr. M. Baradaran Firuzabadi

Dr. H.R. Asghari

January 2020