

اثر گونه‌های میکوریزا و تنش کم‌آبی بر صفات مورفوفیزیولوژیک و بیوشیمیایی گیاهچه‌های حاصل از کشت بافت استویا در شرایط گلخانه

علی حاجی محمدی^۱، رضا ضرغامی^{۲*}، علی کاشانی^۳، حسین حیدری شریف آباد^۱، قربان نور محمدی^۱

^۱ ایران، تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، گروه زراعت.

^۲ ایران، کرج، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران (ABRII)، بخش کشت بافت و سلول.

^۳ ایران، اهواز، دانشگاه شهید چمران اهواز، گروه زراعت.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۸/۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۶/۲۹

چکیده

این مطالعه با هدف بررسی اثر کاربرد گونه‌های قارچ میکوریزا در شرایط تنش کم‌آبی بر برخی صفات مورفوفیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاهچه‌های حاصل از کشت بافت گیاه استویا صورت گرفته است. در این بررسی، آزمایشی در شرایط گلخانه با استفاده از دو گونه قارچ میکوریزا در چهار سطح، M₁: شاهد (بدون قارچ میکوریزا)، M₂: گونه *Mycorrhiza Glomus mosseae*، M₃: گونه *Mycorrhiza Glomus intraradices*، M₄: استفاده از تلفیق ۵۰ درصدی دو گونه قارچ میکوریزا، و اعمال تنش کم‌آبی در چهار سطح: شاهد (I₁)، تنش‌های کم‌آبی خفیف (I₂)، متوسط (I₃) و شدید (I₄) بترتیب آبیاری در ۱۰۰٪، ۷۵٪، ۵۰٪ و ۲۵٪ ظرفیت زراعی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۶ تکرار انجام پذیرفت. کاربرد گونه‌های قارچ میکوریزا در شرایط تنش کم‌آبی موجب افزایش ۱/۷۰، ۴/۱۱، ۱/۷۳ و ۴/۳۲ برابری شاخص سبزیگی، وزن خشک کل گیاه، ارتفاع گیاه و سطح برگ گیاه در مقایسه با شاهد گردید. علاوه بر این، کاربرد گونه‌های قارچ میکوریزا در شرایط تنش کم‌آبی نسبت به شاهد موجب افزایش ۱/۶۶، ۶/۱۳، ۲۹/۶ و ۱/۳۰ برابری پتاسیم، گلوکز، فروکتوز و قندکل شده است. در شرایط تنش کم‌آبی متوسط و شدید، استفاده از تلفیق گونه‌های قارچ میکوریزا، در تیمارهای M₄I₃ و M₄I₄ در مقایسه با تیمارهای M₁I₃ و M₁I₄ منجر به افزایش بیش از سه برابری سطح برگ گیاهان کشت بافتی استویا گردید. نتایج نشان‌دهنده همزیستی مثبت ریشه‌های استویا با تلفیق دو گونه میکوریزا در شرایط تنش کم‌آبی است.

واژه‌های کلیدی: استویا، پتاسیم، ساکارز، قندکل، میکوریزا.

* نویسنده مسئول، پست الکترونیکی: zarghami@abrii.ac.ir

مقدمه

serrata (۱۲). با رشد شهرنشینی گسترش بیماری‌های کبدی، دیابت و چاقی، با رشدی روزافزون سلامت و عمر بشر را تهدید می‌کند. یکی از ساده‌ترین روش‌های کنترل این بیماری‌ها، استفاده از منابع قندی گیاه استویا با ساختار گلیکوزیدی و شیرینی ۳۰۰ برابر شکر در رژیم غذایی است. فرآورده‌های این گیاه می‌توانند به عنوان شیرین‌کننده

گیاه دارویی استویا (*Stevia rebaudiana Bertoni*) یکی از ۹۵۰ جنس موجود در خانواده *Astraceae* است که توسط گیاه‌شناس ایتالیایی، مویسس سانتیاگو برتونی شناسایی شد. فراوان‌ترین گونه‌های این گیاه عبارتند از: *Stevia rebaudiana*، *Stevia pilosa*، *Stevia ovata*، *Stevia eupatoria*، *Stevia plummerae* و *Stevia salicifolia* و *Stevia willd*

یکدست و مشابه گیاه مادری، جهت تولید متابولیت‌های ثانویه باکیفیت در گیاه استویا بهره‌برد (۱۷). گیاه استویا نسبت به خشکی حساس بوده و بروز این تنش در طول دوره رویشی سبب کوچک‌شدن برگ‌ها و کاهش وزن‌خشک برگ استویا به عنوان منبع اصلی قندهای گلیکوزیدی‌شده و در نتیجه کاهش وزن‌خشک کل خواهد شد (۶، ۱۸، ۳۲، ۳۵). گونه‌های قارچ میکوریزا یکی از مهمترین میکروارگانیسم‌های خاک بوده که در همزیستی با ریشه حدود ۷۲٪ گیاهان فعالیت می‌نمایند (۱۱). توانایی تلقیح گیاه استویا با قارچ میکوریزا و بهبود رشد آن در نتیجه این همزیستی تایید شده است (۲۵). گونه‌های قارچ میکوریزای آرباسکولار می‌تواند اثرات منفی محدودیت آب را کاهش دهد و رشد گیاه را در شرایط کشت گلخانه‌ای بهبود بخشد (۵، ۹، ۲۹). کشاورزی در اقلیم خشک و نیمه‌خشک ایران، ضرورت تحقیق در زمینه کاهش اثرات تنش کم‌آبی بر عملکرد گیاهان زراعی را اجتناب ناپذیر نموده است، از این رو در تحقیق حاضر پس از تکثیر گیاهچه‌های استویا به روش کشت بافت گیاهی، اثرگونه‌های قارچ میکوریزا بر تغییرات مورفوفیزیولوژیک و بیوشیمیایی گیاه دارویی استویا (*Stevia rebaudiana Bertoni*) در شرایط تنش کم‌آبی مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روشها

پژوهش حاضر طی سال ۱۳۹۴ تا ۱۳۹۶ در پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران و دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران انجام گردید. برای تولید گیاهچه‌های استویا مشابه والد، عاری از عوامل بیماریزا و کاهش هزینه‌ها، از کشت درون شیشه‌ای قطعات ساقه این گیاه استفاده گردید. گیاهچه‌های تولیدشده جهت سازگاری از شیشه‌های مربایی به گلدان‌های یکبار مصرف با قطر دهانه ۵ و ارتفاع ۷ سانتی متر حاوی پیت و پرلیت در اتاقک رشد منتقل شدند. در این مرحله روی گلدان‌ها با

طبیعی جایگزین شیرین‌کننده‌های مصنوعی همچون آسپارتام، سدیم‌ساکارین و سیکلامات گردد (۱). تشدید چرخه هیدرولوژیکی و گرم‌شدن کره‌زمین، تناوب و افزایش وسعت خشکسالی‌ها را افزایش می‌دهد. این مسئله می‌تواند موجب تأثیرات شدیدی بر رشد و عملکرد فیزیولوژیکی گیاهان بویژه در اکوسیستم‌های دارای محدودیت آب شود. کمبود بارندگی مانع از رشد و تجمع زیست توده گیاهان بر سطح زمین می‌شود (۱۴، ۲۲، ۳۶). با شدت یافتن تغییرات جهانی آب و هوا، خشکسالی به مشکل همه‌جانبه زیست محیطی در جهان تبدیل شده است (۲۱، ۲۸، ۳۴). در حال حاضر با افزایش وسعت زمین‌های در معرض تنش شوری و خشکی، روند روبه رشد جمعیت، کاهش و تخریب منابع آب و خاک در ایران و جهان، پژوهش در زمینه گیاهان مقاوم به شرایط نامساعد محیطی اهمیت یافته است (۱۳، ۲۴). با توجه به اینکه ایران در منطقه خشک و نیمه‌خشک جهان قرار گرفته، از این رو مدیریت زراعی و مصرف بهینه منابع آب از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. خشکسالی بطور قابل‌توجهی از رشد گیاهان جلوگیری و بهره‌وری اولیه خالص را در مزارع خشک و نیمه‌خشک کاهش می‌دهد (۱۹، ۳۳). گیاهان با تغییر خصوصیات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی، باید واکنشی سریع برای کاهش تأثیرات منفی خشکسالی بر رشد خود نشان دهند (۸). استان‌های گیلان و مازندران از بهترین شرایط محیطی کشت استویا در ایران بشمار می‌روند، همچنین این گیاه در برخی شهرهای استان‌های فارس و اصفهان نیز کشت می‌شود (۲۵). کشت گیاه استویا در ایران بصورت کشت بذر این گیاه و یا تکثیر قلمه در گلخانه صورت می‌گیرد. یکی از مشکلات تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاه استویا، تفرق صفات ناشی از کشت بذر و اثرات منفی آن بر متابولیت‌های ثانویه می‌باشد. این در حالی است که تکثیر قلمه این گیاه نیز هزینه بالا و تلفات زیادی را به همراه دارد. از تکنیک کشت بافت گیاهی می‌توان برای رفع این موانع، ایجاد مزارع

ریشه‌های گیاهان بخوبی مخلوط گردید. در ادامه مابقی حجم گلدان‌ها با مخلوط بستر تا حجم نهایی پر و آبیاری یکنواخت انجام شد. لازم به ذکر است که گونه‌های قارچ میکوریزا، از کلینیک گیاه‌پزشکی ارگانیک (استان همدان)، به صورت کیسه‌های ۵ کیلوگرمی خاک محتوی گونه‌ها، با خصوصیات پروپاگل ۹۳۷، طول ریشه‌های قارچی شش متر در هر سانتیمتر ریشه، میزان همزیستی ۸۰٪ با ریشه و ۱۲۰ عدد اسپور قارچ در هر گرم خاک خریداری شد. این بخش از آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در ۶ تکرار با ۵ گلدان در هر تکرار انجام پذیرفت (شکل ۱). فاکتورهای آزمایش شامل دو گونه قارچ میکوریزا به عنوان عامل اول در چهار سطح M₁: شاهد (بدون میکوریزا)، M₂: استفاده از گونه *Mycorrhiza Glomus mosseae* (۳۰ گرم خاک محتوی قارچ) در ۳ کیلوگرم خاک زراعی، M₃: استفاده از گونه *Glomus Mycorrhiza intraradices* (۳۰ گرم خاک محتوی قارچ) در ۳ کیلوگرم خاک زراعی، M₄: استفاده از هر دو گونه قارچ بصورت مخلوط با یکدیگر (۱۵ گرم از هر یک از خاک‌های محتوی گونه‌های قارچی) می‌باشند.

روکش‌های پلاستیکی جهت جلوگیری از آسیب ناشی از تغییر محیط به گیاهچه‌ها، پوشانیده‌شد. برای سازگاری تدریجی گیاهچه‌ها، در فواصل هر سه روز، سوراخ‌هایی بر روی سطح روکش‌ها ایجاد و پس از سازگاری، این روکش‌ها بطور کامل برداشته شد. گیاهچه‌ها در مرحله ۸ برگگی از گلدان‌های کوچک به گلدان‌های سه کیلوگرمی با قطر دهانه ۲۰ و ارتفاع ۳۰ سانتی‌متر در گلخانه با دمای حداقل ۱۷ و حداکثر ۲۵ درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۲۲-۳۱ درصد و شدت نور ۱۰۰۰۰ لوکس منتقل گردیدند. در هر گلدان دو گیاهچه با خصوصیات یکسان مورفولوژیکی مانند ارتفاع و تعداد برگ و سلامت ظاهری کشت شد. همزمان با انتقال گیاهان، تیمار گونه‌های قارچ میکوریزا اعمال گردید. برای اعمال این تیمار، ابتدا نیمی از حجم گلدان‌ها با مخلوط پرلیت، خاک رس و پیت ماس با pH=۷/۳ و نسبت‌های برابر پرگردید. سپس ۳۰ گرم خاک محتوی اسپورهای قارچ میکوریزا (با تراکم ۳۶۰۰ عدد اسپور در ۳ کیلوگرم خاک هر گلدان) با توجه به نوع تیمار قارچ (جدول ۱)، بصورتی که ریشه‌ها در تماس مستقیم با خاک محتوی اسپورها باشند، با خاک اطراف



شکل ۱- مراحل مختلف ریزازدیادی، سازگاری، رشد و نمو گیاه استویا و اعمال تیمارها در گلخانه. الف: ریزازدیادی و نگهداری گیاهچه‌های استویا در شرایط درون شیشه، ب: انتقال گیاهچه‌های ریشه دار شده از کشت درون شیشه به گلدان‌های مستقر در اتاقک رشد جهت سازگاری، پ: سازگاری گیاهچه‌ها به شرایط محیطی اتاقک رشد، ت: انتقال گیاهچه‌های سازگار شده به گلخانه، ث: اعمال تیمارهای قارچ میکوریزا و تنش کم‌آبی به گیاهان استویا.

جدول ۱- ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی یک مترمکعب خاک مورد استفاده در گلدان‌های کشت گیاهچه‌های استویا

Total (gr/m ³) N	P (gr/m ³)	K (gr/m ³)	Mg (gr/m ³)	S (gr/m ³)	B (gr/m ³)	Fe (gr/m ³)	Mn (gr/m ³)
۷۰	۳۵	۷۵	۲	۳۶	۰/۱۵	۰/۴۵	۰/۸
Mo (gr/m ³)	Zn (gr/m ³)	Cu (gr/m ³)	kalk (Kg/m ³)	Dolomit (Kg/m ³)	Ec mS/cm 1:1.5	PG MiX N:P ₂ O ₅ :K ₂ O 14:16:18 (Kg/m ³)	
۱	۰/۲	۰/۶	۳	۳	۰/۶	۰/۵	

زمان، مجموع وزن‌ها با ترازوی الکترونیکی یک ده هزارم گرم (مدل KERN 770) اندازه‌گیری گردید.

• برای اندازه‌گیری صفات بیوشیمیایی میزان گلوکز، فروکتوز، ساکارز، قندکل، پتاسیم و سدیم نمونه‌برداری در سه تکرار دیگر انجام پذیرفت. تمامی برگ‌های ۵ سانتی‌متری بالایی ساقه اصلی گیاه از محل دمبرگ جدا و بلافاصله پس از برداشت داخل فویل آلومینیوم قرار داده و به نیتروژن مایع با دمای ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند و در ادامه فویل‌ها، برای تثبیت مواد متابولیکی و شیمیایی، به مدت ۲۴ ساعت در دستگاه فریزدرایر با شرایط خلاء و دمای ۱۱۸- درجه سانتی‌گراد خشک شدند. پس از این مرحله نمونه‌های گیاهی تا زمان انجام اندازه‌گیری‌های بعدی، در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری و سایر مراحل به شرح ذیل بر روی آن‌ها انجام گرفت.

جدول ۲- میزان آب مصرفی با توجه به تیمارهای تنش کم‌آبی.

تیمار تنش کم‌آبی	مجموع دفعات آبیاری*	مقدار آب مصرفی (میلی‌لیتر)
I ₁	۱۹	۲۰۷۱۰
I ₂	۱۱	۳۷۲۶/۲۵
I ₃	۸	۵۴۲۰
I ₄	۷	۷۱۱۳/۷۵

* سه آبیاری ابتدایی از مجموع دفعات آبیاری در هر تیمار، بمنظور استقرار گیاهچه‌های استویا در خاک، بطور یکنواخت در تمامی گلدان‌ها صورت پذیرفت و در ادامه تیمارهای تنش کم‌آبی اعمال گردیدند.

تیمارهای تنش کم‌آبی به عنوان عامل دوم در چهار سطح I₁: شاهد (آبیاری در ۱۰۰٪ ظرفیت زراعی)، I₂: تنش کم‌آبی خفیف (آبیاری در ۷۵٪ ظرفیت زراعی)، I₃: تنش کم‌آبی متوسط (آبیاری در ۵۰٪ ظرفیت زراعی)، I₄: تنش کم‌آبی شدید (آبیاری در ۲۵٪ ظرفیت زراعی) در نظر گرفته شد.

اعمال تیمارهای تنش کم‌آبی، نمونه‌برداری از گیاهچه‌ها و اندازه‌گیری صفات: پس از استقرار موفق گیاهچه‌های کشت بافتی گیاه استویا در گلدان‌های موجود در گلخانه، سپری شدن دو ماه از دفعات آبیاری و اعمال تیمارهای آبیاری (جدول ۲) اندازه‌گیری صفات مورد آزمایش به شرح ذیل صورت پذیرفت:

• صفت شاخص سبزی‌نگی برگ (عدد SPAD) به روش غیرتخریبی و با استفاده از دستگاه کلروفیل متر (مدل SPAD-502 plus ساخت کشور ژاپن) اندازه‌گیری شد.

• اندازه‌گیری ارتفاع ساقه اصلی، سطح برگ و وزن خشک کل گیاه به روش تخریبی صورت گرفت. در این راستا پس از برداشت گیاهان با سه تکرار از خاک (در مجموع ۳۰ گیاه)، ریشه، ساقه و برگ‌ها جدا گردیدند. سپس با استفاده از خط‌کش و کاغذ شطرنجی بترتیب ارتفاع ساقه اصلی و سطح برگ هر گیاه اندازه‌گیری شد.

• برای اندازه‌گیری وزن خشک کل گیاه، ساقه، ریشه و برگ‌ها درون پاکت‌های کاغذی جداگانه در دستگاه آون (ساخت شرکت Heraeus) به مدت ۷۲ ساعت با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از گذشت این مدت

ویال ۲ میلی‌متری مناسب ریخته و ۱/۵ میلی‌لیتر اتانول ۸۰٪ به آن اضافه شد. سپس به مدت ۵ دقیقه ورتکس نموده، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد با ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. این مرحله سه بار تکرار گردید. در ادامه فاز رویی جدا شده در فالكون‌های ۱۵ میلی‌لیتری ریخته شد. با قراردادن فالكون‌ها در آون به مدت یک هفته در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد الکل موجود در فاز رویی بطور کامل تبخیر گردید. به نمونه‌های خشک شده ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر، ۴۷۰ میکرو لیتر هیدروکسید باریم ۰/۳ نرمال و ۵۰۰ میکرو لیتر سولفات روی ۰/۵٪ اضافه و نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد با ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. فاز رویی جدا در فالكون‌های ۱۵ میلی‌لیتری ریخته و ۲ میلی‌لیتر از محلول حاصل جهت اندازه‌گیری قندکل به ویال‌های جداگانه منتقل شد. با قرار دادن فالكون‌ها در آون به مدت سه هفته در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد، فاز آبی بطور کامل تبخیر گردید. سپس یک میلی‌لیتر آب با درجه خلوص (High-performance liquid chromatography) HPLC روی رسوب به جای مانده اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در دستگاه شیکر قرار داده شد. محلول حاصل را با فیلتر سرسرنگی ۰/۴۵ میکرومتری فیلتراسیون نموده، درون ویال‌های ۲ میلی‌لیتری ریخته و در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در مرحله بعد برای اندازه‌گیری و انجام تفکیک قندهای محلول ساکارز، گلوکز و فروکتوز، محلول توسط سرنگ به دستگاه HPLC (مدل KNAUER-2013) تزریق گردید. برای سنجش از ستون Eurokat H-10 μ m با ابعاد ۸ × ۳۰۰ میلی متر، شناساگر UV-K2501 در طول موج ۲۶۷ نانومتر، مخلوط ۵۰ تا ۸۰٪ استونیتریل و آب مقطر با درجه خلوص HPLC و pH=۲/۵ به عنوان حلال و با سرعت جریان ۰/۷ میلی‌لیتر بر دقیقه استفاده شد. انتگرال سطح زیر پیک مربوط به ساکارز، گلوکز و فروکتوز توسط نرم‌افزار Chromstar 7.0 محاسبه گردید. با استفاده از غلظت استاندارد با سطح زیر پیک کروماتوگرام غلظت ساکارز،

آماده سازی نمونه و استخراج کاتیون‌های پتاسیم و سدیم: اندازه‌گیری کاتیون‌های پتاسیم و سدیم برگ با استفاده از دستگاه یون کروماتوگرافی (مدل Metrohm850 ساخت کشور ژاپن) بر اساس روش شلیگل (۳۱) صورت پذیرفت. ابتدا ۰/۲۵ گرم نمونه فریز درایر شده را درون فالكون ۱۵ میلی‌لیتری ریخته و ۲/۵ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۰/۱ نرمال به آن اضافه و فالكون‌ها به مدت چهار ساعت در حمام آب گرم در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد همراه با لرزش ۱۲۵ دور در دقیقه قرار گرفتند. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد با ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و فاز رویی برداشته شد. جهت فیلتر نمودن فاز رویی، آن را از کاغذ صافی واتمن با قطر منافذ ۱۲۵ میلی‌متر عبور داده شد. pH محلول صاف شده مورد سنجش قرار گرفت و با توجه به pH کمتر از ۲ محلول، یک میلی‌لیتر از آن با ۹ میلی‌لیتر آب دیونایز به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. محلول حاصل به دستگاه یون کروماتوگرافی منتقل و پس از ۱۶ ساعت، میزان غلظت کاتیون‌ها مشخص گردید. مقدار نهایی کاتیون‌های سدیم و پتاسیم برحسب استانداردهای محاسبه شده ای که برای اندازه‌گیری غلظت کاتیون‌ها برای دستگاه یون کروماتوگرافی تعریف شده، صورت گرفت. دستگاه سطح زیر منحنی‌های بدست آمده از غلظت کاتیون‌های سدیم و پتاسیم را برای هر نمونه بطور جداگانه محاسبه نموده. سپس آن مقادیر را بطور خودکار در معادله خط بدست آمده از استانداردهای تعریف شده دستگاه قرار داده و مقدار نهایی غلظت کاتیون‌های سدیم و پتاسیم هر نمونه برحسب ppm بدست آمد.

اندازه‌گیری قندهای ساکارز، گلوکز و فروکتوز: اندازه‌گیری قندهای ساکارز، گلوکز و فروکتوز با استفاده از کروماتوگرافی مایع با فشار زیاد و به روش شلیگل (۳۱) انجام گردید. یک صدم گرم از برگ فریزدرایر شده درون

ارتفاع ساقه اصلی: بیشترین ارتفاع ساقه اصلی بترتیب ۲۶/۹۲ و ۲۲/۸۰ سانتی متر از تیمارهای M4I2 (استفاده از مخلوط دو گونه قارچ و آبیاری در ۷۵٪ ظرفیت زراعی) و M4I3 (استفاده از مخلوط دو گونه قارچ و آبیاری در ۵۰٪ ظرفیت زراعی) بدست آمد (جدول ۴). کمترین ارتفاع ساقه اصلی، ۱۵/۵۰ و ۱۶ سانتی متر بوده که بترتیب به تیمارهای M1I1 (بدون مایکوریزا و بدون تنش کم‌آبی) و M1I4 (بدون مایکوریزا و آبیاری در ۲۵٪ ظرفیت زراعی) اختصاص دارد (جدول ۴).

سطح برگ گیاه: نتایج مقایسات میانگین اثرات متقابل کاربرد گونه‌های مختلف قارچ مایکوریزا و سطوح تنش کم‌آبی نشان داد که بیشترین سطح برگ گیاه به میزان ۲۳۳/۸ سانتی‌مترمربع متعلق به تیمار M4I3 (استفاده از مخلوط دوگونه گلوموس موسه آ و گلوموس اینترادیسز و آبیاری در ۵۰٪ ظرفیت زراعی) می‌باشد (جدول ۴). کمترین سطح برگ نیز به میزان ۵۴/۰۴ سانتی‌مترمربع که در تیمار M1I2 (بدون مایکوریزا و آبیاری در ۷۵٪ ظرفیت زراعی) ایجاد شده است (جدول ۴).

وزن خشک کل گیاه: بیشترین وزن خشک کل گیاه، حاصل تیمارهای M4I4 (مخلوط دو گونه قارچ و آبیاری در ۲۵٪ ظرفیت زراعی) و M4I3 (مخلوط دو گونه قارچ و آبیاری در ۵۰٪ ظرفیت زراعی) بترتیب به میزان ۱/۷۲۸ و ۱/۷۱۸ گرم بوده است. کمترین وزن خشک کل گیاه به تیمار M1I1 در تمامی سطوح آبیاری اختصاص یافت (جدول ۴).

شاخص سبزینگی برگ: بیشترین میزان شاخص سبزینگی برگ از تیمار M4 (تلفیق ۵۰٪ از هر دوگونه قارچ) و چهار سطح آبیاری بترتیب ۳۲/۸۸، ۳۵/۸۸، ۳۴/۴۲ و ۳۳/۱۶ واحد (عدد SPAD) می‌باشد. کمترین میزان شاخص سبزینگی برگ نیز در طی تیمار M1I2 (بدون قارچ و آبیاری در ۷۵٪ ظرفیت زراعی) به میزان ۲۱/۰۵ واحد (عدد SPAD) بدست آمد (جدول ۴).

گلوکز و فروکتوز محاسبه و به صورت میلی‌گرم برگ‌گرم وزن خشک برگ گزارش شد.

روش اندازه‌گیری قندکل: اندازه‌گیری قندکل براساس روش شلیگل (۳۱) انجام گردید. ۵۰۰ میکرولیتر از ۲ میلی‌لیتر محلول آماده شده (در دستورالعمل قندهای محلول به روش HPLC) به یک فالكون ۱۵ میلی‌لیتری منتقل شد. ۲۵۰ میکرولیتر محلول فنل ۵٪ روی ۵۰۰ میکرولیتر محلول برداشته شده اضافه گردید. سپس ۱۲۵۰ میکرو لیتر اسید سولفوریک ۹۸٪ به این محلول اضافه و پس از ۴۵ دقیقه میزان جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۴۸۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل CARY300 SCAN) مورد سنجش قرار گرفت. استانداردهای دستگاه اسپکتروفتومتر در غلظت‌های ۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی مولار از گلوکز ساخته شد که بر اساس این استانداردها، معادله خط بدست آمد، در ادامه مقدار جذب قرائت‌شده از نمونه‌ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر، در معادله خط $y=0.919x-0.655$ حاصل از نمودار استانداردهای تهیه شده برای قند کل، به عنوان y معادله قرار داده و میزان قندکل نمونه‌ها (x معادله) برحسب میلی‌گرم برگ‌گرم ماده خشک بدست آمد.

آنالیز آماری: تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها بوسیله نرم‌افزارهای SAS و MSTAT-C و مقایسات میانگین صفات با استفاده از آزمون دانکن انجام گرفت.

نتایج

نتایج حاصل از بررسی جدول تجزیه واریانس صفات بیانگر وجود اختلاف آماری معنی‌داری میان تیمارهای مورد استفاده از نظر صفات ارتفاع ساقه اصلی، سطح برگ گیاه، وزن خشک کل گیاه، ساکارز، گلوکز، قندکل، پتاسیم در سطح ۵٪ است. در مورد صفات فروکتوز، سدیم، شاخص سبزینگی برگ نیز اختلاف آماری معنی‌داری در سطح ۱٪ میان تیمارهای اعمال شده مشاهده گردید (جدول ۳ و ۵).

جدول ۳- تجزیه واریانس صفات مورد مطالعه در شرایط تنش کم آبی و استفاده از قارچ میکوریزا در کشت گیاه استویا.

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		ارتفاع ساقه اصلی	سطح برگ گیاه	وزن خشک کل گیاه
میکوریزا (M)	۳	**۲۵۱/۷۸۷	**۸۴/۸۱۱	**۰/۸۴۱
آبیاری (I)	۳	*۳۶/۳۱۱	*۳/۸۵۳	*۰/۰۰۸
میکوریزا × آبیاری	۹	*۱۹/۷۹۹	*۱۳/۱۰۳	*۰/۰۳۱
اشتباه آزمایشی	۷۵	۱۹/۵۱۴	۸/۰۱۹	۰/۰۲۰
ضریب تغییرات (%)	-	۲۱/۶۷	۲۶/۷۴	۱۱/۷۰

ns، *، ** بترتیب غیرمعنی دار، معنی دار در سطح احتمال پنج درصد، معنی دار در سطح احتمال یک درصد.

جدول ۴ - مقایسه میانگین برهمکنش کاربرد قارچ میکوریزا تحت شرایط تنش کم آبی بر صفات مورد مطالعه گیاه استویا.

برهمکنش تیمارها	ارتفاع ساقه اصلی (cm)	سطح برگ گیاه (cm ²)	وزن خشک کل گیاه (g)	شاخص سبزی‌نگی برگ (عدد SPAD)
× M ₁	I ₁	abc۱۷۹/۰	e۰/۴۵۶	b۲۸/۰۲
	I ₂	cde۱۷/۹۲	d۵۴/۰۴	e۲۱/۰۵
	I ₃	de۱۶/۵۰	cd۷۱/۲۵	de۲۲/۹۸
	I ₄	e۱۶/۰۰	d۶۱/۹۹	cde۲۳/۶۲
× M ₂	I ₁	bcd۱۹/۷۵	bcd۸۴/۰۸	cd۰/۷۹۲
	I ₂	cde۱۷/۸۳	bcd۱۲۳/۸	bc۱/۲۳۳
	I ₃	bcd۱۹/۱۷	bcd۱۰۷/۱	cde۰/۷۹۷
	I ₄	bcd۲۰/۵۰	bcd۸۴/۸۷	de۰/۶۵۶
× M ₃	I ₁	cde۱۸/۲۰	bcd۱۱۸/۱	bcd۱/۰۹۴
	I ₂	ab۲۴/۹۰	bcd۱۱۷/۹	bc۱/۲۱۳
	I ₃	abc۲۳/۴۲	abcd۱۳۴/۱	bcd۱/۰۹۲
	I ₄	bcd۲۰/۴۲	bcd۱۱۹/۵	cd۰/۹۴۳
× M ₄	I ₁	abcd۲۲/۰۸	bcd۱۲۶/۴	ab۱/۴۰۷
	I ₂	a۲۶/۹۲	abcd۱۴۶/۳	bc۱/۲۳۵
	I ₃	abc۲۲/۸۰	a۲۳۳/۸	a۱/۷۱۸
	I ₄	ab۲۴/۳۰	ab۱۹۳/۶	a۱/۷۲۸

اعداد با یک حرف مشترک در هر ستون، نشان دهنده عدم اختلاف آماری معنی‌دار است. M₁: شاهد (عدم استفاده از قارچ)، M₂: استفاده از گونه *Mycorrhiza Glomus mosseae*، M₃: استفاده از گونه *Mycorrhiza Glomus intraradices*، M₄: استفاده از تلفیق ۵۰٪ از هر دو گونه قارچ، I₁: شاهد (آبیاری در ۱۰۰٪ ظرفیت زراعی)، I₂: تنش کم آبی خفیف (آبیاری در ۷۵٪ ظرفیت زراعی)، I₃: تنش کم آبی متوسط (آبیاری در ۵۰٪ ظرفیت زراعی)، I₄: تنش کم آبی شدید (آبیاری در ۲۵٪ ظرفیت زراعی).

است که ناشی از اعمال تیمار M2I1 (کاربرد گونه گلوموس موسه آ در شرایط بدون تنش کم‌آبی) بدست آمد (جدول ۶).

۰/۳۶۸ میلی‌گرم برگرم وزن خشک برگ بیشترین میزان گلوکز است که از تیمار M2I2 (گونه گلوموس موسه آ و آبیاری در ۷۵٪ ظرفیت زراعی) بدست آمده که بطور معنی‌داری بیشتر از سایر تیمارها است. کمترین مقدار گلوکز نیز ۰/۰۶۰ و ۰/۰۶۲ میلی‌گرم برگرم وزن خشک برگ است که بترتیب به تیمارهای M1I3 (بدون قارچ و آبیاری در ۵۰٪ ظرفیت زراعی) و M1I4 (بدون قارچ و آبیاری در ۲۵٪ ظرفیت زراعی) اختصاص یافت. بیشترین میزان فروکتوز به میزان ۰/۲۹۶ میلی‌گرم برگرم وزن خشک برگ از تیمار M2I3 (کاربرد گونه گلوموس موسه آ و آبیاری در ۵۰٪ ظرفیت زراعی) بدست آمد که از این نظر با تیمارهای دیگر تفاوت معنی‌داری دارند. کمترین میزان فروکتوز نیز ۰/۰۱۰ و ۰/۰۱۴ میلی‌گرم برگرم وزن خشک برگ است که بترتیب به تیمارهای M1I4 (بدون قارچ و آبیاری در ۲۵٪ ظرفیت زراعی) و M1I3 (بدون قارچ و آبیاری در ۵۰٪ ظرفیت زراعی) اختصاص داشته است (جدول ۶).

یون‌های سدیم و پتاسیم: بیشترین میزان یون سدیم به میزان ۱/۴۱۷ ppm (بدون قارچ و آبیاری در ۲۵٪ ظرفیت زراعی) بدست آمد (جدول ۶) که با دیگر تیمارها تفاوت معنی‌داری نشان داد. از طرفی سایر تیمارهای اعمال شده از نظر میزان عنصر سدیم تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نشان نداشتند. بنظر می‌رسد در شرایط تنش‌های کم‌آبی خفیف، متوسط و شدید در اثر استفاده از گونه‌های قارچ میکوریزا تجمع یون‌های سدیم صورت نگیرد.

همچنین بررسی مقایسه میانگین‌ها نشان داد، بیشترین میزان یون پتاسیم به میزان ۶۶/۵۳ ppm و ۶۶/۰۷ ppm بترتیب به تیمارهای M4I3 (مخلوط دو گونه قارچ و آبیاری در ۵۰٪ ظرفیت زراعی) و M1I4 (بدون قارچ و آبیاری در ۲۵٪ ظرفیت زراعی) اختصاص یافت و کمترین مقدار یون پتاسیم نیز به میزان ۴۰ ppm از تیمار M1I1 (بدون قارچ و بدون تنش خشکی) بدست آمد (جدول ۶).

ساکارز، گلوکز و فروکتوز: مقایسه میانگین‌ها نشان داد بیشترین مقدار ساکارز به میزان ۰/۰۶۵ میلی‌گرم برگرم وزن خشک برگ از تیمار M4I3 (مخلوط دو گونه قارچ و آبیاری در ۵۰٪ ظرفیت زراعی) بدست آمد، که از این نظر با سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری داشت (جدول ۶). ۰/۰۱۵ میلی‌گرم برگرم وزن خشک برگ، کمترین میزان ساکارز

جدول ۵- تجزیه واریانس صفات مورد مطالعه تحت شرایط تنش کم‌آبی و کاربرد قارچ میکوریزا در گیاه استویا.

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات				یون سدیم	یون پتاسیم
		ساکارز	گلوکز	فروکتوز	قندکل		
مایکوریزا (M)	۳	۰/۰۳۹*	۲۹/۵۷۳ ^{ns}	۰/۰۲۲**	۰/۰۰۳**	۰/۰۱۳**	۰/۰۱۶**
آبیاری (I)	۳	۰/۰۰۹ ^{ns}	۴۵۵/۳۶۸**	۰/۰۰۶**	۰/۰۰۰۱*	۰/۰۱۰**	۰/۰۱۲**
مایکوریزا × آبیاری	۹	۰/۰۶۳**	۸۱/۱۳۸*	۰/۰۰۲*	۰/۰۰۰۱*	۰/۰۰۷**	۰/۰۰۵*
اشتباه آزمایشی	۷۵	۰/۰۱۴	۳۸/۰۷۲	۰/۰۰۲	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۲	۰/۰۰۲
ضریب تغییرات (درصد)	-	۱۱/۴۱	۱۰/۷۲	۴/۷۹	۲۶/۵۱	۲۲/۲۲	۶/۱۵

ns، *، ** بترتیب غیر معنی‌دار، معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد، معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد.

صفت دارای تفاوت معنی‌داری با دیگر تیمارها است (جدول ۶). کمترین میزان قند کل نیز ۰/۶۲۰ میلی‌گرم برگرم وزن خشک برگ، از تیمار M2I1 (کاربرد گونه گلوموس موسه آ در شرایط بدون تنش کم‌آبی) بدست آمد که از نظر این

فندکل: بررسی نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد بیشترین میزان قندهای محلول به میزان ۰/۸۰۸ میلی‌گرم برگرم وزن خشک برگ، از تیمار M2I1 (کاربرد گونه گلوموس موسه آ در شرایط بدون تنش کم‌آبی) بدست آمد که از نظر این

جدول ۶ - مقایسه میانگین برهمکنش کاربرد قارچ مایکوریزا تحت شرایط تنش کم‌آبی بر صفات مورد مطالعه گیاه استویا.

قندکل (mg/g)	فروکتوز (mg/g)	گلوکز (mg/g)	ساکارز (mg/g)	یون پتاسیم (ppm)	یون سدیم (ppm)	برهمکنش تیمارها
f. / ۶۲۰	g. / ۰۶۱	cd. / ۰۸۳	def. / ۰۳۰	d۴. / ۰۰	ab / ۰۰	I1
cdef. / ۶۷۱	fg. / ۰۶۸	bcd. / ۱۵۴	cde. / ۰۳۹	abc۵۵ / ۵۳	c. / ۲۳۳	I2
def. / ۶۴۶	g. / ۰۱۴	d. / ۰۶۰	ef. / ۰۲۳	ab۵۹ / ۹۷	c. / ۴۰۰	I3
cdef. / ۶۶۸	g. / ۰۱۰	d. / ۰۶۲	ef. / ۰۲۶	a۶۶ / ۰۷	a / ۴۱۷	I4
a. / ۸۰۸	abc. / ۲۶۵	bc. / ۱۹۷	f. / ۰۱۵	cd۴۷ / ۱۲	bc. / ۶۳۳	I1
bcdef. / ۶۸۸	abcde. / ۲۱۹	a. / ۳۶۸	f. / ۰۱۵	ab۶۲ / ۶۸	bc. / ۵۳۳	I2
ef. / ۶۴۰	a. / ۲۹۶	ab. / ۲۶۵	def. / ۰۳۱	abc۵۶ / ۲۵	bc. / ۵۸۳	I3
ab. / ۷۵۹	de. / ۱۶۶	bcd. / ۱۳۶	cde. / ۰۴۰	ab۶۳ / ۴۰	c. / ۲۵۰	I4
abc. / ۷۴۵	abcd. / ۲۳۳	bc. / ۲۰۷	def. / ۰۳۰	abc۵۴ / ۸۷	c. / ۴۰۰	I1
abc. / ۷۴۹	abcde. / ۲۱۵	b. / ۲۲۰	def. / ۰۲۸	abc۵۸ / ۰۵	c. / ۴۰۰	I2
cdef. / ۶۷۱	abc. / ۲۷۴	bcd. / ۱۷۴	abc. / ۰۵۰	ab۶۲ / ۴۸	bc. / ۴۶۶	I3
abc. / ۷۵۴	ef. / ۱۴۰	bc. / ۱۹۷	bcd. / ۰۴۶	ab۵۹ / ۸۸	c. / ۴۰۰	I4
abcd. / ۷۳۰	cde. / ۱۹۶	bcd. / ۱۸۵	abc. / ۰۵۴	bc۵۳ / ۸۳	bc. / ۴۵۰	I1
abc. / ۷۴۷	bcde. / ۱۹۹	ab. / ۲۵۳	abc. / ۰۵۶	bc۵۲ / ۸۵	bc. / ۷۶۶	I2
bcdef. / ۶۸۱	ab. / ۲۸۵	ab. / ۲۵۰	a. / ۰۶۵	a۶۶ / ۵۳	bc. / ۶۶۶	I3
bcde. / ۷۱۱	ab. / ۲۸۲	ab. / ۲۵۱	ab. / ۰۶۲	ab۶۱ / ۱۵	bc. / ۴۶۶	I4

اعداد با یک حرف مشترک در هر ستون، نشان دهنده عدم اختلاف آماری معنی‌دار است. M1: شاهد (عدم استفاده از قارچ)، M2: استفاده از گونه M3: *Mycorrhiza Glomus mosseae*، استفاده از گونه *Mycorrhiza Glomus intraradices*، M4: استفاده از تلفیق ۵۰٪ از هر دو گونه قارچ، I1: شاهد (آبیاری در ۱۰۰٪ ظرفیت زراعی)، I2: تنش کم آبی خفیف (آبیاری در ۷۵٪ ظرفیت زراعی)، I3: تنش کم آبی متوسط (آبیاری در ۵۰٪ ظرفیت زراعی)، I4: تنش کم آبی شدید (آبیاری در ۲۵٪ ظرفیت زراعی).

غذایی موجود در خاک و در نتیجه عدم تعادل تغذیه‌ای در گیاهان می‌شود (۲۶). استویا گیاهی حساس به خشکی است. بروز تنش آبی در طول دوره رویشی آن سبب کوچک شدن برگ‌ها، در نتیجه کاهش وزن خشک برگ گیاه استویا به عنوان منبع اصلی قندهای گلیکوزیدی و

بحث و نتیجه گیری

بر اساس مطالعات انجام شده، تنش خشکی با اثر بر بافت‌های گیاه، باعث محدود نمودن رشد و بروز برخی تغییرات فیزیولوژیکی و متابولیکی در آنها می‌گردد. علاوه‌براین موجب اختلال در دسترسی ریشه به عناصر

کاهش وزن خشک کل گیاه می‌گردد (۶، ۱۹، ۳۲، ۳۵). اثرات مثبت قارچ‌های میکوریزا در افزایش ارتفاع ساقه اصلی، سطح برگ و ماده خشک گیاه در شرایط محدودیت آبیاری در نواحی خشک به اثبات رسیده است (۲۳). علت افزایش عملکرد محصول در گیاهان تلقیح شده با میکوریزا، تعادل آبی آن‌ها در شرایط تنش کم‌آبی و در نتیجه جذب بیشتر آب و عناصر معدنی گزارش شده است (۱۶). نتایج پژوهش‌ها توانایی تلقیح ریشه استویا با گونه‌های قارچ میکوریزا و بهبود رشد این گیاه را تایید نموده اند (۲۵). نتایج اندازه‌گیری ارتفاع ساقه اصلی در پژوهش حاضر، حاکی از اثر مثبت کاربرد مخلوط دو گونه قارچ میکوریزا در جهت خنثی کردن اثر تنش کم‌آبی و افزایش بهره‌وری زراعی گیاه استویا در شرایط تنش کم‌آبی می‌باشد. بطوریکه کاربرد مخلوط دو گونه قارچ میکوریزا در شرایط تنش کم‌آبی خفیف (آبیاری در ۷۵٪ ظرفیت زراعی) سبب افزایش ارتفاع ساقه گیاه نسبت به شرایط مشابه تنش کم‌آبی خفیف بدون استفاده از قارچ میکوریزا است. کاربرد گونه‌های قارچ میکوریزا در همزیستی با گیاهان، سبب افزایش شاخص‌های رشدی و عملکرد ماده خشک، در مقایسه با شرایط عدم استفاده از قارچ‌های میکوریزا شده است. به طوری که این گیاهان دارای مواد فتوسنتزی بیشتری نسبت به گیاهان همزیست با قارچ‌های غیرمیکوریزایی بودند. مکانیسم‌های متعددی برای بیان این اثر از قبیل افزایش هدایت هیدرولیکی ریشه، تنظیم اسمزی گیاه میزبان و بهبود تماس با ذرات خاک از طریق هیف قارچ که قادر به استخراج آب از منافذ ریز می‌باشد، گزارش شده است (۲۷). تنش خشکی با اثر بر بافت‌ها سبب بسته شدن روزنه‌ها و کاهش تبادل دی‌اکسیدکربن در برگ‌ها شده که کاهش فتوسنتز، اندازه سطح برگ و تولید بیوماس را در پی دارد (۲۶). تلقیح ریشه‌های گیاه استویا با قارچ میکوریزا در شرایط تنش خشکی و محدودیت آبیاری، موجب بهبود رشد، میزان سطح برگ و وزن خشک گیاه شده است (۲۵). همچنین مشخص شد که گونه‌های

قارچ میکوریزا آرباسکولار می‌توانند اثرات منفی محدودیت آب را کاهش دهد و رشد گیاه را در شرایط کشت گلخانه‌ای بهبود بخشند (۵، ۹، ۲۹). مخلوط دو گونه قارچ میکوریزا سبب افزایش بیش از ۳ برابری سطح برگ گیاه استویا، بهبود سطح برگ و وزن خشک گیاه در نتیجه این همزیستی گردید. نتایج مثبت ارتباط همزیستی قارچ شبه میکوریزای *piriformospora indica* با استویا در جهت تحریک رشد آن گیاه در شرایط تنش‌های شوری و خشکی گزارش شده است (۳۰). تنش کم‌آبی عمده تأثیر خود را از طریق تنش عناصر غذایی بر صفات فیزیولوژیک گیاه برجای می‌گذارد و بهترین تیمار برای مبارزه با تنش کم‌آبی و عناصر غذایی در یونجه، تلقیح بذرها با سویه گلوموس موسه آ قارچ میکوریزا و باکتری سینوریزوبیوم میلیوتی به حالت تلقیح دوگانه بود، همچنین نتیجه دیگر نشان داد، با اینکه سینوریزوبیوم میلیوتی باکتری همزیست یونجه است، اما قارچ میکوریزا، سویه گلوموس موسه آ در حالت تلقیح انفرادی نسبت به تلقیح انفرادی باکتری ارجحیت داشت که تأثیر مثبت کاربرد سویه گلوموس موسه آ بر خصوصیات بیوشیمیایی و مورفوفیزیولوژیک گیاه یونجه در شرایط تنش کم‌آبی را نشان داد (۳) و تاییدی بر نتایج حاصل از اثرات مثبت کاربرد سویه‌های قارچ میکوریزا بر گیاه استویا در شرایط تنش کم‌آبی در تحقیق حاضر است. در پژوهش حاضر مخلوط دو گونه قارچ میکوریزا نسبت به عدم کاربرد میکوریزا در شرایط تنش کم‌آبی، شاخص سبزیگی برگ را به میزان ۲۸/۷۶٪ افزایش دادند. قارچ‌های میکوریزا آرباسکولار سبب تشکیل وزیکول‌ها، آرباسکول‌ها و هیف‌ها در ریشه‌های گیاه همزیست و همچنین تشکیل اسپورها و هیف‌ها در ریزوسفر خاک شده است. این عمل موجب تشکیل شبکه‌ای از رشته‌های هیف در همزیستی با ریشه‌های گیاه، افزایش دسترسی ریشه‌ها و جذب عناصر غذایی می‌گردد. از طرفی هیف‌های قارچی می‌توانند روند تجزیه مواد آلی خاک را تسریع نموده و با افزایش دسترسی و انتقال

بیشتری به کم‌آبی در شرایط تنش خشکی از خود نشان می‌دهند (۷). در تحقیق حاضر مشخص گردید در شرایط بدون تنش و استفاده از مخلوط گونه‌های قارچ میکوریزا، جذب پتاسیم نسبت به عدم کاربرد میکوریزا افزایش داشته است. این درحالی است که میزان جذب سدیم و پتاسیم در شرایط تنش خشکی و همزیستی با قارچ میکوریزا نسبت به عدم کاربرد قارچ تفاوت چندانی نشان نداد. کافی و همکاران بیان داشتند در مواردی که درصد پتاسیم و سدیم در گیاهان تحت تنش خشکی کمتر است می‌تواند ناشی از کاهش قابلیت دسترسی به این عناصر در شرایط کمبود رطوبت باشد (۴). با توجه به نتیجه می‌توان گفت در شرایط تنش کم‌آبی این تحقیق، همزیستی تلفیق گونه‌های قارچ میکوریزا با گیاه استویا نسبت به سایر تیمارها توانسته بر میزان یون‌های سدیم و پتاسیم تاثیر گذار باشد. نتایج بررسی میزان قندکل و قندهای محلول ساکارز، گلوکز و فروکتوز نشان داد رشد اندام‌های مکنده قارچ میکوریزا و ارتباط همزیستی با سلول‌های بافت ریشه گیاه، قدرت و سطح جذب ریشه‌های گیاه را افزایش داده است. این امر موجب بهبود انتقال مواد مغذی خاک از طریق هیف‌های قارچ میکوریزا و ثبات خاک در شرایط تنش خشکی گردیده است. محققان بیان داشتند در تنش خشکی، گیاه برای حفظ تعادل اسمزی و توانایی جذب بیشتر آب از محیط ریشه، مقدار ترکیباتی مانند کربوهیدرات‌ها را که در ساختار سلول‌ها و رشد گیاه شرکت دارند را در جهت بهبود تنظیم اسمزی افزایش می‌دهد (۲۶). پژوهشگران نشان دادند که در گیاهان تحت تیمار با قارچ میکوریزا، افزایش زیست‌توده به دلیل بهبود جذب عناصر غذایی (نیتروژن، پتاسیم، منیزیم، مس، آهن، منگنز و روی)، افزایش شاخص سبزی‌نگی برگ و هیدرات‌های کربن مشاهده شده است (۲۰). نتایج تحقیق حاضر مبین این موضوع است که همزیستی گونه‌های قارچ میکوریزا با ریشه‌های گیاهچه‌های استویا تکثیرشده به روش کشت بافت در مقایسه با تیمار شاهد (بدون

مواد غذایی مختلف به گیاه باعث بهبود رشد و سبزی‌نگی گیاه می‌شوند. علاوه بر این قارچ‌های میکوریزا در افزایش تثبیت CO₂ اتمسفری در گیاه میزبان، با افزایش اثر مبدا به مخزن و اثرگذاری بر انتقال فتوآسمیلات‌های تولید شده در بخش‌های هوایی به سمت ریشه نقش دارند. همچنین قارچ‌های میکوریزا آرباسکولار بواسطه ایجاد ارتباطات بین گیاه و قارچ، منجر به افزایش سرعت فتوسنتز و سایر عوامل مرتبط با تبادل گازها و در نتیجه رشد گیاهان میزبان در شرایط تنش می‌گردند (۱۰). تأثیر پذیری خصوصیات بیوشیمیایی گیاه استویا از محیط کشت، نشان داد بستر کشت و نوع ماده مغذی افزوده شده به بستر نقش بسزایی در میزان تولید فرآورده‌های بیوشیمیایی گیاه استویا دارند (۲). بنابراین با توجه به هدف کشت گیاه، بایستی محیط و تیمار غذایی مناسب انتخاب شود که نتایج تحقیق حاضر نیز نشان داد در نتیجه همزیستی ریشه‌های گیاه استویا با سویه‌های گلووموس موسه آ و اینترادیسز دسترسی گیاهچه‌های استویا به مواد غذایی افزایش یافته، در نتیجه اثرات مثبتی بر خصوصیات مورفوفیزیولوژیک و بیوشیمیایی گیاهچه‌های تحت تیمار سویه‌های قارچ میکوریزا نسبت به شرایط عدم کاربرد میکوریزا نشان داد. مطالعات نشان داده‌اند که همزیستی گیاهان مختلف با قارچ‌های *Glomus mosseae* و *Glomus geosporum*. بطور معنی‌داری شاخص سبزی‌نگی برگ را در تنش‌های خشکی و شوری افزایش داده‌اند (۱۵) که تاییدکننده نتایج تحقیق حاضر است. بیشترین مقدار یون پتاسیم از تیمار مخلوط دو گونه قارچ میکوریزا و آبیاری در ۵۰٪ ظرفیت زراعی بدست آمد که بیانگر اثر مثبت همزیستی مخلوط دو گونه قارچ میکوریزا بر جذب یون پتاسیم، بهبود نقش آن در کنترل روزه‌ها و افزایش تاب‌آوری گیاه در شرایط تنش خشکی است. گیاهان همزیست با گونه‌های قارچ میکوریزا، از طریق افزایش جذب عناصری همچون: فسفر، پتاسیم، آهن، مس و روی که در انتقال انرژی، تنظیم اسمزی، سنتز رنگیزه‌ها و فتوسنتز نقش دارند، مقاومت

داشته است. با توجه به این نتایج، می‌توان تیمار مخلوط دو گونه *Glomus intraradices* و *Glomus mosseae* در شرایط تنش کم‌آبی (تیمار M4I3) را به عنوان مناسب‌ترین تیمار جهت حفاظت گیاه استویا در شرایط تنش کم‌آبی ناشی از کاهش میزان آبیاری معرفی نمود.

گونه‌های قارچ میکوریزا) در شرایط تنش کم‌آبی، موجب جلوگیری از کاهش سطح برگ، حفظ عملکرد و کاهش حداکثری خسارت ناشی از تنش خشکی می‌گردد. علاوه بر این همزیستی با قارچ‌های میکوریزا، افزایش مقادیر صفات مورفوفیزیولوژیک و بیوشیمیایی، در نتیجه افزایش میزان قندهای ساکارز، گلوکز و فروکتوز را به دنبال

منابع

- آذر پور، ا.، م. ک. معتمد، ح. ر. بزرگی. ۱۳۹۲. زراعت و ترویج استویا (گیاه شناسی، کاشت، داشت، برداشت، شیمی، صنعت و فرآوری). انتشارات دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان. ۷۹۶ ص.
- اصغری، ر. ۱۳۹۶. مقایسه اثر تیمار تغذیه ای و نوع بستر کشت بر برخی خصوصیات فیتوشیمیایی گیاه استویا. مجله پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست‌شناسی ایران). جلد ۳۰، شماره ۲، صفحه ۲۶۴-۲۷۲.
- ظفری، م.، ع. عبادی، ع. جهانبخش گنده کهریز، س. ۱۳۹۷. اثر توأم قارچ و باکتری بر افزایش اسمولیت های سازگاری در یونجه تحت تنش کم آبی. مجله پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست‌شناسی ایران). جلد ۳۱، شماره ۱، صفحه ۱۶۵-۱۵۶.
- کافی، م.، ا. برزوئی، م. صالحی، ع. کمندی، ع. معصومی، ج. نباتی. ۱۳۹۱. فیزیولوژی تنش های محیطی در گیاهان. انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد. ۵۰۲ ص.
- Abbaspour, H., Saeidi-Sar, S., Afshari, H., and Abdel-Wahhab, M. A. 2012. Tolerance of mycorrhiza infected pistachio (*Pistacia vera* L). Seedling to drought stress under glasshouse conditions. J. Plant Physiol. 169, 704-709. doi: 10.1016/j.jplph.2012.01.014
- Aladakatti, YR., YB. Palled, MB. Chetti, SI. Halikatti, SC. Alagundagi, PL. Patil, VC. Patil and AD. Janawade. 2012. Effect of irrigation schedule and planting geometry on growth and yield of stevia (*Stevia rebaudiana Bertoni*). Karnataka J. Agric. Sci, 25: 30-35.
- Bagheri, V., M.H. Shamsir, H. Alaei and H. Salehi. 2019. Effect of Three Species of Arbuscular Mycorrhizal Fungi on Growth and Nutrients Uptake in Zinnia Plant under Drought Stress Conditions. Journal of Plant Productions. Agronomy, Breeding and Horticulture (Scientific Journal of Agriculture), winter, 41(4): 83-96.
- Bardgett, R. D., M. Liesje and F. T. De Vries. 2014. Going underground: root traits as drivers of ecosystem processes. Trends Ecol. Evol. 29, 692-699. doi: 10.1016/j.tree.2014.10.006.
- Barzana, G., R. Aroca, G. P. Bienert, F. Chaumont and J. M Ruiz-Lozano. 2014. New insights into the regulation of aquaporins by the arbuscular mycorrhizal symbiosis in maize plants under drought stress and possible implications for plant performance. Mol. Plant Microbe Interact. 27, 349-363. doi: 10.1094/MPMI-09-13-0268-R.
- Begum, N., C. Qin, M. A. Ahanger, S. Raza, M. I. Khan, M. Ashraf, N. Ahmed, and L. Zhang. 2019. Role of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Plant Growth Regulation: Implications in Abiotic Stress Tolerance. Frontiers in Plant Science.; 10: 1068. doi: 10.3389/fpls.2019.01068.
- Brundrett, M. C., and L. Tedersoo. 2018. Evolutionary history of mycorrhizal symbioses and global host plant diversity. New Phytol. 220, 1108-1115. doi: 10.1111/nph.14976.
- Curry, L., and R. Ashley. 2008. Subchronic toxicity of rebaudioside A. Cargill Incorporated. J. Process Biochem, 83: 115-117.
- Fallahi, J., M. T. Ebadi and R. Ghorbani. 2009. The effects of salinity and drought stresses on germination and seedling growth of clary. Environmental Strees of Agriculture Science. 1(1): 57-67 (in Persian).
- Fay, P. A., J. D. Carlisle, A. K Knapp, J. M. Blair and S. L. Collins. 2003. Productivity responses to altered rainfall patterns in a C4-dominated grassland. Oecologia 137, 245-251. Doi: 10.1007/s00442-003-1331-3.
- Habibi, S., M. Meskarbashee and M. Farzaneh. 2014. Influence of three species of mycorrhizal fungi (*Glomus SPP.*) on physiological characters of wheat under the salinity conditions. Journal of Plant Productions. Agronomy, Breeding and Horticulture (Scientific Journal of Agriculture). Autumn, 37(3): 37-52.

16. Habibzadeh, Y., J. Jalilian, M. R. Zardashti, A. Pirzad and O. Eini. 2015. Some morphophysiological characteristics of mung bean mycorrhizal plants under different irrigation regimes in field condition. *Journal of Plant Nutrition*, 38(11), 1754-1767.
17. Haji Mohammadi, A., R. Zarghami, A. Kashani, H. Heydari Sharifabad and G. Nour Mohammadi. 2017. Effect of Different Hormonal Treatment on *Stevia (rebaudiana Bertoni)* Micro-propagation. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 20: 457-464.
18. Kanta, C., I. P. Sharma and P. B. Rao. 2016. Influence of water deficit stress on morphophysiological and biochemical traits of four medicinal plant species in Tarai region. *Res. Environ*, 9: 1391-1396.
19. Li, X., T. Zhu, F. Peng, Q. Chen, S. Lin and P. Christie. 2015. Inner Mongolian steppe arbuscular mycorrhizal fungal communities respond more strongly to water availability than to nitrogen fertilization. *Environ. Microbiol.* 17, 3051-3068. doi: 10.1111/1462-2920.12931.
20. Mandal, S., H. Elvelin, B. Giri, V. P. Singh and R. Kapoor. 2013. Arbuscular mycorrhiza enhances the production of stevioside and rebaudioside-A in *Stevia rebaudiana* via nutritional and non-nutritional mechanisms. *Applied Soil Ecology*, 72: 187-194.
21. Mathur, S., R.S. Tomar and A. Jajoo. 2018. Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) protects photosynthetic apparatus of wheat under drought stress. *Photosynth. Res.* 139, 227-238. doi: 10.1007/s11120-018-0538-4.
22. Muller, B., F. Pantin, M. Génard, O. Turc, S. Freixes, and M. Piques. 2011. Water deficits uncouple growth from photosynthesis, increase C content, and modify the relationships between C and growth in sink organs. *J. Exp. Bot.* 62, 1715-1729. doi: 10.1093/jxb/erq438.
23. Naher, U. A., R. Othman and Q. A. Panhwar. 2013. Beneficial effects of mycorrhizal association for crop production in the tropics (a review). *International Journal of Agriculture and Biology*, 15(5), 1021-1028.
24. Nezami, A., J. Nabati, M. Kafi, and M. Mohseni. 2009. Evaluation of salinity tolerance at emergence and seedling stages of kochia under control environment. *Environmental Stress of Agriculture Science* 1(1): 69-77.
25. Noori Akandi, Z., 2015. Effect of *Piriformospora indica* mycorrhiza-like fungi on salt tolerance of *stevia (Stevia rebaudiana B.)* medicinal plant in controlled conditions. MSc thesis, Sari Agricultural Science and Natural Resources University, Sari, Iran (in Persian).
26. Nourzad, S., A. Ahmadian and M. Moghaddam. 2015. Proline, Total Chlorophyll, Carbohydrate Amount and Nutrients Uptake in Coriander (*Coriandrum Sativum L.*) under Drought Stress and Fertilizers Application. *Iranian Journal of Field Crops Research*, 13(1): 131-139.
27. Ortas, I., N. Sari, C. Akpınar and H. Yetisir. 2011. Screening mycorrhiza species for plant growth, P and Zn uptake in pepper seedling grown under greenhouse conditions. *Scientia Horticulturae*, 128(2), 92-98.
28. Piao, S. L., P. Ciais, G. Y. Huan, Z. H. Shen, S. S. Peng, J. S. Li. 2010. The impacts of climate change on water resources and agriculture in China. *Nature* 467, 43-51. doi: 10.1038/nature09364.
29. Porcel, R., and J. M. Ruiz-Lozano. 2004. Arbuscular mycorrhizal influence on leaf water potential, solute accumulation, and oxidative stress in soybean plants subjected to drought stress. *J. Exp. Bot.* 55, 1743-1750. doi: 10.1093/jxb/erh188.
30. Seraj, F., H.A. Pirdashti, Y. Yaghoobian and V.G. Omran. 2016. The effect of *Piriformospora indica* inoculation on salt and drought stress tolerance in *stevia rebaudiana* under in vitro conditions. *Iranian Journal of Plant Biology*, 8th Year, 29: 1-20.
31. Sheligl, H. Q. 1986. Die verwertung orgngischer souren durch chlorella lincht. *Planta Journal*, 47-51.
32. Shi, Y., and GX. Ren. 2012. The effects of drought stress on the photosynthetic parameters and dry leaf yield of *Stevia rebaudiana Bertoni*. *Adv. Mater. Res.* 518: 4786-4789.
33. Shukla, N., R. P. Awasthi, L. Rawat and J. Kumar. 2012. Biochemical and physiological responses of rice (*Oryza sativa L.*) as influenced by *Trichoderma harzianum* under drought stress. *Plant Physiol. Biochem.* 54, 78-88. doi: 10.1016/j.plaphy.2012.02.001.
34. Trenberth, K. E., A. Dai, G. V. D. Schrier, P. D. Jones, J. Barichivich and K. R. Briffa. 2014. Global warming and changes in drought. *Nat. Clim. Chang.* 4, 17-22. doi: 10.1038/nclimate2067.
35. Vasilakoglou, I., D. Kalfountzos, N. Gougoulas and C. Reppas. 2015. Productivity of two stevia varieties under reduced irrigation and

fertilization inputs. Arch, Agron, Soil Sci, <http://www.tandfonline.com/loi/gags20>.

36. Xia, C., M. J. Christensen, X. Zhang, and Z. Nan. 2018. Effect of *Epichloe gansuensis* endophyte

and transgenerational effects on the water use efficiency, nutrient and biomass accumulation of *Achnatherum inebrians* under soil water deficit. Plant Soil 424, 555–571. Doi: 10.1007/s11104-018-3561-5.

The effect of mycorrhizas under water deficit conditions on some morphophysiological and biochemical traits in greenhouse cultivation of *Stevia* Tissue culture plantlets

Ali Haji Mohammadi¹, Reza Zarghami^{2*}, Ali Kashani³, Hossein Heydari Sharifabad¹, Ghorban Nour Mohammadi¹

¹Dept. of Agronomy, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, I.R. of Iran.

² Dept. of Tissue and Cell Culture, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research, Education & Extension Organization (AREEO), Karaj, I.R. of Iran.

³ Dept. of Agronomy, College of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, I.R. of Iran.

Abstract

The current research is conducted to investigate the effect of application of mycorrhiza treated soil under water deficit stress on some morphophysiological and biochemical traits of stevia plants obtained from tissue culture. The experiment was done in a greenhouse condition with treatments of two mycorrhiza species at four levels (M₁: without mycorrhiza, M₂: *Glomus mosseae*, M₃: *Glomus intraradices*, M₄: mixed of both species) and application of water deficit. The irrigation was applied at four levels as follows: I₁: maintaining soil moisture at 100% of field capacity, I₂: irrigation after reaching 75% of field capacity, I₃: irrigation after reaching 50% of field capacity, I₄: irrigation after reaching 25% of field capacity. The statistical model was factorial experiment using completely randomized design with 6 replications. Application of mycorrhiza species in water deficit stress conditions due to 1.70, 4.11, 1.73 and 4.32 fold increase in leaf greenness index, total plant dry weight, main stem height and leaf area parameters, respectively. In addition, these treatments caused to 1.66, 6.13, 29.6 and 1.30 fold increase of potassium, glucose, fructose and total soluble sugars in stevia plants. Under moderate and severe water deficit stress, the use of a mixture of mycorrhiza species in treatments M₄I₄ and M₄I₃ compared to treatments M₁I₄ and M₁I₃ (without mycorrhiza fungus) increased more than threefold the leaf area of stevia tissue culture plants that positive root symbiosis stevia plants were well clarified by mixing two species of mycorrhizal fungi under water deficit stress and irrigation restrictions.

Key words: Stevia, Potassium, Sucrose, total sugars, Mycorrhiza.