DOR: 20.1001.1.23832592.1402.36.1.2.3
مقاله پژوهشی

اثر گونه‌های مایکوریزا 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 مایکوریزا 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 دوگونه قارچ مایکوریزا در چهار سطح، M_1: شاهد (بدون قارچ مایکوریزا)، M_2: گونه *Mycorrhiza Glomus mosseae*، M_3: گونه *Mycorrhiza Glomus intraradices*، M_4: استفاده از تلفیق ۵۰ درصدی دو گونه قارچ مایکوریزا، و اعمال تنش کم‌آبی در چهار سطح: شاهد(I_1)، تنش‌های کم‌آبی خفیف (I_2)، متوسط (I_3) و شدید (I_4) بترتیب آبیاری در۱۰۰٪، ۷۵٪، ۵۰٪ و ۲۵٪ ظرفیت زراعی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با ۶ تکرار انجام پذیرفت. کاربرد گونه‌های قارچ مایکوریزا در شرایط تنش کم‌آبی بترتیب موجب افزایش ۱/۷۰، ۴/۱۱، ۱/۷۳ و ۴/۳۲ برابری شاخص سبزینگی، وزن خشک کل گیاه، ارتفاع گیاه و سطح برگ گیاه در مقایسه با شاهد گردید. علاوه براین، کاربرد گونه‌های قارچ مایکوریزا 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 مایکوریزا، در تیمارهای M_4I_4 و M_4I_3 در مقایسه با تیمارهای M_1I_4 و M_1I_3 منجر به افزایش بیش از سه برابری سطح برگ گیاهان کشت بافتی استویا گردید. نتایج نشان‌دهنده همزیستی مثبت ریشه‌های استویا با تلفیق دو گونه مایکوریزا در شرایط تنش کم‌آبی است.

واژه های کلیدی: استویا، پتاسیم، ساکارز، قندکل، مایکوریزا.

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۲۱۵۹۳۵۵۱، پست الکترونیکی: zarghami@abrii.ac.ir

مقدمه

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 eupatoria*، *Stevia ovate* و *Stevia salicifolia*، *Stevia plummerae*، *willd Stevia 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

DOR: 20.1001.1.23832592.1402.36.1.2.3
مقاله پژوهشی

طبیعی جایگزین شیرین‌کننده‌های مصنوعی همچون آسپارتام، سدیم‌ساخارین 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 شدت‌یافتن 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، ازاین‌رو 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 نیمه خشک 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 می گیرد. یکی از مشکلات تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاه استویا، تفرق صفات ناشی از کشت بذور و اثرات منفی آن بر متابولیت‌های ثانویه می‌باشد. این در حالی است که تکثیر قلمه این گیاه نیز هزینه بالا و تلفات زیادی را به‌همراه دارد. از تکنیک کشت بافت گیاهی می‌توان برای رفع این موانع، ایجاد مزارع 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 درنتیجه کاهش وزن‌خشک کل خواهد شد (۶، ۱۸، ۳۲، ۳۵). گونه‌های قارچ مایکوریزا یکی از مهمترین میکروارگانیسم‌های خاک بوده که در همزیستی با ریشه حدود ٪۷۲ گیاهان فعالیت می‌نمایند (۱۱). توانایی تلقیح گیاه استویا با قارچ مایکوریزا و بهبود رشد آن در نتیجه این همزیستی تایید شده است (۲۵). گونه‌های قارچ مایکوریزای آرباسکولار می‌تواند اثرات منفی محدودیت آب را کاهش دهد و رشد گیاه را در شرایط کشت گلخانه‌ای بهبود بخشد (۵، ۹، ۲۹). کشاورزی دراقلیم خشک و نیمه‌خشک ایران، ضرورت تحقیق در زمینه کاهش اثرات تنش کم‌آبی برعملکرد گیاهان زراعی را اجتناب ناپذیر نموده است، ازاین‌رو در تحقیق حاضر پس‌از تکثیر گیاهچه‌های استویا به‌روش کشت بافت گیاهی، اثرگونه‌های قارچ مایکوریزا 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 ۱۳۹۴تا 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 شیشه های 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

DOR: 20.1001.1.23832592.1402.36.1.2.3
مقاله پژوهشی

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 برگی از گلدان‌های کوچک به گلدان‌های سه کیلوگرمی با قطر دهانه ۲۰ و ارتفاع ۳۰ سانتی متر در گلخانه با دمای حداقل ۱۷ و حداکثر ۲۵ درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۳۱-۲۲درصد 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 مایکوریزا 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 مایکوریزا (با تراکم ۳۶۰۰ عدد اسپور در ۳ کیلوگرم خاک هر گلدان) با توجه به نوع تیمار قارچ (جدول۱)، بصورتی که ریشه‌ها در تماس مستقیم با خاک محتوی اسپورها باشند، با خاک اطراف 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 مایکوریزا، از کلینیک گیاه‌پزشکی ارگانیک (استان همدان)، به صورت کیسه‌های ۵ کیلوگرمی خاک محتوی گونه‌ها، با خصوصیات پروپاگل ۹۳۷، طول ریسه‌های 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 کاملا تصادفی در ۶ تکرار با ۵ گلدان در هر تکرار انجام پذیرفت (شکل۱). فاکتورهای آزمایش شامل دو گونه قارچ مایکوریزا به عنوان عامل اول در چهار سطح M_1: شاهد (بدون مایکوریزا)، M_2: استفاده از گونه *Mycorrhiza Glomus mosseae* (۳۰ گرم خاک محتوی قارچ) در ۳ کیلوگرم خاک زراعی، M_3: استفاده از گونه *Glomus Mycorrhiza intraradices* (۳۰ گرم خاک محتوی قارچ) در ۳ کیلوگرم خاک زراعی، M_4: استفاده از هر دو گونه قارچ بصورت مخلوط با یکدیگر (۱۵ گرم از هریک از خاک‌های محتوی گونه‌های قارچی) می باشند.

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 سازگارشده به گلخانه، **ث**: اعمال تیمارهای قارچ مایکوریزا و تنش کم‌آبی به گیاهان استویا.

DOR: 20.1001.1.23832592.1402.36.1.2.3
مقاله پژوهشی

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

Mn (gr/m^3)	Fe (gr/m^3)	B (gr/m^3)	S (gr/m^3)	Mg (gr/m^3)	K (gr/m^3)	P (gr/m^3)	Total (gr/m^3) N
۰/۸	۰/۴۵	۰/۱۵	۳۶	۲	۷۵	۳۵	۷۰
PG MiX $N:P_2O_5:K_20$ 14:16:18 (Kg/m^3)	Ec mS/cm 1:1.5	Dolomit (Kg/m^3)	kalk (Kg/m^3)	Cu (gr/m^3)	Zn (gr/m^3)	Mo (gr/m^3)	
۰/۵	۰/۶	۳	۳	۰/۶	۰/۲	۱	

تیمارهای تنش کم‌آبی به عنوان عامل دوم در چهار سطح I_1: شاهد (آبیاری در ۱۰۰٪ ظرفیت زراعی). I_2: تنش کم‌آبی خفیف (آبیاری در ۷۵٪ ظرفیت زراعی). I_3: تنش کم‌آبی متوسط (آبیاری در ۵۰٪ ظرفیت زراعی). I_4: تنش کم‌آبی شدید (آبیاری در ۲۵٪ ظرفیت زراعی) در نظرگرفته 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، سپری‌شدن دو ماه از دفعات آبیاری و اعمال تیمارهای آبیاری (جدول۲) اندازه‌گیری صفات مورد آزمایش به شرح ذیل صورت پذیرفت:

- صفت شاخص سبزینگی برگ (عدد SPAD) به روش غیرتخریبی و با استفاده از دستگاه کلروفیل‌متر (مدل SPAD-502 plus ساخت کشور ژاپن) اندازه‌گیری شد.
- اندازه‌گیری ارتفاع ساقه اصلی، سطح برگ و وزن‌خشک کل گیاه به روش تخریبی صورت گرفت. در این راستا پس از برداشت گیاهان با سه تکرار از خاک (در مجموع۳۰ 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 وزن‌خشک 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 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 درادامه 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 استقرارگیاهچه های استویا درخاک، بطور یکنواخت در تمامی گلدان ها صورت پذیرفت و در ادامه تیمارهای تنش کم‌آبی اعمال گردیدند.

DOR: 20.1001.1.23832592.1402.36.1.2.3
مقاله پژوهشی

آماده سازی نمونه و استخراج کاتیون‌های پتاسیم و سدیم: اندازه‌گیری کاتیون‌های پتاسیم و سدیم برگ با استفاده از دستگاه یون کروماتوگرافی (مدلMetrohm850 ساخت کشور ژاپن) بر اساس روش شلیگل (۳۱) صورت پذیرفت. ابتدا ۰/۰۲۵ گرم نمونه فریز درایر شده را درون فالکون ۱۵ میلی‌لیتری ریخته و ۲/۵ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۰/۱ نرمال به آن اضافه و فالکون‌ها 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 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 جداشده در فالکون‌های ۱۵ میلی‌لیتری ریخته شد. با قراردادن فالکون‌ها 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 میکرولیتر سولفات‌روی ۵٪ اضافه و نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۵درجه سانتی‌گراد با ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. فازرویی جدا و در فالکون‌های ۱۵ میلی‌لیتری ریخته و۲ میلی‌لیتر از محلول حاصل جهت اندازه‌گیری قندکل به ویال‌های جداگانه منتقل شد. با قرار دادن فالکون‌ها 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-10µm 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،

DOR: 20.1001.1.23832592.1402.36.1.2.3
مقاله پژوهشی

گلوکز و فروکتوز محاسبه و به صورت میلی‌گرم برگرم وزن‌خشک 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 روشHPLC) به یک فالکون 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_0.655حاصل از نمودار استانداردهای تهیه شده برای قند کل، به عنوان y معادله قرار داده و میزان قندکل نمونه‌ها (x معادله) برحسب میلی‌گرم بر گرم ماده خشک بدست آمد.

آنالیز آماری: تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها بوسیله نرم‌افزارهای SAS وMSTAT-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 (جداول۳ و۵).

ارتفاع ساقه اصلی: بیشترین ارتفاع ساقه اصلی بترتیب ۲۶/۹۲ و۲۲/۸۰ سانتی متر از تیمارهای M_4I_2 (استفاده از مخلوط دو گونه قارچ وآبیاری در ۷۵٪ ظرفیت زراعی) و M_4I_3 (استفاده از مخلوط دو گونه قارچ و آبیاری در ۵۰٪ ظرفیت زراعی) بدست آمد (جدول۴). کمترین ارتفاع ساقه اصلی، ۱۵/۵۰ و ۱۶ سانتی‌متر بوده که بترتیب به تیمارهای M_1I_1 (بدون مایکوریزا و بدون تنش کم‌آبی) و M_1I_4 (بدون مایکوریزا و آبیاری در ۲۵٪ ظرفیت زراعی) اختصاص دارد (جدول۴).

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 M_4I_3 (استفاده از مخلوط دوگونه گلوموس موسه آ و گلوموس اینترارادیسز و آبیاری در۵۰٪ ظرفیت زراعی) می‌باشد (جدول۴). کمترین سطح برگ نیز به میزان ۵۴/۰۴ سانتی‌مترمربع که در تیمار M_1I_2 (بدون مایکوریزا و آبیاری در ۷۵٪ ظرفیت زراعی) ایجاد شده است (جدول۴).

وزن خشک کل گیاه: بیشترین وزن خشک کل گیاه، حاصل تیمارهای M_4I_4 (مخلوط دو گونه قارچ و آبیاری در ۲۵٪ ظرفیت زراعی) و M_4I_3 (مخلوط دو گونه قارچ و آبیاری در۵۰٪ ظرفیت زراعی) بترتیب به میزان ۱/۷۲۸ و ۱/۷۱۸ گرم بوده است. کمترین وزن خشک کل گیاه به تیمارM_1 در تمامی سطوح آبیاری اختصاص یافت (جدول۴).

شاخص سبزینگی برگ: بیشترین میزان شاخص سبزینگی برگ از تیمارM_4 (تلفیق ۵۰٪ از هر دوگونه قارچ) و چهار سطح آبیاری بترتیب ۳۲/۸۸، ۳۵/۸۸، ۳۴/۴۲ و۳۳/۱۶ واحد (عدد SPAD) می‌باشد. کمترین میزان شاخص سبزینگی برگ نیز در طی تیمارM_1I_2 (بدون قارچ و آبیاری در ٪۷۵

DOR: 20.1001.1.23832592.1402.36.1.2.3
مقاله پژوهشی

ظرفیت زراعی) به میزان ۲۱/۰۵ واحد(عدد SPAD) بدست آمد (جدول۴).

جدول ۳- تجزیه واریانس صفات مورد مطالعه در شرایط تنش کم‌آبی و استفاده از قارچ مایکوریزا در کشت گیاه استویا.

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		ارتفاع ساقه اصلی	سطح برگ گیاه	وزن خشک کل گیاه	شاخص سبزینگی برگ
مایکوریزا(M)	۳	۲۵۱/۷۸۷**	۸۴/۸۱۱**	۰/۸۴۱**	۵۳۰/۰۶۶**
آبیاری(I)	۳	۳۶/۳۱۱*	۳/۸۵۳*	۰/۰۰۸*	۲۵/۱۴۶*
مایکوریزا× آبیاری	۹	۱۹/۷۹۹*	۱۳/۱۰۳*	۰/۰۳۱*	۳۳/۵۸۴**
اشتباه آزمایشی	۷۵	۱۹/۵۱۴	۸/۰۱۹	۰/۰۲۰	۹/۳۶۶
ضریب تغییرات(٪)	-	۲۱/۶۷	۲۶/۷۴	۱۱/۷۰	۱۱/۲۹

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

جدول۴ – مقایسه میانگین برهمکنش کاربرد قارچ مایکوریزا تحت شرایط تنش کم‌آبی 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 (عددSPAD)
$I_1 \times M_1$	I_1	e۱۵/۵۰	abc۱۷۹/۰	e۰/۴۵۶	b۲۸/۰۲
	I_2	cde۱۷/۹۲	d۵۴/۰۴	e۰/۴۲۸	e۲۱/۰۵
	I_3	de۱۶/۵۰	cd۷۱/۲۵	e۰/۴۷۷	de۲۲/۹۸
	I_4	e۱۶/۰۰	d۶۱/۹۹	e۰/۴۱۹	cde۲۳/۶۲
$I_1 \times M_2$	I_1	bcde۱۹/۷۵	bcd۸۴/۰۸	cde۰/۷۹۲	bcd۲۶/۳۳
	I_2	cde۱۷/۸۳	bcd۱۲۳/۸	bc۱/۱۲۳	e۲۱/۷۵
	I_3	bcde۱۹/۱۷	bcd۱۰۷/۱	cde۰/۷۹۷	bc۲۷/۳۷
	I_4	bcde۲۰/۵۰	bcd۸۴/۸۷	de۰/۶۵۶	bcd۲۶/۵۸
$I_1 \times M_3$	I_1	cde۱۸/۲۰	bcd۱۱۸/۱	bcd۱/۰۹۴	de۲۲/۷۸
	I_2	ab۲۴/۹۰	bcd۱۱۷/۹	bc۱/۲۱۳	cde۲۳/۶۶
	I_3	abc۲۳/۴۲	abcd۱۳۴/۱	bcd۱/۰۹۲	bcd۲۶/۴۸
	I_4	bcde۲۰/۴۲	bcd۱۱۹/۵	cd۰/۹۴۳	bcd۲۶/۷۳
$I_1 \times M_4$	I_1	abcd۲۲/۰۸	bcd۱۲۶/۴	ab۱/۴۰۷	a۳۲/۸۸
	I_2	a۲۶/۹۲	abcd۱۴۶/۳	bc۱/۲۳۵	a۳۵/۸۸
	I_3	abc۲۲/۸۰	a۲۳۳/۸	a۱/۷۱۸	a۳۴/۴۲
	I_4	ab۲۴/۳۰	ab۱۹۳/۶	a۱/۷۲۸	a۳۳/۱۶

اعداد با یک حرف مشترک در هر ستون، نشان دهنده عدم اختلاف آماری معنی‌داراست. M_1: شاهد (عدم استفاده از قارچ)، M_2: استفاده از گونه *Mycorrhiza Glomus mosseae*، M_3: استفاده از گونه*Mycorrhiza Glomus intraradices*، M_4: استفاده از تلفیق ۵۰٪ از هر دوگونه قارچ، I_1: شاهد (آبیاری در ۱۰۰٪ ظرفیت زراعی). I_2: تنش کم آبی خفیف (آبیاری در ۷۵٪ ظرفیت زراعی). I_3: تنش کم آبی متوسط (آبیاری در ۵۰٪ ظرفیت زراعی). I_4: تنش کم آبی شدید (آبیاری در ۲۵٪ ظرفیت زراعی).

DOR: 20.1001.1.23832592.1402.36.1.2.3
مقاله پژوهشی

یون‌های سدیم و پتاسیم: بیشترین میزان یون سدیم به میزان ۱/۴۱۷ ppm از تیمار M_1I_4 (بدون قارچ و آبیاری در ۲۵٪ ظرفیت زراعی) بدست آمد (جدول ۶) که با دیگر تیمارها تفاوت معنی‌داری نشان داد. ازطرفی سایر تیمارهای اعمال شده از نظر میزان عنصر سدیم تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نشان نداشتند. بنظر می رسد در شرایط تنش‌های کم‌آبی خفیف، متوسط و شدید در اثر استفاده از گونه‌های قارچ مایکوریزا 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 M_4I_3 (مخلوط دو گونه قارچ و آبیاری در ۵۰٪ ظرفیت زراعی) وM_1I_4 (بدون قارچ و آبیاری در ۲۵٪ ظرفیت زراعی) اختصاص یافت و کمترین مقدار یون پتاسیم نیز به میزان ۴۰ ppm از تیمار M_1I_1 (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 M_4I_3 (مخلوط دو گونه قارچ و آبیاری در ۵۰٪ ظرفیت زراعی) بدست آمد، که از این نظر با سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری داشت (جدول۶). ۰/۰۱۵ میلی‌گرم برگرم وزن‌خشک برگ، کمترین میزان ساکارز است که ناشی از اعمال تیمار M_2I_1 (کاربرد گونه گلوموس موسه آ در شرایط بدون تنش کم‌آبی) بدست آمد (جدول۶).

۰/۳۶۸ میلی‌گرم برگرم وزن‌خشک برگ بیشترین میزان گلوکز است که از تیمار M_2I_2 (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 وزن‌خشک برگ است که بترتیب به تیمارهای M_1I_3 (بدون قارچ و آبیاری در ۵۰٪ ظرفیت زراعی) و M_1I_4 (بدون قارچ و آبیاری در ۲۵٪ ظرفیت زراعی) اختصاص یافت. بیشترین میزان فروکتوز به میزان ۰/۲۹۶ میلی‌گرم برگرم وزن‌خشک برگ از تیمار M_2I_3 (کاربرد گونه گلوموس موسه آ و آبیاری در ۵۰٪ ظرفیت زراعی) بدست آمد که ازاین نظر با تیمارهای دیگرتفاوت معنی‌داری دارند. کمترین میزان فروکتوز نیز ۰/۰۱۰ و ۰/۰۱۴ میلی‌گرم برگرم وزن خشک برگ است که بترتیب به تیمارهای M_1I_4 (بدون قارچ و آبیاری در ۲۵٪ ظرفیت زراعی) وM_1I_3 (بدون قارچ و آبیاری در ۵۰٪ ظرفیت زراعی) اختصاص داشته است (جدول۶).

جدول ۵- تجزیه واریانس صفات مورد مطالعه تحت شرایط تنش کم‌آبی و کاربرد قارچ مایکوریزا درگیاه استویا.

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات					
		یون سدیم	یون پتاسیم	ساکارز	گلوکز	فروکتوز	قندکل
مایکوریزا(M)	۳	۰/۰۳۹*	۲۹/۵۷۳ns	۰/۰۰۳**	۰/۰۲۲**	۰/۱۱۳**	۰/۰۱۶**
آبیاری(I)	۳	۰/۰۰۹ns	۴۵۵/۳۶۸**	۰/۰۰۰۱*	۰/۰۰۶**	۰/۰۱۰**	۰/۰۱۲**
مایکوریزا× آبیاری	۹	۰/۰۶۳**	۸۱/۱۳۸*	۰/۰۰۰۱*	۰/۰۰۲*	۰/۰۰۷**	۰/۰۰۵*
اشتباه آزمایشی	۷۵	۰/۰۱۴	۳۸/۰۷۲	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۲	۰/۰۰۲	۰/۰۰۲
ضریب تغییرات(درصد)	-	۱۱/۴۱	۱۰/۷۲	۲۶/۵۱	۴/۷۹	۲۲/۲۲	۶/۱۵

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

DOR: 20.1001.1.23832592.1402.36.1.2.3
مقاله پژوهشی

قندکل: بررسی نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد بیشترین میزان قندهای محلول به میزان ۰/۸۰۸ میلی‌گرم برگرم وزن خشک برگ، از تیمار M_2I_1 (کاربرد گونه گلوموس موسه آ در شرایط بدون تنش کم‌آبی) بدست آمد که از نظر این صفت دارای تفاوت معنی‌داری با دیگر تیمارها است (جدول ۶). کمترین میزان قند کل نیز ۰/۶۲۰ میلی‌گرم برگرم وزن خشک برگ، به تیمار M_1I_1 (بدون قارچ مایکوریزا و بدون تنش کم‌آبی) اختصاص دارد (جدول ۶).

جدول۶ – مقایسه میانگین برهمکنش کاربرد قارچ مایکوریزا تحت شرایط تنش کم‌آبی بر صفات مورد مطالعه گیاه استویا.

برهمکنش تیمارها		یون سدیم (ppm)	یون پتاسیم (ppm)	ساکارز (mg/g)	گلوکز (mg/g)	فروکتوز (mg/g)	قندکل (mg/g)
× M_1	I_1	ab۱/۰۰	d۴۰/۰۰	def۰/۰۳۰	cd۰/۰۸۳	g۰/۰۶۱	f۰/۶۲۰
	I_2	c۰/۲۳۳	abc۵۵/۵۳	cde۰/۰۳۹	bcd۰/۱۵۴	fg۰/۰۶۸	cdef۰/۶۷۱
	I_3	c۰/۴۰۰	ab۵۹/۹۷	ef۰/۰۲۳	d۰/۰۶۰	g۰/۰۱۴	def۰/۶۴۶
	I_4	a۱/۴۱۷	a۶۶/۰۷	ef۰/۰۲۶	d۰/۰۶۲	g۰/۰۱۰	cdef۰/۶۶۸
× M_2	I_1	bc۰/۶۳۳	cd۴۷/۱۲	f۰/۰۱۵	bc۰/۱۹۷	abc۰/۲۶۵	a۰/۸۰۸
	I_2	bc۰/۵۳۳	ab۶۲/۶۸	f۰/۰۱۵	a۰/۳۶۸	abcde۰/۲۱۹	bcdef۰/۶۸۸
	I_3	bc۰/۵۸۳	abc۵۶/۲۵	def۰/۰۳۱	ab۰/۲۶۵	a۰/۲۹۶	ef۰/۶۴۰
	I_4	c۰/۲۵۰	ab۶۳/۴۰	cde۰/۰۴۰	bcd۰/۱۳۶	de۰/۱۶۶	ab۰/۷۵۹
× M_3	I_1	c۰/۴۰۰	abc۵۴/۸۷	def۰/۰۳۰	bc۰/۲۰۷	abcd۰/۲۳۳	abc۰/۷۴۵
	I_2	c۰/۴۰۰	abc۵۸/۰۵	def۰/۰۲۸	b۰/۲۲۰	abcde۰/۲۱۵	abc۰/۷۴۹
	I_3	bc۰/۴۶۶	ab۶۲/۴۸	abc۰/۰۵۰	bcd۰/۱۷۴	abc۰/۲۷۴	cdef۰/۶۷۱
	I_4	c۰/۴۰۰	ab۵۹/۸۸	bcd۰/۰۴۶	bc۰/۱۹۷	ef۰/۱۴۰	abc۰/۷۵۴
× M_4	I_1	bc۰/۴۵۰	bc۵۳/۸۳	abc۰/۰۵۴	bcd۰/۱۸۵	cde۰/۱۹۶	abcd۰/۷۳۰
	I_2	bc۰/۷۶۶	bc۵۲/۸۵	abc۰/۰۵۶	ab۰/۲۵۳	bcde۰/۱۹۹	abc۰/۷۴۷
	I_3	bc۰/۶۶۶	a۶۶/۵۳	a۰/۰۶۵	ab۰/۲۵۰	ab۰/۲۸۵	bcdef۰/۶۸۱
	I_4	bc۰/۴۶۶	ab۶۱/۱۵	ab۰/۰۶۲	ab۰/۲۵۱	ab۰/۲۸۲	bcde۰/۷۱۱

اعداد با یک حرف مشترک در هر ستون، نشان دهنده عدم اختلاف آماری معنی‌داراست. M_1: شاهد (عدم استفاده از قارچ)، M_2: استفاده از گونه *Mycorrhiza Glomus mosseae*، M_3: استفاده از گونه*Mycorrhiza Glomus intraradices*، M_4: استفاده از تلفیق ۵۰٪ از هر دوگونه قارچ، I_1: شاهد (آبیاری در ۱۰۰٪ ظرفیت زراعی). I_2: تنش کم آبی خفیف (آبیاری در ۷۵٪ ظرفیت زراعی). I_3: تنش کم آبی متوسط (آبیاری در ۵۰٪ ظرفیت زراعی). I_4: تنش کم آبی شدید (آبیاری در ۲۵٪ ظرفیت زراعی).

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 می گردد. علاوه‌براین موجب اختلال در دسترسی ریشه به عناصر غذایی موجود در خاک و درنتیجه عدم تعادل تغذیه‌ای در گیاهان می شود (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

DOR: 20.1001.1.23832592.1402.36.1.2.3
مقاله پژوهشی

کاهش وزن خشک کل گیاه می‌گردد (۶، ۱۹، ۳۲، ۳۵). اثرات مثبت قارچ‌های میکوریزا در افزایش ارتفاع ساقه اصلی، سطح برگ وماده خشک گیاه در شرایط محدودیت آبیاری در نواحی خشک به‌اثبات رسیده است (۲۳). علت افزایش عملکرد محصول در گیاهان تلقیح شده با مایکوریزا، تعادل آبی آن‌ها در شرایط تنش کم‌آبی و درنتیجه جذب بیشتر آب و عناصر معدنی گزارش شده است (۱۶). نتایج پژوهش‌ها توانایی تلقیح ریشه استویا با گونه‌های قارچ مایکوریزا و بهبود رشد این گیاه را تایید نموده اند (۲۵). نتایج اندازه‌گیری ارتفاع ساقه اصلی در پژوهش حاضر، حاکی از اثر مثبت کاربرد مخلوط دوگونه قارچ مایکوریزا در جهت خنثی کردن اثر تنش کم‌آبی و افزایش بهره‌وری زراعی گیاه استویا در شرایط تنش کم‌آبی می‌باشد. بطوریکه کاربرد مخلوط دو گونه قارچ مایکوریزا 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 مایکوریزا است. کاربرد گونه های قارچ مایکوریزا در همزیستی با گیاهان، سبب افزایش شاخص‌های رشدی و عملکرد ماده خشک، درمقایسه با شرایط عدم استفاده از قارچ‌های مایکوریزا شده است. به‌طوری‌که این گیاهان دارای مواد فتوسنتزی بیشتری نسبت به گیاهان همزیست با قارچ‌های غیرمایکوریزایی بودند. مکانیسم‌های متعددی برای بیان این اثر ازقبیل 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 بسته‌شدن روزنه‌ها و کاهش تبادل دی‌اکسیدکربن در برگ‌ها شده که کاهش فتوسنتز، اندازه سطح برگ و تولید بیوماس را درپی دارد (۲۶). تلقیح ریشه‌های گیاه استویا با قارچ مایکوریزا در شرایط تنش خشکی و محدودیت آبیاری، موجب بهبود رشد، میزان سطح برگ و وزن‌خشک گیاه شده است (۲۵). همچنین مشخص شد که گونه‌های قارچ مایکوریزا 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 مایکوریزا سبب افزایش بیش از ۳ برابری سطح برگ گیاه استویا، بهبود سطح برگ و وزن‌خشک گیاه در نتیجه این همزیستی گردید. نتایج مثبت ارتباط همزیستی قارچ شبه مایکوریزای *piriformospora indica* با استویا در جهت تحریک رشد آن گیاه در شرایط تنش‌های شوری و خشکی گزارش شده است (۳۰). تنش کم آبی عمده تأثیر خود را از طریق تنش عناصر غذایی بر صفات فیزیولوژیک گیاه برجای می گذارد و بهترین تیمار برای مبارزه با تنش کم آبی و عناصر غذایی در یونجه، تلقیح بذرها با سویه گلوموس موسه آ قارچ مایکوریزا و باکتری سینوریزوبیوم ملیلوتی به حالت تلقیح دوگانه بود، همچنین نتیجه دیگر نشان داد، با اینکه سینوریزوبیوم ملیلوتی باکتری همزیست یونجه است، اما قارچ مایکوریزا، سویه گلوموس موسه آ در حالت تلقیح انفرادی نسبت به تلقیح انفرادی باکتری ارجحیت داشت که تاثیر مثبت کاربرد سویه گلوموس موسه آ بر خصوصیات بیوشیمیایی ومورفوفیزیولوژیک گیاه یونجه در شرایط تنش کم آبی را نشان داد(۳) و تاییدی بر نتایج حاصل ازاثرات مثبت کاربرد سویه های قارچ مایکوریزا بر گیاه استویا در شرایط تنش کم آبی در تحقیق حاضر است. در پژوهش حاضر مخلوط دو گونه قارچ مایکوریزا نسبت به عدم کاربرد مایکوریزا در شرایط تنش کم‌آبی، شاخص سبزینگی برگ را به‌میزان ۲۸/۷۶٪ افزایش دادند. قارچ‌های مایکوریزا 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

DOR: 20.1001.1.23832592.1402.36.1.2.3
مقاله پژوهشی

موادغذایی مختلف به گیاه باعث بهبود رشد و سبزینگی گیاه می شوند. علاوه بر این قارچ‌های مایکوریزا در افزایش تثبیت CO_2 اتمسفری در گیاه میزبان، با افزایش اثر مبدا به مخزن و اثرگذاری بر انتقال فتوآسیمیلات‌های تولید شده در بخش‌های هوایی به سمت ریشه نقش دارند. همچنین قارچ‌های مایکوریزا آرباسکولار بواسطه ایجاد ارتباطات بین گیاه و قارچ، منجر به افزایش سرعت فتوسنتز و سایر عوامل مرتبط با تبادل گازها ودرنتیجه 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 فرآورده های 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 ریشه های گیاه استویا با سویه های گلوموس موسه آ و اینترارادیسز دسترسی گیاهچه های استویا به مواد غذایی افزایش یافته، در نتیجه اثرات مثبتی بر خصوصیات مورفوفیزیولوژیک و بیوشیمیایی گیاهچه های تحت تیمار سویه های قارچ مایکوریزا نسبت به شرایط عدم کاربرد مایکوریزا 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 حاضراست. بیشترین مقدار یون پتاسیم از تیمار مخلوط دو گونه قارچ مایکوریزا و آبیاری در ۵۰٪ ظرفیت زراعی بدست آمد که بیانگر اثر مثبت همزیستی مخلوط دوگونه قارچ مایکوریزا بر جذب یون پتاسیم، بهبود نقش آن در کنترل روزنه‌ها و افزایش تاب‌آوری گیاه در شرایط تنش‌خشکی است. گیاهان همزیست با گونه‌های قارچ مایکوریزا، ازطریق افزایش جذب عناصری همچون: فسفر، پتاسیم، آهن، مس و روی که در انتقال انرژی، تنظیم اسمزی، سنتز رنگیزه‌ها و فتوسنتز نقش دارند، مقاومت بیشتری به کم‌آبی در شرایط تنش‌خشکی از خود نشان می‌دهند (۷). در تحقیق حاضر مشخص گردید در شرایط بدون تنش و استفاده از مخلوط گونه‌های قارچ مایکوریزا، جذب پتاسیم نسبت به عدم کاربرد مایکوریزا افزایش داشته است. این درحالی است که میزان جذب سدیم و پتاسیم در شرایط تنش‌خشکی و همزیستی با قارچ مایکوریزا نسبت به عدم کاربرد قارچ تفاوت چندانی نشان نداد. کافی و همکاران بیان داشتند در مواردی که درصد پتاسیم و سدیم در گیاهان تحت تنش‌خشکی 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 مایکوریزا 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، گلوگز و فروکتوز نشان داد رشد اندام‌های مکنده قارچ مایکوریزا 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 مایکوریزا و ثبات خاک در شرایط تنش‌خشکی 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 مایکوریزا، افزایش زیست‌توده به دلیل بهبود جذب عناصرغذایی (نیتروژن، پتاسیم، منیزیم، مس، آهن، منگنز و روی)، افزایش شاخص سبزینگی برگ و هیدرات‌های‌کربن مشاهده شده است (۲۰). نتایج تحقیق حاضر مبین این موضوع است که همزیستی گونه‌های قارچ مایکوریزا با ریشه‌های گیاهچه‌های استویا تکثیرشده به روش کشت بافت در مقایسه با تیمار شاهد (بدون

DOR: 20.1001.1.23832592.1402.36.1.2.3

گونه‌های قارچ مایکوریزا) در شرایط تنش کم‌آبی، موجب جلوگیری از کاهش سطح برگ، حفظ عملکرد و کاهش حداکثری خسارت ناشی از تنش خشکی می‌گردد. علاوه‌براین همزیستی با قارچ‌های مایکوریزا، افزایش مقادیر صفات مورفوفیزیولوژیک و بیوشیمیایی، در نتیجه افزایش میزان قندهای ساکارز، گلوکز و فروکتوز را به دنبال داشته است. با توجه به این نتایج، می‌توان تیمار مخلوط دوگونه *Glomus mosseae* و *Glomus intraradices* در شرایط تنش کم‌آبی (تیمار M_4I_3) را به عنوان مناسب ترین تیمار جهت حفاظت گیاه استویا در شرایط تنش کم‌آبی ناشی از کاهش میزان آبیاری معرفی نمود.

منابع

۱. 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.

۲. اصغری، ر. ۱۳۹۶. مقایسه اثر تیمار تغذیه ای و نوع بستر کشت بر برخی خصوصیات فیتوشیمیایی گیاه استویا. مجله پژوهشهای گیاهی(مجله زیست شناسی ایران). جلد ۳۰، شماره۲، صفحه ۲۷۲ -۲۶۴.

۳. ظفری، م.، عبادی، ع.، جهانبخش گده کهریز، س.۱۳۹۷. اثر توأم قارچ و باکتری بر افزایش اسمولیت های سازگاری در یونجه تحت تنش کم آبی. مجله پژوهشهای گیاهی(مجله زیست شناسی ایران). جلد ۳۱، شماره۱، صفحه ۱۶۵- ۱۵۶.

۴. 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.

5. 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

6. 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.

7. Bagheri, V., M.H. Shamshir, 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.

8. 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.

9. 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.

10. 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.

11. 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.

12. Curry, L., and R. Ashley. 2008. Subchronic toxicity of rebaudioside A. Cargill Incorporated. J. Process Biochem, 83: 115-117.

13. 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).

14. 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.

15. 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.

DOR: 20.1001.1.23832592.1402.36.1.2.3

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 PB. Rao. 2016. Influence of water deficit stress on morpho-physiological 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. Akpinar 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. Yaghoubian 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. Gougoulias and C. Reppas. 2015. Productivity of two stevia varieties under reduced irrigation and

مقاله پژوهشی
DOR: 20.1001.1.23832592.1402.36.1.2.3

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 Mohammadi[1], Reza Zarghami[2*], Ali Kashani[3], HosseinHeydari Sharifabad[1], GhorbanNour Mohammadi[1]

[1]Dept. 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, ShahidChamran 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 (M_1: without mycorrhiza, M_2: *Glomus mosseae*, M_3: *Glomus intraradices*, M_4: mixed of both species) and application of water deficit. The irrigation was applied at four levels as follows: I_1: maintaining soil moisture at 100% of field capacity, I_2: irrigation after reaching 75% of field capacity, I_3: irrigation after reaching 50% of field capacity, I_4: 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 dued 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 M_4I_4 and M_4I_3 compared to treatments M_1I_4 and M_1I_3 (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.