اثر تلقیح قارچ اندوفایت *Piriformospora indica* و باکتری *Azotobacter chroococcum* بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و تحمل گندم (رقم نیک‌نژاد) به کمبود روی در شرایط گلخانه

وحیداله جهاندیده مهجن‌آبادی[1*]، مژگان سپهری[1]، امیرحسین خوشگفتارمنش[1] و حمیدرضا عشقی‌زاده[2]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۹/۲۳ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۷/۱۱)

چکیده

کمبود روی از شایع‌ترین کمبودهای عناصر غذایی در گیاهان است که موجب کاهش شدید رشد و عملکرد آنها می‌شود. افزایش سطح گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و کاهش کارایی سیستم‌های سمیت‌زدایی ممکن است از دلایل اصلی آسیب به عملکردهای بافت سلولی گیاهان دچار کمبود روی باشند. در این تحقیق، تأثیر تلقیح انفرادی و همزمان قارچ اندوفایت *Piriformospora indica* و باکتری *Azotobacter chroococcum* بر ویژگی‌های بیوشیمیایی، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و رشد و نمو گیاه گندم (رقم نیک‌نژاد)، در شرایط کمبود و کفایت روی بررسی شد. آزمایش در گلخانه مرکز کشت بدون خاک دانشگاه صنعتی اصفهان و با استفاده از بستر کشت مخلوط شن و پرلیت (v/v ۲:۱) به صورت فاکتوریل و در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. نتایج نشان داد که کمبود روی باعث کاهش وزن خشک شاخساره، غلظت کاروتنوئید، مقدار کل عنصر روی شاخساره و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان گیاهان شاهد شد. تلقیح انفرادی و همزمان قارچ *P. indica* و باکتری *A. chroococcum* در شرایط کمبود روی، موجب افزایش معنی‌دار وزن خشک شاخساره گیاهان نسبت به شاهد شد. بیشترین وزن خشک شاخساره متعلق به تیمار تلقیح انفرادی باکتری بود. گیاهان تلقیح یافته با *P. indica* به تنهایی، در هر دو سطح روی، از بیشترین مقدار روی و غلظت کاروتنوئید برخوردار بودند. تلقیح *A. chroococcum* به تنهایی و در ترکیب با *P. indica*، فقط در افزایش مقدار روی شاخساره، در شرایط کمبود روی، مؤثر واقع شد. تلقیح *A. chroococcum* به تنهایی و در ترکیب با *P. indica* موجب تحریک فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان آسکوربات‌پراکسیداز و پراکسیداز در پاسخ به تنش کمبود روی شد؛ اگرچه تلقیح *P. indica* به تنهایی به‌ترتیب موجب افزایش و کاهش فعالیت آنزیم پراکسیداز و آسکوربات‌پراکسیداز شد. به‌طور کلی، تلقیح گیاه گندم رقم نیک‌نژاد با ریزجانداران مورد مطالعه در این پژوهش، به‌ویژه تلقیح باکتری *A. chroococcum*، می‌تواند به عنوان روشی مفید برای کاهش اثرهای مضر تنش کمبود روی، استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: تلقیح میکروبی، تلقیح انفرادی، سمیت‌زدایی، سطح گونه‌های فعال اکسیژن

مقدمه

کمبود روی در اغلب خاک‌ها، به ویژه در خاک‌های مناطق خشک و نیمه خشک، به دلایل متعددی نظیر pH قلیایی، مقدار زیاد آهک و کمبود مواد آلی شایع می‌باشد (۳). طبق آمار موجود، حدود ۴۰٪ از اراضی زیر کشت گندم آبی کشور دارای کمبود روی می‌باشند (۲). کمبود روی به‌دلیل نقش مهم این عنصر در عملکردهای حیاتی سلول شامل متابولیسم پروتئین، تنظیم بیان ژن، پایداری عملکردی و ساختاری غشا، متابولیسم کربن فتوسنتزی و متابولیسم کربوهیدرات، به سرعت رشد یافته و توسعه گیاه و در نتیجه عملکرد آن را کاهش می‌دهد (۳۱).

۱. گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

۲. گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

*: مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: vahid.jahandideh67@gmail.com

افزایش سطح گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive Oxygen Species, ROS) و کاهش کارایی سیستم سمیت‌زدایی در گیاهان، از دلایل احتمالی ایجاد آسیب و اختلال در عملکردهای مختلف سلول‌های گیاهی در شرایط کمبود روی می‌باشند (۱۷). فلز روی موجب کاهش یا توقف فعالیت آنزیم NADPH اکسیداز می‌شود. بنابراین، در شرایط کمبود روی، به‌دلیل افزایش فعالیت این آنزیم، تولید رادیکال سمی سوپراکسید (O^{2-}) نیز افزایش می‌یابد (۱۵ و ۳۷). همچنین، غلظت زیاد آهن در گیاهان دچار کمبود روی از طریق تجزیه پراکسید هیدروژن (H_2O_2) طی واکنش هابر- وایس، موجب افزایش تولید رادیکال هیدروکسیل (OH^-) می‌شود (۴۸). گیاهان با دارا بودن سیستم‌های سمیت‌زدایی آنزیمی (سوپراکسیددیسموتاز، کاتالاز، پراکسیداز، گلوتاتیون‌پراکسیداز، آسکوربات‌پراکسیداز و گلوتاتیون‌ردوکتاز) و غیر آنزیمی (اسید آسکوربیک، گلوتاتیون و کاروتنوئیدها)، معمولاً سطح گونه‌های فعال اکسیژن را در حد متعادل نگه می‌دارند (۶). روی نقش مهمی در بیان ژن‌های مسئول کدگذاری آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان دارد (۷ و ۸). بنابراین، در شرایط کمبود این عنصر، سیستم سمیت‌زدایی آنزیمی آسیب می‌بیند. کک‌مک و مارشنر (۱۵) بیان کردند که روی در فعال کردن اکثر آنزیم‌های درگیر در سمیت‌زدایی پراکسید هیدروژن از جمله کاتالاز، گلوتاتیون‌ردوکتاز و آسکوربات‌پراکسیداز مورد نیاز است. همچنین، آنان نشان دادند که در گیاهان دچار کمبود روی، فعالیت آنزیم کاتالاز و آسکوربات‌پراکسیداز کاهش می‌یابد (۱۴). تحقیقات نشان داده است که آنزیم کاتالاز به رادیکال سوپراکسید بسیار حساس است و در سطوح زیاد این رادیکال غیرفعال می‌گردد. بنابراین، احتمالاً دلیل کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز در شرایط کمبود روی به اثر بازدارندگی رادیکال سوپراکسید بر فعالیت این آنزیم باز می‌گردد (۲۲).

تلقیح گیاهان با ریزجانداران مفید خاک، سبب تحریک و افزایش رشد گیاه، به‌ویژه در شرایط تنش‌های محیطی، می‌شود. قارچ *Piriformospora indica*، اندوفایت شبه میکوریزی (Mycorrhizal-like fungi) می‌باشد که در سال ۱۹۹۸ توسط وارما و همکاران (۴۵) از ریزوسفر دو گیاه خشکی‌پسند کهور (*Zizyphus nummularia*) و گز (*Prosopis juliflora*) از صحرای تار کشور هندوستان استخراج شد. این قارچ، مانند اکثر قارچ‌های اندوفایت، با ایجاد تغییرات ژنتیک، فیزیولوژیک و اکولوژیک در گیاهان میزبان خود، عملکرد آنها را در واحد سطح افزایش می‌دهد و امکان توسعه و کشت آنها را در خاک‌هایی با شرایط نامساعد محیطی و تغذیه‌ای فراهم می‌آورد (۳۰). بالتروشات و همکاران (۱۲) گزارش کردند که تلقیح قارچ اندوفایت *P. indica* با گیاه جو در شرایط تنش شوری، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و در نتیجه مقاومت این گیاه را به تنش افزایش داد. همچنین، گزارش‌ها حاکی از آن است که تلقیح گیاه گوجه‌فرنگی با قارچ *P. indica*، قدرت تحمل گیاه به تنش‌های شوری و کمبود عناصر غذایی را از طریق فعال کردن متابولیسم آنتی‌اکسیدان و در نتیجه تجمع آسکوربات افزایش داد (۴۶). قارچ اندوفایت *P. indica* فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان را تحریک می‌کند و تولید ROS را از طریق به تأخیر انداختن تخریب اسیدهای چرب اشباع نشده غشای پلاسمای لیپیدی، محدود می‌کند (۴۱).

باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه (Plant growth promoting rhizobacteria) از جمله *Azotobacter chroococcum* به عنوان گروه مهمی از ریزجانداران مفید خاک، به‌صورت مستقیم از طریق تولید هورمون‌های محرک رشد گیاه، تثبیت بیولوژیک نیتروژن اتمسفر، کمک به آزاد شدن فسفر و پتاسیم و عناصر کم‌مصرف در خاک و غیر مستقیم با تولید سیدروفر، آنتی‌بیوتیک، آنزیم‌ها، هیدروژن‌سیانید و اسیدهای آلی سبب تحریک و افزایش رشد گیاه در شرایط طبیعی و دارای تنش می‌شوند (۲۳). گزارش‌های متعددی نشان داده که باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه از طریق تحریک فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان موجب افزایش مقاومت گیاهان به تنش‌های مختلف می‌شوند (۲۶، ۴۰ و ۴۴).

اثرهای تلقیح قارچ اندوفایت *Piriformospora indica* و

باکتری *Azotobacter chroococcum* بر پاسخ فیزیولوژیک گیاه گندم در شرایط کمبود روی شناخته شده نیست. لذا ،این تحقیق به منظور بررسی تأثیر تلقیح انفرادی و همزمان قارچ *Piriformospora indica* و باکتری *Azotobacter chroococcum* بر ویژگی‌های بیوشیمیایی، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و رشد و نمو گیاه گندم (رقم نیک‌نژاد)، در شرایط کمبود و کفایت روی انجام شد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در گلخانه‌ی مرکز کشت بدون خاک دانشگاه صنعتی اصفهان (به منظور کنترل شرایط محیطی)، با آرایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. عوامل مورد مطالعه شامل چهار سطح ریزجاندار (شاهد، تلقیح قارچ اندوفایت *Piriformospora indica*، تلقیح باکتری *Azotobacter chroococcum* و تلقیح همزمان قارچ و باکتری) و دو سطح عنصر روی (کمبود و کفایت روی) بودند.

تکثیر و تولید مایه تلقیح قارچ *P. indica*

کلونیزاسیون ریشه گیاه با مایه تلقیح قارچ اندوفایت *P. indica* مستلزم وجود تعداد کافی اسپور قارچ است. لذا، با تهیه تعداد کافی پتری‌دیش محتوی محیط کشت پیچیده (Complex medium)، جدایه قارچی مذکور روی این محیط، کشت و درون انکوباتور در دمای ۲۴ درجه سلسیوس به مدت ۴ هفته نگهداری شدند. پس از سپری شدن این زمان، با استفاده از محلول آب توئین ۲۰٪ اقدام به جمع‌آوری اسپورهای قارچی از سطح محیط کشت شد و پس از انجام مراحل مختلف سانتریفیوژ، شستشو و انحلال طی سه مرتبه، تعداد اسپورها در مایه تلقیح قارچ با استفاده از لام نئوبار شمارش و در حدود 5×10^{7} اسپور در هر میلی‌لیتر محلول آب توئین ۲۰٪ تنظیم شد.

تهیه مایه تلقیح باکتری *A. chroococcum*

جدایه باکتری *A. chroococcum* استفاده شده در این تحقیق از کلکسیون میکروبی مؤسسه تحقیقات خاک و آب کشور تهیه شد.

کشت گیاه و اعمال تیمارها

جهت بررسی تیمارهای آزمایش روی صفات مورد نظر در شرایط گلخانه، با توجه به امکان کنترل شرایط محیطی در سیستم‌های کشت بدون خاک در مقایسه با خاک، از گلدان‌های سه کیلوگرمی حاوی مخلوط ماسه و پرلیت استریل (۲:۱ v/v) استفاده شد. بذرهای گندم (رقم نیک‌نژاد) با استفاده از الکل ۹۶٪ به مدت ۳۰ ثانیه و محلول رقیق هیپوکلریت سدیم (۵٪) به مدت ۵ دقیقه ضدعفونی و جهت حذف هیپوکلریت سدیم باقیمانده در سطح بذرها، چندین مرتبه با آب مقطر استریل شستشو شدند. بذرهای ضدعفونی شده گندم به‌صورت یکنواخت روی کاغذ صافی استریل درون پتری‌دیش‌های شیشه‌ای پخش و پس از چند روز خوابانیدن در دمای ۲۵ درجه سلسیوس (درون انکوباتور) جوانه‌دار شدند.

جهت اعمال تیمار قارچ، بذرهای جوانه‌دار شده گندم در پتری‌دیش‌های استریل قرار داده شدند و با محلول اسپور قارچ (حاوی 5×10^{7} اسپور در هر میلی‌لیتر) تلقیح و به مدت ۴ ساعت روی هم‌زن دورانی با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه قرار داده شدند. لازم به ذکر است که در مورد تیمارهای عدم تلقیح قارچ، ریشه گیاهان تنها با محلول آب توئین ۲۰٪ فاقد اسپور قارچ آغشته شدند. سپس، تعداد چهار گیاهچه در داخل هر گلدان کاشته شد و پس از گذشت سه روز و اطمینان از نفوذ اسپورهای قارچ به درون ریشه، اعمال تیمار باکتری (5×10^{7} سلول در هر میلی‌لیتر محیط کشت مایع) انجام گرفت. گیاهان در گلخانه به مدت ۲ ماه در دمای روزانه ۱۸–۲۵ درجه سلسیوس، دمای شبانه حداقل ۱۵ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۴۰٪، شدت روشنایی ۱۰۰۰۰ لوکس و ۱۱–۱۲ ساعت دوره روشنایی نگهداری شدند. جهت تأمین عناصر غذایی مورد نیاز گیاه در طی دوره رشد آن از محلول غذایی جانسون استفاده شد (۲۷). برای اعمال تیمار عنصر روی، از محلول غذایی جانسون دارای ۲ میکرومولار سولفات روی (کفایت روی) و

بدون سولفات روی (کمبود روی) استفاده شد.

ویژگی‌های اندازه‌گیری شده

وزن خشک شاخساره

پس از پایان دوره کشت دو ماهه، نمونه‌برداری از اندام‌های گیاه انجام شد. نمونه‌های مذکور به مدت ۴۸ ساعت در آون با دمای ۷۵ درجه سلسیوس قرار داده شدند و سپس وزن خشک آنها تعیین گردید.

مقدار کل روی شاخساره

جهت اندازه‌گیری مقدار کل روی شاخساره، یک گرم از نمونه خشک آسیاب شده به مدت ۴ ساعت در دمای ۵۵۰ درجه سلسیوس در کوره خاکستر شد. پس از سرد شدن کوره، نمونه‌ها از کوره خارج و به آنها ۱۰ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۲ نرمال اضافه شد. نمونه‌ها روی گرم‌کن قرار گرفتند تا خاکستر گیاه به صورت کامل هضم شد. عصاره حاصل پس از صاف شدن، با استفاده از آب مقطر به حجم ۵۰ میلی‌لیتر رسانده شد. مقدار کل روی شاخساره با استفاده از دستگاه جذب اتمی مدل Perkin-Elmer 3030 اندازه‌گیری شد (۲۰).

غلظت کاروتنوئید

کاروتنوئید با استفاده از استون ۸۰٪ از برگ‌های گیاهان استخراج و با استفاده از دستگاه طیف‌سنج در طول موج ۴۷۰ نانومتر از طریق روش آرنون (۹) اندازه‌گیری شد.

فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان

جهت سنجش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، ابتدا برگ‌های گیاهان با آب مقطر شسته شدند و بلافاصله ۰/۱ گرم نمونه برگ پودر شده با نیتروژن مایع درون یک میلی‌لیتر بافر فسفات سرد (۵۰ میلی‌مولار و pH= ۷/۸) محتوی EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) دو میلی‌مولار، DTT (*Dithiothreitol*) دو میلی‌مولار، Tris-HCL ۵۰ میلی‌مولار، Trition-X100 دو درصد و PVP (Polyvinylpyrrolidone) دو درصد وارد و همگن شد. نمونه‌های همگن شده به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس با شدت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و سپس عصاره استخراجی برای تخمین فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان جمع‌آوری و در ویال‌های جداگانه نگهداری شد. فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربات‌پراکسیداز به‌ترتیب با استفاده از روش‌های ابی (۵)، رائو (۳۸) و ناکانو و آسادا (۳۵) اندازه‌گیری شد.

تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS و مقایسه میانگین‌ها بر مبنای آزمون LSD در سطح احتمال ۵٪ انجام شد.

نتایج و بحث

وزن خشک شاخساره

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که وزن خشک شاخساره گیاهان گندم به طور معنی‌داری تحت تأثیر عوامل مورد آزمایش قرار گرفت (جدول ۱). نتایج حاکی از آن است که وزن خشک شاخساره گیاهان فاقد تلقیح میکروبی (تیمار شاهد) در شرایط کمبود روی، نسبت به شرایط کفایت این عنصر به‌مقدار ۱۳٪ کاهش یافت (شکل ۱).

کمبود روی موجب کاهش سرعت رشد و توسعه گیاه می‌شود، زیرا این عنصر نقش اساسی در برخی عملکردهای مهم سلول از جمله متابولیسم پروتئین، تنظیم بیان ژن، پایداری عملکردی و ساختاری غشا، متابولیسم کربن فتوسنتزی و متابولیسم کربوهیدرات ایفا می‌نماید (۳۱). در شرایط کمبود روی، بیشترین مقدار وزن خشک شاخساره متعلق به گیاهان تلقیح یافته با باکتری *A. chroococcum* است، به‌طوری که وزن خشک شاخساره این گیاهان ۳۴/۳ درصد بیشتر از گیاهان شاهد (عدم تلقیح قارچ و باکتری) بود. همچنین، تلقیح قارچ

جدول ۱. نتایج تجزیه واریانس اثر تیمارهای مختلف بر صفات مورد بررسی

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات					
		وزن خشک شاخساره	روی	کاروتنوئید	کاتالاز	آسکوربات پراکسیداز	گایاکول پراکسیداز
روی	۱	۰/۰۲۵	۳۴۷**	۲/۹۶**	۰/۰۰۰۰۰۰۰۲	۰/۰۰۰۰۵*	۷۰**
تلقیح میکروبی	۳	۰/۷۴**	۲۵۷**	۲/۵۲**	۱/۳۶	۰/۰۰۱۸۴**	۱۳۵**
روی× تلقیح میکروبی	۳	۰/۲۵۶*	۱۱۱*	۰/۱۹۶*	۵/۰۱**	۰/۰۰۰۳۶**	۱۷**
خطای آزمایش	۱۴	۰/۰۶۷	۲۶	۰/۰۴۷	۰/۴۳۸	۰/۰۰۰۰۱	۳
CV(٪)		۵/۷۵	۷/۸۸	۴/۰۹	۱۴/۹۱	۵/۲۶	۱۰/۲۹

** و * به‌ترتیب معنی‌دار در سطوح ۱٪ و ۵٪

شکل ۱. اثر تلقیح انفرادی و همزمان قارچ *P. indica* و باکتری *A. chroococcum* بر وزن خشک شاخساره در سطوح مختلف روی. میانگین‌های با حداقل یک حرف یکسان، تفاوت معنی‌داری از لحاظ آماری در سطح احتمال ۵٪ ندارند.

P. indica و همزمان این قارچ و باکتری *A. chroococcum* در شرایط کمبود روی، وزن خشک شاخساره گیاهان را نسبت به شاهد به‌ترتیب به مقدار ۱۰/۲ و ۱۴ درصد افزایش داد. در شرایط کفایت روی، اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای میکروبی و تیمار شاهد وجود نداشت (شکل ۱).

نتایج به دست آمده به‌خوبی بیانگر اثر مثبت ریزجانداران مورد مطالعه، به‌ویژه تلقیح باکتری *A. chroococcum*، بر کاهش اثرهای مضر تنش کمبود روی بر وزن خشک شاخساره بود. طارق و همکاران (۴۳) نشان دادند که وزن خشک شاخساره گیاه برنج تلقیح یافته با باکتری‌های PGPR در شرایط کمبود روی، افزایش یافت. همچنین، افزایش وزن خشک شاخساره گیاه گندم تلقیح یافته با باکتری ازتوباکتر کروکوکوم توسط محققین گزارش شده است (۱۴). باکتری ازتوباکتر کروکوکوم قادر به تولید هورمون‌های جیبرلین، سیتوکینین و اکسین و نیز ویتامین‌ها می‌باشد. بنابراین، می‌توان افزایش وزن خشک شاخساره گیاهان تلقیح یافته با باکتری ازتوباکتر را به توانایی این باکتری در تولید مواد مذکور نسبت داد (۳۴). بالتروشات و همکاران (۱۲) گزارش کردند که قارچ *P. indica* سبب افزایش وزن خشک شاخساره ذرت در شرایط تنش شوری شد. میکال جانسون و همکاران (۳۳) علت افزایش عملکرد گیاهان مایه‌زنی شده با قارچ *P. indica* را به نقش این قارچ در تولید هورمون‌های گیاهی، از جمله اکسین، مرتبط دانستند. در شرایط

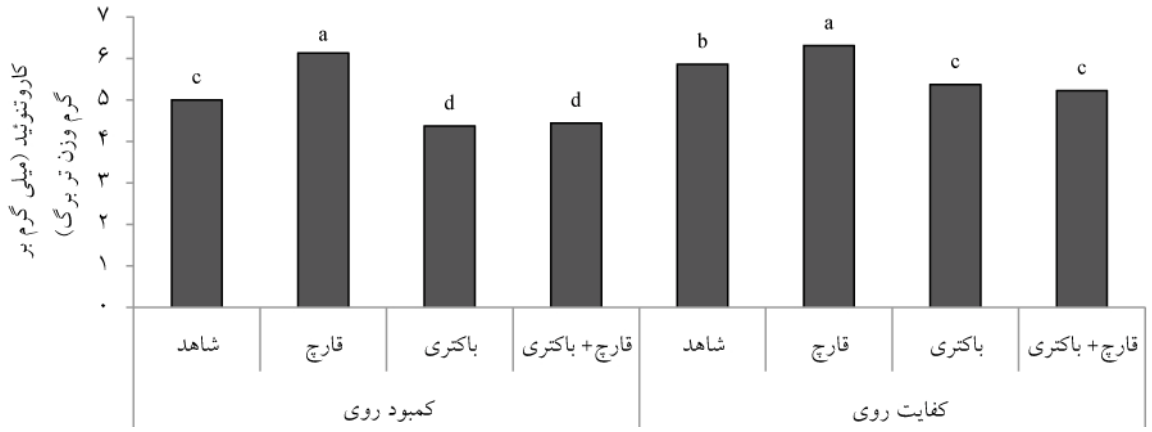
شکل ۲. اثر تلقیح انفرادی و همزمان قارچ *P. indica* و باکتری *A. chroococcum* بر مقدار کل روی شاخساره در سطوح مختلف روی. میانگین‌های با حداقل یک حرف یکسان، تفاوت معنی‌داری از لحاظ آماری در سطح احتمال ۵٪ ندارند.

کمبود روی، تلقیح همزمان قارچ *P. indica* و باکتری *A. chroococcum*، در مقایسه با تلقیح انفرادی باکتری موجب کاهش وزن خشک شاخساره شد که ممکن است به دلیل رقابت این دو ریزجاندار در استفاده از منابع غذایی موجود در ریزوسفر باشد که در نتیجه موجب شده است که این ریزجانداران نتوانند تمام توان خود را در ارتباط همزیستی با گیاه استفاده نمایند (۴۶). این نتیجه مخالف با نتایج مینا و همکاران (۳۲) می‌باشد که افزایش عملکرد گیاه نخود بر اثر تلقیح همزمان قارچ *P. indica* و باکتری محرک رشد سودوموناس استرادیا را در مقایسه با تیمار بدون قارچ و باکتری و تیمارهای تلقیح انفرادی هریک از این ریزجانداران گزارش کردند. به نظر می‌رسد دلیل تفاوت این نتایج با نتایج تحقیق حاضر، جنس باکتری و نوع گیاه مورد مطالعه باشد.

مقدار کل روی شاخساره

نتایج تجزیه واریانس حاکی از آن است که عوامل مورد آزمایش دارای تأثیر معنی‌داری بر مقدار کل روی شاخساره گندم بودند (جدول ۱). نتایج نشان دهنده آن است که مقدار کل روی شاخساره گیاهان شاهد (عدم تلقیح قارچ و باکتری) در شرایط کمبود روی، نسبت به شرایط کفایت این عنصر به مقدار ۳۵/۴ درصد کاهش یافت. در هر دو حالت کمبود و کفایت روی، بیشترین مقدار کل روی شاخساره متعلق به تیمار تلقیح قارچ *P. indica* بود، به‌طوری که این قارچ مقدار کل روی شاخساره گیاهان را در شرایط کمبود و کفایت روی به‌ترتیب به مقدار ۴۸ و ۲۳ درصد نسبت به گیاهان شاهد افزایش داد. در شرایط کمبود روی، تلقیح باکتری *A. chroococcum* و نیز تلقیح همزمان این باکتری و قارچ *P. indica* موجب افزایش مقدار کل روی شاخساره نسبت به تیمار شاهد شد. اما، در شرایط کفایت روی، اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای مذکور وجود نداشت (شکل ۲).

اسوامیناتان و همکاران (۴۲) گزارش کردند که تلقیح قارچ میکوریزی *Glomus macrocarpus* به گیاهان گندم و ذرت در شرایط کمبود روی، سبب افزایش جذب روی توسط این گیاهان شد. همچنین، گوه و همکاران (۲۴) نشان دادند که تلقیح قارچ‌های میکوریزی آربسکولار با گیاه گندم در شرایط کاربرد مقادیر مختلف روی، منجر به افزایش انتقال روی از ریشه به شاخساره شد. نتایج این تحقیق با یافته‌های گوسال و همکاران (۲۵) مطابقت دارد. آنها بیان داشتند که تلقیح گیاهچه‌های *Chlorophytum borivilianum* با قارچ *P. indica* میزان جذب روی را افزایش می‌دهد. اثر مثبت قارچ *P. indica* در افزایش جذب روی توسط گیاه را می‌توان به نقش مؤثر این قارچ در افزایش سطح جذب ریشه گیاه و در نتیجه دسترسی بیشتر آن به فضای اطراف ریشه مربوط دانست. افزایش جذب عناصر غذایی در گیاه گندم تلقیح شده با باکتری



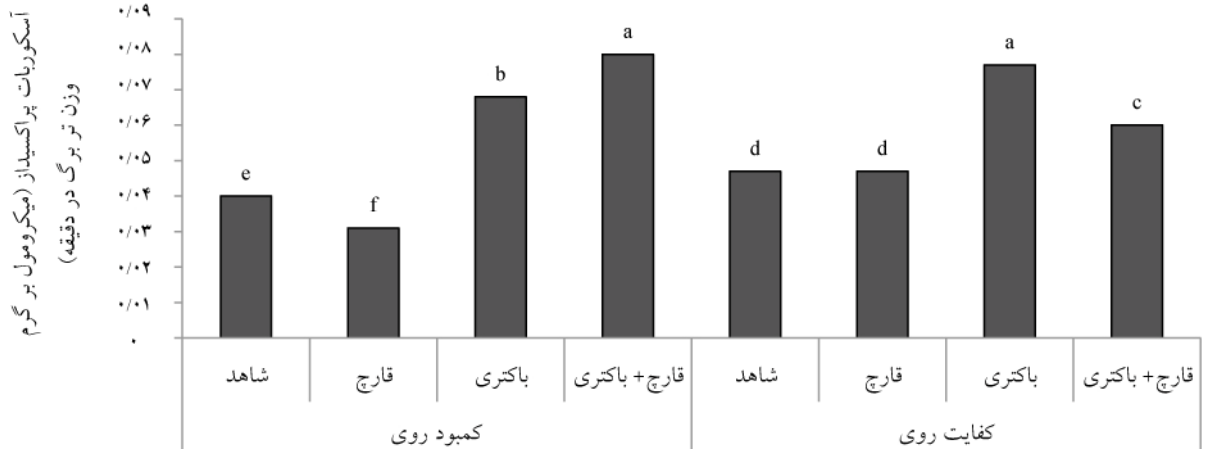
شکل ۳. اثر تلقیح انفرادی و همزمان قارچ *P. indica* و باکتری *A. chroococcum* بر غلظت کاروتنوئید در سطوح مختلف روی. میانگین‌های با حداقل یک حرف یکسان، تفاوت معنی‌داری از لحاظ آماری در سطح احتمال ۵٪ ندارند.

A. chroococcum در هر دو شرایط مزرعه و گلخانه گزارش شده است (۲۸، ۲۹ و ۳۶). باکتری *A. chroococcum* با تولید هورمون‌های محرک رشد گیاه از جمله ایندول‌استیک‌اسید، موجب توسعه بیشتر سیستم ریشه و در نتیجه افزایش جذب عناصر غذایی می‌شود (۳۴).

غلظت کاروتنوئید

نتایج تجزیه آماری داده‌های مربوط به غلظت کاروتنوئید نشان دهنده آن است که غلظت کاروتنوئید به طور معنی‌داری تحت تأثیر عوامل مورد آزمایش قرار گرفت (جدول ۱). نتایج نشان داد که غلظت کاروتنوئید گیاهان شاهد (عدم تلقیح قارچ و باکتری) در شرایط کمبود روی، نسبت به شرایط کفایت روی ۱۷/۲ درصد کاهش یافت (شکل ۳).

شارما و همکاران (۳۹) نیز کاهش غلظت کاروتنوئید گیاه گندم را در شرایط کمبود روی گزارش کردند. به دلیل نقش روی در بیان ژن‌های مسئول کدگذاری آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، سیستم سمیت‌زدایی آنزیمی در شرایط کمبود این عنصر آسیب می‌بیند (۷ و ۸). کاهش غلظت کاروتنوئید می‌تواند به دلیل افزایش سطح گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و کاهش کارایی سیستم سمیت‌زدایی (آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان) در شرایط کمبود روی و در نتیجه پراکسیداسیون لیپیدهای غشا و اکسایش کاروتنوئید باشد (۱۳). بیشترین غلظت کاروتنوئید در شرایط کمبود و کفایت روی در تیمار تلقیح قارچ *P. indica* به دست آمد، به‌طوری که غلظت کاروتنوئید گیاهان تلقیح یافته با این قارچ در شرایط کمبود و کفایت روی به‌ترتیب ۲۲/۶ و ۷/۶ درصد بیشتر از گیاهان شاهد (عدم تلقیح قارچ و باکتری) بود. اما تلقیح *A. chroococcum* و همچنین تلقیح همزمان این باکتری و قارچ *P. indica* با گیاهان در هر دو سطح روی، موجب کاهش غلظت کاروتنوئید شد (شکل ۳). چکیچ و همکاران (۱۹)، افزایش غلظت کاروتنوئید گیاهان *Capsicum annuum* تلقیح یافته با قارچ‌های میکوریزی (*Glomus mosseae* و *G. intraradices*) را در شرایط تنش شوری گزارش کردند. با توجه به بهبود وضعیت تغذیه‌ای گیاهان گندم تلقیح یافته با قارچ *P. indica* در مطالعه حاضر و نقش مثبت این قارچ در افزایش بیان تعدادی از پروتئین‌ها و آنزیم‌های شرکت کننده در ساختار کلروپلاست و مراکز واکنش فتوسیستم I و II و نیز آنزیم‌های مهم در چرخه کالوین در شرایط تنش، که توسط سپهری (۴) گزارش شده است، قارچ *P. indica* می‌تواند نقش مهمی در حفظ فتوسنتز و ساختار کاروتنوئیدها ایفا کند. کاروتنوئیدها از جمله ترکیبات آنتی‌اکسیدان غیر آنزیمی هستند که می‌توانند در کاهش غلظت یون سوپراکسید نقش داشته و تشکیل رادیکال هیدروکسیل را نیز کاهش دهند (۱۸). کاروتنوئیدها از طریق فروکش کردن

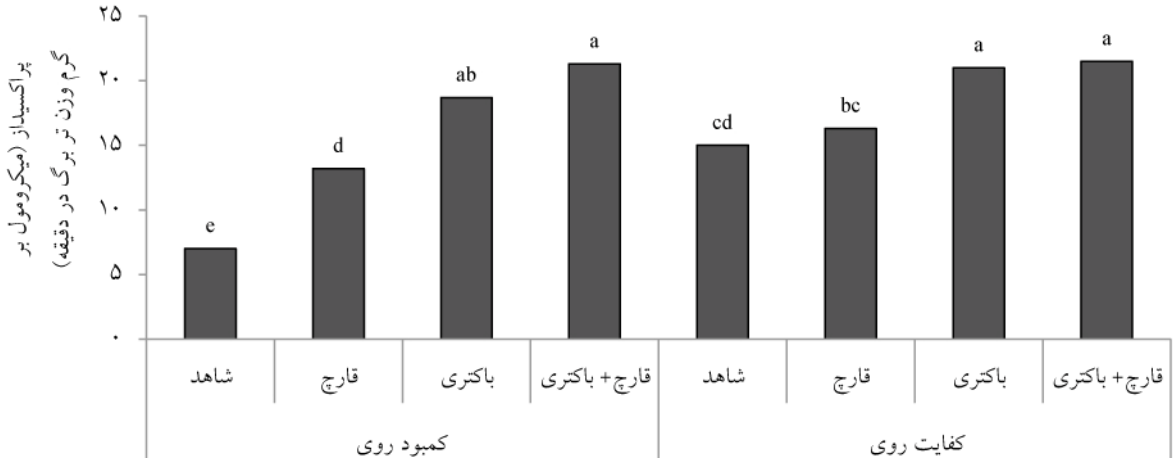


شکل ۴. اثر تلقیح انفرادی و همزمان قارچ *P. indica* و باکتری *A. chroococcum* بر فعالیت آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز در سطوح مختلف روی. میانگین‌های با حداقل یک حرف یکسان، تفاوت معنی‌داری از لحاظ آماری در سطح احتمال ۵٪ ندارند.

سریع وضعیت برانگیخته کلروفیل، حفاظت از فتوسیستم‌ها را در بافت‌های فتوسنتزی به‌عهده دارند. حفظ ساختار کاروتنوئید در شرایط تنش، به توانایی بخش غیرآنزیمی گیاه در حذف رادیکال‌های فعال اکسیژن اشاره می‌کند (۱۳). بنابراین، تأثیر قارچ *P. indica* در افزایش غلظت کاروتنوئید گیاهان در شرایط کمبود روی، احتمالاً می‌تواند به عنوان یکی از مکانیسم‌های مقاومتی مثبت فعال شده توسط این قارچ در افزایش تحمل گیاهان به شرایط تنش کمبود روی مطرح باشد. کاهش غلظت کاروتنوئید در شرایط تلقیح باکتری *A. chroococcum* و همچنین تلقیح همزمان این باکتری و قارچ *P. indica* با گیاهان، نشان از اثر رقت در گیاه داشته که با نتایج حاصل از وزن خشک شاخساره هم‌خوانی دارد. در واقع، به دلیل افزایش سطح برگ گیاهان در این شرایط، غلظت کاروتنوئید در واحد سطح برگ کاهش یافت. بنابراین، کاهش غلظت کاروتنوئید در این شرایط را نمی‌توان به کاهش مکانیسم مقاومتی گیاه مرتبط دانست.

فعالیت آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز

آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز در چرخه آسکوربات-گلوتاتیون جانداران فتوسنتزکننده، برای جلوگیری از تجمع سطوح سمی پراکسیدهیدروژن در شرایط تنش نقش مهمی ایفا می‌کند و بدین ترتیب گیاه را در برابر آسیب‌های ناشی از تولید این رادیکال محافظت می‌کند (۱۰ و ۱۱). نتایج تجزیه واریانس حاکی از آن است که عوامل مورد آزمایش دارای تأثیر معنی‌داری بر فعالیت آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز گیاهان گندم بودند. فعالیت آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز گیاهان شاهد (فاقد تلقیح قارچ و باکتری) در شرایط کمبود روی، نسبت به شرایط کفایت این عنصر، ۱۷/۵ درصد کاهش یافت (شکل ۴). کک‌مک و مارشنر (۱۶) نیز نشان دادند که در شرایط کمبود روی، فعالیت آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز برگ گیاه لوبیا کاهش یافت. دلیل کاهش فعالیت آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز در شرایط کمبود روی این است که روی نقش مهمی در بیان ژن‌های مسئول کدگذاری آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان از جمله آسکوربات‌پراکسیداز دارا می‌باشد (۷ و ۸). بنابراین، ساخت این آنزیم در شرایط کمبود روی دچار اختلال می‌شود. بیشترین فعالیت آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز در شرایط کمبود روی، مربوط به تیمار تلقیح همزمان قارچ *P. indica* و باکتری *A. chroococcum* است، به‌طوری که فعالیت این آنزیم در شرایط یاد شده دو برابر گیاهان شاهد بود. تیمار تلقیح باکتری *A. chroococcum* در شرایط کمبود روی، فعالیت آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز را نسبت به شاهد ۷۰٪ افزایش داد. اما تیمار تلقیح قارچ *P. indica*، ۲۹٪ فعالیت این آنزیم را کاهش



شکل ۵. اثر تلقیح انفرادی و همزمان قارچ *P. indica* و باکتری *A. chroococcum* بر فعالیت آنزیم پراکسیداز در سطوح مختلف روی. میانگین‌های با حداقل یک حرف یکسان، تفاوت معنی‌داری از لحاظ آماری در سطح احتمال ۵٪ ندارند.

داد. بیشترین فعالیت آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز در شرایط کفایت روی، متعلق به تلقیح باکتری *A. chroococcum* بود، بدین صورت که این باکتری توانست فعالیت آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز را ۶۸/۸ درصد نسبت به تیمار شاهد افزایش دهد. همچنین، تلقیح همزمان قارچ *P. indica* و باکتری *A. chroococcum* با گیاهان در شرایط کفایت روی، فعالیت آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز را نسبت به شاهد ۲۷/۶ درصد افزایش داد (شکل ۴).

گورورانی و همکاران (۲۶) افزایش فعالیت آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز گیاه گل مریم تلقیح یافته با باکتری‌های PGPR را در شرایط تنش گزارش کردند. آنان نشان دادند که باکتری‌های PGPR موجب افزایش بیان ژن مسئول کدگذاری آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز در شرایط تنش می‌شوند و از این طریق تحمل به تنش را در گیاهان افزایش می‌دهند. بنابراین، با توجه به نتایج مذکور به نظر می‌رسد که یکی از مکانیسم‌های فعال شده توسط باکتری به‌صورت انفرادی و در ترکیب با قارچ جهت حذف اثرهای مضر تنش کمبود روی، فعال کردن آنزیم آنتی‌اکسیدان آسکوربات‌پراکسیداز باشد. برعکس نتایج این پژوهش، بالتروشات و همکاران (۱۲) افزایش فعالیت آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز را در گیاهان تلقیح شده با قارچ *P. indica* در شرایط تنش شوری گزارش کردند. نقش مثبت این قارچ در افزایش بیان پروتئین آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز گیاه جو در شرایط مواجهه با تنش، توسط سپهری و همکاران (۴) تأیید شده است. روند تغییرات آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاهان تلقیح یافته با ریزجانداران در شرایط تنش بسیار متنوع است، زیرا تولید ROS در شرایط تنش بستگی به نوع ریزجاندار، نوع تنش، ژنوتیپ گیاهی و همچنین مرحله نموی گیاه دارد، که به دنبال آن شاهد تنوع در فعالیت آنتی‌اکسیدان‌ها خواهیم بود. احتمالاً قارچ اندوفایت *P. indica* با تأثیر بر سایر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و نیز مکانیسم آنتی‌اکسیدان غیر آنزیمی (کاروتنوئید) که در این پژوهش نیز توضیح داده شد، موجب کاهش خسارات ناشی از اثرهای مضر تنش کمبود روی در گیاهان می‌شود.

فعالیت آنزیم پراکسیداز

آنزیم پراکسیداز یکی از آنزیم‌های مهم از بین برنده پراکسیدهیدروژن در گیاهان در شرایط تنش‌های محیطی می‌باشد (۱۱). نتایج تجزیه واریانس حاکی از آن است که عوامل مورد آزمایش دارای تأثیر معنی‌داری بر فعالیت آنزیم پراکسیداز گیاهان گندم بود. نتایج نشانگر آن است که فعالیت آنزیم پراکسیداز گیاهان شاهد در شرایط کمبود روی، نسبت به شرایط کفایت این عنصر، کاهش یافت (شکل ۵). چن و

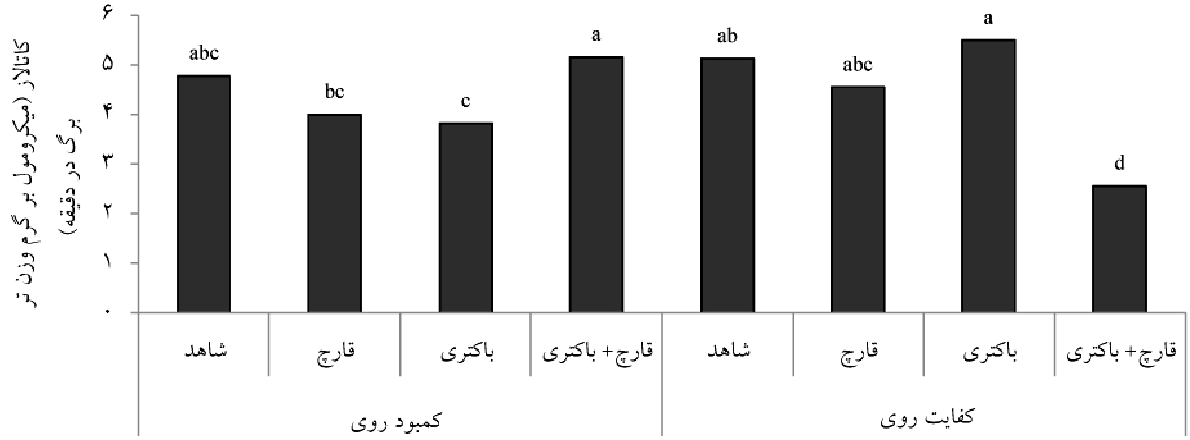
همکاران (۲۱) نیز نشان دادند که در شرایط کمبود روی، فعالیت آنزیم پراکسیداز گیاه برنج کاهش یافت. آنها بیان داشتند که ممکن است در شرایط تنش کمبود روی، آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از گونه‌های فعال اکسیژن از حداکثر توانایی سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدان گیاه فراتر برود و در نتیجه فعالیت این آنزیم کاهش یابد. همچنین، به دلیل کاهش ساخت پروتئین در شرایط کمبود روی (۳۱)، بیوسنتز آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در این شرایط آسیب می‌بیند. بیشترین فعالیت آنزیم پراکسیداز در شرایط کمبود و کفایت روی متعلق به تلقیح همزمان قارچ *P. indica* و باکتری *A. chroococcum* بود که به‌ترتیب نسبت به تیمار شاهد ۲۰۴ و ۴۳/۳ درصد افزایش نشان داد. تلقیح باکتری *A. chroococcum* با گیاهان در شرایط کمبود و کفایت روی، فعالیت آنزیم پراکسیداز را به‌ترتیب ۱۶۷ و ۴۰ درصد نسبت به تیمار شاهد افزایش داد. در حالی که در شرایط کمبود و کفایت روی، فعالیت این آنزیم در گیاهان تلقیح یافته با قارچ *P. indica* به‌ترتیب ۸۸ و ۸/۶ درصد بیشتر از گیاهان شاهد بود (شکل ۵).

سان و همکاران (۴۱) گزارش کردند که تلقیح قارچ *P. indica* با گیاه کلم چینی در شرایط تنش شوری، فعالیت آنزیم پراکسیداز و در نتیجه تحمل گیاه به تنش را افزایش می‌دهد. محققین متعددی نشان داده‌اند که تحریک فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاهان تلقیح یافته با قارچ *P. indica* در افزایش مقاومت گیاه به تنش‌های محیطی بسیار مهم است (۱۲ و ۳۵). استجنر و همکاران (۴۰) افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز را در گیاه چغندر تلقیح شده با باکتری *A. chroococcum* در شرایط تنش کمبود نیتروژن گزارش کردند. همچنین، توران و همکاران (۴۴) نشان دادند که تلقیح PGPR ها با گیاهان گندم و برنج، موجب افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز در شرایط تنش سرما شد. احتمالاً تولید متابولیت‌ها توسط باکتری‌های محرک رشد، از جمله هورمون‌های محرک رشد، نقش ویژه‌ای در تحریک و بیان پروتئین‌های آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان ایفا می‌کند. تنش اکسیداتیو ناشی از افزایش گونه‌های فعال اکسیژن در سلول، یکی از مهمترین آثار نامطلوب کمبود روی بر گیاه و فرایندهای فیزیولوژیک مهم گیاهی می‌باشد. با توجه به نقش مهم آنزیم پراکسیداز در حذف رادیکال سمی پراکسیدهیدروژن در شرایط تنش‌های مختلف، افزایش فعالیت این آنزیم در تیمارهای میکروبی می‌تواند عاملی مؤثر در حذف گونه‌های فعال اکسیژن و در نتیجه افزایش مقاومت گیاهان به تنش کمبود روی باشد.

فعالیت آنزیم کاتالاز

آنزیم کاتالاز به‌طور منحصر به فردی تبدیل رادیکال پراکسیدهیدروژن به آب و اکسیژن را انجام می‌دهد و بدین ترتیب گیاه را در برابر آسیب‌های ناشی از تنش محافظت می‌کند (۴۷). نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که فعالیت آنزیم کاتالاز گیاهان گندم به طور معنی‌داری تحت تأثیر عوامل مورد آزمایش قرار گرفتند. فعالیت آنزیم کاتالاز برگ گیاهان شاهد در شرایط کمبود روی، نسبت به شرایط کفایت این عنصر ۸٪ کاهش یافت (شکل ۶). مطابق با نتایج این پژوهش، کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز برگ گیاه لوبیا در شرایط تنش کمبود روی توسط محققین گزارش شده است (۱۶). کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز در شرایط کمبود روی، به‌دلیل اثر بازدارندگی رادیکال سوپراکسید بر این آنزیم است زیرا آنزیم کاتالاز به رادیکال سوپراکسید بسیار حساس است و در سطوح زیاد این رادیکال، غیر فعال می‌شود (۲۲). تلقیح باکتری *A. chroococcum* و قارچ *P. indica* و تلقیح همزمان این دو ریزجاندار با گیاهان در شرایط کمبود روی تأثیری بر فعالیت آنزیم کاتالاز نداشت. اما در شرایط کفایت روی، تیمار تلقیح همزمان این دو ریزجاندار فعالیت آنزیم کاتالاز را دو برابر نسبت به شاهد کاهش داد.

بر عکس نتایج پژوهش حاضر، استجنر و همکاران (۴۰) افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز را در گیاه چغندر تلقیح شده با باکتری *A. chroococcum* در شرایط تنش کمبود نیتروژن گزارش کردند. آقابابائیان و همکاران (۱) نیز نشان دادند که فعالیت آنزیم کاتالاز گیاه ذرت تلقیح یافته با قارچ *P. indica*



شکل ۶. اثر تلقیح انفرادی و همزمان قارچ *P. indica* و باکتری *A. chroococcum* بر فعالیت آنزیم کاتالاز در سطوح مختلف روی. میانگین‌های با حداقل یک حرف یکسان، تفاوت معنی‌داری از لحاظ آماری در سطح احتمال ۵٪ ندارند.

در شرایط تنش شوری افزایش یافت. تولید ROS در شرایط تنش، بستگی به نوع ریزجاندار، نوع تنش، شدت تنش، مدت تنش، جنس، گونه، ژنوتیپ گیاهی و همچنین مرحله نموی گیاه دارد. اگرچه تلقیح ریزجانداران مورد مطالعه با گیاهان، وزن خشک شاخساره را افزایش داد، ولی تأثیر معنی‌داری بر فعالیت آنزیم کاتالاز نداشت. بنابراین، به نظر می‌رسد که نقش مثبت این ریزجانداران در کاهش اثرهای مضر تنش کمبود روی از طریق این آنزیم نبوده است و از روش‌هایی که در قسمت‌های قبل به آنها اشاره شد این کار صورت گرفته است.

نتیجه‌گیری

افزایش سطح گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و کاهش کارایی سیستم سمیت‌زدایی (سیستم آنزیمی و غیر آنزیمی) از دلایل احتمالی آسیب به عملکردهای مختلف سلول‌های گیاهی در شرایط کمبود روی می‌باشند. نتایج این مطالعه گلخانه‌ای نشان‌دهنده آن است که در شرایط عدم کاربرد روی، باکتری *A. chroococcum* و قارچ اندوفایت *P. indica* نقش مؤثری در بهبود وزن خشک شاخساره دارا می‌باشند که این اثر سودمند باکتری در تلقیح همزمان کاهش می‌یابد. این دو ریزجاندار از طریق تحریک سیستم سمیت‌زدایی گونه‌های فعال اکسیژن (سیستم آنزیمی و غیر آنزیمی) گیاهان گندم نقش مهمی در کاهش اثرهای مضر ناشی از کمبود روی ایفا می‌کنند؛ اگرچه نقش تلقیح باکتری *A. chroococcum* بارزتر است. به‌طور کلی، تلقیح گیاه گندم رقم نیک‌نژاد با ریزجانداران مورد مطالعه در این پژوهش، به ویژه تلقیح باکتری *A. chroococcum*، می‌تواند به عنوان روشی مفید جهت کاهش اثرهای مضر تنش کمبود روی استفاده شود. با توجه به امکان کنترل شرایط محیطی در شرایط گلخانه و سیستم کشت بدون خاک در مقایسه با شرایط مزرعه و سیستم خاک، توصیه می‌شود تأثیر ریزجانداران مورد مطالعه در این پژوهش در غلظت‌های مختلف سایر عناصر غذایی بررسی شود.

منابع مورد استفاده

۱. آقابابائیان، م. ۱۳۹۲. بررسی اثر تلقیح قارچ اندوفایت *Piriformospora indica* و باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه (PGPR) بر گیاه ذرت در شرایط تنش شوری. پایان‌نامه کارشناسی ارشد خاک‌شناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان.

۲. بلالی، م. ر.، م. ج. ملکوتی. ح. مشایخی. و ز. خادمی. ۱۳۷۸. اثر عناصر ریزمغذی بر افزایش عملکرد و تعیین حد بحرانی آنها در خاک‌های تحت کشت گندم آبی ایران. مجله آب و خاک ۱۲(۶): ۱۱۱-۱۱۹.

۳. خوشگفتارمنش، ا. ح.، م. ر. بلالی. و ز. خادمی. ۱۳۸۰. تأثیر مصرف سولفات روی بر رشد و عملکرد گندم در اراضی شور بایر اصلاح شده. هفتمین کنگره علوم خاک، شهرکرد.

۴. سپهری، م. ۱۳۸۸. شناسایی مکانیسم‌های مولکولی مقاومت القا شده توسط قارچ *Piriformospora indica* به گیاه جو در شرایط تنش شوری و خشکی. رساله دکتری مهندسی علوم خاک، دانشکده مهندسی و فن‌آوری کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

6. AL-Aghabary, K., Z. Zhu and Q. Shi. 2004. Influence of silicon supply on chlorophyll content, chlorophyll fluorescence, and antioxidative enzyme activities in tomato plants under salt stress. J. Plant Nutr. 27: 2101-2115.
7. Allen, R.D. 1995. Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. J. Plant Physiol. 107: 1049-1054.
8. Alscher, R.G., J.L. Donahue and C.L. Cramer. 1997. Reactive oxygen species and antioxidants: Relationships in green cells. Physiol. Plant. 100: 224-233.
9. Arnon, A.N. 1967. Method of extraction of chlorophyll in the plants. Agron. J. 23: 112-121.
10. Asada, K. 1992. Ascorbate peroxidase: A hydrogen peroxide scavenging enzyme in plants. Physiol. Plant. 85: 235-241.
11. Asada, K. 1999. The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. Ann. Rev. Plant Physiol. 50: 601-639.
12. Baltruschat, H., J. Fodor, B.D. Harrach, E. Niemczyk, B. Barna, G. Gullner, A. Janeczko, K.H. Kogel, P. Schafer, I. Schwarczinger, A. Zuccaro and A. Skoczowski. 2008. Salt tolerance of barley induced by the root endophyte *Piriformospora indica* is associated with a strong increase in antioxidants. New Phytol. 180: 501-510.
13. Bandyopadhyay, U., D. Das and R. K. Banerjee. 1999. Reactive oxygen species: Oxidative damage and pathogenesis. Curr. Sci. India 77: 658-666.
14. Behl, R.K., S. Ruppel, E. Kothe and N. Narula. 2012. Wheat x Azotobacter x VA Mycorrhiza interactions towards plant nutrition and growth- a review. J. Appl. Bot. Food Qual. 81: 95-109.
15. Cakmak, I. and H. Marschner. 1988. Enhanced superoxide radical production in roots of zinc deficient plants. J. Exp. Bot. 39: 1449-1460.
16. Cakmak, I. and H. Marschner. 1993. Effect of zinc nutritional status on activities of superoxide radical and hydrogen peroxide scavenging enzymes in bean leaves. Plant Soil 155: 127-130.
17. Cakmak, I. 2000. Possible roles of zinc in protecting plant cells from damage by reactive oxygen species. New Phytol. 146: 185-205.
18. Candan, N. and L. Tarhan. 2003. Relationship among chlorophyll-carotenoid content, antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation levels by Mg^{2+} deficiency in the *Mentha pulegium* leaves. Plant Physiol. Biochem. 41: 35-40.
19. Cekic, F.O., S. Unyayar and I. Ortas. 2012. Effects of arbuscular mycorrhizal inoculation on biochemical parameters in *Capsicum annuum* grown under long term salt stress. Turk J. Bot. 36: 63-72.
20. Chapman, H. and P. Pratt. 1961. Plant analysis. PP. 56–64. *In:* Methods of Analysis for Soils, Plants and Waters, Div. Agric. Sci., University of California.
21. Chen, W., X. Yang, Z. He, Y. Feng and F. Hu. 2008. Differential changes in photosynthetic capacity, 77 K chlorophyll fluorescence and chloroplast ultrastructure between Zn-efficient and Zn-inefficient rice genotypes (*Oryza sativa*) under low zinc stress. Physiol. Plant. 132: 89-101.
22. Fridovich, I. 1986. Biological effects of the superoxide radical. Arch. Biochem. Biophys. 247: 1-11.
23. Glick, B.R. 2012. Plant growth-promoting bacteria: Mechanisms and applications. Scientifica, Article ID 963401, Hindawi Publishing Corporation.
24. Goh, T.B., M.R. Banerjee, T. Shihua and D.L. Burton. 1997. Vesicular arbuscular mycorrhizae mediated uptake and translocation of P and Zn by wheat in a calcareous soil. Can. J. Plant Sci. 77: 339-346.
25. Gosal, S., A. Karlupia, S. Gosal, I. Chhibba and A. Varma. 2010. Biotization with *Piriformospora indica* and *Pseudomonas fluorescens* improves survival rate, nutrient acquisition, field performance and saponin content of

micropropagated *Chlorophytum sp.* Indian J. Biotechnol. 9: 289-297.
26. Gururani, M.A., C.P. Upadhyaya, V. Baskar, A. Nookaraju, J. Venkatesh and S.W. Park. 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria enhance abiotic stress tolerance in *solanum tuberosum* through inducing changes in the expression of ROS-scavenging enzymes and improved photosynthetic performance. J. Plant Growth Regul. 32: 245-258.
27. Johnson, C., P. Stout, T.C. Broyer and A.B. Carlton. 1957. Comparative chlorine requirements of different plant species. Plant Soil 8: 337-353.
28. Kumar, V., R.K. Behl and N. Narula. 2001a. Effect of P-solubilizing *Azotobacter chroococcum* on yield traits and their survival in rhizosphere of wheat genotypes under field conditions. Acta Agron. Hungarica 49: 141-149.
29. Kumar, V., R.K. Behl and N. Narula. 2001b. Establishment of phosphate solubilizing strains of *Azotobacter chroococcum* in the rhizosphere and their effect on wheat cultivars under greenhouse conditions. Microbiol. Res. 156: 87-94.
30. Lindalh, B.D., K. Ihrmark, J. Boberg, S.E. Trumbore, P. Hogberg, J. Stenlid and R.D. Finlay. 2007. Spatial separation of litter decomposition and mycorrhizal nitrogen uptake in a boreal forest. New Phytol. 173: 611-620.
31. Marschner, H. 2011. Mineral Nutrition of Higher Plants. Elsevier.
32. Meena, K.K., S. Mesapogu, M. Kumar, M.S. Yandigeri, G. Singh and A.K. Saxena. 2010. Co-inoculation of the endophytic fungus *Piriformospora indica* with the phosphate-solubilising bacterium *Pseudomonas striata* affects population dynamics and plant growth in chickpea. Biol. Fertil. Soils 46: 169-174.
33. Michal-Johnson, J., Y.C. Lee, I. Camehl, C. Sun, K.W. Yeh and R. Oelmuller. 2013. *Piriformospora indica* promotes growth of Chinese cabbage by manipulating auxin homeostasis- role of auxin in symbiosis. *In:* Varma, A. (Ed.), *Piriformospora Indica*, Soil Biology, Springer-Verlag, Berlin.
34. Mrkovacki, N. and V. Milic. 2001. Use of *Azotobacter chroococcum* as potentially useful in agricultural application. Ann. Microbiol. 51: 145-158.
35. Nakano, Y. and K. Asada. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant Cell Physiol. 22: 867-880.
36. Narula, N., V. Kumar, R.K. Behl, A. Deubel, A. Gransee and W. Merbach. 2000. Effect of P solubilizing *Azotobacter chroococcum* on NPK uptake in P responsive wheat genotypes grown under greenhouse conditions. J. Plant Nutr. 163: 393-398.
37. Pinton, R., I. Cakmak and H. Marschner. 1994. Zinc deficiency enhanced NADPH-dependent superoxide radical production in plasma membrane vesicles isolated from roots of bean plants. J. Exp. Bot. 45: 45-50.
38. Rao, M.V., G. Paliyath and D.P. Ormrod. 1996. Ultraviolet-B- and ozone-induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol. 110: 125-136.
39. Sharma, P.N., P. Kumar and R.K. Tewari. 2004. Early signs of oxidative stress in wheat plants subjected to zinc deficiency. Plant Nutr. 27: 451-463.
40. Stajner, D., S. Kevresan, O. Gasic, N. Mimica-Ducic and H. Zongil. 1997. Nitrogen and azotobacter chroococcum enhance oxidative stress tolerance in sugar beet. Biol. Plant. 39: 441-445.
41. Sun. C., J.M. Johnson, D. Cai, I. Sherameti, R. Oelmüller and B. Lou. 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. J. Plant Physiol. 167: 1009-1017.
42. Swaminathan, K. 1978. Responses of three crop species to vesicular-arbuscular mycorrhizal infection on zinc-deficient Indian soils. New Phytol. 82: 481-487.
43. Tariq, M., S. Hameed, K.A. Malik and F.Y. Hafeez. 2007. Plant root associated bacteria for zinc mobilization in rice. Pak. J. Bot. 39: 245-253.
44. Turan, M., M. Güllüce, R. Çakmak and F. Şahin. 2013. Effect of plant growth-promoting rhizobacteria strain on freezing injury and antioxidant enzyme activity of wheat and barley. J. Plant Nutr. 36: 731-748.
45. Varma, A., A. Singh, N. Sudha Sahay, J. Sharma, A. Roy, M. Kumari, D. Rana, S. Thakran, D. Deka, K. Bharti, P. Franken, T. Hurek, O. Blechert, K.H. Rexer, G. Kost, A. Hahn, B. Hock, W. Maier, M. Walter, D. Strack and I. Kranner. 2001. *Piriformospora indica*: A cultivable mycorrhiza-like endosymbiotic fungus. Mycota IX. Springer Series, Germany, pp. 123-150.
46. Varma, A., M. Bakshi, B. Lou, A. Hartmann and R. Oelmueller. 2012. *Piriformospora indica*: A novel plant growth-promoting mycorrhizal fungus. Agric. Res. 1: 117-131.

47. Willekens, H., S. Chamnongpol, M. Davey, M. Schraudner, C. Langebartels, M. Van Montagu, D. Inzé and W. Van Camp. 1997. Catalase is a sink for H_2O_2 and is indispensable for stress defence in C3 plants. EMBO J. 16: 4806-4816.
48. Willson, R.L. 1988. Zinc and iron in free radical pathology and cellular control. PP. 147-172. *In:* Mills, C.F. (Ed.), Zinc in Human Biology, Springer-Verlag, London, UK.