

تأثیر قارچ *Piriformospora indica* بر صفات مورفوفیزیولوژیک گیاه تربچه (*Raphanus raphanistrum* L.) در شرایط تنش فلزات سنگین

فاطمه ایزدی^۱، مهدی قبولی^{۲*}، مجید رستمی^۳، زهرا موحدی^۲

تاریخ دریافت: ۹۹/۶/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۹/۱۱/۲۵

۱- فارغ التحصیل کارشناسی ارشد مهندسی تولیدات گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ملایر، ملایر، ایران

۲- استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ملایر، ملایر، ایران

۳- دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ملایر، ملایر، ایران

*مسئول مکاتبه: Email: m.ghabooli@malayeru.ac.ir

چکیده

اهداف: قارچ *Piriformospora indica* علاوه بر تحریک رشد و نمو گیاه میزبان سبب ایجاد مقاومت به تنش‌های غیرزیستی نظیر تنش فلزات سنگین می‌شود. بررسی تأثیر قارچ اندوفیت *P. indica* بر برخی خصوصیات مورفوفیزیولوژیک گیاه تربچه و همچنین مقاومت به تنش فلزات سنگین از اهداف این پژوهش است.

مواد و روش‌ها: این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه ملایر انجام شد. تیمارهای آزمایش شامل ۳ نوع فلز سنگین (روی، نیکل، سرب و شاهد) و ۳ تیمار قارچی (تلقیح با اسپور، تلقیح با میسلیوم و عدم تلقیح) بودند. خصوصیات مورد بررسی شامل وزن خشک اندام هوایی، محتوای نسبی آب، رنگیزه‌های فتوسنتزی، نشت یونی، کربوهیدرات کل محلول، پروتئین و پرولین بود.

یافته‌ها: نتایج نشان داد طی تنش، فلزات سنگین کاهش معنی‌داری در وزن خشک، محتوای نسبی آب، کلروفیل، کاروتنوئید، میزان کربوهیدرات و پروتئین ایجاد کرد؛ در حالیکه تلقیح با اسپور و میسلیوم قارچ بر صفاتی نظیر پرولین، کربوهیدرات و پروتئین اثر معنی‌داری داشت و باعث افزایش این صفات و کاهش تأثیرات منفی فلزات سنگین شد. تنش فلزات سنگین با افزایش نشت یونی باعث ناپایداری غشاء گردید اما تلقیح با قارچ خصوصاً اسپور میزان نشت یونی ناشی از پراکسیداسیون لیپیدها را پائین آورد.

نتیجه‌گیری: کاربرد روش‌های زیستی می‌تواند نقش مهمی در مقابله با اثرات سمی فلزات سنگین داشته باشد. با توجه به تکثیر قارچ *P. indica* بر روی محیط کشت مصنوعی و نتایج بدست آمده، امکان استفاده از آن به عنوان یک کود زیستی در اصلاح خاک‌های آلوده به فلزات سنگین قابل بررسی است.

واژه‌های کلیدی: رنگیزه‌های فتوسنتزی، پراکسیداسیون لیپید، تنش فلزات سنگین، همزیستی، نشت یونی

Evaluation of fungus *Piriformospora indica* Effects on Some Morphophysiological Traits of Radish under Heavy Metal Stress

Fatemeh Izadi¹, Mehdi Ghabooli^{2*}, Majid Rostami³, Zahra Movahedi²

Received: 13 September 2020 Accepted: 13 February 2021

1- Graduated student, Agronomy and Plant Breeding Dept., Faculty of Agriculture, Malayer University, Malayer, Iran.

2* - Assist. Prof., Agronomy and Plant Breeding Dept., Faculty of Agriculture, Malayer University, Malayer, Iran.

3- Assoc. Prof., Agronomy and Plant Breeding Dept., Faculty of Agriculture, Malayer University, Malayer, Iran.

*Corresponding Author Email: m.ghabooli@malayeru.ac.ir

Abstract

Background and Objective: *Piriformospora indica* is an endophytic fungus, which transfers several benefits to hosts including enhance plant growth and induce tolerance to abiotic stress as heavy metals stress. The aim of this study was to investigate the effect of *P. indica* on some morphophysiological parameters of radish (*Raphanus sativus*) under normal conditions and heavy metal stress.

Materials and Methods: This experiment was conducted as a factorial experiment in a completely randomized design with three replications in the greenhouse of Agricultural Faculty of Malayer University. The experimental factors included four heavy metals (zinc, nickel, lead and control) and three fungal inoculums (inoculated with spores and mycelium and non-inoculated). Shoot dry weight, relative water content, photosynthetic pigments, electrolyte leakage, total soluble carbohydrate, protein and proline contents were investigated parameters.

Results: The results showed that the heavy metal stress significantly decreased dry weight, RWC, chlorophyll, total soluble carbohydrate, protein and proline contents; whereas inoculation with fungal spore and mycelium affected parameters such as proline, total soluble carbohydrate and protein and mitigated the adverse effect of heavy metal stress. Heavy metal stress with increasing electrolyte leakage causes membrane instability, whereas inoculation with *P. indica* especially spore decreased lipid peroxidation.

Conclusion: Using biotic methods can play an important role in counteracting with toxic effect of heavy metals. Based on these results and because *P. indica* can be propagated axenically on various medium, it can be concluded that this endophytic fungus serves as a promising approach to clean soil contaminated with heavy metal ions.

Keywords: Phtotosynthetic Pigments, Lipid Peroxidation, Heavy Metal Stress, Symbiosis, Electrolyte Leakage

مقدمه

امروزه به دلیل توزیع مواد زائد خانگی، صنعتی و کشاورزی توسط انسان، محیط زیست درحال آلوده شدن با مواد آلی و معدنی می‌باشد. اصلی‌ترین ترکیب آلاینده‌های معدنی، فلزات سنگین از جمله مس، سرب، روی، آهن و کادمیم می‌باشد (دبیری ۲۰۰۰). در بین فلزات سنگین عناصری وجود دارد که بعنوان عناصر کم-مصرف (Fe, Mo, Mn, Zn, Ni, ...) برای متابولیسم گیاهی با اهمیت هستند اما وقتی مقدار آنها در محیط رشد گیاه زیاده‌تر از حد نرمال باشد، برای گیاهان مسمومیت‌زا هستند. امکان اصلاح خاک‌های آلوده به فلزات سنگین با استفاده از تکنیک‌های شیمیایی، فیزیکی و زیستی وجود دارد، اما روش‌های فیزیکی و شیمیایی معمولاً هزینه‌بر، وقت‌گیر و تخریب‌کننده محیط زیست می‌باشند. از این رو، طی سال‌های اخیر پژوهشگران درصدد طراحی و توسعه تکنیک‌های زیستی برآمدند که بتوانند مکان‌های آلوده به فلزات سنگین را بدون آنکه بر حاصلخیزی و تنوع بیولوژیکی خاک اثرات سوئی داشته باشند، پاکسازی و تعدیل نمایند (سروار و همکاران ۲۰۱۷).

گیاهان بطور وراثتی مکانیسم‌های مشخصی برای مبارزه با خسارت تنش اکسیداتیو و مقابله با اثرات مضر گونه‌های فعال اکسیژن (ROSها) دارند که این مکانیسم‌ها شامل افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانت‌های آنزیمی (SOD، CAT، و POX) و غیر آنزیمی نظیر گلوکاتینون، تیول و کارتنوئیدها می‌باشد (تونواجام و همکاران ۲۰۱۴). از طرفی ارتباط همزیستی گیاهان با قارچ‌های میکوریزا نقش مهمی در سیستم دفاعی گیاه بازی کرده و می‌تواند به نحو موثری فلزات سنگین را در خاک محدود و اثرات آن را تخفیف دهد (لاتف و همکاران ۲۰۱۶). ژن‌های مختلف درگیر در مقاومت به فلزات سنگین از قبیل ترانسپورترهای ZIP، متالوتیونین‌ها و گلوکاتینون اس ترانسفراز در گیاهان کلونیزه‌شده با قارچ‌های میکوریزا افزایش بیان داشته‌اند (هیلدبرانت و همکاران ۲۰۰۷).

یکی از قارچ‌های اندوفیت شبه‌میکوریزا، قارچ *Piriformospora indica* می‌باشد که در سال ۱۹۹۸ توسط وارما و همکاران (۱۹۹۹) در کشور هندوستان شناسایی گردید. این قارچ با تعداد زیادی از گیاهان عالی رابطه همزیستی برقرار نموده و توانایی معنی‌داری برای غیرفعال کردن فلزات سنگین در ریشه‌ها دارد که می‌تواند در زیست‌پالایی امیدوار کننده باشد (گیل و همکاران ۲۰۱۶). تاثیر قارچ *P. indica* بر مقاومت به تنش فلزات سنگین در گزارش‌های کمی مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج نشان داد تلقیح با قارچ *P. indica* از طریق افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت و محتوای کلروفیل و همچنین کاهش ROS، باعث افزایش مقاومت به تنش فلز سنگین کادمیم در گل آفتابگردان (شهابی نیا و همکاران ۲۰۱۳)، تنباکو (هوی و همکاران ۲۰۱۵)، برنج (دابرال و همکاران ۲۰۱۹) و یونجه (لی و همکاران ۲۰۲۰) می‌شود. ناندا و آگروال (۲۰۱۸) نشان دادند که افزایش پرولین و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در کنار کاهش پراکسیداسیون لیپید و پراکسید هیدروژن در گیاهان *Cassia angustifolia* تلقیح‌شده با قارچ *P. indica* باعث مقاومت آنها به تنش فلز سنگین مس می‌شود. سرتیپ‌نیا و همکاران (۲۰۱۳) نتایج مشابهی در مورد گیاهان گوجه-فرنگی در شرایط تنش سرب گزارش کردند. همچنین گزارش شده است که تلقیح گیاه گندواش با قارچ مذکور باعث افزایش زیست‌توده، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت و ترکیبات فنلی شده و مقاومت به تنش آرسنیک را افزایش می‌دهد (رحمان و همکاران ۲۰۱۹). نتایج این مطالعات نشان می‌دهد که قارچ می‌تواند به عنوان یک عامل بالقوه برای حذف زیستی فلزات سنگین مورد توجه قرار گیرد. از اینرو، کاربرد عملی *P. indica* در پاک‌سازی زمین‌های آلوده به فلزات سنگین نیاز به بررسی بیشتری دارد و می‌تواند ابزار مهمی در کشاورزی پایدار باشد.

تربچه (*Raphanus sativus* L.) گیاهی یکساله و علفی از خانواده شب‌بو و در مناطق مختلف ایران کشت می‌شود. بخش خوراکی این گیاه ستبر و در تماس مستقیم با خاک قرار دارد. بنابراین فلزات سنگین به

شد. تیمارهای آزمایش شامل مایه تلقیح مختلف قارچ (میسلیوم، اسپور و شاهد بدون قارچ) به عنوان فاکتور اول و سه نوع فلز سنگین (شامل نیترات سرب، نیترات روی، نیترات نیکل و شاهد) به عنوان فاکتور دوم می باشد. در تیمار با اسپور قارچ، بذره‌های جوانه دار شده با سوسپانسیون اسپور قارچ (حاوی $10^6 \times 5$ اسپور در میلی لیتر) تلقیح و به مدت یک ساعت بر روی شیکر با ۷۰ دور در دقیقه قرار داده شدند تا امکان اتصال اسپورهای قارچ به سطح ریشه‌چه فراهم شود، سپس گیاهچه‌های تلقیح شده در گلدان کاشته شدند. برای تیمار میسلیوم، از مخلوط ۱٪ (وزنی به وزنی) میسلیوم و خاک استفاده و سپس گیاهچه‌ها در آن کاشته شدند. گلدان‌ها پس از کشت به گلخانه منتقل و به مدت ۲ ماه نگهداری گردیدند. برای اعمال تنش فلزات سنگین، ابتدا محلول حاوی فلزات سنگین (سرب، نیکل و روی) تهیه و سپس گلدان‌ها با محلول حاوی فلزات سنگین با غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر آبیاری شدند تا میزان مورد نظر از فلزات سنگین به خاک اضافه شود. سپس گلدان‌ها به مدت دو ماه در شرایط طبیعی حفظ شدند. لازم به ذکر است که در شرایط کنترل (عدم اعمال تنش فلزات سنگین)، آبیاری گلدان‌ها با آب آبیاری و بدون فلزات سنگین انجام گرفت. چهار هفته پس از خروج گیاهچه‌ها، نمونه برداری از اندام‌های هوایی صورت گرفت و صفاتی مانند ارتفاع بوته، تعداد برگ در هر گیاه، وزن خشک اندام هوایی، محتوای نسبی آب، رنگیزه‌های فتوسنتزی، کربوهیدرات، پروتئین و پرولین مورد سنجش قرار گرفتند.

بررسی صفات مورفولوژیک و فیزیولوژیک

پس از تعیین وزن تر نمونه‌های گیاهی برداشت شده، نمونه‌های مذکور به مدت ۴۸ ساعت در آون با دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و وزن خشک آن‌ها نیز محاسبه گردید. برای اندازه‌گیری محتوای نسبی آب برگ (RWC)، از روش بار و وثرلی (۱۹۶۲) و معادله $RWC = \frac{FW - DW}{TW - DW} \times 100$ استفاده شد

راحتی در آن تجمع یافته و برای مصرف‌کنندگان مضر خواهند بود. این گیاه در بسیاری از نقاط دنیا به واسطه دوره رشد کوتاه و ارزش غذایی بالا کشت می‌شود (اکرم و همکاران ۲۰۱۵). با اینحال، مطالعات معدودی در زمینه تاثیر تنش‌های غیر زیستی مانند خشکی و فلزات سنگین بر روی این گیاه انجام شده است.

با توجه به اینکه گیاهان نقش مهمی در انتقال فلزات سنگین در خاک‌های آلوده بر عهده دارند، در نتیجه می‌توانند سبب ورود سموم به چرخه غذایی گردند. از اینرو بررسی جذب فلزات توسط گیاهان به خصوص سبزیجات از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. هدف مطالعه حاضر ارزیابی تاثیر ارتباط همزیستی قارچ اندوفیت *P. indica* با گیاه تربچه بر مقاومت به فلزات سنگین روی، سرب و نیکل و توانایی قارچ در کاهش اثرات مضر این فلزات در گیاه مذکور می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه، تشخیص و تکثیر مایه تلقیح قارچ *P. indica*

برای کشت قارچ از محیط کشت پیچیده (محیط کشت آسپرژیلوس تغییر یافته حاوی عناصر ماکرو، میکرو، عصاره مخمر، پپتون و کازئین) استفاده شد. کشت جداییه قارچ مطابق با روش قبولی و همکاران (۲۰۱۳) انجام و پس از جمع‌آوری اسپورهای قارچ، تعداد اسپورها با استفاده از لام نئوبار شمارش گردید. برای تهیه میسلیوم، دیسک‌های فعال قارچ از محیط کشت برداشته و در ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع قرار داده و سپس در شیکر انکوباتور با دمای 28 ± 2 درجه سانتی‌گراد و ۱۵۰ دور در دقیقه به مدت ۷-۱۰ روز قرار داده شدند. در مرحله بعد با استفاده از فیلتر کاغذی، میسلیوم‌ها از محیط کشت جدا و سپس چندین بار با آب مقطر شستشو داده شد (بجاج و همکاران ۲۰۱۵).

کشت گیاه و اعمال تیمارها

این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در شرایط کنترل شده گلخانه انجام

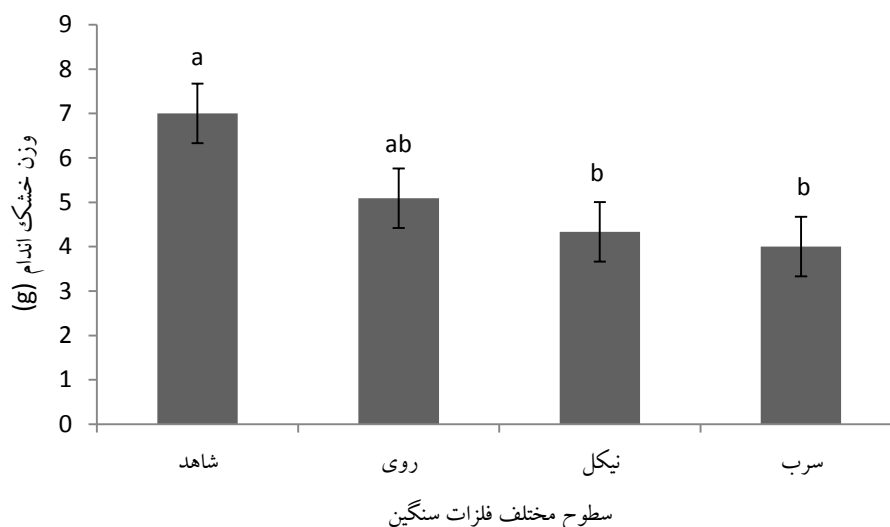
نتایج و بحث

وزن خشک اندام هوایی

بر اساس نتایج به دست آمده اثرات ساده تنش فلزات سنگین بر وزن خشک اندام هوایی در سطح احتمال ۱ درصد معنی دار شد اما اثر ساده قارچ و اثرات متقابل معنی دار نشد (جدول ۱). تنش فلزات سنگین باعث کاهش وزن خشک گردیده است، به طوریکه کمترین وزن خشک مربوط به تیمار فلز سنگین سرب (۴/۰ گرم در بوته) و بیشترین میزان آن مربوط به شاهد (۷/۰ گرم در بوته) بود (شکل ۱). اگرچه اثرات قارچ بر وزن خشک اندام هوایی گیاهان تلقیح شده معنی دار نبود اما قارچ تا حدی توانسته بود اثرات مضر فلزات سنگین را بر وزن خشک گیاهان تلقیح شده جبران نماید؛ بطوریکه گیاهان تلقیح شده نسبت به گیاهان شاهد سریعتر رشد کرده، ارتفاع بیشتری داشته و دارای تعداد بیشتری برگ بودند (داده‌های مرتبط با ارتفاع و تعداد برگ آورده نشده است) اما نتایج نشان داد تلقیح با قارچ خصوصاً میسلیوم قارچ تعداد برگ و ارتفاع گیاه را افزایش می‌دهد).

بیوماس (زیست توده) و رشد طولی گیاه به عنوان شاخص‌های سمیت فلزات سنگین در گیاهان شناخته می‌شوند. پژوهش‌های متعددی نشان داده است که وقتی گیاهان در معرض غلظت‌های بالای فلزات سنگین قرار می‌گیرند، وزن تر و خشک گیاه و طول بخش هوایی و ریشه کاهش می‌یابد (امیدبیگی ۲۰۰۹). تاثیر نامطلوب فلزات سنگین بر ارتفاع، وزن خشک و تر و دیگر شاخص‌های رشدی برنج گزارش شده است که نتایج مطالعه حاضر با آن منطبق می‌باشد. از مهم‌ترین دلایل کاهش معنی‌دار عملکرد و ماده خشک گیاه در شرایط تنش می‌توان به کاهش تقسیم سلولی، بسته شدن روزنه‌ها، کاهش فتوسنتز و متعاقباً ممانعت از رشد اشاره کرد (شانکر و همکاران ۲۰۰۵).

که در آن FW ، TW و DW به ترتیب وزن تر، وزن آماس و وزن خشک می‌باشد. رنگیزه‌های برگ (کلروفیل a ، کلروفیل b و کلروفیل کل) با استفاده از استون ۸۰ درصد، استخراج و سنجش آن مطابق با روش آرنون (۱۹۴۹) انجام شد. غلظت کلروفیل a ، کلروفیل b ، کلروفیل کل و کاروتنوئید به ترتیب در طول موج‌های ۶۶۳، ۶۴۵، ۶۵۲ و ۴۷۰ نانومتر تعیین گردید. نشت یونی مطابق با روش والنتویچ و همکاران (۲۰۰۶) و با استفاده از برگ‌های تازه و دستگاه EC متر اندازه‌گیری شد. ابتدا هدایت الکتریکی اولیه ($EC1$) اندازه‌گیری و سپس نمونه‌ها در ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو و بعد از کاهش دما تا دمای محیط، هدایت الکتریکی مجدداً اندازه‌گیری شد ($EC2$). نشت یونی از طریق رابطه $EL = (EC1/EC2) \times 100$ محاسبه گردید. استخراج و اندازه‌گیری پروتئین کل به روش رنگ‌سنجی برادفورد (۱۹۸۷) و توسط دستگاه اسپکتروفتومتر انجام شد. از سرم آلبومین گاوی به عنوان استاندارد استفاده شد. استخراج کربوهیدرات کل محلول از بافت تر به روش ایروجویین و همکاران (۱۹۹۲) با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۲۰ نانومتر قرائت و با استفاده از منحنی استاندارد بدست آمده از غلظت‌های مختلف گلوکز بیان گردید. جهت سنجش پرولین روش بیتس و همکاران (۱۹۷۳) انتخاب شد و نمونه‌ها با استفاده از معرف نین‌هیدرین و در طول موج ۵۲۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. استخراج فنول کل به وسیله معرف فولین سیوکالتیو مطابق با روش سینگلتن و روسی (۱۹۶۵) صورت گرفت و در طول موج ۷۶۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. مقدار فنول کل با استفاده از منحنی کالیبراسیون استاندارد بود که برای اسید گالیک در غلظت‌های مختلف تهیه شده بود، محاسبه شد. به منظور مقایسه گیاهان شاهد و گیاهان تلقیح شده با قارچ *P. indica*، تجزیه آماری نتایج، با استفاده از نرم‌افزار $MSTAT-C:2015$ انجام گردید. مقایسه میانگین‌ها نیز در سطح ۵٪ و بر اساس آزمون دانکن انجام شد.



شکل ۱- نتایج مقایسه میانگین تیمارهای مختلف فلزات سنگین در وزن خشک اندام هوایی گیاه تربچه

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس محتوای نسبی آب و رنگیزه‌های فتوسنتزی گیاه تربچه تحت تنش فلزات سنگین و قارچ

منابع تغییر	درجه آزادی	وزن خشک اندام هوایی	محتوای نسبی آب	کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل کل	کارتوتنوئید	نشت یونی	کربوهیدرات	پروکلین	پروتئین
قارچ	۲	۲/۰۸۳ ^{ns}	۶/۲۹ ^{ns}	۰/۰۳۹۸ ^{ns}	۰/۰۱۳۷ ^{ns}	۰/۱۱۳ ^{ns}	۰/۰۰۰۶ ^{ns}	۳۶/۶۲۸ ^{**}	۰/۰۴۷۲ ^{**}	۱/۸۸۱ ^{**}	۰/۰۰۴۳ ^{**}
فلزات سنگین	۳	۱۶/۲۴ ^{**}	۳/۴۴ ^{ns}	۰/۰۴۲۲ ^{ns}	۰/۰۱۱۳ ^{ns}	۰/۱۸۱ [*]	۰/۰۱۰۱ ^{**}	۱۵/۰۱۸ [*]	۰/۰۲۲۰ ^{**}	۰/۶۱۸ ^{**}	۰/۰۰۸۶ ^{**}
قارچ × فلزات سنگین	۶	۱/۳۰ ^{ns}	۱۸/۴۹ [*]	۰/۰۷۲۵ ^{**}	۰/۰۴۷۴ [*]	۰/۲۶۸ ^{**}	۰/۰۰۵۷ [*]	۱۷/۹۴۴ [*]	۰/۰۰۴۸ ^{**}	۰/۰۲۸ ^{**}	۰/۰۰۰۶ ^{**}
خطای آزمایش	۲۴	۱/۷۹	۵/۴۲	۰/۰۱۷۳	۰/۰۱۴۵	۰/۰۴۸	۰/۰۰۱۹	۴/۸۵۹	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۵	۰/۰۰۰
ضریب تغییرات	-	۶/۵۴	۲/۲۴	۲/۱۷	۱/۳۴	۰/۸۹	۱/۰۷	۳/۶۱	۰/۵۵	۰/۱۵	۰/۴۴

ns و ** و * به ترتیب غیر معنی‌داری و معنی‌داری در سطح ۱ و ۵ درصد می باشد.

از جمله کلنیزاسیون غیریکنواخت گیاهان یا پاسخ متفاوت گیاه به تلقیح با میسیلیوم یا اسپور قارچ باشد.

محتوای نسبی آب برگ

بر اساس نتایج به دست آمده برهمکنش تیمارهای مختلف قارچ و فلزات سنگین بر محتوای نسبی آب برگ در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار شد (جدول ۱). نتایج مقایسه میانگین نشان‌داد بیشترین محتوای نسبی آب برگ در

تأثیر قارچ بر میزان وزن خشک گیاهان تلقیح شده با قارچ در شرایط تنش خشکی (قبولی و همکاران ۲۰۱۳)، شوری (والر و همکاران ۲۰۰۵) و فلزات سنگین (ناندا و آگراوال ۲۰۱۸) گزارش شده است. مکانیسم‌های مختلفی در ارتباط با تأثیر قارچ‌های اندوفیت بر رشد رویشی گیاهان ذکر شده است. در پژوهش حاضر، این تاثیرات معنی‌دار نبود که این امر می‌تواند ناشی از دلایل متعددی

(جدول ۰/۵۵ میلی‌گرم برگرم وزن‌تر) دیده شده است (جدول ۲).

تجزیه واریانس داده‌ها نشان‌داد اثرات ساده تنش فلزات سنگین و اثرات متقابل تیمارهای قارچ و فلزات سنگین بر میزان کلروفیل کل و کاروتنوئید معنی‌دار است (جدول ۱). بیشترین میزان کلروفیل کل در تیمار با میسلیوم و بدون تنش فلزات سنگین (۲/۵۵ میلی‌گرم برگرم وزن‌تر) و کمترین اثر در تیمار با میسلیوم و فلز سنگین روی (۱/۵۳ میلی‌گرم برگرم وزن‌تر) مشاهده شد. همچنین بیشترین میزان کاروتنوئید در تیمار با میسلیوم و بدون تنش فلزات سنگین (۰/۴۴ میلی‌گرم برگرم وزن‌تر) و کمترین اثر در تیمار با میسلیوم و فلز سنگین روی (۰/۲۹ میلی‌گرم برگرم وزن‌تر) دیده شده است (جدول ۲).

فلزات سنگین به وسیله مهار آنزیم‌های گاما-آمینو لوالونیک اسید دهیدروژناز و پروتوکلروفیل ردوکتاز سبب مهار بیوسنتز کلروفیل می‌شوند. بر همکنش متقابل فلز سنگین با گروه سولفیدریل آنزیم‌ها مهم‌ترین مکانسیم این مهارها عنوان شده است. علاوه بر مهار بیوسنتز کلروفیل به وسیله فلزات سنگین، این فلزات باعث تجزیه زیستی کلروفیل نیز می‌شوند (شارما و دوی ۲۰۰۵). کاروتنوئیدها کمتر تحت تاثیر فلزات سنگین قرار می‌گیرند و در نتیجه، موجب کمتر شدن نسبت کلروفیل به کاروتنوئید در گیاهان می‌شوند (واسیلو و یوردانو ۱۹۹۷).

نتایج به‌دست‌آمده نشان داد تلقیح قارچ باعث افزایش رنگی‌های فتوسنتزی نسبت به گیاهان شاهد می‌گردد که با نتایج کریمی و همکاران (۲۰۱۵) و باساک و همکاران (۲۰۱۱) مطابقت داشت. در پژوهشی دیگر مشخص شد تلقیح ریشه گیاه دارویی *Coleus forskohlii* با قارچ *P. indica* منجر به افزایش کلی زیست‌توده اندام

گیاهان تلقیح‌نشده و تیمار شده با فلز سنگین نیکل (۹۲/۶ درصد) و کمترین اثر در تیمار شاهد تلقیح‌نشده (۸۵/۳ درصد) دیده شده است (جدول ۲).

محتوای آبی برگ‌ها به‌عنوان فاکتوری برای تعیین سطح آب گیاه شناخته شده است که منعکس‌کننده فعالیت‌های متابولیکی در بافت‌هاست؛ کاهش محتوای نسبی آب برگ سبب کاهش فراهمی آب مورد نیاز برای فرایندهای مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی می‌گردد (فرخنده و همکاران ۲۰۱۲). کاظم‌علیلو و صدقیانی (۲۰۱۲) در تحقیقی روی گیاه بنگدانه نشان دادند که در اثر سمیت با فلز سنگین سرب و با افزایش غلظت فلز، میزان نسبی محتوای آب برگ (RWC) کاهش یافت.

نتایج برخی بررسی‌ها نشان داده است که قارچ تاثیر مثبت و مستقیمی بر محتوای نسبی آب در شرایط تنش‌های غیر زیستی دارد (قبولی و همکاران ۲۰۱۱). به‌نظر می‌رسد میسلیوم‌های قارچ سطح جذب بالاتری را برای گیاهان میزبان فراهم آورده و از طرفی به نگهداری آب در اطراف آن کمک کرده‌اند و همین مسئله سبب شده است تا در شرایط یکسان، گیاهان تلقیح‌شده نسبت به گیاهان شاهد دارای محتوای نسبی آب بیشتری باشند.

رنگی‌های فتوسنتزی

بر اساس نتایج به‌دست‌آمده از تجزیه واریانس داده‌ها، برهمکنش تیمارهای مختلف قارچ و فلزات سنگین بر میزان کلروفیل a و b معنی‌دار شد (جدول ۱). معنی‌دار شدن اثرات متقابل نشان می‌دهد که دو فاکتور مستقل از هم عمل نکرده‌اند. بیشترین مقدار کلروفیل a در تیمار با میسلیوم و بدون تنش فلزات سنگین (۱/۲۱ میلی‌گرم برگرم وزن‌تر) و کمترین اثر در تیمار با میسلیوم قارچ و فلز سنگین روی (۰/۶۹ میلی‌گرم برگرم وزن‌تر) دیده شده است (جدول ۲). بیشترین میزان کلروفیل b در تیمار اسپور و فلز سنگین روی (۰/۹۲ میلی‌گرم برگرم وزن‌تر) و کمترین اثر در تیمار قارچ میسلیوم و فلز سنگین روی

جدول ۲- مقایسه میانگین صفات فیزیولوژیک گیاه تربچه تحت تأثیر تنش فلزات سنگین و تیمار با قارچ

تیمارها	محتوای نسبی آب (%)	کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل کل	کارتونوئید	نشت یونی (%)	کربوهیدرات کل محلول (mg.g ⁻¹ FW)	پرویلین (μg.g ⁻¹ FW)	پروتئین (mg.g ⁻¹ FW)
CF0	۸۵/۲۹ ^b	۰/۹۷۲ ^{ab}	۰/۷۵۳ ^{ab}	۲/۱۰ ^{abc}	۰/۳۷۵ ^{ab}	۴/۰۴ ^b	۰/۰۷۵ ^f	۰/۳۳۱ ^j	۰/۰۰۷ ^f
ZF0	۸۷/۰۱ ^{ab}	۰/۸۵۵ ^{ab}	۰/۷۴۹ ^{ab}	۱/۹۲ ^{abc}	۰/۳۲۰ ^{ab}	۱۱/۶۲ ^a	۰/۱۱۵ ^e	۰/۷۳۰ ⁱ	۰/۰۵۱ ^d
NF0	۹۲/۵۷ ^a	۰/۸۸۲ ^{ab}	۰/۶۶۸ ^{ab}	۱/۸۶ ^{bc}	۰/۳۱۲ ^b	۴/۱۱ ^b	۰/۱۱۹ ^e	۰/۹۰۳ ^h	۰/۰۴۱ ^e
PF0	۹۰/۶۲ ^{ab}	۱/۰۸۳ ^a	۰/۸۱۸ ^{ab}	۲/۲۴ ^{ab}	۰/۳۴۴ ^{ab}	۷/۵۷ ^{ab}	۰/۱۱۵ ^e	۱/۰۵۰ ^g	۰/۰۳۵ ^e
CF1	۸۷/۹۳ ^{ab}	۱/۰۱۵ ^{ab}	۰/۷۵۳ ^{ab}	۲/۱۳ ^{abc}	۰/۳۶۳ ^{ab}	۴/۲۱ ^b	۰/۱۰۶ ^{ef}	۱/۰۷۳ ^g	۰/۰۰۹ ^f
ZF1	۸۷/۴۶ ^{ab}	۱/۱۵۶ ^a	۰/۹۱۳ ^a	۲/۳۴ ^{ab}	۰/۴۰۴ ^{ab}	۲/۳۱ ^b	۰/۲۰۵ ^d	۱/۴۴۷ ^d	۰/۰۷۱ ^c
NF1	۸۷/۷۶ ^{ab}	۱/۰۶۴ ^{ab}	۰/۷۷۴ ^{ab}	۲/۱۶ ^{abc}	۰/۳۳۰ ^{ab}	۳/۵۲ ^b	۰/۲۲۳ ^{cd}	۱/۳۴۰ ^e	۰/۰۷۲ ^c
PF1	۸۶/۵۴ ^{ab}	۱/۰۰۵ ^{ab}	۰/۶۹۶ ^{ab}	۲/۰۱ ^{abc}	۰/۳۱۳ ^b	۳/۳۲ ^b	۰/۲۵۶ ^{bc}	۱/۶۳۲ ^b	۰/۰۸۷ ^b
CF2	۹۰/۳۷ ^{ab}	۱/۲۱۱ ^a	۰/۸۹۴ ^{ab}	۲/۵۵ ^a	۰/۴۴۴ ^a	۲/۷۱ ^b	۰/۱۰۵ ^{ef}	۱/۱۹۷ ^f	۰/۰۰۹ ^f
ZF2	۸۸/۲۲ ^{ab}	۰/۶۹۶ ^b	۰/۵۴۸ ^b	۱/۵۳ ^c	۰/۲۸۸ ^b	۵/۰۰ ^b	۰/۲۰۱ ^d	۱/۵۵۳ ^c	۰/۰۷۸ ^c
NF2	۸۶/۴۸ ^{ab}	۱/۰۶۰ ^{ab}	۰/۷۸۰ ^{ab}	۲/۰۳ ^{abc}	۰/۳۳۱ ^{ab}	۵/۴۱ ^b	۰/۲۶۹ ^b	۱/۳۷۷ ^e	۰/۰۹۱ ^b
PF2	۸۷/۴۸ ^{ab}	۰/۹۵۸ ^{ab}	۰/۶۴۴ ^{ab}	۱/۷۷ ^{bc}	۰/۳۱۳ ^b	۷/۲۲ ^{ab}	۰/۳۲۶ ^a	۱/۸۳۵ ^a	۰/۱۰۴ ^a

میانگین‌هایی که در یک ستون با حداقل یک حرف مشترک مشخص شده‌اند، با یکدیگر اختلاف معنی‌داری براساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد ندارند.

(F0: تلقیح‌نشده؛ F1: تلقیح شده با قارچ (اسپور)؛ F2: تلقیح شده با قارچ (میسلیوم)؛ C: گیاه شاهد در شرایط بدون تنش فلزات سنگین؛ Z: تیمار با فلز روی؛ N: تیمار با فلز نیکل؛ P: تیمار با فلز سرب).

نشت الکترولیت و پایداری غشاء

بر اساس نتایج به دست آمده از تجزیه واریانس داده-ها، اثر ساده قارچ در سطح ۱ درصد و اثر ساده فلزات سنگین و اثرات متقابل تیمارها بر میزان نشت یونی در سطح ۵ درصد معنی‌دار شد (جدول ۱). معنی‌دار شدن اثرات متقابل نشان می‌دهد که دو فاکتور مستقل از هم عمل نکرده‌اند. با بررسی جدول مقایسه میانگین (جدول ۲)، مشاهده شد بالاترین میزان نشت یونی مربوط به تیمار فلز سنگین روی در گیاهان تلقیح‌نشده با قارچ (۱۱/۶۲ درصد) بود. هم‌چنین نتایج نشان داد تیمار گیاهان تربچه با قارچ *P. indica* باعث کاهش نشت یونی در آن‌ها و افزایش پایداری غشاء می‌گردد؛ به طوری که تیمار با

هوایی، محتوای کلروفیل a، b می‌گردد (داس و همکاران ۲۰۱۲). مطالعات مشابهی در رابطه با تاثیر قارچ بر میزان کلروفیل در گیاهان تلقیح‌شده در شرایط تنش‌های غیر زیستی نظیر فلزات سنگین (هوی و همکاران ۲۰۱۵) گزارش شده است. به نظر می‌رسد قارچ با تاثیر بر روی پروتئین‌های درگیر در فرآیند فتوسنتز و چرخه کالوین و افزایش بیان آن‌ها، نقش موثری در حفظ و پایداری فتوسنتز در گیاهان میزبان ایفا می‌کنند (کریمی و همکاران ۲۰۱۵).

پرولین مربوط به تیمار با فلز سنگین سرب و میسلیموم قارچ (۱/۸۳۵ میکرومول بر گرم وزن تر) بود. در کل نتایج نشان داد که کمترین میزان پروتئین مربوط به تیمار بدون قارچ (۰/۰۰۷ میلی گرم بر گرم وزن تر) در شرایط طبیعی بود و بیشترین میزان پروتئین مربوط به تیمار با فلز سنگین سرب و میسلیموم قارچ (۰/۱۰۴ میلی گرم بر گرم وزن تر) بود (جدول ۲).

در موارد متعددی سازش گیاهان به تنش‌های محیطی از جمله فلزات سنگین با انباشت متابولیت‌هایی مانند ترکیبات نیتروژن‌دار (پرولین، سایر آمینواسیدها و پلی‌آمین‌ها) و کربوهیدرات‌ها (ساکارز، سایر اولیگوساکاریدها و پلی‌ساکاریدها) انجام می‌گیرد (لین و همکاران ۲۰۰۹). تجمع قندهای محلول و پرولین در شرایط تنش به تنظیم اسمولاریته سلول کمک می‌کند و موجب حفظ و نگهداری مولکول‌های زیستی و غشاهای می‌گردد (ناندا و آگراوال ۲۰۱۸). در پژوهش حاضر نیز میزان کربوهیدرات‌ها تحت تنش فلزات سنگین افزایش پیدا کرد.

تلقیح با قارچ سبب افزایش میزان کربوهیدرات در گیاهان تلقیح‌شده در شرایط مختلف رطوبتی شده است که با نتایج قبولی (۲۰۱۴) و باقری و همکاران (۲۰۱۳) مطابقت دارد. تلقیح با قارچ *P. indica* میزان کربوهیدرات‌های محلول و پرولین را افزایش داد (بالتراشات و همکاران ۲۰۰۸). تغییرات کربوهیدرات‌ها به دلیل ارتباط مستقیم آنها با فرایندهای فیزیولوژیکی نظیر فتوسنتز، انتقال و تنفس اهمیت خاصی دارند. به نظر می‌رسد قارچ با افزایش میزان کربوهیدرات‌ها در شرایط تنش به تثبیت فتوسنتز و فرایندهای متابولیسمی در این شرایط کمک شایانی می‌نماید. گزارش داده شده است که قارچ *P. indica* از طریق برخی انتقال‌دهنده‌های هگزوزی، جذب کربوهیدرات‌ها را افزایش می‌دهد. در رابطه همزیستی، کربوهیدرات‌ها بهایی است که گیاه در ازای فسفات عرضه شده توسط قارچ پرداخت می‌کند (رانی و همکاران ۲۰۱۶).

اسپور قارچ توانسته است اثرات منفی تنش فلز سنگین بر پایداری غشاء را تا حد زیادی خنثی نماید. فلزات سنگین از طریق افزایش تجمع ROS و در اثر تنش اکسیداتیو حاصل از آن، منجر به آسیب به ساختار غشاء و ساختار آن می‌شوند؛ لذا قابلیت نفوذپذیری غشاهای آسیب‌دیده مختل می‌شود. همین امر باعث نشت الکترولیت‌ها به خارج سلول می‌شود (داوی و همکاران ۲۰۰۵). قارچ می‌تواند توسط جلوگیری از تشکیل ROS تحت شرایط تنش، بطور نسبی با این پاسخ تنش مقابله کند و مانع تجزیه این لیپیدها شود یا تجزیه آنها را به تاخیر اندازد (ناندا و آگراوال ۲۰۱۸). به نظر می‌رسد قارچ با کمک به پایداری غشاء و جلوگیری از نشت یونی در شرایط تنش به بهبود فعالیت‌های فیزیولوژیکی گیاه کمک شایانی می‌نماید. تأثیر قارچ‌های میکوریزا و همچنین قارچ‌های شبه‌میکوریزا مانند *P. indica* بر متابولیسم ROSها و کمک به حفظ هموستازی ROSها در شرایط تنش توسط پژوهشگران دیگر گزارش شده است (ناث و همکاران ۲۰۱۶).

محتوای کربوهیدرات، پرولین و پروتئین نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد اثرات ساده قارچ و تنش فلزات سنگین و اثرات متقابل تیمارها بر میزان کربوهیدرات، پرولین و پروتئین برگ گیاه تربچه در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار است (جدول ۱). معنی‌دار شدن اثرات متقابل در مورد این صفات نشان می‌دهد که دو فاکتور مستقل از هم عمل نکرده‌اند. نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که کمترین میزان کربوهیدرات مربوط به تیمار بدون قارچ (۰/۰۷۵ میلی گرم بر گرم وزن تر) در شرایط بدون تنش بود و بیشترین میزان کربوهیدرات مربوط به تنش فلز سنگین سرب و تلقیح با میسلیموم قارچ (۰/۳۲۶ میلی گرم بر گرم وزن تر) بود. همچنین نتایج مقایسه میانگین نشان داد که کمترین میزان پرولین مربوط به تیمار بدون قارچ (۰/۳۳۱ میکرومول بر گرم وزن تر) در شرایط فاقد تنش بود و بیشترین میزان

پژوهشگران، تیمارهای مختلف قارچ *P. indica* بر میزان پروتئین سنبل الطیب تاثیر معنی داری داشتند؛ بطوریکه هم در شرایط تنش و هم در شرایط نرمال، میزان پروتئین در گیاهان تلقیح شده به طور معنی داری بالاتر بود (لرستانی و همکاران ۲۰۱۸). باقری و همکاران (۲۰۱۳) نیز گزارش کردند که تیمار گیاهان برنج با قارچ *P. indica* باعث افزایش میزان پروتئین کل محلول می گردد.

نتیجه گیری کلی

مطالعه حاضر با هدف ارزیابی اثرات سمیت القاء شده توسط فلزات سنگین روی، سرب و نیکل و به سازی این اثرات از طریق کلینزاسیون قارچ *P. indica* در گیاه تربچه انجام گردید. نتایج نشان داد که فلزات سنگین روی بسیاری از صفات اندازه گیری شده تاثیر منفی داشتند؛ از طرفی تلقیح گیاهان با اسپور و میسلیوم قارچ سبب بهبود برخی از صفات بررسی شده گردیده است؛ بطوریکه افزایش معنی دار در سطح پرولین، کربوهیدرات و پروتئین در گیاهان تلقیح شده با قارچ *P. indica* مشاهده شد. علاوه بر بهبود پارامترهای حفاظتی، قارچ میزان نشت یونی ناشی از پراکسیداسیون لیپیدها را نیز پائین آورد. همچنین نتایج مقایسه اسپور و میسلیوم قارچ نشان داد که هر دو مایه تلقیح (اینوکولوم) نتایج مثبتی بر صفات اندازه گیری شده دارند، بطوریکه میزان برخی صفات مانند رنگیزه های فتوسنتزی در گیاهان تلقیح شده با اسپور و برخی دیگر از صفات مانند کربوهیدرات کل محلول و پرولین در گیاهان تلقیح شده با میسلیوم قارچ بالاتر بود؛ اما با توجه به سهولت بیشتر تهیه میسلیوم نسبت به اسپور، استفاده از آن در مطالعات آتی توصیه می گردد. در مجموع نتایج بدست آمده با توجه به افزایش آلودگی خاک های زراعی و غیر زراعی به فلزات سنگین حائز اهمیت است و نشان می دهد در آینده استفاده از اندوفیت هایی نظیر *P. indica* می تواند نقش مهمی در مقابله با اثرات محدودکننده و مضر فلزات سنگین بازی کند؛ البته نیاز است که با

اسید آمینه پرولین فراوان ترین متابولیتی است که در بسیاری از گونه های گیاهی تحت تنش های غیر زیستی مانند فلزات سنگین تجمع می یابد (زابادوس و ساوور ۲۰۱۰). افزایش پرولین نوعی مکانیسم دفاعی است که باعث سازش بیشتر سلول با شرایط تنش و حفاظت از آنزیم های سیتوزول و ساختارهای سلولی می شود (وانگ و همکاران ۲۰۰۸). در پژوهش حاضر نیز گیاه تربچه به منظور دفاع در برابر تنش حاصل از فلز سنگین سرب، میزان پرولین آزاد را افزایش داد. به نظر می رسد افزایش میزان پرولین از طریق تجزیه پروتئین ها در برگ های بالغ و یا سنتز پرولین در کلروپلاست ها باشد (کرس و هاره ۱۹۹۷).

تاثیر قارچ بر محتوای پرولین گیاهان تلقیح شده توسط پژوهشگران مختلف گزارش شده است (قبولی ۲۰۱۴ و شهابیوند و همکاران ۲۰۱۷). گزارش شده است که قارچ *P. indica* از راه های مختلف نظیر افزایش سطوح آنزیم های آنتی اکسیدانت ها، اسمولیت ها (به خصوص پرولین) و حفظ رنگیزه های کلروفیلی موجب افزایش تحمل به تنش در گیاه میزبان می گردد (زارع و همکاران ۲۰۱۲).

گیاه با تجمع پرولین، افزایش ذخیره سازی کربوهیدرات ها و پروتئین سازی می تواند در برابر تنش مقاومت کند (هونگ ۲۰۰۰). کاهش اولیه محتوای پروتئین می تواند به علت کاهش در سنتز بعضی پروتئین ها و یا احتمالاً افزایش فعالیت آنزیم های پروتئولیتیک باشد (پاندا و خان ۲۰۰۳). مشاهده شده است که تحت شرایط تنش، گونه های اکسیژن فعال (ROSها) می توانند با صدمه زدن به پروتئوم گیاه باعث نابودی شمار زیادی از پروتئین های گیاه شوند (تورگات و همکاران ۲۰۰۴). همچنین فلزات سنگین با اختلال در فرآیند تثبیت نیتروژن از طریق مهار فعالیت های آنزیمی مانند گلوتامین سینتاز، گلوتامات سینتاز و نیترات ردوکتاز و فرآیند احیاء نیترات سبب کاهش تولید پروتئین شده و رشد را متوقف می کنند (پاندا و خان ۲۰۰۳). بر اساس نتایج

سپاسگزاری

پژوهش‌های بیشتر و بهینه‌سازی کلنیزاسیون ریشه، این

بدينوسيله از حمايت‌هاي مالي دانشگاه ملایر جهت

امکان را عملی نمود.

انجام این پژوهش قدردانی می‌گردد.

منابع مورد استفاده

- Akram NA, Noreen S, Noreen T and Ashraf M. 2015. Exogenous application of trehalose alters growth, physiology and nutrient composition in radish (*Raphanus sativus* L.) plants under water-deficit conditions. *Brazilian Journal of Botany*, 38: 431-439.
- Arnon DI. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in beta vulgaris. *Plant Physiology*, 24: 1-15.
- Bagheri A, Saadatmand S, Niknam V, Nejadstari T and Babaeizad V. 2013. Effect of endophytic fungus, *Piriformospora indica* on growth and activity of antioxidant enzymes of rice (*Oryza sativa* L.) under salinity stress. *International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research*, 1(11): 1337-1350.
- Bajaj R, Hu W, Huang Y, Chen S, Prasad R, Varma A and Bushley K.E. 2015. The beneficial root endophyte *Piriformospora indica* reduces egg density of the soybean cyst nematode. *Biological Control*, 90:193-199.
- Baltruschat H, Fodor J, Harrach BD, Niemczyk E, Barna B and Gullner G. 2008. Salt tolerance of barley induced by the root endophyte *Piriformospora indica* is associated with a strong increase in antioxidants. *New Phytologist*, 180: 501-510.
- Barrs HD and Weatherley PE. 1962. A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficits in leaves. *Australian journal of Biological Sciences*, 15 (3): 413-428.
- Basak H, Demir K, Kasim R and Okay FY. 2011. The effect of endo-mycorrhiza (VAM) treatment on growth of tomato seedling grown under saline conditions. *African Journal of Agriculture Research*, 6(11): 2532-2538.
- Bates LS, Walderd RP and Teare ID. 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant Soil*, 39: 205-208.
- Bradford MM. 1975. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry Quantities*, 72: 248-254.
- Dabiri M. 2000. 3rd edition. *Environmental Pollution (water, soil and air)*. Etehad Publication. (In Persian).
- Dabral S, Varma A, Choudhary DK, Bahuguna RN and Nath M. 2019. Biopriming with *Piriformospora indica* ameliorates cadmium stress in rice by lowering oxidative stress and cell death in root cells. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 186: 109741.
- Das A, Kamal S, Shakil NA, Sherameti I, Oelmüller R, Dua M, Tuteja N, Johri AK and Varma A. 2012. The root endophyte fungus *Piriformospora indica* leads to early flowering, higher biomass and altered secondary metabolites of the medicinal plant, *Coleus forskohlii*. *Plant Signaling and Behavior*, 7(1): 103-112.
- Davey MWE, Stals B, Panis J, Keulemans R and Swennen L. 2005. High Throughput determination of malondialdehyde in plant tissues. *Analytical Biochemistry*, 347: 201-207.
- Farkhondeh R, Nabizadeh E and Jalilnezhad N. 2012. Effect of salinity stress on proline content, membrane stability and water relations in two sugarbeet cultivars. *International Journal of Agriculture Research*, 2(5): 385-392.
- Ghahooli M, Shahriary F, Sephehrin M, Marashi H and Hosseini Salekdeh G. 2011. An evaluation of the impact of the endophyte fungus *Piriformospora indica* on some traits of barley (*Hordeum vulgare* L.) in drought stress. *Agroecology*, 3(3): 328-336. (In Persian).

- Ghabooli M, Khatabi B, Ahmadi FS, Sepehri M, Mirzaei M, Amirkhani A and Salekdeh G.H. 2013. Proteomics study reveals the molecular mechanisms underlying water stress tolerance induced by *Piriformospora indica* in barley. *Journal of Proteomics*, 94: 289-301.
- Ghabooli M. 2014. Effect of *Piriformospora indica* inoculation on some physiological traits of barley (*Hordeum vulgare*) under salt stress. *Chemistry of Natural Compounds*, 50(6): 1082-1087.
- Ghabooli M, Lorestani S, Movahedi Z and Karimi R. 2018. An evaluation of fungus *Piriformospora indica* effects on some morphophysiological traits of valerine under drought stress. *Journal of Iranian Plant Ecophysiological Research*, 13(50): 41-52. (In Persian).
- Gill SS, Gill R, Trivedi DK, Anjum NA, Sharma KK, Ansari MW, Ansari AA, Johri AK, Prasad R, Pereira E and Varma A. 2016. *Piriformospora indica*: potential and significance in plant stress tolerance. *Frontiers in Microbiology*, 7: 332.
- Hare PD and Cress WA. 1997. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regulation*, 21(2):79-102.
- Hong Z, Lakkineni K, Zhang Z and Verma DPS. 2000. Removal of feedback inhibition of $\Delta 1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. *Plant Physiology*, 122(4):1129-1136.
- Hildebrandt U, Regvar M and Bothe H. 2007. Arbuscular mycorrhiza and heavy metal tolerance. *Phytochemistry*, 68: 139-146.
- Hui F, Liu J, Gao Q and Lou B. 2015. *Piriformospora indica* confers cadmium tolerance in *Nicotiana tabacum*. *Journal of Environmental Sciences*, 37: 184-191.
- Irigoyen JJ, Emerich DW and Sanchez-Diaz M. 1992. Alfalfa leaf senescence induced by drought stress: photosynthesis, hydrogen peroxide metabolism, lipid peroxidation and ethylene evaluation. *Physiologia Plantarum*, 84: 67-72.
- Karimi F, Sepehri M, Afuni M and Hajabbasi M. 2015. Effect of Endophytic Fungus, *Piriformospora Indica*, on Barley Resistance to Lead. *Isfahan University of Technology*, 19 (71): 311-321 (in Persian).
- Kazemalilo S and Rasolisadaghiani M. 2013. Effect of soil cadmium pollution on some physiological parameters of *Hyoscyamus* plant in presence/absence of growth-promoting microorganisms. *Water and Soil Science*, 22(4): 17-30. (In Persian)
- Khalid M, Kayani SI and Tang K. 2020. The ameliorative effects of exogenous inoculation of *Piriformospora indica* on molecular, biochemical and physiological parameters of *Artemisia annua* L. under arsenic stress condition. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 206:111202.
- Latef AAHA, Hashem A, Rasool S, AbdAllah EF, Alqarawi AA, Egamberdieva D, Jan S, Anjum NA and Ahmad P. 2016. Arbuscular mycorrhizal symbiosis and abiotic stress in plants: a review. *Journal of plant Biology*, 59: 407-426.
- Li L, Zhu P, Wang X and Zhang Z. 2020. Phytoremediation effect of *Medicago sativa* colonized by *Piriformospora indica* in the phenanthrene and cadmium co-contaminated soil. *BMC biotechnology*, 20: 1-14.
- Line CJ, Liu L, Liu T, Zhu L, Sheng D and Wang D. 2009. Soil amendment application frequency contributes to phytoextraction of lead by sunflower at different nutrient levels. *Environmental and Experimental Botany*, 65: 410-416.
- Nanda R and Agrawal V. 2018. *Piriformospora indica*, an excellent system for heavy metal sequestration and amelioration of oxidative stress and DNA damage in *Cassia angustifolia* Vahl under copper stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 156: 409-419.
- Nath M, Bhatt D, Prasad R, Gill SS, Anjum NA and Tuteja N. 2016. Reactive oxygen species generation-scavenging and signaling during plant-arbuscular mycorrhizal and *Piriformospora indica* interaction under stress condition. *Frontiers in Plant Science*, 7: 1-7.

- Omidbeigi R. 2009. Production and processing of medicinal plants 5th edition. Publication of Astan Quds Razavi. (In Persian).
- Panda S and Khan M. 2003. Antioxidant efficiency in rice (*Oryza sativa* L.) leaves under heavy metal toxicity. *Journal of Plant Biology*, 30 (1): 23-30.
- Rani M, Raj S, Dayaman V, Kumar M, Dua M and Johri AK. 2016. Functional characterization of a hexose transporter from root endophyte *Piriformospora indica*. *Frontiers in Microbiology*, 7:1083.
- Sartipnia N, Khavari-Nejad RA, Babaeizad V, Nejad-Sattari T and Najafi F. 2013. Effect of *Piriformospora indica* on antioxidant enzymes activity of tomato (*Lycopersicon esculentum* mill) under lead stress. *International Journal of Biosciences*, 3: 55–64.
- Sarwar N, Imran M, Shaheen MR, Ishaque W, Asif Kamran MA, Matloob A, Rehim A and Hussain S. 2017. Phytoremediation strategies for soils contaminated with heavy metals: modifications and future perspectives. *Chemosphere*, 171: 710-721.
- Shahabivand S, Parvaneh A and Aliloo AA. 2017. Root endophytic fungus *Piriformospora indica* affected growth, cadmium partitioning and chlorophyll fluorescence of sunflower under cadmium toxicity. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 145: 496-502.
- Shanker AK, Cervantes C, Loza-Tavera H and Avudainayagam S. 2005. Chromium toxicity in plants. *Environment international*, 31(5): 739-753.
- Sharma P and Dubey RS. 2005. Lead toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17: 35–52.
- Singleton VL and Rossi A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagent. *American journal of Enology and Viticulture*, 16(3): 144-158.
- Szabados L and Savoure A. 2010. Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science*, 15(2): 89-97.
- Thounaojam TC, Panda P, Choudhury S, Patra HK and Panda S. K. 2014. Zinc ameliorates copper-induced oxidative stress in developing rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Protoplasma*, 251: 61–69.
- Turgut C, Pepe MK and Cutright TJ. 2004. The effect of EDTA and citric acid on phytoremediation of Cd, Cr, and Ni from soil using *Helianthus annuus*. *Environmental Pollution*, 131 (1): 147-154.
- Valentovic P, Luxova M, Kolarovic L and Gasparikova O. 2006. Effect of osmotic stress on compatible solutes content, membrane stability and water relations in two maize cultivars. *Plant Soil and Environment*, 52: 186-191.
- Vassilev A and Yordanov I. 1997. Reductive analysis of factors limiting growth of cadmium –treated plants: A Review. *Journal of Plant Physiology*, 23(3-4): 114-133.
- Waller W, Achatz B, Baltruschat H, Fodor J, Becker K, Fischer M, Heier T, Huckelhoven R, Neumann C, Wettstein D, Franken P and Kogel KH. 2005. The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt stress tolerance, disease resistance and higher yield. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102: 13386-13391.
- Wang L, Zhou Q, Ding L and Sun Y. 2008. Effect of cadmium toxicity on nitrogen metabolism in leaves of *Solanum nigrum* L. *Journal of Hazardous Materials*, 154(1-3): 818-825.
- Zarea MJ, Hajinia S, Karimi N, Mohammadi Goltapeh E, Rejali F and Varma A. 2012. Effect of *Piriformospora indica* and *Azospirillum* strains from saline or non-saline soil on mitigation of the effects of NaCl. *Soil Biology and Biochemistry*, 45: 139-146.