تاثیر همزیستی توأم قارچ میکوریزا آربوسکولار و باکتری ریزوبیوم بر میزان گلیکوزیدهای استویول در گیاه دارویی استویا

مهستی فرید[a]، حمید مظفری[*b]،ابراهیم محمدی گل تپه[c]

[a] دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه زراعت، واحد شهرقدس، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
[b] استادیار گروه زراعت، واحد شهرقدس، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
[c] استاد گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۶/۳/۲۸ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۷/۱/۷

چکیده

مقدمه: گیاه استویا به عنوان منبع جدید مواد شیرین کننده عاری از قند ساکارز است و می‌تواند جایگزین مناسبی برای منابع قندی مثل ساکارز باشد. این امر برای حفظ سلامتی افراد و همچنین رفع محدودیت استفاده از قند توسط بیماران دیابتی حائز اهمیت فراوان است.

مواد و روش‌ها: در این آزمایش تأثیر میکرو ارگانیسم‌های قارچ میکوریزا در ۳ سطح و باکتری ریزوبیوم در ۵ سطح به صورت آزمایش فاکتوریل با طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس بر میزان قندهای استویوزید و ریبائودیوزید A گیاه استویا بررسی شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که فاکتورهای قارچ میکوریزا، باکتری ریزوبیوم و اثر متقابل آنها تأثیر معنی‌داری بر روی صفات مورد بررسی داشت. بیشترین درصد قندهای استویوزید و ریبائودیوزید A به ترتیب در ترکیب‌های تیماری b_0f_{25} (بدون استفاده از باکتری و ۲۵ درصد قارچ آربوسکولار) و $b_{100}f_{50}$ (۱۰۰ سی سی باکتری و ۵۰ درصد قارچ آربوسکولار) حاصل شد.

نتیجه‌گیری: همزیستی قارچ میکوریزا و باکتری ریزوبیوم با گیاه استویا می‌تواند در بهبود عملکرد اقتصادی و تولید قند موثر واقع شود.

واژه های کلیدی: *استویا، استویوزید، باکتری ریزوبیوم، ریبائودیوزید A، قارچ میکوریزا*

[*] نویسنده مسئول مکاتبات email: Mozafarihamid@yahoo.com

مقدمه

گیاه استویا[1] نخستین بار در دره ریو ماندی[2] در شمال شرقی کشور پاراگوئه شناخته شد. این گیاه شامل ۲۴۰ گونه گیاهان بومی آمریکای جنوبی، آمریکای مرکزی و مکزیک و گونه‌هایی استکه در بخش‌های شمالی مانند دیو مکزیکو، آریزونا و تکزاس یافت شده‌اند (Koyama *et al*., 2003). برگ‌های استویا به دلیل شیرین بودن نام‌های مختلفی از جمله برگ قندی، برگ عسلی، برگ شیرین، علف شیرین، برگ آبنباتی و برگ شیرین پاراگوئه داشته است و به جهت شیرین بودن برگ‌ها به‌طور وسیعی کاشته می‌شود (Carakostas *et al*., 2008). استویا گیاهی چندساله از تیره مرکبان است که به طور طبیعی بدون کالری و دارای گلیکوزیدهای استویول در برگ‌ها می‌باشد که ۳۰۰ الی ۴۰۰ برابر شیرین‌تر از قند می‌باشد و در دنیا به عنوان شیرین کننده طبیعی جایگزین ساکارز شناخته شده است (Chalapathi *et al*., 1997).

مهمترین کشورهای تولید کننده استویا: ژاپن، چین، تایوان، کره، برزیل، مالزیا و پاراگوئه هستند. مهمترین اهمیت اقتصادی آن به عنوان یک ماده شیرین کننده طبیعی در جایگزینی شیرین کننده های مصنوعی (آسپارتام و سدیم ساخارین) است به طوری که در کشورهای ژاپن، کره و چین، پاراگوئه و بسیاری کشورهای دیگر در محصولات غذایی و در آمریکا و کانادا در تهیه مواد خوراکی رژیمی مجاز است. در حال حاضر در ژاپن مصرف سالیانه قند استویوزید[3] ۵۰ تن به ارزش ۲۲۰ میلیون دلار کانادا است (Zare Hoseini *et al*., 2015).

تاکنون ۸ نوع گلیکوزید دترپنوئید[4] که به گلیکوزیدهای استویول[5] هم معروف هستند، شناخته شده‌اند که شامل استویوزید، ریبائودیوزید[6] A تا F و دالکوزید[7] A می‌باشد و همچنان شناخت ترکیبات جدید ادامه دارد (Venkata Sai *et al*., 2011). از این میان چهار نوع گلیکوزید استویول اصلی شامل استویوزید، ریبائودیوزید A، ریبائودیوزید C و دالکوزید A در گیاه استویا وجود دارد. از خواص، ریبائودیوزید A می‌توان به خاصیت ضد فشار خون، ضد تومور، ضد اسهال، ادرارآور و دارای قابلیت ایمنی‌سازی اشاره کرد (Robert *et al*., 2008).

دیابت یا مرض قند یک بیماری بغرنج و دارای انواع مختلفی است که متابولیسم کربوهیدرات‌ها، چربی‌ها و پروتئین‌ها را بر هم زده، در روند آن‌ها اختلال ایجاد می‌کند و نتیجه آن کمبود و یا فقدان ترشح انسولین و یا کاهش حساسیت بافت به انسولین است. امروزه مدیریت دیابت یک مساله جهانی است و هنوز درمان موفقی برای آن پیدا نشده است (Li *et al*., 2004). به‌طوری که عوامل کاهش‌دهنده جدید قند خون دارای اثرات جانبی و ناخواسته بوده و بنابراین درمان جایگزین و استفاده از گیاهان بومی مختلف و فرمول‌های گیاهی مورد توجه قرار گرفته‌اند (Satyanarayana *et al*., 2007). گلیکوزیدهای شیرین موجود در برگ‌های استویا دارای خواص مثبت دارویی از جمله درمان یا بهبود دیابت نوع ۲، تصلب شریان و فشار خون بالا می‌باشد (Geuns, 2010). به همین جهت برگ‌های این گیاه دارای اهمیت اقتصادی بوده و لازم است که مطالعات به‌زراعی بیشتری بر روی آن انجام گیرد.

در سال ۱۹۵۷ نشان داده شد که همزیستی گیاه با قارچ میکوریزا دارای اثر افزاینده بر جذب عناصر غذایی و رشد گیاه است (Smith *et al*., 1997). از آن زمان تاکنون گزارش‌های بسیاری در مورد افزایش رشد گستره وسیعی از واریته‌ها و گونه‌های مختلف گیاهان مانند گیاهان زراعی (Fagardo *et al*., 1982) و درختان میوه (Calvet *et al*., 2001) دارای توان برقراری رابطه همزیستی با قارچ‌های میکوریزا ارائه شده است. مکانیسم‌های مختلفی در ارتباط با تاثیر میکوریزا بر رشد رویشی گیاهان ذکر شده است. یکی از آنها تاثیر میکوریزا بر جذب عناصر غذایی از جمله نیتروژن، فسفر و پتاسیم خاک است (Abdelhanej & Abdel- Monsif, 2006).

Gupta و همکاران (۲۰۰۲) با بررسی تاثیر همزیستی قارچ *Glomus fasciculatum* با سه رقم نعناع (*Mentha arvensis*) شامل Kalka، Shivalik و Gomti نتیجه گرفتند که کلنیزاسیون ریشه ارقامی که با قارچ میکوریزا تیمار شده بودند به‌طور معنی‌داری افزایش پیدا کرده و طول گیاهان بلندتر می‌شود. آزمایش Ratti و همکاران (۲۰۰۱) بر روی علف لیمو (*Cymbopogon martini* var. motia) نیز موید این مطلب است.

[1] *Stevia rebaudiana* Bertoni
[2] Riomonday
[3] Stevioside
[4] Diterpenoid Glycosides
[5] Stevioi Glycosides
[6] Rebaudiosides
[7] Dulcoside

میکروارگانیسم دیگری که توانایی همزیستی با گیاهان و در نتیجه استفاده در کشاورزی را دارد باکتری با نام عمولی ریزوبیا از خانواده باکتری‌های تثبیت کننده نیتروژن است که قادر به همزیستی خوبی با لگوم‌ها هستند. از جمله فعالیت‌های مفید این باکتری‌ها می‌توان به تولید هورمون‌های محرک رشد گیاه به ویژه اکسین‌ها و ترکیبات مشابه آن توسط سویه‌های مختلف ریزوبیومی اشاره داشت (Calderon *et al*., 2004). ریزوبیوم‌ها از طریق آلوده‌سازی تارهای کشنده یا جراحات اپیدرمی، وارد سیستم ریشه‌ای گیاه شده و سلول‌های کورتکس ریشه را تحریک به تقسیم شدن و ایجاد گره می‌نمایند. در گره‌های ریشه‌ای، ریزوبیوم‌ها نیتروژن اتمسفری (N_2) را که برای گیاه قابل استفاده نبوده به فرم قابل استفاده گیاه (NH_4^+) تبدیل می‌نمایند که این فرآیند تثبیت زیستی نیتروژن نام دارد (Asadi Rahmani *et al*., 2007). با توجه به اهمیت گیاه استویا و اثرات مطلوب میکرواورگانیسم‌ها در گیاهان، این تحقیق به منظور بررسی تأثیر همزیستی توأم قارچ میکوریزا آربوسکولار و باکتری ریزوبیوم بر خصوصیات میزان گلیکوزیدهای استویول در گیاه دارویی استویا به منظور راه کاری جهت افزایش میزان عملکرد و قند و کاهش استفاده از کودهای شیمیایی به لحاظ مخاطرات زیست محیطی و حفظ سلامت مصرف کنندگان انجام شده است.

مواد و روش‌ها

- مواد گیاهی و میکرواورگانیسم‌ها

گیاه مورد استفاده در این آزمایش استویا (*Stevia rebaudiana* B.) بود. میکرواورگانیسم‌ها شامل قارچ میکوریزا *Glomus mosseae* و باکتری ریزوبیوم بودند. قارچ مذکور از کلینیک گیاه‌شناسی ارگانیک همدان تهیه شد که دارای مشخصات عمومی ۱۲۰ اسپور در هر سانتی‌متر ریشه، ۸۰٪ میزان همزیستی با گیاه و طول ریسه ۶ متر در هر گرم خاک بود. همچنین باکتری ریزوبیوم تحت عنوان کود بیولوژیک ریزوبین سوپر پلاس حاوی باکتری مزوریزوبیوم از شرکت فن‌آوری زیستی مهر آسیا تهیه گردید.

- شرایط رشد گیاهان

این تحقیق در سال ۱۳۹۴ در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس واقع در استان تهران با متوسط دمای گلخانه ۳۰-۲۵ درجه سانتی‌گراد در روز، ۱۸ درجه سانتی‌گراد در شب و متوسط رطوبت نسبی هوا ۶۰-۵۰ درصد اجراء گردید. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار اجرا شد. فاکتورهای آزمایش شامل: باکتری ریزوبیوم (B) در پنج سطح ۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ سی سی و فاکتور دوم قارچ میکوریزای آربوسکولار (F) در سه سطح ۰، ۲۵ و ۵۰ درصد بود. تیمارهای آزمایش شامل ۱۵ ترکیب تیماری به شرح زیر بود:

۱: باکتری ریزوبیوم ۰ سی سی – قارچ میکوریزای آربوسکولار ۰ درصد (تیمار شاهد؛ b_0f_0)

۲: باکتری ریزوبیوم ۰ سی سی – قارچ میکوریزای آربوسکولار ۲۵ درصد (b_0f_{25})

۳: باکتری ریزوبیوم ۰ سی سی – قارچ میکوریزای آربوسکولار ۵۰ درصد (b_0f_{50})

۴: باکتری ریزوبیوم ۲۵ سی سی – قارچ میکوریزای آربوسکولار ۰ درصد ($b_{25}f_0$)

۵: باکتری ریزوبیوم ۲۵ سی سی – قارچ میکوریزای آربوسکولار ۲۵ درصد ($b_{25}f_{25}$)

۶: باکتری ریزوبیوم ۲۵ سی سی – قارچ میکوریزای آربوسکولار ۵۰ درصد ($b_{25}f_{50}$)

۷: باکتری ریزوبیوم ۵۰ سی سی – قارچ میکوریزای آربوسکولار ۰ درصد ($b_{50}f_0$)

۸: باکتری ریزوبیوم ۵۰ سی سی – قارچ میکوریزای آربوسکولار ۲۵ درصد ($b_{50}f_{25}$)

۹: باکتری ریزوبیوم ۵۰ سی سی – قارچ میکوریزای آربوسکولار ۵۰ درصد ($b_{50}f_{50}$)

۱۰: باکتری ریزوبیوم ۷۵ سی سی – قارچ میکوریزای آربوسکولار ۰ درصد ($b_{75}f_0$)

۱۱: باکتری ریزوبیوم ۷۵ سی سی – قارچ میکوریزای آربوسکولار ۲۵ درصد ($b_{75}f_{25}$)

۱۲: باکتری ریزوبیوم ۷۵ سی سی – قارچ میکوریزای آربوسکولار ۵۰ درصد ($b_{75}f_{50}$)

۱۳: باکتری ریزوبیوم ۱۰۰ سی سی – قارچ میکوریزای آربوسکولار ۰ درصد ($b_{100}f_0$)

۱۴: باکتری ریزوبیوم ۱۰۰ سی سی – قارچ میکوریزای آربوسکولار ۲۵ درصد ($b_{100}f_{25}$)

۱۵: باکتری ریزوبیوم ۱۰۰ سی سی – قارچ میکوریزای آربوسکولار ۵۰ درصد ($b_{100}f_{50}$)

خاک مورد استفاده در گلدان‌ها از منطقه سبزیکاری منطقه چهار باغ کرج تهیه شد و ضد عفونی خاک با فرمالین ۷ درصد به مدت ۴۸ ساعت انجام شد. خاک ضد عفونی شده با کود دامی کاملاً پوسیده به نسبت ۱۵ درصد وزنی مخلوط گردیده و در گلدان‌های با ظرفیت ۳/۵ لیتر ریخته شد. در نهایت نشاءهای سن ۲۰ روزه و ارتفاع تقریبی ۱۳–۱۵ سانتی‌متر به گلدان‌ها منتقل گردید و ترکیب‌های تیماری مذکور اعمال شد.

- اندازه‌گیری صفات

- اندازه گیری گلیکوزیدهای استویول

جهت اندازه‌گیری میزان گلیکوزیدهای استویول نمونه‌های برگی از تمام تیمارها و واحدهای آزمایشی تهیه گردید. این کار در دو مرحله انجام گردید، مرحله اول، دوماه بعد از تلقیح گیاهان و درمرحله بلوغ گیاه زمانی که تخمین زده می‌شود بهترین زمان تجمع گلیکوزیدهای استویول در برگ‌های گیاه است (قبل از گلدهی) و مرحله دوم سه ماه بعد از تلقیح گیاهان و بعد از اینکه تقریبا گیاهان به گلدهی رسیدند (۹۰ درصد).

اندازه‌گیری گلیکوزیدهای استویول براساس گزارش Geuns و همکاران (۲۰۱۰)، با کمی تغییر به صورت زیر انجام شد:

- استخراج و آماده سازی نمونه:

برگ‌های استویا در دمای ۶۰ درجه و به مدت ۱۵ ساعت در آون و تحت وکیوم خشک و سپس با استفاده از هاون پودر و مقدار ۰/۱ گرم از پودر آن برای استخراج گلیکوزیدها استفاده گردید. مقدار ۳ میلی لیتر آب مقطر به نمونه پودر شده اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در ترمو میکسر با دمای ۸۵ درجه قرار داده شد. سپس به مدت ۳ دقیقه با دور ۶۰۰۰ سانتریفوژ و عصاره آن ذخیره گردید. این فرآیند سه بار تکرار و عصاره‌ها ادغام و سپس مجموعه عصاره‌ها به مدت ۵ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰ سانتریفوژ و عصاره جدید جداسازی شدند. این کار مجدداً تکرار و با استفاده از آب مقطر به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانیده شد. برای جداسازی مواد جامد و ناخالصی‌های عصاره، مقدار ۳ میلی‌لیتر از عصاره از فیلتر (0.45µm) عبور داده و در ظرف جدید نگهداری گردید. در مرحله بعد و به منظور خالص‌سازی گلیکوزیدهای استویول، مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره فیلتر شده از کارتریج C_{18}، که قبلا با متانول و آب بهینه شده بود، عبور داده شد. سپس با استفاده از استونیتریل ۲۰ درصد، مواد زائد و رنگیزه‌ها شسته و سر انجام با استفاده از استونیتریل ۸۰ درصد گلیکوزیدهای استویول از کارتریج جدا و در تیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری نگهداری تا کروماتوگرافی شود.

- کروماتوگرافی مایع با فشار بالا (HPLC):

برای کروماتوگرافی (HPLC) از دو ستون C_{18} بصورت سری و دتکتور UV-Vis در طول موج ۲۰۲ استفاده گردید. مخلوط ۵۰ تا ۸۰ درصد استوینول وآب به عنوان حلال و با سرعت جریان ۰/۵ میلی‌لیتر در دقیقه مورد استفاده قرار گرفت. در این روش ۲ نوع گلیکوزیدهای استویول (استویوزید و ریبودیوزید A) اندازه‌گیری شدند. سطح زیر پیک مربوط به هر گلیکوزید استویول توسط نرم‌افزار Chromstar 7.0 انتگرال‌گیری شده و با استفاده از رابطه غلظت استاندارد (استویوزاید) با سطح زیر پیک کروماتوگرام، غلظت گلیکوزید های استویول محاسبه و به صورت در صد وزن خشک برگ گزارش گردیدند.

- تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS (Ver. 22) انجام گرفت. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن و در سطح احتمال ۵ درصد صورت گرفت.

یافته‌ها

نتایج آزمون نرمال بودن خطاهای آزمایشی برای همه صفات مورد بررسی نشان داد که توزیع خطاها از توزیع نرمال تبعیت نموده و فرض‌های لازم برای انجام تجزیه واریانس برقرار است.

- محتوای استویوزید

طبق نتایج ارائه شده در جدول ۱ مشخص شد که فاکتورهای باکتری ریزوبیوم، قارچ میکوریزا و اثر متقابل

باکتری ریزوبیوم × قارچ میکوریزا تاثیر معنی‌داری ($P \leq ۰/۰۱$) بر روی درصد قند استویوزید داشت. نتایج مقایسه میانگین ترکیب‌های تیماری اثر متقابل (جدول ۲) نشان داد که بیشترین درصد قند استویوزید در اثر ترکیب تیماری b_0f_{25} با میانگین ۸/۳ درصد به دست آمد از طرفی کمترین درصد قند استویوزید در اثر ترکیب تیماری b_0f_{50} حاصل شد (جدول ۲). همچنین اثر ساده قارچ میکوریزا و باکتری ریزوبیوم به تنهایی بر محتوای استویوزید در شکل‌های ۱ و ۲ نشان داده شده است که بیشترین مقدار در سطح قارچ میکوریزای f_{25} و باکتری b_0 به دست آمده است.

- محتوای ریبائودیوزید A

مشابه با محتوای قند استویوزید، فاکتورهای باکتری ریزوبیوم، قارچ میکوریزا و اثر متقابل باکتری ریزوبیوم × قارچ میکوریزا تاثیر معنی‌داری ($P \leq ۰/۰۱$) بر روی درصد قند ریبائودیوزید A داشت (جدول ۱). همچنین نتایج مقایسه میانگین ترکیب‌های تیماری اثر متقابل (جدول ۲) نشان داد که بیشترین درصد قند ریبائودیوزید A در ترکیب تیماری $b_{100}f_{50}$ حاصل شد. کمترین میزان این قند نیز در ترکیب‌های تیماری b_0f_{50} و $b_{100}f_0$ هر دو با میانگین ۰/۱ درصد رخ داد. همچنین اثر ساده قارچ میکوریزا و باکتری ریزوبیوم به تنهایی بر محتوای ریبائودیوزید A در شکل‌های ۱ و ۲ نشان داده شده است که بیشترین مقدار در سطح قارچ میکوریزای f_{50} و باکتری b_{75} به دست آمده است.

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر ساده فاکتورهای قارچ میکوریزای آربوسکولار و باکتری ریزوبیوم و اثر توأم آنها بر محتوای قندهای استویوزید و ریبائودیوزید A در گیاه استویا

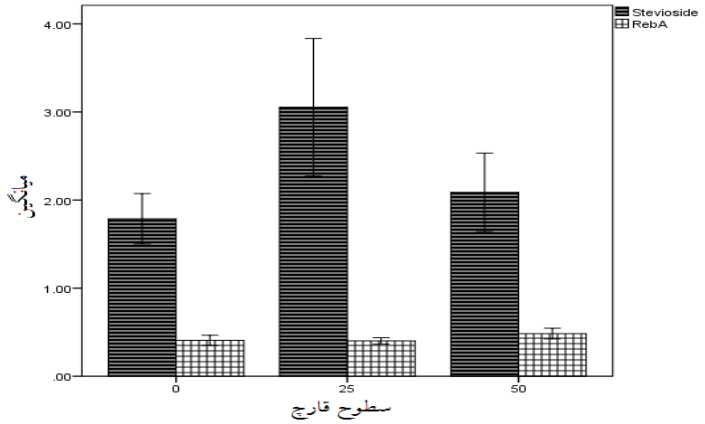
منابع تغییرات	درجه آزادی	محتوای استویوزید	محتوای ریبائودیوزید A
تکرار	۲	۰/۰۸۴ *	۰/۰۰۱ ns
قارچ	۲	۶/۵۷**	۰/۰۳**
باکتری	۴	۵/۹۶**	۰/۱۳**
قارچ × باکتری	۸	۲۰/۲۴**	۰/۱۵**
خطا	۲۸	۰/۰۲۳	۰/۰۰۲

ns، * و ** به ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد و ۱ درصد هستند.

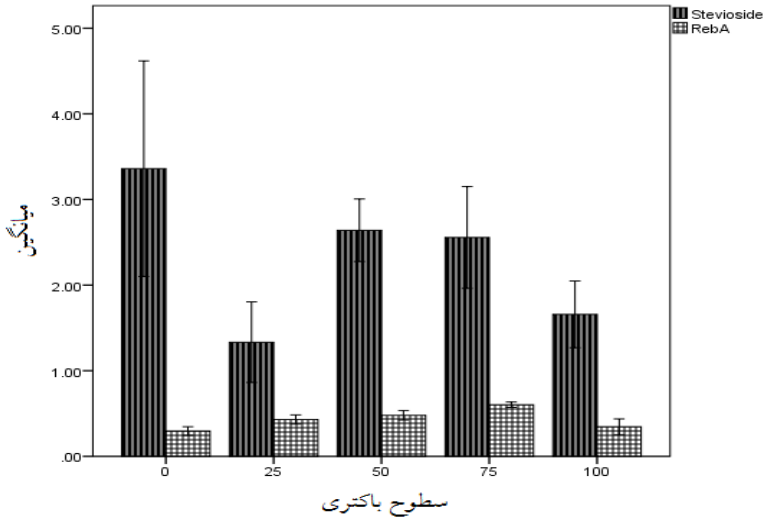
جدول ۲- مقایسه میانگین ترکیب‌های تیماری اثرمتقابل فاکتورهای سطوح قارچ میکوریزا و باکتری ریزوبیوم بر محتوای قندهای استویوزید و ریبائودیوزید A

ترکیب تیماری		محتوای استویوزید (درصد)	محتوای ریبائودیوزید A (درصد)
باکتری	قارچ		
	۰	۱/۷ H	۰/۳۸ E
۰	۲۵	۸/۳ A	۰/۴۰ E
	۵۰	۰/۱ L	۰/۱۰ G
	۰	۳/۲ D	۰/۶۳ ABC
۲۵	۲۵	۰/۴ JK	۰/۲۹ F
	۵۰	۰/۴ J	۰/۳۷ E
	۰	۱/۳ I	۰/۲۶ F
۵۰	۲۵	۳/۸ C	۰/۶۰ BC
	۵۰	۲/۸ E	۰/۵۸ C
	۰	۲/۶ EF	۰/۶۶ AB
۷۵	۲۵	۰/۵ J	۰/۴۸ D
	۵۰	۴/۶ B	۰/۶۷ AB
	۰	۰/۱ KL	۰/۱۰ G
۱۰۰	۲۵	۲/۳ G	۰/۲۴ F
	۵۰	۲/۵ FG	۰/۷۰ A

میانگین‌های دارای حروف مشترک اختلاف آماری معنی‌داری ندارند.



شکل ۱- نمایش تاثیر سطوح مختلف قارچ میکوریزا بر درصد قندهای استویوزید و ریبائودیوزیدA



شکل ۲- نمایش تاثیر سطوح مختلف باکتری ریزوبیوم بر درصد قندهای استویوزید و ریبائودیوزید A

- همبستگی بین صفات

با توجه به اینکه میزان عملکرد اقتصادی گیاه استویا به درصد قندهای موجود در گیاه و عملکرد بیولوژیکی آن بستگی دارد لذا لازم است ارتباط بین صفات مطالعه شده نیز بررسی گردد به همین منظور ضرایب همبستگی پیرسون بین صفات محاسبه شد (جدول ۳). نتایج تجزیه همبستگی نشان داد که بین طول ریشه و درصد قند ریبائودیوزید A رابطه مثبت و معنی‌داری وجود دارد (جدول ۳). همچنین بین وزن خشک و تر اندام هوایی و وزن خشک و تر ریشه همبستگی مثبت و معنی‌داری وجود داشت.

بحث

برای جذب عناصر غذایی خاک و افزایش کارایی جذب در گیاهان، از روش‌های مختلفی همچون استفاده از منابع کودی، استفاده از مواد آلی و تلقیح گیاهان با باکتری‌های تشدید کننده رشد[1] (PGPR) می‌توان سود برد. اکثر تحقیقات انجام شده روی باکتری‌های دی ازوتروف آزادزی بوده و تعداد کمی نیز روی باکتری‌های همزیست ریزوبیوم، متمرکز بوده است (Robert and Schmidt, 1983). باکتری‌های PGPR با تاثیر بر فیزیولوژی و مورفولوژی ریشه گیاهان تلقیح شده، موجب افزایش جذب عناصر و رشد بیشتر گیاهان می‌شوند (یحیی‌آبادی و اسدی رحمانی، ۱۳۹۳). از طرفی دیگر مشخص شده است که به واسطه همزیستی قارچ میکوریزا با ریشه گیاه موجب افزایش جذب آب و عناصر غذایی شده و سبب افزایش میزان فتوسنتز و به طبع آن افزایش رشد رویشی و ماده خشک تولید شده می‌گردد (زارع حسینی و همکاران، ۱۳۹۴). به طوری که در

[1] Plant Growth Promoting Rhizobacteria; PGPR

جدول ۳- ضرایب همبستگی پیرسون بین صفات مورد مطالعه در گیاه استویا

صفات	وزن خشک ریشه	وزن خشک اندام هوایی	وزن تر اندام هوایی	وزن تر ریشه	طول ساقه	طول ریشه	میزان سبزینگی (SPAD)	محتوای استویوزید
محتوای ریبائودیوزید A	۰/۰۹	۰/۴۶	۰/۱۶	۰/۲۹	۰/۱۲	۰/۶۸**	-۰/۱۹	۰/۴۷
محتوای استویوزید	-۰/۰۲	-۰/۱۹	-۰/۱۶	۰/۰۶	-۰/۰۶	۰/۴۴	۰/۱۲	
میزان سبزینگی (SPAD)	-۰/۱۵	-۰/۲۵	-۰/۴۲	-۰/۱۴	-۰/۱۹	۰/۰۲		
طول ریشه	۰/۱۸	۰/۴۰	-۰/۰۷	۰/۳۱	-۰/۱۸			
طول ساقه	-۰/۱۵	۰/۰۵	۰/۲۴	-۰/۳۴				
وزن تر ریشه	۰/۷۵**	۰/۳۹	-۰/۰۱					
وزن تر اندام هوایی	۰/۰۳	۰/۶۶**						
وزن خشک اندام هوایی	۰/۴۲							

** معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد

این مطالعه، تأثیر توأم همزیستی قارچ میکوریزا و باکتری ریزوبیوم باعث افزایش میزان سبزینگی برگ‌های استویا شد. قبلاً نیز نتایجی در مورد تأثیر مثبت هر کدام از این دو فاکتور بر روی بهبود رشد گیاه گزارش شده است برای مثال کاربرد قارچ میکوریزا در گیاهان دارویی علف لیمو (Ratti *et al*., 2001)، نعناع (Gupta *et al*., 2002) و مشخصاً در گیاه استویا (زارع حسینی و همکاران، ۱۳۹۴) و کاربرد باکتری ریزوبیوم در لوبیا چیتی (افشاری و همکاران، ۱۳۹۲) و در لوبیا قرمز (صفاپور و همکاران، ۱۳۸۹).

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که محتوای کل قندهای میوه‌های گیاهان میکوریزایی نسبت به گیاه غیر میکوریزایی پایین‌تر بوده است و علت این امر انتقال قندها به سمت ریشه برای مصرف قارچ می‌باشد (Goussous and Mohammad, 2009). به همین دلیل احتمال می‌رود که در این مطالعه ترکیب تیماری b_0f_{25} به علت درصد پایین قارچ و عدم وجود باکتری بیشترین میزان قند استویوزید را تولید کرده است ولی با افزایش درصد قارچ به ۵۰ درصد در ترکیب تیماری b_0f_{50} به عنوان عامل بازدارنده عمل کرده است. این امر در مورد محتوای قند ریبائودیوزید A کاملاً متفاوت است به طوری که بیشترین درصد قند ریبائودیوزید A در ترکیب تیماری $b_{100}f_{50}$ حاصل شده است و به نظر می‌رسد که به مطالعات بیشتری برای یافتن فیزیولوژی پاسخ گیاه استویا در پاسخ به میکرواورگانیسم‌های ذکر شده از لحاظ میزان قندهای استویوزید و ریبائودیوزید A نیاز است.

منابع

افشاری، ع.، صباغ پور، س. ح.، حاج سید هادی، م. و اسدی‌رحمانی، ه. (۱۳۹۲). تأثیر باکتری‌های ریزوبیوم و محرک رشد گیاه بر عملکرد و اجزاء عملکرد لوبیا چیتی. فن‌آوری تولیدات گیاهی، ۵(۱)، ۷۱-۸۱.

رضوانی، م.، اردکانی، م.، رجالی، ف.، نورمحمدی، ق.، زعفریان، ف. و تیموری، س. (۱۳۸۸). تاثیر سویه‌های مختلف قارچ‌های میکوریزا روی ویژگی‌های ریشه و غلظت فسفر، پتاسیم، روی و آهن یونجه (*Medicagi sativa* L.). بوم شناسی گیاهان زراعی (دانش نوین کشاورزی)، ۵(۱۵)، ۵۵-۶۶.

زارع‌حسینی، ر.، محمدی گل‌تپه، ا.، کلاته‌جاری، س. و دهقانی‌مشکانی، م. (۱۳۹۴). بررسی تأثیر ورمی کمپوست و تلقیح قارچ بر خصوصیات رشدی و میزان استویوزید گیاه دارویی شیرین برگ (*Stevia rebaudiana* Bertoni). فصلنامه گیاهان دارویی، ۴(۵۶)، ۱۷۹-۱۸۸.

صفاپور، م.، اردکانی، م.، رجالی، ف.، خاقانی، ش. و تیموری، م. (۱۳۸۹). تاثیر تلقیح دوگانه مایکوریزا و ریزوبیوم بر عملکرد سه رقم لوبیا قرمز (*Phaseolus vulgaris* L.). یافته‌های نوین کشاورزی، ۵(۱۷)، ۲۱-۳۵.

یحیی‌آبادی، م. و اسدی رحمانی، ه. (۱۳۹۳). بررسی پتانسیل تثبیت بیولوژیکی نیتروژن و جذب برخی عناصر

ریزمغذی توسط سوی ههای مختلف باکتری ریزوبیوم همزیست لوبیا در دو منطقه از استان اصفهان. نشریه زراعت، ۲۷(۱۰۵)، ۷۵-۸۰.

Abdel-Hanej, A. A. A. & Abdel-Monsief, R. A. (2006). Effect of VAM inoculation on growth, yield and nutrient content of Cantaloup and Cucumber under different water regimes.

Research Journal of Agriculture and Biological Sciences, 2, 503–508.

Asadi Rahmani, H., Abbaszadeh, P., Saleh-rastin, N., Khavazi, K., Soltani, A. & Saghafi, K. (2007). Production of ACC-deaminase by isolates of fluourescent Pseudomonads. The 10th

Iranian Soil Science Congress, Karaj, Iran.

Carakostas, M. C., Curry, L. L., Boileau, A. C. & Brusick, D. J. (2008). The history, technical function and safety of rebaudioside A, a naturally occurring steviol glycoside, for use in food and beverages. Food and Chemical Toxicology, 46, S1 - S10.

Calderon, F. J., McCarty, G. W., Van Kessel, J. A. S. & Reeves, J. B. (2004). Carbon and Nitrogen Dynamics During Incubation of Manured Soil. Soil Science Society of America Journal, 68, 1592-1599.

Calvet, C., Pinochet, J., Hernandez Dorrego, A., Estaun, V. & Camprubi, A. (2001). Field microplot performance of peach- almond hybrid GF- 677 after inoculation with arbuscular mycorrhizalnfungi in a replant soil infested with root – k not nematodes. Mycorrhiza, 10, 295 – 300.

Chalapathi, M. V. & Thimmegowda, S. (1997). Natural noncalorie sweetener Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) a future crop of India. Crop Research Hisar, 14 (2), 347 - 350.

Fagardo, B. E., Barea, J. M. & Ocampo, J. A. (1982). The effect of season on VA mycorrhiza of the almond tree and of phosphate fertilization and species of endophyte on its *mycorrhizal* dependency. Plant Soil, 68(3), 361-367.

Genus, J. M. C. (2010). Stevia and steviol glycosides. Heverlee. Euprint.

Goussous, S. J. & Mohammad, M. J. (2009). Effect of two arbuscular mycorrhizae and N and P fertilizers on growth and nutrient uptake of onions. International Journal of Agriculture and Biology, 11, 463 -467.

Gupta, M. L., Prasad, A., Ram, M. & Kumar, S. (2002). Effects of the vesicular-arbuscular mycorrhizal (VAM) fungus *Glomus fasciculatum* on the essential oil yield related cultivars of menthol mint (*Mentha arvensis*) under field conditions. Bioresource Technology, 81, 77 - 9.

Koyama, E., Sakai, N., Ohori, Y., Kitazawa, K., Izawa, O., Kakegawa, K., Fujino A. & Ui, M. (2003). Absorption and metabolism of glycosidic sweeteners of stevia mixtureand their aglycone, steviol, in rats and humans. Food and Chemical Toxicology, 41, 875- 883.

Li, W., Johnson, S. A., Shelley, W. C. & Yoder, M. C. (2004). Hematopoietic stem cell repopulating ability can be maintained in vitro by some primary endothelial cells. Exp Hematol, 32, 1226-1237.

Ratti, N., Kumar, S., Verma, H. N. & Gautam, S. P. (2001). Improvement in bioavailability of tricalcium phosphate to *Cymbopogon martinii* var. motia by rhizobacteria, AMF and *Azospirillum* inoculation. Microbiology Research, 156, 145 - 49.

Robert, F. M. & Schmidt, E. L. (1983). Population changes and persistence of Rhizobium Phaseoli in soil and rhizospheres. Applied and Environmental Microbiology, 45(2), 550-556.

Satyanarayana, A., Thiyagarajan, T. M. & Uphoff, N. (2007). Opportunities for water saving with higher yield from the system of rice intensification. Irrigation Science, 25, 99-115.

Smith, S. E. & Read, D. J. (1997). Mycorrhizal Symbiosis, Academic press, San Diego California, pp: 126 – 160.

Venkata, S. P., Mani, A. & Indra, P. (2011). Diterpene Glycosides from *Stevia rebaudiana*. Molecules. 16(5), 3552-3562.

Zare Hoseini, R., Mohammadi Goltapeh, E. & Kalatejari, S. (2015). Effect of bio-fertilizer on growth, development and nutrient content (leaf and soil) of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Journal of Crop Protection, 4 (Supplementary), 691-704.