دوماهنامه علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۳۱، شماره ۲، صفحه ۲۳۴-۲۲۰ (۱۳۹۴)

اثر قارچ میکوریز و ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه بر سرعت رشد، زمان گلدهی و الگوی تجمع استویوزاید در گیاه استویا (*Stevia rebaudiana* Bert.)

محمود اطرشی[۱]، فریناز وفادار اصفهان[۲] و ریحانه عموآقایی[۳*]

۱- استادیار، بخش تحقیقات کشت بافت، مدیریت بیوتکنولوژی کشاورزی منطقه مرکزی کشور، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران (ABRII)

۲- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهرکرد

۳*- نویسنده مسئول، دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهرکرد، پست الکترونیک: Rayhanehamooaghaie@yahoo.com

تاریخ دریافت: دی ۱۳۹۱ تاریخ اصلاح نهایی: شهریور ۱۳۹۲ تاریخ پذیرش: شهریور ۱۳۹۲

چکیده

استویا (*Stevia rebaudiana* Bert.) یک گیاه دارویی است که به‌عنوان شیرین‌کننده‌ای مناسب برای بیماران دیابتی استفاده می‌شود. در این پژوهش تأثیر تلقیح منفرد یا توأم قارچ میکوریزی گلوموس اینترارادیسز و باکتری‌های باسیلوس پلی‌میکسا، سودوموناس پوتیدا و ازتوباکتر کروکوکوم بر گیاهچه‌هایی که از کشت قطعات تک‌گره استویا باززایی شده بودند، در زمان‌های ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ روز پس از اعمال تیمارها بررسی شد. نتایج نشان دادند که میزان پارامترهای رشد (وزن تر، وزن خشک و طول ساقه) و استویوزاید تا ۶۰ روز پس از اعمال تیمارها، در تیمارهای منفرد و سه‌تایی باکتری یا قارچ در حد معنی‌داری افزایش یافت ولی بیشترین میزان پارامترهای رشد و استویوزاید در تیمارهای دوتایی از میکروارگانیسم‌ها و به‌طور ویژه در تیمار ازتوباکتر+ گلوموس مشاهده شد. بیشترین میزان وزن تر، وزن خشک، طول ساقه و استویوزاید در ۶۰ روز پس از اعمال اولیه تیمارها و در تیمار ازتوباکتر+ گلوموس که به‌ترتیب ۵۳/۷٪، ۵۷٪، ۳۷٪ و ۸۱٪ افزایش نسبت به شاهد را نشان می‌دهند، مشاهده شد. به‌طور جالب توجهی مشاهده شد که سرعت رشد در تیمارهای دوگانه و سه‌گانه در فاصله ۳۰-۱۵ روز حداکثر بود و در فاصله ۴۵-۳۰ روز که منطبق با دوران گلدهی آنها بود، کاهش یافت. اما در تیمارهای منفرد سرعت رشد در فاصله ۴۵-۳۰ روز به حداکثر رسید و در فاصله ۶۰-۴۵ روز با ورود به مرحله گلدهی بشدت کاهش یافت. به هر حال حداکثر میزان تجمع استویوزاید در همه تیمارها در فاصله ۴۵-۳۰ روز بدست آمد و در فاصله ۶۰-۴۵ روز با ورود به مرحله گلدهی میزان تجمع استویوزاید در تیمارهای سه‌گانه و منفرد بشدت و در تیمارهای دوگانه به‌طور ملایم‌تر کاهش یافت. بنابراین تیمار میکروارگانیسم‌ها سرعت رشد، فنولوژی گیاه و الگوی تجمع استویوزاید را در استویا تحت تأثیر قرار می‌دهند.

واژه‌های کلیدی: ازتوباکتر، باسیلوس، گلوموس، سودوموناس.

مقدمه

استویا با نام علمی *Stevia rebaudiana* Bert. گیاهی بوته‌ای، پایا و چندساله است که به خانواده Asteraceae تعلق دارد (Ali *et al*., 2010). ویژگی جالب توجه این گیاه شیرین بودن شدید برگ‌ها و عصاره آبی آن است (Geuns, 2003). این گیاه بومی مناطق شمالی آمریکای جنوبی

(پاراگوئه و برزیل) است. در قرن ۱۶ ارزش پزشکی استویا شناخته شد و استفاده از آن در چای آغاز شد. از آن زمان به بعد، استفاده از آن به‌طور وسیعی در سراسر اروپا و آسیا رایج شد (Cardello *et al*., 1999). شیرین بودن برگ‌های استویا به دلیل متابولیت‌های ثانویه‌ای است که گلیکوزیدهای دی‌ترپنی نامیده می‌شوند. دو گلیکوزید اصلی گیاه، استویوزاید و ربودیوزاید A هستند. غلظت استویوزاید معمولاً دامنه‌ای از ۱۰-۳ درصد و غلظت ربودیوزاید A دامنه‌ای از ۳-۱ درصد وزن خشک برگ است. برگ‌های استویا استویوزاید، ۳۰۰-۲۰۰ مرتبه و ربودیوزاید A، ۴۰۰-۱۸۰ مرتبه شیرین‌تر از شکر است (Das *et al*., 2007). ماده شیرین‌کننده استویا به سبب فاقد کالری بودن برای افرادی که از دیابت، هیپوگلیسمی، فشار خون بالا، فنیل‌کتون اوری، ناراحتی‌های قلبی، چاقی و عفونت‌های قارچی مزمن رنج می‌برند یک شیرین‌کننده مطلوب است (Woelwer-Rieck, 2010)، زیرا استویوزاید قادر به تحریک ترشح انسولین در پانکراس بیماران دیابتی و دیگر اختلالات متابولیسم کربوهیدراتی است و سطح گلوکز خون را بالا نمی‌برد (Kedik *et al*., 2003) و به‌عنوان کاهنده سطوح اسید اوریک و ضدتومور به‌شمار می‌آید (Madan *et al*., 2010). اخیراً تقاضای بالایی برای متابولیت‌های ثانویه این گیاه، به‌دلیل بیماری‌هایی که توسط شیرین‌کننده‌های شیمیایی مانند ساخارین و آسپارتام ایجاد می‌شوند و سلامتی را به مخاطره می‌اندازند، در جهان وجود دارد. به همین دلیل بیشتر کشورها به دنبال تنظیم یک دستورالعمل قطعی برای کشت استویا هستند تا بتوانند هم میزان بیوماس و هم میزان گلیکوزید استویوزاید گیاه استویا را افزایش دهند.

کشت بافت یکی از روشهای مهم در بیوتکنولوژی است که امکان تولید سریع گیاهان عاری از عوامل بیماری‌زا را محقق می‌سازد. کشت بافت همچنین یک تکنیک مفید و مؤثر در تکثیر گیاهانی مانند استویا است که بذر آنها به سختی جوانه می‌زند و قلمه‌ها یا گیاهچه‌های حاصل از قلمه‌زنی هم مرگ و میر زیادتری نشان می‌دهند و هم میزان بیوماس کمتری نسبت به گیاهچه‌های تکثیر شده به روش کشت بافت نشان می‌دهند، در نتیجه تکثیر این گیاهان به روشهای سنتی کار مشکلی است (Debnath, 2008). اما در جریان کشت بافت گیاهچه‌ها از هر نوع آلودگی میکروبی دور می‌مانند. اگرچه این امر برای مهار بیماری‌ها مفید است اما این گیاهچه‌ها امکان روابط همزیستی مسالمت‌آمیز را تا حدودی از دست می‌دهند (Kapoor *et al*., 2008). گزارش شده که تلقیح گیاهچه‌های حاصل از کشت بافت با قارچ‌های میکوریزی و یا با باکتری‌های محرک رشد گیاهان می‌توانند به استقرار این گیاهچه‌ها کمک کنند و نقش مهمی در سلامتی و تأمین نیازهای غذایی این گیاهچه‌ها داشته باشند (Rai, 2001؛ Russo *et al*., 2008). بر این اساس در این پژوهش گیاهچه‌های حاصل از کشت بافت استویا با انواع ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه (PGPR: Plant Growth Promoting Rhizobacteria) و میکوریزها تلقیح شدند و اثرات آنها در طی ۶۰ روز روی رشد گیاه بررسی شد.

قارچ میکوریزای آرباسکولار قادر است جذب فسفر، ریزمغذی‌ها و نیتروژن را از خاک افزایش دهد و به این ترتیب عناصر ضروری برای رشد گیاه را از خاک فراهم کند. همچنین قادر به افزایش جذب آب بوده و اثرات مهارکننده در مقابل تعدادی از عوامل بیماری‌زا داشته است. این قارچ‌ها در مقاومت به خشکی، مقاومت به فلزات سنگین و بهتر شدن ساختار دانه‌ای خاک هم ایفای نقش می‌کنند. البته افزایش جذب فسفر به‌طور کلی به‌عنوان مهمترین فایده قارچ میکوریزای آرباسکولار برای گیاه میزبانش شناخته شده‌است که منجر به افزایش رشد و محصول در میزبان آن می‌شود (Gosling *et al*., 2006). جوامع میکروبی هم به میزان زیادی به برقراری همزیستی میکوریزی کمک می‌کنند و جوانه‌زنی اسپورهای قارچ میکوریزای آرباسکولار را تحریک کرده و درصد کلونیزاسیون ریشه‌ای را با قارچ افزایش می‌دهند (Johansson *et al*., 2004). به‌طور متقابل قارچ میکوریزای آرباسکولار نیز بر جوامع میکروبی تأثیر می‌گذارد که در بیشتر موارد این تأثیر مثبت است.

باکتری‌های تحریک‌کننده رشد گیاه هم به‌صورت کودهای زیستی، تحریک‌کننده رشد تارهای کشنده، پاک‌کننده آلاینده‌های فلزات سنگین در ریشه با مکانیسم‌هایی مانند تولید سیدروفور، کنترل‌کننده اثرات تنش‌ها در گیاهان، حل‌کننده بهتر مواد معدنی مانند فسفر و تثبیت‌کننده N_2 به‌شمار می‌آیند (Van Loon, 2007؛ Gray & Smith, 2005؛ Vessey, 2003). ریزوباکترهای تحریک‌کننده رشد گیاه همچنین با تولید هورمون‌های گیاهی مانند اکسین، سیتوکینین و جیبرلین منجر به افزایش رشد منطقه سطحی ریشه می‌شوند و به این ترتیب منجر به افزایش سطح تماس در خاک و تغذیه گیاه می‌شوند (Robin *et al.*, 2008؛ Khalid *et al.*, 2004). تعداد زیادی از باکتری‌های PGPR به‌عنوان باکتری‌های کمک‌کننده میکوریزا (MHB: Mycorrhiza Helper Bacteria) شناخته می‌شوند. باکتری‌های کمک‌کننده (MHB) اغلب از جنس‌های باسیلوس و سودوموناس هستند. باکتری‌های MHB می‌توانند عملکرد قارچ میکوریزای آرباسکولار را از طریق اثر بر نفوذپذیری سلول‌های ریشه‌ای، تراوشات ریشه‌ای، تسهیل ورود قارچ به ریشه میزبان، تولید هورمون‌های گیاهی، تعدیل اثرات منفی عوامل محیطی روی رشد هیف و تحریک رشد تارهای کشنده گیاه تحت تأثیر قرار دهند (Barea *et al.*, 2005؛ Frey-Klett *et al.*, 2007). دیگر اثرات شناخته شده از MHB روی میکوریز، حل کردن و قابل دسترس کردن مواد مغذی، تثبیت نیتروژن و کنترل پاتوژن‌های ریشه‌ای است (Frey-Klett *et al.*, 2007).

بنابراین با توجه به اهمیت باکتری‌های تحریک‌کننده رشد گیاه (PGPR) و قارچ میکوریزای آرباسکولار (AM)، در این پژوهش تأثیر تلقیح منفرد و توأم گیاه با قارچ میکوریزای آرباسکولار گلوموس اینترادیسسز و باکتری‌های حل‌کننده فسفات، باسیلوس پلی‌میکسا و سودوموناس پوتیدا و باکتری تثبیت‌کننده نیتروژن، ازتوباکتر کروکوکوم بر پارامترهای رشد اندام هوایی (طول ساقه، وزن تر و خشک)، سرعت رشد و میزان استویوزاید در فواصل ۱۵ روزه پس از کاشت، بررسی شد.

مواد و روشها

تهیه نمونه‌های گیاهی

به‌دلیل مشکلات جوانه‌زنی بذر استویا و ایجاد تنوع ژنوتیپی و عدم دسترسی به یک جمعیت هومولوگ در تکثیر به‌وسیله بذر، کشت بافت تنها راه جایگزین به‌منظور ریزازدیادی سریع و به میزان زیاد گیاه استویا است (Debnath, 2008). در نتیجه گیاهچه‌های لازم برای این پژوهش از طریق کشت قطعات تک‌گره ساقه بدست آورده شدند.

به‌منظور تهیه محیط کشت مغذی برای تکثیر استویا، از محیط کشت پایه MS (Murashing & Skoogs, 1962) که حاوی هورمون‌های IBA (۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر) و BAP (۱ میلی‌گرم بر لیتر) است، استفاده شد. برای تهیه ریزنمونه از گیاهچه‌های درون شیشه‌ای موجود در پژوهشکده بیوتکنولوژی منطقه مرکزی استفاده شد. ساقه گیاهچه‌های جوان استویا به روش استفاده از قطعات تک‌گره (نودال کاتینگ) توسط اسکالپل به قطعات ۱ سانتی‌متری برش داده شدند. آنگاه ۶-۵ عدد ریزنمونه در هر شیشه مربایی کشت گردید و تمام شیشه‌های کشت شده به اتاق رشد با دمای ۲۵±۲°C، ۱۶ ساعت روشنایی و شدت نور ۴۰۰۰-۳۰۰۰ لوکس منتقل شدند (Rafiq *et al.*, 2007؛ Ahmed *et al.*, 2007).

به‌منظور مقاوم‌سازی، ابتدا گیاهچه‌هایی که به مدت ۴۰ روز درون شیشه مربایی در اتاق کشت به خوبی رشد کرده‌اند و ریشه‌دار شده‌اند، به‌طور کامل شستشو داده شدند تا محیط کشت چسبیده به ریشه آنها به‌طور کامل زدوده شود. سپس یک گیاهچه به هر لیوان یک بار مصرف حاوی پیت‌ماس که ته آن سوراخ شده، منتقل شده و بر روی این لیوان‌ها سریع یک لیوان یک بار مصرف دیگر به صورت وارونه قرار گرفت تا گیاهچه‌های ضعیف درون آن از

رطوبت کافی (همانند شرایط کشت درون شیشه) بهره‌مند شوند. این لیوان‌ها به فیتوترون با دمای ۲۵±۲°C، ۱۶ ساعت روشنایی و رطوبت ۵۰٪ منتقل گردیدند. لیوان‌های رویی پس از ۱۵ روز به‌طور کامل برداشته شدند تا گیاهچه‌ها در هوای آزاد رشد کنند. در این مرحله گیاهچه‌ها آماده انتقال به گلدان‌ها در گلخانه شدند.

تهیه نمونه‌های قارچ و باکتری

در این تحقیق باکتری‌های ازتوباکتر کروکوم و باسیلوس پلی‌میکسا از مرکز کلکسیون قارچ و باکتری ایران تهیه شدند و آزمون تأییدی تثبیت‌کنندگی نیتروژن روی ازتوباکتر و حل‌کنندگی فسفر روی باسیلوس انجام شد. باکتری سودوموناس پوتیدا از گروه میکروبیولوژی دانشگاه اصفهان تهیه شد و آزمون تأییدی حل‌کنندگی فسفر روی آن انجام گردید. قارچ میکوریزای آرباسکولار استفاده شده در این پروژه، گلوموس اینترارادیسز بود که آن هم به‌صورت کود (قارچ تکثیرشده به فرم میسلیوم بر روی ریشه بقولات در خاک شنی- لومی) از کلینیک گیاه پزشکی کود ارگانیک همدان تهیه شد.

آزمون تأییدی تثبیت‌کنندگی نیتروژن ازتوباکتر

برای بررسی توانایی تثبیت‌کنندگی نیتروژن توسط باکتری ازتوباکتر، یک عدد کلونی تک در شرایط استریل بر روی محیط کشت اختصاصی تثبیت‌کنندگی نیتروژن (Holt, 1994) کشت داده شد و به مدت ۷-۳ روز در انکوباتور در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا کلونی‌ها بر روی محیط کشت رشد کنند. با توجه به این که این محیط عاری از نیتروژن می‌باشد توانایی رشد روی آن تا حد زیادی توانایی تثبیت نیتروژن باکتری را اثبات می‌کرد (Willey *et al*., 2009). البته کلکسیون قارچ و باکتری ایران هم که نمونه از آنجا تهیه شده بود براساس آزمون احیای استیلنی توانایی تثبیت نیتروژن باکتری را تأیید کرده بود.

آزمون حل‌کنندگی فسفر

برای بررسی توانایی حل‌کنندگی فسفر توسط باسیلوس و سودوموناس، یک عدد کلونی تک در شرایط استریل بر روی محیط کشت اختصاصی حل‌کنندگی فسفر، پیکوساکایا آگار (PVK) (Pikovskaya, 1948) به روش خطی کشت داده شد و به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا کلونی‌ها بر روی محیط کشت رشد کنند. وجود هاله شفاف مبین توانایی حل‌کنندگی فسفر بود (Naz & Bano, 2010).

آماده‌سازی مایه تلقیح قارچ و باکتری

برای آماده‌سازی مایه تلقیح باکتری‌ها، یک کلونی تک از باکتری‌های ذکر شده به ۵۰۰ میلی‌لیتر محیط مغذی LB مایع تلقیح شد و به مدت ۲۴ ساعت بر روی شیکر انکوباتور قرار گرفت تا باکتری‌ها رشد کرده و به غلظت ۳×۱۰^{۸}cfu ml^{-1} برسند. برای کنترل غلظت باکتری از معیار مک‌فارلند استفاده شد. هرگاه جذب نوری محلول باکتری در دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۰۰nm حدود ۰/۲۵ شود معادل محلول ۱ مک‌فارلند است و به این معنی است که باکتری‌ها به غلظت مورد نظر ۳×۱۰^{۸}cfu ml^{-1} رسیده‌اند (Willey *et al*., 2009).

آماده‌سازی گیاهچه‌ها و اعمال تیمار میکوریز و باکتری‌های همیار

در این مرحله گیاهچه‌های مقاوم‌سازی شده در فیتوترون، در گلخانه تحقیقاتی به گلدان‌ها منتقل شدند. هر گیاهچه مقاوم‌سازی شده، در یک گلدان ۴ کیلوگرمی کاشته شد. به این صورت که ابتدا گلدان‌ها تا یک سوم از خاک استریل شده پر شدند، آنگاه گیاهچه‌های مقاوم‌سازی شده، از لیوان یک بار مصرف به همراه پیت ماس به صورتی‌که ریشه‌ها جدا نشوند خارج و در گلدان‌ها با همان مقدار پیت‌ماس قرار داده شدند و بقیه گلدان با خاک پر شد.

در گلدان‌های حاوی قارچ میکوریز، ریشه‌های گیاه با

۲۵۰ گرم میسلیوم قارچ میکوریز رشد کرده بر روی ریشه بقولات در خاک شنی–لومی ریشه آغشته شد و گلدان‌های دربردارنده بر چسب باکتری، با غلظت ۳×۱۰^{۸} cfu ml^{-1} از باکتری‌ها مطابق طرح آماری آغشته شدند. برای این منظور در تلقیح اول که بلافاصله پس از کاشت یک گیاهچه در هر یک از گلدان‌ها انجام شد، ۵ میلی‌لیتر از هر محلول باکتریایی، در پای هر گیاهچه، در هر یک از گلدان‌های مربوطه تلقیح شد و در دومین تلقیح که پانزده روز بعد از اولین تلقیح انجام شد دوباره ۵ میلی‌لیتر از هر محلول باکتریایی، در پای هر گیاهچه، در هر یک از گلدان‌های مربوطه تلقیح شد. گلدان‌ها در یکی از واحدهای گلخانه در دمای $۲۸\pm۵^{\circ}C$ و رطوبتی در حدود ۵۰٪ نگهداری شدند.

اندازه‌گیری پارامترهای رشد گیاهچه‌های استویا

۱۹۲ گیاهچه در یک دوره ۶۰ روزه در گلدان‌های مذکور رشد داده شدند و در فواصل ۱۵ روزه، یعنی ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ روز پس از کاشت برداشت شدند و طول ساقه آنها با خطکش و وزن تر بخش هوایی با ترازوی دیجیتالی اندازه‌گیری شد. سپس بخش هوایی هر تیمار در پاکت کاغذی قرار داده شد و در آون ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت قرار گرفتند تا کاملاً خشک شوند. پس از خشک شدن کامل در آون، وزن خشک نمونه‌ها با ترازوی دیجیتالی اندازه‌گیری شد (Mishra *et al.*, 2010). سرعت رشد هم مطابق رابطه زیر اندازه‌گیری شد. در این فرمول w_1 وزن کل بخش هوایی گیاه در زمان t_1 و w_2 وزن کل بخش هوایی گیاه در زمان t_2 است و $p=۰/۰۲۵\ m^2$ مساحت هر گلدان حاوی تک گیاهچه است (Buttery, 1969 ؛Radford, 1967).

$$\text{Crop Growth Rate (CGR, g m}^{-2}\ day^{-1}) = \frac{W_2 - W_1}{P(T_2 - T_1)}$$

اندازه‌گیری استویوزاید گیاهچه‌های استویا

محتوای استویوزاید در برگ‌ها در فواصل ۱۵ روزه یعنی ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ روز پس از کاشت، با استفاده از HPLC اندازه‌گیری شد. ستون استفاده شده در این روش NH_2 بود. در فاز متحرک ستون از حلال‌های استونیتریل لیکروسالو مرک و آب خالص شده به نسبت ۸۰٪ استونیتریل و ۲۰٪ آب استفاده شد. طول موج ماوراءبنفش استفاده شده در دستگاه، ۲۱۰ نانومتر بود و دمای دستگاه روی $۴۵^{\circ}C$ با نرخ جریان ۱/۲ میلی‌لیتر بر دقیقه تنظیم شد (Kolb *et al.*, 2001؛ Woelwer-Rieck *et al.*, 2010).

تجزیه‌های آماری

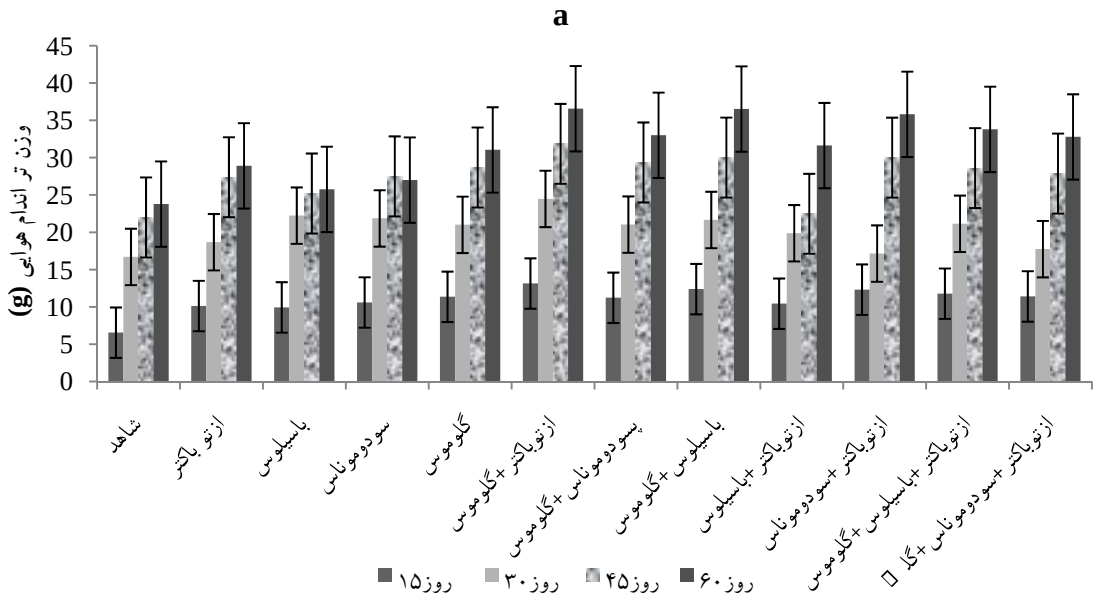
این آزمایش به‌صورت فاکتوریل زمان×تیمارهای میکربی در طرح کاملاً تصادفی با ۴ تکرار انجام شد. تیمارهای مورد استفاده در این آزمایش عبارت بودند از:

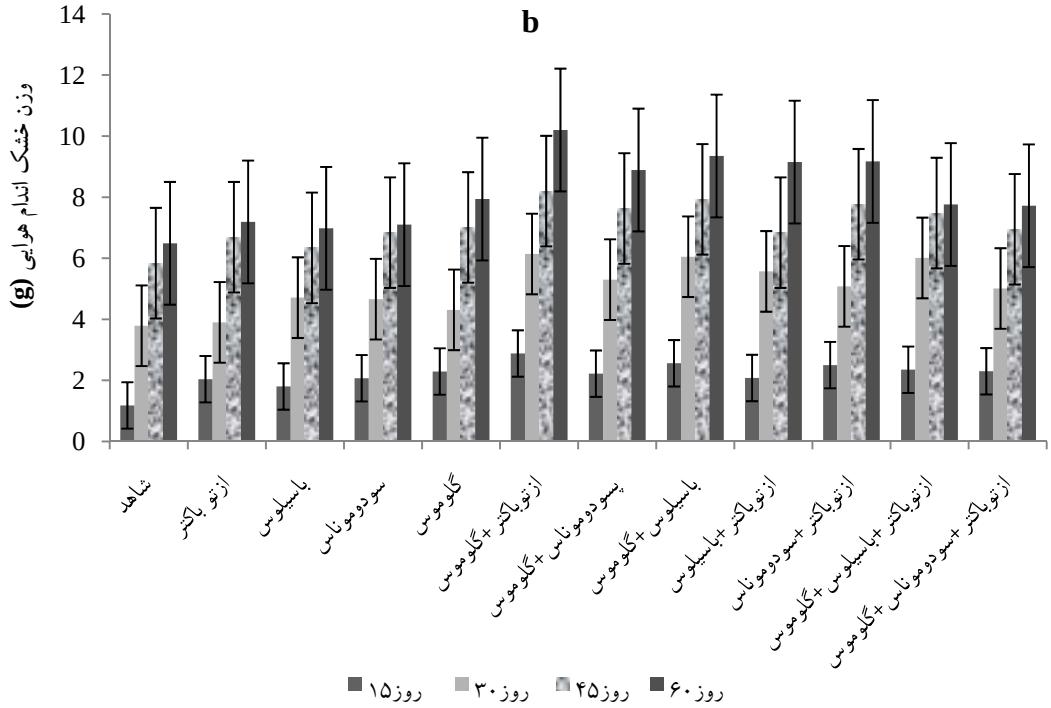
۱- تیمار شاهد، ۲- تلقیح با باکتری ازتوباکتر، ۳- تلقیح با باکتری باسیلوس، ۴- تلقیح با باکتری سودوموناس ۵- تلقیح با قارچ گلوموس، ۶- تلقیح با ازتوباکتر+گلوموس، ۷- تلقیح با سودوموناس+گلوموس، ۸- تلقیح با باسیلوس+گلوموس، ۹- تلقیح با ازتوباکتر+باسیلوس، ۱۰- تلقیح با ازتوباکتر+سودوموناس، ۱۱- تلقیح با ازتوباکتر+باسیلوس+گلوموس، ۱۲- تلقیح با ازتوباکتر+سودوموناس+گلوموس که اثرات آنها بر میزان رشد و تولید استویوزاید در فواصل زمانی ۱۵ روزه یعنی ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ روز پس از کاشت ارزیابی شد. تجزیه واریانس با نرم‌افزار SAS و مقایسه میانگین طبق آزمون LSD انجام شد.

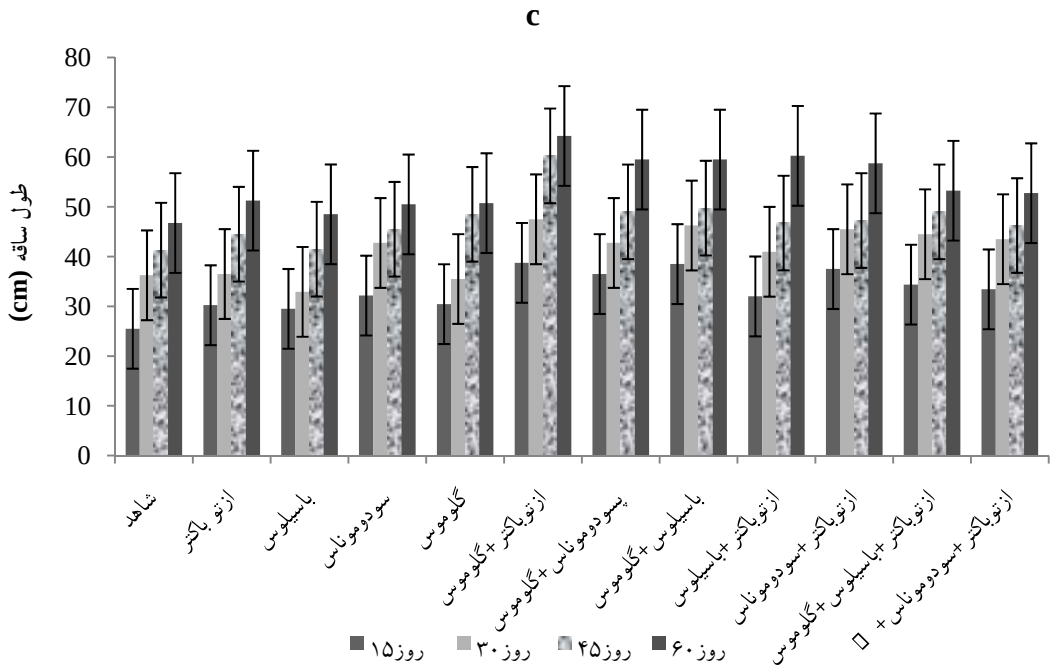
نتایج

در شکل‌های ۱ و ۲ مقادیر طول، وزن خشک و تر بخش هوایی و میزان استویوزاید در گیاه استویا در طی زمان‌های ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ روز پس از اعمال اولیه تیمارها نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهند که بیشترین میزان وزن تر، وزن خشک، طول ساقه و استویوزاید در ۶۰ روز پس از اعمال اولیه تیمارها و در تیمار ازتوباکتر+گلوموس که به‌ترتیب ۵۳/۷٪، ۵۷٪، ۳۷٪ و ۸۱٪ افزایش نسبت به شاهد را نشان می‌دهند، بدست آمده

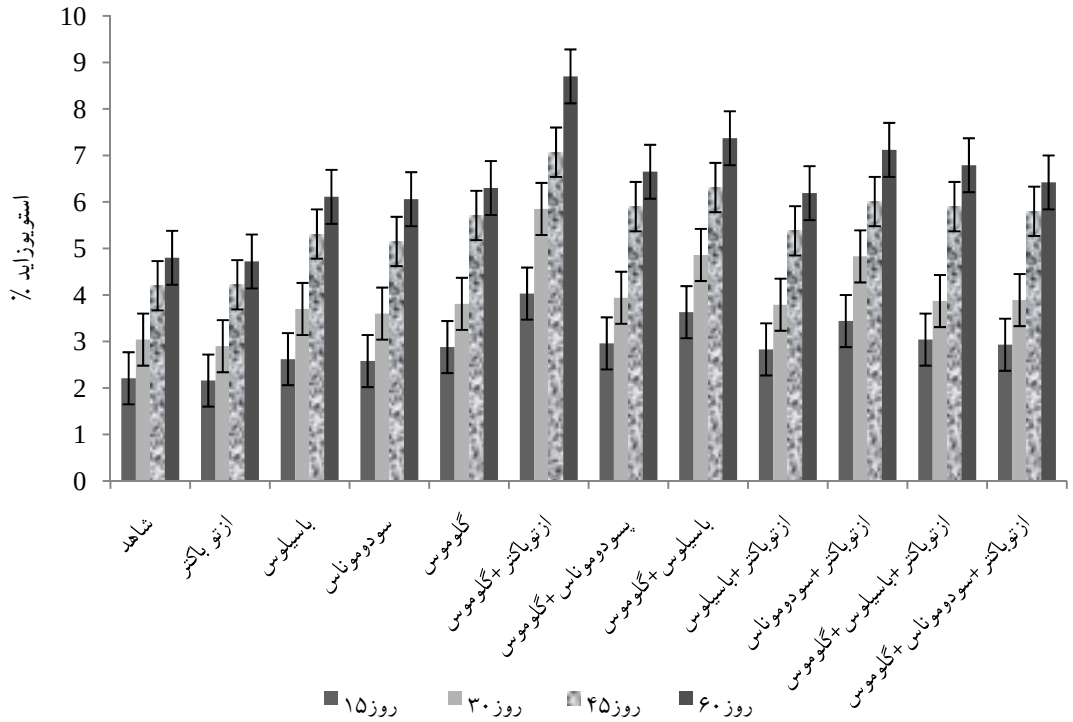
است. اگرچه در بیشتر موارد افزایش رشد و تولید استویوزاید در تیمارهای منفرد و سه‌تایی نیز نسبت به تیمار شاهد در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار بوده‌است اما تیمارهای دوگانه و مخصوصاً تیمار ازتوباکتر+گلوموس بیشترین میزان پارامترهای رشد بخش هوایی و همچنین حداکثر مقدار استویوزاید را در تمام زمان‌های ذکر شده در سطح احتمال ۵٪ نشان می‌دهند.







شکل ۱- میانگین اثر تیمارهای مختلف میکروارگانیسم‌ها بر میزان وزن تر (a)، وزن خشک (b) و طول ساقه (c) در فواصل ۱۵ روزه (خطاها نشان‌دهنده مقادیر محاسبه شده براساس LSD است.)



شکل ۲- میانگین اثر تیمارهای مختلف میکروارگانیسم‌ها بر میزان استویوزاید برگ در فواصل ۱۵ روزه (خطاها نشان‌دهنده مقادیر محاسبه شده براساس LSD است.)

جدول ۱ تغییرات تجمع ماده خشک در فواصل مختلف زمانی یا به عبارت دیگر الگوی سرعت رشد در زمان‌های مختلف در پاسخ به تیمارهای مختلف میکروارگانیسم‌ها را نشان می‌دهد. به‌طور جالبی مشاهده شد که سرعت رشد در تیمارهای دوگانه و سه‌گانه در فاصله زمانی ۳۰-۱۵ روز حداکثر بود و در فاصله ۴۵-۳۰ روز که منطبق با دوران گلدهی آنها بود، کاهش یافت. اما در تیمارهای منفرد سرعت رشد در فاصله ۴۵-۳۰ روز به حداکثر رسید و در فاصله ۶۰-۴۵ روز با ورود به مرحله گلدهی بشدت کاهش یافت. به هر حال در فاصله ۶۰-۴۵ روز کاهش سرعت رشد در همه تیمارهای دوگانه و سه‌گانه ادامه داشت ولی به‌طور جالب توجهی در تیمار ازتوباکتر +گلوموس مشاهد شد که هرچند سرعت رشد در فاصله ۴۵-۳۰ روز ۳۷٪ نسبت به فاصله ۳۰-۱۵ روز کاهش یافت ولی در فاصله ۶۰-۴۵ روز سرعت رشد در همان حد فاصله ۴۵-۳۰ روز ثابت ماند و کاهش بیشتری نداشت.

جدول ۱- سرعت رشد گیاه استویا بر مبنای وزن خشک در فواصل زمانی ۳۰-۱۵، ۴۵-۳۰، ۶۰-۴۵ روز پس از اعمال اولیه تیمارها برحسب $g\ m^{-2}\ day^{-1}$

تیمار	۳۰-۱۵	۴۵-۳۰	۶۰-۴۵
شاهد	۵/۴۷ e	۶/۹۶ abc	۱/۷۳ cd
ازتوباکتر	۴/۹۶ ef	۷/۴۴ a	۱/۳۳ d
باسیلوس	۴/۳۵f	۷/۷۶ a	۱/۷۱ cd
سودوموناس	۵/۸۱ de	۶/۹۱ abc	۰/۶۹ e
گلوموس	۵/ ۳۹ef	۷/۲ a	۲/۴۸ c
ازتوباکتر+گلوموس	۸/۶۹ ab	۵/۴۹ de	۵/۳۳ a
سودوموناس+گلوموس	۸/۲۱ b	۶/۲۱ b	۳/۳۶ b
باسیلوس+گلوموس	۹/۳۱ ab	۵/۰۱ e	۳/۷۹ b
ازتوباکتر+باسیلوس	۹/۳۱ ab	۶/۱۶ cd	۳/۳۹ b
ازتوباکتر+سودوموناس	۶/۸۸ cd	۷/۱۷ a	۳/۷۳ b
ازتوباکتر+باسیلوس+گلوموس	۹/۷۶ a	۳/۹۲ f	۰/۷۵ e
ازتوباکتر+سودوموناس+گلوموس	۷/۲۳ c	۵/۱۷ e	۲/۰۵ cd

مقایسه میانگین بین اعداد هرستون در سطح ۵٪ انجام شده و حروف یکسان در هر ستون به معنای عدم تفاوت معنی‌دار بین تیمارهای آن ستون است.

جدول ۲ نشان می‌دهد که حداکثر میزان تجمع استویوزاید در همه تیمارها در فاصله ۴۵-۳۰ روز بدست آمد و در فاصله ۶۰-۴۵ روز با ورود به مرحله گلدهی در تیمارهای سه‌گانه و منفرد بشدت و به حدود نصف تا یک سوم نسبت به مقادیر فاصله ۴۵-۳۰ روز و در تیمارهای دوگانه تا حدی ملایم‌تر تنزل پیدا کرد. تیمار ازتوباکتر+گلوموس از همان ابتدا (فاصله ۳۰-۱۵ روز) میزان تجمع استویوزاید بالاتری نسبت به سایر تیمارها داشته و این توان حتی در فاصله ۶۰-۴۵ روز هم بالاتر از دیگر تیمارهاست. برخی تیمارهای دیگر نظیر گلوموس، سودوموناس+گلوموس و یا ازتوباکتر+باسیلوس+گلوموس نیز در فاصله ۴۵-۳۰ روز هم توان با تیمار ازتوباکتر+گلوموس به تجمع استویوزاید پرداختند اما میزان کمتر آنها در دوره‌های ۳۰-۱۵ روز و یا ۶۰-۴۵ روز باعث شده که میزان کل استویوزاید آنها در روز شصتم کمتر از تیمار ازتوباکتر+گلوموس باشد.

جدول ۲- میزان تجمع استویوزاید در گیاه استویا در فواصل زمانی ۳۰-۱۵، ۴۵-۳۰ و ۶۰- ۴۵ روز پس از اعمال اولیه تیمارها برحسب ppm

تیمار	۳۰-۱۵	۴۵-۳۰	۶۰-۴۵
شاهد	۵/۵۶ cd	۷/۶۹ e	۴/۰۵ e
ازتوباکتر	۴/۹۳ d	۸/۸۱ de	۳/۳ f
باسیلوس	۷/۲۳ bc	۱۰/۷۱ bc	۵/۳۲ d
سودوموناس	۶/۸۱ bcd	۱۰/۳۶ cd	۶/۰۸ c
گلوموس	۶/۱۸ bcd	۱۲/۷۳ a	۳/۹ ef
ازتوباکتر+گلوموس	۱۰/۸۸ a	۱۲/۱۴ ab	۸/۱۵ a
سودوموناس+گلوموس	۶/۵۴ bd	۱۳/۰۹ a	۵/۰۱ d
باسیلوس+گلوموس	۸/۲۳ b	۹/۶۴ cd	۷/۰۷ b
ازتوباکتر+باسیلوس	۶/۴۲ bcd	۱۰/۵۷ c	۵/۴۴ d
ازتوباکتر+سودوموناس	۷/۸۹ b	۹/۲۸ cd	۷/۴ b
ازتوباکتر+باسیلوس+گلوموس	۵/۵۴ cd	۱۳/۵۶ a	۵/۹۴ c
ازتوباکتر+سودوموناس+گلوموس	۶/۴۲ bcd	۱۲/۶۹ a	۴/۱۳ e

مقایسه میانگین بین اعداد هرستون در سطح ۵٪ انجام شده و حروف یکسان در هر ستون به معنای عدم تفاوت معنی‌دار بین تیمارهای آن ستون است.

بحث

نتایج حاصل از تلقیح منفرد گیاهچه‌ها با باکتری‌های ازتوباکتر، باسیلوس، سودوموناس و قارچ میکوریزای آرباسکولار به تنهایی نشان داد که همه این تیمارها در زمان‌های ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ روز پس از تلقیح، طول، وزن تر و خشک ساقه را به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش داده‌اند (شکل ۱). افزایش پارامترهای رشد به‌وسیله باکتری‌های PGPR و میکوریزها در منابع متعددی تا به حال گزارش شده‌است. Mamata و همکاران (۲۰۱۰) در تحقیقی باکتری‌های حل‌کننده فسفات را از منطقه ریزوسفر گیاه *S. rebaudiana* جدا کردند و توانایی این باکتری‌ها را در حل کردن فسفات، سازگاری زیستی، تولید ایندول استیک‌اسید (IAA) و سیدروفور در گلخانه مورد بررسی قرار دادند. آنان دریافتند که این باکتری‌ها اثر تحریک‌کننده بر روی پارامترهای رشد گیاه یعنی طول شاخه، طول ریشه، وزن خشک برگ، وزن خشک ساقه، میزان بیوماس کل شاخه‌ها و همچنین روی محتوای گلیکوزیدی برگ دارند که نتایج آنان با نتایج این مطالعه هماهنگی دارد. یک مطالعه روی اثر میکوریز بر پونه کوهی نشان داد که کلونیزاسیون وزن تر و خشک شاخه را تا ۳ برابر نسبت به شاهد افزایش داد (Morone-Fortunato & Avato, 2008). نتایج این پژوهش نیز نشان داد که تیمارهای دوگانه و تا حدی سه‌گانه بیشتر از تیمارهای منفرد پارامترهای رشد گیاه را افزایش داده‌اند. منابع دیگر نیز گزارش کرده‌اند که تلقیح‌های میکوریز و PGPR و یا تلقیح توأم باکتری‌های حل‌کننده فسفات و تثبیت‌کننده نیتروژن می‌توانند بهتر از کاربرد هریک از آنها به تنهایی باشند، همچنین میان‌کنش‌هایی می‌تواند منجر به تغییر ویژگی‌های ساختاری خاک شود (Rillig & Mummey, 2006) و یا دستیابی به مواد مغذی را افزایش دهد (Jones *et al.*, 2009). مثلاً میکروارگانیسم‌های خاکزی هورمون‌های گیاهی را تولید می‌کنند که می‌توانند رشد هیف

و اسپور میکوریزای آرباسکولار را تحت تأثیر قرار دهند (Barea *et al*., 2005).

نتایج این پژوهش نشان داد که در بین ۱۲ تیمار مورد بررسی، گیاهچه‌های تلقیح شده با تیمار ازتوباکتر+گلوموس بیشترین میزان وزن تر، وزن خشک و طول را در میان تمام تیمارهای اعمال شده در این پژوهش، در چهار زمان ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ روز پس از اعمال اولیه تیمارها داشتند. بنابراین احتمال می‌رود که اثر سینرژیست این دو میکروارگانیسم روی هم بهتر از اثرات سایر ترکیب‌ها باشد.

تجزیه و تحلیل کمّی رشد، روشی است برای توجیه و تفسیر واکنش‌های گیاه نسبت به شرایط محیطی مختلف که گیاه در طول دوره حیات خود با آنها مواجه می‌گردد. به کمک این روش، شناخت بهتری از چگونگی انتقال مواد ساخته شده فتوسنتزی به اندام‌های مختلف و انباشت آنها از طریق اندازه‌گیری ماده خشک تولید شده در طول فصل رشد بدست می‌آید. نتایج این پژوهش نشان داد که تلقیح میکروارگانیسم‌ها در طی رشد رویشی گیاه اثر مثبتی بر افزایش بیوماس گیاه داشته و سرعت رشد در تیمارهای تحت تلقیح منفرد، دوگانه و حتی سه‌گانه در حد معنی‌داری نسبت به شاهد بالاتر بوده‌است. Rasheed و همکاران (۲۰۰۳) نیز گزارش کردند که کاربرد کودهای شیمیایی نیتروژن و فسفر همراه با سایر عناصر پرمصرف و ریزمغذی سرعت رشد گیاه ذرت را نسبت به گیاهان شاهد که کود دریافت نکرده‌اند در حد معنی‌دار افزایش می‌دهد. میکوریز و باکتری‌های PGPR مواد مغذی ماکرو ازجمله نیتروژن، فسفر و پتاسیم و مواد مغذی میکرو مانند آهن، مس، روی و منگنز را برای گیاه تأمین می‌کنند و منجر به تسریع رشد و افزایش بیوماس گیاهی می‌گردند (Aseri *et al*., 2008) و احتمالاً همین امر موجب افزایش سرعت رشد گیاهان می‌شود. نتایج نشان دادند که در تیمارهای دوگانه و سه‌گانه بیشترین افزایش سرعت رشد در فاصله ۳۰-۱۵ روز، اما در تیمار تلقیح منفرد در فاصله ۴۵-۳۰ روز ایجاد می‌شود. از سوی دیگر مشاهدات عینی ما نشان دادند که تیمارهای دوگانه و سه‌گانه در فاصله ۴۵-۳۰ روز، تیمارهای منفرد در فاصله ۶۰-۴۵ و تیمار شاهد از همه دیرتر و پس از ۶۰ روز به گل می‌رود. احتمالاً نسبت زیادتر دسترسی به عناصر غذایی در تیمارهای دوگانه و سه‌گانه باعث می‌شود که گیاهان این تیمار به حداکثر ماده غذایی مورد نیاز خود در همان اوایل رشد دسترسی داشته باشند، اما در تیمارهای منفرد مقادیر کمتر مواد غذایی ابتدا کمتر رشد را تحریک می‌کند و به تدریج که انتقال مواد غذایی از میزبان گیاهی به باکتری‌ها بیشتر می‌شود توان همزیستی میکروارکانیسم‌ها بالاتر می‌رود و در نتیجه در اواسط دوره رشد گیاه را به بالاترین پتانسیل رشد خود می‌رساند که با الگوی گیاهان شاهد تفاوتی ندارد. به هر حال سرعت انباشت ماده خشک در تیمارهای دوگانه و سه‌گانه در فاصله ۴۵-۳۰ روز و در تیمارهای منفرد در فاصله ۶۰-۴۵ روز که منطبق با شروع گلدهی آنهاست کاهش می‌یابد. به هر حال در فاصله ۶۰-۴۵ روز سرعت انباشت وزن خشک در همه تیمارها بجز تیمار گلوموس+ ازتوباکتر بشدت کاهش می‌یابد. این امر می‌تواند به دلایل مختلفی باشد، ازجمله آنکه در این زمان گیاهان وارد مرحله گلدهی شده‌اند و در نتیجه مواد فتوسنتزی بیشتر صرف فرایندهای زایشی شده و انباشت مواد در بیوماس رویشی کاهش می‌یابد. همچنین می‌توان تصور کرد که گل به منزله مخزن فعال‌تری نسبت به میکروارگانیسم‌های مجاور ریشه عمل می‌کند و کاهش دریافت مواد کربنی توسط میکروارگانیسم‌ها کارایی روابط مسالمت‌آمیزشان با گیاهان و نتایج مثبت آنها را در انباشت ماده خشک کاهش می‌دهد. کاهش سرعت رشد با شروع مرحله گلدهی گیاه به‌وسیله اردکانی و همکاران (۱۳۸۹) نیز گزارش شده‌است. به هر حال اینکه به‌طور جالب توجهی تیمار گلوموس+ ازتوباکتر توانسته پتانسیل خود و در نتیجه انباشت ماده خشک در گیاه را حتی پس از ورود به مرحله گلدهی حفظ نماید حکایت از اثر سینرژیست خوب این دو میکروارگانیسم روی هم دارد که توانسته است به پایداری یکدیگر و در نهایت به سرعت انباشت ماده خشک در گیاه بخوبی کمک نماید.

Das و همکاران (۲۰۰۷) در بررسی اثر تلقیح ۲۵ گرم باکتری تثبیت کننده نیتروژن آزواسپریلوم، ۲۵ گرم قارچ میکوریزای آرباسکولار و ۲۵ گرم باکتری حل‌کننده فسفر را روی میزان بیوماس استویا در روزهای ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ روز پس از کاشت دریافتند که سرعت تجمع بیوماس در گیاه تا روز ۴۵ افزایش و بعد تا روز ۶۰ کاهش یافت، ولی بیشترین بیوماس کل گیاه در روز ۶۰ بدست آمد که این منطبق با نتایج ما می‌باشد. اما Das و همکاران (۲۰۰۷) بیشترین میزان و سرعت افزایش بیوماس را در تلقیح سه‌تایی (قارچ میکوریز+باکتری حل‌کننده فسفات+آزواسپیریلوم) به گیاه استویا گزارش کردند، در حالیکه بر طبق نتایج ما بیشترین اثرات در تیمارهای دوگانه بدست آمد. Earanna (۲۰۰۷) گزارش کرده است که تلقیح استویا با ۲۰ گرم گلوموس فسیکولاتوم و ۱۰ میلی‌لیتر از دو باکتری ازتوباکتر کروکوم ($۳/۴\times۱۰^{۸}$cfu ml^{-1})، و سودوموناس فلورسنس ($۲/۸\times۱۰^{۸}$cfu ml^{-1}) و قارچ آسپرژیلوس آواموری ($۴/۳\times۱۰^{۸}$cfu ml^{-1}) به‌صورت مجزا و یا ترکیب با هم، اثرات مثبتی روی رشد گیاه داشت و بیشترین ارتفاع و بیوماس پس از ۹۰ روز از کشت گیاه، در تیمارهای چهارگانه بدست آمد که به عقیده آنها ممکن است به‌دلیل تأمین مواد مغذی مورد نیاز گیاه توسط تثبیت‌کننده نیتروژنی، حل‌کننده فسفات و میکوریز باشد. این نتایج با نتایج ما متفاوت است که احتمالاً به‌دلیل متفاوت بودن جنس و گونه قارچ یا باکتری بکار رفته یا تعداد دفعات تلقیح یا میزان باکتری تلقیح شده در هر بار تلقیح به خاک بوده است و یا به‌علت متفاوت بودن شرایط رویشی گیاه است.

اگرچه از استویوزاید به‌دلیل شیرینی با نام قند یاد می‌شود ولی در حقیقت یک متابولیت ثانویه است که مسیر سنتز آن تا حد زیادی با مسیر سنتز ترپنوئیدها مشترک می‌باشد و بیوسنتز ترکیب‌های ترپنوئیدی به متابولیسم اولیه گیاه، فتوسنتز یا مسیرهای اکسیداتیو کربن و تأمین انرژی و محرک‌های (elicitors) خاص بستگی دارد. نتایج این تحقیق نشان داد که همه تیمارها توانسته‌اند میزان تولید استویوزاید را نسبت به شاهد افزایش دهند. البته اثر مثبت الیسیتورهای میکروبی روی سنتز متابولیت‌های ثانویه به‌وسیله محققان دیگر نیز گزارش شده‌است. به‌عنوان مثال Santoro و همکاران (۲۰۱۱) گزارش کردند که در گیاهان نعناع فلفلی (*Mentha piperita*) تیمار شده با سودوموناس فلورسنس و آزواسپیریلوم برازیلنس میزان اسانس دو برابر بیشتر از گیاهان شاهد بود. همچنین تلقیح گیاه مرزنجوش با سودوموناس فلورسنس نیز موجب افزایش تجمع اسانس و محصول شد (Banchio *et al.*, 2008). Kapoor و همکاران (۲۰۰۸) نیز گزارش کردند که تولید متابولیت‌های ثانویه مثل آرتیمیزین در اثر تلقیح با میکوریزها افزایش یافت.

نتایج نشان دادند که بیشترین میزان استویوزاید پس از ۶۰ روز از اعمال اولیه تیمارها در تیمار ازتوباکتر+گلوموس مشاهده می‌شود. Das و Dang (۲۰۱۰) در هندوستان در بررسی اثر هشت تیمار مختلف حاوی ۵۰۰ گرم قارچ میکوریزای آرباسکولار، ۲۵۰ گرم باکتری تثبیت‌کننده نیتروژن آزواسپریلوم و ۲۵۰ گرم باکتری حل‌کننده فسفات (*باسیلوس مگاتریوم*) را به‌طور منفرد، ترکیب دوتایی و ترکیب سه‌تایی در طی شش ماه در خاک اسیدی روی میزان بیوماس استویا گزارش کردند. بیشترین میزان استویوزاید ۲۰/۱۷٪ پس از شش ماه از تیمار سه‌گانه (قارچ میکوریز + آزواسپیریلوم + باسیلوس) بدست آمد. این نتایج در کلیات، یعنی اثر مثبت میکروارگانیسم‌ها در تحریک سنتز استویوزاید با نتایج این تحقیق منطبق است اما در جزئیات یعنی زمان و اینکه تیمارهای سه‌گانه بیشتر از دیگر تیمارها تحت تأثیر قرار گرفته‌اند با نتایجی که در این مطالعه بدست آمد متفاوت است، که شاید به‌دلیل متفاوت بودن جنس یا گونه یا مقادیر قارچ یا باکتری‌های بکار رفته یا به علت متفاوت بودن شرایط رویشی گیاه و یا به‌علت متفاوت بودن مدت زمان اثر تیمارها روی گیاه در آزمایش ما و آزمایش Das و Dang (۲۰۱۰) باشد.

بررسی الگوی زمانی تجمع استویوزاید (جدول ۲) نشان داد که حداکثر میزان تجمع استویوزاید در همه تیمارها در

فاصله ۴۵-۳۰ روز بدست آمد و در فاصله ۶۰-۴۵ روز با ورود به مرحله گلدهی همه تیمارها تنزل پیدا کرد. بنابراین به نظر می‌رسد الگوی تجمع استویوزاید بیشتر تابع ژنتیک گیاه بوده و اوج میزان آن در اواسط رشد رویشی رخ می‌دهد و کمتر تحت تأثیر تیمارهای میکروارگانیسمی و یا حتی الگوی رشد گیاه قرار گرفته است. اما به هر حال همانند سرعت رشد در تیمارهای دوگانه و مخصوصاً تیمار ازتوباکتر+گلوموس بالاتر بوده و در فاصله ۶۰-۴۵ روز با ورود به مرحله گلدهی نیز کمتر کاهش یافته است. احتمالاً اثر سینرژیستی ازتوباکتر و گلوموس نسبت مناسبی از آب و عناصر را برای گیاه مهیا نموده و گیاه نیز به‌دلیل بهره‌مندی از مزایای این همزیستی بین مخزن گل و مخزن میکربی ریشه توازنی برقرار کرده که نتیجه این توازن به‌صورت بقای سرعت تجمع ماده خشک و حتی توان تولید متابولیت ثانویه استویوزاید پدیدار شده است.

در کل بیشترین میزان پارامترهای رشد بخش هوایی و استویوزاید در تیمار ازتوباکتر+گلوموس بدست آمد. شاید به این دلیل است که گلوموس جذب فسفر و ریزمغذی‌ها را برای گیاه افزایش داده و ازتوباکتر هم با تثبیت نیتروژن دسترسی به منابع نیتروژن را برای گیاه هموارتر کرده و تعادل مناسب‌تری از عناصر نیتروژن، فسفر و پتاسیم ایجاد شده است و در نتیجه منجر به رشد بهتر گیاه و سنتز بالاتری از استویوزاید شده است (Vafadar *et al*., 2014). در تمام صفات مورد بررسی مشاهده شد که تیمارهای سه‌گانه میکروارگانیسم‌ها نسبت به تیمارهای دوگانه و حتی در مواردی نسبت به تیمارهای منفرد میکروارگانیسم‌ها پاسخ‌های کمتری نشان دادند. شاید این امر به‌دلیل رقابت بیش از حد میکروارگانیسم‌ها در تیمارهای سه‌گانه ایجاد شده، به‌طوری که به جای اینکه اثر مطلوبی روی رشد گیاه داشته باشند در جذب مواد کربنی از گیاه دچار رقابت می‌شوند و در نتیجه عمل یکدیگر را محدود می‌کنند. در مجموع به نظر می‌رسد که انتخاب ترکیب‌های سازگار و مناسب از باکتری‌های PGPR و میکوریزها می‌تواند به‌طور مناسبی هم رشد گیاه استویا را تحریک کند و هم میزان گلیکوزید استویوزاید را افزایش دهد و از نتایج این تحقیق چنین استنتاج می‌شود که ترکیب گلوموس+ازتوباکتر گزینه مناسبی برای تهیه کود بیولوژیک برای استویاست.

سپاسگزاری

به این وسیله از مسئولان محترم پژوهشکده بیوتکنولوژی منطقه مرکزی کشور و معاونت پژوهشی دانشگاه شهرکرد که با حمایت مالی و آزمایشگاهی امکان انجام این تحقیق را فراهم کردند و جناب آقای دکتر جواد هاشمی که در بخش HPLC و سرکار خانم دکتر گیتی امتیازی که در بخش میکروبی این پژوهش ما را کمک کردند، تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع مورد استفاده

- Ahmed, M.B., Salahin, M., Karim, R., Razvy, M.A., Hannan, M.M., Sultana, R., Hossain, M.M. and Islam, R., 2007. An efficient method for in vitro clonal propagation of a newly introduced sweetener plant (*Stevia rebaudiana* Bertoni.) in Bangladesh. American-Eurasian Journal of Scientific Research, 2(2): 121-125.
- Ali, A., Gull, I., Nas, S. and Afghan, S., 2010. Biochemical investigation during different stages of in vitro propagation of *Stevia rebaudiana*. Pakistan Journal of Botany, 42(4): 2827-2837.
- Aseri, G.K., Jain, N., Panwar, J., Rao, A.V. and Meghwal, P.R., 2008. Biofertilizers improve plant growth, fruit yield, nutrition, metabolism and rhizosphere enzyme activities of Pomegranate (*Punica granatum* L.) in Indian Thar desert. Scientia Horticulturae, 117(2): 130-135.
- Banchio, E., Bogino, P.C, Zygadlo, J. and Giordano, W., 2008. Plant growth promting rhizobacteria improve growth and essential oil yield in *Origanum majorana* L. Biochemical Systematics and Ecology, 36(10): 766-771.
- Barea, J., Pozo, M.J., Azcon, R. and Azcón-Aguilar, C., 2005. Microbial co-operation in the rhizosphere. Journal of Experimental Botany, 56(417): 1761-1778.
- Buttery, B.R., 1969. Analysis of the growth of soybeans as affected by plant production and fertilizer. Canadian Journal of Plant Science, 49(6): 675-684.

- Cardello, H.M.A.B., Da Silva, M.A.P.A. and Damasio, M.H., 1999. Measurement of the relative sweetness of *Stevia* extract, aspartame and cyclamate/saccharin blend as compared to sucrose at different concentrations. Plant Food for Human Nutrition, 54(2): 119-129.
- Das, K. and Dang, R., 2010. Influence of biofertilizers on stevioside content in *Stevia rebaudiana* grown in acidic soil condition. Archives of Applied Science Research, 2(4): 44-49.
- Das, K., Dang, R., Shivananda, T.N. and Sekeroglu N., 2007. Influence of bio-fertilizers on the biomass yield and nutrient content in *Stevia rebaudiana* Bert. grown in Indian subtropics. Journal of Medicinal Plants Research, 1: 005-008.
- Debnath, M., 2008. Clonal propagation and antimicrobial activity of an endemic medicinal plant *Stevia rebaudiana*. Journal of Medicinal Plants Research, 2: 45-51.
- Earanna, N., 2007. Response of *Stevia rebaudiana* to biofertilizers. Karnataka Journal of Agricultural Sciences, 20: 616-617.
- Frey-Klett, P., Garbaye, J. and Tarkka, M., 2007. The mycorrhiza helper bacteria revisited. New Phytologist, 176: 22-36.
- Geuns, J.M.C., 2003. Molecules of interest: stevioside. Phytochemistry, 64(5): 913-921.
- Gosling, P., Hodge, A., Goodlass, G. and Bending, G.D., 2006. Arbuscular mycorrhizal fungi and organic farming. Agriculture, Ecosystems and Environment, 113(1-4): 17-35.
- Gray, E.J. and Smith D.L., 2005. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant bacterium signaling processes. Soil Biology and Biochemistry, 37(3): 395-412.
- Holt, J.G., 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Lippincott Williams & Wilkins, 787p.
- Johansson, J.F., Paul, L.R. and Finlay, R.D., 2004. Microbial interactions in the mycorrhizosphere and their significance for sustainable agriculture. FEMS Microbiology Ecology, 48:1-13.
- Jones, D.L., Nguyen, C. and Finlay, R.D., 2009. Carbon flow in the rhizosphere: carbon trading at the soil-root interface. Plant and Soil, 321: 5-33.
- Kapoor, R., Sharma, D. and Bhatnagar, A.K., 2008. Arbuscular mycorrhizal in micropropagation systems and their potential application. Scientia Horticulturae, 116(3): 227-239.
- Kedik, S.A., Fedorov, S.V., Yanul, N.A., Prokhorova, L.V., Smirnova, E.V. and Panov, A.V., 2003. Chromatographic Determination of stevioside in raw plant material. Pharmaceutical Chemistry Journal, 37(10): 529-532.
- Khalid, A., Arshad, M. and Zahir, Z.A., 2004. Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. Journal of Applied Microbiology, 96(3): 473-480.
- Kolb, N.J., Herrera, L., Ferreyra, D.J. and Uliana, R.F., 2001. Analysis of sweet diterpene glycosides from *Stevia rebaudiana*: improved HPLC method. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49(10): 4538-4541.
- Madan, S., Ahmad, S., Singh, G.N., Kohli, K., Kumar, Y., Singh, R. and Garg, M., 2010. *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni-a review. Indian Journal of Natural Products and Resources, 1: 267-287.
- Mamta R.P., Pathaniad, V. and Gulatic, A., 2010. Stimulatory effect of phosphate solubilizing bacteria on plant growth, stevioside and rebaudioside- a contents of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Applied Soil Ecology, 46: 222–229.
- Mishra, P.K., Singh, R., Kumar, U. and Prakash, V., 2010. *Stevia rebaudiana*-a magical sweetener. Global Journal of Biotechnology and Biochemistry, 5: 62-74.
- Morone-Fortunato, I. and Avato, P., 2008. Plant development and synthesis of essential oils in micropropagated and mycorrhiza inoculated plants of *Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 93(2): 139-149.
- Murashig, T. and Skoogs, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15(3): 473-497.
- Naz, I and Bano, A., 2010. Biochemical, molecular characterization and growth promoting effects of phosphate solubilizing *Pseudomonas* sp. isolated from weeds grown in salt range of Pakistan. Plant Soil, 334: 199-207.
- Pikovskaya, R.I., 1948. Mobilization of phosphorus in soil in connection with the vital activity of some microbial species. Microbiology, 17: 362-370.
- Radford, P.J., 1967. Growth analysis formulae: their use and abuse. Crop Science, 7(3): 171-175.
- Rafiq, M., Umardahot, M., Mangrio, S.M., Naqvi, H.A. and Qarshii, I.A., 2007. In vitro clonal propagation and biochemical analysis of field established *Stevia rebaudiana* Bertoni. Pakistan Journal of Botany, 39(7): 2467-2474.
- Rai, M.K., 2001. Current advances in mycorrhizal in micropropagation. In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant, 37(2): 158-167.
- Rasheed, M., Hussain, A. and Mahmood, T., 2003. Growth analysis of hybrid maize as influenced by planting techniques and nutrient management.

- Vafadar, F., Amooaghaie R. and Otroshy, M., 2014. Effects of plant-growth-promoting rhizobacteria and arbuscular mycorrhizal fungus on plant growth, stevioside, NPK, and chlorophyll content of *Stevia rebaudiana*. Journal of Plant Interactions, 9(1): 128-136.
- Van Loon, L.C., 2007. Plant responses to plant growth promoting rhizobacteria. European Journal of Plant Pathology, 119(3): 243-254.
- Vessey, J.K., 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. Plant and Soil, 255(2): 571-586.
- Willey, J.M., Sherwood, L.M. and Woolverton, C., 2009. Prescott's Principles of Microbiology. McGraw Hill Higher Education, 960p.
- Woelwer-Rieck, U., Lankes, C., Wawrzun, A. and Wüst, M., 2010. Improved HPLC method for the evaluation of the major steviol. glycosides in leaves of *Stevia rebaudiana*. Europen Food Research and Technology, 231(4): 581-588.

International Journal of Agriculture and Biology, 5(2): 169-171.
- Rillig, M.C. and Mummey, D.L., 2006. Mycorrhizas and soil structure. New Phytologist, 171: 41-53.
- Robin, A., Vansuyt, G., Hinsinger, P., Meyer, J.M., Briat, J.F. and Lemanceau, P., 2008. Iron dynamics in the rhizosphere: consequences for plant health and nutrition. Advances in Agronomy, 99: 183-225.
- Russo, A., Vettori, L., Felici, C., Fiaschi, G., Morini, S. and Toffanin, A., 2008. Enhanced micropropagation response and biocontrol effect of *Azospirillum brasilense* on *Pruny cerasifera* plants. Journal of Biochemistry, 134(3-4): 312-319.
- Santoro, M.V., Zygadlo, J., Giordano, W. and Banchio, E., 2011. Volatile organic compounds from rhizobacteria increase biosynthesis of essential oils and growth parameters in peppermint (*Mentha piperita*). Plant Physiology and Biochemistry, 49(1): 1177-1182.

Effect of mycorrhiza and plant growth promoting rhizobacteria on plant growth rate, flowering time and stevioside accumulation pattern in *Stevia rebaudiana* Bert.

M. Otroshy[1], F. Vafadar Esfehan[2] and R. Amooaghaie[3*]

1- Department of Tissue Culture, Agricultural Biotechnology Research Institute, Center region of Iran (ABRII), Isfahan, Iran
2- MSc. Student, Department of Biology, Faculty of Science, Shahrekord University, Shahrekord, Iran
3*-Corresponding author, Department of Biology, Faculty of Science, Shahrekord University, Shahrekord, Iran
E-mail: Rayhanehamooaghaie@yahoo.com

Received: January 2013 Revised: August 2013 Accepted: September 2013

Abstract

Stevia rebaudiana Bert. is a medicinal plant, mostly utilized as a suitable sweeter for diabetic patients. In this research, the effect of single or co-inoculation of Arbuscular Mycorrhiza Fungi (AMF) and bacteria (*Bacillus polymixa, Pesudomonas putida and Azotobacter chroococcuom*) on regenerated plantlets in tissue culture was investigated in intervals of 15, 30, 45, 60 days after planting. Results showed that in comparison to control, inoculation with single and triple treatments significantly increased length, fresh and dry weight of aerial parts and stevioside content until 60 days after planting while the best enhancement was observed in dual inoculations especially in *Glomus+Azotobacter* treatments. Interestingly, in dual or triple inoculations, maximum relative growth rate was obtained in 15-30 days and reduced in 30-45 days after planting that was in accordance with their flowering time but in single inoculation maximum relative growth rate was available in 30-45 days and with promoting of flowering phase in 45-60 days declined severely. However, maximum stevioside accumulation rate was obtained 30-45 days after planting in all treatments and in 45-60 days after planting reduced severely in single or triple inoculations and more slightly in dual inoculations. Therefore, microorganisms affect relative growth rate, phenology and stevioside accumulation pattern in stevia.

Keywords: Azotobacter, *Bacillus*, *Glomus*, *Pseudomonas*.