https://ijpb.ui.ac.ir/?lang=en
Journal of Plant Biological Sciences
E-ISSN: 3041-9603
Vol. 15, Issue. 3, No. 57 Autumn 2023
Document Type: Research Paper
Received: 15/11/2023 Accepted: 26/08/2024

Improving physiological traits and germination parameters *Serendipita indica* inoculated chicory plants under nickel stress

Zahra Soleimanpour Rekhneh, Zahra Movahedi *, Mehdi Ghabooli, Majid Rostami

Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Malayer University, Malayer, Iran

Abstract

Heavy metal stress is one of the most important factors limiting the growth and yield of plants in many parts of the world. As a mycorrhizal endophytic fungus, *Serendipita indica* stimulates the growth of many plant species and increases resistance to biotic and abiotic stresses. In this research, the combined effect of *S. indica* endophytic fungus and nickel nitrate (control, 50, 100, and 200 mg/L) on chicory germination has been investigated according to a factorial experiment based on completely randomized design (CRD) with 3 replications. The results showed that the interaction effect of nickel nitrate and fungus was significant for the percentage and rate of germination, root length, shoot length, fresh and dry weight of seedlings, and chlorophyll. Also, the results showed that the main effect of nickel nitrate was significant for phenol, proline, and antioxidant enzymes, whereas the amounts of phenol, proline, catalase, and peroxidase increased by 40, 35, 33 and 42%, respectively, at the level of 50 mg/L of nickel nitrate compared to the control. Based on the results, treatment with the endophytic fungus increased traits such as germination percentage and rate, root and shoot length, seedling fresh and dry weight, and chlorophyll and reduced the negative effects of nickel nitrate in these traits. On the other hand, nickel nitrate treatment increased the content of total phenol, proline, and antioxidant enzymes. Therefore, it seems that the use of symbiotic endophyte fungus can be considered a suitable solution to reduce the negative effects of heavy metals.

Introduction

Heavy metals are frequently encountered contaminants in diverse soils and their presence can have adverse impacts on crop yields and agricultural production, thereby jeopardizing the sustainability of farming practices. The unprincipled disposal of sewage sludge and industrial effluents in farming fields has also given rise to nickel (Ni) accumulation in soils used for vegetable production and irrigated with untreated

* Corresponding Author: zahra_movahedi_312@yahoo.com

3041-9603 © University of Isfahan
This is an open access article under the CC BY-NC-ND/4.0/ License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

DOI. 10.22108/IJPB.2024.139807.1343

wastewater. Ni can thus harm some tissues; it is further suspected of being responsible for some types of cancer. Several reclamation techniques are available to address the life-threatening issues arising from potentially Ni-contaminated soils. One promising and environmentally friendly alternative is harnessing beneficial root-colonizing microbes. As a mycorrhizal endophytic fungus, *Serendipita indica* stimulates the growth of many plant species and increases resistance to biotic and abiotic stresses. This approach holds potential for the sustainable development of agriculture systems, offering a cost-effective way to enhance plant growth and increase the tolerance of crops to Ni stress. The present study was conducted to examine the possible protective role of *S. indica* inoculation under Ni toxicity in chicory germination.

Material and Methods

In this research, the combined effect of *S. indica* endophytic fungus and nickel nitrate (control, 50, 100, and 200 mg/L) on chicory germination has been investigated according to a factorial experiment based on completely randomized design (CRD) with 3 replications. The first chicory seeds were treated with 5.0% sodium hypochlorite for 5 min and then with 70.0% ethanol for 30 s for surface sterilization. Then, they were washed three times with distilled water. Spore extract was added to the Petri dishes for inoculation, except for the control treatments without *S. indica*. In total, 30 seeds of chicory were used for each Ni nitrate [$Ni(NO_3)^2$] stress treatment (50, 100, and 200 mg/L) and were placed in Petri dishes containing two layers of Whatman No 2.0 filter paper moistened with 10 mL of solutions or distilled water as the control. The stock solutions of Ni nitrate were further prepared in distilled water at the desired concentrations and diluted with distilled water to obtain suitable concentrations. Double-distilled water was applied as the control treatment. The Petri dishes were then located in a germinator with a temperature of 25 ℃ and a 16/8 h light/dark cycle. The measured traits also included percentage and rate of germination, seedling's fresh and dry weights, shoot length, root length, proline, phenol content, catalase, and peroxidase. The obtained data were analyzed using SPSS statistical software. Mean comparisons were conducted using Duncan's multiple range test at a significant level of 1%.

Results and Discussion

The results showed that the interaction effect of nickel nitrate and fungus was significant for the percentage and rate of germination, root length and shoot length, dry weight of seedlings, and chlorophyll a and -b. The impact of Ni and *S. indica* on seed germination and early stage of plant growth was measured. It was observed that Ni treatment decreases the percentage and rate of germination. In treatments of Ni without fungal spore at 50, 100, and 200 mg/L a reduced seed germination rate. While inoculation of fungal spores (Si+Ni) increased seed germination compared with the control ones. As shown, *S. indica* inoculation augmented the seedlings' fresh and dry weight compared to non-inoculated plants. Exposure of chicory plants to 200 mg/L Ni resulted in a marked decrease in seedling's fresh and dry weight compared to control plants. The toxic effect of Ni on biomass was significantly mitigated by *S. indica*. The root length and shoot height were significantly decreased by the supply of Ni. Under Ni stress, root length, and shoot height were significantly enhanced due to the presence of *S. indica*. Also, the results showed that the main effect of nickel nitrate was significant for phenol, proline, and antioxidant enzymes, whereas the amounts of phenol, proline, catalase, and peroxidase increased by 40, 35, 33 and 42%, respectively, at the level of

50 mg/L of nickel nitrate compared to the control. Based on the results, treatment with the endophytic fungus increased traits such as germination percentage and rate, root and shoot length, seedling fresh and dry weight, and chlorophyll and reduced the negative effects of nickel nitrate in these traits. On the other hand, nickel nitrate treatment increased the content of total phenol, proline, and antioxidant enzymes.

Conclusion
This study revealed that *S. indica* treatment significantly and positively enhanced most measured traits and improved the growth performance of chicory seedlings under Ni toxicity stress. The results of this study confirm that the use of symbiotic endophyte fungus can be considered a suitable solution to reduce the negative effects of heavy metals.

Keywords: Antioxidant activity, Chicory, Endophytic fungus, Germination.

علوم زیستی گیاهی، سال پانزدهم، شمارهٔ پیاپی پنجاه و هفتم، پاییز ۱۴۰۲، صفحه ۱۱۴- ۹۷
تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۰۸/۲۴
تاریخ بررسی مجدد: ۱۴۰۳/۰۵/۲۷
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۴۰۳/۰۶/۰۵
مقاله پژوهشی

بهبود فاکتورهای جوانه‌زنی در کاسنی تلقیح شده با قارچ *Serendipita indica* تحت تأثیر تنش نیترات نیکل

زهرا سلیمان‌پور رخنه، زهرا موحدی*، مهدی قبولی، مجید رستمی
گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ملایر، ملایر، ایران

چکیده

تنش فلزات سنگین یکی از مهمترین عوامل محدود کنندهٔ رشد و عملکرد گیاهان در بسیاری از مناطق دنیا است. قارچ *Serendipita indica* به عنوان یک قارچ اندوفیت شبه میکوریزی سبب تحریک رشد بسیاری از گونه‌های گیاهی شده و منجر به افزایش مقاومت به تنش‌های زیستی و غیرزیستی می شود. در پژوهش حاضر، تأثیر تلفیقی قارچ اندوفیت *S. indica* و نیترات نیکل (شاهد، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر) بر جوانه‌زنی گیاه کاسنی به صورت آزمایش فاکتوریل و در قالب طرح کامل تصادفی با ۳ تکرار بررسی شده است. نتایج نشان دادند تأثیر متقابل نیترات نیکل و قارچ برای درصد و سرعت جوانه‌زنی، طول ریشه‌چه و ساقه‌چه، وزن تر و خشک گیاهچه و کلروفیل معنی‌دار بود. همچنین نتایج نشان دادند برای میزان فنول، پرولین و آنزیم‌های آنتی اکسیدانی اثر ساده نیترات نیکل معنی‌دار بود، به طوری‌که مقادیر فنول، پرولین، کاتالاز و پراکسیداز به ترتیب ۴۰، ۳۵، ۳۳ و ۴۲ درصد در تیمار ۵۰ میلی‌گرم در لیتر نیترات نیکل نسبت به شاهد، افزایش یافت. بر اساس نتایج، تیمار توسط قارچ سبب افزایش صفاتی از جمله درصد و سرعت جوانه‌زنی، طول ریشه‌چه و ساقه‌چه، وزن تر و خشک گیاهچه و کلروفیل و کاهش اثرات منفی نیترات نیکل در این صفات شد. از طرف دیگر تیمار نیترات نیکل منجر به افزایش محتوای فنول کل، پرولین و آنزیم‌های آنتی اکسیدان شد. بنابراین به نظر می‌رسد کاربرد قارچ‌های همزیست اندوفیت می‌تواند به عنوان یک راهکار مناسب برای کاهش اثرات منفی فلزات سنگین در نظر گرفته شود.

واژه‌های کلیدی: جوانه‌زنی، فعالیت آنتی اکسیدانی، قارچ اندوفیت، کاسنی.

* نگارندهٔ مسؤول: نشانی پست الکترونیک: zahra_movahedi_312@yahoo.com، شمارهٔ تماس: ۰۹۳۵۱۶۲۶۸۵۹

3041-9603 © University of Isfahan
This is an open access article under the CC BY-NC-ND/4.0/ License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

DOI. 10.22108/IJPB.2024.139807.1343

مقدمه

گیاه کاسنی (*Cichorium intybus* L.) متعلق به خانواده Asteracea یا خانواده کاسنی است که در دهه‌های جدید به علّت اهمیتی که گیاهان دارویی نسبت به داروهای با منشاء شیمیایی پیدا کرده‌اند، این گیاه مورد توجه خاصی قرار گرفته و از آن در جهت درمان مشکلات گوارشی، کبد و کیسه صفرا استفاده می‌شود. استفاده از این گیاه برای رفع قولنج‌های کبدی، زردی، بیماری‌های مزمن پوست، عفونت مجاری ادرار مفید بوده و تاثیرات مثبتی شامل تصفیه‌کنندگی خون، ملین بودن، تب بری و رفع کم‌خونی دارد (Ahvazi et al., 2010). مصرف کاسنی به علّت مقادیر زیاد اسید سیتریک، سبب بهبود سیستم ایمنی در برابر التهاب و عفونت باکتریایی می‌شود (Ahmad, 2009). تنش‌های محیطی سبب کاهش عملکرد محصولات کشاورزی در سطح جهان می‌شوند (Upendra & Bandyopadhyay, 2006). آلودگی خاک با فلزات سنگین از تنش‌های محیطی است که اثرات فیزیولوژیکی مضری بر موجودات زنده و از جمله انسان دارند و حتی در غلظت‌های کم نیز سرطان‌زا است (Bafeel, 2010). آلوده شدن زمین‌های کشاورزی با فلزات سنگین که عدد اتمی بالاتر از ۲۰ و چگالی بالاتر از پنج گرم بر سانتی‌متر مکعب دارند، یکی از مسائل مهم زیست محیطی است (Alloway, 2010). برخی فلزات سنگین مانند مس، روی، نیکل، مولیبدن، منگنز و آهن به‌عنوان عناصر کم مصرف، در مقادیر کم سبب رشد و نمو گیاه می‌شوند، ولی مقدار اضافی آنها نیز منجر به اختلال در فرآیندهای فیزیولوژیکی و ریخت شناسی گیاهان می‌شود. همچنین فلزات سنگینی مانند سرب، کادمیوم، کروم و جیوه در غلظت‌های بسیار کم برای گیاهان سمی هستند (Sebastiani Rubio et al., 2012; et al., 2004).

نیکل از عناصر ضروری کم مصرف است که فعالیت آنزیم اوره‌آز در گیاهان به آن وابسته است. این فلز به فرم‌های مختلف در محیط‌های آبی، خاکی و همچنین در پیکره گیاهان و جانوران وجود دارد. با افزایش آلودگی‌های زیست‌محیطی، نیکل وارد زنجیره غذایی موجودات زنده شده و میزان آن به طور معنی‌داری افزایش یافته است (Cempel & Nikel, 2006). مقادیر بالای نیکل، فرآیندهای فیزیولوژیکی گیاهان از قبیل فتوسنتز، انتقال مواد آلی، تغذیه معدنی و توازن آب بافت‌ها را کاهش می‌دهد (Pegon, 1985). تأثیر سمی نیکل با بروز علائمی مانند کلروز و نکروز و پژمردگی برگ‌ها آشکار می‌شود (Parida et al., 2003). بخش دیگری از تأثیرات سمی نیکل، توسط تنش اکسیداتیو القا شونده بر گیاهان وارد می‌شود (Baccouch et al., 2001).

کاربرد روش‌های زیست شناختی مانند قارچ‌های اندوفیت جهت افزایش تحمّل گیاهان به تنش‌های محیطی مانند آلودگی خاک به فلزات سنگین، پژوهشگران را در رسیدن به اهداف کشاورزی پایدار امیدوار نموده است. یکی از این قارچ‌های اندوفیت مفید، قارچ *Serendipita indica* است که در سال ۱۹۹۸توسط پژوهشگری به نام وارما و همکارانش در کشور هندوستان از خاک مناطق بیابانی جداسازی شد (Varma et al., 1998). این قارچ دارای گیاهان میزبان فراوانی است

که با همسانه سازی ریشه گیاه میزبان، سبب تحریک رشد می‌شود. *S. indica* با تعداد زیادی از گیاهان عالی (تک و دولپه‌ای)، از جمله گیاهان خشکی‌پسند، بوته‌ای یک‌ساله و چندساله و درختان چوبی رابطه همزیستی برقرار می‌نماید (Singh et al., 2000; Varma et al., 1998). قارچ‌های میکوریزی به‌عنوان همزیست اجباری گیاهان میزبان مطرح هستند، ولی قارچ *S. indica* یک همزیست اختیاری بوده و در محیط‌های کشت مصنوعی به راحتی رشد می‌کند (Qiang et al., 2011).

سمّیت ناشی از غلظت‌های بالای نیکل و ضرورت وجود آن برای رشد، نشان‌دهنده اهمّیت شناخت علائم مسمومیت این عنصر در گیاهان را آشکار می‌کند. همچنین اطلاع از میزان جذب آن توسط گیاهان در خاک‌های آلوده به نیکل اهمیت دارد. اگرچه نیکل یک ریز مغذی ضروری برای گیاهان است، امّا در غلظت‌های زیاد در بیشتر گونه‌های گیاهی سمّی است (Eskandari et al., 2017). جوانه‌زنی بذر، اولین فرآیند فیزیولوژیکی است که به طور بالقوه تحت تأثیر غلظت بالای نیکل در خاک قرار می‌گیرد. بنابراین توانایی جوانه زدن بذر در محیط حاوی نیکل زیاد، ممکن است نشان دهنده سطح تحمّل آن به این عنصر سمّی باشد، اگرچه به نظر می‌رسد سمیت نیکل بر رشد گیاهچه نسبت به جوانه‌زنی تأثیر بیشتری دارد (Eskandari et al. 2017). پژوهش تأثیر نیکل بر صفات و ویژگی‌های مورفوفیزیولوژیکی گیاهان و شناسایی آستانه تحمل نسبت به غلظت‌های مختلف این فلز در شرایط کنترل شده، می‌تواند در بهبود کیفیت گیاهان و محصولات زراعی و افزایش بازده آن‌ها مفید باشد. بنابراین هدف از انجام این تحقیق بررسی تأثیر تلفیقی نیترات نیکل و تلقیح با قارچ اندوفیت *Serendipita indica* بر جوانه‌زنی گیاه کاسنی است.

مواد و روش‌ها

این آزمایش به‌صورت فاکتوریل و در قالب طرح کامل تصادفی و در سه تکرار انجام شد. قارچ *S. indica* (شاهد و اسپور تهیه شده از پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران) به‌عنوان فاکتور اول و سطوح مختلف نیترات نیکل (شاهد، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر) به عنوان فاکتور دوم در نظر گرفته شد. هر تکرار یک پتری دیش حاوی ۳۰ عدد بذر بود.

کشت قارچ و آماده سازی اسپور: جدایه قارچ *S. indica* بر اساس روش پیشنهادی قبولی و همکاران (Ghabooli et al., 2013) در تعداد ۱۲ پتری‌دیش حاوی محیط کشت پیچیده (حاوی عناصر میکرو، ماکرو، نمک‌ها، پیتون و عصاره مخمر)، کشت شده و در درون شیکر انکوباتور با دمای ۲۴ °C به مدت ۴ هفته نگهداری شد. پس از گذشت مدّت زمان لازم جهت تولید اسپور، مقدار ۳۰-۲۰ میلی‌لیتر محلول آب توئین ۲۰ درصد به هر پتری دیش افزوده، اسپورهای قارچ جمع‌آوری شده و تعداد آن‌ها با لام نئوبار شمارش شدند.

آماده سازی و تلقیح بذر: بذر گیاه دارویی کاسنی از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شد. ضدعفونی سطحی بذرها با هیپوکلرید سدیم

۵ درصد به مدّت ۵ دقیقه، سه بار شستشو با آب مقطر و سپس با الکل (اتانول ۷۰ درصد) به مدّت ۳۰ ثانیه و سه بار شستشو با آب مقطر انجام شد. پس از ضدعفونی، بذرها به مدت ۲۴ ساعت در سوسپانسیون اسپور قرار داده شدند و سپس اعمال تیمار نیترات نیکل (شاهد، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر) روی گیاهان تلقیح شده انجام شد. انتخاب این مقادیر بر اساس بررسی منابع و آزمایش‌های اولیه بود. تمامی تیمارها به علاوه شاهد در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد ژرمیناتور (۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی) و رطوبت نسبی ۴۵ درصد قرار داده شدند. برای اثبات کلنیزاسیون، بین ۷ تا ۱۰ روز پس از تلقیح، از ریشه‌های گیاهان تلقیح‌شده و شاهد نمونه‌برداری و با روش‌های میکروسکوپی و با رنگ تریفان بلو، وجود کلامیدوسپورهای قارچ بررسی شد.

بررسی صفات ریخت شناسی و فیزیولوژیک

۲۴ ساعت پس از شروع آزمایش، تعداد بذرهای جوانه زده شمارش شده و تا پایان آزمایش (۲۱ روز بعد) ادامه یافت. همچنین صفات مرتبط با جوانه‌زنی از جمله درصد جوانه‌زنی کل، سرعت جوانه‌زنی، طول ریشه‌چه، طول ساقه‌چه، وزن تر و خشک گیاهچه یادداشت شد. آزمایش جوانه‌زنی در داخل ژرمیناتور و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انجام شد. برای سنجش وزن خشک، گیاهچه‌ها به مدّت ۴۸ ساعت در آونی با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شده و سپس با ترازوی دیجیتالی با دقت یک هزارم گرم توزین شدند. درصد جوانه‌زنی نهایی از رابطه‌ی شماره ۱ (Ranal & De Santana, 2006) محاسبه شد.

رابطه‌ی (۱): $$GP = \left(\frac{N_g}{N_t}\right) \times 100$$

در رابطه فوق، GP درصد جوانه‌زنی کل، N_g تعداد کل بذرهای جوانه زده در پایان آزمایش و N_t برابر با تعداد کل بذرهای مورد استفاده در آزمایش است. برای محاسبه سرعت جوانه‌زنی از رابطه‌ی شماره ۲ استفاده شد که در این رابطه، GR سرعت جوانه‌زنی، Ni تعداد بذور جوانه‌زده در روز مورد نظر و Di تعداد روزهای سپری شده از شروع آزمایش است (Abdolrahmani, 2010).

رابطه‌ی (۲): $$GR = \sum_{i=1}^{n} \frac{Ni}{Di}$$

سنجش محتوای کلروفیل با روش Arnon (1949) و با استون ۸۰ درصد صورت گرفت و میزان کلروفیل در طول‌موج‌های ۶۶۳ و ۶۴۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. برای اندازه‌گیری پرولین از روش Bates و همکاران (1973) استفاده و غلظت آن در طول‌موج ۵۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. استخراج و اندازه‌گیری فنول کل به روش Zhu & Yao (2004) انجام شد. جهت انجام این آزمایش‌ها به ۰/۵ میلی‌لیتر از هر عصاره (۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) ۲/۵ میلی‌لیتر واکنش‌گر فولین – سیو کالتیو ۰/۲ نرمال افزوده شد. پس از ۵ دقیقه ۲ میلی‌لیتر از محلول ۷۵ گرم بر لیتر کربنات سدیم به آن اضافه شد. پس از ۲ ساعت، جذب مخلوط در طول موج ۷۶۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (Jenway 6035, UK) در مقابل بلانک خوانده شد. در نهایت با منحنی استاندارد غلظت‌های مختلف اسید گالیک برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر تعیین شد. فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز با روش Nakano & Asada (1981) اندازه‌گیری شد. مخلوط واکنشی (یک میلی‌لیتر) شامل ۲۵۰ میکرولیتر از محلول بافر

فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار با pH خنثی، ۲۵۰ میکرولیتر از آسکوربات یک میلی‌مولار، ۲۵۰ میکرولیتر از EDTA ۰/۴ میلی‌مولار، ۱۹۰ میکرولیتر آب دو بار تقطیر، ۱۰ میکرولیتر از پراکسید هیدروژن ۱۰ میلی‌مولار و ۵۰ میکرولیتر از محلول آنزیمی استخراج شده بود. سرعت واکنش آنزیمی به‌صورت تغییرات جذب بر زمان در طول موج ۲۹۰ نانومتر برای یک دقیقه ثبت شده و فعالیت آنزیم کاتالاز به روش Bergmeyer (1970) و بر اساس میزان ناپدیدشدن آب‌اکسیژنه در طول‌موج ۲۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.در نهایت تجزیه آماری بر اساس آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی، با نرم افزار آماری SPSS انجام شده و برای بیان تفاوت‌های آماری بین میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن استفاده شد.

نتایج و بحث

درصد و سرعت جوانه زنی

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان دادند تأثیر متقابل سطوح مختلف نیترات نیکل در قارچ اندوفیت *S. indica* برای صفات درصد و سرعت جوانه‌زنی در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. نتایج مقایسه میانگین نشان دادند بیشترین درصد جوانه‌زنی (۹۸/۳ درصد) در تیمار تلقیح با قارچ و در عدم حضور نیترات نیکل و کمترین درصد جوانه‌زنی (۵۲/۰۹ درصد) مربوط به ترکیب تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر نیترات نیکل و عدم تلقیح با قارچ *S. indica* بود (جدول ۲). به عبارت دیگر با افزایش غلظت نیترات نیکل به ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر ۱۳، ۴۱ و ۷۵ درصد از جوانه‌زنی بذور نسبت به شاهد کاسته شد. این تأثیر مضر نیترات نیکل با تلقیح قارچ *S. indica* به‌صورت ۱۲، ۳۴ و ۵۹ درصد بود که به ترتیب نشانگر تأثیر مثبت ۱، ۷ و ۱۶ درصدی کاربرد این قارچ است. بر اساس نتایج مقایسه میانگین بیشترین سرعت جوانه‌زنی (۰/۰۶۵ بذر در ساعت) به تیمار تلقیح با قارچ و عدم‌حضور نیترات نیکل و کمترین آن به تیمار تلقیح نشده و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر نیترات نیکل (۰/۰۳۸ بذر در ساعت) مربوط بود (شکل ۱). با افزایش غلظت نیترات نیکل به ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر، ۷۵ درصد از سرعت جوانه‌زنی بذور نسبت به شاهد کاسته شد. این تأثیر مضر نیترات نیکل با تلقیح قارچ *S. indica* به مقدار ۱۸ درصد افزایش یافت. پاسخ‌های گوناگون به سمیت ایجاد شده توسط فلزات سنگین به گونه گیاهی، مرحله رشد، شرایط کشت، غلظت و مدت‌زمان تیماردهی بستگی دارد (Chen et al., 2009) . تأثیر مهارکنندگی فلزات سنگین بر جوانه‌زنی از روش مهار هیدرولیز نشاسته آندوسپرم اعمال می‌شود که سرعت جوانه‌زنی را کاهش داده و از رشد اولیه‌ی بذور جلوگیری می‌کند، از سوی دیگر، این تأثیر مهارکنندگی با آسیب رساندن به رویان مانع جوانه‌زنی می‌شود (Mishra & Choudhuri, 1997). یکی دیگر از عوامل کاهش درصد جوانه‌زنی، سرعت پائین تجزیه اندوخته بذر و از بین‌رفتن غشاء است (Shafiq & Iqbal, 2008). کاهش جوانه‌زنی و قدرت بذر در اثر استفاده فلزات سنگین در سایر گیاهان از جمله تربچه در تنش نیکل، کادمیوم و سرب (Moridian Pirdosti et al., 2022) و افسنطین در تنش فلزات سنگین

مس، کادمیوم و سرب (Lashkari Sanami et al., 2022) گزارش شده است. پژوهش حاضر نشان داد که کاربرد قارچ *S. indica*، دارای تأثیر مثبت بر جوانه‌زنی کاسنی بوده و تأثیر منفی نیترات نیکل را کاهش داد. نتایج Sakhai و همکاران (Sakhai et al., 2021) نشان دادند تلقیح گیاه شنبلیله با قارچ *S. indica* می‌تواند تأثیرات مثبتی بر جوانه‌زنی و کاهش تأثیر فلز سنگین داشته باشد. در شرایط عدم‌کاربرد قارچ، سرعت جوانه‌زنی با افزایش درصد جوانه‌زنی کاهش یافته ولی با تلقیح قارچ، سرعت جوانه‌زنی با افزایش درصد جوانه‌زنی افزایش یافت، بنابراین در شرایط تنش، گیاه سعی می‌کند تا سریعتر جوانه بزند، اگرچه درصد جوانه‌زنی کم می‌شود. در مقابل، با ورود یک عامل محرک تحمل به تنش مثل قارچ *S. indica*، درصد جوانه‌زنی بهبود یافته و سرعت نیز وضعیت بهتری داشت. قارچ اندوفیت *S. indica* سرعت جوانه‌زنی را در گونه‌های مختلف گیاهی بهبود داده و حتی در شرایط تنش نیز سبب بهبود جوانه‌زنی بذر می‌شود (Saleem et al., 2022).

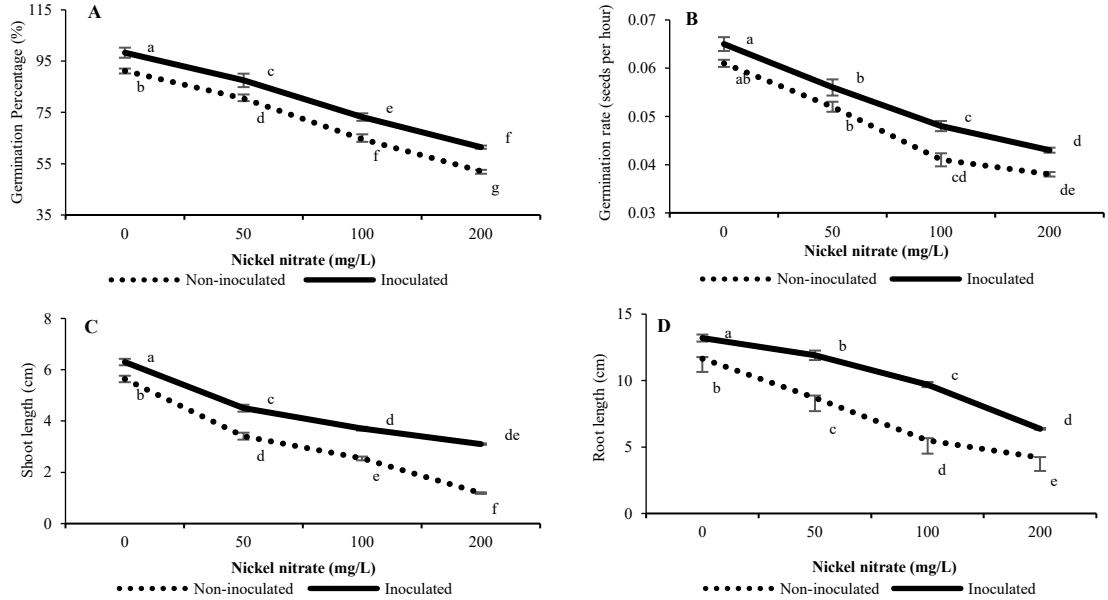
جدول ۱- تجزیه واریانس سطوح مختلف نیترات نیکل و تلقیح با قارچ *S. indica* بر درصد و سرعت جوانه‌زنی و طول ریشه‌چه و ساقه‌چه

Table 1- Variance analysis for effect of nickel nitrate and *S. indica* inoculation on germination percentage and rate, root and shoot length

Sources of variation	DF	Germination percentage	Germination rate	Shoot length	Root length
Fungus *S. indica* (F)	1	7.2**	3.21**	1.5**	2.2**
Nickel nitrate (N)	3	25.6**	4.8**	16.6**	5.64**
F × N	3	5.6**	15.3**	7.3**	3.15**
Error	16	0.023	3.6	0.051	0.011
Coefficient of variation	-	5.98	10.46	6.98	8.07

** و n.s به ترتیب معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد و عدم تفاوت معنی‌داری است.

** and ns: significance at 1% probability level and non-significance, respectively.

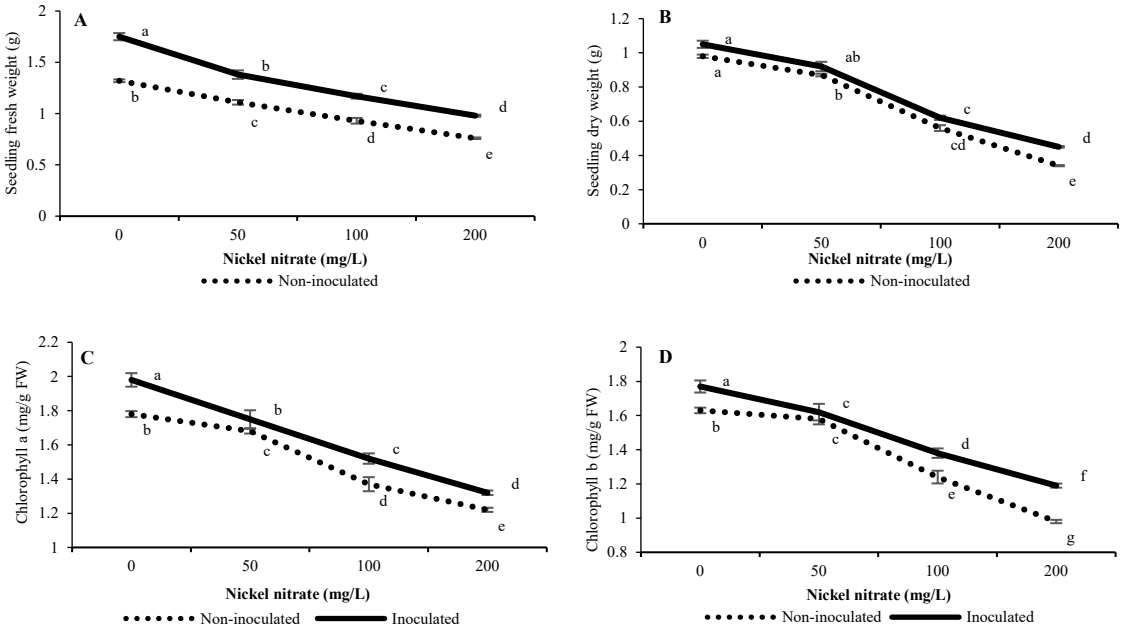


شکل ۱- مقایسه میانگین تأثیرات نیترات نیکل و قارچ *S. indica* بر (A) درصد جوانه‌زنی، (B) سرعت جوانه‌زنی، (C) طول ریشه‌چه و (D) طول ساقه‌چه

Figure 1- Mean comparison for effect of nickel nitrate and *S. indica* inoculation on (A) germination percentage, (B) germination rate, (C) shoot length, and (D) root length

طول ریشه‌چه و ساقه‌چه، وزن تر و خشک گیاهچه

نتایج تجزیه واریانس (جداول ۱ و ۳) نشان دادند تأثیر متقابل نیترات نیکل و قارچ اندوفیت *S. indica* برای صفات طول ریشه‌چه و ساقه‌چه، وزن تر و خشک گیاهچه در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. نتایج مقایسه میانگین نشان داد بیشترین طول ریشه‌چه (۱۳/۲ سانتی‌متر) و ساقه‌چه (۶/۳ سانتی‌متر)، وزن تر (۱/۷۵ گرم) و خشک (۱/۰۵ گرم) گیاهچه مربوط به بذرهای تیمار شده با اسپور قارچ *S. indica* و در عدم حضور نیترات نیکل بودند (جداول ۲ و ۴). با افزایش غلظت نیترات نیکل به ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر، طول ساقه‌چه ۴ برابر نسبت به شاهد کاهش یافت ولی با کاربرد قارچ، این کاهش به یک برابر کاهش یافت. همچنین با افزایش غلظت نیترات نیکل به ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر، طول ریشه‌چه ۲ برابر نسبت به شاهد کاهش یافت، ولی با کاربرد قارچ، این کاهش به یک برابر کاهش یافت (شکل ۱). همچنین نتایج نشان دادند کمترین طول ریشه‌چه (۴/۲ سانتی‌متر) و ساقه‌چه (۱/۱۹ سانتی‌متر)، وزن تر (۰/۷۶ گرم) و خشک (۰/۳۴ گرم) مربوط به ترکیب تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر نیترات نیکل و عدم تلقیح قارچ *S. indica* بود (شکل ۲).



شکل ۲- مقایسه میانگین تاثیرات نیترات نیکل و قارچ *S. indica* بر (A) وزن تر گیاهچه، (B) وزن خشک گیاهچه، (C) کلروفیل a و (D) کلروفیل b

Figure 2- Mean comparison for effect of nickel nitrate and *S. indica* inoculation on (A) seedling dry weight, (B) seedling fresh weight, (C) chlorophyll a and (D) chlorophyll b

جدول ۲- مقایسه میانگین تأثیرات نیترات نیکل و قارچ *S. indica* بر درصد و سرعت جوانه‌زنی و طول ریشه‌چه و ساقه‌چه

Table 2- Mean comparison for effect of nickel nitrate and *S. indica* inoculation on germination percentage, germination rate, root and shoot length

S. indica	Nickel nitrate(mg/L)	Germination percentage (%)	Germination rate (Seeds/hour)	Shoot length (cm)	Root length (cm)
Non-inoculated	0	91.2±0.91^{b}	0.061±0.0007^{ab}	5.64±0.0564^{b}	11.65±0.117^{b}
	50	80.4±1.61^{d}	0.052±0.0010^{b}	3.41±0.0682^{d}	8.70±0.174^{c}
	100	64.5±1.94^{f}	0.041±0.0014^{cd}	2.54±0.0762^{e}	5.50±0.165^{cd}
	200	52.1±0.52^{g}	0.038±0.0005^{de}	1.19±0.0119^{f}	4.20±0.042^{e}
Inoculated	0	98.3±1.97^{a}	0.065±0.0014^{a}	6.30±0.1260^{a}	13.20±0.264^{a}
	50	87.5±2.63^{c}	0.056±0.0017^{b}	4.50±0.1350^{c}	11.90±0.357^{b}
	100	73.2±1.46^{e}	0.048±0.0011^{c}	3.70±0.0740^{d}	9.70±0.194^{c}
	200	61.5±0.61^{f}	0.043±0.0005^{d}	3.10±0.0310^{de}	6.37±0.064^{d}

میانگین‌هایی که در یک ستون حروف مشابهی دارند از لحاظ آماری در سطح احتمال ۱٪ تفاوت معنی‌داری ندارند

Means that have the same letters in a column are not statistically significant at the 1% probability level.

پژوهش‌های قبلی نشان دادند گیاهان در معرض تنش فلزات سنگین از قبیل نیکل، کاهش معنی‌داری در وزن تر و خشک گیاه و طول اندام هوایی و ریشه دارند (Moridian Pirdosti et al., 2022). کاهش طول گیاهچه در اثر بروز تنش فلز سنگین، توسط سایر پژوهشگران در گیاهانی از جمله شنبلیله (Sakhai et al., 2021) و خرفه، سیاه‌دانه، شنبلیله، شوید، زنیان و ریحان (Spanany & Fallah, 2016) گزارش شده است. یکی از دلایل کاهش طول گیاهچه در رویارویی با فلزات سنگین، مرگ سلول‌های مریستمی به‌واسطه فعالیت برخی آنزیم‌های مرتبط با مرگ برنامه‌ریزی شده در لپه‌ها و آندوسپرم است، که تعداد سلول‌های مریستمی را کاهش می‌دهد، بنابراین وقتی فعالیت آنزیم‌های هیدرولیتیک به‌واسطه عناصر سنگین تحت‌تأثیر قرار می‌گیرد، غذا به ریشه‌های اولیه و اندام هوایی نمی‌رسد و در نتیجه طول گیاهچه‌ها را تحت‌تأثیر قرار می‌دهد (Kabir et al., 2008). برخی منابع، این کاهش طول گیاهچه در اثر تنش فلزات سنگین را به دخالت این عوامل در فرآیند تقسیم سلولی، انحراف کروموزومی و میتوز غیرطبیعی نسبت می‌دهند (Radha et al., 2010)، به‌طوریکه فلزات سنگین با مهار تقسیم میتوزی و جلوگیری از طویل شدن سلول‌ها سبب کاهش رشد ریشه و ساقه می‌شوند (Shulan et al., 2010). علاوه بر این، فلزات سنگین در غلظت‌های زیاد مانع ساخت RNA های ریبوزومی در سلول‌های مریستمی شده و سبب کاهش رشد می‌شوند (Serida et al., 2008).

از مهم‌ترین دلایل کاهش عملکرد و ماده خشک گیاه در شرایط تنش می‌توان به کاهش فعالیت کینازهای وابسته به سیکلین، کاهش تقسیم سلولی، بسته‌شدن روزنه‌ها و کاهش فتوسنتز اشاره کرد که مانع از رشد می‌شود (Farooq et al., 2009). همچنین کاهش وزن تر اندام هوایی و ریشه می‌تواند به علّت تأثیر فلز سنگین روی میزان آب در بافت‌های گیاه (کاهش پتانسیل آب گیاه)، باشد (John et al., 2009). کاهش رشد گیاه در طول تنش به علّت کاهش پتانسیل آب، اختلال در جذب عناصر غذایی و تنش ثانویه مانند تنش اکسیداتیو است. علاوه بر این، نیکل می‌تواند سازمان میکروتوبول را در سلول‌های مریستمی مختل کند (Yemets et al., 2021). همچنین کاهش رشد

می‌تواند به علّت سرکوب سرعت رشد ازدیاد طول سلول‌ها و مهار غیرقابل برگشت نیکل روی پمپ پروتون باشد (Zambelli & Ciurli, 2013). فلزات سنگین ریخت شناسی ریشه را تغییر داده و سبب کاهش جذب مواد غذایی شده و از این روش بر وزن تر و خشک ریشه و اندام هوایی تاثیر منفی دارند (Fuentes et al., 2006). نتایج این پژوهش، نشان داد تلقیح با قارچ *S. indica* تأثیرات منفی نیترات نیکل را کاهش داد. تأثیر مثبت قارچ *S. indica* بر کاهش تأثیرات منفی فلزات سنگین در گیاهان مختلف از جمله تربچه (Izadi et al., 2021)، توتون (Hui et al., 2015) و گوجه‌فرنگی (Golestani kian et al., 2021) گزارش شده است. نتایج این پژوهش نشان داد طول ریشه‌چه، ساقه‌چه و وزن تر و خشک گیاهچه در گیاهان تلقیح شده با *S. indica* در مقایسه با گیاهان شاهد افزایش یافت. این نتایج با گزارش Mehri و همکاران (Mehri et al., 2023) و Mahmoodi و همکاران (Mahmoodi et al., 2023) در زمینه تأثیر معنی‌دار قارچ *S. indica* بر طول ریشه و ساقه و نیز وزن خشک گیاه مطابقت داشت. این تأثیرات مثبت می‌تواند به علّت این باشد که تلقیح گیاهان با قارچ *S. indica* سبب افزایش تولید هورمون‌های اکسین و سیتوکینین شده که به دنبال آن منجر به افزایش تقسیم سلولی و رشد سلول‌ها و نیز افزایش قدرت جذب در گیاهان می‌شود (Sirrenberg, 2007; Hartley & Gange, 2009).

کلروفیل

آثار اصلی تیمار نیترات نیکل و قارچ و نیز تأثیر متقابل نیترات نیکل و قارچ بر محتوای کلروفیل برگ کاسنی معنی‌دار بود (جدول ۳). مقایسه میانگین ترکیبات تیماری نشان دادند بیشترین کلروفیل a و کلروفیل b مربوط به تلقیح با قارچ *S. indica* و در عدم حضور نیترات نیکل و کمترین کلروفیل a و کلروفیل b مربوط به ترکیب تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر نیترات نیکل و عدم تلقیح قارچ *S. indica* بوده است (جدول ۴). درصد تأثیر مثبت کاربرد قارچ برای کاهش تأثیرات مضر نیترات نیکل در سطوح ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر، به ترتیب برابر ۴، ۱۱ و ۸ ٪ برای کلروفیل a و ۳، ۱۱ و ۲۱ ٪ برای کلروفیل b بوده است (شکل ۲). ایجاد اختلال در مراحل مختلف سنتز کلروفیل توسط فلزات سنگین از دلایل اصلی کاهش محتوای کلروفیل در گیاهان تحت تیمار عناصر سنگین است (Manio et al., 2003). تأثیرات منفی تنش فلزات سنگین بر میزان کلروفیل با تلقیح ریشه گیاهان با قارچ‌های اندوفیت کاهش می‌یابد (Hui et al., 2015; Shahabivand et al., 2017). تلقیح با قارچ اندوفیت سبب افزایش فعالیت‌هایی فتوسنتزی و تنظیم مقدار فیتوهورمون‌ها شده و به‌عنوان روشی مؤثر جهت کاهش تأثیر تنش فلز سنگین در گیاهان پیشنهاد می‌شود (He et al., 2017). کاهش کلروفیل در حضور نیکل می‌تواند به علّت افزایش فعالیت آنزیم کلروفیلاز، حساسیت سایرآنزیم‌های ساخت پورفیرین‌ها ازجمله بازدارندگی سنتز آنزیم دلتا آمینولوولینیک اسید دهیدراتاز، فعالیت آنزیم‌های هم‌دار مانند کاتالاز و پراکسیداز یا از کاهش دسترسی به آهن لازم برای سنتز کلروفیل باشد (Fatemeh et al., 2012). نیکل می‌تواند جایگزین یون منیزیم در بخش تتراپیرول

مولکول کلروفیل شود و با کاهش میزان کلروفیل منجر به کاهش رشد شود (Azizollahi et al., 2019). همچنین ممکن است سازوکار عمل نیکل، به‌صورت ایجاد اختلال در مراکز منیزیم فتوسیستم II باشد که از فراهم‌شدن الکترون‌ها به فتوسیستم II جلوگیری کرده و مانع ورود پروتون‌ها به داخل تیلاکوئیدها می‌شود (Chakarawet et al., 2020).

جدول ۳- تجزیه واریانس وزن تر و خشک گیاهچه، کلروفیل a و b تحت سطوح مختلف نیترات نیکل با تیمار تلقیح با قارچ *S. indica*

Table 3- Variance analysis for effect of nickel nitrate and *S. indica* inoculation on seedling dry and fresh weights and chlorophyll a and b.

Sources of variation	DF	seedlings fresh weight	seedlings dry weight	Chlorophyll a	Chlorophyll b
Fungus *S. indica* (F)	1	3.52**	1.5**	4.36**	3.95**
Nickel nitrate (N)	3	5.87**	4.32**	2.12**	5.21**
F × N	3	7.66**	2.51**	5.3**	7.22**
Error	16	0.091	0.001	0.031	0.049
Coefficient of variation	-	8.99	5.17	8.62	7.21

** و n.s به ترتیب معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد و عدم تفاوت معنی‌داری است.

ns, **: Significance is at the 1% probability level and non-significance , respectively

جدول ۴-مقایسه میانگین تاثیرات نیترات نیکل و قارچ *S. indica* بر وزن تر و خشک گیاهچه و کلروفیل a و b

Table 4- Mean comparison for effect of nickel nitrate and *S. indica* inoculation on seedling dry and fresh weights and chlorophyll a and b.

S. indica	Nickel nitrate (mg/L)	seedlings fresh weight (g)	seedlings dry weight (g)	Chlorophyll a (mg/g FW)	Chlorophyll b (mg/g FW)
Non-inoculated	0	1.32±0.0118^{b}	0.98±0.0097^{a}	1.78±0.0119^{b}	1.63±0.011^{b}
	50	1.11±0.0112^{c}	0.87±0.0089^{b}	1.68±0.009^{c}	1.58±0.0014^{c}
	100	0.93±0.0078^{d}	0.56±0.0054^{cd}	1.37±0.0012^{d}	1.24±0.0032^{e}
	200	0.76±0.0065^{e}	0.34±0.0031^{e}	1.22±0.0089^{e}	0.98±0.0027^{g}
Inoculated	0	1.75±0.0061^{a}	1.05±0.0091^{a}	1.98±0.0017^{a}	1.77±0.0031^{a}
	50	1.38±0.0101^{b}	0.92±0.0088^{ab}	1.75±0.0019^{b}	1.62±0.0023^{c}
	100	1.17±0.0091^{c}	0.62±0.0059^{c}	1.52±0.0027^{c}	1.38±0.0031^{d}
	200	0.98±0.007^{d}	0.45±0.0029^{d}	1.32±0.0024^{d}	1.19±0.0094^{f}

میانگین‌هایی که در یک ستون حروف مشابهی دارند از لحاظ آماری در سطح احتمال ۱٪ تفاوت معنی‌داری ندارند

Means that have the same letters in a column are not statistically significant at the 1% probability level.

فنول کل

نتایج جدول تجزیه واریانس (جدول ۵) نشان دادند تأثیر اصلی نیترات نیکل معنی‌دار بود، امّا تأثیر اثر ساده قارچ و اثر متقابل نیترات نیکل و قارچ معنی‌دار نشد. نتایج مقایسه میانگین برای اثر ساده نیترات نیکل نشان دادند کاربرد ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر نیترات نیکل سبب افزایش ۸۹/۳ درصدی میزان فنول نسبت به شاهد شد (جدول ۶). درصد تأثیر مثبت کاربرد قارچ بر کاهش تأثیرات مضر نیترات نیکل در سطوح دیگر (۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر)، نسبت به شاهد به ترتیب برابر ۴۰ و ۷۶ ٪ بود (شکل ۳). ترکیبات فنولیک در سازوکارهای دفاعی گیاهان نقش مهمی ایفا می‌کنند. این مواد عملکردهای متنوعی در گیاهان دارند که شامل دامنه وسیعی از فعالیت‌های زیستی از جمله ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی، ضد باکتریایی،

ضدویروسی و ویژگی‌های مختلف درمانی است (Eftekhari et al., 2012). یکی از سازوکارهای مؤثر در افزایش میزان تحمّل فلزات سنگین، تولید و انباشتگی ترکیبات فنولی است. در شرایط تنش فلزات سنگین، فنول‌های متصل به دیواره بیشتر از فنول‌های محلول تحت‌تأثیر قرار می‌گیرند (Kreis & Reinhard, 1989). ترکیبات فنولی در شرایط طبیعی در سلول سنتز می‌شود، امّا تنش‌های محیطی مقدار آن‌ها را در سلول تغییر می‌دهد. تغییر در بیوسنتز آنزیم‌های فتوسنتزکننده یا تجزیه‌کننده ترکیبات فنولی از قبیل فنول هیدروکسیلاز بر مقدار آن‌ها در سلول تأثیر می‌گذارد. ترکیبات فنولی به‌عنوان یکی از ترکیبات آنتی‌اکسیدان شناخته شده‌اند که با سازوکارهای متعدد مثل ربایش رادیکال‌های آزاد و قرارگرفتن به‌عنوان سوبسترای آنزیم‌های پراکسیداز، نقش آنتی‌اکسیدانی خود را ایفا می‌کنند (Chu et al., 2000). افزایش در میزان ترکیبات فنولی تحت تأثیر تنش فلزات سنگین در گیاهان مختلف گزارش شده است (Pandey & Tripathi, 2011;Schutzendubel et al., 2001).

جدول ۵- تجزیه واریانس سطوح مختلف نیترات نیکل و تلقیح با قارچ *S. indica* بر پرولین، فنول و آنزیم‌های آنتی اکسیدانی

Table 5- Variance analysis for effect of nickel nitrate and *S. indica* inoculation on antioxidant enzymes, proline and phenol content.

Sources of variation	DF	Total phenol	Proline	Catalase	Peroxidase
Fungus *S. indica* (F)	1	0.0137^{ns}	0.001^{ns}	0.0079^{ns}	0.046^{ns}
Nickel nitrate (N)	3	0.135^{**}	2.21^{**}	0.842^{**}	0.375^{**}
F × N	3	0.002^{ns}	0.005^{ns}	0.048^{ns}	0.0057^{ns}
Error	16	0.05	0.07	0.025	0.022
Coefficient of variation	-	11.46	8.72	6.41	8.60

** و n.s به ترتیب معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد و عدم تفاوت معنی‌داری است.

ns, **: Significance is at the 1% probability level and non-significance , respectively

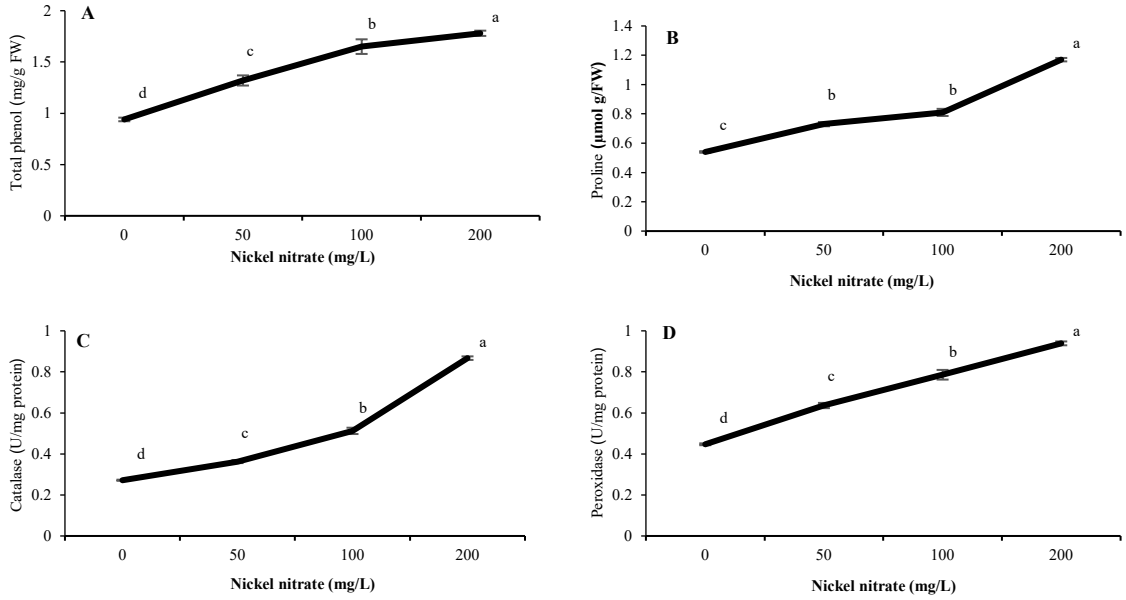
جدول ۶- مقایسه میانگین تأثیر نیترات نیکل بر پرولین، فنول و آنزیم‌های آنتی اکسیدانی

Table 6- Mean comparison for effect of nickel nitrate on antioxidant enzymes, proline and phenol content.

Nickel nitrate (mg/L)	Total phenol (mg/g FW)	Proline (mg/g FW)	Catalase (U/mg protein)	Peroxidase (U/mg protein)
0	0.94 ± 0.018^{d}	0.54 ± 0.005^{c}	0.272 ± 0.0027^{d}	0.447 ± 0.0045^{c}
50	1.32 ± 0.049^{c}	0.73 ± 0.015^{b}	0.363 ± 0.0073^{c}	0.636 ± 0.0127^{b}
100	1.65 ± 0.071^{b}	0.81 ± 0.024^{b}	0.512 ± 0.0154^{b}	0.786 ± 0.0236^{b}
200	1.78 ± 0.026^{a}	1.17 ± 0.012^{a}	0.867 ± 0.0087^{a}	0.939 ± 0.0094^{a}

میانگین‌هایی که در یک ستون حروف مشابهی دارند از لحاظ آماری در سطح احتمال ۱٪ تفاوت معنی‌داری ندارند

Means that have the same letters in a column are not statistically significant at the 1% probability level.



شکل ۳- مقایسه میانگین تأثیر نیترات نیکل بر (A) فنول، (B) پرولین، (C) کاتالاز و (D) پراکسیداز

Figure 3- Mean comparison for effect of nickel nitrate on (A) phenol content, (B) proline, (C) catalase and (D) peroxidase

پرولین

بر اساس نتایج تجزیه واریانس (جدول ۵) فقط تأثیر اصلی نیترات نیکل بر میزان پرولین گیاه کاسنی معنی‌دار بود. بررسی نتایج مقایسه میانگین نشان دادند بیشترین محتوای پرولین (۱/۱۷ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) مربوط به ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر نیترات نیکل بوده است، همچنین کمترین میزان پرولین (۰/۵۴ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) در تیمار شاهد مشاهده شد (جدول ۶). مقدار افزایش پرولین در سطوح ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر نیترات نیکل، به ترتیب برابر ۳۵، ۵۰ و ۱۱۶ ٪ بوده است (شکل ۳). یکی از ترکیبات مهمی که در شرایط تنش افزایش می‌یابد، پرولین است که مقدار آن در پاسخ به تنش در بسیاری از گیاهان، افزایش‌یافته و گیاه با تجمع پرولین، پلی آمین، تر هالوز، افزایش ذخیره‌سازی کربوهیدرات‌ها و پروتئین‌سازی می‌تواند مقاومت خود را در برابر تنش افزایش دهد (Hong, 2000). پرولین یکی از محافظت‌کننده‌های غشاء است و افزایش آن در کاهش تأثیرات تنش نقش دارد. انباشته‌شدن بیشتر پرولین در گیاهان تحت تیمار با غلظت‌های زیاد نیکل می‌تواند بیانگر راهکارهای سازگاری گیاه برای مقابله با سمّیت نیکل توسط نقش‌های چندگانه پرولین از قبیل عامل ایجادکننده‌ی اسمز، جاروب کننده‌ی رادیکال‌های آزاد، محافظ آنزیم‌های سیتوپلاسمی، منبع نیتروژن و کربن برای رشد پس از تنش، محافظ پروتئوم و مخزن انرژی برای تنظیم پتانسیل اکسایش - کاهش باشد (Rodríguez et al., 2007). گزارش‌های متعددی نشان داده‌اند که مقادیر زیاد فلزات سنگین از جمله کادمیوم و نیکل سبب تجمع پرولین در گیاهان می‌شود (Mir et al., 2019; Tagharobiyan et al., 2016). تنش نیکل با کاهش جذب آب در رشد اختلال ایجاد می‌کنند و برای کاهش آسیب حاصل از تنش‌های غیر زیستی

اسمولیت‌هایی مثل پرولین نقش دارند، زیرا سبب حفظ ماکروملکول‌ها و کاهش پراکسیداسیون لیپید شده، سرعت و درصد جوانه‌زنی را افزایش می‌دهد (Thakur & Sharma, 2016). همچنین پرولین منجر به تغییر فرآیندهای فیزیولوژیکی شده که در نهایت جذب آب را افزایش می‌دهد. پرولین در تنش نیکل و شوری در گیاه نخود فرنگی سبب اصلاح وضعیت آبی و فعال شدن سامانه آنتی اکسیدانی شد (Shahid et al., 2014).

آنزیم‌های آنتی اکسیدان

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۵) برای آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز نشان داد فقط تأثیر ساده نیترات نیکل معنی‌دار شد. نتایج مقایسه میانگین اثر ساده نیترات نیکل (جدول ۶) نشان دادند بیشترین فعالیت آنزیم‌های کاتالاز (۰/۸۶۶۹ واحد در میلی‌گرم پروتئین) و پراکسیداز (۹۳۹/ واحد در میلی‌گرم پروتئین) مربوط به تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر نیترات نیکل بوده است. همچنین کمترین میزان کاتالاز (۰/۲۷۱۷ واحد در میلی‌گرم پروتئین) و پراکسیداز (۰/۴۴۷ واحد در میلی‌گرم پروتئین) را نیز تیمار شاهد دارا بوده است. مقدار فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی کاتالاز و پراکسیداز در سطوح ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر تنش نیترات نیکل، به ترتیب ۳۳، ۸۹ و ۳۲۰ ٪ برای کاتالاز و ۴۲، ۷۶ و ۲۱۰ درصد برای پراکسیداز نسبت به گروه شاهد افزایش داشت (شکل ۳). آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز در پژوهش حاضر، تحت تنش نیترات نیکل افزایش داشت. آنزیم کاتالاز، هیدروژن پراکسید را هم به‌عنوان دهنده هیدروژن و هم به‌عنوان سوبسترا در تجزیه کاتالیتیکی هیدروژن پراکسید به محصولات (اکسیژن و آب) استفاده می‌کند (Xu et al., 2009). کاتالاز یک آنزیم آنتی‌اکسیدان مهم در سازوکار دفاعی گیاهان است که در کنترل گونه‌های فعال اکسیژن نقش مهمی دارد و سبب کاهش آسیب اکسیداتیو می‌شود. بروز تنش فلز سنگین موجب افزایش فعالیت کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز، افزایش پراکسیداسیون لیپیدها، تجمع پراکسید هیدروژن و مرگ سلولی می‌شود. در گیاه شنبلیله تحت تنش فلزات سنگین، تولید و فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز افزایش یافت (Garnczarska & Ratajczak, 2000). پراکسیداز و کاتالاز هر دو آنزیم‌های مهمی هستند که H_2O_2 زیادی را از راه کاتالیز کردن به آب و مولکول اکسیژن تجزیه می‌کنند (Moller et al., 2007).

جمع‌بندی

پژوهش حاضر نشان داد کاربرد *S. indica* سبب بهبود فاکتورهای جوانه‌زنی از جمله درصد و سرعت جوانه‌زنی تحت تنش نیترات نیکل (به‌ترتیب ۸ و ۱۸ درصد) شد که به نوبه خود می‌تواند استقرار گیاه و رشد گیاه را افزایش دهد. با کاربرد قارچ *S. indica*، کاهش حدود ۴۰۰ و ۲۰۰ درصدی طول ساقه‌چه و ریشه‌چه در اثر تنش نیکل، به کاهش حدود ۱۰۰ درصدی رسید. از طرف دیگر تلقیح با قارچ *S. indica* توانسته است تأثیرات منفی ناشی از نیترات نیکل را کاهش دهد. مقادیر تأثیر مثبت کاربرد قارچ برای کاهش تاثیرات مضر نیترات نیکل در سطوح شاهد، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰

میلی‌گرم در لیتر، به ترتیب برابر ۱۲، ۳۲، ۴۶ و ۶۱ درصد برای کلروفیل a، ۱۳، ۳۷، ۷۶ و ۵۲ درصد برای کلروفیل b بود. در مجموع نتایج نشان دادند کاربرد میکروارگانیسم‌های مفید مانند قارچ‌های مفید می‌تواند یک راهکار مناسب برای افزایش فاکتورهای جوانه‌زنی و کاهش تأثیرات منفی ناشی از فلزات سنگین در نظر گرفته شود.

References

Abdolrahmani, B., Ghassemi-Golezani, K.,Valizadeh, M., Feizi-Asl, V., & Tvakoli, A. (2010) Effects of seed priming on seed vigor and grain yield of barley (*Hordeum vulgare* L. cv. Abidar) in rainfed conditions. *Iranian Journal of Crop Sciences*, *11* (*4*), 337-352. [In Persian]. https://doi: 20.1001.1. 15625540.1388.11.4.2.8

Ahmad, N. (2009) Alloxan diabetes-induced oxidative stress and impairment of oxidative defense system in rat brain: neuroprotective effects of *Cichorium intybus*. *International Journal of Diabetes and Metabolism*, *17*, 105-109. https://doi.org/10.1159/000497681

Ahvazi, M., Rezvani Aghdam, A., & Habibi Khaniani, B. (2010) *Seed of medical plants (morphology, physiology and medicinal properties).* Vol 1. Jahad Daneshgahi Press. 228. [In Persian].

Alloway, B, J. (2010) *Heavy metals in soil* (Third edition), John Wiley and Sons, Inc, New York, USA.

Arnon, D. I. (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts, polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*, *24*, 1-15. https://doi.org/10.1104/pp.24.1.1

Azizollahi, Z., Ghaderian, S. M., & Ghotbi-Ravandi, A. A. (2019) Cadmium accumulation and its effects on physiological and biochemical characters of summer savory (*Satureja hortensis* L.). *International Journal of Phytoremediation, 21*(12), 1241-1253. https://doi.org/10.1080/15226514.2019. 1619163

Baccouch, S., Chaoui, A., & El Ferjani, E. (2001) Nickel toxicity induces oxidative damage in *zea mays* roots. *Journal of Plant Nutrition, 24*(7), 1085–1097. https://doi.org/10.1081/PLN-100103805

Bafeel, S. (2010) Physiological and biochemical aspects of tolerance in *Lepidium sativum* (cress) to lead toxicity. *Catrina, Egyptian Society for Environmental Sciences*, *5*(1), 1-7.

Bates, L., Waldren, R. P., & Teare, I. D. (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, *39*, 205-207.

Bergmeyer, H. U. (1970) *Methods of enzymatic analysis*. Academic Verlag, Berlin, Germany.

Cempel, M., & Nikel, G. (2006) Nickel: A review of its sources and environmental toxicology. *Polish Journal of Environmental Studies, 15*(3), 375-382.

Chakarawet, K., Harris, T. D., & Long, J. R. (2020) Semiquinone radical-bridged M_2 (M= Fe, Co, Ni) complexes with strong magnetic exchange giving rise to slow magnetic relaxation. *Chemical Science, 11*(31), 8196-8203. https://doi.org/ 10.1039/ D0SC03078C

Chen, C., Huang, D., & Liu, J. (2009) Functions and toxicity of nickel in plants: recent advances and future prospects. *Clean–Soil, Air, Water, 37*(5), 304-313. https://doi.org/10.1002/clen. 200800199

Chu, Y. H., Chang, C. L., & Hsu, H. F. (2000) Flavonoid contents of several vegetables and their antioxidant activity. *Journal of Agriculture and Food Science*, *80*, 561-566. https://doi.org/ 10.1002/(SICI)1097-0010(200004)80: 5<561

Eftekhari, M., Alizadeh, M., & Ebrahimi, P. (2012) Evaluation of the total phenolics and quercetin content of foliage in mycorrhizal grape (*Vitis vinifera* L.) varieties and effect of postharvest drying on quercetin yield. *Industrial Crops and Products, 38*, 160-165. https://doi.org/ 10.1016/j.indcrop.2012. 01.022

Eskandari, B. S., Ghaderian, S. M., Ghasemi, R., & Schat, H. (2017) Optimization of seed germination in an Iranian serpentine endemic, *Fortuynia Garcinii Flora, 231*, 38-42. https://doi.org/10.1016/j.flora.2017.04.0 05

Farooqi, Z. R., Zafar Iqbal, M., Kabir, M., & Shafiq, M. (2009) Toxic effects of Lead and Cadmium on germination and seedling growth of *Albizia kebbeck* (L.) Benth. *Pakistan Journal of Botany, 41*(1), 27-33.

Fatemeh, G., Reza, H., Rashid, J., & Latifeh, P. (2012) Effects of Ni^{2+} toxicity on Hill reaction and membrane functionality in maize. *Journal of Stress Physiology and Biochemistry, 8*(4), 55-61.

Fuentes, D., Disante, K. B., Valdecantos, A., Cortina, J., & Vallejo, V. R. (2006) Response of *Pinus halepensis* Mill. seedlings to biosolids enriched with Cu, Ni and Zn in three mediterranean forest soils. *Environmental Pollution, 145* (1), 316-323. https://doi.org/ 10.1016/ j.envpol.2006.03.005

Garnczarska, M., & Ratajczak, L. (2000) Metabolic responses of *Lemna minor* to lead ions, II. Induction of antioxidant enzymes in roots. *Acta Physiologiae Plantarum, 22*, 429-432.

Ghabooli, M., Khatabi, B., Ahmadi, F. S., Sepehri, M., Mirzaei, M., Amirkhani, A., & 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. https://doi.org/ 10.1016/j.jprot. 2013.09.017

Golestani kian, S., Movahedi, Z., Ghabooli, M., & Mohsenifard, E. (2021) Effect of using *Piriformospora indica* and cadmium on some morphophysiological traits and concentration of nutrients of tomato in aeroponic system. *Horticultural Plants Nutrition*, *4*(1), 47-60. [In Persian]. https://doi.org/ 10.22070/ HPN.2021.5319.1086

Hartley, S. E., & Gange, A. C. (2009) Impacts of plant symbiotic fungi on insect herbivores, mutualism in a multitrophic context. *Annual Review of Entomology, 54*, 323-342. https://doi.org/10.1146/annurev.ento.54. 110807.090614

He, Y., Yang, Z., Li, M., Jiang, M., Li, T., & Zaho, Z. (2017) Effects of a dark septate endophyte (DSE) on growth, cadmium content, and physiology in maize under cadmium stress. *Environmental Science and Pollution Research, 24*(2), 119.

Hong, Z. (2000) Removal of feedback inhibition of delta (1)- pyrroline-5-carboxylate syntheses results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. *Plant Physiology, 122,* 1129-1136. https://doi.org/10.1104/pp.122.4.1129

Hui, F., Liu, J., GAO, P., & Lou, B. (2015) *Priformospora indica* confers cadmium tolerance in *Nicotiana tabacum*. *Journal of Environmental Science, 37*, 184-191. https://doi.org/10.1016/ j.jes.2015. 06.005

Izadi, F., Ghabooli, M., Rostami, M., & Movahedi, Z. (2021) Evaluation of fungus *Piriformospora indica* effects on some morphophysiological traits of radish under Heavy Metal Stress. *Journal of Agricultural Science and Sustainable Production*, *31*(3), 117-129. [In Persian]. https://doi.org/10.22034/ saps.2021.13694

John, R., Ahmad, P., Gadgil, K., & Sharma, S. (2009) Heavy metal toxicity: effect on plant growth, biochemical parameters and metal accumulation by

Brassica juncea L. *International Journal of Plant Production, 3* (3), 65-75. https://doi.org/ 10.22069/ijpp. 2012.653

Kabir, M., Iqbal, M. Z., Shafiq, M., & Farooqi, Z. R. (2008) Reduction in germination and seedling growth of *Thespesia populnea* L., caused by lead and cadmium treatments. *Pakistan Journal of Botany, 40*(6), 2419-2426.

Kreis, W. & Reinhard, E. (1989) The production of secondary metabolites by plant cells cultivated in bioreactors. *Planta Medica, 55*, 409-416. https://doi.org/ 10.1055/s-2006-962054

Lashkari Sanami, N., Ghorbani, J., Hodjati, S. M., Vahabzadeh Kebria, G., & Motesharezadeh, B. (2022) Seed germination of plants grown in coal mine wastes in response to copper, lead, and cadmium stress. *Environmental Sciences*, *20*(1), 179-198. [In Persian]. https://doi.org/10.52547/envs.2021.1041

Mahmoodi, N., Movahedi, Z., & Ghabooli, M. (2023) Impact of *Piriformospora indica* on various characteristics of tomatoes during nickel nitrate stress under aeroponic and greenhouse conditions. *Frontiers in Microbiology*, *13*, 1-12. https://doi.org/10.3389/fmicb. 2022.1091036

Manio, T., Stentiford, E. I., & Millner, P. A. (2003) The effect of heavy metals accumulation on the chlorophyll concentration of *Typha latifolia* plants, growing in substrate containing sewage sludge compost and watered with metaliferus water. *Ecological Engineering, 20*, 65-74. https://doi.org/ 10.1016/S0925-8574(03)00004-1

Mehri, M., Ghabooli, M., & Movahedi, Z. (2023) Contribution of *Serendipita indica* on growth improvement, antioxidative capacity of *Dracocephalum kotschyi*, and its resistance against cadmium stress. *International Microbiology, 26*(4), 821-831. https://doi.org/10.1007/s10123-023-00339-z.

Mir, M., Talei, D., & Rafiei, F. (2019) Morpho-physiological responses of purslane (*Portulaca oleracea* L.) to humic acid under Nickle stress. *Horticultural Plants Nutrition*, *2*(1), 1-20. [In Persian]. https://doi.org/ 10.22070/hpn.2019.4522.1028

Mishra, A., & Choudhuri, M. A. (1997) Differential effect of Pb^{2+} and Hg^{2+} on inhibition of germination of seed of two rice cultivars. *Indian Journal of Plant Physiology*, *291,* 41-44.

Moller, I. M., Jensen, P. E., & Hansson, A. (2007) Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annual Review of Plant Biology, 58*, 459-481. https://doi.org/10.1146/annurev.arplant. 58.032806.103946

Moridian Pirdosti, K. M., Movahedi, Z., & Rostami, M. (2022) Effects of different concentrations of heavy metals application on germination indices of radish. *Journal of Seed Research, 12* (2), 14-23. [In Persian]. https://doi.org/ 10.30495/jsr.2023.1961387.1244

Nakano, Y., & Asada, K. (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology, 22*, 867-880. https://doi.org/10.1093/ oxfordjournals.pcp.a076232

Pandey, P., & Tripathi, A. K. (2011) Effect of heavy metals on morphological and biochemical characteristics of *Albizia procera* benth seedlings. *International Journal of Environmental Sciences, 1*(5), 1009-1018.

Parida, B. K., Chhiba, I. M., & Nayyar, V. K. (2003) Influence of nickel contaminated soils on fenugreek (*Trigunella corniculata L.*) growth and mineral composition. *Scientia Horticulturae, 98*, 113-119. https://doi.org/ 10.1016/S0304-4238(02)00208-X

Pegon, Y. (1985) Direct determination of arsenic in blood serum by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Analytica Chimica Acta,*

172, 147-156. https://doi.org/10.1016/ S0003-2670(00) 82602-1

Qiang, X., Weiss, M., Kogel, K. H., & Schafer, P. (2011) *Piriformospora indica* a mutualistic basidiomycete with an exceptionally large plant host range. *Molecular Plant Pathology, 13*(5), 508-518. https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00764.x

Radha, J., Srivastava, S., Solomon, S., Shrivastava, A. K., & Chandra, A. (2010) Impact of excess zinc on growth parameters, cell division, nutrient accumulation, photosynthetic pigments and oxidative stress of sugarcane (*Saccharum spp.*). *Acta Physiologiae Plantarum, 32*(5), 979- 986.

Ranal, M. A., & De Santana, D. G. (2006) How and why to measure the germination process? *Brazilian Journal of Botany, 29*(1), 1-11. https://doi.org/ 10.1590/S0100-84042006000100002

Rodríguez, M. C., Barsanti, L., Passarelli, V., Evangelista, V., Conforti, V., & Gualtieri, P. (2007) Effects of chromium on photosynthetic and photoreceptive apparatus of the alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environmental Research, 105* (2), 234-239. https://doi.org/ 10.1016/j.envres. 2007.01.011

Rubio, C., Lucas, J. R. D., Gutiérrez, A. J., Glez-Weller, D., Pérez Marrero, B., Caballero, J. M., Revert, C., & Hardisson, A. (2012) Evaluation of metal concentrations in *mentha* herbal teas (*Mentha piperita* L. *Mentha pulegium* L and *Mentha* species) by inductively coupled plasma spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 71,* 11-17. https://doi.org/ 10.1016/j.jpba.2012.07.015

Sakhai, F., Movahedi, Z., Ghabooli, M., & Mohseni Fard, E. (2021) Effect of *Piriformospora indica* inoculation on some morphophysiological traits of fenugreek under cadmium stress. *Iranian Journal of Seed Science and Technology*, *10*(1), 123-140. [In Persian]. https://doi.org/ 10.22092/ ijsst.2020.128428.1307

Saleem, S., Sekara, A., & Pokluda, R. (2022). *Serendipita indica*-A Review from Agricultural Point of View. *Plants, 11*(24), 3417. https://doi.org/10.3390/ plants11243417

Schutzendubel, A., Schwanz, P., Teichmann, T., Gross, K., Langenfeld, R., Douglas, L., & Polle, A. (2001) Cadmium-induced changes in antioxidative systems, hydrogen peroxide content, and differentiation in Scots pine roots. *Plant Physiology, 127*, 887-898. https://doi.org/ 10.1104/ pp.010318

Sebastiani, L., Scebba, F., & Tognetti, R. (2004) Heavy metal accumulation and growth responses in poplar clones Eridano (*Populus deltoides* maximowiczii) and I-214 (*P.euramericana*) exposed to industrial waste. *Environmental and Experimental Botany, 52* (1), 79-88. https://doi.org/ 10.1016/j.envexpbot.2004.01.003

Serida, K., Mohammad, B. A., Eun, J. H., & Kee, Y. P. (2008) Copper toxicity in *Withania somnifera*: Growth and antioxidant enzymes responses of *in vitro* grown plants. *Environmental and Experimental Botany, 64*, 279-285. https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.200 8.02.004

Shafiq, M., Iqbal, M. Z., & Athar, M. (2008) Effect of lead and cadmium on germination and seedling growth of *Leucaena leucocephala*. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*, *12 (2)*, 61-66. https://doi.org/10.4314/jasem.v12i3.554 97

Shahabivand, S., Parvaneh, A., & Aliloo, A. A. (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.

https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.07.064

Shahid, M. A., Balal, R. M. Pervez, M. A. Abbas, T. Aqeel, M. A. Javaid, M. M., & Garcia Sanchez, F. (2014) Exogenous proline and proline-enriched *Lolium perenne* leaf extract protects against phytotoxic effects of nickel and salinity in *Pisum sativum* by altering polyamine metabolism in leaves. *Turkish Journal of Botany,* 38, 914–926. https://doi.org/10.3906/bot-1312-13

Shulan, Z., Qing, L., Yanting, Q., & Lian, D. (2010) Responses of root growth and protective enzymes to copper stress in turfgrass. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica, 52*, 7-11. https://doi.org/10.2478/v10182-010-0017-5

Singh, A., Sharma, J., Rexer, K. H., & Varma, A. (2000) Plant productivity determinants beyond minerals, water and light: *Piriformospora indica*-a revolutionary plant growth promoting fungus. *Current Science-Bangalore, 79(11)*, 1548-1554.

Sirrenberg, A., Göbel, C., Grond, S., Czempinski, G. N., Ratzinger, A., Karlovsky, P., Santos, P., Feussner, I., & Pawlowski. K. (2007) *Piriformospora indica* affects plant growth by auxin production. *Physiologia Plantarum, 131*, (4): 581-589. https://doi.org/ 10.1111/j.1399-3054.2007.00983.x

Spanany, A., & Fallah, S. (2016) The effect of cadmium stress on seeds germination characteristics of some medicinal plants under in vitro conditions. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research*, *32*(3), 527-542. [In Persian].

Tagharobiyan, M., Poozesh, V., & Khorshidi, M. (2016) Influence of nickel on the indices of growth and content of photosynthetic pigments, protein, soluble sugar, proline and nickel accumulation in coriander. *Applied Research of Plant Ecophysiology, 2 (2),* 59-74. [In Persian].

Thakur, S., & Sharma, S. S. (2016) Characterization of seed germination, seedling growth, and associated metabolic responses of *Brassica juncea* L. cultivars to elevated nickel concentrations. *Protoplasma, 253(2),* 571-580. https://doi.org/ 10.1007/s00709-015-0835-0

Upendra, K., & Bandyopadhyay M. (2006) Sorption of cadmium from aqueous solution using pretreated rice husk. *Bioresource Technology*, *97*, 104-109. https://doi.org/ 10.1016/j.biortech.2005.02.027

Varma, A., Savita, S., Sahay, N., Butehorn, B., & Franken. P. (1998) *Piriformospora indica*, A cultivable plant- growth-promoting root endophyte. *Journal of Applied & Environmental Microbiology, 65*, 2741-2744. https://doi.org/10.1128/AEM.65.6.2741-2744.1999

Xu, W. T., Peng, X. L., Luo, Y. B., Wang, J., Guo, X., & Huang, K. L. (2009) Physiological and biochemical responses of grapefruit seed extract dip on 'Redglobe' grape. *LWT-Food Science Technology, 42*, 471-476. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2008.09.002

Yemets, A., Horiunova, I., & Blume, Y. (2021). Cadmium, nickel, copper, and zinc influence on microfilament organization in *Arabidopsis* root cells. *Cell Biology International,* 45(1), 211-226. https://doi.org/10.1002/cbin.11485

Zambelli, B., & Ciurli, S. (2013) Nickel and human health. *Interrelations Between Essential Metal Ions and Human Diseases, 13,* 321-357. https://doi.org/10.1007/978-94-007-7500-8_10.

Zhu, H. H., & Yao, Q. (2004) Localized and systemic increase of phenols in tomato roots induced by *Glomus versiforme* inhibits *Ralstonia solanacearum*. *Journal of Phytopathology, 152,* 537-542. https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2004.00892.x