

Effect of *Priformospora indica* inoculation on biological activity of *Stevia rebaudiana* plants treated with selenium nanoparticles

Masoumeh Ahmadi Khoei¹, Roya Karamian^{2*}

- 1- Ph.D. Student of Plant Biology-Physiology, Department of Biology, Faculty of Science, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran
- 2- Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran

Citation: Ahmadi Khoei, M., & Karamian, R. (2022). Effect of *Priformospora indica* inoculation on biological activity of *Stevia rebaudiana* plants treated with selenium nanoparticles. *Plant Productions*, 45(3), 361-373.

Abstract

Introduction

Stevia rebaudiana Bertoni is a herbaceous plant from the family Asteraceae and used as a valuable sweetener in food industry and as anti-inflammatory, antioxidant, antipyretic, antifungal, and antibacterial agent in medicine and pharmacology. *Piriformospora indica* is an endophytic fungus, which is mainly used to improve plant growth and the amount of secondary metabolites. Selenium (Se) as a micronutrient increases the antioxidant properties and plant growth and its nano form (SeNPs) is considered as a synthetic antioxidant. To evaluate the effect of *Piriformospora indica* inoculation and selenium nanoparticles foliar application at two concentrations of 5 and 10 mg/l on biological activities of the methanolic extract of the regenerated *S. rebaudiana* plants, an experiment was conducted in 2020 in Plant Physiology Research Laboratory of the Bu-Ali Sina University of Hamadan in a factorial arrangement based on completely randomized design with three replications.

Materials and Methods

To investigate the effects of endophytic fungus *P. indica* and SeNPs application, *in vitro* regenerated *Stevia* plantlets were inoculated with *P. indica* and foliar sprayed with SeNPs at two concentrations of 5 and 10 mg/l. Plant samples were harvested at vegetative and initial flowering stages and used for further analyses. After measuring the growth parameters, total phenol content and antioxidant activity were evaluated by Folin-Ciocalteu and DPPH radical scavenging assays, respectively. In addition, antibacterial activity of the plant methanolic extracts was studied by disc diffusion method.

* Corresponding Author: Roya Karamian
E-mail: r_karamian@basu.ac.ir

Results and Discussion

Inoculation of *P. indica* and application of SeNPs together resulted in plant growth improvement and also increase in total phenol content and antioxidant activity of the *Stevia* plants especially at vegetative stage. In addition, the studied extracts represented good antibacterial activity against two gram-positive bacteria, *Bacillus thuringiensis* and *Staphylococcus aureus*, and one gram-negative bacterium, *Escherichia coli*. The highest antioxidant and antibacterial activities were observed in the *Stevia* plants inoculated with *P. indica* and also treated with SeNPs.

Conclusion

Regarded to the results of the present study, *P. indica* inoculation and SeNPs application could result to the benefits in *Stevia* plants. Hence, it can be concluded that the biotic and non-biotic elicitors of *P. indica* and SeNPs can improve the antioxidant and antimicrobial activities of the *Stevia* plants by increasing the amount of total phenolic compounds.

Keywords: Antibacterial activity, Antioxidant property, Endophyte, Phenolic compounds, Selenium, Stevia

اثر تلقیح قارچ *Piriformospora indica* بر فعالیت زیستی گیاه استویا تحت تیمار نانوذرات سلنیوم

معصومه احمدی خویی^۱، رویا کریمیان^{۲*}

۱- دانشجوی دکتری زیست شناسی گیاهی- فیزیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران
۲- استاد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

چکیده

استویا (*Stevia rebaudiana* Bertoni) گیاهی متعلق به تیره مرکبان است و در صنایع غذایی بعنوان عامل شیرین کننده و در پزشکی و داروسازی به عنوان عامل ضد التهاب، آنتی اکسیدان، تب بر، ضد قارچ و ضد باکتری استفاده می شود. *Piriformospora indica* یک قارچ اندوفیت گیاهی است که موجب بهبود رشد، افزایش محتوای متابولیت های ثانویه و خواص دارویی گیاه میزبان می شود. سلنیوم (Se) به عنوان یک ریزمغذی توان آنتی اکسیدانی و رشد گیاهان را افزایش داده و در فرم نانوذره (SeNPs) یک آنتی اکسیدان مصنوعی است. به منظور بررسی اثر قارچ *P. indica* و نانوذرات سلنیوم در دو غلظت ۵ و ۱۰ میلی-گرم در لیتر بر فعالیت زیستی گیاهان باززایی شده *S. rebaudiana* در دو مرحله رویشی و آغاز گلدهی، آزمایشی در سال ۱۳۹۸ در آزمایشگاه فیزیولوژی گیاهی دانشگاه بوعلی سینا بصورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی و ۳ تکرار انجام شد. شاخص های رشد، محتوای فنل و پتانسیل آنتی اکسیدانی عصاره متانولی استویا پس از اعمال تیمارها به ترتیب با استفاده از روش فولین-سیوکالتو و مهار رادیکال آزاد DPPH و فعالیت ضد باکتریایی به روش انتشار دیسک بررسی شد. نتایج نشان داد که *P. indica* و نانوذرات سلنیوم سبب افزایش شاخص های رشد، محتوای فنل و پتانسیل آنتی اکسیدانی استویا بویژه در مرحله رویشی شدند. همچنین عصاره ها در برابر باکتری های *Bacillus thuringiensis*، *Staphylococcus aureus* و *Escherichia coli* خاصیت ضد باکتریایی نشان دادند. بیشترین ظرفیت آنتی اکسیدانی و فعالیت ضد باکتریایی مربوط به گیاهانی بود که همزمان در معرض *P. indica* و SeNPs قرار گرفتند. بنظر می رسد که *P. indica* و SeNPs، با افزایش محتوای فنل، موجب تقویت توان آنتی اکسیدانی و خاصیت ضد باکتریایی استویا می شوند.

کلیدواژه ها: استویا، اندوفیت، ترکیبات فنلی، سلنیوم، خاصیت آنتی اکسیدانی، فعالیت ضد باکتریایی

* نویسنده مسئول: رویا کریمیان

رایانامه: r_karamian@basu.ac.ir

مقدمه

استویا گیاهی متعلق به تیره مرکبان، بومی آمریکای جنوبی و یکی از ۱۵۴ عضو از جنس *Stevia* است (Carocho et al., 2015). استیول گلیکوزیدهای برگ استویا ۳۰۰ بار شیرین‌تر از ساکارز بوده و به دلیل نداشتن کالری از بالا رفتن قند خون جلوگیری می‌کنند (Periche et al., 2015). همچنین برگ استویا حاوی آنتی‌اکسیدان‌های مختلف از جمله ترکیبات فنلی است. در حال حاضر، توجه به پلی‌فنل‌های گیاهی در پژوهش‌های علمی و اهداف صنعتی افزایش یافته و گروه‌های متنوع آن‌ها به عنوان آنتی‌اکسیدان در صنایع غذایی و داروسازی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Tabet and Boukhari, 2018). بعلاوه پژوهشگران به خواص ضد-باکتریایی ترکیبات فنلی پی برده و آن‌ها را مکمل‌های موثر آنتی‌بیوتیک‌ها در طول درمان بیماری معرفی کرده‌اند (Mandal et al., 2017). قارچ‌های میکوریز بعنوان منبعی ارزشمند از کودهای زیستی، متابولیسم ثانویه گیاه میزبان را تحت تاثیر قرار داده و باعث بهبود عملکرد آن می‌شوند (Zulfiqari et al., 2014). *P. indica*، قارچی اندوفیت با دامنه میزبان وسیع است که باعث تقویت عملکرد، انباشت متابولیت‌های ثانویه بویژه پلی‌فنل‌ها و افزایش توان آنتی‌اکسیدانی گیاهان می‌شود (Amani et al., 2021). به دلیل دریافت ناکافی سلنیوم از رژیم غذایی، راهکارهای مختلفی چون تقویت گیاهان با سلنیوم در اشکال یونی و یا نانو بکار رفته و مشخص شده‌است که غلظت بهینه آن باعث تقویت متابولیسم ثانویه و رشد و نمو گیاهان می‌شود (D'Amato et al., 2020). این عنصر در محتوای ترکیبات فنلی، اسید آسکوربیک، سلنوپروتئین‌ها و سایر آنتی‌اکسیدان‌های گیاهی موثر بوده و تأثیر قابل توجهی نیز بر متابولیسم ترکیبات گوگردار مانند گلوتاتینون، گلوکوزینولات‌ها و ایزوتیوسیانات‌ها دارد (Di Mola et al., 2020). (Borbély et al., 2021). نشان دادند که سلنیوم باعث افزایش آنتی‌اکسیدانی گیاه استویا می‌شود. هدف از این پژوهش، مطالعه اثر قارچ *P. indica* و نانوذرات سلنیوم بر فعالیت‌های زیستی گیاه استویا با تمرکز بر محتوای ترکیبات فنلی، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و نیز خاصیت ضد باکتریایی آن است.

مواد و روش‌ها

شرایط کشت گیاه

این پژوهش در آزمایشگاه فیزیولوژی گیاهی دانشگاه بوعلی‌سینا همدان در بهمن ماه سال ۱۳۹۸ انجام شد. فاکتورهای آزمایش شامل قارچ *P. indica* (تلقیح و عدم تلقیح) و نانوذرات سلنیوم (صفر، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر بر اساس تجربیات قبلی) بودند. از روش اسپری برگی جهت اعمال نانوذرات سلنیوم استفاده شد (Tofangsazpour et al., 2019). جهت تهیه اسپور (*P. indica* DSM 11827)، قارچ مذکور بر روی محیط کشت کفر (Kaefer's medium) کشت و در انکوباتور در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ هفته نگهداری شد. جهت تلقیح قارچ، از گیاهچه‌های حاصل از ریزازدیادی جوانه‌های انتهایی برگرفته از دانه‌رست‌های استویا که از کشت بذر آن در محیط کشت پایه (Murashige MS and Skoog, 1962) بدست آمده بودند، استفاده شد. گیاهچه‌های واجد ۱۰ میانگره (شکل a) انتخاب و ریشه آن‌ها در سوسپانسیون اسپور قارچ ($10^5 \times 5$ اسپور در میلی‌لیتر) و نمونه‌های شاهد در آب مقطر به مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفتند. در نهایت گیاهان تلقیح شده و تلقیح نشده به گلدان‌های حاوی خاک منتقل و در اتاق رشد نگهداری شدند. گیاهان استویا هر ۲ روز یک بار با آب مقطر و هفته‌ای یک بار با محلول ۱/۲ هوگلند آبیاری شدند. پس از تأیید برقراری همزیستی از طریق رنگ‌آمیزی (Philips and Hayman, 1970) ریشه گیاه استویا (شکل b)، نانوذرات سلنیوم (۱۰-۴۵ نانومتر، شرکت پیشگامان نانومواد ایرانیان) در دو غلظت ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر، هفته‌ای یک بار در ۳ هفته قبل از برداشت اسپری شدند. برداشت اول دو ماه پس از انتقال گیاهچه‌ها به گلدان (مرحله رویشی یا vegetative stage) (شکل c) و برداشت دوم در آغاز مرحله گلدهی (initial flowering) انجام شد (شکل d). (۱)

ارزیابی شاخص‌های رشد

شاخص‌های رشد ارزیابی شده در این پژوهش شامل وزن تر و خشک و طول ریشه و اندام هوایی بودند.

ارزیابی محتوای سلنیوم

محتوای سلنیوم پس از هضم نمونه گیاهی با دستگاه Perkin Elmer Optima 7300 dv ICP-OES Spectrometer (USA) (Liu and ZX, 2009) ارزیابی شد.

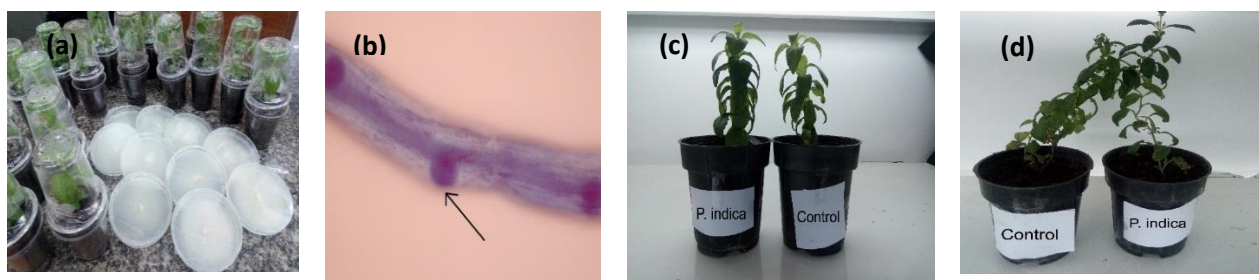


Figure 1. (a) *Stevia* seedlings grown in MS media, (b) *P. indica* spores on the *Stevia* root surface, (c) *Stevia* plants at vegetative stage, (d) *Stevia* plants at initial flowering stage.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

تمام آزمایش‌ها به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی (نانوذره سلنیوم، قارچ *P. indica* و اعمال همزمان این دو) در ۳ تکرار (۳ گیاه از ۳ گلدان) انجام شد و نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار (Mean \pm S) گزارش شدند. رسم نمودارها و آنالیز داده‌ها توسط نرم‌افزارهای Exel و SPSS نسخه ۱۲ و مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون دانکن ($P \leq 0.05$) انجام شد.

نتایج و بحث

ارزیابی شاخص‌های رشد

پس از تلقیح ریشه‌های گیاه استویا با قارچ *P. indica*، اسپوره‌های قارچ در ریشه‌ها مشاهده شد و میزان کلونیزاسیون ریشه در تیمارهای مختلف ۳۵-۶۵٪ و با بیشترین میزان در مرحله رویشی بدست آمد. شاخص‌های رشد گیاه استویا تحت تأثیر نانوذرات سلنیوم و *P. indica* قرار گرفتند. اثر مثبت تلقیح *P. indica* بر شاخص‌های رشد در سطح ۰/۰۵ معنی‌دار بود. به نحوی که وزن خشک اندام هوایی ۴۷/۱۹٪ نسبت به شاهد در مرحله رویشی و ۶۱/۶۲٪ در مرحله آغاز گلدهی و طول بخش هوایی ۳۱/۲۲٪ نسبت به شاهد در مرحله رویشی و ۳۵/۷۲٪ در مرحله آغاز گلدهی و طول ریشه ۵۸/۵۴٪ نسبت به شاهد در مرحله رویشی و ۳۲/۸۱٪ در مرحله آغاز گلدهی افزایش نشان دادند. همچنین تیمار نانوذرات سلنیوم در غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر باعث تغییر طول اندام هوایی و ریشه (به ترتیب ۱۱/۷٪ و ۲۹/۴٪ در مرحله رویشی و ۱۸/۵۷٪ و ۷٪ در مرحله آغاز گلدهی) شد که در سطح ۰/۰۵ معنی‌دار نبود (جدول ۱). اثرات مفید میکوریز آریسکولار بر رشد گیاه استویا در مطالعات مختلف گزارش شده‌است (Zewail et al., 2021). همچنین (Shah et al., 2019) گزارش کردند که طول ساقه و ریشه، در *Cymbidium aloifolium* در حضور *P. indica* افزایش یافت. (Rai et al., 2001) نشان دادند

ارزیابی محتوای فنل کل

جهت ارزیابی محتوای فنل کل عصاره متانولی نمونه‌ها، از معرف فولین-سیوکالتو و قرائت جذب مخلوط واکنشی در طول موج ۷۵۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر UV-Visible مدل Perkin Elmer استفاده شد. محتوای فنل کل با استفاده از منحنی استاندارد اسیدگالیک محاسبه و برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر ارائه شد (Foline and Denis, 1912).

ارزیابی پتانسیل آنتی‌اکسیدانی

بدین منظور از عصاره متانولی تهیه شده توسط سوکسله و تغلیظ شده توسط روتاری Lab Tech مدل Ev311، استفاده شد. جهت مطالعه ارزیابی آنتی‌اکسیدانی، درصد فعالیت مهار رادیکال آزاد ۲، ۲-دی فنیل ۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH) توسط عصاره‌ها در برابر اسید آسکوربیک به عنوان شاهد استاندارد اندازه‌گیری شد. بعلاوه مقادیر IC_{50} عصاره‌ها و اسید آسکوربیک نیز محاسبه شد (Sharma and Bhat, 2009).

ارزیابی فعالیت ضد باکتریایی

اثرات ضد باکتریایی عصاره متانولی نمونه‌ها در غلظت‌های (۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) با استفاده از روش انتشار دیسک در برابر باکتری‌های *Bacillus thuringiensis* (PTCC 1385) (Wild) *Escherichia coli* و *Staphylococcus aureus* (Wild) *Pseudomonas aeruginosa* (PTCC 15442) (Awoyinka et al., 2007). از دیسک‌های حاوی ۳۰ میلی‌گرم از آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین، پنی‌سیلین و سفالکسین (پادتن طب، ایران) به عنوان شاهد مثبت و از دیسک حاوی DMSO (رقیق‌کننده عصاره‌ها) به عنوان شاهد منفی استفاده شد. فعالیت ضد باکتریایی عصاره‌ها با اندازه‌گیری قطر هاله‌های شفاف عدم رشد و محاسبه میانگین قطر نهایی از ۳ تکرار انجام شد.

توجهی رشد ریشه را در کشت بافت توتون تحریک می‌کند (Domokos-Szabolcsy et al., 2012). همچنین El-Batal et al. (2016) گزارش کردند که نانوذره سلنیوم در غلظت کم (۰/۵ppm) شاخص‌های رشد سیب‌زمینی را افزایش می‌دهد. در توافق با نتایج پژوهش (Javaid et al., 2007) مبنی بر اثر کلونیزاسیون میکوریز *N. papyraceus* بر محتوای سلنیوم در مراحل مختلف رشدی *Cynodon dactylon*، در پژوهش حاضر نیز محتوای این عنصر در مراحل مختلف رشد گیاه استوایی تلقیح شده با *P. indica* متفاوت بود.

طول ساقه و ریشه، سطح برگ، تعداد گل‌آذین و بذر در *Withania somnifera* و *Spilanthes calva* در حضور *P. indica* افزایش یافت. اثرات مثبت *P. indica* بر رشد گیاه را می‌توان به نقش این قارچ در افزایش جذب مواد مغذی و تولید هورمون‌های رشد نسبت داد (Mensah et al., 2020). سلنیوم در غلظت کم محرک رشد و فتوسنتز در گیاهان است، اما در غلظت‌های بالا سمی بوده و منجر به نکرور برگ، کاهش رشد و در نهایت مرگ پیش از بلوغ می‌شود (Zhou et al., 2003). مشخص شده‌است که نانوذره سلنیوم به طور قابل

Table 1. Effects of SeNPs application and *P. indica* colonization on growth parameters of *Stevia* plants at vegetative and initial flowering stages.

Treatment	Growth stage	Shoot length (cm)	Shoot fresh weight (g)	Shoot dry weight (g)	Root length (cm)	Root fresh weight (g)	Root dry weight (g)
Control	Vegetative	14.73 ^{de} ±0.5	5 ^c ±0.50	0.96 ^b ±0.15	3.57 ^c ±0.39	0.96 ^{ab} ±0.01	0.49 ^g ±0.01
SeNPs (5)		15.66 ^{cd} ±0.5	4.75 ^b ±0.44	0.91 ^b ±0.80	3.91 ^c ±0.76	0.98 ^{ab} ±0.08	0.53 ^f ±0.02
SeNPs (10)		16.66 ^c ±1.52	6.32 ^c ±0.31	0.95 ^b ±0.08	4.53 ^{bc} ±0.68	0.95 ^{ab} ±0.08	0.56 ^{ef} ±0.02
<i>P. indica</i>		19.33 ^b ±1.52	7.3 ^d ±0.41	1.42 ^c ±0.39	5.66 ^{ab} ±0.57	1.42 ^a ±0.39	0.75 ^e ±0.03
<i>P. indica</i> + SeNPs (5)		20.33 ^b ±2.08	7.4 ^{ab} ±0.64	1.32 ^c ±0.50	6.76 ^{ab} ±0.92	1.32 ^{ab} ±0.32	0.81 ^b ±0.03
<i>P. indica</i> + SeNPs (10)		23.16 ^a ±1.25	7.5 ^a ±0.41	1.6 ^c ±0.32	6.93 ^a ±0.96	1.6 ^d ±0.24	0.87 ^a ±0.01
Control	Initial flowering	50.66 ^{gh} ±1.15	10.79 ^d ±0.45	1.85 ^{ef} ±0.55	12.83 ^d ±0.76	1.99 ^d ±0.01	0.92 ^e ±0.02
SeNPs (5)		55.8 ^f ±1.75	14.31 ^c ±0.59	2.05 ^{def} ±0.19	13.57 ^{cd} ±1.45	1.98 ^d ±0.13	1.03 ^{de} ±0.06
SeNPs (10)		55.1 ^f ±0.76	16.36 ^c ±0.57	2.09 ^{de} ±0.18	15.2 ^{bc} ±0.64	1.95 ^d ±0.50	1.16 ^d ±0.15
<i>P. indica</i>		68.7.6 ^{cd} ±1.32	20.33 ^b ±1.04	2.99 ^b ±0.20	17.01 ^{ab} ±0.52	2.5 ^d ±0.56	1.78 ^b ±0.52
<i>P. indica</i> + SeNPs (5)		72.33 ^{ab} ±2.08	21.28 ^{ab} ±0.91	3.01 ^b ±0.12	18.11 ^a ±0.34	2.7 ^d ±0.25	1.88 ^b ±0.02
<i>P. indica</i> + SeNPs (10)		75.33 ^a ±1.52	23.13 ^a ±0.90	3.33 ^a ±0.25	17.73 ^a ±1.62	2.26 ^d ±0.63	2.12 ^a ±0.16

Significant differences between means, as determined by Duncan test ($P \leq 0.05$), are indicated by different letters.

در میلی‌لیتر در مقایسه با گیاهان تلقیح نشده گردیدند، اما در غلظت ۸۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، هر دو گیاهان تلقیح شده و نشده محتوای سلنیوم بالاتری نشان دادند. (Peng et al., 2020) نشان دادند که کربوکسیلات‌های ریزوسفر باعث تبدیل سلنیوم متصل به اکسید آهن به اشکال قابل دسترس و محلول می‌شوند و کلونیزاسیون میکوریز، ریشه گیاه را جهت جذب بیشتر کربوکسیلات‌ها تحریک می‌کند.

ارزیابی محتوای فنل کل

بر اساس نتایج حاصل، محتوای فنل کل ارزیابی شده در تیمارهای مختلف در مرحله رویشی بیش از آغاز گلدهی بود. تغییرات محتوای فنل کل در برگ در مرحله رویشی به ترتیب در غلظت ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر SeNPs (۷/۱۶٪ و ۴۹/۲٪ نسبت به شاهد) و در مرحله آغاز گلدهی (۱۶/۴٪ و ۲۱/۶۹٪ نسبت به شاهد) بدست آمد، که معنی دار نبود. لیکن تلقیح *P. indica* منجر به افزایش محتوای فنل کل (در مرحله رشد رویشی ۷۲٪ و در مرحله آغاز گلدهی ۵۲/۹٪ نسبت به شاهد)

ارزیابی محتوای سلنیوم

نتایج حاصل از آنالیز ICP، ضمن تأیید انباشت سلنیوم در برگ نشان داد که میزان انباشت نانوذرات سلنیوم در برگ با افزایش غلظت اعمال شده در هر دو مرحله رشد بصورت معنی‌داری (در سطح ۰/۰۵) افزایش یافت. لیکن اثر *P. indica* در افزایش محتوای سلنیوم معنی دار نبود. در تمام تیمارها محتوای سلنیوم در مرحله رویشی بیشتر از آغاز گلدهی بود. حداکثر میزان انباشت سلنیوم در تیمار *P. indica* + SeNPs (10) مشاهده شد (شکل ۲). قارچ *P. indica* از جمله اندوفیت‌های شبه میکوریزی است که با تقویت جذب عناصر توسط گیاه میزبان، عملکرد آن را افزایش می‌دهد. تاکنون در مورد جذب سلنیوم در گیاهان تلقیح شده با *P. indica* پژوهشی انجام نشده و گزارش‌های مبنی بر افزایش جذب سلنیوم توسط قارچ‌های میکوریز نیز محدود هستند. (Jianheng et al., 2015) نشان دادند که قارچ‌های میکوریز باعث بهبود جذب سلنیوم در مریم‌گلی در غلظت ۲۰ میکروگرم

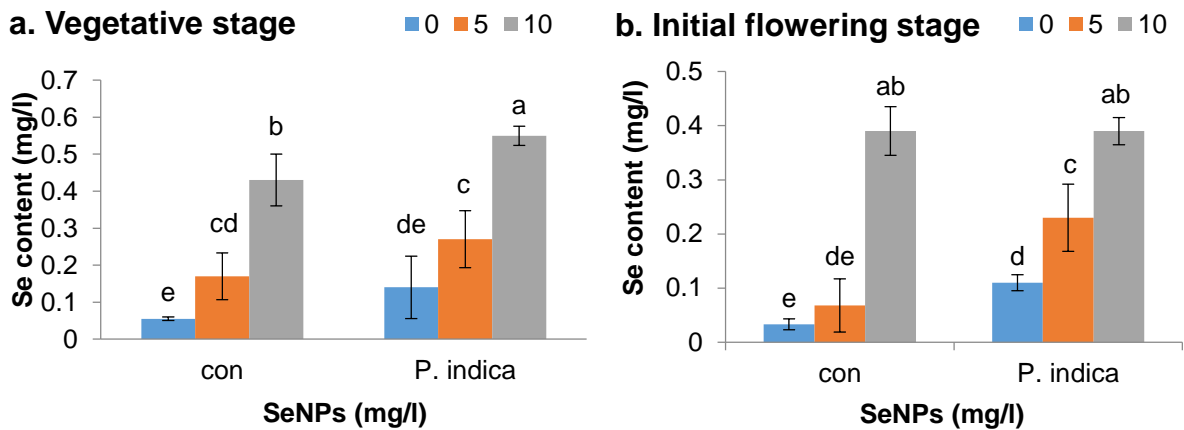


Figure 2. Selenium content of the *Stevia* plants treated with selenium nanoparticles (SeNPs) and inoculated with *P. indica* at vegetative (a) and initial flowering (b) stages. Significant differences between means, as determined by Duncan test ($P \leq 0.05$), are indicated by different letters.

ارزیابی پتانسیل آنتی‌اکسیدانی

نتایج حاصل از بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی تیمارهای مختلف در اشکال ۳ و ۴ و جدول ۳ ارائه شده‌است. نتایج نشان داد که در تمام تیمارها فعالیت آنتی‌اکسیدانی در مرحله رویشی بالاتر از آغاز گلدهی بود. علیرغم کمتر بودن فعالیت آنتی-اکسیدانی گیاهان شاهد در مقایسه با اسید آسکوربیک، افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی در تیمار همزمان قارچ و نانوذرات سلنیوم به ویژه در غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد. همچنین پتانسیل آنتی‌اکسیدانی با افزایش غلظت عصاره و ماده موثره محلول واکنش افزایش یافت. کمترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی در نمونه شاهد و در غلظت ۰/۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نمونه در مراحل رویشی و آغاز گلدهی به ترتیب ۷۲/۲۵ و ۶۲/۰۵ میلی‌گرم در لیتر بدست آمد. همچنین بیشترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی در مرحله رویشی در غلظت ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و در تیمار همزمان *P. indica* + (10) به میزان ۹۲/۳۴ و در مرحله آغاز گلدهی در غلظت ۰/۸ میلی‌گرم در میلی‌لیتر نمونه و در تیمار همزمان *P. indica* + (10) SeNPs به میزان ۱۰۱/۰۶ بدست آمد. مقادیر IC_{50} (غلظتی از عصاره که ۵۰٪ رادیکال آزاد را مهار می‌کند) بیشتر، بیانگر توانایی کمتر آنتی‌اکسیدان در مهار رادیکال آزاد است. تلقیح قارچ و کاربرد نانوذرات سلنیوم موجب کاهش میزان IC_{50} در مقایسه با اسید آسکوربیک شدند. برگ‌های استویا دارای استویول‌گلیکوزیدها، فلاونوئیدها، آلکالوئیدها، کلروفیل‌ها و گزانتوفیل‌ها، هیدروکسی‌سینامیک اسیدها، اولیگوساکاریدهای خنثی و محلول در آب، آمینواسیدها، لیپیدها، اسانس‌ها و عناصر کمیاب هستند و

گردید. در تیمار همزمان (*P. indica* + SeNPs (10) محتوای فنل کل ۹۴٪ در مرحله رویشی و ۸۵٪ در مرحله آغاز گلدهی بیشتر از شاهد بدست آمد و کمترین محتوای فنل نیز در نمونه‌های شاهد مشاهده شد (جدول ۲). عوامل متعددی چون الگوی آبیاری، شرایط اقلیمی، تغییرات آب و هوا، مدیریت پس از برداشت و نیز تکنیک‌های آزمایشگاهی استخراج ممکن است بر محتوای فنل تاثیر بگذارند. با این حال محتوای فنل در این پژوهش با نتایج برخی مطالعات همخوانی داشت (Garcia-Mier et al., 2021; Rastgoo et al., 2018). مشخص شده‌است که *P. indica* مانند قارچ‌های میکوریز با تغییر فعالیت‌های متابولیسمی گیاه میزبان، باعث انباشت پلی-فنل‌ها می‌شود. از سوی دیگر تولید ترکیبات فنلی از طریق سیستم دفاعی گیاه همگام با تولید گلیکوپروتئین‌ها و لیپوپولی-ساکاریدها توسط آنزیم‌های هیدرولاز گیاهی که در پاسخ به تلقیح قارچ *P. indica* القا می‌شوند، افزایش می‌یابد (Bagheri et al., 2014). همچنین مشخص شده‌است که قارچ‌های میکوریز با تاثیر بر فعالیت آنزیم‌های کلیدی بیوسنتز ترکیبات فنلی، چون فنیل‌آلانین‌آمونیا لیا ز و تیروزین-آمینوترانسفراز، باعث افزایش این ترکیبات در گیاه می‌شوند (Ru et al., 2017). نانوذرات سلنیوم باعث افزایش محتوای فنل کل در کلم‌چینی و سیب‌زمینی بنفش نیز شده‌اند (Gasecka et al., 2015; Leamsamrong et al., 2019). سلنیوم با افزایش فعالیت فنیل‌آلانین‌آمونیا لیا ز بعنوان آنزیم کلیدی مسیر فنیل پروپانوئید، منجر به افزایش ترکیبات فنلی می‌شود (Sreelakshmi and Sharma, 2008).

اسپورها، رشد هیف‌ها و تحریک تلقیح ریشه تأثیر می‌گذارند (Khalvandi et al., 2015). (Pusztahelyi et al., 2015).
 (2019) همبستگی معنی‌داری میان فعالیت آنتی‌اکسیدانی و محتوای ترکیبات فنلی در گیاه *Mentha piperita* تلقیح شده با *P. indica* گزارش کردند. مطالعات زیادی در مورد خاصیت آنتی‌اکسیدانی نانوذرات سلنیوم انجام شده‌است. فعالیت مهار رادیکال DPPH توسط نانوذرات سلنیوم در مطالعات (2019) Boroumand et al. و Shubharani et al. (2019) نیز گزارش شده‌است. سلنیوم از طریق تنظیم مسیر فنیل پروپانوئید و انباشت ترکیبات فنلی، نقش مهمی در پتانسیل آنتی‌اکسیدانی گیاهان دارد (Zahedi et al., 2020).

عصاره آن‌ها با کاهش فشار خون، کنترل دیابت و بهبود هضم و نیز افزایش حرکات روده، اثرات مفیدی بر سلامتی انسان دارد. اخیراً فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی عصاره برگ استویا نیز گزارش شده‌است، هرچند ترکیبات مسئول این فعالیت‌ها کاملاً مشخص نیست. گزارش شده‌است که رابطه مثبت معنی‌داری میان محتوای ترکیبات فنلی و رادایوزید A با توان آنتی-اکسیدانی عصاره برگ استویا وجود دارد، ولی این رابطه میان رادایوزید C و استویوزید با پتانسیل آنتی‌اکسیدانی وجود ندارد (Tavarini et al., 2015). در توافق با گزارش‌های قبلی، بنظر می‌رسد که ترکیبات فنلی نقش کلیدی در تعامل میان گیاه استویا و قارچ همزیست ایفا نموده و بر جوانه‌زنی

Table 2. Total Phenol content of the *Stevia* leaves at vegetative and initial flowering stages

Treatment	Total phenol (mg/g)	
	Growth stage: Vegetative	Growth stage: Initial flowering
Control	2.5 ^f ±0.008	4.87 ^a ±0.01
<i>P. indica</i>	4.3 ^b ±0.02	1.89 ^e ±0.006
SeNPs (5)	2.6 ^e ±0.006	2.9 ^c ±0.006
SeNPs (10)	3.37 ^d ±0.004	2.2 ^d ±0.006
<i>P. indica</i> + SeNPs (5)	4.1 ^c ±0.004	2.3 ^d ±0.002
<i>P. indica</i> + SeNPs (10)	4.87 ^a ±0.01	3.3 ^b ±0.007

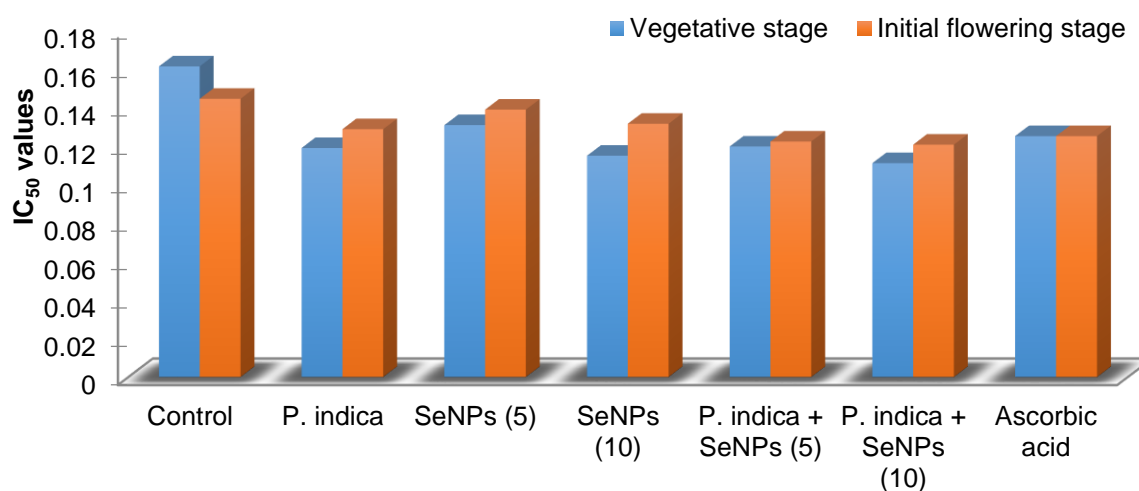


Figure 3. IC₅₀ values of the *Stevia* leaves at vegetative and initial flowering stages and ascorbic acid as standard

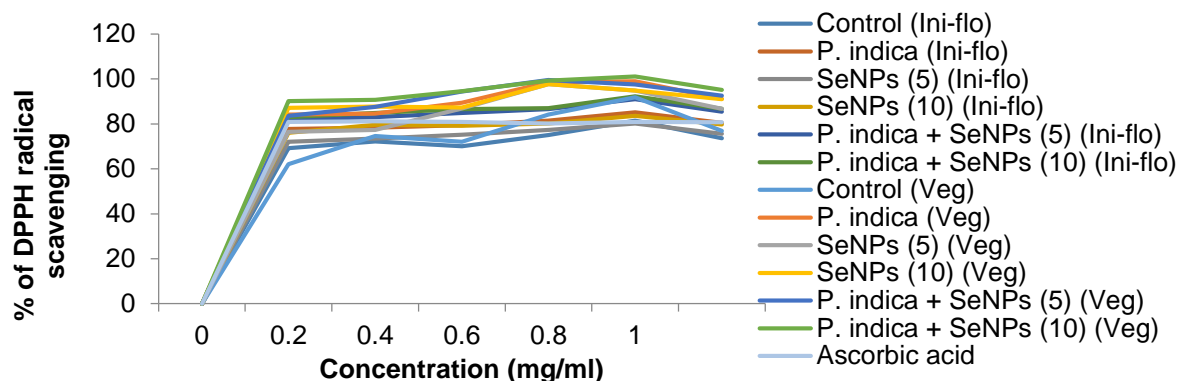


Figure 4. DPPH radical scavenging of the *Stevia* leaves at vegetative and initial flowering stages

Table 3. Antiradical activity (%) and IC₅₀ value (mg/ml) of the *Stevia* leaves at vegetative and initial flowering stages and ascorbic acid as standard

Treatment	IC ₅₀ (mg/ml)	Average of DPPH radical scavenging (%)	Growth stage
Control	0.1612	76.93 ^d	Vegetative
<i>P. indica</i>	0.1188	91.14 ^{bc}	
SeNPs (5)	0.1307	86.66 ^c	
SeNPs (10)	0.1148	90.94 ^b	
<i>P. indica</i> + SeNP (5)	0.1195	92.56 ^{ab}	
<i>P. indica</i> + SeNP (10)	0.1109	95.17 ^a	
Control	0.1443	73.63 ^{de}	Initial flowering
<i>P. indica</i>	0.1285	80.44 ^{ad}	
SeNPs (5)	0.1387	75.67 ^{abc}	
SeNPs (10)	0.1313	79.73 ^{ab}	
<i>P. indica</i> + SeNPs (5)	0.1221	85.45 ^{ab}	
<i>P. indica</i> + SeNPs (10)	0.1205	86.76 ^a	
Ascorbic acid	0.125	80.61	

Experiment was performed in triplicate and expressed as mean \pm SD. Values in each row with different superscripts are significantly different ($P \leq 0.0$)

و در برابر باکتری *S. aureus* و در تیمار همزمان SeNPs و *P. indica* + (10) به ترتیب به میزان ۲۸/۳ و ۲۶/۶۹ میلی‌متر بدست آمد. بعلاوه عصاره‌های مربوط به مرحله رویشی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری نسبت به مرحله آغاز گلدهی داشتند. برخلاف نتایج ما Mohammadi Gholami and Naseri (2016) با مطالعه خواص ضد میکروبی اسانس گیاه *Artemisia hussckenechtii* نشان دادند که این گیاه در مرحله گلدهی دارای فعالیت ضد میکروبی بالاتری است که ممکن است به تغییر محتوای ترکیبات موثر در فعالیت عصاره در این مرحله باشد. اثرات ضد میکروبی نانوذرات سلنیوم در برابر طیف گسترده‌ای از سویه‌های باکتری بیماری‌زا گزارش شده و جهت درمان موثر بیماری‌های عفونی پیشنهاد شده‌است (Cremonini et al., 2016). هرچند مقادیر زیاد آن‌ها منجر به بروز اثرات سمی می‌شود. فناوری نانو یک روش ایمن جهت کاهش سمیت و افزایش عملکرد این عنصر است. et al.

ارزیابی فعالیت ضد باکتریایی

نتایج مربوط به ارزیابی فعالیت ضد باکتریایی عصاره نمونه‌های مورد آزمایش در برابر دو باکتری گرم مثبت و دو باکتری گرم منفی در جداول ۴ (مرحله رویشی) و ۵ (مرحله آغاز گلدهی) ارائه شده‌است. عصاره حاصل از نمونه‌ها در برابر سه باکتری *S. aureus*، *E. coli* و *B. thuringiensis* موثر بوده و قطر هاله بدست آمده در برابر باکتری *P. aeruginosa* نسبت به سه باکتری دیگر کمتر بود که نشان‌دهنده مقاومت بیش‌تر آن است. نمونه شاهد در برابر باکتری *P. aeruginosa* هیچ گونه فعالیتی در هر دو مرحله رشدی گیاه نشان ندادند. افزایش فعالیت ضدباکتریایی نمونه‌ها در هنگام تلقیح *P. indica* و کاربرد نانوذرات سلنیوم در هر دو مرحله رشدی مشاهده شد. بزرگترین قطر هاله بدست آمده در مرحله رشد رویشی و آغاز گلدهی در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر نمونه

Table 4. Antibacterial activity of the *Stevia* leaves at vegetative stage

Treatment	Concentration (mg/l)	Inhibition zone (mm)			
		<i>S. aureus</i>	<i>B. thuringiensis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
<i>P. indica</i>	25	20.66 ^{ab} ±1.52	17.16 ^b ±0.76	18 ^a ±1	NA
	50	21.33 ^{ab} ±2.51	21.16 ^a ±1.75	14.33 ^b ±1.04	NA
	100	24 ^a ±2	13.16 ^c ±0.76	16.16 ^{ab} ±2	7.1 ^b ±1.15
	200	24.83 ^a ±1.04	14.83 ^c ±0.76	18.66 ^a ±1.04	13.16 ^a ±0.76
SeNPs (5)	25	18.83 ^b ±1.6	15.56 ^a ±1.06	15.43 ^{ab} ±1.2	11.33 ^a ±1.04
	50	23.16 ^a ±1.25	16.83 ^a ±0.28	13.86 ^{bc} ±1.9	5.86 ^b ±1.3
	100	19.5 ^b ±1.5	9.8 ^c ±1.89	12.16 ^c ±0.76	NA
	200	24.16 ^a ±1.25	12.63 ^b ±0.32	16.16 ^a ±0.76	6.5 ^b ±2
SeNPs (10)	25	22.83 ^{ab} ±0.76	17.5 ^b ±1.5	17.63 ^b ±1.2	13.83 ^a ±1.6
	50	24.2 ^a ±1	22.5 ^a ±1.3	16.26 ^b ±1.56	7.5 ^b ±1.5
	100	20.83 ^b ±1.75	14 ^c ±1.5	18.16 ^b ±1.89	NA
	200	25 ^a ±1.78	14.66 ^{bc} ±2	23 ^a ±2.64	10 ^b ±1.5
<i>P. indica</i> + SeNPs (5)	25	23.3 ^b ±1.3	20.33 ^a ±1.44	18 ^{ab} ±1.32	13.33 ^a ±1.04
	50	27.16 ^a ±0.76	20.7 ^a ±1.75	17.83 ^{ab} ±1.25	6.76 ^c ±1.5
	100	18.96 ^c ±1.76	16.33 ^b ±1.52	15.66 ^b ±1.52	NA
	200	26.63 ^a ±1.5	18.66 ^{ab} ±1.44	18.83 ^a ±1.89	8.9 ^b ±0.5
<i>P. indica</i> + SeNPs (10)	25	27.1 ^{ab} ±0.65	22.3 ^b ±0.81	19.83 ^b ±2	13.3 ^a ±0.81
	50	27.9 ^a ±0.98	24.66 ^a ±1.4	18.9 ^{bc} ±2.1	12.16 ^a ±1
	100	23.66 ^c ±1.25	14.33 ^c ±0.28	15.9 ^c ±1.9	NA
	200	28.3 ^a ±1.25	22.53 ^b ±0.5	28 ^a ±1.3	9.9 ^b ±1.8

Table 5. Antibacterial activity of the *Stevia* leaves at initial flowering stage

Treatment	Concentration (mg/l)	Inhibition zone (mm)			
		<i>S. aureus</i>	<i>B. thuringiensis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Control	25	15.16 ^{bc} ±1.25	13.5 ^a ±0.5	12.16 ^a ±0.28	NA
	50	17.33 ^{ab} ±0.76	13.5 ^a ±0.5	11.58 ^a ±0.87	NA
	100	14.83 ^c ±1.25	6.66 ^c ±1.25	11.5 ^a ±1.32	NA
	200	18.16 ^a ±1.25	10.5 ^b ±0.86	13.5 ^a ±1.32	NA
<i>P. indica</i>	25	19.66 ^b ±1.52	15.16 ^b ±0.76	16 ^a ±1	NA
	50	19.66 ^b ±2.51	21.33 ^a ±1.52	13 ^b ±2.29	NA
	100	21.16 ^{ab} ±1.04	11.5 ^c ±1.32	14.66 ^{ab} ±0.57	5.8 ^b ±0.57
	200	21.33 ^a ±1.52	13.16 ^{bc} ±0.28	16.5 ^a ±0.5	12.16 ^a ±1.25
SeNPs (5)	25	17.16 ^b ±1.89	14.03 ^a ±1.84	13.6 ^a ±1.15	9.83 ^a ±0.76
	50	20.66 ^a ±0.57	15 ^a ±1.32	11.83 ^{ab} ±1.75	5.06 ^b ±0.89
	100	17.5 ^b ±1.5	5.83 ^b ±0.57	10.8 ^b ±1.31	NA
	200	22 ^a ±0.5	12.86 ^a ±1.4	13.16 ^{ab} ±0.76	5.4 ^b ±1.53
SeNPs (10)	25	19.16 ^{bc} ±0.76	16 ^b ±1.8	17.16 ^a ±1.8	12.66 ^a ±1.52
	50	22.5 ^a ±1.5	19.33 ^a ±1.3	15 ^a ±1	6.83 ^b ±1.6
	100	18 ^c ±2.17	10.5 ^c ±1.3	11.66 ^b ±1.52	NA
	200	20.99 ^{ab} ±1.1	11.83 ^c ±1.6	16.16 ^a ±0.76	6.33 ^b ±0.76
<i>P. indica</i> + SeNPs (5)	25	18 ^{bc} ±1	15.16 ^b ±1.25	15.7 ^b ±2	13.43 ^a ±0.81
	50	26.6 ^a ±1.99	18.26 ^a ±0.76	14.16 ^b ±0.76	6.23 ^b ±1.18
	100	17.26 ^c ±1.1	13.16 ^b ±1.04	14.5 ^b ±0.86	NA
	200	20.43 ^b ±1.88	14.36 ^b ±1.3	20 ^a ±1	4.8 ^b ±0.76
<i>P. indica</i> + SeNPs (10)	25	22.66 ^b ±1.75	20.66 ^a ±0.76	18 ^b ±2	10.83 ^a ±1.89
	50	24 ^b ±1.5	21.16 ^a ±1.25	15.66 ^{bc} ±1.04	10.5 ^a ±1.32
	100	21.5 ^b ±1	12.33 ^b ±0.76	13.5 ^c ±1.3	NA
	200	26.96 ^a ±1.74	22.63 ^a ±1.23	22.83 ^a ±1.5	6.8 ^b ±1.18

Table 6. Antibacterial activity of three antibiotics as positive controls

Inhibition zone (mm)			Bacteria
Gentamicin	Penicillin	Cephalexin	
NA	NA	Na	<i>E. coli</i>
25±0.57	NA	0.18±10	<i>S. aureus</i>
25±0.44	NA	Na	<i>P. aeruginosa</i>
20±0.66	NA	30±0.22	<i>B. thuringiensis</i>

NA: No Active.

مطلوب گزارش شده و تیمار نانوذرات سلنیوم و تلقیح قارچ *P. indica* آن را بهبود بخشیده است. علی‌رغم مقاوم بودن باکتری‌های مورد مطالعه نسبت به پنی‌سیلین، اثرات ضد باکتریایی برخی از نمونه‌ها بیشتر از پنی‌سیلین بود.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان داد که فعالیت آنتی-اکسیدانی و ضد باکتریایی عصاره برگ استویا همسو با افزایش محتوای فنل، با تلقیح قارچ *P. indica* و کاربرد نانوذرات سلنیوم بویژه در غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر بهبود یافت، هرچند تاثیر تلقیح قارچ بیشتر از کاربرد نانوسلنیوم بود. بعلاوه عصاره گیاهان تحت تیمار همزمان *P. indica* و نانوذرات سلنیوم، فعالیت ضدباکتریایی قابل توجهی بویژه در برابر باکتری‌های گرم مثبت نشان دادند.

سپاسگزاری

نگارندگان از حمایت مالی دانشگاه بوعلی‌سینا در انجام این پژوهش قدردانی می‌کنند

(El-Zayat (2021) نشان دادند که نانوذرات سنتز شده سلنیوم به روش زیستی در برابر باکتری‌های بیماری‌زای گرم مثبت و منفی اثر مهارکنندگی دارند. تاکنون در مورد فعالیت ضد باکتریایی گیاهان تیمار شده با سلنیوم گزارشی ارائه نشده است، ولی بنظر می‌رسد که سلنیوم با افزایش محتوای فنل گیاه، خاصیت ضدباکتریایی آن را بهبود می‌بخشد. اطلاعات در مورد فعالیت ضد باکتریایی قارچ‌های میکوریز و *P. indica* نیز محدود است. همزیستی میکوریز آربسکولار می‌تواند آسیب‌های ناشی از پاتوژن‌ها یا انگل‌ها را کاهش داده و مکانیسم‌های دفاعی گیاهان را از طریق افزایش میزان ترکیبات فنلی و پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی تحریک کند (Song et al., 2015). در توافق با برخی گزارش‌ها، تقویت خاصیت ضد باکتریایی گیاهان تلقیح شده با *P. indica* را می‌توان به افزایش ترکیبات فنلی نسبت داد، زیرا این ترکیبات قادرند گیرنده‌های سطح سلولی را از دسترس باکتری‌ها دور کنند (Khalil et al., 2020). با مقایسه فعالیت ضدباکتریایی نمونه‌های مورد مطالعه با آنتی‌بیوتیک‌های مرجع (جدول ۶) نیز، قدرت بازدارندگی عصاره گیاه استویا در برابر این باکتری‌ها

References

- Mohebodini, M., Khademvatan, S., Jafari, M. and Kumar, V. 2021. *Piriformospora indica* based elicitation for overproduction of phenolic compounds by hairy root cultures of *Ficus carica*. Journal of Biotechnology, 327: 43-53.
- Awoyinka, O.A., Balogun, I.O. and Ogunnowo, A.A. 2007. Photochemical screening and *in vitro* bioactivity of *Cnidocolus aconitifolius* (Euphorbiaceae). Journal of Medicinal Plants Research, 1(3): 63-65.
- Bagheri, S., Ebrahimi, M.A., Davazdah Emami, S. and Minooyi Moghadam, J. 2014. Terpenoids and phenolic compounds production of mint genotypes in response to mycorrhizal bio-elicitors. Technical Journal of Engineering and Applied Sciences, 4(4): 339-348.
- Borbély, P., Molnár, Á., Vályon, E., Ördög, A., Horváth-Boros, K., Csupor, D. and Kolbert, Z. 2021. The effect of foliar selenium (Se) treatment on growth, photosynthesis, and oxidative-nitrosative signalling of *Stevia rebaudiana* leaves. Antioxidants, 10(1): 72.
- Boroumand, S., Safari, M., Shaabani, E., Shirzad, M. and Faridi-Majidi, R. 2019. Selenium nanoparticles: synthesis, characterization and study of their cytotoxicity, antioxidant and antibacterial activity. Materials Research Express, 6(8): 1-9.
- Carocho, M., Morales, P. and Ferreira, I.C.F.R. 2015. Natural food additives: Quo vadis? Trends in Food Science and Technology, 45: 284-295.

- Cremonini, E., Zonaro, E., Donini, M., Lampis, S., Boaretti, M., Dusi, S., Melotti, P., Lieo, M.M. and Vallini, G. 2016. Biogenic selenium nanoparticles: characterization, antimicrobial activity and effects on human dendritic cells and fibroblasts. *Microbial Biotechnology*, 9(6): 758-771.
- D'Amato, R., Regni, L., Falcinelli, B., Mattioli, S., Benincasa, P., Dal Bosco, A., Pacheco, P., Proietti, P., Troni, E., Santi, C. and Businelli, D. 2020. Current knowledge on selenium biofortification to improve the nutraceutical profile of food: A comprehensive review. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 68: 4075-4097.
- Di Mola, I., Cozzolino, E., Ottaiano, L., Nocerino, S., Roupheal, Y., Colla, G., El-Nakhel, C. and Mori, M. 2020. Nitrogen use and uptake efficiency and crop performance of baby spinach (*Spinacia oleracea* L.) and lamb's lettuce (*Valerianella locusta* L.) grown under variable sub-optimal N regimes combined with plant-based biostimulant application. *Agronomy*, 10: 278.
- Domokos-Szabolcsy, E., Marton, L., Sztrik, A., Babka, B., Prokisch, J. and Fari, M. 2012. Accumulation of red elemental selenium nanoparticles and their biological effects in *Nicotinia tabacum*. *Plant Growth Regulation*, 68: 525-531.
- El-Batal, A.I., Sidkey, N.M., Ismail, A., Arafa, R.A. and Fathy, R.M. 2016. Impact of silver and selenium nanoparticles synthesized by gamma irradiation and their physiological response on early blight disease of potato. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 8: 934-951.
- El-Zayat, M.M., Eraqi, M.M., Alrefai, H., El-Khateeb, A.Y., Ibrahim, M.A., Aljohani, H.M., Aljohani, M.M. and Elshaer, M.M. 2021. The antimicrobial, antioxidant, and anticancer activity of greenly synthesized selenium and zinc composite nanoparticles using *Ephedra aphylla* extract. *Biomolecules*, 11: 470-487.
- Folin, O. and Denis, W. 1912. On phosphofungic phosphomolybdic compounds as color reagents. *Journal of Biological Chemistry*, 12: 239-243.
- Garcia-Mier, L., Meneses-Reyes, A., Jimenez-Garcia, S., Mercado Luna, A., García Trejo, J., Contreras-Medina, L. and Feregrino-Perez, A. 2021. Polyphenol content and antioxidant activity of stevia and peppermint as a result of organic and conventional fertilization. *Journal of Food Quality*, pp. 1-6.
- Gasecka, M., Mleczeck, M., Siwulski, M., Niedzielski, P. and Kozak, L. 2015. The effect of selenium on phenolics and flavonoids in selected edible white rot fungi. *LWT-Food Science and Technology*, 63(1): 726-731.
- Javaid, A., Riaz, T. and Nawaz Khan, S. 2007. Mycorrhizal status of *Narcissus papyraceus* Kerl-Gawl. co-cultivated with *Cynodon dactylon* Pers. *International Journal of Agriculture & Biology*, 9(6): 902-904.
- Jianheng, L.I., Yajun, Q., Junxiang, Qi., Hanqiu W.U. and Xiaoyu, Y. 2015. Effect of am fungi and different selenium levels on the quality of *Salvia miltiorrhiza* Bge. *Frontiers in Physiology*, 8: 4174-4180.
- Khalil, R., Ali, Q.H.M. and Malik, A. 2020. Phenolic acid profiling by RP-HPLC: evaluation of antibacterial and anticancer activities of *Conocarpus erectus* plant extracts. *Biological and Clinical Sciences Research Journal*, pp. 10.
- Khalvandi, M., Amerian, M., Pirdashti, H. and Gholami, A. and Baradaran Firouzabadi, M. 2019. Study the physiological and biochemical properties of peppermint (*Mentha piperita* L.) in response to salt stress coexistence with *Piriformospora indica* fungi. *Journal of Plant Production Research*, 26(1): 1-19. [In Persian]
- Leamsamrong, K., Tongjaroenbuangam, W., Maneetong, S., Chantiratikul, A., Chinrasri, O. and Chantiratiku, P. 2019. Physicochemical contents, antioxidant activities, and acute toxicity assessment of selenium-enriched chinese kale (*Brassica oleracea* var. *alboglabra* L.) seedlings. *Journal of Chemistry*, pp. 1-12.
- Liu, K.L. and Gu, Z.X. 2009. Selenium accumulation in different brown rice cultivars and its distribution in fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 695-700.
- Mandal, S.M., Dias, R.O. and Franco, O.L. 2017. Phenolic Compounds in Antimicrobial Therapy. *Journal of Medicinal Food*, 20(10): 1031-1038.
- Mensah, R. A., Li, D., Liu, F., Tian, N., Sun, X., Hao, X., Lai, Z. and Cheng, C. 2020. Versatile *Piriformospora indica* and its potential applications in horticultural crops. *Horticultural Plant Journal*, 6(2): 111-121.
- Mohammadi Gholami, A. and Naseri, A. 2016. Study chemical composition and antimicrobial properties of essential oils of *Artemisia houssckenechtii* in three growth stage. The Third National Conference on Life Science. [In Persian]
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.
- Peng, Q., Wu, M., Zhang, Z., Su, R., He, H. and Zhang, X. 2020. The interaction of arbuscular mycorrhizal fFungi and phosphorus inputs on selenium uptake by alfalfa (*Medicago sativa* L.) and selenium fraction transformation in soil. *Frontiers in Plant Science*, 11: 1-13.

- Periche, A., Castelló, M.I., Heredia, A. and Escriche, I. 2015. Influence of extraction methods on the yield of steviol glycosides and antioxidants in *Stevia rebaudiana* extracts. *Plant Foods for Human Nutrition*, 70(2): 119-127.
- Philips, J.M. and Hayman, D.S. 1970. Improved procedures for cleaning roots and staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society*, 55: 158-161.
- Pusztahelyi, T., Holb, I. and Pócsi, I. 2015. Secondary metabolites in fungus-plant interactions. *Frontiers in Plant Science*, 6: 573.
- Rai, M., Acharya, D., Singh, A. and Varma, A. 2001. Positive growth responses of the medicinal plants *Spilanthes calva* and *Withania somnifera* to inoculation by *Piriformospora indica* in a field trial. *Mycorrhiza*, 11: 123-128.
- Rastgoo, A., Sanikhani, M., Kheiry, A. and Aelaei, M. 2018. Effect of proline and salicylic acid on morphological and phytochemical characteristics of *Stevia rebaudiana* (Bert.). *Iranian Journal of Horticultural Science*, 50(1): 209-219. [In Persian]
- Ru, M., Wang, K., Bai, Z., Peng, L., He, S., Wang, Y. and Liang, Z. 2017. A tyrosine aminotransferase involved in rosmarinic acid biosynthesis in *Prunella vulgaris* L. *Scientific Reports*, 7: 1-12.
- Shah, S., Thapa, B.B., Chand, K., Pradhan, S., Maharjan, A., Verma, A., Thakuri L.S., Joshi P. and Pant, B. 2019. *Piriformospora indica* promotes the growth of the in-vitro-raised *Cymbidium aloifolium* plantlet and their acclimatization. *Plant Signaling & Behavior*, pp. 1-7.
- Sharma, O.P. and Bhat, T.K. 2009. DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry*, 113: 1202-1205.
- Shubharani, R., Mahesh, M. and Yogananda Murthy, V.N. 2019. Biosynthesis and characterization, antioxidant and antimicrobial activities of selenium nanoparticles from ethanol extract of bee propolis. *Journal of Nanomedicine and Nanotechnology*, 10: 1.
- Song, Y., Chen, D., Lu, K., Sun, Z. and Zeng, R. 2015. Enhanced tomato disease resistance primed by arbuscular mycorrhizal fungus. *Frontier in Plant Science*, 6: 786.
- Sreelakshmi, Y. and Sharma, R. 2008. Differential regulation of phenylalanine ammonia lyase activity and protein level by light in tomato seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46: 444-451.
- Tabet, A. and Boukhari, A. 2018. Antioxidant and antibacterial activities of two Algerian halophytes. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 50(1): 114-121.
- Tavarini, S., Sgherri, C., Ranieri, A.M. and Angelini, L.G. 2015. Effect of nitrogen fertilization and harvest time on steviol glycosides, flavonoid composition, and antioxidant properties in *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63: 7041-7050.
- Tofangszapou, R., Bakhshandeh, A., Abdalimashhadi, A., Moraditelavat, M. and Lotfi Jalal-Aabadi, A. 2021. Effect of potassium and boron foliar application on some of the qualitative and quantitative characteristics of stevia (*Stevia rebaudiana* L.). *Journal of Plant Productions*, 44(2): 181-194. [In Persian]
- Zahedi, S.M., Moharrami, F., Sarikhani, S. and Padervand, M. 2020. Selenium and silica nanostructure-based recovery of strawberry plants subjected to drought stress. *Scientific Reports*, 10: 1-18.
- Zewail, R.M.Y., Ali, M., El-Gamal, I.S.H., Al-Maracy, S.H.A., R. Islam, K.R., Elsadek, M., Azab, E., Gobouri, A.A., ElNahas, N., Mohamed, M.H.M. and El-Desouky, H.S. 2021. Interactive effects of arbuscular mycorrhizal inoculation with nano boron, zinc, and molybdenum fertilization on stevioside contents of *Stevia (Stevia rebaudiana, L.)* plants. *Horticulturae*, 7: 260.
- Zhou, N., Xiao, H., Li, T.K., Nur-E-Kamal, A.F. and Liu, L. 2003. DNA damage-mediated apoptosis induced by selenium compounds. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(32): 29532-29537.
- Zulfiqari, M., Nazeri, V., Rejali, F. and Sefidkan, F. 2014. Investigation of the effect of different mycorrhiza species on growth characteristics and essential oil content of *Ocimum basilicum* L. *Journal of Plant Productions*, 37(4): 47-56. [In Persian]