

Effect of Mycorrhizal Fungi and Rhizobium Bacteria on the Activity of Antioxidant Enzymes and Mineral Elements in Grass Pea (*Lathyrus sativus*) under Drought Stress

Pages
21-39

H. Shamsaee¹, M. Oveysi^{2*}, M. Nasri³, H. Larijani⁴ and H. Tohidi moghadam⁵

1, 2, 3, 4 & 5) Agrotechnology Department, Islamic Azad University, Varamin-Pishva Branch, Varamin, Iran.

*Corresponding author : meysam.oveysi12@gmail.com

Received date: 2025.01.29

Accepted date: 2025.04.13

Abstract

Drought stress is considered one of the most significant environmental factors reducing the growth and yield of many plants, especially in arid and semi-arid regions worldwide. Nowadays, using growth-promoting fungi and bacteria is an effective way to combat environmental stresses. This research was conducted over two years as a split-factorial experiment within a randomized complete block design. The main factor was drought levels (50, 80, and 110 mm based on a Class A evaporation pan), and the sub-factor was mycorrhizal fungi and Rhizobium bacteria (inoculation and non-inoculation, factorially arranged). The study was replicated four times, and the antioxidant activity and mineral content of grass pea (*Lathyrus sativus*) were evaluated. The results showed that drought stress increased the activity of catalase, superoxide dismutase, and malondialdehyde enzymes. The application of fungi and bacteria significantly improved the measured indicators. Co-inoculation of seeds with mycorrhiza and Rhizobium significantly increased potassium at all drought stress levels and calcium under severe drought stress. Overall, the highest measured indicators under both control and drought stress conditions were observed in the treatments involving the use of bacteria and fungi. Fungi and bacteria can induce tolerance in plants against drought conditions. Since this method is less costly than other approaches, it can be recommended for increasing yield in areas facing stress conditions.

Keywords: Biofertilizers, Catalase, Malondialdehyde, Mineral elements and Superoxide dismutase.

اثر قارچ مایکوریزا و باکتری ریزوبیوم بر فعالیت آنزیم‌های آنتی-اکسیدانی و عناصر معدنی خلر (*Lathyrus*

sativus) تحت تنش کم آبی

شماره صفحات

۲۱-۳۹

حمیدرضا شمسایی^۱، میثم اویسی^{۲*}، محمد نصری^۳، حمیدرضا لاریجانی^۴ و حمیدرضا توحیدی مقدم^۵

۱، ۲، ۳، ۴ و ۵) گروه آگروتکنولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین-پیشوا، ورامین، ایران.

* نویسنده مسئول: meysam.oveysi12@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۱/۲۴

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۱/۱۰

چکیده

تنش کم آبی از مهم‌ترین عوامل محیطی کاهش رشد و عملکرد بسیاری از گیاهان به خصوص در مناطق خشک و نیمه‌خشک دنیا محسوب می‌گردد. امروزه استفاده از قارچ‌ها و باکتری‌های محرک رشد شیوه‌ای مؤثر در مقابله با تنش‌های محیطی است. این پژوهش طی دو سال به صورت اسپلیت فاکتوریل و در قالب طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی تحت سطوح کم آبی (۵۰، ۸۰ و ۱۱۰ میلی‌متر بر اساس تشتک تبخیر کلاس A) به عنوان عامل اصلی، قارچ مایکوریزا و باکتری ریزوبیوم (تلقیح و عدم تلقیح به صورت فاکتوریل به عنوان عامل فرعی) در چهار تکرار اجرا و فعالیت آنزیم‌های آنتی-اکسیدانی و عناصر معدنی گیاه خلر مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد تنش کم آبی سبب افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و مالون دی آلدئید شد و استفاده از قارچ و باکتری به‌طور معنی‌داری سبب بهبود در شاخص‌های اندازه‌گیری شد. تلقیح توأم بذر با مایکوریزا و ریزوبیوم به‌طور معنی‌داری پتانسیم را در تمامی سطوح تنش کم آبی و کلسیم را تحت تنش کم آبی شدید افزایش داد. به‌طور کلی مشخص شد که بیشترین شاخص‌های اندازه‌گیری شده در هر دو شرایط شاهد و تنش کم آبی از تیمار استفاده از باکتری و قارچ بود. قارچ و باکتری می‌تواند سبب القای تحمل در گیاه در مقابله با شرایط کم آبی شود و از آنجایی که نسبت به سایر روش‌ها هزینه کمتری مورد نیاز است بنابراین در مناطقی که با شرایط تنش روبرو هستند می‌توان جهت افزایش عملکرد استفاده از قارچ و باکتری ریزوبیوم را پیشنهاد داد.

واژه‌های کلیدی: سوپراکسید دیسموتاز، عناصر معدنی، کاتالاز، کودهای زیستی، مالون دی-آلدئید.

مقدمه

تنش کم‌آبی، عامل اصلی کاهش عملکرد گیاهان در جهان (به‌طور متوسط ۵۰٪) است و زمانی رخ می‌دهد که تبخیر آب از جذب آن توسط ریشه بیشتر باشد (Zargar *et al.*, 2017). گیاه خلر (*Lathyrus sativus* L.)، یک لگوم یک‌ساله بومی آسیای جنوب غربی با ویژگی‌های رشدی منحصربه‌فرد شامل رشد سریع، تحمل به تنش‌ها، تثبیت نیتروژن، عملکرد دانه و علوفه بالا و دامنه تحمل اکولوژیک وسیع است (Gonçalves *et al.*, 2022). این گیاه در مناطق خشک و نیمه‌خشک زیست‌توده کمی تولید می‌کند، اما دارای ویژگی‌های مورفولوژیک مانند برگ‌های باریک و سیستم ریشه‌ای عمیق برای تحمل کم‌آبی است (Barpete *et al.*, 2020). خلر همچنین در دماهای شدید و مناطق با بارندگی ۳۰۰ تا ۱۵۰۰ میلی‌متر رشد می‌کند و مقاوم به کم‌آبی، بارندگی و سیلاب است و در خاک‌های فقیر و غرقابی نیز رشد می‌کند (Goldsmith *et al.*, 2022). استحکام و قابلیت تثبیت نیتروژن خلر آن را برای شرایط نامطلوب جذاب کرده (Santos *et al.*, 2021) و دانه‌های آن با داشتن پروتئین بالا (۳۴٪/۱۸-۶/۲) نقش مهمی در کاهش سوء‌تغذیه جهانی دارند (Verma *et al.*, 2022).

تنش کم‌آبی با اختلال در فرآیندهای فیزیولوژیک، عملکرد گیاه را کاهش می‌دهد. بسته شدن روزنه‌ها در شرایط کم‌آبی منجر به کاهش تثبیت دی‌اکسید کربن می‌شود (Noreen *et al.*, 2017). تحمل کم‌آبی شامل سازوکارهای فیزیولوژیکی متعددی است و درک پاسخ‌های فیزیولوژیکی گیاه به کم‌آبی برای شناخت مکانیسم مقاومت ضروری است (Chen *et al.*, 2016). تنش کم‌آبی سبب ایجاد صدمات اکسیداتیو شده (Resende *et al.*, 2019) و تعادل اکسیداسیون و احیاء در سطح سلولی را بر هم می‌زند (Ebrahimi *et al.*, 2016). بسته شدن روزنه‌ها در زمان تنش کم‌آبی منجر به تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS^۱) از جمله H₂O₂^۲ در بافت‌ها می‌شود (Foster *et al.*, 2015). افزایش ROS موجب تنش اکسیداتیو ثانویه و آسیب‌های سلولی می‌شود (Furlan *et al.*, 2016). گیاهان دارای سامانه‌های آنتی‌اکسیدانی آنزیمی (مانند SOD^۳، POD^۴، CAT^۵، APX^۶ و GR^۷) و غیرآنزیمی برای غیرفعال کردن ROS و کاهش خسارت‌های اکسیداتیو هستند (Khan *et al.*, 2019). آنزیم SOD خط اول دفاعی است و رادیکال‌های سوپراکسید را به H₂O₂ تبدیل می‌کند که سپس توسط APX به آب تبدیل می‌شود. H₂O₂ تولید شده نیز توسط APX، CAT و پراکسیداز پاک‌سازی می‌شود. واکنش CAT در شرایط تنش کم‌آبی متغیر است، اما CAT و APX نقش مهمی در حذف H₂O₂ دارند. پتاسیم در تنظیم اسمزی نقش دارد و کمبود آن با کاهش

^۱ گونه‌های فعال اکسیژن

^۲ هیدروژن پراکسید

^۳ سوپراکسید دیسموتاز،

^۴ پراکسیداز

^۵ کاتالاز

^۶ آسکوربات پراکسیداز

^۷ گلووتاتیون ردوکتاز

هدایت دی‌اکسید کربن و اختلال در فعالیت آنزیم‌ها همراه است (Gurrieri *et al.*, 2020). قارچ‌های مایکوریزا با همزیستی با گیاهان، جذب عناصر غذایی را بهبود می‌بخشند (Liang *et al.*, 2020). باکتری‌های محرک رشد گیاه (PGPB) مانند آزوسپیریلیوم، از توپاکتر، سودوموناس و ریزوبیوم با مکانیسم‌های مختلف از جمله تغییر در مورفولوژی ریشه با واسطه هورمون‌هایی مانند IAA⁸، از گیاهان در برابر تنش‌های محیطی محافظت می‌کنند (Fogaca de Freitas *et al.*, 2022; Amine-Khodja *et al.*, 2022). پژوهش‌ها نشان داده‌اند که قارچ‌های مایکوریزا با افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی از گیاه در برابر خسارات اکسیداتیو محافظت می‌کنند (Ghanbary *et al.*, 2020). در مطالعه‌ای (Ghorbanli *et al.*, 2012) نشان دادند که تنش کم‌آبی در کتان باعث کاهش فعالیت CAT و افزایش فعالیت پراکسیداز و پرولین می‌شود. همچنین Soleymani and Pirzad (2015) نیز بیان کردند که مایکوریزا با خنثی کردن رادیکال‌های آزاد و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در تعدیل تنش کم‌آبی مؤثر است. مایکوریزا با ایجاد یک همزیستی با ریشه گیاهان، جذب مواد مغذی معدنی را افزایش می‌دهد (Begum *et al.*, 2019). این قارچ‌ها با تشکیل شبکه‌های گسترده‌ای از هیفا، سطح جذب را گسترش داده و به مواد مغذی غیرقابل دسترس (مانند فسفر و سایر عناصر) دسترسی پیدا می‌کنند (Ma *et al.*, 2021; Mohammad, 2019). مایکوریزا با تولید آنزیم‌ها، مواد مغذی نامحلول را محلول کرده و آنها را به ریشه گیاه منتقل می‌کند (Chen *et al.*, 2024; Gong *et al.*, 2023). این همزیستی، کارایی جذب مواد مغذی و تحمل گیاه در برابر تنش‌ها را بهبود می‌بخشد و برخی از قارچ‌ها می‌توانند مواد مغذی را برای استفاده در زمان کمبود، ذخیره کنند (Wang *et al.*, 2023; Müller *et al.*, 2017). به طور خلاصه، مایکوریزا به عنوان توسعه‌ای کارآمد از سیستم ریشه‌ای گیاه، به رشد و سلامت کلی اکوسیستم کمک می‌کند (Zhang *et al.*, 2022). تنش کم‌آبی با ایجاد تنش اکسیداتیو عملکرد گیاه مقاوم خلر را کاهش می‌دهد. از آنجایی که میکروارگانیسم‌های مفید خاک (قارچ مایکوریزا و باکتری محرک رشد) می‌توانند تحمل گیاه به کم‌آبی را از طریق تقویت سازوکار دفاعی آنتی‌اکسیدانی و بهبود تغذیه معدنی افزایش دهند، این پژوهش به منظور بررسی تأثیر کاربرد قارچ مایکوریزا و باکتری محرک رشد بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و غلظت عناصر معدنی خلر تحت تنش کم‌آبی انجام شد.

مواد و روش‌ها

این آزمایش به صورت اسپلینت فاکتوریل و در قالب طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی در چهار تکرار در مزرعه‌ای در روستای قلعه سفید (استان اصفهان) با طول جغرافیایی ۵۱ درجه و ۳۹ دقیقه و ۴۰ ثانیه و عرض جغرافیایی ۳۲ درجه و ۳۸ دقیقه و ۳۰ ثانیه، در ارتفاع ۱۵۹۰ متری از سطح دریا در سال‌های ۱۳۹۸ و ۱۳۹۹ اجرا شد. تیمارها شامل تنش کم‌آبی در سه سطح (۵۰، ۸۰ و ۱۱۰ میلی‌متر بر اساس تشت تبخیر کلاس A) به عنوان عامل اصلی و تلقیح و عدم تلقیح با قارچ مایکوریزا (مایکوریزا

⁸ ایندول-۳-استیک اسید

آرباسکولار (*Glomus intraradices*) و تلقیح و عدم تلقیح با باکتری همزیست ریزوبیوم (*Rhizobium leguminosarum*) بود. قبل از اجرای آزمایش به منظور بررسی نیازهای کودی گیاه خلر و تعیین خصوصیات شیمیایی خاک، نمونه‌ای مرکب از خاک مزرعه از عمق صفر تا ۳۰ سانتی‌متری انتخاب و مورد ارزیابی قرار گرفت (جدول ۱). خاک مورد آزمایش دارای بافت لوم رسی-سیلتی با شوری بالا (هدایت الکتریکی ۳/۹ دسی‌زیمنس بر متر) بود. به دلیل همگنی و عدم تغییر خواص فیزیکی شیمیایی خاک طی دو سال متوالی، آزمون خاک در سال اول آزمایش انجام شد.

جدول ۱: خصوصیات فیزیکی شیمیایی نمونه خاک

Table 1: Physicochemical properties of soil sample

شن (درصد)	سیلت (درصد)	رس (درصد)	پتاسیم قابل جذب (میلی گرم بر کیلوگرم)	فسفر قابل جذب (میلی گرم بر کیلوگرم)	نیترژن کل (درصد)	کربن آلی (درصد)	اسیدیته (دسی زیمنس بر متر)	هدایت الکتریکی (دسی زیمنس بر متر)
Sand (%)	Silt (%)	Clay (%)	Available Potassium (mg/kg)	Available Phosphorus (mg/kg)	Total Nitrogen (%)	Organic Carbon (%)	Saturated Paste pH	Electrical Conductivity (dS/m)
25	64	11	334	11.7	0.02	0.23	7.9	9.2

آماده‌سازی خاک و کاشت

جهت اجرای این طرح از رقم محلی خلر، تهیه شده از سازمان جهاد کشاورزی منطقه مورد مطالعه انجام شد. در پاییز، مزرعه شخم عمیق زده شد و در اواخر آذرماه، تهیه بستر نهایی با دیسک و ماله انجام شد. کاشت بذر در ۳۰ آذر و برداشت در ۲۵ خرداد انجام شد. کود سوپر فسفات تریپل (۱۰۰ کیلوگرم در هکتار) بر اساس نتایج آزمون خاک، به صورت یکنواخت به تمامی ۴۸ کرت آزمایشی با ابعاد ۱×۴ متر و فاصله ۵۰ سانتی‌متر بین کرت‌ها اضافه شد. فاصله بین اسپلیت‌ها نیز ۵۰ سانتی‌متر در نظر گرفته شد. بذور خلر پس از اندازه‌گیری درصد جوانه‌زنی در آزمایشگاه و ضدعفونی با قارچ‌کش کربوکسی تیرام (۲ در هزار)، به صورت دستی و هیرم‌کاری در عمق ۳-۵ سانتی‌متر پس از گاورو شدن خاک کاشته شدند. هر کرت شامل ۴ ردیف کشت بود که دو ردیف کناری به عنوان حاشیه و دو ردیف میانی برای اندازه‌گیری صفات در نظر گرفته شدند. جهت کنترل علف‌های هرز، از علف‌کش ترفلان (۲/۵ لیتر در هکتار) قبل از کاشت استفاده شد. اولین آبیاری قبل از کاشت انجام و نیاز آبی بعدی با استفاده از روش فائو و آمار تبخیر از تشتک کلاس A (۵۰، ۸۰ و ۱۱۰ میلی‌متر) تعیین شد (Allen et al., 1988). تبخیر از تشت تبخیر کلاس A به صورت روزانه و با رعایت سطح استاندارد آب (با استفاده از چاهک و گیج اندازه‌گیری) اندازه‌گیری و ثبت شد. سطح آب تشت پس از هر اندازه‌گیری به نقطه اولیه بازگردانده شد و آب تشت به منظور حفظ دقت اندازه‌گیری، به صورت دوره‌ای تعویض گردید. برای برداشت خلر در پلات‌های آزمایشی جهت اندازه‌گیری خصوصیات آنزیمی، نمونه‌برداری از برگ‌های کاملاً باز و جوان از گیاهان انتخاب شده در هر پلات صورت گرفته و بلافاصله پس از برداشت، نمونه‌ها در نیترژن مایع منجمد و تا زمان استخراج آنزیم در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

تیمارها

قارچ میکوریزا با نام تجاری مایکورت به صورت بذرمال استفاده شد. باکتری ریزوبیوم از مؤسسه تحقیقات خاک و آب استان اصفهان تهیه و به منظور تلقیح بذر، ۷ گرم مایه تلقیح (حاوی 10^7 عدد باکتری فعال در هر گرم) در محیط دور از نور خورشید با استفاده از محلول صمغ عربی ده درصد وزنی برای چسبندگی بهتر به بذرها اضافه شد (Namdari and Baghbani-Arani, 2024). برای تلقیح همزمان قارچ و باکتری، ابتدا قارچ میکوریزا به صورت بذرمال به بذرها افزوده شد تا پوشش اولیه را ایجاد کند. سپس، مایه تلقیح باکتری ریزوبیوم که با محلول صمغ عربی آماده شده بود، بلافاصله پس از قارچ و در همان محیط دور از نور خورشید و با دقت بر روی بذرها اعمال شد تا از پایداری و چسبندگی هر دو میکروارگانیسم به بذر اطمینان حاصل شود. این فرآیند دو مرحله‌ای امکان همزیستی و فعالیت مؤثر هر دو قارچ و باکتری را فراهم می‌آورد. تنش کم‌آبی در مرحله سه برگی بوته‌ها اعمال شد.

صفات مورد ارزیابی

در پایان آزمایش، ۱۰ بوته از هر کرت با حذف اثر حاشیه برای تعیین صفات زیر برداشت شدند.

پراکسیداسیون لیپید

میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی با استفاده از تست تیوباربیتوریک اسید (TBAT) و سنجش مالون‌دی‌آلدئید (MDA) ارزیابی شد. غلظت MDA با ضریب تصحیح $0/155$ محاسبه و بر حسب میکرومول بر گرم وزن تر ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{FW}$) با استفاده از رابطه (Hels and Packer, 1968) بیان شد.

$$\text{MDA } (\mu\text{mol/ g Fw}) = [A532 - A600/155] \times 1000 \quad \text{رابطه ۱}$$

در این معادله، MDA ($\mu\text{mol/ g Fw}$) غلظت مالون‌دی‌آلدئید بر حسب میکرومول بر گرم وزن تر، A532 جذب نمونه در طول موج ۵۳۲ نانومتر، A600 جذب نمونه در طول موج ۶۰۰ نانومتر، ۱۰۰۰ ضریب تبدیل میلی‌مول به میکرومول است.

فعالیت آنتی‌اکسیدانی

ابتدا بافر استخراج ($2/423$ گرم تریس در 100 میلی‌لیتر آب مقطر، $\text{pH}=7.8$ با HCl غلیظ، نگهداری ۲۴ ساعت در یخچال و افزودن 20 میلی‌لیتر گلیسرول و رساندن حجم به 200 میلی‌لیتر) تهیه شد. $0/5$ گرم نمونه برگ‌پودر شده با 5 میلی‌لیتر بافر استخراج مخلوط، ورتکس و به مدت ۱۵ دقیقه در 15000 دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. عصاره بالایی به عنوان عصاره آنزیمی برای سنجش فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز جدا شد. پروتئین عصاره با استفاده از روش برادفورد (Bradford, 1976) و معرف برادفورد ($0/1$ گرم کوماسی برلیانت بلو G250 در 50 میلی‌لیتر اتانول 96% و 50 میلی‌لیتر آب مقطر، مخلوط به مدت یک ساعت، افزودن قطره‌ای اسید ارتو فسفریک 85% و رساندن حجم به یک لیتر) و استاندارد پروتئین آلبومین سرم گاوی (1 میلی‌گرم در میلی‌لیتر) اندازه‌گیری شد.

فعالیت آنزیم کاتالاز

فعالیت کاتالاز در سه میلی‌لیتر بافر واکنش به صورت ۵۰ میلی‌مولار بافر فسفات سدیمی با pH=7، 10 میلی‌مولار آب اکسیژنه و ۴۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی اندازه‌گیری شد. پس از اضافه کردن آب اکسیژنه فعالیت کاتالاز موجود در عصاره آنزیمی، در طول موج ۲۴۰ نانومتر در مدت یک دقیقه توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل HITACHI u-1800) اندازه‌گیری شد. میزان فعالیت آنزیم طبق رابطه (۲) بر حسب واحد آنزیمی بر میلی‌گرم پروتئین در دقیقه تعیین شد. در این رابطه A (مقدار عصاره آنزیمی موجود در محلول واکنش)، B (مقدار بافر استخراج بکار رفته)، C (وزن نمونه تازه)، ΔOD (اختلاف جذب طول موج خاص هر آنزیم در طول مدت یک دقیقه)، EC (ضریب خاموشی آنزیم). برای کاتالاز EC برابر ۳۹/۴ میلی‌مول بر سانتی‌متر است (Sairam *et al.*, 2002).

$$\text{Enzyme activity (EA)} = (\Delta OD \times 1000) \times (A-1) / (EC \times B) / (C-1) \quad \text{رابطه ۲}$$

فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز

مخلوط واکنش شامل ۱۳ میلی‌مول متیونین، ۲۵ میکرومول نیتروبلوتترازولیوم، ۱/۵ میلی‌لیتر فسفات بافر (۱ مولار، pH=7.8)، ۶۰ میکرومول ریبوفلاوین (۱ میلی‌مولار) و ۵۰ میلی‌مول سدیم بی‌کربنات تهیه شد. ۲/۹ میلی‌لیتر از این مخلوط با ۲ میکرومول ریبوفلاوین و ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی به مدت ۱۵ دقیقه زیر نور لامپ فلورسانس (۱۵×۶ وات) قرار داده شد. فعالیت آنزیم با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۶۰ نانومتر اندازه‌گیری و با بلانک و شاهد مقایسه شد. میزان فعالیت آنزیم بر حسب واحد آنزیم در میلی‌گرم پروتئین کل بیان گردید (Sairam *et al.*, 2002).

ارزیابی عناصر پتاسیم و کلسیم

میزان پتاسیم در عصاره گیاه با استفاده از دستگاه فلیم فتومتر (Chapman and Pratt, 1962) (JENWAY PFP7) و میزان کلسیم با روش جذب اتمی شعله‌ای توسط دستگاه جذب اتمی (Shimadzu 1-670) اندازه‌گیری شد (Waling *et al.*, 1989).

محاسبات آماری طرح

پس از جمع‌آوری داده‌ها، تجزیه واریانس صفات اندازه‌گیری شده به کمک نرم‌افزار SAS نسخه ۹.۴ انجام شد؛ و میانگین‌ها با آزمون LSD در سطح پنج درصد مورد مقایسه قرار گرفتند. از نرم‌افزار Excel 2016 نیز برای ترسیم شکل‌ها استفاده شد.

نتایج و بحث

مالون‌دی‌آلدئید

نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که اثر متقابل تنش آبی، قارچ مایکوریزا و تلقیح باکتریایی بر صفات مورد بررسی

از نظر آماری معنی‌دار بود (جدول ۲). بر اساس نتایج به دست آمده، با افزایش سطوح تنش کم‌آبی در تیمارهای اعمال شده، میزان مالون‌دی‌آلدئید (MDA) به طور معنی‌داری افزایش یافت. بیشترین غلظت MDA در تیمارهای تنش کم‌آبی با تبخیر ۱۱۰ و ۸۰ میلی‌لیتر از تشت تبخیر و بدون تلقیح با قارچ میکوریزا و باکتری ریزوبیوم به ترتیب با مقادیر ۳۷/۲۵ و ۳۲/۰۰ میکرومول بر میلی‌گرم پروتئین مشاهده شد. در مقابل، کمترین میزان MDA در شرایط آبیاری بهینه همراه با تلقیح بذر با قارچ میکوریزا و باکتری ریزوبیوم به میزان ۱۹/۵۹ میکرومول بر میلی‌گرم پروتئین اندازه‌گیری شد (شکل ۱). اگرچه اعمال تنش کم‌آبی و افزایش شدت آن منجر به افزایش غلظت این ترکیب در گیاه گردید، اما اثر مثبت تلقیح با عوامل زیستی از طریق کاهش آسیب ناشی از تنش، سبب تعدیل شدت تنش و در نتیجه کاهش میزان MDA شد. در گیاهان سالم و بدون تنش، سطح MDA معمولاً پایین است زیرا سیستم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانی گیاه به طور موثری ROS تولید شده در طی فرآیندهای متابولیکی عادی را خنثی می‌کنند. کاهش MDA در این شرایط می‌تواند نشان‌دهنده‌ی سلامت بهینه گیاه باشد. غلظت مالون‌دی‌آلدئید در گیاه، مشابه سایر آنتی‌اکسیدان‌ها، می‌تواند به عنوان یک شاخص مناسب در ارزیابی مقاومت گیاه به تنش کم‌آبی مورد استفاده قرار گیرد؛ بنابراین، اندازه‌گیری میزان این ترکیب به عنوان یک بیومارکر می‌تواند در تعیین میزان تحمل گیاه به تنش نقش مؤثری ایفا کند. در شرایط تنش اکسیداتیو، پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع منجر به افزایش میزان لیپیدها شده و در اثر حمله رادیکال‌های آزاد به لیپیدها، آلدئیدهای مختلف از جمله مالون‌دی‌آلدئید تولید می‌شود. باکتری‌ها و قارچ‌ها با تغییر در تعادل بین تولید رادیکال‌های آزاد و ظرفیت دفاع آنتی‌اکسیدانی میزبان، میزان پراکسیداسیون لیپیدها و در نتیجه سطح مالون‌دی‌آلدئید را تحت تأثیر قرار می‌دهند. (Hassanpour Darvishi (2015) گزارش کرد که میزان مالون‌دی‌آلدئید در شرایط تنش کم‌آبی در برگ‌های گیاه سویا و گیاه خلر افزایش یافته است که با نتایج پژوهش حاضر همخوانی دارد. (Sandhya *et al.* (2011) اظهار داشتند که نشت‌یابی غشای سلولی گیاه در شرایط تنش کم‌آبیافزایش یافته و تلقیح بذر با باکتری و قارچ زیستی در مقایسه با تیمار عدم تلقیح موجب کاهش نشتی الکترولیت‌ها از غشاء شد.

فعالیت آنزیم کاتالاز

نتایج حاصل از مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که اعمال تنش کم‌آبی در سطح تبخیر ۸۰ میلی‌لیتر از تشت تبخیر منجر به افزایش معنی‌دار آماری در فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) در بین تیمارهای تلقیح و عدم تلقیح در این سطح تنش گردید، به طوری که فعالیت این آنزیم در محدوده ۲۶/۰۲ تا ۲۲/۲۷ واحد آنزیمی بر میلی‌گرم پروتئین در دقیقه متغیر بود (شکل ۲). کمترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز نیز در شرایط آبیاری بهینه و بدون تلقیح بذر با قارچ میکوریزا و باکتری ریزوبیوم به میزان ۱۶/۲۱ واحد آنزیمی بر میلی‌گرم پروتئین در دقیقه مشاهده شد (شکل ۲). تلقیح باکتری ریزوبیوم و قارچ میکوریزا از طریق کاهش تنش اکسیداتیو در گیاه موجب افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز برای تجزیه پراکسید هیدروژن می‌شود. در پژوهش حاضر، تحت شرایط تنش کم‌آبی، کاربرد باکتری ریزوبیوم و قارچ میکوریزا موجب افزایش مقاومت غشای سیتوپلاسمی گردید و با

افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز از فروپاشی و مرگ سلولی جلوگیری نمود. تنش کم‌آبی از طریق افزایش گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) سبب تخریب غشای سلولی، سیستم فتوسنتزی و اکسیداسیون بسیاری از ترکیبات حیاتی گیاهان می‌شود (Borishev et al., 2016). اولین خط دفاعی در مقابله با افزایش ROS در سلول‌های گیاهی را آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نظیر سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و پراکسیداز (POD) تشکیل می‌دهند؛ بنابراین، افزایش فعالیت این آنزیم‌ها در جهت کاهش اثرات منفی ROS تحت تنش کم‌آبی امری منطقی به نظر می‌رسد (Niu et al., 2018; Hosseinzadeh et al., 2016). افزایش فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز منجر به افزایش پتانسیل دفاعی گیاه در مقابله با تنش کم‌آبی شده و میزان تحمل گیاه را در برابر این تنش بهبود می‌بخشد (Borishev et al., 2016).

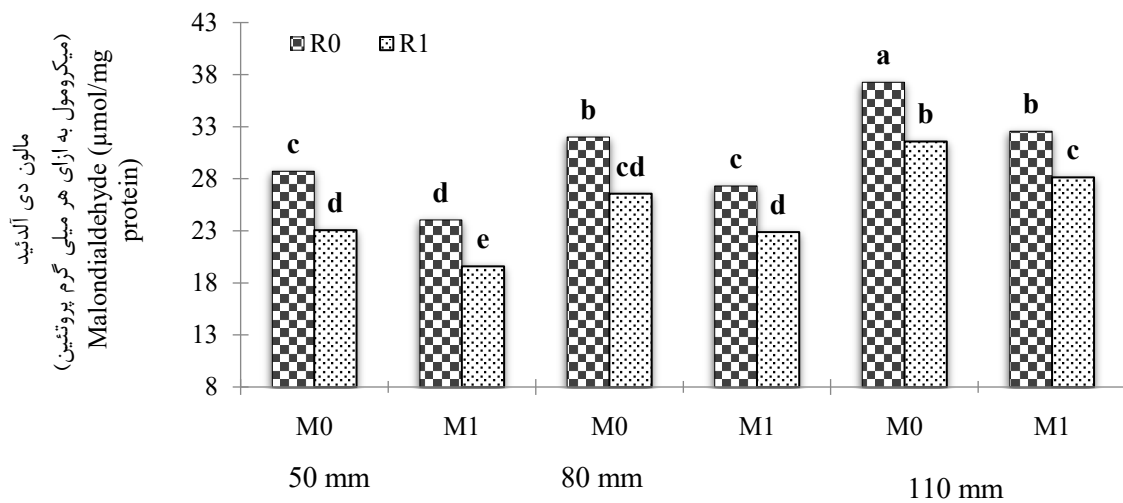
جدول ۲: نتایج تجزیه مرکب اثر سال، آبیاری، قارچ و باکتری بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و تجمع عناصر خنثی

Table 2: Combined Analysis of Variance for the Effects of Year, Irrigation, Fungi, and Bacteria on Antioxidant Enzyme Activities and Element Accumulation of Grass Pea.

منابع تغییرات C.V	درجه آزادی df	میانگین مربعات (MS)				
		مالون دی آلدئید Malondialdehyde	کاتالاز Catalase	سوپراکسید دیسموتاز Superoxide Dismutase	پتاسیم Potassium	کلسیم Calcium
سال Year (y)	1	0.0192 ^{ns}	0.0274 ^{ns}	0.0111 ^{ns}	5.254 ^{ns}	21.031 ^{ns}
تکرار (rep)	6	0.0166	0.0124	0.0012	3.352	31.002
تنش Stress (S)	2	3.2119 ^{**}	0.6989 [*]	1.4391 ^{**}	22.413 [*]	36.201 ^{**}
Y×S	2	0.0689 ^{ns}	0.2138 ^{ns}	0.0596 ^{ns}	2.407 ^{ns}	11.244 ^{ns}
خطای اصلی Main error	6	0.0311	0.0891	0.0154	3.076	861.4
قارچ میکوریزا Mycorrhizal fungi (M)	1	0.3609 [*]	0.0017 ^{ns}	0.2194 [*]	21.543 [*]	44.842 [*]
باکتری ریزوبیوم Rhizobium bacteria (RI)	1	0.3414 [*]	0.0234 ^{ns}	0.2186 [*]	20.108 [*]	49.254 [*]
y×M	1	0.0212 ^{ns}	0.0544 ^{ns}	0.0224 ^{ns}	7.094 ^{ns}	9.002 ^{ns}
y×RI	1	0.1327 ^{ns}	0.1012 ^{ns}	0.0241 ^{ns}	3.102 ^{ns}	22.163 ^{ns}
S×M	2	0.3465 [*]	3.2560 ^{**}	0.2295 [*]	91.331 ^{**}	276.615 ^{**}
S×RI	2	2.0321 ^{**}	4.1801 ^{**}	0.8321 ^{**}	69.337 ^{**}	159.821 ^{**}
M×RI	1	0.1002 ^{ns}	0.0103 ^{ns}	0.0332 ^{ns}	121.523 ^{**}	14.512 ^{ns}
y×S×M	2	0.0311 ^{ns}	0.0223 ^{ns}	0.0621 ^{ns}	2.411 ^{ns}	8.911 ^{ns}
y×S×RI	2	0.1103 ^{ns}	0.0715 ^{ns}	0.0521 ^{ns}	3.435 ^{ns}	16.203 ^{ns}
y×M×RI	1	0.0354 ^{ns}	0.0417 ^{ns}	0.0184 ^{ns}	1.284 ^{ns}	8.354 ^{ns}
S×M×RI	2	3.2981 ^{**}	3.2554 ^{**}	1.004 ^{**}	48.213 ^{**}	211.241 ^{**}
y×S×M×RI	6	2.2761 ^{ns}	1.3241 ^{**}	1.4314 ^{**}	56.122 ^{**}	189.102 ^{**}
خطای فرعی Sub-error	66	0.0251	0.0312	0.0326	2.982	6.381
ضریب تغییرات (درصد) Coefficient of variation (%)	-	4.21	5.67	3.41	4.92	3.56

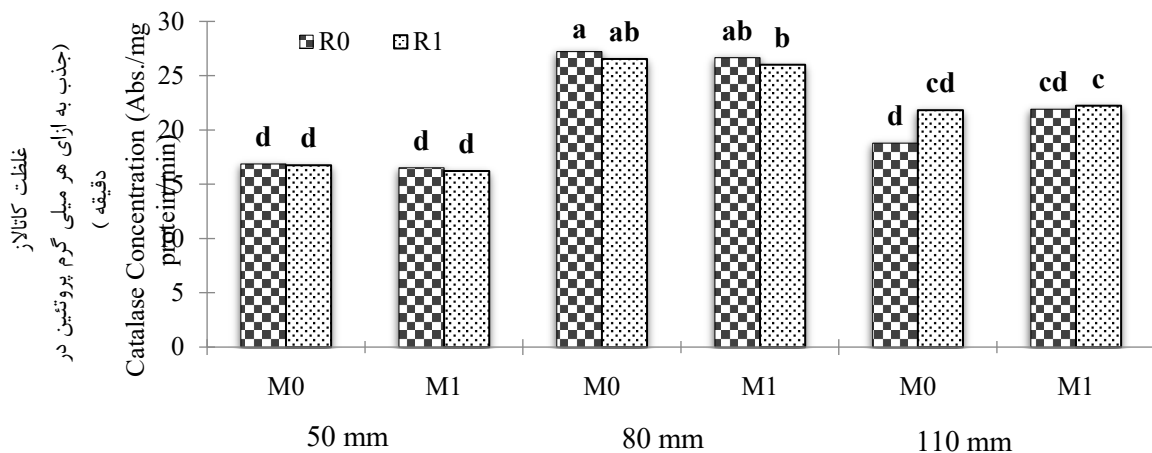
*, **, و ns به ترتیب نشان‌دهنده معنی‌داری در سطح ۵ و ۱ درصد و عدم معنی‌داری است.

"*, **, and ns denote significance at the 5% and 1% levels, and non-significance, respectively."



شکل ۱: اثرات متقابل مرکب دو ساله سطوح تنش کم آبی و کاربرد قارچ میکوریزا و باکتری ریزوبیوم بر غلظت آنزیم دی آلدئید
Figure 1: Effects of Combined Two-Year Interaction of Drought Stress Levels and Application of Mycorrhizal Fungi and Rhizobium Bacteria On the Concentration of Malondialdehyde Enzyme

عدم تلقیح قارچ میکوریزا، M1: تلقیح قارچ میکوریزا، R0: عدم تلقیح باکتری ریزوبیوم، R1: تلقیح باکتری ریزوبیوم، 50mm: تبخیر ۵۰ میلی‌لیتر از تشت تبخیر، 80mm: تبخیر ۸۰ میلی‌لیتر از تشت تبخیر، 110mm: تبخیر ۱۱۰ میلی‌لیتر از تشت تبخیر.
 M0: No mycorrhizal fungi inoculation, M1: Mycorrhizal fungi inoculation, R0: No Rhizobium bacteria inoculation, R1: Rhizobium bacteria inoculation, 50mm: 50 ml evaporation from evaporation pan, 80mm: 80 ml evaporation from evaporation pan, 110mm: 110 ml evaporation from evaporation pan.



شکل ۲: اثرات متقابل مرکب دو ساله سطوح تنش کم آبی و کاربرد قارچ میکوریزا و باکتری ریزوبیوم بر غلظت آنزیم کاتالاز
Figure 2: Effects of Combined Two-Year Interaction of Drought Stress Levels and Application of Mycorrhizal Fungi and Rhizobium Bacteria on On Concentration of the Catalase Enzyme.

M0: عدم تلقیح قارچ میکوریزا، M1: تلقیح قارچ میکوریزا، R0: عدم تلقیح باکتری ریزوبیوم، R1: تلقیح باکتری ریزوبیوم، 50mm: تبخیر ۵۰ میلی‌لیتر از تشت تبخیر، 80mm: تبخیر ۸۰ میلی‌لیتر از تشت تبخیر، 110mm: تبخیر ۱۱۰ میلی‌لیتر از تشت تبخیر.
 M0: No mycorrhizal fungi inoculation, M1: Mycorrhizal fungi inoculation, R0: No Rhizobium bacteria inoculation, R1: Rhizobium bacteria inoculation, 50mm: 50 ml evaporation from evaporation pan, 80mm: 80 ml evaporation from evaporation pan, 110mm: 110 ml evaporation from evaporation pan.

سوپر-اکسید دیسموتاز

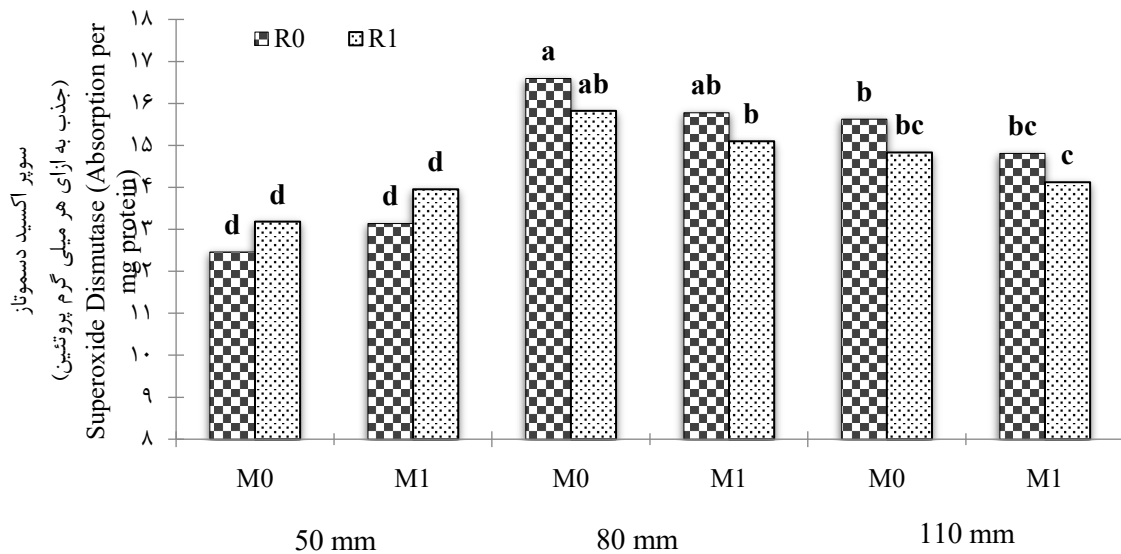
نتایج حاصل از مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که اعمال تنش کم آبی در سطح تبخیر ۸۰ میلی‌لیتر از تشت تبخیر، منجر

به افزایش معنی‌دار آماری در فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) در بین تیمارهای تلقیح و عدم تلقیح در این سطح تنش گردید، به طوری که فعالیت این آنزیم در محدوده ۱۵/۱ تا ۱۶/۵۹ واحد آنزیمی بر میلی‌گرم پروتئین در دقیقه متغیر بود (شکل ۳). کمترین میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در شرایط آبیاری بهینه و تحت تیمارهای تلقیح و عدم تلقیح در محدوده ۱۲/۴۶ تا ۱۳/۹۵ واحد آنزیمی بر میلی‌گرم پروتئین در دقیقه مشاهده شد (شکل ۳). تنش اکسیداتیو ناشی از افزایش گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) در سلول، به عنوان یکی از مهم‌ترین اثرات نامطلوب تنش‌های محیطی بر گیاه و فرآیندهای فیزیولوژیکی اساسی گیاهی شناخته می‌شود. با توجه به نقش حیاتی آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در حذف رادیکال سمی پراکسید هیدروژن در شرایط تنش‌های گوناگون، افزایش فعالیت این آنزیم در تیمارهای حاوی باکتری محرک رشد گیاه (PGPR) و قارچ‌های همزیست می‌تواند به عنوان یک عامل مؤثر در خنثی‌سازی ROS عمل نماید (Sepehri *et al.*, 2015). افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی از طریق القای سیستم دفاعی، موجب بیوسنتز و تجمع متابولیت‌های ثانویه می‌گردد (Mohammadi *et al.*, 2019). در این پژوهش، آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز (CAT) از الگوی نسبتاً مشابهی پیروی نمودند. به نظر می‌رسد با تولید پراکسید هیدروژن توسط آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، فعالیت آنزیم کاتالاز نیز به موازات آن تغییر کرده و پراکسید هیدروژن تولید شده را تجزیه می‌کند. فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز پس از اعمال تنش کم‌آبی تا سطح تبخیر ۸۰ میلی‌لیتر از تشتک تبخیر افزایش یافت و پس از آن روند کاهشی را نشان داد. افزایش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز در مراحل اولیه تنش کم‌آبی، گیاه را در برابر آسیب‌های اکسیداتیو محافظت می‌کند. کاهش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز پس از طولانی شدن دوره تنش کم‌آبی، بیانگر تضعیف عملکرد این آنزیم در حذف گونه‌های فعال اکسیژن می‌باشد. احتمالاً تولید متابولیت‌ها توسط باکتری محرک رشد، از جمله هورمون‌های محرک رشد گیاهی، نقش ویژه‌ای در تحریک و بیان پروتئین‌های آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی ایفا می‌کند. افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در گیاهان تلقیح شده با قارچ میکوریزا در سایر پژوهش‌ها نیز گزارش شده است (Porcel and Ruiz-Lozano, 2004; Khalafallah *et al.*, 2008). نتایج نشان داد که باکتری محرک رشد گیاه (از طریق تولید متابولیت‌هایی مانند هورمون‌های گیاهی که بیان پروتئین‌های آنزیمی را تحریک می‌کنند) و قارچ همزیست، با افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز به خنثی‌سازی گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) در شرایط تنش کمک می‌کنند.

پتاسیم و کلسیم برگ

نتایج پژوهش نشان داد که در تمامی سطوح تنش کم‌آبی اعمال شده، تلقیح بذر با قارچ میکوریزا و باکتری ریزوبیوم و همچنین تلقیح توأم آن‌ها سبب افزایش میزان پتاسیم در بافت برگ گردید، اگرچه این افزایش از نظر آماری تنها در تیمار تلقیح هم‌زمان با هر دو عامل زیستی (میکوریزا و ریزوبیوم) معنی‌دار بود (شکل ۴). بیشترین غلظت پتاسیم در برگ در شرایط آبیاری

بهینه و تلقیح هم‌زمان با قارچ مایکوریزا و باکتری ریزوبیوم به میزان ۰/۸۴۱ درصد و کمترین میزان در شرایط تنش کم‌آبی با تبخیر ۱۱۰ میلی‌لیتر از تشت تبخیر و بدون تلقیح بذر با قارچ و باکتری زیستی به میزان ۰/۵۹۵ درصد حاصل شد (شکل ۴).



شکل ۳: اثرات متقابل مرکب دو ساله سطوح تنش کم‌آبی و کاربرد قارچ مایکوریزا و باکتری ریزوبیوم بر غلظت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز

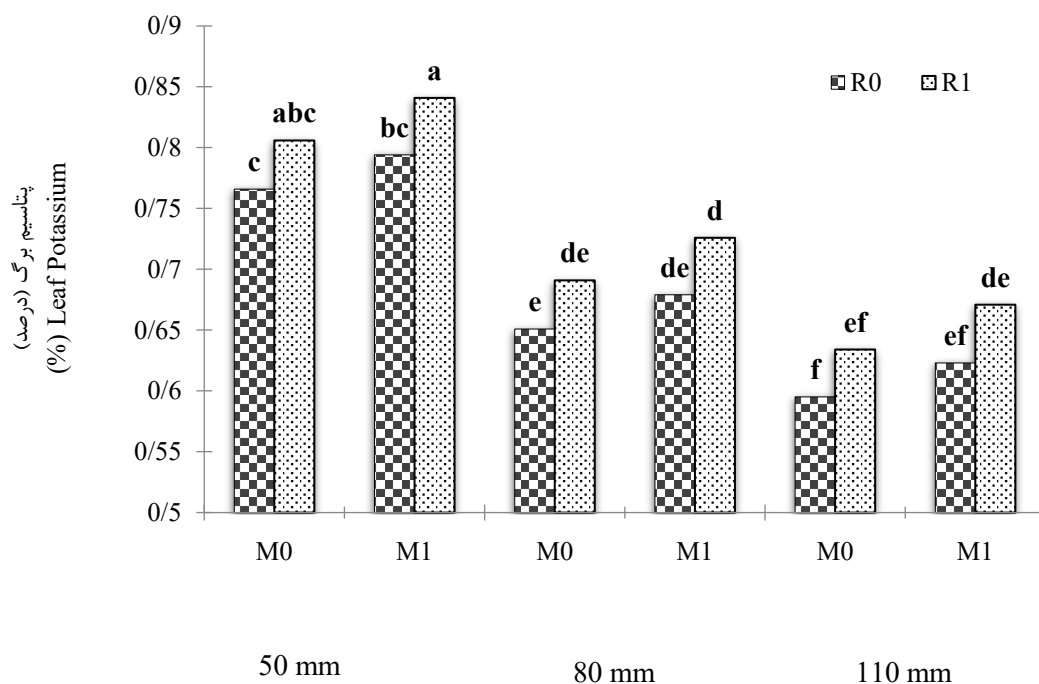
Figure 3: Effects of Combined Two-Year Interaction of Drought Stress Levels and Application of Mycorrhizal Fungi and Rhizobium Bacte on Concentration of Superoxide Dismutase Enzyme.

M0: عدم تلقیح قارچ مایکوریزا، M1: تلقیح قارچ مایکوریزا، R0: عدم تلقیح باکتری ریزوبیوم، R1: تلقیح باکتری ریزوبیوم، 50mm: تبخیر ۵۰ میلی‌لیتر از تشت تبخیر، 80mm: تبخیر ۸۰ میلی‌لیتر از تشت تبخیر، 110mm: تبخیر ۱۱۰ میلی‌لیتر از تشت تبخیر.

M0: No mycorrhizal fungi inoculation, M1: Mycorrhizal fungi inoculation, R0: No Rhizobium bacteria inoculation, R1: Rhizobium bacteria inoculation, 50mm: 50 ml evaporation from evaporation pan, 80mm: 80 ml evaporation from evaporation pan, 110mm: 110 ml evaporation from evaporation pan.

در شرایط آبیاری بهینه و تحت تیمار تنش کم‌آبی با تبخیر ۸۰ میلی‌لیتر از تشت تبخیر، اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای مختلف تلقیح مشاهده نگردید. در شرایط تنش کم‌آبی با تبخیر ۱۱۰ میلی‌لیتر از تشت تبخیر، تلقیح هم‌زمان با هر دو عامل زیستی (مایکوریزا و ریزوبیوم) سبب افزایش معنی‌دار میزان کلسیم در برگ در مقایسه با تیمار عدم تلقیح گردید (شکل ۴). بر اساس نتایج، بیشترین میزان کلسیم در برگ در شرایط آبیاری بهینه و تلقیح هم‌زمان بذر با قارچ مایکوریزا و باکتری ریزوبیوم به میزان ۳۹۲/۵۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم مشاهده شد. کمترین میزان کلسیم در برگ نیز تحت شرایط تنش کم‌آبی با تبخیر ۱۱۰ میلی‌لیتر از تشت تبخیر و بدون تلقیح با قارچ و باکتری زیستی به میزان ۳۴۲/۸۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم حاصل گردید (شکل ۵). جذب عناصر غذایی توسط گیاهان تحت شرایط تنش کم‌آبی به دلیل کاهش تعرق، اختلال در سیستم انتقال فعال و نفوذپذیری غشاء و در نتیجه کاهش نیروی جذب‌کنندگی ریشه، کاهش می‌یابد. همچنین با کاهش رطوبت خاک، سرعت انتشار مواد غذایی از محیط خاک به سطح جذب‌کننده ریشه کاهش پیدا می‌کند. کارایی سیستم ریشه گیاه نیز ممکن است در نتیجه کمبود رطوبت خاک تقلیل یابد. به‌طور کلی، گزارش‌های موجود در رابطه با اثر تنش کم‌آبی بر میزان عناصر غذایی در گونه‌های

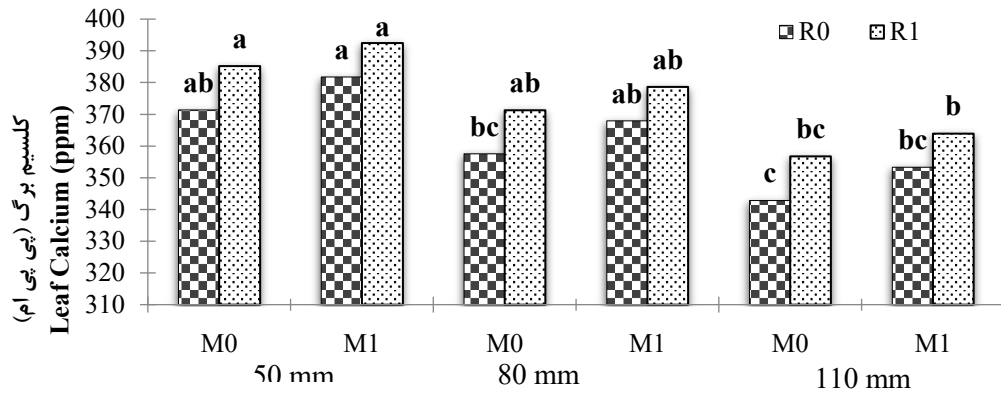
مختلف گیاهی متفاوت است. در شرایط رطوبت کافی، ممکن است درصد پتاسیم در بافت‌های گیاه کاهش یابد که این امر می‌تواند ناشی از رقیق شدن آن باشد. با این حال، به‌طور کلی اعتقاد بر این است که در اثر تنش کم‌آبی، میزان جذب پتاسیم در گیاه افزایش می‌یابد مواد بیولوژیکی از جمله قارچ میکوریزا در شرایط تنش سبب افزایش جذب عناصر معدنی به ویژه کلسیم می‌شود (Habibi et al., 2017; Alizadeh et al., 2020) که این امر به دلیل نقش پتاسیم در تنظیم فشار اسمزی و کنترل روزنه‌ها است. تحت تنش اسمزی شدید، میزان کلسیم سیتوپلاسمی افزایش یافته و نقش یک سیگنال درک‌کننده تنش را ایفا می‌کند. با سنتز و انتقال اسید آبسزیک (ABA) به برگ، کانال‌های کلسیمی در سلول‌های نگهبان روزنه فعال شده و روزنه‌ها بسته می‌شوند. گزارش شده است که تلقیح بذر با مواد بیولوژیکی از جمله قارچ میکوریزا در شرایط تنش سبب افزایش جذب عناصر معدنی به ویژه کلسیم می‌شود (Habibi et al., 2017; Alizadeh et al., 2020) که با نتایج این پژوهش همسو است. با مقایسه نتایج سایر مطالعات می‌توان بیان نمود که باکتری و قارچ با افزایش جذب پتاسیم (که برای تنظیم فشار اسمزی و کنترل روزنه‌ها ضروری است) و همچنین با افزایش جذب کلسیم (که به عنوان سیگنال درک‌کننده تنش، به فعال‌سازی مسیر اسید آبسزیک و در نتیجه بسته شدن روزنه‌ها کمک می‌کند)، به بهبود مقاومت گیاه در برابر تنش کم‌آبی یاری می‌رسانند.



شکل ۴: اثرات متقابل مرکب دو ساله سطوح تنش کم‌آبی و کاربرد قارچ میکوریزا و باکتری ریزوبیوم بر میزان پتاسیم برگ
Figure 4: Effects of Combined Two-Year Interaction of Drought Stress Levels and Application of Mycorrhizal Fungi and Rhizobium Bacteria on Leaf Potassium Content.

M0: عدم تلقیح قارچ میکوریزا، M1: تلقیح قارچ میکوریزا، R0: عدم تلقیح باکتری ریزوبیوم، R1: تلقیح باکتری ریزوبیوم، 50mm: تبخیر ۵۰ میلی‌لیتر از تشت تبخیر، 80mm: تبخیر ۸۰ میلی‌لیتر از تشت تبخیر، 110mm: تبخیر ۱۱۰ میلی‌لیتر از تشت تبخیر.

M0: No mycorrhizal fungi inoculation, M1: Mycorrhizal fungi inoculation, R0: No Rhizobium bacteria inoculation, R1: Rhizobium bacteria inoculation, 50mm: 50 ml evaporation from evaporation pan, 80mm: 80 ml evaporation from evaporation pan, 110mm: 110 ml evaporation from evaporation pan.



شکل ۵: اثرات متقابل مرکب دو ساله سطوح تنش کم آبی و کاربرد قارچ میکوریزا و باکتری ریزوبیوم بر میزان کلسیم برگ
Figure 5: Effects of Combined Two-Year Interaction of Drought Stress Levels and Application of Mycorrhizal Fungi and Rhizobium Bacteria on Leaf Calcium Content.

M0: عدم تلقیح قارچ میکوریزا، M1: تلقیح قارچ میکوریزا، R0: عدم تلقیح باکتری ریزوبیوم، R1: تلقیح باکتری ریزوبیوم، 50mm: تبخیر ۵۰ میلی‌لیتر از تشت

تبخیر، 80mm: تبخیر ۸۰ میلی‌لیتر از تشت تبخیر، 110mm: تبخیر ۱۱۰ میلی‌لیتر از تشت تبخیر.

M0: No mycorrhizal fungi inoculation, M1: Mycorrhizal fungi inoculation, R0: No Rhizobium bacteria inoculation, R1: Rhizobium bacteria inoculation, 50mm: 50 ml evaporation from evaporation pan, 80mm: 80 ml evaporation from evaporation pan, 110mm: 110 ml evaporation from evaporation pan.

نتیجه‌گیری کلی

پژوهش حاضر به تفصیل نشان می‌دهد که تنش خشکی، به عنوان یک عامل تنش‌زای محیطی غالب ناشی از کاهش دسترسی به آب، تأثیرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی نامطلوبی بر گیاهان تحمیل می‌کند. این تأثیرات شامل افزایش معنی‌دار پراکسیداسیون لیپیدها، که با افزایش غلظت مالون‌دی‌آلدئید به عنوان یک بیومارکر کلیدی آسیب اکسیداتیو غشایی سنجیده می‌شود، و همچنین کاهش جذب عناصر غذایی ضروری نظیر پتاسیم و کلسیم است. در پاسخ به این چالش، گیاهان سازوکارهای دفاعی آنتی‌اکسیدانی ذاتی خود، شامل افزایش فعالیت آنزیم‌های کلیدی مانند کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز را فعال می‌کنند تا گونه‌های فعال اکسیژن تولید شده در شرایط تنش را خنثی سازند. با این حال، یافته‌های این مطالعه به روشنی برجسته می‌کند که تلقیح بذر با عوامل زیستی، به ویژه قارچ میکوریزا و باکتری ریزوبیوم (به صورت تکی یا تلقیح توأم)، به عنوان یک رهیافت کارآمد برای تعدیل اثرات مخرب تنش خشکی و ارتقاء تحمل گیاهان عمل می‌کند. این عوامل زیستی با کاهش قابل توجه میزان MDA، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (CAT و SOD)، و بهبود جذب عناصر غذایی، ظرفیت گیاه را برای مقابله با تنش اکسیداتیو و حفظ یکپارچگی فیزیولوژیکی در شرایط کم‌آبی به طور چشمگیری افزایش می‌دهند. به خصوص، تلقیح همزمان با هر دو عامل زیستی اثربخشی سینرژیک بالایی در کاهش MDA و بهبود جذب پتاسیم و کلسیم از خود نشان داده است که بر پتانسیل این رویکرد بیولوژیکی و پایدار در کشاورزی برای افزایش پایداری و بهره‌وری محصولات در مناطق مستعد خشکی تأکید می‌کند.

منابع

Alizadeh, K., Rezaei-chiyaneh, E., Amir Nia, R. & Barin, M. (2020). Combined Application of PGPR and Mycorrhizal Fungi on Seed yield, Macronutrients Uptake and Soil Biological Index in

Intercropping Linseed (*Linum usitatissimum* L.) with Faba bean (*Vicia faba* L.). *Journal Of Agricultural Science And Sustainable Production*, 30(1), 19-40. (In Persian)

Allen, R. G., Pereira, L. S., Raes, D., & Smith, M. (1998). FAO Irrigation and drainage paper No. 56. Rome: food and agriculture organization of the United Nations, 56(97), e156.

Amine-Khodja, I. R., Boscari, A., Riah, N., Kechid, M., Maougal, R. T., Belbekri, N., & Djekoun, A. (2022). Impact of two strains of *Rhizobium leguminosarum* on the adaptation to terminal water deficit of two cultivars *Vicia faba*. *Plants*, 11(4), 515.

Barpete, S., Gupta, P., Khawar, K. M., Özcan, S. E. B. A. H. A. T. T. İ. N., & Kumar, S. (2020). In vitro approaches for shortening generation cycles and faster breeding of low β -N-oxalyl-L- α , β -diaminopropionic acid content of grass pea (*Lathyrus sativus* L.). *Fresenius Environ Bull*, 29(04A), 2698-2706.

Begum, N., Qin, C., Ahanger, M. A., Raza, S., Khan, M. I., Ashraf, M., ... & Zhang, L. (2019). Role of arbuscular mycorrhizal fungi in plant growth regulation: implications in abiotic stress tolerance. *Frontiers in plant science*, 10, 1068.

Borišev, M., Borišev, I., Župunski, M., Arsenov, D., Pajević, S., Čurčić, Ž., ... & Djordjevic, A. (2016). Drought impact is alleviated in sugar beets (*Beta vulgaris* L.) by foliar application of fullerene nanoparticles. *PloS one*, 10, 1-20.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.

Chapman, H. D., & Pratt, P. F. (1962). Methods of analysis for soils, plants and waters. *Soil Science*, 93(1), 68.

Chen, D., Wang, S., Cao, B., Cao, D., Leng, G., Li, H., & Deng, X. (2016). Genotypic variation in growth and physiological response to drought stress and re-watering reveals the critical role of recovery in drought adaptation in maize seedlings. *Frontiers in Plant Science*, 6, 1241.

Chen, L., Zhang, X., Li, Q., Yang, X., Huang, Y., Zhang, B., ... & Li, X. (2024). Phosphatases: Decoding the Role of mycorrhizal fungi in plant disease resistance. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(17), 9491.

de Freitas, V. F., Cerezini, P., Hungria, M., & Nogueira, M. A. (2022). Strategies to deal with drought-stress in biological nitrogen fixation in soybean. *Applied Soil Ecology*, 172, 104352.

Ebrahimi, M., Zamani, G. R., & Alizadeh, Z. (2016). Antioxidant activity: a strategy for alleviating the effects of drought on *Calendula officinalis* L. *European Journal of Medicinal Plants*, 15(4), 1-14.

Foster, K., Lambers, H., Real, D., Ramankutty, P., Cawthray, G. R., & Ryan, M. H. (2015). Drought resistance and recovery in mature *Bituminaria bituminosa* var. *albomarginata*. *Annals of Applied Biology*, 166(1), 154-169.

Furlan, A., Bianucci, E., del Carmen Tordable, M., Kleinert, A., Valentine, A., & Castro, S. (2016). Dynamic responses of photosynthesis and the antioxidant system during a drought and rehydration cycle in peanut plants. *Functional Plant Biology*, 43(4), 337-345.

Ghanbary, E., Fathizadeh, O. & Tabari, M. (2020). The effect of mycorrhizal fungi and growth-promoting rhizobacteria on the activity of antioxidant enzymes of Calotrope seedlings under drought stress. *Forest Research and Development*, 6(3), 477-489. (In Persian)

Ghorbanli, M., Bakhshi Khaniki, G., & Zakeri, A. (2012). Investigation on the effects of water stress on antioxidant compounds of *Linum usitatissimum* L. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research*, 27(4), 647-658. (In Persian)

Goldsmith, M., Barad, S., Peleg, Y., Albeck, S., Dym, O., Brandis, A., & Reich, Z. (2022). The identification and characterization of an oxalyl-CoA synthetase from grass pea (*Lathyrus sativus* L.). *RSC chemical biology*, 3(3), 320-333.

Gonçalves, L., Rubiales, D., Bronze, M. R., & Vaz Patto, M. C. (2022). Grass pea (*Lathyrus sativus* L.)—A sustainable and resilient answer to climate challenges. *Agronomy*, 12(6), 1324.

Gong, Y., Lebreton, A., Zhang, F., & Martin, F. (2023). Role of carbohydrate-active enzymes in mycorrhizal symbioses. *Essays in Biochemistry*, 67(3), 471-478.

Gurrieri, L., Merico, M., Trost, P., Forlani, G., & Sparla, F. (2020). Impact of drought on soluble sugars and free proline content in selected *Arabidopsis* mutants. *Biology*, 9(11), 367.

Habibi, H., Moteszarezhadeh, B., & Alikhani, H. A. (2017). Effect of biochar and biological treatments on nutrient elements content (P, K, Ca, Mg, Fe and Mn) of *Amaranthus* in oil polluted soil. *Iranian Journal of Soil and Water Research*, 48(2), 369-384. (In Persian)

Hassanpour Darvishi, H. (2015). Effect of lead and zinc and mycorrhiza fungi role on antioxidant enzymes activity and biomarkers of destruction in alfalf, green pea and vetch. *crop physiology journal*, 6(24), 73-88. (In Persian)

Heath, R. L., & Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of biochemistry and biophysics*, 125(1), 189-198.

Hosseinzadeh, S. R., Amiri, H., & Ismaili, A. (2016). Effect of vermicompost fertilizer on photosynthetic characteristics of chickpea (*Cicer arietinum* L.) under drought stress. *Photosynthetica*, 54, 87-92.

Khalafallah, A. A., & Abo-Ghalia, H. H. (2008). Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on the metabolic products and activity of antioxidant system in wheat plants subjected to short-term water stress, followed by recovery at different growth stages. *Journal of Applied Sciences Research*, 4(5), 559-569.

Khan, N., Bano, A., Rahman, M. A., Guo, J., Kang, Z., & Babar, M. A. (2019). Comparative physiological and metabolic analysis reveals a complex mechanism involved in drought tolerance in chickpea (*Cicer arietinum* L.) induced by PGPR and PGRs. *Scientific reports*, 9(1), 2097.

Liang, X., Zhang, T., Lu, X., Ellsworth, D. S., BassiriRad, H., You, C., & Ye, Q. (2020). Global response patterns of plant photosynthesis to nitrogen addition: A meta-analysis. *Global Change Biology*, 26(6), 3585-3600.

Ma, X., Li, X., & Ludewig, U. (2021). Arbuscular mycorrhizal colonization outcompetes root hairs in maize under low phosphorus availability. *Annals of botany*, 127(1), 155-166.

Mohammad, I. (2019). Mycorrhizae's role in plant nutrition and protection from pathogens. *Current Agriculture Research Journal*, 8, 1037-1045.

Mohammadi, H., Amirikia, F., Ghorbanpour, M., Fatehi, F., & Hashempour, H. (2019). Salicylic acid induced changes in physiological traits and essential oil constituents in different ecotypes of *Thymus kotschyianus* and *Thymus vulgaris* under well-watered and water stress conditions. *Industrial Crops and Products*, 129, 561-574.

Müller, A., Ngwene, B., Peiter, E., & George, E. (2017). Quantity and distribution of arbuscular mycorrhizal fungal storage organs within dead roots. *Mycorrhiza*, 27, 201-210.

Namdari, A. & Baghbani-Arani, A. (2024). The Effect of Plant Residues, Mycorrhizal Symbiosis, and Zinc Sulfate in Legume and Non-Legume Rotation on Nutrients Absorption and Wheat Yield. *Iranian Journal of Field Crop Science*, 55(2), 73-88. (In Persian)

Niu, J., Zhang, S., Liu, S., Ma, H., Chen, J., Shen, Q., & Zhao, X. (2018). The compensation effects of physiology and yield in cotton after drought stress. *Journal of plant physiology*, 224, 30-48.

Noreen, S., Fatima, K., Athar, H. U. R., Ahmad, S., & Hussain, K. (2017). Enhancement of physio-biochemical parameters of wheat through exogenous application of salicylic acid under drought stress. *JAPS: Journal of Animal & Plant Sciences*, 27(1).

Resende, C. F., Pacheco, V. S., Dornellas, F. F., Oliveira, A. M. S., Freitas, J. C. E., & Peixoto, P. H. P. (2018). Responses of antioxidant enzymes, photosynthetic pigments and carbohydrates in micropropagated *Pitcairnia encholirioides* LB Sm. (*Bromeliaceae*) under ex vitro water deficit and after rehydration. *Brazilian Journal of Biology*, 79(1), 53-62.

Sairam, R. K., Rao, K. V., & Srivastava, G. C. (2002). Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. *Plant science*, 163(5), 1037-1046.

Sandhya, V. S. K. Z., Ali, S. Z., Grover, M., Reddy, G., & Venkateswarlu, B. (2010). Effect of plant growth promoting *Pseudomonas* spp. on compatible solutes, antioxidant status and plant growth of maize under drought stress. *Plant growth regulation*, 62, 21-30.

Santos, C., Polanco, C., Rubiales, D., & Vaz Patto, M. C. (2021). The MLO1 powdery mildew susceptibility gene in *Lathyrus* species: The power of high-density linkage maps in comparative mapping and synteny analysis. *The Plant Genome*, 14(2), e20090.

Sepehri, M., Jahandideh Mahjen Abadi, V. A., Asadi Rahmani, H., & Sadeghi Hosni, A. (2015). Influence of *Rhizobium leguminosarum* bv phaseoli bacteria on growth, activity of antioxidant

enzymes and nutrient uptake of common bean (*Phaseolus vulgaris*) under salinity stress. *Journal of Soil Management and Sustainable Production*, 5(2), 165-180. (In Persian)

Soleymani, F., & Pirzad, A. (2016). The effect of mycorrhizal fungi on the oxidant enzymes activity in the medicinal herb, hyssop, under water deficit conditions. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research*, 31(6), 1013-1023. (In Persian)

Verma, A., Nidhi, N., Kaur, G., Mantri, S., Sharma, T. R., Pandey, A. K., & Kandoth, P. K. (2022). Contrasting β -ODAP content correlates with stress gene expression in Lathyrus cultivars. *Physiologia Plantarum*, 174(1), e13616.

Wang, Y., Dong, F., Chen, H., Xu, T., & Tang, M. (2023). Effects of arbuscular mycorrhizal fungus on sodium and chloride ion channels of *Casuarina glauca* under salt stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(4), 3680.

Zargar, S. M., Nagar, P., Deshmukh, R., Nazir, M., Wani, A. A., Masoodi, K. Z., & Rakwal, R. (2017). Aquaporins as potential drought tolerance inducing proteins: towards instigating stress tolerance. *Journal of proteomics*, 169, 233-238.

Zhang, W., Yu, L., Han, B., Liu, K., & Shao, X. (2022). Mycorrhizal inoculation enhances nutrient absorption and induces insect-resistant defense of *Elymus nutans*. *Frontiers in plant science*, 13, 898969.

Zheng, W., Zeng, S., Bais, H., LaManna, J. M., Hussey, D. S., Jacobson, D. L., & Jin, Y. (2018). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) reduce evaporation and increase soil water retention. *Water Resources Research*, 54(5), 3673-3687.