Effect of application of mycorrhizal fungus and *Azotobacter* on physiological characteristics of *Trigonella foenum-graecum* L. under water stress conditions

Amir Rahimi[1], Behnam Dovlati[2*], Reza Amirnia[1], Saied Heydarzade[1]
[1.] Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, University of Urmia, Iran
[2.] Soil Science Department, Urmia University, Iran

Abstract
In order to investigate the effect of biofertilizers on biochemical properties of fenugreek plant under stress conditions, a factorial experiment was conducted in a randomized complete block design with three replications. Different levels of irrigation were considered at three levels (irrigation after 50, 100 and 150 mm evaporation from evaporation pan) as the first factor and application of biological fertilizers in four levels included as mycorrhizal + *Azotobacter*, mycorrhizal fungi, *Azotobacter* and control (no biofertilizer) as the second factor. The results revealed that the hydrogen peroxide, malondialdehyde and glycine betaine in mycorrhiza + *Azotobacter* treatment decreased significantly in different levels of irrigation. The highest content of ascorbic acid (7.23 $mgkg^{-1}$ fw) and glutathione (36.20 $mgkg^{-1}$ Fw) were observed in combined mycorrhizal fungi and *Azotobacter* treatment in optimum irrigation conditions. Water deficit stress reduced significantly soluble sugars, so Mycorrhizal+*Azotobacter* treatment increased the amount of soluble sugars in Fenugreek. The maximum amount of proline was observed in the control (no biofertilizer) and irrigation treatment with 150 mm evaporation from the pan. So that the activity of catalase, ascorbate peroxidase and glutathione reductase in the inoculated plants with microorganisms under drought stress conditions of 100 and 150 mm evaporation from pan compared to 50 mm evaporation from pan was decreased. On this basis, it seems, the increase of enzymatic antioxidants activity and the enhancement of non-enzymatic antioxidants production in combined treatment of mycorrhiza+bacteria, can reduce the activated oxygen vulnerability, and could increase the tolerance to water stress.

Keywords: Ascorbic acid, Antioxidant, Mycorrhizal symbiosis, drought stress, malondialdehyde

* Corresponding Author: b.dovlati@urmia.ac.ir

Copyright©2017, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially
DOI:10.22108/ijpb.2019.116384.1149

زیست‌شناسی گیاهی ایران، سال یازدهم، شمارهٔ چهل ودوم، زمستان ۱۳۹۸، صفحهٔ ۱۸-۱
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۸/۰۱/۳۱
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۸/۰۳/۰۷ و ۱۳۹۸/۰۶/۰۳
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۸/۰۹/۱۰

بررسی تأثیر کودهای زیستی قارچ میکوریزا و ازتوباکتر بر ویژگی‌های فیزیولوژیکی گیاه دارویی شنبلیله (*Trigonella foenum-graecum* L.) در شرایط تنش کم‌آبی

امیر رحیمی[۱]، بهنام دولتی[۲*]، رضا امیرنیا[۱]، سعید حیدرزاده[۱]
[۱] گروه علوم زراعی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
[۲] گروه علوم خاک، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

چکیده

به‌منظور بررسی تأثیر کودهای زیستی بر ویژگی‌های فیزیولوژیکی گیاه دارویی شنبلیله در شرایط تنش رطوبتی، آزمایشی به‌شکل فاکتوریل در قالب طرح پایهٔ بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار انجام شد. سطوح مختلف آبیاری در سه سطح آبیاری پس‌از ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌متر تبخیر از تشتک تبخیر به‌عنوان فاکتور اول و کاربرد کودهای زیستی در چهار سطح تلقیح با قارچ میکوریزا+ازتوباکتر، قارچ میکوریزا، ازتوباکتر و بدون تلقیح با قارچ میکوریزا به‌عنوان فاکتور دوم درنظر گرفته شدند. نتایج نشان دادند میزان پراکسیدهیدروژن، مالون‌دی‌آلدئید و گلیسین‌بتائین در تلقیح با قارچ میکوریزا+ازتوباکتر در سطوح مختلف آبیاری به‌طور معناداری کاهش می‌یابد. بیشترین میزان آسکوربیک‌اسید (۷/۲۳ میلی‌گرم‌برگرم وزن تر) و گلوتاتیون (۳۶/۲۰ میلی‌گرم‌برگرم وزن تر) به‌ترتیب در تیمار ترکیبی قارچ میکوریزا و ازتوباکتر در شرایط آبیاری مطلوب مشاهده شد. تنش کم‌آبی به کاهش معنادار قندهای محلول منجر شد؛ درحالی‌که در این شرایط، گیاهان تلقیح‌شده با قارچ میکوریزا+ازتوباکتر افزایش میزان قندهای محلول را نشان دادند. بیشترین میزان پرولین در تیمار شاهد و آبیاری در سطح ۱۵۰ میلی‌متر تبخیر از تشتک به دست آمد؛ به‌طوری‌که فعالیت آنزیم کاتالاز، آسکوربات‌پراکسیداز و گلوتاتیون‌ردوکتاز در گیاهان تلقیح‌شده با ریزموجودات در شرایط تنش خشکی ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌متر تبخیر از تشتک نسبت به سطح ۵۰ میلی‌متر تبخیر از تشتک کاهش نشان داد؛ بر این اساس، افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و افزایش تولید آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی در تیمار تلفیقی قارچ میکوریزا+باکتری می‌تواند به کاهش آسیب‌پذیری نسبت به اکسیژن فعال و افزایش تحمل به تنش کم‌آبی منجر شود.

واژه‌های کلیدی: آسکوربیک‌اسید، آنتی‌اکسیدان، تلقیح میکوریزایی، تنش خشکی، مالون‌دی‌آلدئید

* نگارندهٔ مسؤول: نشانی پست الکترونیک: b.dovlati@urmia.ac.ir، شمارهٔ تماس: ۰۴۴۳۲۷۵۵۲۸۴

Copyright©2017, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

مقدمه

شنبلیله با نام علمی *Trigonella foenum-graecum* L.، گیاهی نهان‌دانه از دولپه‌ای‌های جداگلبرگ است که جزو راستهٔ گل سرخ (Rosales)، تیرهٔ نخود (Fabaceae)، زیرتیرهٔ پروانه‌داران (Papilionaceae) و جنس (*Trigonela* L.) از گروه Trifolia قرار دارد. نام این گیاه از کلمهٔ یونانی به معنای مثلث (به‌علت مثلثی‌بودن برگچه‌ها) و *foenum-graecum* به معنای Greek hay یا علف یونانی (به‌علت کاربردهای فراوان در یونان باستان) گرفته شده است. شنبلیله علاوه‌بر مصرف به‌شکل سبزی، گیاهی است که مصرف ادویه‌ای، دارویی (ضدفشار خون، دیابت و ...) و آرایشی دارد و به‌عنوان کود سبز استفاده می‌شود (Bairwa and Kaushik, 2010). باتوجه‌به گستردگی کشت شنبلیله در جهان، این گیاه با تنش‌های غیرزندهٔ محیطی مختلف ازجمله تنش خشکی در طول فصل رشد مواجه می‌شود (Dadrasan *et al*., 2015; Bairwa and Kaushik, 2010).

تنش خشکی ازجمله تنش‌های محیطی است که علاوه‌بر کاهش رشد رویشی و تغییر ساختارهای آناتومیکی گیاه، از طریق ایجاد تنش ثانویه نظیر تنش اکسیداتیو سبب تغییر در مسیرهای سنتز ترکیبات و متابولیت‌های ثانویه می‌شود (Sharma *et al*., 2012; Rajaeian *et al*., 2015). مطالعه‌های بسیاری در زمینهٔ افزایش تجمع گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) طی تنش خشکی گزارش شده‌اند. گیاهان از طریق سازوکارهای آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیرآنزیمی گونه‌های فعال اکسیژنی ایجادشده را کاهش می‌دهند (Hasanuzzaman *et al*., 2013)؛ تجمع گونه‌های فعال اکسیژن در سلول موجب آسیب‌رسیدن به لیپیدهای غشا، پروتئین‌ها و نوکلئیک‌اسید می‌شود. طی فتوسنتز در وضعیت کم‌آبی، نشت زیاد الکترون به‌سمت O_2 اتفاق می‌افتد و انواع مختلف ROS نظیر سوپراکسید، پراکسیدهیدروژن، رادیکال هیدروکسیل و رادیکال اکسیژن تولید می‌کند. گیاهان دارای سازوکارهای آنتی‌اکسیدان آنزیمی و غیرآنزیمی برای مقابله با تنش اکسیداتیو ناشی از گونه‌های فعال اکسیژن هستند. رادیکال سوپراکسید ممکن است به‌وسیلهٔ آنزیم سوپراکسیددیسموتاز به H_2O_2 و سپس در کلروپلاست به‌وسیلهٔ آسکوربات‌پراکسیداز به آب تبدیل شود؛ همچنین H_2O_2 منتشرشده به بخش بیرونی کلروپلاست به‌وسیلهٔ آنزیم کاتالاز در سلول‌های برگ پاک‌سازی می‌شود. در وضعیت خشکی، تنفس نوری به‌علت محدودشدن جذب و تثبیت CO_2 و افزایش فعالیت اکسیژنازی آنزیم روبیسکو افزایش می‌یابد که این امر افزایش تولید H_2O_2 را در پی دارد (Miller *et al*., 2010).

آنزیم‌های کاتالاز (CAT) و آسکوربات‌پراکسیداز (APX) نقش مهمی در حذف H_2O_2 ایفا می‌کنند و هرکدام میل ترکیبی متفاوتی با این نوع ROS دارند. کاتالاز برای عمل به نیروی احیایی نیاز ندارد، ولی آسکوربات‌پراکسیداز برای فعالیت به عامل احیایی نیاز دارد. سطح تمایل کاتالاز به H_2O_2 کمتر از آسکوربات‌پراکسیداز است. آسکوربات‌پراکسیداز در بیشتر اندامک‌های سلولی وجود دارد؛

درحالی‌که کاتالاز فقط در پراکسی‌زوم یافت می‌شود. پیشنهاد شده است آسکوربات‌پراکسیداز ممکن است تنظیم‌کننده و کنترل‌کنندهٔ درون‌سلولی مناسبی برای حفظ تعادل ROS باشد (Mittler, 2002).

تنظیم اسمزی ازجمله سازوکارهای پاسخ به تنش‌های محیطی است. تنظیم اسمزی نوعی سازگاری به تنش کمبود آب است که می‌تواند از طریق تجمع مواد محلول در سلول‌ها به حفظ تورژسانس سلول‌ها و فرایندهای وابسته به آن در پتانسیل‌های کم آب منجر شود. در زمان تنش‌های غیرزیستی مانند خشکی، مولکول‌های آلی دارای وزن مولکولی کمتر مانند قندهای محلول، پرولین، پروتئین و بتائین در ریشه‌ها و اندام‌های هوایی گیاهان به‌منزلهٔ تنظیم‌کننده‌های اسمزی عمل می‌کنند (Lokhande *et al*., 2010). قندهای محلول به‌عنوان تنظیم‌کنندهٔ اسمزی، ثبات‌دهندهٔ غشاهای سلولی و حفظ‌کنندهٔ تورژسانس سلول‌ها عمل می‌کنند و در گیاهانی که قندهای محلول در پاسخ به تنش خشکی تجمع می‌یابند، تنظیم اسمزی بهتر انجام می‌شود (Slama *et al*., 2007).

کودهای زیستی نظیر قارچ‌های میکوریزا و ازتوباکتر نقش مهمی در کشاورزی پایدار دارند؛ درحقیقت، قارچ‌های میکوریزا و همزیستی آنها با گیاهان سبب تغییراتی در روابط آبی گیاه و درنتیجه، بهبود مقاومت به خشکی یا تحمل در گیاه میزبان می‌شود (Habibzadeh *et al*., 2015). قارچ‌های میکوریزا با جذب عناصر غذایی مانند فسفر و همچنین تعدیل اثر تنش‌های محیطی، افزایش مقاومت نسبت به عوامل بیماری‌زا، کاهش آسیب‌های ریشه‌ای و تشدید فعالیت تثبیت زیستی نیتروژن سبب بهبود رشد گیاهان و افزایش عملکرد آنها می‌شوند (Baum *et al*., 2015). گزارش شده است قارچ میکوریزا از طریق کاهش پراکسیداسیون لیپیدها و نفوذپذیری غشا و افزایش تجمع ترکیبات تنظیم‌کنندهٔ اسمزی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان قادر به کاهش خسارت ناشی از تنش خشکی است (Zhu *et al*., 2010). باکتری‌های تثبیت‌کنندهٔ نیتروژن مانند ازتوباکتر در محیط ریشهٔ گیاه توانایی ساخت و ترشح مواد زیستی فعال را دارند که تأثیر مثبت و مفیدی در توسعهٔ سیستم ریشه‌ای دارد و عملکرد گیاهان زراعی و ویژگی‌های خاک را با بهبود جذب آب و عناصر غذایی و تثبیت زیستی نیتروژن تحت‌تأثیر قرار می‌دهد (Mirzakhani *et al*., 2014)؛ به‌این‌ترتیب، آزمایش حاضر با هدف بررسی اثر کودهای زیستی قارچ میکوریزا و ازتوباکتر بر ویژگی‌های فیزیولوژیکی گیاه دارویی شنبلیله در شرایط تنش کم‌آبی انجام شد.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر به‌شکل آزمایش فاکتوریل در قالب طرح پایهٔ بلوک‌های کامل تصادفی با ۱۲ تیمار و ۳ تکرار طی سال زراعی ۹۴-۱۳۹۳ و در مزرعهٔ تحقیقاتی دانشکدهٔ کشاورزی دانشگاه ارومیه انجام شد. برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک موردمطالعه به روش‌های استاندارد اندازه‌گیری شدند. آبیاری در سه سطح آبیاری پس‌از ۵۰ (شاهد)، ۱۰۰ (تنش متوسط) و ۱۵۰ (تنش شدید) میلی‌متر تبخیر از تشتک تبخیر کلاس

A به‌عنوان فاکتور اول و کاربرد کودهای زیستی هنگام کاشت در چهار سطح شاهد (بدون کاربرد کود زیستی)، قارچ میکوریزا، ازتوباکتر وترکیب ازتوباکتر+قارچ میکوریزا به‌عنوان فاکتور دوم انجام شد. کود زیستی ازتوباکتر به میزان ۲ لیتر در هکتار در سایه با بذر آغشته شد. به‌منظور تلقیح بذرهای شنبلیله با میکوریزا، ۱ گرم از خاکی که حاوی حدود ۱۰۰۰ اسپور بود، زیر بذر قرار داده شد. در نیمهٔ اردیبهشت، بذرهای شنبلیله در ردیف‌هایی با فاصلهٔ ۲۵ سانتی‌متر و با تراکم زیاد (۷۰ بذر در مترمربع) در عمق ۳ تا ۵ سانتی‌متری کشت شدند و سپس در مرحلهٔ ۴ تا ۶ برگی برای رسیدن به تراکم مناسب (۴۰ بوته در مترمربع) تنک شدند. به‌منظور جلوگیری از نشت آب به کرت‌های مجاور، فاصلهٔ کرت‌های اصلی از یکدیگر برابر ۱/۵ متر و فاصلهٔ بین دو بلوک برابر ۳ متر در نظر گرفته شد. تمام مراقبت‌های زراعی برای تمام تیمارها به‌شکل یکنواخت انجام شدند. مقدار آب آبیاری بر اساس درصد رطوبت خاک و رساندن آن به ظرفیت زراعی با استفاده از رابطهٔ زیر محاسبه و به خاک مزرعه اضافه شد (Benami and Ofen, 1984). در اوایل مرحلهٔ زایشی، تعدادی بوته به‌طور تصادفی از هر کرت آزمایشی نمونه‌برداری و برگ‌های بخش بالایی بوته‌ها در فویل آلومینیومی بسته‌بندی و درون نیتروژن مایع فریز شده و تا زمان اندازه‌گیری شاخص‌های فیزیولوژیک در فریزر با دمای منفی ۸۰ درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شدند.

ویژگی‌های اندازه‌گیری‌شده

فعالیت آنزیم: به‌منظور سنجش فعالیت آنزیم، ۰/۲۵ گرم برگ تازه در ۴ میلی‌لیتر بافر فسفات‌پتاسیم ۰/۰۵ مولار (اسیدیتهٔ ۷/۵) حاوی پلی‌وینیل‌پیرولیدین (PVP) ۱ درصد و EDTE ۰/۲ میلی‌مولار ساییده شد. تمام مراحل استخراج در یخ انجام شدند؛ سپس عصاره‌ها به‌مدت ۲۰ دقیقه در ۱۵۰۰۰ دوردردقیقه و دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند و از محلول شفاف رویی برای سنجش فعالیت آنزیم‌ها استفاده شد.

فعالیت کاتالاز باتوجه‌به تغییرات غلظت H_2O_2 در طول موج ۲۴۰ نانومتر ارزیابی شد. در این روش، آنزیم کاتالاز موجود در نمونه با تجزیهٔ پراکسیدهیدروژن سبب کاهش جذب این ماده در طول موج ۲۴۰ نانومتر می‌شود. مخلوط واکنش شامل ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار (اسیدیتهٔ ۷/۵)، ۰/۱ میلی‌لیتر پراکسیدهیدروژن ۱ درصد و ۵۰ میلی‌لیتر عصارهٔ آنزیمی بود. فعالیت آنزیمی بر اساس تغییرات جذب در ۶۰ ثانیه به‌ازای هر میلی‌گرم پروتئین خوانده شد (Maehly and Chance, 1959).

مخلوط واکنش برای اندازه‌گیری فعالیت آسکوربات‌پراکسیداز شامل ۲ میلی‌لیتر بافر فسفات‌پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار (اسیدیتهٔ ۷)، ۰/۱ میلی‌مولار EDTA، ۰/۲ میلی‌لیتر آسکوربات ۰/۵ میلی‌مولار، ۰/۲ میلی‌لیتر پراکسیدهیدروژن ۱/۵ میلی‌مولار و ۵۰ میلی‌لیتر عصارهٔ آنزیمی بود. اکسیداسیون آسکوربات توسط کاهش میزان جذب در ۲۴۰ نانومتر تعیین شد (Chen and Asada, 1989).

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم گلوتاتیون‌ردوکتاز بر اساس احیای گلوتاتیون اکسیدشده (GSSG) توسط آنزیم گلوتاتیون‌ردوکتار با مصرف

NADPH انجام شد (Sgherri *et al.*, 1994). مخلوط واکنش شامل ۱۰۰ میلی‌مولار بافر فسفات‌پتاسیم (اسیدیتهٔ ۷)، ۰/۵ میلی‌مولار گلوتاتیون اکسیدشده (GSSG)، ۵۰ میکرومولار NADPH، ۱/۵ میلی‌مولار $MgCl_2$، ۰/۲ میلی‌مولار Na_2EDTA و عصارهٔ آنزیمی بود. میزان جذب نوری با اسپکترومتر در طول موج ۳۴۰ نانومتر انجام شد.

محتوای آسکوربیک‌اسید: به‌منظور سنجش محتوای آسکوربیک‌اسید برگ، ۰/۱ گرم بافت گیاهی در ۳ میلی‌لیتر سولفوسالیسیلیک‌اسید ۵ درصد عصاره‌گیری شد و پس‌از سانتریفیوژ و جداکردن محلول رویی، اسیدیته در محدودهٔ ۵/۵ تا ۶/۵ تنظیم شد. محلول واکنش شامل تری‌کلرواستیک‌اسید ۱۰ درصد، متافسفریک‌اسید، بی‌پیریدیل ۴ درصد (حل‌شده در اتانول ۷۰ درصد) و $FeCl_3$ ۳ درصد بود. پس‌از گذشت ۳۰ دقیقه، جذب نمونه‌ها با اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۲۵ نانومتر خوانده شد (Law *et al.*, 1983).

به‌منظور اندازه‌گیری گلوتاتیون، ۰/۵ گرم برگ همراه با ۵ میلی‌لیتر سولفوسالسیلیک‌اسید ۵ درصد در هاون سرد هموژن شد و عصارهٔ حاصل پس‌از صاف‌کردن، به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰ دوردردقیقه سانتریفیوژ شد. مقدار ۱ میلی‌لیتر از بخش رویی آن برداشته و اسیدیتهٔ آن با ۱/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات‌پتاسیم ۰/۵ میلی‌مولار روی ۷/۵ تنظیم شد. محلول واکنش شامل ۰/۵ میلی‌لیتر بافر سدیم‌فسفات ۰/۱ مولار، ۵ میلی‌مولار EDTA، ۰/۲ میلی‌لیتر ۵، ۵- دی‌تیوبیس (۲- نیتروبنزوئیک‌اسید) ۶ میلی‌مولار، ۰/۱ میلی‌لیتر NADPH ۲ میلی‌مولار و ۰/۱ میلی‌لیتر گلوتاتیون‌ردوکتاز بود. واکنش با اضافه‌کردن ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره آغاز شد. تغییرات جذب با اسپکتروفتومتر در ۴۱۲ نانومتر ثبت شد (Smith, 1985).

به‌منظور اندازه‌گیری مالون‌دی‌آلدئید باتوجه‌به واکنش تیوباربیتوریک‌اسید (TBA)، ۰/۵ گرم بافت برگی تازه در ۱ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک‌اسید (TCA) ۵ درصد ساییده شد. عصارهٔ حاصل به لوله‌های سانتریفیوژ منتقل و به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۴۰۰۰ دوردردقیقه و دمای اتاق سانتریفیوژ شد. مقدار ۲ میلی‌لیتر از عصاره به ۲ میلی‌لیتر تیوباربیتوریک‌اسید ۰/۶ درصد اضافه و به‌مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب جوش قرار داده شد. جذب محلول رویی در طول موج‌های ۵۳۲، ۶۰۰ و ۴۵۰ نانومتر خوانده و میزان مالون‌دی‌آلدئید بر اساس رابطهٔ زیر محاسبه شد (Zhang and Qu, 2004):

$$MDA=645\times(A532-A600)-0.56\times A450$$

به‌منظور اندازه‌گیری پراکسیدهیدروژن، ۰/۵ گرم نمونهٔ برگ در ۵ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک‌اسید (TCA) ۰/۱ درصد هموژن شد؛ سپس نمونه‌ها به لوله‌های سانتریفیوژ منتقل و به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد با سرعت ۱۵۰۰۰ دوردردقیقه سانتریفوژ شدند و پس‌ازآن، مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات‌پتاسیم ۱۰ میلی‌مولار با اسیدیتهٔ ۷ و ۱ میلی‌لیتر یدیدپتاسیم ۱ مولار به ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول رویی اضافه شد. غلظت پراکسیدهیدروژن به‌وسیلهٔ اسپکتوفتومتر در طول موج ۳۹۰ نانومتر محاسبه شد (Velikova *et al.*, 2000).

به‌منظور اندازه‌گیری گلایسین‌بتائین، ۰/۵ گرم بافت گیاهی با ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر به‌مدت ۴۸ ساعت در ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شد و پس‌از صاف‌کردن، عصاره به نسبت ۱:۱ با سولفوریک‌اسید ۲ نرمال رقیق شد. نمونه‌ها به‌مدت ۱ ساعت در لولهٔ سانتریفیوژ و در آب یخ نگه داشته شدند؛ سپس معرف ۰/۲ میلی‌لیتر یدید-یدین‌پتاسیم سرد اضافه شد و نمونه‌ها به‌آهستگی با ورتکس مخلوط شدند. نمونه‌ها به‌مدت ۱۶ ساعت در صفر تا ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و سپس به‌مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دوردردقیقه سانتریفیوژ شدند و ۱ میلی‌لیتر از فاز رویی با میکروپیپت جدا و در ۹ میلی‌لیتر ۱، ۲- دی کلرواتان (به‌عنوان معرف) حل شد. پس‌از ۲ ساعت، جذب در ۳۶۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد (Grieve and Grattan, 1983).

اندازه‌گیری قندهای محلول کل برگ بر اساس روش فنل‌سولفوریک‌اسید تعیین شد؛ این روش مبتنی بر هیدرولیز اسیدی قندهای محلول و ایجاد ترکیب فورفورال است که با فنل تولید کمپلکس رنگی می‌کند. در این روش، ۰/۵ گرم برگ با اتانول ۷۰ درصد هموژن شد. عصارهٔ حاصل صاف و به‌خوبی با فنل ۵ درصد مخلوط شد؛ سپس ۵ میلی‌لیتر سولفوریک‌اسید غلیظ ۹۸ درصد به آن افزوده و یک ساعت بعد، جذب محلول‌ها با اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۸۵ نانومتر خوانده شد (Dubois *et al*., 1956).

به‌منظور اندازه‌گیری پرولین برگ، ۰/۵ گرم بافت برگی در هاون ساییده و با ۱۰ میلی‌لیتر سولفوسالسیلیک‌اسید ۳ درصد هموژن و عصارهٔ حاصل برای حذف بافت برگی صاف شد. به‌منظور استخراج پرولین، ۱ میلی‌لیتر از محلول در لولهٔ آزمایش ریخته و ۱ میلی‌لیتر معرف نین‌هیدرین و ۱ میلی‌لیتر استیک‌اسید گلی‌سیال به آن اضافه شد و به‌مدت ۱ ساعت در ۱۰۰ درجهٔ سانتی‌گراد انکوباته شد؛ سپس بی‌درنگ واکنش‌ها در حمام یخ متوقف شدند. مقدار ۴ میلی‌لیتر تولوئن به هر لوله افزوده و محتویات آنها به‌خوبی مخلوط شد. هر لوله از دو فاز تشکیل شده بود که محلول قرمز بخش رویی نمونه‌برداری و جذب آن در طول موج ۵۲۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر تعیین شد (Bates *et al*., 1973). تجزیه‌وتحلیل داده‌ها پس‌از اطمینان‌یافتن از نرمال‌بودن آنها با نرم‌افزار SAS 9.1 انجام و برای مقایسهٔ میانگین‌ها از روش چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۱ درصد استفاده شد.

محاسبهٔ درصد کلونیزاسیون: حدود ۱ گرم از ریشه‌های شنبلیله رنگ‌آمیزی و تعداد ۵۰ قطعهٔ یک سانتی‌متری برای ارزیابی درصد کلونیزاسیون ریشه به‌شکل تصادفی انتخاب شدند. قطعه‌های ریشه روی لام و درون محلول لاکتوفنل زیر میکروسکوپ بررسی شدند. میزان کلونیزاسیون با برآورد طولی ریشه‌ای که به ساختمان قارچی آلوده بود، محاسبه شد (Garcia *et al*., 2012).

نتایج و بحث

نتایج برخی از ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک موردمطالعه در جدول ۱ نشان داده شده‌اند.

نتایج جدول تجزیه واریانس نشان دادند فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات‌پراکسیداز،

گلوتاتیون‌ردوکتاز، محتوای آسکوربیک‌اسید، گلوتاتیون، مالون‌دی‌آلدئید، پراکسیدهیدروژن، گلایسین‌بتائین و پرولین تحت‌تأثیر اثر متقابل سطوح آبیاری و کود زیستی قرار گرفتند؛ درحالی‌که قندهای محلول تحت‌تأثیر اثر سادهٔ تیمارهای آزمایشی قرار گرفتند (جدول ۲).

جدول ۱- برخی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی خاک منطقهٔ موردمطالعه

فسفر ($mgkg^{-1}$)	پتاسیم ($mgkg^{-1}$)	کربن آلی (درصد)	نیتروژن (درصد)	کربنات‌کلسیم معادل (درصد)	شن (درصد)	سیلت (درصد)	رس (درصد)	بافت خاک	اسیدیته	هدایت الکتریکی (dSm^{-1})
۹/۱	۲۹۷	۱/۱۸	۰/۰۶	۱۵/۸۳	۱۸	۴۳	۳۹	لومی‌رسی	۷/۸۱	۱/۳۷

جدول ۲- تجزیه واریانس برخی ویژگی‌های فیزیولوژیکی شنبلیله تحت‌تأثیر رژیم‌های آبیاری و کودهای زیستی

منابع تغییرات	درجهٔ آزادی	کاتالاز	آسکوربات‌پراکسیداز	گلوتاتیون ردوکتاز	آسکوربیک‌اسید	گلوتاتیون	مالون‌دی‌آلدئید	پراکسیدهیدروژن	گلایسین بتائین	پرولین	قندهای محلول
تکرار	۲	۰/۰۴	۰/۰۳	۰/۰۲	۰/۰۷	۱/۷۱	۱۵/۳۱	۰/۱۶	۲/۰۷	۴/۰۲	۱/۳۸
رژیم آبیاری	۲	۰/۸۱**	۰/۶۵**	۰/۹۲**	۱/۲۶**	۵۴/۱۰**	۱۵۹۲/۸۳**	۱۰/۳۵**	۲۷/۴۸**	۹۲/۸۸**	۱۶/۴۱**
کود زیستی	۳	۲/۷۵**	۱/۹۳**	۱/۹۰**	۲/۶۹**	۱۰۳/۰۶**	۳۴۹/۶۶**	۲**	۳۸/۶۴**	۳۱۳/۳۴**	۳۹/۵۷**
رژیم آبیاری×کود زیستی	۶	۰/۳۵**	۰/۰۹**	۰/۲۸**	۰/۳۴**	۱۲/۹۸**	۵۹/۹۷**	۰/۲۵**	۳/۴۵*	۸/۴۴*	۳/۳۱ns
اشتباه آزمایشی	۳۴	۰/۰۳	۰/۰۲	۰/۰۱	۰/۰۶	۱/۷۱	۵/۹۸	۰/۰۶	۱/۰۹	۲/۴۷	۱/۷۴
ضریب تغییرات (درصد)		۴/۵۳	۴/۹۷	۵/۱۳	۴/۶۷	۴/۸۰	۵/۰۴	۵/۱۳	۴/۶۶	۵/۱۷	۵/۳۸

ns، * و ** به‌ترتیب نشان‌دهندهٔ عدم‌معناداری و معناداری در سطح احتمال پنج و یک درصد است.

فعالیت آنزیم کاتالاز: نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان دادند با تأخیر در آبیاری، فعالیت آنزیم کاتالاز به‌طور معناداری کاهش می‌یابد؛ درحالی‌که کاربرد ترکیبی ریزموجودات در مقایسه با شاهد (بدون کاربرد کود زیستی) تأثیر معناداری در افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز در هریک از سطوح آبیاری (۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌متر تبخیر) نشان می‌دهد؛ به‌طوری‌که کاربرد ترکیبی قارچ میکوریزا و ازتوباکتر بیشترین تأثیر را در افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز دارد (جدول ۳). کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز به‌عنوان پاسخ کلی به تنش آبی (Pan *et al*., 2006; Liu *et al*., 2008) نتیجه‌ای از مهار سنتز آنزیم یا تغییر در جمع‌آوری آنزیم‌های زیرواحد در شرایط تنش است (Fazeli *et al*., 2018)؛ همچنین ممکن است با تخریب ناشی از پروتئازهای پراکسی‌زومی القاشده مرتبط باشد یا ممکن است پیامد غیرفعال‌شدن نوری آنزیم باشد (Liu *et al*., 2008). در شرایط تنش،

افزایش متوسط فعالیت کاتالاز برگ در گیاهان تلقیح شده با ازتوباکتر و گیاهان میکوریزایی نشان می‌دهد تلقیح در این گیاهان قادر به افزایش فعالیت این آنزیم برای مقابله با خسارت اکسیداتیو ناشی از کمبود آب است؛ ازاین‌رو، مایه‌های تلقیح قادر به تنظیم واکنش‌های اکسیداتیو و دفاع آنتی‌اکسیدانی هستند (Ortiz *et al*., 2015).

فعالیت آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز: میزان فعالیت آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز در گیاه شنبلیله با افزایش تنش خشکی کاهش یافت و حداکثر میزان فعالیت آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز در گیاهان تلقیح‌شده با میکوریزا+ازتوباکتر با تیمار آبیاری در سطح ۵۰ میلی‌متر تبخیر از تشتک به دست آمد و میزان فعالیت آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز در تیمار ترکیبی قارچ میکوریزا و ازتوباکتر نسبت به شرایط کاربرد جداگانهٔ قارچ میکوریزا و ازتوباکتر بیشتر بود (جدول ۳). آسکوربات‌پراکسیداز، آنزیمی کلیدی در سامانهٔ مهار آنزیمی ROS است که می‌تواند H_2O_2 تولیدشده در کلروپلاست‌ها را از بین ببرد (Miller *et al*., 2010). باتوجه‌به کاهش فعالیت آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز در گیاهان شنبلیلهٔ در معرض تنش کم‌آبی، گزارش شده است سطوح بالای H_2O_2 در شرایط تنش شدید آب می‌تواند آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را مهار کند یا کاهش دهد (Fouad *et al*., 2014)؛ به‌طوری‌که کاربرد تلفیقی قارچ میکوریزا و باکتری‌های محرک رشد، تولیدات آنتی‌اکسیدانی را افزایش می‌دهند که این افزایش آنتی‌اکسیدانی موجب کم‌کردن گونه‌های اکسیژن فعال در برابر تنش و محافظت سلول‌ها در برابر تنش اکسیداتیو می‌شود. Andrade و همکاران (۲۰۱۰) در گزارش‌های خود، افزایش فعالیت آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز را در گیاه لوبیا مایه‌زنی‌شده با کودهای زیستی عنوان کردند.

فعالیت آنزیم گلوتاتیون‌ردوکتاز: نتایج نشان دادند بیشترین فعالیت آنزیم گلوتاتیون‌ردوکتاز از تیمار ترکیبی قارچ میکوریزا و ازتوباکتر در سطح ۵۰ میلی‌متر تبخیر از تشتک مشاهده می‌شود؛ به‌طوری‌که تیمار ترکیبی قارچ میکوریزا و ازتوباکتر در مقایسه با تیمار شاهد (بدون کاربرد کود زیستی)، میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون‌ردوکتاز را در هر سه رژیم آبیاری افزایش می‌دهد، همچنین میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون‌ردوکتاز در تیمار ترکیبی قارچ میکوریزا و ازتوباکتر نسبت به شرایط کاربرد جداگانهٔ قارچ میکوریزا و ازتوباکتر بیشتر است (جدول ۳). پژوهش حاضر نشان داد فعالیت آنزیم گلوتاتیون‌ردوکتاز در شرایط تنش کم‌آبی کاهش می‌یابد. افزایش فعالیت آنزیمی در گیاهان میکوریزایی، گیاهان تلقیح‌شده با باکتری ازتوباکتر و گیاهان با تلقیح دوگانه نشان داد ریزموجودات خسارت تنش اکسیداتیو ناشی از کمبود آب را کاهش می‌دهند. گزارش شده است همزیستی با قارچ میکوریزا به گیاهان کمک می‌کند با تنش خشکی مقابله کنند و احتمالاً با حفظ فرایندهای فتوسنتزی در اثر افزایش فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانتی روبه‌رو شوند (Mohammadi *et al*., 2019).

جدول ۳- مقایسه میانگین برخی ویژگی‌های فیزیولوژیکی شنبلیله تحت‌تأثیر سطوح مختلف آبیاری و کود زیستی

سطوح آبیاری	کود زیستی	کاتالاز (میکرومول بر گرم وزن تر)	آسکوربات پراکسیداز (میلی‌گرم پروتئین)	گلوتاتیون ردوکتاز (میلی‌گرم پروتئین)	گلوتاتیون (میلی‌گرم بر گرم وزن تر)	آسکوربیک‌اسید (میکرومول بر گرم وزن تر)	مالون‌دی‌آلدئید (میکرومول بر گرم وزن تر)	پراکسیدهیدروژن (میکرومول بر گرم وزن تر)	گلایسین بتائین (میکرومول بر گرم وزن تر)	پرولین (میکرومول بر گرم وزن تر)
۵۰	میکوریزا + ازتوباکتر	۵/۲۵^{a}	۴/۰۵^{a}	۳/۴۹^{a}	۳۶/۲۰^{a}	۷/۲۳^{a}	۳۳/۱۳^{h}	۳/۴۰^{g}	۱۹/۲۸^{e}	۲۸/۱۴^{de}
	میکوریزا	۳/۹۱^{b}	۳/۱۴^{c}	۲/۹۱^{b}	۲۸/۰۷^{c}	۵/۶۰^{c}	۳۵/۷۷^{gh}	۳/۶۸^{fg}	۲۰/۴۰^{cde}	۲۸/۹۱^{d}
	ازتوباکتر	۳/۸۳^{bcd}	۲/۸۷^{cd}	۲/۲۵^{cd}	۲۷/۵۰^{cd}	۵/۴۹ cde	۳۹/۵۵ fg	۴/۰۶ ef	۲۲/۰۲^{cd}	۳۳/۷۳^{c}
	شاهد	۳/۷۶^{bcd}	۲/۸۰^{de}	۲/۲۱^{cd}	۲۷/۰۴^{cd}	۵/۴۰^{cde}	۴۰/۳۰^{ef}	۴/۱۴^{e}	۲۲/۳۴^{c}	۴۳/۵۱^{a}
۱۰۰	میکوریزا + ازتوباکتر	۵/۲۱^{a}	۳/۵۰^{b}	۳/۴۶^{a}	۲۷/۸۷^{cd}	۶/۲۴^{b}	۴۱/۰۸^{ef}	۴/۸۰^{d}	۲۰/۱۱^{de}	۲۳/۸۶^{fg}
	میکوریزا	۳/۸۶^{cd}	۲/۹۰^{cd}	۲/۲۷^{c}	۲۷/۴۷^{cd}	۵/۵۰^{cde}	۴۴/۲۵^{de}	۵/۱۳^{cd}	۲۱/۴۶^{cd}	۲۵/۸۹^{ef}
	ازتوباکتر	۳/۷۳^{bcd}	۲/۵۹^{ef}	۲/۱۹^{cd}	۲۵/۴۵^{de}	۵/۳۵^{cde}	۴۶/۰۱^{d}	۵/۳۱^{c}	۲۲/۲۲^{c}	۲۹/۱۷^{d}
	شاهد	۳/۴۹^{de}	۲/۴۰^{g}	۲/۰۲^{de}	۲۴/۰۵^{ef}	۵/۰۱^{ef}	۶۲/۶۲^{b}	۵/۹۸^{b}	۲۵/۰۴^{b}	۳۷/۵۵^{b}
۱۵۰	میکوریزا + ازتوباکتر	۳/۸۸^{cd}	۳/۱۲^{c}	۲/۲۹^{c}	۳۱/۲۴^{b}	۵/۵۷^{cd}	۵۰/۷۴^{c}	۵/۱۸^{cd}	۲۱/۶۷^{cd}	۲۲/۶۱^{g}
	میکوریزا	۳/۸۲^{bcd}	۳/۰۷^{cd}	۲/۲۵^{cd}	۲۷/۷۲^{cd}	۵/۴۹^{cde}	۶۱/۶۱^{b}	۵/۲۷^{cd}	۲۲/۰۵^{cd}	۲۴/۳۰^{fg}
	ازتوباکتر	۳/۵۴^{cde}	۲/۴۵^{fg}	۲/۰۵^{cde}	۲۲/۷۸^{fg}	۵/۰۸^{def}	۶۵/۶۶^{ab}	۵/۳۷^{c}	۲۵/۵۰^{b}	۳۱/۰۲^{cd}
	شاهد	۳/۳۵^{e}	۲/۲۹^{g}	۱/۹۲^{e}	۲۱/۰۹^{g}	۴/۸۰^{f}	۶۷/۹۳^{a}	۶/۸۹^{a}	۲۸/۸۲^{a}	۳۳/۴۹^{c}

میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون، اختلاف معنی‌داری بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد ندارند.

گلوتاتیون و آسکوربیک‌اسید: بر اساس نتایج، میزان گلوتاتیون و آسکوربیک‌اسید با تأخیر در آبیاری به‌طور معناداری کاهش یافت؛ به‌طوری‌که کاربرد ترکیبی قارچ میکوریزا و ازتوباکتر در شرایط آبیاری مطلوب، بیشترین غلظت گلوتاتیون و آسکوربیک‌اسید را در برگ‌ها نشان داد؛ درحالی‌که کمترین میزان آنها در گیاهان بدون تلقیح با کودهای زیستی و در شرایط تنش آبی (۱۵۰ میلی‌متر تبخیر) مشاهده شد (جدول ۳). گزارش شده است افزایش آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی مانند گلوتاتیون و آسکوربیک‌اسید نقشی کلیدی در اجتناب از تنش اکسیداتیو ناشی از کمبود آب در گیاهان عالی بازی می‌کند (Taïbi *et al.*, 2016)؛ ازاین‌رو، کابرد ترکیبی قارچ میکوریزا و ازتوباکتر از طریق افزایش گلوتاتیون و آسکوربیک‌اسید باعث تحمل گیاه شنبلیله در شرایط تنش خشکی می‌شود. گزارش شده است تلقیح گیاه کتان با قارچ میکوریزا باعث افزایش گلوتاتیون به‌عنوان ترکیب حفاظتی برای مقابله با آثار ناشی از کمبود آب می‌شود (Ruiz-Sanchez *et al.*, 2011). هر دو تلقیح با قارچ میکوریزا و تلقیح با ازتوباکتر به‌طور خالص باعث افزایش غلظت گلوتاتیون در مقایسه با تیمار شاهد شد که به دنبال تلقیح دوگانه، اثر افزایشی داشتند.

مالون‌دی‌آلدئید: غلظت مالون‌دی‌آلدئید به‌عنوان شاخصی از پراکسیداسیون لیپید در برگ گیاهان تحت‌تنش خشکی بیشتر بود؛ به‌طوری‌که با تأخیر در آبیاری، غلظت مالون‌دی‌آلدئید به‌طور معناداری افزایش یافت. استفاده از ریزموجودات نقش مهمی در کاهش غلظت مالون‌دی‌آلدئید در شرایط تنش خشکی دارد (جدول ۳). در شرایط تنش کم‌آبی،

غلظت زیاد مالون‌دی‌آلدئید در برگ‌ها ممکن است با تجمع زیاد H_2O_2 در گیاهان همراه باشد که نشان‌دهندهٔ میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی است (Gill and Tuteja, 2010)؛ باوجوداین، گیاهان تلقیح‌شده دارای مالون‌دی‌آلدئید کمتری نسبت به گیاهان شاهد تلقیح‌نشده بودند که نشان‌دهندهٔ دخالت هر دو نوع ریزموجود در متابولیسم ROS است (Mo *et al*., 2016). گزارش شده است در اثر تنش کم‌آبی، غلظت مالون‌دی‌آلدئید در گونه‌های میکوریزی نسبت به شاهد کاهش می‌یابد، اما این کاهش در گونه‌های قارچ همزیست یکسان نیست (Ruiz-Lozano *et al*., 2001).

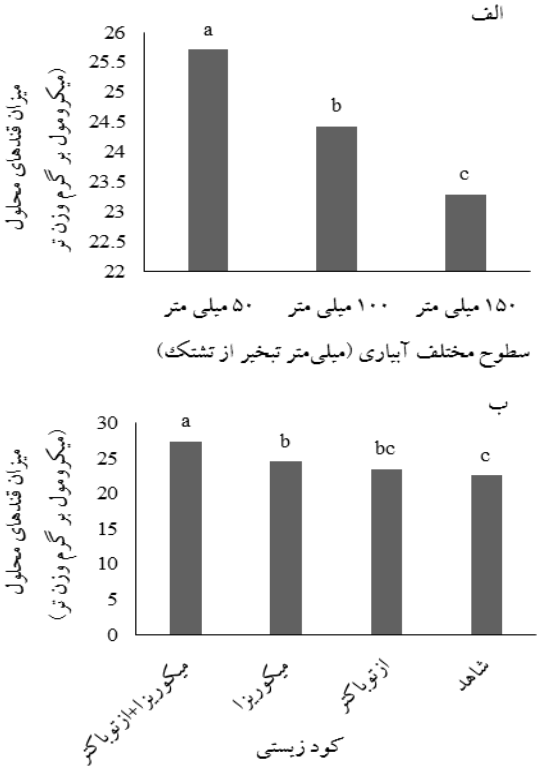
پراکسیدهیدروژن: میزان پراکسیدهیدروژن برگ همراه با افزایش تنش خشکی افزایش یافت؛ به‌طوری‌که تیمار ترکیبی قارچ میکوریزا و ازتوباکتر در مقایسه با تیمار شاهد (بدون کاربرد کود زیستی)، میزان پراکسیدهیدروژن را در هر سه رژیم آبیاری کاهش داد و میزان پراکسیدهیدروژن در تیمار ترکیبی قارچ میکوریزا و ازتوباکتر نسبت به شرایط کاربرد جداگانهٔ قارچ میکوریزا و ازتوباکتر کمتر بود (جدول ۳). حفاظت از گیاهان میزبان در برابر تنش‌اکسیداتیو با افزایش فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدان، مسئول حذف ROS است که نشان‌دهندهٔ تجمع کم پراکسیدهیدروژن است (Fouad *et al*., 2014). در شرایط دیم، غلظت زیاد مالون‌دی‌آلدئید در برگ‌ها ممکن است با تجمع زیاد پراکسیدهیدروژن در گیاهان همراه باشد که نشان‌دهندهٔ میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی است (Gill and Tuteja, 2010). قارچ‌های میکوریزا در تولید جاروب‌کننده‌های رادیکال‌های پروکسیل، پایداری سلولی در برابر رادیکال‌های آزاد و ایجاد سیستم قوی مهارکننده در برابر ROS نقش مهمی دارند (Ashraf and Foolad, 2007)؛ باوجوداین، گیاهان تلقیح‌شده دارای مالون‌دی‌آلدئید کمتری نسبت به گیاهان شاهد تلقیح‌نشده بودند که نشان‌دهندهٔ دخالت هر دو نوع ریزموجود در متابولیسم ROS است (Mo *et al*., 2016).

گلایسین‌بتائین: نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان دادند با تأخیر در آبیاری، میزان گلایسین‌بتائین به‌طور معناداری افزایش می‌یابد. کاربرد ترکیبی قارچ میکوریزا و ازتوباکتر در مقایسه با شاهد (بدون کاربرد کود زیستی) تأثیر معناداری در کاهش میزان گلایسین‌بتائین در هریک از سطوح آبیاری (۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌متر تبخیر) نشان می‌دهد؛ به‌طوری‌که کاربرد ترکیبی قارچ میکوریزا و ازتوباکتر بیشترین کاهش را در غلظت گلایسین‌بتائین نشان می‌دهد (جدول ۳). گزارش شده است گلایسین‌بتائین به‌عنوان عامل سازگاری مؤثر در حفاظت از دستگاه فتوسنتزی و افزایش توان فتوسنتزی طی شرایط تنش خشکی در گیاه ذرت تجمع می‌یابد (Ali and Ashraf, 2011). گلایسین‌بتائین ممکن است سبب کاهش ازدست‌دادن آب سیتوپلاسم و حفظ تورگر در گیاهان در معرض کمبود آب شود (Ashraf and Foolad, 2007). گزارش شده است غلظت گلایسین‌بتائین در برگ گیاه لوبیا همراه با افزایش تنش کم‌آبی در شرایط استفاده از قارچ‌های میکوریزا، افزایش تدریجی نشان می‌دهد Andrade (*et al*., 2010). نتایج یادشده نشان می‌دهند گونه‌های میکوریز نسبت به غیرمیکوریز در تعدیل

تنش نقش دارند و ممکن است تجمع این اسمولیت در برگ از طریق کاهش پتانسیل اسمزی و پتانسیل آب سلول، امکان ادامهٔ جذب آب را برای سلول فراهم کند.

پرولین: میزان پرولین در برگ با افزایش تنش خشکی افزایش یافت. بیشترین میزان پرولین در گیاهان بدون کاربرد کود زیستی (شاهد) طی تیمار آبیاری در سطح ۱۵۰ میلی‌متر تبخیر از تشتک به دست آمد و کمترین میزان پرولین نیز از گیاهان تحت‌تیمار تلفیقی میکوریزا و ازتوباکتر در سطح ۵۰ میلی‌متر تبخیر از تشتک حاصل شد و غلظت پرولین در تیمار ترکیبی قارچ میکوریزا و ازتوباکتر نسبت به شرایط کاربرد جداگانهٔ قارچ میکوریزا و ازتوباکتر کمتر بود (جدول ۳). تجمع پرولین در شرایط تنش ممکن است به‌علت کاهش اکسیداسیون پرولین یا تحریک سنتز آن از گلوتامات یا افزایش فعالیت آنزیم پروتئاز باشد (Sharma and Kuhad, 2006). پرولین نقش محافظت‌کنندگی آنزیم‌های سیتوزولی (حفاظت از آنزیم کربوکسیلاز) و ساختار سلولی را بر عهده دارد؛ ازاین‌رو، پرولین طی شرایط تنش در سلول انباشت می‌شود (Fang and Xiong, 2015). شرایط کم‌آبی از طریق افزایش بیان آنزیم‌های سنتزکنندهٔ پرولین و کاهش فعالیت آنزیم‌های تخریب پرولین (Serraj and Sinclair, 2002) سبب افزایش پرولین در گیاه می‌شود. دلایل مختلفی برای تجمع پرولین در گیاه طی شرایط کم‌آبی ارائه شده‌اند که برخی آن را به‌علت اثر تنظیمی ABA بر فرایندهای نوری در متابولیسم پرولین (Schutz and Fangmeir, 2001) و برخی آن را به‌علت وجود ترکیبات پرانرژی حاصل از فتوسنتز می‌دانند که سبب تحریک سنتز پرولین می‌شود (Zhang and Qu, 2004). معمولاً گیاهان میکوریزایی با استفاده از روابط آبی و تغذیهٔ بهتر نسبت به گیاهان بدون میکوریز می‌توانند به‌طور موقت از شرایط تنش خشکی فرار کنند و کمتر دچار آسیب شوند و درنتیجه، میزان پرولین نسبت به گیاهان بدون میکوریز افزایش کمتری نشان می‌دهد (Porcel and Ruiz-Lozano, 2004).

قندهای محلول کل: تنش کم‌آبی به کاهش معنادار قندهای‌های محلول منجر شد (شکل ۱، الف)؛ به‌طوری‌که کمترین میزان قندهای محلول از تیمار بدون کاربرد کود زیستی (شاهد) به دست آمد و بیشترین میزان آن در تیمار کاربرد ترکیبی قارچ میکوریزا+ازتوباکتر مشاهده شد (شکل ۱، ب). نتایج نشان می‌دهند طی شرایط تنش کم‌آبی، مقدار قندهای محلول در گیاه شنبلیله کاهش می‌یابد. پژوهشگران کاهش قندهای محلول کل در شرایط تنش خشکی را گزارش کرده‌اند (Benhiba *et al*., 2015; Saouri *et al*., 2018). احتمالاً کاهش قندهای محلول در شرایط تنش خشکی از کاهش دسترسی به کربوهیدرات‌ها در اثر کاهش فتوسنتز ناشی می‌شود. احتمالاً آسیب به غشای سلولی در پی تنش کم‌آبی نیز تنظیم اسمزی را محدود می‌کند؛ به‌طوری‌که محتوای آب برگ بیشتر در تنش کم‌آبی ممکن است از تجمع اسمولیت‌ها مانند قندهای محلول کل جلوگیری کند؛ باوجوداین، احتمالاً آثار هم‌افزایی تلقیح دوگانهٔ ریزموجودات روی غلظت قندهای محلول به‌علت افزایش فتوسنتز بوده است (Fouad *et al*., 2014).



شکل ۱- مقایسهٔ میانگین میزان قندهای محلول شنبلیله تحت‌تأثیر سطوح مختلف آبیاری (الف) و کود زیستی (ب). حرف‌های غیرمشابه، تفاوت معنادار در سطح احتمال ۵ درصد را بیان می‌کنند.

بر اساس نتایج، کاربرد کودهای زیستی (میکوریزا و میکوریزا+ازتوباکتر) سبب افزایش غلظت گلایسین‌بتائین، قندهای محلول و پرولین می‌شود؛ به‌طوری‌که این افزایش با افزایش درصد کلونیزاسیون ریشه و غلظت فسفر در بافت‌های گیاهی موردآزمایش همراه است. محتملاً با افزایش درصد کلونیزاسیون ریشه تحت‌تأثیر کود زیستی میکوریزا، تحریک تولید اسمولیت‌های یادشده تقویت می‌شود؛ به‌طوری‌که در شرایط تنش، تأثیر مثبت کود زیستی میکوریزا بر تولید این اسمولیت‌ها تا حدی از بروز آثار سوء تنش بر گیاه می‌کاهد و مانع از کاهش شدید عملکرد می‌شود.

یکی از کارهایی که گیاهان در مواجهه با تنش‌ها انجام می‌دهند، سنتز و تجمع ترکیبات محافظت‌کنندهٔ اسمزی نظیر قندهای محلول، آمینواسیدها، گلایسین‌بتائین و غیره است (Bohnert and Jensen, 1996)؛ به‌طوری‌که گلایسین‌بتائین باعث تثبیت ساختارهای سلولی و پروتئین‌های کارکردی می‌شود و تمامیت غشای سلول را در برابر عوامل تنش‌زا حفاظت می‌کند (Nawaz and Ashraf, 2010). در شرایط تنش، کودهای زیستی با افزایش میزان پرولین، قندهای محلول و افزایش جذب عناصر معدنی سبب کاهش اثر تنش خشکی و افزایش عملکرد گیاهان می‌شوند (El-bassiouny and Shukry, 2001). نتایج گویای افزایش معنادار جذب عناصر غذایی شامل نیتروژن، فسفر و پتاسیم در اندام‌های هوایی است و تیمار میکوریزا+ازتوباکتر بیشترین تأثیر را در افزایش جذب عناصر در پی دارد. معمولاً ریزموجودات در اطراف ریشه مستقر می‌شوند و گیاه را در جذب عناصر یاری می‌کنند (Wu and Xia, 2006)؛ همزیستی میکوریزایی نیز مقاومت گیاه میزبان به شرایط تنشی را افزایش می‌دهد. امروزه مشخص شده است قارچ‌های میکوریزایی به‌شکل مستقیم و غیرمستقیم باعث افزایش رشد گیاه میزبان می‌شوند (Feng *et al.*, 2002).

نتیجه‌گیری کلی

افزایش پرولین و گلیسین‌بتائین طی شرایط کم‌آبی در گیاه شنبلیله، پتانسیلی برای محافظت سلول‌ها از طریق سیستم تنظیم‌بخشی اسمزی است. خسارت اکسیداتیو ناشی از خشکی (H_2O_2 و

MDA) در گیاهان میکوریزا و ازتوباکتر کاهش یافت و از تلقیح دوگانهٔ ریزموجودات کمتر بود. در تیمارهای تلقیح دوگانهٔ ریزموجودات، آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی بیشتر از گیاهانی است که تنها با میکوریزا یا ازتوباکتر تلقیح شده‌اند. ریزموجودات باتوجه‌به افزایش محلول‌های سازگار و تنظیم سیستم‌های آنتی‌اکسیدان، وضعیت آب گیاه را طی خشکسالی حفظ می‌کنند؛ بنابراین، نتایج ما نشان دادند استفاده از کودهای زیستی قارچ میکوریزا و ازتوباکتر می‌تواند آسیب‌های تنش آب را با کاهش ROS کاهش دهد و تحمل تنش آب را بهبود بخشد.

Reference

Ali, Q. and Ashraf, M. (2011) Exogenously applied glycinebetaine enhances seed and seed oil quality of maize (*Zea mays* L.) under water deficit conditions. Environmental and Experimental Botany 71(2): 249-259.

Andrade, S. A., Gratão, P. L., Azevedo, R. A., Silveira, A. P., Schiavinato, M. A. and Mazzafera, P. (2010) Biochemical and physiological changes in jack bean under mycorrhizal symbiosis growing in soil with increasing Cu concentrations. Environmental and Experimental Botany 68(2): 198-207.

Ashraf, M. and Foolad, M. R. (2007) Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. Environmental and Experimental Botany 59: 206-216.

Bairwa, R. C. and Kaushik, M. K. (2010) Response of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) varieties to fertility levels and growth regulators on productivity, profitability and quality. Journal of Progressive Agriculture 1(1): 65-67.

Bates, L. S., Waldren, R. P. and Teare, I. D. (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant and soil 39(1): 205-207.

Baum, C., El-Tohamy, W. and Gruda, N. (2015) Increasing the productivity and product quality of vegetable crops using arbuscular mycorrhizal fungi. A review. Scientia Horticulturae 187: 131-141.

Benami, A. and Ofen, A. (1984) Irrigation Engineering-Sprinkler, Trickle and Surface Irrigation: Principles, Design and Agricultural Practices. Irrigation Engineering Scientific Publications.

Benhiba, L., Fouad, M.O., Essahibi, A., Ghoulam, C. and Qaddoury, A. (2015) Arbuscular mycorrhizal symbiosis enhanced growth and antioxidant metabolism in date palm subjected to long-term drought. Trees 29(6): 1725-1733.

Bohnert, H. J., and Jensen, R. G. (1996). Strategies for engineering water stress tolerance in plants. Trends Biotechnol 14: 89-97.

Chen, G. X. and Asada K. (1989) Ascorbate peroxidase in tea leaves: occurrence of two isozymes and the differences in their enzymatic and molecular properties. Plant Cell Physiology 30:987-998.

Dadrasan, M., Chaichi, M. R., Pourbabaee, A. A., Yazdani, D. and Keshavarz-Afshar, R. (2015) Deficit irrigation and biological fertilizer influence on yield and *Trigonelline* production of fenugreek. Industrial Crops and Products 77:156-162.

Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. T. and Smith, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical chemistry 28(3): 350-356.

El-Bassiouny, H. M. S. and Shukry, W. M. (2001) Cowpea growth pattern, metabolism and yield in response to IAA and biofertilizers under drought conditions. Egyptian Journal of Biology 3: 117-129.

Fang, Y. and Xiong, L. (2015) General mechanisms of drought response and their application in drought resistance improvement in plants. Cellular and Molecular Life Sciences 72(4): 673-689.

Fazeli, A., Zarei, B. and Tahmasebi, Z. 2018. The effect of salinity stress and salicylic acid on some physiological and biochemical traits of Black cumin (*Nigella sativa* L.). Iranian Journal of Plant Biology 9(4): 69-83 (in Persian).

Feng, G., Zhang, F., Li, X., Tian, C., Tang, C. and Rengel, Z. (2002). Improved tolerance of maize plants to saltstress byarbuscular mycorrhizais related to higher accumulation of soluble sugars in roots. Mycorrhiza 12:185-190.

Fouad, M. O., Essahibi, A., Benhiba, A. and Qaddoury, A. (2014) Effectiveness of arbuscular mycorrhizal fungi in the protection of olive plants against oxidative stress induced by drought. Spanish Journal of Agricultural Research 12:763-771.

Garcia, I., Mendoza, R. and Pomar, M. C. (2012) Arbuscular mycorrhizal symbiosis and dark septate endophytes under contrasting grazing modes in the Magellanic steppe of Tierra del Fuego. Agriculture, Ecosystems and Environment 155: 194-201.

Gill, S. S. and Tuteja, N. (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiology and Biochemistry 48: 909-930.

Grieve, C. M. and Grattan, S. R. (1983) Rapid assay for determination of water soluble quaternary ammonium compounds. Plant and Soil 70(2): 303-307.

Habibzadeh, Y., Jalilian, J., Zardashti, M. R., Pirzad, A. and Eini, O. (2015) Some morpho-physiological characteristics of Mung Bean mycorrhizal plant under different irrigation regimes in field condition. Journal of Plant Nutrition 38(11): 1754-1767.

Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Gill, S. S. and Fujita, M. (2013) Drought stress responses in plants, oxidative stress, and antioxidant defense. Climate Change and Plant Abiotic Stress Tolerance 209-250.

Law, M. Y., Charles, S. A. and Halliwell, B. (1983) Law, M.Y., Charles, S.A. and Halliwell, B., 1983. Glutathione and ascorbic acid in spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplasts. The effect of hydrogen peroxide and of paraquat. Biochemical Journal 210: 899-903.

Liu, J., Xie, X., Du, J., Sun, J. and Bai, X. (2008) Effects of simultaneous drought and heat stress on Kentucky bluegrass. Horticultural Science 115: 190-195

Lokhande, V. H., Nikam, T. D. and Penna, S. (2010) Biochemical, physiological and growth changes in response to salinity in callus cultures of *Sesuvium portulacastrum* L. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 102(1):17-25.

Maehly, A. C. and Chance, B. (1959) The assay of catalase and peroxidase. In: Methods of biochemical analysis (Ed. Glick, D.) 1: 357-425. Interscience Publishers, New York.

Miller, G., Suzuki, N. and Ciftci-Yilmaz, S. (2010) Reactive oxygen species homeostasis and signaling during drought and salinity stresses. Plant Cell and Environment 33: 453-467.

Mirzakhani, M., Ardakani, M. R., Rejali, F., Rad, A. H. S. and Miransari, M. (2014) Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) oil content and yield components as affected by co-inoculation with *Azotobacter chroococcum* and *Glomus intraradices* at various N and P levels in a dry climate. In Use of Microbes for the Alleviation of Soil Stresses 153-164.

Mittler, R. (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends in Plant Science 7: 405-410.

Mo, Y., Wang, Y., Yang, R., Zheng, J., Liu, C., Li, H., Ma, J., Zhang, Y., Wei, C. and Zhang, X. (2016) Regulation of plant growth, photosynthesis, antioxidation and osmosis by an

arbuscular mycorrhizal fungus in watermelon seedlings under well-watered and drought conditions. Front Plant Science 7: 1-15

Mohammadi, M., Modarres-Sanavy, S. A. M., Pirdashti, H., Zand, B. and Tahmasebi-Sarvestani, Z. (2019) Arbuscular mycorrhizae alleviate water deficit stress and improve antioxidant response, more than nitrogen fixing bacteria or chemical fertilizer in the evening primrose. Rhizosphere 9: 76-89.

Nawaz, K. and Ashraf, M. (2010). Exogenous application of glycinebetaine modulates activities of antioxidants in maize plants subjected to salt stress. Journal of Agronomy and Crop Science, 196(1): pp.28-37.

Ortiz, N., Armada, E., Duque, E., Roldán, A. and Azcón, R. (2015) Contribution of arbuscular mycorrhizal fungi and/or bacteria to enhancing plant drought tolerance under natural soil conditions: effectiveness of autochthonous or allochthonous strains. Journal of Plant Physiology 174: 87-96.

Pan, Y., Wu, L. J. and Yu, Z. L. (2006) Effect of salt and drought stress on antioxidant enzymes activities and SOD isoenzymes of liquorice (*Glycorhiza uralensis* Fisch). Journal of Plant Growth Regulation 49:157-165

Porcel, R. and Ruiz-Lozano, J. M. (2004) Arbuscular mycorrhizal influence on leaf water potential, solute accumulation, and oxidative stress in soybean plants subjected to drought stress. Journal of Experimental Botany 55: 1743-1750.

Rajaeian, S., Ehsanpour, A. A. and Toghyani, M. A. (2015) Changes in phenolic compound, TAL, PAL activity of *Nicotiana rustica* triggered by ethanolamine pretreatment under in vitro salt stress condition. Iranian Journal of Plant Biology 7(2): 1-12 (in Persian).

Ruiz-Lozano, J. M., Collados, C., Barea, J. M. and Azcón, R. (2001) Arbuscular mycorrhizal symbiosis can alleviate drought-induced nodule senescence in soybean plants. New Phytologist 151(2): 493-502.

Ruiz-Sanchez, M., Armada, E., Munoz, Y., Garcia de Salamone, I. E., Aroca, R., Ruiz-Lozano, J. M. and Azcon, R. (2011) *Azospirillum* and arbuscular mycorrhizal colonization enhance rice growth and physiological traits under well-watered and drought conditions. Journal of Plant Physiology 168: 1031-1037.

Sabouri, F., Sirousmehr, A. and Gorgini Shabankareh, H. (2018) Effect of irrigation regimes and application of humic acid on some morphological and physiological characteristics of Savory (*Satureja hortensis* L.). Iranian Journal of Plant Biology 9(4): 13-24 (in Persian).

Schutz, M. and Fangmeir, E. (2001) Growth and yield responses of spring wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Minaret) to elevated CO_2 and water limitation. Environmental Pollution 114: 187-194.

Serraj, R. and Sinclair, T. R. (2002) Osmolyte accumulation: Can it really help increase crop yield under drought conditions? Plant, Cell and Environment 25(2): 333-341.

Sgherri, C. L. M., Liggini, B., Puliga, S. and Navari Izzo, F. (1994) Antioxidant system in *Sporoblus stapfianus*. Changes in response to desiccation and rehydration. Phytochemistry 35: 561-565.

Sharma, K. D. and Kuhad, M. S. (2006) Influence of potassium level and soil moisture regime on biochemical metabolites of *Brassica* Species. Brassica Journal 8: 71-74.

Sharma, P., Dubey, R. and Pessarakli, M. (2012) Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. Journal of Botany 14: 1-26.

Slama, I., Ghnaya, T., Hessini, K., Messedi,

D., Savouré, A. and Abdelly, C. (2007) Comparative study of the effects of mannitol and PEG osmotic stress on growth and solute accumulation in *Sesuvium portulacastrum*. Environmental and Experimental Botany 61(1): 10-17.

Smith, I. K. (1985) Stimulation of glutathione synthesis in photorespiring plants by catalase inhibitors. Plant Physiolgy 79: 1044-1047.

Taïbi, K., Taïbi, F., Abderrahim, L.A., Ennajah, A., Belkhodja, M. and Mulet, J.M. (2016) Effect of salt stress on growth, chlorophyll content, lipid peroxidation and antioxidant defence systems in *Phaseolus vulgaris* L. South African Journal of Botany 105: 306-312.

Velikova, V., Yordanov, I. and Edreva, A. (2000) Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: protective role of exogenous polyamines. Plant Science 151: 59-66.

Wu, Q. and Xia, R. (2006) Arbuscular mycorrhizal fungi influence growth, osmotic adjustment and water stress conditions. Journal of Plant Physiology 163: 417-425.

Zhang, Z.L, and Qu, W. (2004) Experimental guidance of plant physiology. High Education Press, Beijing.

Zhu, X. C., Song, F. B. and Xu, H. W. (2010) Arbuscular mycorrhizae improves low temperature stress in maize via alterations in host water status and photosynthesis. Plant and Soil 331 (1-2): 129-137.