

اثر هم‌زیستی میکوریزی بر محتوای آبی و سیستم آنتی‌اکسیدان گیاه شیرین بیان (*Glycyrrhiza glabra* L.) تحت تنش کم‌آبی

سمیه محمدی^۱، الهه وطن خواه^{۱*}، ستاره امانی‌فر^۲ و زهره طفرانگار^۱

^۱ ایران، زنجان، دانشگاه زنجان، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

^۲ ایران، زنجان، دانشگاه زنجان، دانشکده کشاورزی، گروه علوم و مهندسی خاک

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱/۲۰

چکیده

رابطه هم‌زیستی بین قارچ‌های میکوریز آربوسکولار و ریشه‌ی گیاهان عالی، یک نقش مهمی را در تحمل گیاهان به تنش آبی ایفا می‌کند. بنابراین برای بررسی اثر هم‌زیستی میکوریزی بر محتوای آبی و سیستم آنتی‌اکسیدان گیاه شیرین بیان (*Glycyrrhiza glabra* L.) تحت تنش کم‌آبی، آزمایشی فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو فاکتور شامل (۱) تلقیح شده میکوریزی با قارچ *Funneliformis mosseae* و بدون تلقیح و (۲) سطوح کم‌آبی ۱۰۰٪ (شاهد)، ۷۰٪ و ۵۰٪ ظرفیت‌زراعی (FC) اجرا شد. نتایج نشان داد که تنش کم‌آبی، محتوای نسبی آب برگ و وزن خشک گیاه را کاهش داد و هم‌زیستی میکوریزی موجب بهبود این شاخص‌های رشد گردید. بررسی‌های بیوشیمیایی نیز نشان داد هم‌زیستی میکوریزی به‌طور معنی‌داری محتوای پروتئین و مالون‌دی‌آلدهید در دو سطح تنش و فنل در سطح ۵۰٪ FC را در مقایسه با گیاهان غیرمیکوریزی کاهش داد. محتوای فلاونونوئید گیاهان میکوریزی در سطح ۵۰٪ FC بیشتر از گیاهان غیرمیکوریزی بود. همچنین هم‌زیستی با قارچ *F. mosseae*، فعالیت‌های آسکوربات پراکسیداز و پلی‌فنل اکسیداز بخش هوایی و زیرزمینی و پراکسیداز بخش هوایی را در تمام سطوح رطوبتی خاک در مقایسه با گیاهان بدون تلقیح به‌طور معنی‌داری کاهش داد. درحالی‌که هم‌زیستی میکوریزی منجر به افزایش معنی‌دار فعالیت‌های کاتالاز و پراکسیداز ریشه در سطح ۵۰٪ FC و فعالیت‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز بخش هوایی در سطح ۷۰٪ FC شد. به‌طور کلی نتایج نشان داد که هم‌زیستی گیاه شیرین‌بیان با قارچ *F. mosseae* با بهبود محتوای آبی و تنظیم پاسخ سیستم دفاع آنتی‌اکسیدان آنزیمی و غیرآنزیمی موجب کاهش آثار مضر تنش کم‌آبی گردید.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌ها و متابولیت‌های آنتی‌اکسیدان، تنش کم‌آبی، شیرین‌بیان، قارچ میکوریز آربوسکولار، محتوای نسبی آب برگ

* نویسنده مسؤل، پست الکترونیکی: Elahe_vatankhah@znu.ac.ir

مقدمه

تبدیلی مورد نیاز است (۳۳). ماده اصلی این گونه، ترکیب ساپونین تری‌ترپنوئیدی به‌نام اسید گلیسیریزیک یا گلیسیریزین با شیرینی ۵۰ تا ۱۵۰ برابر ساکارز است. این گیاه کاربردهای درمانی مختلفی نیز داشته و در طب سنتی، از ریشه آن برای درمان زخم معده استفاده می‌شود. در مطالعات بالینی و تجربی نیز مواردی نظیر اثرات درمانی در

گیاه شیرین بیان با نام علمی *Glycyrrhiza glabra* L. گیاهی چند ساله از خانواده بقولات (Fabaceae) است که به سبب دارا بودن ترکیبات دارویی و غذایی مهم در ریشه و ریزوم آن، مورد توجه صنایع دارویی، غذایی، آرایشی و حتی دخانیات در سراسر جهان قرار گرفته است. در ایران سالانه بیش از ۵۰ هزار تن ریشه شیرین بیان برای صنایع

پراکسیداز و کاتالاز) و غیرآنزیمی (مانند آسکوربات، گلوکاتایون، فلاونوئیدها، کاروتنوئیدها، توکوفرول‌ها و پرولین) می‌باشد. آنتی‌اکسیدان‌ها نه تنها بعنوان روبشگرهای مستقیم ROS، بلکه بعنوان حسگرهای مهم وضعیت ردوکس سلولی نیز عمل می‌کنند که موجب راه اندازی برخی وقایع علامت‌دهی برای کنترل سطوح ROS سلولی می‌شوند (۳۲).

استفاده از کودهای زیستی و آلی یکی از مهمترین فعالیت‌ها در کشاورزی پایدار است و در عین حال تقاضا برای کودهای معدنی را کاهش می‌دهد. یکی از روش‌های اصلاح روابط آبی در گیاهان استفاده از قارچ‌های میکوریزی است (۲۹). قارچ‌های میکوریز آربوسکولار (AM) از مهم‌ترین عوامل همزیست اجباری ریشه گیاهان بشمار رفته و تقریباً با ۸۰ درصد گونه‌های گیاهی رابطه همزیستی برقرار می‌کنند. این قارچ‌ها به شاخه Glomeromycota از راسته Glomerales تعلق دارند و به دلیل پراکنش جهانی و نیز ارتباط گسترده آن‌ها با گیاهان، از فراوان‌ترین روابط همزیستی موجود در طبیعت محسوب می‌گردند (۴۰). از مهم‌ترین منافع حاصل از همزیستی قارچ‌های AM با گیاهان می‌توان به افزایش مقاومت گیاهان به تنش‌های غیرزیستی نظیر خشکی و شوری اشاره نمود (۲۱). گزارش‌های زیادی مبنی بر افزایش تحمل گیاهان به خشکی در نتیجه تلقیح با قارچ‌های AM وجود دارد (۴، ۱۸ و ۳۸). سازوکارهای مطرح شده برای افزایش تحمل خشکی در نتیجه همزیستی با قارچ‌های AM شامل تنظیم بهبود یافته روابط آبی گیاه، افزایش تنظیم اسمزی، افزایش سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدان و تولید مولکول‌های حفاظتی می‌باشند. همچنین میسلیوم‌های بیرونی موجود در خاک ممکن است خاکدانه‌ها را تثبیت کنند و با افزایش رطوبت، جذب آب را بهبود بخشند (۲۰). مقاومت کردن گیاهان به تنش از طریق همزیستی با قارچ AM، اغلب در ارتباط با افزایش سطوح یا فعالیت‌های آنتی‌اکسیدان در گیاهان است که در

بیماری‌های پوستی و ریوی، نارسایی کبدی و قلبی و خواص ضدالتهابی، ضد ویروس، ضد میکروب، آنتی-اکسیدان، ضدسرطان و تقویت سیستم ایمنی برای این گیاه اثبات شده است (۹ و ۲۸). همچنین عصاره شیرین بیان به‌عنوان طعم دهنده در بسیاری از انواع غذاها و نوشیدنی‌ها و یا بعنوان شیرین کننده برخی غذاها استفاده می‌شود (۳۳).

تنش خشکی یکی از تنش‌های غیرزیستی جدی و محدود کننده رشد گیاه است که تولید محصول را در سراسر جهان کاهش می‌دهد. تخمین زده شده است که نزدیک به یک سوم خاک‌ها تحت تنش خشکی قرار می‌گیرند همچنین کشور ایران دارای آب و هوای خشک و نیمه‌خشک است (۴۴). کمبود آب که ناشی از عوامل بسیاری از جمله کاهش ظرفیت بارندگی، توزیع نامنظم باران، شدت و طول مدت خشکسالی و میزان پیشرفت تنش می‌باشد (۱۱) و ۳۸ بعنوان یکی از موانع مهم برای رشد گیاهان چندساله محسوب می‌شود (۳۰). تنش خشکی به‌طور معمول باعث کاهش پتانسیل آبی خاک، ایجاد کم‌آبی در سلول و در نهایت منجر به مهار توسعه و تقسیم سلولی، کاهش اندازه برگ، جلوگیری از طویل شدن ساقه و تکثیر ریشه، اختلال در نوسانات روزنه‌ای، آب گیاه، جذب مواد غذایی معدنی و کارایی استفاده آب می‌شود (۴۴). همچنین تنش خشکی با تولید بیش از حد انواع اکسیژن واکنش‌گر (ROS) مانند اکسیژن یکتایی، سوپراکسیدها، هیدروژن پراکسید و رادیکال‌های هیدروکسیل موجب آسیب یا مرگ سلولی، دستگاه فتوسنتزی و متابولیسم طبیعی سلول می‌گردد (۴). گیاهان با دارا بودن یک شبکه پاسخ پیچیده از ترکیبات و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان که سلول‌های گیاهی را در برابر تولید بیش از حد ROS محافظت می‌کند، شناخته می‌شوند. تنش اکسیداتیو زمانی اتفاق می‌افتد که سیستم دفاعی آنتی-اکسیدان تولید شده قادر به حفظ تعادل ردوکس سلولی مناسب نباشد. سیستم آنتی‌اکسیدان شامل هر دو مولکول‌های آنزیمی (مانند سوپراکسید دیسموتاز، آسکوربات

تهیه شده از شرکت پاکان بذرافشان، ابتدا در اتانول ۷۰٪ به مدت ۲ دقیقه و هیپوکلریت سدیم ۰/۵٪ به مدت ۱۵ دقیقه ضدعفونی و سپس با آب مقطر استریل، ۳ بار شستشو داده شدند. به منظور غلبه بر مشکل جوانه‌زنی، بذرها به مدت ۲ دقیقه در آب جوش نیز قرار گرفتند. خاک مورد استفاده جهت کاشت از اراضی دانشگاه زنجان با مختصات جغرافیایی ۳۶ درجه و ۴۰ دقیقه عرض شمالی و ۴۸ درجه و ۲۴ دقیقه طول شرقی، از عمق ۰ تا ۲۰ سانتی متری سطح خاک جمع‌آوری و از الک ۴ میلی‌متری عبور داده شد، برخی از خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک بستر شامل: بافت خاک، pH (در گل اشباع)، هدایت الکتریکی در عصاره گل اشباع (ECe)، درصد کربن آلی (OC)، مقدار فسفر قابل جذب با عصاره‌گیر بی‌کربنات سدیم، رطوبت ظرفیت زراعی (FC) و درصد اشباع (SP) تعیین گردید (جدول ۱). جهت کاشت، نیمی از بذرها در ۱/۸ کیلوگرم خاک اتوکلاو شده حاوی ۵۰ گرم مایه تلقیح حاکی قارچ *F. mosseae* (با پتانسیل ۲۰ اسپور در هر گرم مایه تلقیح حاوی اندام‌های قارچی و قطعه‌هایی از ریشه‌های کلنیزه شده و کلنیزه نشده به همراه خاک) و نیمی دیگر از بذرها در ۱/۸ کیلوگرم خاک اتوکلاو شده حاوی همان میزان مایه تلقیح حاکی اتوکلاو شده در گلدان‌ها کاشته شدند. همچنین، برای ایجاد یک جامعه میکروبی یکنواخت، همه گلدان‌ها ۱۰ میلی‌لیتر عصاره فیلتر شده بدون قارچ AM از مایه تلقیح دریافت کردند. سپس در اتاق رشد تحت شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. گلدان‌ها هر روز وزن شده و در صورت کاهش وزن گلدان به اندازه ظرفیت زراعی اولیه با آب مقطر به مدت دو ماه آبیاری شدند. در این مدت هر هفته یک بار گلدان‌ها با محلول غذایی لانگ اشتون (۲۷) تغذیه شدند. سپس گیاهچه‌های شیرین بیان حاصل از جوانه‌زنی بذرها بعد از دو ماه طی مرحله رویشی گیاه در معرض سطوح مختلف رطوبتی شامل سه سطح ۱۰۰ (S0)، ۷۰ (S1) و ۵۰

تحقیقات بسیاری گزارش شده است (۱۸، ۲۵ و ۳۶). اثر افزایشی تلقیح قارچ AM بر محتوای پروتئین کل، اسانس، وزن خشک و طول اندام هوایی و ریشه در گیاهان شیرین بیان رشد یافته تحت شرایط تنش آبی توسط Akhzari و همکاران (۸) نیز گزارش شده است. همچنین Movahhed Haghghi و همکاران (۳۳) نشان دادند تلقیح قارچ *Claroiedoglomus etunicatum* و تغذیه سیلیکون در گیاهان شیرین بیان در معرض کمبود آب، موجب بهبود ویژگی‌های مورفو-فیزیولوژیکی، سیستم دفاعی آنزیمی و عملکرد گیاه گردید.

با توجه به بحران کم‌آبی در ایران، انتخاب و کشت گیاهان مقاوم به خشکی و همچنین کاربرد قارچ‌های AM از استراتژی‌های زیستی مهم محسوب می‌شود. شیرین بیان یک گیاه دارویی چند ساله با ارزش است که معمولاً در مناطقی با آب و هوای نیمه‌خشک و خشک رشد می‌کند و می‌تواند شرایط سخت محیطی را تحمل نماید (۲۸). بنابراین در این تحقیق اثر تنش خشکی و همچنین نقش قارچ میکوریزی *Funneliformis mosseae* بر شاخص وضعیت آبی گیاه (محتوای نسبی آب برگ) و تنظیم سیستم آنتی‌اکسیدانی آنزیمی (سوپراکسید دیسموتاز، پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز، کاتالاز و پلی‌فنل اکسیداز) و غیرآنزیمی (پرولین، فنل، فلاوونوئید و کاروتنوئید) گیاه شیرین بیان اندازه‌گیری شد و پتانسیل قارچ میکوریزی *F. mosseae* در القای مقاومت به تنش کم‌آبی در گیاه شیرین بیان و شناخت سازوکار مقاومت القا شده احتمالی در این گیاه بررسی گردید.

مواد و روشها

کشت و تلقیح گیاهان: این تحقیق جهت بررسی سطوح مختلف خشکی روی گیاه شیرین بیان به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۴ تکرار در آزمایشگاه تحقیقاتی گروه زیست‌شناسی دانشگاه زنجان در سال ۱۳۹۸ انجام شد. بذرهاى گیاه شیرین بیان (*G. glabra* L.)

گیاهان برداشت شده و برخی از شاخص‌های رشد، میزان ترکیبات آنتی‌اکسیدان غیرآنتیمی و فعالیت آنزیم‌های آنتی-اکسیدان مورد بررسی و سنجش قرار گرفت.

(S2) درصد ظرفیت زراعی قرار گرفتند و با توزین روزانه گلدان‌ها میزان تخلیه‌ی رطوبتی خاک کنترل و در صورت نیاز گیاهان آبیاری شدند. ۲۱ روز بعد از اعمال تنش،

جدول ۱- برخی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک مورد استفاده برای کشت گلدان

| N | K | P | OC | FC | EC _e | pH | بافت |
|-------|---------------------|---------------------|------|----|--------------------|-----|----------|
| % | mg kg ⁻¹ | mg kg ⁻¹ | % | % | dS m ⁻¹ | | لومی شنی |
| ۰/۱۱۴ | ۳۷۰ | ۵/۴ | ۱/۱۴ | ۱۴ | ۰/۶۲ | ۷/۸ | |

EC_e: قابلیت هدایت الکتریکی در عصاره گل اشباع، FC: رطوبت ظرفیت زراعی، OC: درصد کربن آلی، P: مقدار فسفر قابل جذب، K: مقدار پتاسیم قابل جذب، N: مقدار ازت قابل جذب.

MDA، یک میلی‌لیتر از روشناور به ۴ میلی‌لیتر اسید تری کلرواستیک ۲۰ درصد (W/V) حاوی ۰/۵ درصد (W/V) اسید تیوباربیتوریک (TBA) اضافه گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد در بن ماری حرارت داده شد. سپس بلافاصله لوله‌ها داخل یخ سرد گذاشته شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و با سرعت $10000 \times g$ سانتریفیوژ شد. جذب محلول رویی حاصل از سانتریفیوژ توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۳۲ نانومتر اندازه‌گیری شد. ماده مورد نظر برای جذب در این طول موج کمپلکس قرمز (MDA-TBA) است. جذب بقیه رنگیزه‌های غیراختصاصی در ۶۰۰ نانومتر خوانده شد و از میزان جذب در ۵۳۲ نانومتر کم شد. برای محاسبه غلظت MDA از ضریب خاموشی معادل mm^{-1} 155 cm^{-1} استفاده شد و در نهایت مقدار MDA براساس میکرومول بر گرم وزن تر ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{ FW}$) محاسبه گردید (۲۶).

اندازه‌گیری آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنتیمی: پرولین: برای استخراج پرولین از بافت خشک گیاهی (۰/۱ گرم اندام هوایی و ۰/۰۵ گرم اندام زیرزمینی) در ۱۰ میلی‌لیتر اسید سولفوسالیسیلیک ۳ درصد استفاده شد. محتوای پرولین با استفاده از معرف نین‌هیدرین و منحنی استاندارد پرولین سنجش گردید (۱۴) و بر حسب میکرومول بر گرم وزن خشک ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{ DW}$) گزارش گردید.

اندازه‌گیری شاخص‌های رشد: ابتدا ۴ بوته از هر گلدان خارج کرده پس از شستشو با آب مقطر، نمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت داخل انکوباتور در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد خشک شدند. توزین وزن خشک هر بوته با ترازوی دیجیتالی انجام و میانگین براساس واحد گرم گزارش شد.

برای اندازه‌گیری محتوای نسبی آب برگ (RWC)، از برگ هر گیاه دیسکی با قطر ۱ سانتی‌متر تهیه شد و با ترازو (مدل GR200) وزن گردید (FW). سپس دیسک‌ها در ظروف پتری حاوی آب مقطر به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند. دیسک‌ها پس از این مدت از پتری خارج شده و با استفاده از کاغذ صافی خشک و دوباره وزن شدند تا وزن حالت تورژسانس (TW) کامل به دست آید. برای محاسبه وزن خشک (DW)، دیسک‌های خارج شده از آب به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد خشک و سپس توزین گردیدند. سپس RWC با استفاده از رابطه زیر محاسبه گردید (۴۲).

$$RWC (\%) = [(FW-DW)/(TW-DW)] \times 100$$

اندازه‌گیری مالون دی‌آلدهید (MDA): برای استخراج MDA ۰/۱۵ گرم بافت تر گیاهی در ۵ میلی‌لیتر محلول اسید تری کلرواستیک (TCA) ۰/۱ درصد سائیده شد سپس عصاره حاصل در دمای محیط و با سرعت $10000 \times g$ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. برای سنجش

و فعالیت آنزیم به‌صورت میلی‌مول آب اکسیژنه در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین ($\text{mmol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ protein}$) گزارش گردید.

فعالیت آنزیم پراکسیداز: سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز با استفاده از روش دو گهرمایه‌ای یعنی پراکسید هیدروژن $0/017$ مولار و فنل آمینوآنتی‌پیرین $0/0025$ مولار (فنل $0/17$ مولار و 4 - آمینوآنتی‌پیرین $0/0025$ مولار) صورت گرفت (۳۹). در این روش، پراکسید هیدروژن سریع با محلول فنل 4 - آمینوآنتی‌پیرین با وجود پراکسید واکنش می‌دهد و تولید ماده رنگی کوئینونیمین (Quinoneimine) می‌کند که رنگ صورتی پررنگ با جذب بیشینه در 510 نانومتر را نشان می‌دهد. فعالیت آنزیم پراکسیداز به‌صورت میکرومولار آب اکسیژنه تجزیه شده در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین ($\mu\text{M H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ protein}$) گزارش گردید.

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز: برای سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (EC 1.11.1.11) از بافر فسفات 50 میلی‌مولار با $\text{pH}=7$ حاوی EDTA $0/1$ میلی‌مولار و آسکوربات $0/5$ میلی‌مولار و همچنین پراکسید هیدروژن 1 میلی‌مولار استفاده شد (۳۴). برای محاسبه فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز از ضریب خاموشی $\text{cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ $2/8$ برای آسکوربات احیا شده در طول موج 290 نانومتر استفاده شد و فعالیت آنزیم به‌صورت میلی‌مول آسکوربات در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین ($\text{mmol Ascorbate min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ protein}$) گزارش گردید.

فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز: برای سنجش آنزیم پلی‌فنل اکسیداز از بافر فسفات $0/2$ مولار با $\text{pH}=6/8$ و پیروگالال $0/02$ مولار استفاده شد. لازم به ذکر است که سنجش آنزیم پلی‌فنل اکسیداز در دمای 40 درجه سانتی‌گراد انجام شد (۳۷). فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز به‌صورت تغییرات جذب در طول موج 430 نانومتر در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین ($\Delta\text{A min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ protein}$) گزارش گردید.

فنل کل و فلاوونوئید: $0/1$ گرم از پودر بافت خشک گیاهی با 2 میلی‌لیتر متانول خالص مخلوط و به‌مدت 48 ساعت در دمای اتاق قرار داده شد. سپس عصاره صاف شده آن برای تبخیر متانول در مجاورت هوا قرار گرفت. بعد از حل کردن رسوب حاصل در آب مقطر یا متانول خالص، عصاره آبی و متانولی به‌ترتیب برای سنجش فنل کل و فلاوونوئید مورد استفاده قرار گرفت. محتوای فنل کل با استفاده از معرف سیوکالتو (۳۵) بر حسب میلی‌گرم اسید گالیک بر وزن خشک نمونه و محتوای فلاوونوئید با استفاده از روش کلرید آلومینیوم (۱۵) بر حسب میلی‌گرم کوئرستین بر وزن خشک نمونه گیاهی اندازه‌گیری شد.

کاروتنوئید: برای استخراج کاروتنوئید از بافت تر گیاهی ($0/1$ گرم اندام هوایی) از 10 میلی‌لیتر استن 80 درصد استفاده شد و با استفاده از روش Lichtenthaler و Buschmann (۳۱) سنجش گردید.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان:

استخراج عصاره آنزیمی: برای استخراج آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، مقدار $0/1$ گرم از بافت تر گیاهی توسط 1 میلی‌لیتر بافر استخراج (بافر فسفات 50 میلی‌مولار با $\text{pH}=6/8$ حاوی 1 میلی‌مولار Na-EDTA) به‌خوبی سائیده شد. سپس محلول حاصل به‌مدت 20 دقیقه با سرعت $\times\text{g}$ 13000 در دمای 4 درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد و روشنادهای حاصل تا زمان سنجش فعالیت آنزیم‌ها در فریزر با دمای -70 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

فعالیت آنزیم کاتالاز: برای سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز (EC 1.11.1.6) از بافر فسفات 50 میلی‌مولار با $\text{pH}=7$ حاوی Na-EDTA $0/1$ میلی‌مولار و پراکسید هیدروژن 10 میلی‌مولار استفاده گردید. سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز بر اساس کاهش جذب آب اکسیژنه در طول موج 240 نانومتر صورت گرفت (۷). برای محاسبه فعالیت آنزیم کاتالاز از ضریب خاموشی آب اکسیژنه ($\text{cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$) 40 استفاده شد

نتایج

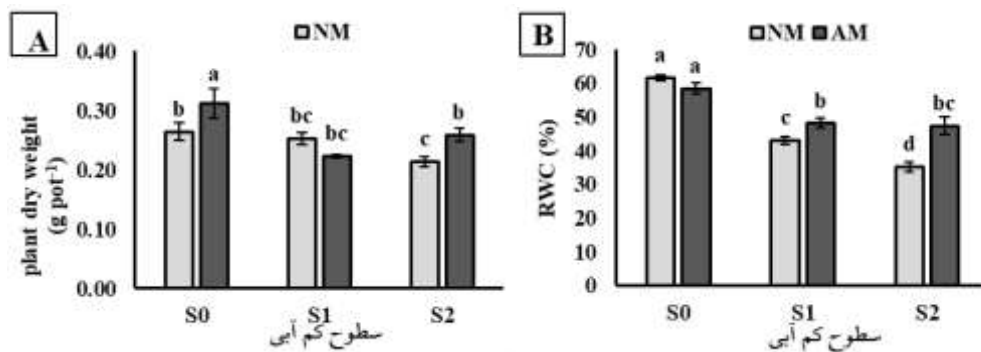
صفات رشدی: نتایج تجزیه واریانس نشان داد اثر قارچ میکوریزی، بر وزن خشک کل گیاه معنی‌دار نبود ولی اثر تنش کم‌آبی ($p < 0/01$) و اثر متقابل آن‌ها ($p < 0/05$) بر میزان این شاخص معنی‌دار بود. درحالی‌که اثر قارچ میکوریزی، تنش کم‌آبی و اثر متقابل آن‌ها بر RWC در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ۲).

تنش کم‌آبی موجب کاهش معنی‌دار وزن خشک کل گیاهان بدون تلقیح تنها در سطح ۵۰٪FC در مقایسه با تیمار شاهد گردید و تلقیح با قارچ AM موجب افزایش معنی‌دار وزن خشک کل گیاه تنها در دو سطح رطوبتی بدون تنش و ۵۰٪FC در مقایسه با گیاهان بدون تلقیح همان سطح گردید (شکل ۱A).

تنش کم‌آبی موجب کاهش معنی‌دار ۳۰ و ۴۳ درصدی RWC گیاهان غیرمیکوریزی بترتیب در دو سطح ۷۰٪FC و ۵۰٪FC گردید (شکل ۱B). تلقیح با قارچ AM منجر به افزایش RWC به میزان ۱۱/۸٪ و ۱۲/۱٪ در دو سطح تنشی متوسط و شدید در مقایسه با گیاهان غیرمیکوریزی همان سطح مربوطه گردید (شکل ۱B).

فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز: فعالیت این آنزیم بر اساس روش Giannopolitis و Ries (۲۳) اندازه‌گیری شد. در این روش، سه میلی‌لیتر مخلوط واکنش که حاوی بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با $pH=7/5$ ، متیونین ۱۳ میلی‌مولار، نیترو بلو تترازولیوم (NBT) ۷۵ میکرومولار، ریو فلاوین ۷۵ میکرومولار، EDTA ۰/۱ میلی‌مولار و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود مورد استفاده قرار گرفت که به مدت ۱۲ دقیقه در فاصله ۱۵ سانتی‌متری از روشنایی قرار داده شد، سپس جذب آن‌ها توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۶۰ نانومتر قرائت گردید. یک واحد آنزیمی برابر است با مقدار آنزیمی که احیای نوری NBT را به میزان ۵۰٪ بازدارندگی کند. فعالیت این آنزیم براساس واحد آنزیمی به ازای هر میلی‌گرم پروتئین ($Unit\ mg^{-1}\ protein$) محاسبه شد.

آنالیز آماری: در این تحقیق نرمال بودن توزیع داده‌ها با استفاده از آزمون لون (Levene's Test) و مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام گرفت. محاسبه میانگین‌ها و بررسی معنی‌دار بودن اختلافات در نرم افزار SPSS نسخه ۲۴ و رسم نمودارها با نرم افزار Excel نسخه ۲۰۱۶ انجام و گزارش شد.



شکل ۱- اثر متقابل قارچ و تنش کم‌آبی بر وزن خشک کل گیاه (A) (plant dry weight) و محتوای نسبی آب برگ (RWC) (B). S0، S1 و S2 به ترتیب عبارتند از سطوح تنش کم‌آبی ۱۰۰٪ (شاهد)، ۷۰٪ و ۵۰٪ ظرفیت زراعی. NM و AM به ترتیب عبارتند از گیاهان شاهد بدون تلقیح و تلقیح شده با قارچ *F. mosseae*. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد با استفاده از آزمون دانکن می‌باشد.

جدول ۲- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) اثر تلقیح قارچ میکوریزی بر برخی شاخص‌های رشدی و بیوشیمیایی گیاه شیرین بیان تحت تنش خشکی

| منابع تغییرات | درجه آزادی | وزن خشک کل گیاه | محتوای نسبی آب برگ | مالون دی‌آلدهید بخش هوایی | مالون دی‌آلدهید بخش زیرزمینی | پرولین بخش هوایی | پرولین بخش زیرزمینی | فنل بخش هوایی |
|----------------|------------|---------------------|--------------------|---------------------------|------------------------------|------------------|---------------------|---------------|
| Fungi (F) | ۱ | ۰/۰۰۳ ^{ns} | ۱۳۰/۱۰۷** | ۹/۲×۱۰ ^{-۵} ** | ۵/۵×۱۰ ^{-۵} ** | ۲۵/۴۵۵** | ۴۲۳/۸۹۲** | ۱/۳۹۰** |
| Stress (S) | ۲ | ۰/۰۰۷** | ۷۶۸/۶۳۰** | ۲/۵×۱۰ ^{-۴} ** | ۱/۳×۱۰ ^{-۵} ns | ۲۳/۲۲۱** | ۶۳/۷۰۲** | ۰/۱۵۱** |
| F×S | ۲ | ۰/۰۰۴* | ۱۱۵/۹۲۲** | ۵/۲×۱۰ ^{-۵} ** | ۳/۸×۱۰ ^{-۶} ns | ۰/۱۸۹ ns | ۱۲/۹۳۲* | ۳/۱۷** |
| اشتباه آزمایشی | ۱۲ | ۰/۰۰۱ | ۱۰/۲۲۳ | ۴/۵×۱۰ ^{-۵} | ۵/۳×۱۰ ^{-۶} | ۰/۰۷۹ | ۲/۳۹۹ | ۰/۰۰۳ |
| ضریب تغییرات | - | ۱۲/۴۴ | ۶/۵ | ۱۰/۵ | ۱۲/۱ | ۶/۰۲ | ۷/۴۹ | ۲/۰۶ |

ادامه جدول ۲

| منابع تغییرات | درجه آزادی | فنل بخش زیرزمینی | فلاونوئید بخش هوایی | فلاونوئید بخش زیرزمینی | کاروتنوئید | کاتالاز بخش هوایی | کاتالاز بخش زیرزمینی | پراکسیداز بخش هوایی |
|----------------|------------|------------------|---------------------|------------------------|------------|-------------------|----------------------|---------------------|
| Fungi (F) | ۱ | ۰/۶۰۷** | ۱/۰۴۰** | ۰/۰۵۲** | ۰/۰۰۱* | ۹۴/۵۴۵** | ۳۲۳۶/۳۶۹** | ۳۱۳/۳۱۳** |
| Stress (S) | ۲ | ۰/۱۶۷** | ۱۱/۴۹۹** | ۰/۰۸۰** | ۰/۰۱۰** | ۲۵۵۹/۲۸۱** | ۵۳۸۰/۹۴۷** | ۴/۶۸۴* |
| F×S | ۲ | ۰/۳۴۴** | ۱/۵۲۶** | ۰/۱۱۳** | ۰/۰۰۱** | ۲۲۴۲/۰۰۶** | ۶۱۰۸/۲۷۰** | ۷۳/۳۵۹** |
| اشتباه آزمایشی | ۱۲ | ۰/۰۰۳ | ۰/۰۰۰۳۲۷ | ۰/۰۰۰۳۷۹ | ۰/۰۰۰۱۴ | ۶/۵۵ | ۱۵۲/۵۵۶ | ۱/۱۲۰ |
| ضریب تغییرات | - | ۳/۵ | ۱/۵۷ | ۱۹/۸ | ۶/۷۸ | ۴/۶۸ | ۱۴/۶۰ | ۱۳/۲۷ |

ادامه جدول ۲

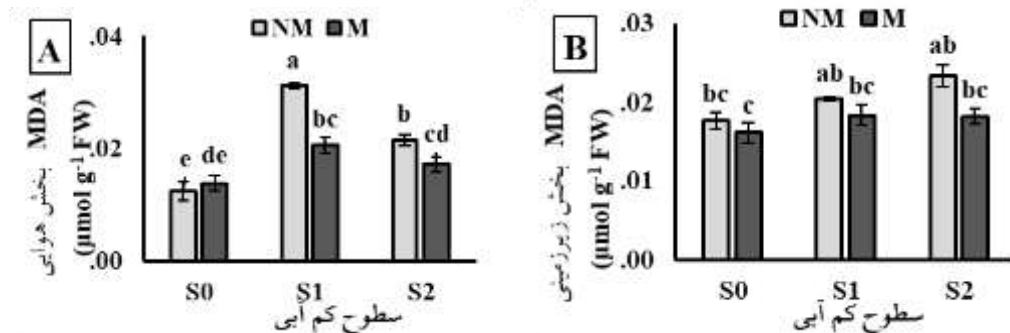
| منابع تغییرات | درجه آزادی | پراکسیداز بخش زیرزمینی | آسکوربات بخش هوایی | آسکوربات بخش زیرزمینی | پراکسیداز بخش هوایی | پلی فنل بخش هوایی | پلی فنل بخش زیرزمینی | سوپراکسید دیسموتاز بخش زیرزمینی |
|----------------|------------|------------------------|--------------------|-----------------------|---------------------|-------------------|----------------------|---------------------------------|
| Fungi (F) | ۱ | ۰/۵۸۷ ^{ns} | ۱۰/۱۱۶** | ۲۵/۹۴۸** | ۲۵/۶۴۲** | ۴/۲۲۴** | ۲۵/۶۴۲** | ۰/۰۲۲** |
| Stress (S) | ۲ | ۵۹۶/۲۸۱** | ۳۰/۴۴۵** | ۴/۷۱۷** | ۳/۵۲۱** | ۴۲/۰۰۰** | ۳/۵۲۱** | ۰/۷۶۴** |
| F×S | ۲ | ۵۸/۴۸۰** | ۰/۸۵۷* | ۲/۷۴۶** | ۳/۴۶۷** | ۰/۷۳۵** | ۳/۴۶۷** | ۰/۰۴۵** |
| اشتباه آزمایشی | ۱۲ | ۲/۵۱۴ | ۰/۱۶۱ | ۰/۰۲۸ | ۰/۰۷۰ | ۰/۰۶۷ | ۰/۰۷۰ | ۰/۰۰۲ |
| ضریب تغییرات | - | ۱۱/۷۸ | ۵/۷۶ | ۹/۷۴ | ۸/۹۱ | ۸/۸۶ | ۸/۹۱ | ۱۲/۱۶ |

ns, * و ** به ترتیب عبارتند از غیرمعنی دار و معنی دار در سطوح ۵ و ۱ درصد.

شاخص در سطح FC/۷۰ مشاهده گردید و تلقیح با قارچ AM موجب کاهش معنی‌دار MDA اندام هوایی در دو سطح تنشی در مقایسه با گیاهان غیرمیکوریزی مربوطه گردید (شکل ۲A). افزایش MDA بخش زیرزمینی در گیاهان غیرمیکوریزی طی تنش خشکی و کاهش محتوای آن با تلقیح قارچ معنی‌دار نبود (شکل ۲B).

مالون دی‌آلدهید: نتایج تجزیه واریانس نشان داد اثر قارچ میکوریزی، تنش کم‌آبی و اثر متقابل آن‌ها بر MDA بخش هوایی در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود درحالی‌که تنها اثر قارچ میکوریزی بر محتوای MDA بخش زیرزمینی در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ۲).

تنش کم‌آبی موجب افزایش معنی‌دار MDA بخش هوایی در گیاهان بدون تلقیح در دو سطح FC/۷۰ و FC/۵۰ در مقایسه با تیمار شاهد شد بطوری‌که بیشترین میزان این

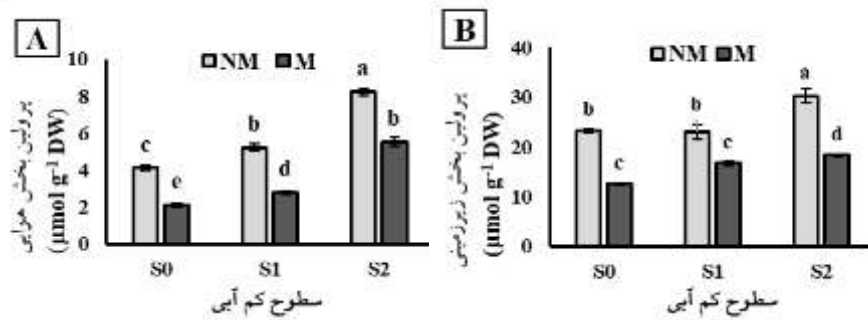


شکل ۲- اثر متقابل قارچ و تنش کم‌آبی بر میزان MDA (مالون‌دی‌آلدهید) بخش هوایی (A) و بخش زیرزمینی (B). S0، S1 و S2 به ترتیب عبارتند از سطوح تنش کم‌آبی ۱۰۰٪ (شاهد)، ۷۰٪ و ۵۰٪ ظرفیت زراعی. NM و AM به ترتیب عبارتند از گیاهان شاهد بدون تلقیح و تلقیح شده با قارچ *F. mosseae*. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد با استفاده از آزمون دانکن می‌باشد.

یافت درحالی‌که محتوای پرولین بخش زیرزمینی تنها در سطح تنشی FC/۵۰ در مقایسه با شاهد رطوبتی بطور معنی‌داری افزایش یافت و در سطح تنشی FC/۷۰ تغییر معنی‌داری را ایجاد نکرد (شکل ۳A, B). تلقیح با قارچ *F. mosseae* موجب کاهش معنی‌دار پرولین بخش هوایی و زیرزمینی در تمام سطوح رطوبتی در مقایسه با گیاهان غیرمیکوریزی مربوطه گردید (شکل ۳A, B).

آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی: نتایج تجزیه واریانس نشان داد اثر قارچ میکوریزی، تنش کم‌آبی و اثر متقابل آن‌ها بر محتوای فنل و فلاونوئید بخش هوایی و زیرزمینی، پرولین بخش زیرزمینی و کاروتنوئید در سطوح احتمال ۱ و ۵ درصد معنی‌دار بود درحالی‌که تنها اثر قارچ و همچنین خشکی بر پرولین بخش هوایی معنی‌دار بود ($p < 0.01$) (جدول ۲).

پرولین: میزان پرولین بخش هوایی در گیاهان غیرمیکوریزی طی تنش کم‌آبی بطور معنی‌داری افزایش



شکل ۳- اثر متقابل قارچ و تنش کم‌آبی بر میزان پرولین بخش هوایی (A) و بخش زیرزمینی (B). S0، S1 و S2 به ترتیب عبارتند از سطوح تنش کم‌آبی ۱۰۰٪ (شاهد)، ۷۰٪ و ۵۰٪ ظرفیت زراعی. NM و AM به ترتیب عبارتند از گیاهان شاهد بدون تلقیح و تلقیح شده با قارچ *F. mosseae*. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد با استفاده از آزمون دانکن می‌باشد.

فلاوونوئید در بخش هوایی گیاهان غیرمیکوریزی با تنش خشکی به‌طور معنی‌دار کاهش یافت (جدول ۳).

کاروتنوئید: تنش خشکی موجب کاهش معنی‌دار میزان کاروتنوئید گیاهان غیرمیکوریزی در دو سطح تنش در مقایسه با شاهد خشکی گردید و تلقیح با قارچ تغییر معنی‌داری را در سطوح تنشی در مقایسه با شاهد بدون تلقیح مربوطه ایجاد نکرد و تنها در سطح شاهد خشکی، میزان کاروتنوئید را به‌طور معنی‌دار کاهش داد (جدول ۳).

فنل و فلاوونوئید: میزان فنل بخش هوایی طی تنش خشکی به‌طور معنی‌داری افزایش یافت برعکس در بخش زیرزمینی، محتوای این شاخص در دو سطح تنشی بطور معنی‌داری کاهش نشان داد. تلقیح با قارچ AM موجب کاهش معنی‌دار فنل بخش هوایی و زیرزمینی در سطح ۵۰٪FC در مقایسه با گیاهان غیرمیکوریزی مربوطه گردید (جدول ۳) درحالی‌که افزایش معنی‌دار محتوای فلاوونوئید بخش هوایی و زیرزمینی در چنین سطح تنش با تلقیح قارچ مشاهده شد. همچنین برعکس فنل، محتوای

جدول ۳- اثر متقابل قارچ و تنش کم‌آبی بر میزان فنل، فلاوونوئید و کاروتنوئید گیاه شیرین بیان تحت تنش کم‌آبی

| کاروتنوئید (mg g ⁻¹ FW) | فلاوونوئید بخش زیرزمینی (mg g ⁻¹ DW) | فلاوونوئید بخش هوایی (mg g ⁻¹ DW) | فنل بخش زیرزمینی (mg g ⁻¹ DW) | فنل بخش هوایی (mg g ⁻¹ DW) | سطوح کم‌آبی | سطوح قارچ |
|------------------------------------|---|--|--|---------------------------------------|-------------|-----------|
| ۰/۲۴±۰/۱۳ ^a | ۰/۲۶±۰/۰۰۲ ^{bc} | ۳/۵۴±۰/۰۰۹ ^a | ۱/۸۵±۰/۰۲۷ ^a | ۱/۷۹±۰/۰۰۴ ^f | S0 | NM |
| ۰/۱۴±۰/۰۷۸ ^d | ۰/۶۵±۰/۰۲۴ ^a | ۰/۵۶±۰/۰۱۳ ^c | ۱/۷۳±۰/۰۲۷ ^b | ۲/۴۳±۰/۰۴۷ ^d | S1 | |
| ۰/۱۶±۰/۰۰۴ ^c | ۰/۱۸±۰/۰۰۵ ^d | ۰/۰۹±۰/۰۰۵ ^f | ۱/۶۹±۰/۰۳۶ ^b | ۲/۹۵±۰/۰۵۱ ^b | S2 | |
| ۰/۲۰±۰/۰۱۵ ^b | ۰/۲۶±۰/۰۰۲ ^{bc} | ۱/۹۶±۰/۰۰۷ ^b | ۰/۹۵±۰/۰۳۴ ^d | ۳/۹۱±۰/۰۰۲ ^a | S0 | AM |
| ۰/۱۵±۰/۰۱۴ ^{cd} | ۰/۲۳±۰/۰۱۱ ^c | ۰/۲۷±۰/۰۰۲ ^e | ۱/۷۴±۰/۰۴۶ ^b | ۲/۷۱±۰/۰۰۶ ^c | S1 | |
| ۰/۱۵±۰/۰۲۰ ^{cd} | ۰/۲۸±۰/۰۰۶ ^b | ۰/۵۰±۰/۰۱۸ ^d | ۱/۴۸±۰/۰۰۴ ^c | ۲/۲۱±۰/۰۰۴ ^e | S2 | |

حروف لاتین غیر مشابه در هر ستون بیانگر تفاوت معنی‌دار می‌باشد (آزمون دانکن، $p < 0.05$). S0، S1 و S2 به ترتیب عبارتند از سطوح تنش کم‌آبی ۱۰۰٪ (شاهد)، ۷۰٪ و ۵۰٪ ظرفیت زراعی. NM و AM به ترتیب عبارتند از گیاهان شاهد بدون تلقیح و تلقیح شده با قارچ *F. mosseae*.

تنش خشکی و اثر متقابل آن‌ها بر فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز، پلی‌فنل اکسیداز و سوپراکسید

آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی: نتایج تجزیه واریانس فعالیت‌های آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نشان داد اثر قارچ میکوریزی،

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز بخش هوایی و زیرزمینی در سطح تنش متوسط و سپس افزایش معنی‌دار فعالیت این آنزیم در سطح تنش شدید در مقایسه با سطح شاهد رطوبتی گردید (جدول ۴). تلقیح با *F. mosseae* موجب کاهش معنی‌دار فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز بخش هوایی و زیرزمینی در تمام سطوح رطوبتی گردید اما این کاهش در بخش زیرزمینی بیشتر از بخش هوایی بود (جدول ۴).

پلی فنل اکسیداز: تنش کم‌آبی در گیاهان بدون تلقیح باعث کاهش معنی‌دار فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز بخش هوایی و زیرزمینی در سطح $70\%/FC$ و افزایش معنی‌دار فعالیت این آنزیم تنها در بخش زیرزمینی در سطح $50\%/FC$ شد. تلقیح با قارچ AM موجب کاهش فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز بخش هوایی و زیرزمینی در تمام سطوح رطوبتی گردید که این کاهش تنها در بخش زیرزمینی در سطح $70\%/FC$ از نظر آماری معنی‌دار نبود (جدول ۴).

سوپراکسید دیسموتاز: تنش کم‌آبی در گیاهان بدون تلقیح باعث کاهش قابل توجه فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز بخش هوایی در سطوح $70\%/FC$ و $50\%/FC$ نسبت به شاهد بدون تنش شد، البته تغییرات فعالیت آنزیم بین دو سطح تنش معنی‌دار نبود، درحالی‌که در بخش زیرزمینی، افزایش معنی‌دار فعالیت این آنزیم در سطح $70\%/FC$ و سپس کاهش معنی‌دار آن در سطح $50\%/FC$ مشاهده شد (جدول ۴). تلقیح با قارچ AM موجب افزایش $2/3$ و 50% برابر فعالیت آنزیم بخش هوایی بترتیب در سطح شاهد و $70\%/FC$ در مقایسه با گیاهان بدون تلقیح همان سطح گردید درحالی‌که در بخش زیرزمینی، کاهش معنی‌دار فعالیت آنزیم با تلقیح قارچی تنها در سطح $70\%/FC-60\%$ مشاهده گردید (جدول ۴).

دیسموتاز بخش هوایی و زیرزمینی و پراکسیداز بخش هوایی در سطوح احتمال ۱ و ۵ درصد معنی‌دار بود درحالی‌که تنها اثر خشکی و اثر متقابل قارچ و خشکی بر فعالیت آنزیم پراکسیداز بخش زیرزمینی در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ۲).

آنزیم کاتالاز: تنش کم‌آبی در گیاهان بدون تلقیح بطور معنی‌داری ابتدا باعث کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز بخش هوایی و زیرزمینی در سطح $70\%/FC$ و سپس افزایش آن در سطح $50\%/FC$ در مقایسه با تیمار شاهد شد (جدول ۴). تلقیح با قارچ AM موجب افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم کاتالاز بخش هوایی در سطوح شاهد و تنش متوسط و کاهش معنی‌دار آن در سطح تنش شدید در مقایسه با گیاهان بدون تلقیح مربوطه گردید. برعکس بخش هوایی، کاهش معنی‌دار فعالیت آنزیم کاتالاز بخش زیرزمینی در سطح شاهد و افزایش معنی‌دار آن در سطح $50\%/FC$ مشاهده گردید و تغییر معنی‌داری تحت تأثیر قارچ میکوریزی در سطح تنش متوسط ایجاد نگردید (جدول ۴).

پراکسیداز: تغییرات فعالیت آنزیم پراکسیداز بخش زیرزمینی طی تنش خشکی مشابه با روند تغییرات آنزیم کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز بود درحالی‌که افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم پراکسیداز بخش هوایی گیاهان بدون تلقیح با قارچ در دو سطح تنش در مقایسه با شاهد مشاهده شد (جدول ۴). تلقیح با قارچ AM موجب کاهش معنی‌دار فعالیت آنزیم پراکسیداز بخش هوایی در تمام سطوح رطوبتی گردید بطوریکه این کاهش در سطح $70\%-60\%/FC$ قابل توجه و در مقایسه با گیاهان غیرمیکوریزی همان سطح، حدود ۹۵ درصد کمتر بود درحالی‌که در بخش زیرزمینی، افزایش فعالیت آنزیم در دو سطح تنش مشاهده گردید که تنها در سطح تنش شدید معنی‌دار بود (جدول ۴).

آسکوربات پراکسیداز: مشابه آنزیم کاتالاز، تنش کم‌آبی در گیاهان غیرمیکوریزی ابتدا موجب کاهش معنی‌دار

جدول ۴- اثر متقابل قارچ و تنش کم‌آبی بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان بخش هوایی و زیرزمینی گیاه شیرین بیان تحت تنش کم‌آبی

| سطوح قارچ | سطوح کم‌آبی | کاتالاز بخش هوایی (mmol H ₂ O ₂ min ⁻¹ mg ⁻¹ protein) | کاتالاز بخش زیرزمینی (mmol H ₂ O ₂ min ⁻¹ mg ⁻¹ protein) | پراکسیداز بخش هوایی (μM H ₂ O ₂ min ⁻¹ mg ⁻¹ protein) | پراکسیداز بخش زیرزمینی (μM H ₂ O ₂ min ⁻¹ mg ⁻¹ protein) | پراکسیداز بخش هوایی (mmol Ascorbate min ⁻¹ mg ⁻¹ protein) | پراکسیداز بخش زیرزمینی (mmol Ascorbate min ⁻¹ mg ⁻¹ protein) | پلی‌فنل اکسیداز بخش هوایی (ΔA min ⁻¹ mg ⁻¹ protein) | پلی‌فنل اکسیداز بخش زیرزمینی (ΔA min ⁻¹ mg ⁻¹ protein) | سوپراکسید دیسموتاز بخش هوایی (Unit mg ⁻¹ protein) | سوپراکسید دیسموتاز بخش زیرزمینی (Unit mg ⁻¹ protein) |
|-----------|-------------|--|---|--|---|--|---|--|---|---|--|
| S0 | | ۳۸/۵۶±۰/۲۸۱ ^c | ۵۰/۷۱±۱/۶۳۷ ^c | ۸/۳۷±۰/۸۷۸ ^f | ۱۲/۷۸±۰/۱۹۴ ^c | ۷/۲۸±۰/۲۸۰ ^c | ۶/۱۵±۰/۲۸۶ ^b | ۴/۸۶±۰/۲۳۱ ^a | ۲/۲۵±۰/۱۱۸ ^c | ۰/۲۹±۰/۰۰۷ ^c | ۰/۳۶±۰/۰۴۳ ^c |
| S1 | NM | ۲۹/۵۶±۱/۲۸۴ ^d | ۲۹/۴۲±۰/۲۸۹ ^e | ۱۶/۹۱±۰/۹۱۵ ^e | ۴/۹۶±۰/۵۹۵ ^d | ۵/۷۰±۰/۲۳۳ ^d | ۲/۶۳±۰/۱۳۸ ^c | ۲/۴۱±۰/۱۸۶ ^b | ۱/۱۹±۰/۰۹۸ ^d | ۰/۱۳±۰/۰۰۱ ^d | ۰/۸۵±۰/۰۲۰ ^a |
| S2 | | ۱۰۲/۸۶±۲/۸۲۸ ^a | ۱۴۳/۳۳±۱/۶۳۷ ^e | ۱۱/۱۵±۰/۳۲۹ ^e | ۲۱/۹۳±۱/۸۹۹ ^b | ۱۰/۱۵±۰/۰۲۷ ^a | ۲۱/۷۰±۲/۰۲۱ ^a | ۵/۲۰±۰/۱۰۲ ^a | ۶/۷۸±۰/۱۱۱ ^a | ۰/۰۰±۰/۰۰۱ ^d | ۰/۰۱±۰/۰۰۱ ^d |
| S0 | | ۵۰/۸۸±۰/۰۵۹ ^b | ۳۲/۱۱±۳/۰۹ ^d | ۵/۸۱±۰/۶۷۰ ^c | ۶/۲۴±۰/۴۲۴ ^d | ۴/۹۴±۰/۲۸۵ ^e | ۰/۱۲±۰/۰۰۱ ^e | ۱/۸۸±۰/۱۳۶ ^c | ۱/۲۴±۰/۱۲۸ ^d | ۰/۶۷±۰/۰۲۹ ^a | ۰/۴۲±۰/۰۳۱ ^c |
| S1 | AM | ۵۲/۳۱±۰/۱۵۳ ^b | ۱۸/۶۹±۲/۹۴۳ ^e | ۰/۷۹±۰/۱۰۱ ^f | ۶/۹۹±۰/۸۰۷ ^d | ۴/۸۲±۰/۱۳۳ ^e | ۰/۱۸±۰/۰۲۲ ^e | ۱/۷۵±۰/۱۳۶ ^c | ۰/۹۴±۰/۰۹۴ ^d | ۰/۴۸±۰/۰۱۸ ^b | ۰/۵۸±۰/۰۲۵ ^b |
| S2 | | ۵۴/۰۴±۱/۸۳۵ ^b | ۲۲۸/۵۲±۸/۴۲۲ ^a | ۴/۷۹±۰/۲۵۲ ^d | ۳۷/۵۴±۰/۴۴۴ ^a | ۸/۸۸±۰/۳۰۵ ^b | ۰/۶۱±۰/۰۷۹ ^d | ۱/۶۸±۰/۰۸۸ ^c | ۵/۱۳±۰/۲۷۰ ^b | ۰/۰۰±۰/۰۰۰۳ ^d | ۰/۰۰±۰/۰۰۰۱ ^d |

ns، * و ** به ترتیب عبارتند از غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطوح ۵ و ۱ درصد. حروف لاتین غیر مشابه در هر ستون بیانگر تفاوت معنی‌دار می‌باشد

(آزمون دانکن، $p < ۰/۰۵$). S0، S1 و S2 به ترتیب عبارتند از سطوح تنش کم‌آبی ۱۰۰٪ (شاهد)، ۷۰٪ و ۵۰٪ ظرفیت زراعی. AM و NM

به ترتیب عبارتند از گیاهان شاهد بدون تلقیح و تلقیح شده با قارچ *F. mosseae*

بحث و نتیجه‌گیری

آکوپورین در برگ‌های گیاه پرتقال سه برگی (*Poncirus trifoliata* L. Raf) تلقیح‌یافته با قارچ *F. mosseae* را گزارش کردند که نشان می‌دهد آکوپورین‌ها نه تنها دروازه های مهم کنترل‌کننده نفوذپذیری آب هستند بلکه برخی از آن‌ها بعنوان کانال‌های CO₂ در مزوفیل برگ‌ها عمل می‌کنند که با میزان نسبتاً بالای فتوسنتز مرتبط می‌باشند. همچنین هیف‌های خارجی قارچ‌های AM بطور مستقیم در جذب آب مشارکت دارند و منجر به بهبود وضعیت آبی گیاهان AM در مقایسه با گیاهان NM در شرایط تنش خشکی می‌گردند (۴).

اکسیداسیون لیپیدهای غشایی (MDA) نشانگر تولید کنترل نشده رادیکال‌های آزاد و تنش اکسیداتیو می‌باشد (۳۸). نتایج این تحقیق افزایش میزان MDA طی تنش خشکی و کاهش میزان آن را در نتیجه همزیستی با قارچ AM نشان داد که همسو با نتایج محققان دیگر در گیاهان مختلف می‌باشد (۶، ۱۰ و ۲۲). میزان کمتر MDA در گیاهان میکوریزی نشان می‌دهد قارچ‌های میکوریزی با فعال‌سازی

تنش خشکی یک مشکل جهانی است که رشد و عملکرد گیاهان را کاهش می‌دهد. در این تحقیق کاهش صفات رشدی مانند وزن خشک کل گیاه و RWC برگ طی تنش خشکی مشاهده شد که همسو با نتایج محققان دیگر است (۵ و ۲۲). کاهش توده زیستی تحت تنش خشکی می‌تواند به دلیل بسته شدن روزنه‌ها، افزایش آنزیم‌های تجزیه‌کننده، تخریب پروتئین و کلروفیل و نیز کاهش شاخص سطح برگ باشد که میزان فتوسنتز را کاهش می‌دهد (۱۲ و ۱۹). در این تحقیق بهبود صفات رشدی در نتیجه تلقیح گیاه شیرین‌بیان با قارچ *F. mosseae* به‌ویژه در سطح تنش شدید مشاهده گردید که موافق با نتایج گزارش شده در گیاهان کاسنی (*Cichorium intybus*) (۳۸) و کنجد (*Sesamum indicum* L.) (۲۲) بود. افزایش توده زیستی تحت تأثیر قارچ AM ممکن است در ارتباط با اثر میکوریز بر بهبود جذب P و مواد غذایی دیگر توسط گیاه (۵) باشد. همچنین Zhang و همکاران (۴۵)، بیان بیشتر ژن‌های

توسط Amiri و همکاران (۱۰) گزارش گردید. همچنین همزیستی با قارچ میکوریزی *Rhizophagus intraradices* محتوای فلاونوئید را در سطح شاهد و تنش شدید در گیاه چمن غاز (*Eleusine coracana*) افزایش داد در حالیکه موجب افزایش معنی‌دار محتوای فنل کل در سطح شاهد و تنش متوسط گردید (۴۲). در این تحقیق نیز قارچ *F. mosseae* با افزایش محتوای فلاونوئید تحت تنش شدید، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان شیرین بیان و در نتیجه مقابله با تنش خشکی را افزایش داد. برخی از مطالعات در شیشه نشان داده است که فلاونوئیدها می‌توانند مستقیماً انواع ROSها مانند سوپراکسید، پراکسید هیدروژن، رادیکال هیدروکسیل، اکسیژن یکتایی یا رادیکال پراکسید را روبشگری نمایند (۳۳) که پیشنهاد می‌کند فلاونوئیدها علاوه بر عملکرد آنها بعنوان فیلتر UV و تنظیم‌کننده نمو، ممکن است با سازوکارهای کلی حفاظتی سلول‌ها از آسیب اکسایشی نیز در ارتباط باشند (۱۶).

افزایش میزان کاروتنوئید در نتیجه تلقیح با قارچ AM توسط برخی از محققان گزارش شده است (۲۱ و ۳۹) اما در این تحقیق همزیستی با قارچ اثر معنی‌داری را بر میزان کاروتنوئید در سطوح تنشی نداشت. بنظر می‌رسد اثر قارچ‌های میکوریز بر محتوای متابولیت‌های ثانوی مانند کاروتنوئید به گونه گیاهی هم بستگی داشته باشد.

آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نقش مهمی را در ایجاد مقاومت گیاهان به تنش‌های محیطی از جمله خشکی ایفا می‌کنند (۲۵، ۳۸ و ۴۱). در این تحقیق نیز افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و پلی‌فنل اکسیداز بخش هوایی و زیرزمینی و پراکسیداز بخش هوایی در سطح تنش شدید و آنزیم سوپراکسید دیسموتاز بخش زیرزمینی در سطح تنش متوسط و پراکسیداز بخش هوایی در دو سطح تنش مشاهده گردید. همچنین موافق با نتایج این تحقیق، بیشترین فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و پلی‌فنل اکسیداز در سطح تنش شدید خشکی

سیستم آنتی‌اکسیدان در متابولیسم ROS درگیر می‌شوند (۳۹). همچنین Abbaspour و همکاران (۴) گزارش کردند که گیاهان میکوریزی، آسیب اکسیداتیو کمتری را تحت شرایط تنش خشکی نشان می‌دهند، بطوری که هیف‌های قارچی بعنوان سازوکار ممانعت‌کننده از خشکی با جذب مستقیم آب و انتقال آن به گیاه میزبان در نهایت منجر به کاهش تولید و انباشتگی ROS در گیاهان می‌شوند.

در این تحقیق، افزایش محتوای پرولین اندام هوایی و زیرزمینی طی تنش خشکی مشاهده شد. این اسمولیت علاوه بر تنظیم اسمزی، بعنوان ذخیره کربن و نیتروژن و فعال سازی پاسخ‌های دفاعی گیاه منجر به افزایش تحمل گیاهان به تنش می‌گردد (۱۳). نتایج این تحقیق کاهش میزان پرولین در گیاهان میکوریزی در مقایسه با گیاهان غیرمیکوریزی را نشان داد که موافق با نتایج محققان دیگر است (۲، ۴، ۷ و ۴۱). بنظر می‌رسد گیاهان میکوریزی با میزان پایین پرولین، کمتر تحت تأثیر تنش خشکی قرار می‌گیرند بنابراین میزان پرولین می‌تواند بعنوان نشانگر آسیب تنش خشکی در نظر گرفته شود. همچنین ممکن است قارچ‌های AM تحت شرایط خشکی بیوستن پرولین را کاهش و/یا تجزیه پرولین را افزایش دهند (۴۳).

افزایش یا کاهش محتوای ترکیبات فنلی تحت تنش‌های محیطی از جمله خشکی توسط محققان متعددی گزارش شده است (۴، ۱۰ و ۴۲). در این تحقیق نیز افزایش محتوای فنل بخش هوایی و کاهش محتوای فلاونوئید بخش هوایی و فنل بخش زیرزمینی با تنش خشکی مشاهده گردید اما در بخش زیرزمینی، محتوای فلاونوئید بسته به سطح تنش تغییراتی را نشان داد. بنابراین بنظر می‌رسد علاوه بر گونه گیاهی، سطح تنش و اندام گیاهی از فاکتورهای مهم تأثیرگذار در رابطه با محتوای ترکیبات فنلی باشند (۱۰).

همسو با نتایج این تحقیق، افزایش محتوای فنل با قارچ AM در سطح شاهد و تنش متوسط در تحقیق انجام شده

توسط Tyagi و همکاران (۴۱) در گیاه *E. coracana* و Gholinezhad و همکاران (۲۲) در گیاه *S. indicum* L. گزارش شده است. تمام آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در یک وضعیت متوالی شرکت می‌کنند بطوریکه سوپراکسید دیسموتاز بعنوان اولین خط دفاعی در برابر هر تنش محیطی از طریق دیسموتاسیون رادیکال سوپراکسید به پراکسید هیدروژن عمل می‌نماید. سپس پراکسید هیدروژن توسط دیگر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مانند کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و پراکسیداز تجزیه می‌شود (۱۷) و (۲۴) که همسو با نتایج این تحقیق است.

کاهش آسیب اکسایشی میانجی‌گری شده با ROSها طی تنش خشکی با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در نتیجه همزیستی با قارچ‌های AM در گونه‌های مختلف گیاهی گزارش شده است (۲۲، ۳۸ و ۴۱). در این پژوهش نیز تلقیح با قارچ AM موجب افزایش معنی‌دار فعالیت‌های آنزیم‌های کاتالاز (۵۹/۶ درصدی یا ۱/۶ برابری) و پراکسیداز (۲۵/۲ درصدی یا ۱/۲۵ برابری) بخش زیرزمینی در سطح تنش شدید و سوپراکسید دیسموتاز (۳۶۰۰ درصدی یا ۳۷ برابری) و کاتالاز (۷۷/۳ درصدی یا ۱/۸ برابری) بخش هوایی در سطح تنش متوسط گردید. همسو با نتایج این تحقیق، افزایش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز و همچنین افزایش بیان نسبی سوپراکسید دیسموتاز و پراکسیداز در گیاهان تلقیح یافته *P. trifoliata* در مقایسه با گیاهان بدون تلقیح تحت تنش خشکی توسط He و همکاران (۲۵) گزارش گردید. همسو با نتایج این تحقیق، Amiri و همکاران (۱۰)، اثر موثر تلقیح با قارچ بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان گیاه شمعدانی معطر (*Pelargonium graveolens* (L.) Herit) را در سطح تنش متوسط خشکی گزارش کردند. Abbaspour و همکاران (۴) عدم معنی‌داری فعالیت آنزیم کاتالاز را در گیاهان تلقیح‌یافته و بدون تلقیح پسته

(*Pistacia vera* L.) در سطح شاهد و تنش خشکی نشان دادند. به نظر می‌رسد فعالیت سیستم آنتی‌اکسیدان آنزیمی به گونه گیاهی و همچنین سطح تنش بستگی داشته باشد. با توجه به نتایج این تحقیق احتمال می‌رود تلقیح با قارچ AM بیشتر از طریق افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز موجب کاهش و تجزیه H_2O_2 در گیاهان تلقیح یافته می‌گردد تا آسکوربات پراکسیداز و پراکسیداز؛ درحالی‌که کاهش فعالیت آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز و پلی‌فنل اکسیداز گیاهان شیرین‌بیان در نتیجه تلقیح قارچی مشاهده گردید. برخی از محققان مطرح کردند کاربرد کودهای زیستی (قارچ‌های میکوریز و باکتری‌ها) از طریق تأمین متعادل عناصر غذایی (نیترژن و فسفر) و انرژی کافی برای رشد و بقای گیاه موجب کاهش شدت تنش و در نتیجه کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی می‌گردد (۱ و ۳). در این تحقیق، قارچ میکوریزی با تعادل بین آنزیم‌های آنتی-اکسیدان و توزیع آن‌ها در بافت‌ها و اندام‌های گیاهی توانست نقش مهمی را در کاهش آسیب اکسایشی و تحمل گیاه شیرین‌بیان به تنش خشکی داشته باشد.

در مجموع، نتایج این تحقیق نشان داد قارچ میکوریزی *F. mosseae* می‌تواند اثر مضر تنش خشکی شدید را کاهش داده و رشد گیاه را با کاهش محتوای MDA و نفوذپذیری غشا بهبود بخشد. علاوه بر این میکوریزا می‌تواند آسیب اکسیداتیو به گیاهان را بطور عمده با حفظ محتوای آب بالاتر و کاهش تجمع ROS در شرایط تنش خشکی شدید کاهش دهد که ممکن است با تجمع کمتر آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی در اندام هوایی مرتبط باشد.

سپاسگزاری

نویسندگان از دانشگاه زنجان و گروه زیست‌شناسی این دانشگاه به دلیل حمایت مالی و فراهم نمودن امکانات لازم در انجام این کار پژوهشی سپاسگزاری می‌کنند.

منابع

- ۱- پارسا، م.، کمائی، ر. و یوسفی، ب. ۱۴۰۱. تأثیر کودهای زیستی و شیمیایی بر ویژگی‌های فیزیولوژیکی و فعالیت چند آنزیم آنتی-اکسیدانتی گیاه نعنای فلفلی (*Mentha piperita*) در شرایط تنش کم‌آبی. مجله پژوهش‌های گیاهی (زیست‌شناسی ایران)، جلد ۳۵، شماره ۳، صفحه ۶۶۴-۶۷۷. <https://dorl.net/dor/20.1001.1.23832592.1401.35.3.13.1>
- ۲- پورفرید، آ.، پاکدین پاریزی، ع.، قربانی نصرآبادی، ر. و رحیمیان، ح. ۱۴۰۱. تأثیر همزیستی با قارچ میکوریز گلوموس موسه‌آ (*Glomus mosseae*) بر ویژگی‌های فیزیولوژیکی دو رقم گیاه Hortic. 197: 373-380. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.062>
- ۳- علیخانی، س. و محمودی زرنندی، م. ۱۳۹۸. اثر مایه‌زنی توأم قارچ اندومیکوریز و باکتریهای ریزوبیوم ملیلوتی و سودوموناس آئروژینوزا بر گیاه یونجه (*Medicago sativa*) در شرایط تنش آبی. مجله پژوهش‌های گیاهی (زیست‌شناسی ایران)، جلد ۳۲، شماره ۱، صفحه ۱۵۵-۱۶۶. <https://dorl.net/dor/20.1001.1.23832592.1398.32.1.7.0>
- 4- Abbaspour H, Saeidi-Sar S, Afshari H, Abdel-Wahhab MA (2012). Tolerance of mycorrhiza infected Pistachio (*Pistacia vera* L.) seedling to drought stress under glasshouse conditions. J. Plant Physiol. 169: 704-709. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2012.01.014>
- 5- Abdel-Salam E, Alatar A, El-Sheikh MA (2018). Inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi alleviates harmful effects of drought stress on damask rose. Saudi J. Biol. Sci. 25: 1772-1780. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.10.015>
- 6- Abdollahi Arpanahi A, Feizian M, Mehdi-pourian G, Namdar Khojas D (2020). Arbuscular mycorrhizal fungi inoculation improve essential oil and physiological parameters and nutritional values of *Thymus daenensis* Celak and *Thymus vulgaris* L. under normal and drought stress conditions. Eur. J. Soil Biol. 100: 103217. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2020.103217>
- 7- Aebi H (1984). Catalase *in vitro*. Methods Enzymol. 105: 121-6. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(84)05016-3)
- 8- Akhzari D (2015) Response of *Glycyrrhiza glabra* L. to arbuscular mycorrhizal fungi and water stress. J. Essent. Oil Bear. Pl. 18:4: 992-1002. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2014.890085>
- 9- Amani M, Sotudeh-Gharebagh R, Mostaufi N, Motahhari Kashani HA (2005). Optimal extraction of glycyrrhetic acid from licorice root. J. Technol. 3: 376-580.
- 10- Amiri R, Nikbakht A, Etemadi N (2015). Alleviation of drought stress on rose geranium [*Pelargonium graveolens* (L.) Herit.] in terms of antioxidant activity and secondary metabolites by mycorrhizal inoculation. Sci.
- 11- Asante F, Guodaar L, Saasi Arimiyaw S (2021). Climate change and variability awareness and livelihood adaptive strategies among smallholder farmers in semi-arid northern Ghana. Environ Dev. 39: 100629. <https://doi.org/10.1016/j.envdev.2021.100629>
- 12- Aien A (2013). Effect of eliminating of irrigation at different growth stages on seed yield and some agronomic traits of two sesame genotypes. Seed Plant. Prod. J. 29: 67-79. <https://doi.org/10.22092/sppj.2017.110500>
- 13- Bandurska H (2022). Drought stress responses: coping strategy and resistance. Plants (Basel) 11(7): 922. <https://doi.org/10.3390/plants11070922>
- 14- Bates LS, Waldern RP, Teare ID (1973). Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant Soil 39: 205-207. <https://doi.org/10.1007/BF00018060>
- 15- Chang C, Yang M, Wen H, Chern J (2002). Estimation of total flavonoid content in *Propolis* by two complementary colorimetric methods. J. Food Drug Anal. 10: 178-182. <https://doi.org/10.38212/2224-6614.2748>
- 16- Di Ferdinando M, Brunetti C, Fini A, Tattini M (2012). Flavonoids as antioxidants in plants under abiotic stresses. In: Ahmad P, Prasad M (eds) Abiotic Stress Responses in Plants. Springer, New York, pp 159-179.
- 17- Esfandiari E, Shakiba MR, Mahboob SA, Alyari H, Shahabivand S (2008). The effect of water stress on the antioxidant content, protective enzyme activities, proline content and lipid peroxidation in wheat seedling. Pak. J. Biol. Sci.

- 11: 1916–1922. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2008.1916.1922>
- 18- Fattahi M, Mohammadkhani A, Shiran B, Baninasab B, Ravash R, Gogorcena Y (2021). Beneficial effect of mycorrhiza on nutritional uptake and oxidative balance in Pistachio (*Pistacia* spp.) root stocks submitted to drought and salinity stress. *Sci. Hortic.* 281: 109937. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.109937>
- 19- Fayyaz F, Talebi R (2009). Determining the relationship between yield and some yield components of chickpea using pass analysis. *Iran. J. Field. Crops Res.* 7: 135–141.
- 20- Fusconi A, Berta G (2012). Environmental stress and role of arbuscular mycorrhizal symbiosis. In: Ahmad P, Prasad MNV (eds.) *Abiotic stress response in plants, metabolism, productivity and sustainability*. Springer, New York, pp 197-214.
- 21- Gai JP, Christie P, Feng G, Li XL (2006). Twenty years of research on community composition and species distribution of arbuscular mycorrhizal fungi in China: a review. *Mycorrhiza* 16: 229-239. <https://doi.org/10.1007/s00572-005-0023-8>
- 22- Gholinezhad E, Darvishzadeh R, Siavash Moghaddam S, Popović-Djordjević J (2020). Effect of mycorrhizal inoculation in reducing water stress in sesame (*Sesamum indicum* L.): The assessment of agrobiological traits and enzymatic antioxidant activity. *Agric. Water Manag.* 238: 106234. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2020.106234>
- 23- Giannopolitis CN, Ries SK (1997). Superoxide dismutase: II. Purification and qualitative relationship with water soluble protein in seedlings. *Plant Physiol.* 59: 315-318. <https://doi.org/10.1104/pp.59.2.315>
- 24- Gong M, Tang M, Chen H, Zhang Q, Feng X (2013). Effects of two *Glomus* species on the growth and physiological performance of *Sophora davidii* seedlings under water stress. *New For.* 44: 399-408. <https://doi.org/10.1007/s11056-012-9349-1>
- 25- He JD, Zou YN, Wu QS, Kuča K (2020). Mycorrhizas enhance drought tolerance of trifoliate orange by enhancing activities and gene expression of antioxidant enzymes. *Sci. Hortic.* 262: 108745. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108745>
- 26- Heath RL, Packer L (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 125: 189-198. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(68\)90654-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90654-1)
- 27- Hewitt EJ (1966). Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. Technical communication No. 22. Commonwealth Agricultural Bureau. Commonwealth Bureau of Horticulture and Plantation Crops. Maidstone, England.
- 28- Hosseini MS, Ebrahimi M, Abadía J, Kadkhodaei S, Amirian R (2022). Growth, phytochemical parameters and glycyrrhizin production in licorice (*Glycyrrhiza glabra* L.) grown in the field with saline water irrigation. *Ind. Crops Prod.* 177: 114444. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.114444>
- 29- Keshavarz Y, Alizadeh O, Sharfzadeh S, Zare M, Bazrafshan F (2020). The effect of biological fertilizer and salicylic acid on the physiological and biological characteristics of corn under drought stress. *Eurasia. J. Biosci.* 14: 1603-1612.
- 30- Kour D, Rana KL, Yadav AN, Yadav N, Kumar M, Kumar V, Vyas P, Dhaliwal HS, Saxena AK (2020). Microbial biofertilizers: Bioresources and eco-friendly technologies for agricultural and environmental sustainability. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 23:101487. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101487>
- 31- Lichtenthaler HK, Buschmann C (2001). Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. *Curr. Protoc. Food Anal. unit F4. 3.1-F4. 3.8. 1-8.* <https://doi.org/10.1002/0471142913.faf0403s01>
- 32- Michalak, A., 2006. Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Pol. J. Environ. Stud.* 15: 523–530.
- 33- Movahhed Haghighi T, Saharkhiz MJ (2022). Mycorrhizal colonization and silicon nutrition mitigates drought stress in Licorice (*Glycyrrhiza glabra* L.) with morphophysiological and biochemical perspectives. *Ind. Crops Prod.* 178: 114650. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.114650>
- 34- Nakano Y, Asada K (1987). Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts; its inactivation in ascorbate-depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical. *Plant Cell Physiol.* 28:131–40. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a077268>
- 35- Pourmorad F, Hosseinimehr S J, Shahabimaid N (2006). Antioxidant activity, phenol and

- flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. *Afr. J. Biotechnol.* 5: 1142-1145.
- 36- Rapparini F, Peñuelas J (2014). Mycorrhizal fungi to alleviate drought stress on plant growth. In: Miransari M (ed) Use of microbes for the alleviation of soil stresses, Volume 1, Springer, New York, pp: 21-42.
- 37- Raymond J, Rakariyatham N, Azanza JL (1993). Purification and some properties of polyphenoloxidase from sunflower seeds. *Phytochem.* 34: 927-931. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)90689-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)90689-7)
- 38- Safahani Langeroodi AL, Adewale Osipitan O, Radicetti E, Mancinelli R (2020). To what extent arbuscular mycorrhiza can protect chicory (*Cichorium intybus* L.) against drought stress. *Sci. Hortic.* 263: 109109. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.109109>
- 39- Sariri R, Sajedi R, Jafarian V (2006). Inhibition of horseradish peroxidase activity by thiol type inhibitors. *J. Mol. Liq.* 123:20-23. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2005.05.004>
- 40- Schalamuk S, Velazquez S, Chidichimo H, Cabello M (2006). Fungal spore diversity of arbuscular mycorrhizal fungi associated with spring wheat: effects of tillage. *Mycologia* 98(1): 16-22. <https://doi.org/10.3852/mycologia.98.1.16>
- 41- Tyagi J, Varma A, Pudake RN (2017). Evaluation of comparative effects of arbuscular mycorrhiza (*Rhizophagus intraradices*) and endophyte (*Piriformospora indica*) association with finger millet (*Eleusine coracana*) under drought stress. *Eur. J. Soil Biol.* 81: 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2017.05.007>
- 42- Weatherley P (1950). Studies in the water relations of the cotton plant. *New Phytol.* 49(1): 81-97. <http://www.jstor.org/stable/2428690>
- 43- Wu QS, Srivastava AK, Zou YN (2013). AMF-induced tolerance to drought stress in citrus: a review. *Sci Hortic* 164:77-87. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.09.010>
- 44- Wu QS, Zou YN (2017). Arbuscular mycorrhizal fungi and tolerance of drought stress in plants. In: Wu QS (ed) Arbuscular mycorrhizas and stress tolerance of plants, Springer, Singapore, pp. 25-41.
- 45- Zhang F, Zou YN, Wu OS, Kuča K (2020). Arbuscular mycorrhizas modulate root polyamine metabolism to enhance drought tolerance of trifoliate orange. *Environ. Exp. Bot.* 171: 103926. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2019.103926>

The effect of mycorrhizal symbiosis on the water content and antioxidant system of licorice (*Glycyrrhiza glabra* L.) under water deficit stress

Mohammadi S.¹, Vatankhah E.^{1*}, Amanifar S.² and Toghranegar Z.¹

¹ Dept. of Biology, Faculty of Sciences, University of Zanjan, I.R. of Iran

² Dept. of Soil Science, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, I.R. of Iran

Abstract

The symbiotic relationship between arbuscular mycorrhizal fungi and the roots of higher plants plays an important role in their tolerance to water stress. To investigate the effect of mycorrhizal symbiosis on water content and antioxidant system of licorice (*Glycyrrhiza glabra* L.) under water deficit stress, a factorial completely randomized experiment was conducted with two factors: (1) mycorrhizal inoculation with *Funneliformis mosseae* and without inoculation, and (2) soil moisture levels of 100% (control), 70%, and 50% of field capacity (FC). The results showed that water deficit stress decreased relative leaf water content and plant dry weight and mycorrhizal colonization improved these growth parameters. Biochemical analyses also showed that mycorrhizal symbiosis significantly decreased the contents of proline and malondialdehyde at two stress levels and phenol at FC50% level compared to non-mycorrhizal plants. The flavonoid content of mycorrhizal plants was higher than non-mycorrhizal ones at FC50% level. In addition, *F. mosseae* symbiosis significantly reduced the activities of ascorbate peroxidase and polyphenol oxidase in shoot and root, and peroxidase in shoot at all moisture levels in comparison with non-colonized plants. Whereas, mycorrhizal symbiosis led to a significant increase in the activities of catalase and peroxidase in root at 50% FC level, and activities of superoxide dismutase and catalase in the shoot at 70% FC level. In general, the results showed that the symbiosis of licorice with *F. mosseae* mitigated the detrimental effects of water deficit stress by improving plant water content and regulating the response of enzymatic and non-enzymatic antioxidant defense system.

Key words: antioxidant enzymes and metabolites, water deficit stress, Licorice, arbuscular mycorrhizal fungus, relative leaf water content