دو فصلنامه
نشریه علمی
زیست شناسی خاک

عنوان فهرست صفحه

غربالگری و شناسایی اولیه باکتری‌های تولیدکننده بیوسورفکتانت حاصل از پسماند زیتون و خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌های نفتی ۱
علی عبادی، سپیده السادات جمالی و مهران کامرانی

پاسخ‌های گیاه– قارچ میکوریز به تنش خشکی: واکاوی فرآیندهای زیستی و سازوکارهای دفاعی ۱۹
حبیب‌اله نادیان قمشه

مقایسه سمیت اکولوژیک نانوذرات اکسید مس و اکسید نیکل بر فعالیت‌های آنزیمی در دو خاک با بافت متفاوت ۶۱
شکوفه رضائی، علی خانمیرزایی و وحیده شریفی‌گلرو

توسعه و اعتبارسنجی یک روش نوین ارزیابی سریع و سه‌بعدی انحلال فسفات در باکتری‌های گرم‌مثبت اسپوردار ۸۱
شکیبا رئیسی، حسینعلی علیخانی، علیرضا فلاح نصرت‌آباد، بهمن خوشرو و احمدعلی پوربابائی

پیامد کاربرد روی، فسفر و کودهای زیستی در عملکرد و شاخص‌های رشد لوبیا چیتی ۱۰۵
اکبر همتی، احمد اصغرزاده و یعقوبعلی کرمی

اثر تلقیح باکتری برادی‌ریزوبیوم ژاپونیکوم بر تثبیت نیتروژن، عملکرد و اجزای عملکرد ارقام سویا (*Glycine max L.*) تحت تنش غرقابی ۱۲۹
سراله گالشی، میترا طلوع حافظیان ، عبدالرحمان داز و ابراهیم زینلی

انجمن علوم خاک ایران **مؤسسه تحقیقات خاک و آب**

نشریه علمی
زیست شناسی خاک

جلد ۱۴ شماره (۱)
۱۴۰۵

صاحب امتیاز: مؤسسه تحقیقات خاک و آب

تأییدیه درجه علمی

به استناد نامه شماره ۳/۱۸/۷۷۶۱۰ مورخ ۱۳۹۴/۴/۲۳ اعتبار علمی نشریه زیست شناسی خاک تمدید شده است.

مدیر مسؤول: **دکتر کامبیز بازرگان** **دانشیار مؤسسه تحقیقات خاک و آب**

سردبیر: **دکتر علیرضا فلاح نصرت آباد** **استاد مؤسسه تحقیقات خاک و آب**

اعضاء هیأت تحریریه (به ترتیب حروف الفبا):

دکتر هادی اسدی‌رحمانی	**استاد مؤسسه تحقیقات خاک و آب**
دکتر حسین بشارتی	**استاد مؤسسه تحقیقات خاک و آب**
دکتر عبدالحسین ضیائیان	**دانشیار مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی فارس**
دکتر حسینعلی علیخانی	**استاد دانشگاه تهران**
دکتر ناصرعلی اصغرزاد	**استاد دانشگاه تبریز**
دکتر علیرضا فلاح نصرت آباد	**استاد مؤسسه تحقیقات خاک وآب**
دکتر احمد گلچین	**استاد دانشگاه زنجان**
دکتر امیر لکزیان	**استاد دانشگاه فردوسی مشهد**
دکتر حبیب اله نادیان قمشه	**استاد دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین اهواز**
دکتر فرشید نوربخش	**استاد دانشگاه صنعتی اصفهان**

ویراستار انگلیسی: **دکتر بهمن خوشرو**

ویراستار فنی: **مهندس کیانا خامه چی**

تعداد انتشار در سال: **دو شماره**

پایگاه الکترونیکی نشریه علمی زیست‌شناسی خاک: **www.sbj.areeo.ir**

پایگاه الکترونیکی انجمن علوم خاک ایران: **www.soiliran.org**

پایگاه الکترونیکی موسسه تحقیقات خاک و آب: **www.swri.ir**

آدرس الکترونیکی دفتر مجله: **jsb.soilbiology@yahoo.com**

این نشریه در پایگاه‌های علمی زیر نمایه می‌شود:

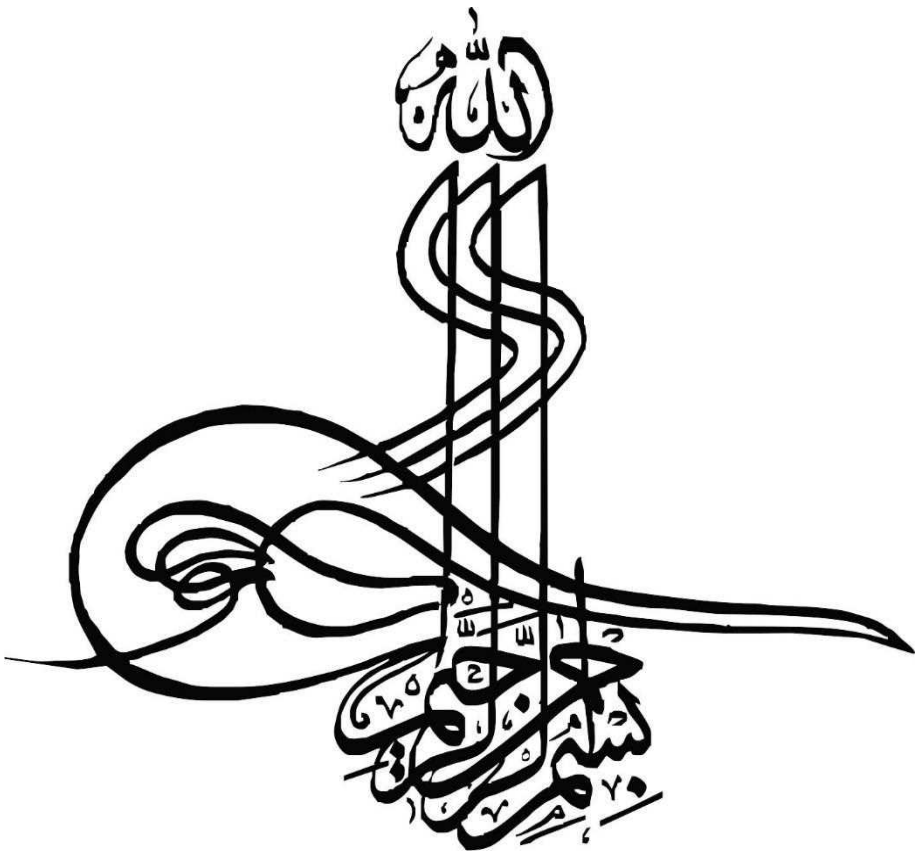
پایگاه استنادی علوم جهان اسلام (**ISC**): **www.isc.gov.ir**

پایگاه اطلاعات علمی جهاد دانشگاهی: **www.sid.ir**

پایگاه سیویلیکا: **www.civilica**

آدرس: کرج - میدان استاندارد، جاده مشکین دشت، بعداز رزکان نو، بلوار امام خمینی – موسسه تحقیقات خاک و آب، کد پستی: ۳۱۷۷۹۹۳۵۴۵

تلفن و نمابر: ۳۶۲۰۸۷۹۶ (۰۲۶) ***آدرس پایگاه الکترونیکی مجله: www.journals.areeo.ir***


الله
بسم الله الرحمن الرحيم

عنوان **فهرست** **صفحه**

غربالگری و شناسایی اولیه باکتری‌های تولیدکننده بیوسورفکتانت حاصل از پسماند زیتون و خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌های نفتی..... ۱

علی عبادی، سپیده السادات جمالی و مهران کامرانی

پاسخ‌های گیاه– قارچ میکوریز به تنش خشکی: واکاوی فرآیندهای زیستی و سازوکارهای دفاعی..... ۱۸

حبیب‌اله نادیان قمشه

مقایسه سمیت اکولوژیک نانوذرات اکسید مس و اکسید نیکل بر فعالیت‌های آنزیمی در دو خاک با بافت متفاوت..... ۶۱

شکوفه رضائی، علی خانمیرزایی و وحیده شریفی‌گلرو

توسعه و اعتبارسنجی یک روش نوین ارزیابی سریع و سه‌بعدی انحلال فسفات در باکتری‌های گرم‌مثبت اسپوردار..... ۸۱

شکیبا رئیسی، حسینعلی علیخانی، علیرضا فلاح نصرت‌آباد، بهمن خوشرو و احمدعلی پورباباائی

پیامد کاربرد روی، فسفر و کودهای زیستی در عملکرد و شاخص‌های رشد لوبیا چیتی..... ۱۰۵

اکبر همتی، احمد اصغرزاده و یعقوبعلی کرمی

اثر تلقیح باکتری برادی‌ریزوبیوم ژاپونیکوم بر تثبیت نیتروژن، عملکرد و اجزای عملکرد ارقام سویا (*Glycine max L.*) تحت تنش غرقابی..... ۱۲۹

سراله گالشی، میترا طلوع حافظیان ، عبدالرحمان داز و ابراهیم زینلی

راهنمای جامع نویسندگان نشریه زیست شناسی خاک

نسخه ۳ – بازبینی تیر ماه ۱۴۰۴ (Version 3.0 - Revised July 2025)

نشریه زیست شناسی خاک، ضمن قدردانی از انتخاب این نشریه برای انتشار دستاوردهای علمی شما، این راهنمای جامع را به منظور همسوسازی با بالاترین استانداردهای نشر بین‌المللی ارائه می‌نماید. هدف ما، انتشار پژوهش‌های اصیل، نوآورانه و تأثیرگذار است که به پیشبرد دانش جهانی در حوزه علوم خاک کمک کند. از شما نویسنده محترم تقاضا داریم پیش از ارسال مقاله، این شیوه‌نامه را به دقت مطالعه فرموده و مقاله خود را بر اساس آن تنظیم نمایید.

فهرست مطالب

مقدمه

۱- انواع مقالات قابل پذیرش (Acceptable Article Types)

۱-۱- مقاله پژوهشی (Original Research Article)

۱-۲- مقاله مروری (Review Article)

۱-۳- مقاله کوتاه (Short Communication)

۱-۴- گزارش علمی (Scientific Report)

۱-۵- یادداشت فنی (Technical Note)

۲- راهنمای کامل تهیه مقاله پژوهشی (Detailed Guidelines for Original Research Articles)

۲-۱- شیوه‌نامه کلی نگارش و صفحه‌آرایی (General Formatting and Layout)

۲-۲- نوع و اندازه فونت‌ها (Font Type and Size)

۲-۳- ساختار کامل مقاله پژوهشی (Full Structure of a Research Article)

۳- ملاحظات اخلاقی و شفافیت در پژوهش (Ethical Considerations and Research Transparency)

۳-۱- اصالت اثر و سرقت علمی (Originality and Plagiarism)

۳-۲- تعارض منافع (Conflict of Interest)

۳-۳- معیارهای نویسندگی (Authorship Criteria)

۳-۴- بیانیه مشارکت نویسندگان (Author Contributions Statement)

۳-۵- بیانیه دسترسی به داده‌ها (Data Availability Statement)

۴- شیوه‌نامه ارجاع‌دهی و تنظیم منابع (Citation and Reference Style Guide)

۴-۱- سیاست‌های کلی (General Policies)

۴-۲- ارجاع‌دهی در متن (In-Text Citation)

۴-۳- فرمت فهرست منابع نهایی (Formatting the Final Reference List)

۴-۳-۱- مقاله مجله علمی (Journal Article)

۴-۳-۲- کتاب (Book)

۴-۳-۳- فصل از کتاب (Book Chapter)

۴-۳-۴- منبع فارسی ترجمه شده (Translated Persian Source)

۴-۳-۵- مقالات کنفرانس (Conference Proceedings)

۴-۳-۶- پایان‌نامه و رساله (Thesis and Dissertation)

۴-۳-۷- منبع آنلاین (Online Source)

۵-پیوست

۱- انواع مقالات قابل پذیرش (Acceptable Article Types)

نشریه زیست شناسی خاک پذیرای انواع مقالات علمی زیر است. این بخش به منظور راهنمایی نویسندگان برای انتخاب بهترین قالب جهت ارائه پژوهش خود تدوین شده است. لطفاً پیش از تهیه مقاله، بخش مربوط به نوع مقاله مورد نظر خود را به دقت مطالعه فرمایید.

۱-۱- مقاله پژوهشی (Original Research Article)

این نوع مقاله، اساس انتشارات علمی نشریه را تشکیل می‌دهد. مقاله پژوهشی باید گزارشی جامع و دقیق از یک **تحقیق اصیل و منتشر نشده** باشد که بر اساس **جمع‌آوری و تحلیل داده‌های دست اول** شکل گرفته است. هدف اصلی آن، ارائه یافته‌های جدید و یک **مشارکت علمی معنادار** در یکی از حوزه‌های تخصصی زیست‌شناسی خاک است. مقاله باید دارای فرضیه یا سؤالات تحقیقی مشخص و روش‌شناسی کاملاً شفاف و قابل تکرار باشد.

- **(جزئیات کامل ساختار، فرمت و الزامات این نوع مقاله در بخش ۲ به تفصیل ارائه شده است).**

۱-۲- مقاله مروری (Review Article)

این نوع مقاله باید یک **تحلیل انتقادی، عمیق و جامع** از وضعیت فعلی دانش در یک زمینه تخصصی و به‌روز در حوزه زیست شناسی خاک باشد. مقاله مروری صرفاً خلاصه‌ای از پژوهش‌های پیشین نیست، بلکه باید با **ترکیب، تلفیق و ارزیابی منتقدانه** منابع، به شناسایی الگوها، تناقضات، شکاف‌های پژوهشی و ارائه دیدگاه‌های نوین بپردازد. نویسندگان و ساختار این نوع مقاله به شرح زیر است:

- **نویسندگان:** این مقالات معمولاً توسط محققان برجسته و صاحب‌نظر که دارای سوابق پژوهشی قابل توجهی در آن حوزه هستند، تهیه می‌شوند. با این حال، نشریه از مقالات مروری با کیفیت بالا که توسط سایر محققان تهیه شده باشد نیز استقبال می‌کند.
- **ساختار:**
  - **عنوان، مشخصات نویسندگان، چکیده‌ها و واژه‌های کلیدی:** مطابق با فرمت مقاله پژوهشی.
  - **توجه:** در چکیده مبسوط مقالات مروری، به جای بخش Materials and Methods، بخش Review Methods (روش جستجو) قرار می‌گیرد (در این بخش به طور بسیار خلاصه به روش شناسی مقاله اشاره می شود. این بخش با "مواد و روش‌ها" در مقالات پژوهشی متفاوت است. در اینجا به مواردی مانند پایگاه‌های اطلاعاتی که در آن‌ها جستجو انجام شده (مثلاً PubMed, Scopus, Web of Science)، کلمات کلیدی مورد استفاده و معیارهای انتخاب یا رد مقالات اشاره می‌شود).
  - **مقدمه:** تعریف دقیق دامنه و محدوده موضوع، بیان اهمیت آن و طرح سؤالات کلیدی که مقاله به آن‌ها پاسخ خواهد داد.
  - **بدنه اصلی:** تقسیم‌بندی موضوع به بخش‌های منطقی (Thematic Sections) و تحلیل عمیق هر بخش.
  - **بحث و چشم‌انداز آینده (Discussion and Future Outlook):** این بخش حیاتی باید شامل تحلیل وضعیت فعلی، شناسایی چالش‌ها و ارائه پیشنهادهای مشخص برای مسیرهای تحقیقاتی آینده باشد.

- **نتیجه‌گیری:** ارائه یک پیام نهایی قدرتمند که حاصل تحلیل جامع انجام شده است.

- **حداکثر حجم:** ۴۵ صفحه.

۱-۳- مقاله کوتاه (Short Communication)

این نوع مقاله برای **انتشار سریع** یافته‌های علمی بسیار مهم، نوآورانه و با پیامدهای قابل توجه در نظر گرفته شده است. این یافته می‌تواند یک کشف پیشگامانه، معرفی یک روش جدید با نتایج اولیه اما بسیار تأثیرگذار، یا مشاهده پدیده‌ای باشد که تئوری‌های موجود را به چالش می‌کشد.

- **ساختار:** ساختار این مقالات فشرده و یکپارچه است. نویسنده باید در متنی روان و بدون تقسیم‌بندی‌های مرسوم، به ترتیب به بیان زمینه و اهمیت یافته، شرح بسیار مختصر روش کار، ارائه یافته کلیدی (حداکثر با ۱ یا ۲ جدول/شکل) و بحثی کوتاه پیرامون اهمیت آن بپردازد. تعداد منابع نیز باید محدود باشد.
- **نکته کلیدی:** این قالب برای مطالعات ناتمام یا نتایج اولیه کم‌اهمیت مناسب نیست. توجیه لزوم **"انتشار سریع"** به دلیل اهمیت بالای یافته، اساس پذیرش این نوع مقاله است.

۱-۴- گزارش علمی (Scientific Report)

تمرکز این نوع مقاله بر ارائه **داده‌های ارزشمند، گسترده و با کیفیت بالا** است که پتانسیل استفاده مجدد توسط سایر محققان را دارند، حتی اگر مقاله مبتنی بر یک فرضیه مشخص نباشد.

- **مثال‌ها:** نتایج یک پیمایش گسترده تنوع زیستی خاک، داده‌های حاصل از پایش بلندمدت یک شاخص اکولوژیک، اعتبارسنجی یک مدل در یک منطقه جدید، یا ارائه یک پایگاه داده جدید و مهم.
- **ساختار:**
  - بخش **"مواد و روش‌ها"** در این نوع مقاله اهمیت حیاتی دارد و باید پروتکل کامل جمع‌آوری داده، کنترل کیفیت و ساختار دیتاست را با جزئیات کامل شرح دهد.
  - بخش "بحث" باید یک **بحث فنی (Technical Discussion)** باشد و بر کیفیت، محدودیت‌ها و پتانسیل استفاده از داده‌ها تمرکز کند. در این بخش باید از تفسیرهای علمی گسترده پرهیز شود.
- **ارزش اصلی:** اعتبار این مقاله در خودِ **داده‌ها** و **شفافیت کامل روش‌شناسی** آن نهفته است.

۱-۵- یادداشت فنی (Technical Note)

این نوع مقاله به معرفی یک **روش، تکنیک، نرم‌افزار یا ابزار آزمایشگاهی جدید یا بهبودیافته** اختصاص دارد که کاربرد مستقیمی در تحقیقات زیست‌شناسی خاک دارد.

- **الزامات اصلی:**
  - مقاله باید به وضوح نشان دهد که روش جدید چه **بهبودی** نسبت به روش‌های موجود ایجاد می‌کند (مثلاً افزایش دقت، کاهش هزینه، سرعت بالاتر).

- مقاله **باید شامل داده‌های اعتبار سنجی** باشد که کارایی و برتری روش جدید را در مقایسه با یک روش استاندارد اثبات کند.

- **ساختار:**
  - **مقدمه:** بیان واضح مشکل یا محدودیت در روش‌های موجود.
  - **شرح فنی:** توصیف دقیق، کامل و گام‌به‌گام روش یا ابزار جدید به گونه‌ای که کاملاً قابل پیاده‌سازی توسط دیگران باشد.
  - **نتایج اعتبارسنجی:** ارائه داده‌هایی که مزیت روش جدید را اثبات می‌کند.
  - **بحث:** خلاصه‌ای از مزایا، محدودیت‌ها و حوزه‌های کاربردی تکنیک جدید.

۲- راهنمای کامل تهیه مقاله پژوهشی (Detailed Guidelines for Original Research Articles)

۲-۱- شیوه‌نامه کلی نگارش و صفحه‌آرایی (General Formatting and Layout)

- **نرم‌افزار:** مقاله باید در نرم‌افزار Microsoft Word (نسخه ۲۰۰۷ یا بالاتر) تهیه شود.
- **اندازه صفحه:** A4
- **حاشیه:** ۳ سانتی‌متر از هر چهار طرف.
- **فاصله خطوط:** ۱,۵
- **ستون‌بندی:** تک ستونی.
- **شماره‌گذاری سطور:** از ابتدای مقاله تا انتها به صورت پیوسته (Continuous).
- **حداکثر حجم:** ۱۸ صفحه (شامل تمام بخش‌ها، جداول و اشکال).

۲-۲- نوع و اندازه فونت‌ها (Font Type and Size)

بخش مقاله	نوع قلم فارسی	اندازه	نوع قلم انگلیسی	اندازه
عنوان مقاله	B Nazanin (پررنگ/Bold)	۱۴	Times New Roman (Bold)	۱۳
نام نویسندگان	B Nazanin	۱۲	Times New Roman	۱۱
وابستگی سازمانی	B Nazanin	۱۰	Times New Roman	۹
چکیده فارسی	B Nazanin	۱۲	-	-
واژه‌های کلیدی فارسی	B Nazanin	۱۲	-	-
عناوین اصلی (مانند مقدمه)	B Nazanin (پررنگ/Bold)	۱۲	Times New Roman (Bold)	۱۱
متن اصلی مقاله	B Nazanin	۱۲	Times New Roman	۱۱
عنوان جدول و شکل	B Nazanin (پررنگ/Bold)	۱۱	Times New Roman (Bold)	۱۰
محتوای داخل جدول/شکل	B Nazanin	۱۰	Times New Roman	۹
منابع	-	-	Times New Roman	۱۰
چکیده انگلیسی مبسوط	-	-	Times New Roman	۱۱

۲-۳- ساختار کامل مقاله پژوهشی (Full Structure of a Research Article)

۱- **عنوان (Title):** باید کوتاه، جامع و منعکس‌کننده محتوای اصلی مقاله (حداکثر ۲۰ کلمه) باشد.

۲- **مشخصات نویسندگان (Authors):** این بخش باید در فایلی جداگانه با عنوان "Title Page" ارسال شود. به منظور حفظ اصل داوری دوسو کور (Double-Blind Peer Review)، هیچ‌گونه اطلاعاتی از مشخصات نویسندگان نباید در فایل اصلی مقاله ذکر گردد.

۳- **چکیده فارسی (Persian Abstract):** به صورت ساختارمند و غیرمبسوط در یک پاراگراف (۲۵۰ الی ۳۰۰ کلمه) شامل بیان مسئله، هدف، روش کار، نتایج و نتیجه‌گیری نهایی باشد.

۴- **واژه‌های کلیدی فارسی (Keywords):** شامل ۳ الی ۶ واژه که در عنوان مقاله به کار نرفته و بر اساس حروف الفبا مرتب شده باشند.

۵- **مقدمه (Introduction):** شامل بیان اهمیت موضوع، مرور انتقادی پژوهش‌های پیشین، برجسته سازی شکاف دانشی (Knowledge Gap) و ارائه شفاف اهداف و فرضیه‌های تحقیق.

۶- **مواد و روش‌ها (Materials and Methods):** شرح دقیق و کامل مراحل تحقیق به گونه‌ای که برای سایر محققان قابل تکرار باشد. تمامی واحدها باید در سیستم استاندارد بین‌المللی (SI) ذکر شوند.

۷- **نتایج (Results):** ارائه عینی یافته‌ها با استفاده از متن، جداول و اشکال استاندارد.

- **اعداد:** اعداد در متن فارسی به صورت فارسی (۱۲۳) و در جداول و نمودارها به صورت انگلیسی (123) تایپ شوند.
- **جداول:** عنوان در بالای جدول قرار گیرد. جداول بدون خطوط عمودی و تنها با سه خط افقی اصلی ترسیم شوند.
- **اشکال:** عنوان در پایین شکل قرار گیرد. اشکال باید با کیفیت بالا (حداقل ۳۰۰ DPI برای تصاویر و ۶۰۰ DPI برای نمودارهای خطی) در فرمت‌های استاندارد (TIFF, JPEG, یا EPS) باشند. فایل اصلی نمودارها (مثلاً Excel) نیز باید ارسال گردد.

۸- **بحث (Discussion):** تحلیل و تفسیر عمیق نتایج، مقایسه با پژوهش‌های بین‌المللی، بیان محدودیت‌ها و توضیح اهمیت یافته‌ها.

۹- **نتیجه‌گیری (Conclusion):** جمع‌بندی روشن و متمرکز بر یافته‌های کلیدی.

۱۰- **سپاسگزاری (Acknowledgments):** قدردانی از حمایت‌های مالی و فنی (حداکثر ۵۰ کلمه).

۱۱- **منابع (References):** فهرست منابع باید بر اساس **بخش ۴ (شیوه‌نامه ارجاع‌دهی)** این راهنما تنظیم شود.

۱۲- **چکیده انگلیسی مبسوط (Extended English Abstract):** در انتهای مقاله و پس از منابع، با حجمی بین ۷۵۰ الی ۱۰۰۰ کلمه و شامل بخش‌های مجزای Background and Objectives, Materials and Methods, Results و Conclusion. **توجه: برای مقالات مروری، ساختار این بخش متفاوت بوده و در توضیحات مربوط به مقاله مروری در بخش ۱-۲ ذکر شده است.**

۳- ملاحظات اخلاقی و شفافیت در پژوهش (Ethical Considerations and Research Transparency)

نشریه زیست شناسی خاک متعهد به رعایت بالاترین استانداردهای اخلاق در نشر (COPE) است.

- **۳-۱- اصالت اثر و سرقت علمی (Originality and Plagiarism):** مقاله ارسالی نباید پیش از این منتشر شده یا همزمان برای نشریه دیگری ارسال شده باشد. تمام مقالات توسط سامانه‌های مشابه‌یاب بررسی می‌شوند و هرگونه سرقت علمی منجر به رد فوری مقاله خواهد شد.
- **۳-۲- تعارض منافع (Conflict of Interest):** تمام نویسندگان موظف هستند هرگونه ارتباط مالی، شخصی یا حرفه‌ای که می‌تواند بر روی پژوهش تأثیرگذار باشد را به صورت یک بیانیه شفاف در انتهای مقاله (پیش از بخش منابع) ذکر کنند.
- **۳-۳- معیارهای نویسندگی (Authorship Criteria):** تمام افرادی که به عنوان نویسنده معرفی می‌شوند باید در پژوهش مشارکت قابل توجهی داشته باشند (طراحی، اجرا، تحلیل داده‌ها، نگارش یا بازبینی انتقادی مقاله).
- **۳-۴- بیانیه مشارکت نویسندگان (Author Contributions Statement):** برای افزایش شفافیت، اکیداً توصیه می‌شود که نقش دقیق هر یک از نویسندگان در بخشی مجزا پس از نتیجه‌گیری مشخص گردد.

مثال: علیرضا فلاح: مفهوم‌پردازی، روش شناسی، نگارش-پیش‌نویس اصلی. **بهمن خوشرو:** نظارت، اعتبارسنجی، نگارش-بازبینی و ویرایش.

- **۳-۵- بیانیه دسترسی به داده‌ها (Data Availability Statement):** نویسندگان تشویق می شوند تا داده‌های خام تحقیق را در یکی از مخازن معتبر داده بارگذاری کرده و نحوه دسترسی به آن را در مقاله‌ی خود اعلام نمایند.

۴- شیوه‌نامه ارجاع‌دهی و تنظیم منابع (Citation and Reference Style Guide)

۴-۱- سیاست‌های کلی (General Policies)

- **زبان:** فهرست منابع نهایی باید صرفاً به زبان انگلیسی باشد.
- **ترجمه:** منابع فارسی باید به انگلیسی برگردانده شده و در انتهای آن عبارت (In Persian) ذکر شود.
- **ترتیب:** الفبایی بر اساس نام خانوادگی نویسنده اول.
- **DOI:** ذکر شناسه DOI برای تمام منابعی که دارای این شناسه هستند، الزامی است.

۴-۲- ارجاع‌دهی در متن (In-Text Citation)

- **فرمت:** (نویسنده, سال). مثال: (Fallah, 2025); (Fallah and Khoshru, 2025); (Fallah et al., 2025).

۴-۳- فرمت فهرست منابع نهایی (Formatting the Final Reference List)

۴-۳-۱- مقاله مجله علمی (Journal Article)

Author Last Name, A.A., Author Last Name, B.B. and Author Last Name, C.C., Year. Title of article. *Full Journal Name*, Volume(Issue), pp.Start-End. DOI: [doi link]

- **مثال:**

Adesemoye, A.O., Torbert, H.A. and Kloepper, J.W., 2009. Enhanced plant nutrient use efficiency with PGPR and AMF in an integrated nutrient management system. *Canadian Journal of Microbiology*, 55(8), pp.876-884. DOI: 10.1139/W09-041

۴-۳-۲- کتاب (Book)

Author Last Name, A.A., Year. *Title of Book*. Edition (if not the first). Publisher.

- **مثال:**

Marschner, P., 2012. *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants*. 3rd ed. Academic Press.

۴-۳-۳- فصل از کتاب (Book Chapter)

Author Last Name, A.A., Year. Title of chapter. In: Editor, A.A. (ed.) *Title of Book*. Publisher, pp.Start-End.

- **مثال:**

Olsen, S.R. and Sommers, L.E., 1982. Phosphorus. In: Page, A.L. (ed.) *Methods of Soil Analysis, Part 2*. 2nd ed. ASA and SSSA, pp.403-430.

۴-۳-۴- منبع فارسی ترجمه شده (Translated Persian Source)

Author Last Name, A.A., Year. Title of article in English. *Translated Journal Name*, Volume(Issue), pp.Start-End. (In Persian). DOI: [doi link]

- **مثال:**

Ahmadi, A. and Hosseini, H., 2025. The effect of biochar on microbial diversity of saline soils. *Journal of Soil Biology*, 12(2), pp.15-28. (In Persian). DOI: [doi link]

۴-۳-۵- مقالات کنفرانس (Conference Proceedings)

Author Last Name, A.A., Year. Title of paper. In: *Title of the conference proceedings*, Date of conference, Location. Publisher, pp.Start-End.

- **مثال:**

Hanbury, A., 2002. The taming of the hue, saturation and brightness colour Space. In: *7th Computer Vision Winter Workshop*, February 2002, Bad Aussee, Austria. pp.90-108.

۴-۳-۶- پایان‌نامه و رساله (Thesis and Dissertation)

Author Last Name, A.A., Year. *Title of thesis*. PhD/MSc Thesis. Name of University.

مثال:

Khosru, B., 2020. *Interactions between Nanoparticles and Plant Growth-Promoting Rhizobacteria in a Calcareous Soil*. PhD Thesis. University of Tehran.

۴-۳-۷- منبع آنلاین (Online Source)

Author/Organization, Year. *Title of Page*. [Online] Available at: URL [Accessed Day Month Year].

- **مثال:**

Soil Science Society of Iran, 2025. *Publication Ethics Guidelines*. [Online] Available at: https://sbj.areeo.ac.ir/ethics [Accessed 9 July 2025].

۵- پیوست

جدول محدودیت انواع مقالات

نوع مقاله	محدودیت تعداد کلمه	تعداد صفحات هدف	محدودیت جداول/اشکال
مقاله پژوهشی	حدود ۶،۰۰۰ تا ۷،۰۰۰	۱۵ تا ۲۰	ندارد (بسته به ضرورت)
مقاله مروری	حدود ۱۰،۰۰۰ تا ۱۵،۰۰۰	۳۰ تا ۴۵	ندارد (بسته به ضرورت)
مقاله کوتاه	حداکثر ۲،۸۰۰	۵ تا ۸	مجموعاً حداکثر ۴ عدد*
گزارش علمی	حداکثر ۱،۲۰۰	۳	ندارد (با هدف ارائه کامل داده)
یادداشت فنی	حداکثر ۲،۵۰۰	۴ تا ۶	مجموعاً حداکثر ۴ عدد*

* مجموع تعداد جداول و اشکال نباید از ۴ بیشتر شود.

فرم تعهد نامه

نشریه زیست شناسی خاک

اینجانب ..... نویسنده مسئول مقاله زیر با عنوان مقاله:

- **سال‌های اجراء آزمایش ذکر شود**

موارد زیر را به آگاهی می رسانم:

۱. کلیه تهیه کنندگان مقاله از ارسال آن به دفتر مجله شما آگاهند
۲. مقاله قبلاً در هیچ مجله داخلی و خارجی منتشر نشده است
۳. مقاله تا زمان پایان بررسی در آن مجله به مجله دیگری ارسال نخواهد شد.
۴. هیچگونه تغییری در تعداد نویسندگان یا ترتیب ذکر اسامی انجام نخواهد شد.

نام نام خانوادگی نویسنده اول: **امضاء نویسنده اول مقاله**

نام نام خانوادگی نویسنده دوم: **امضاء نویسنده دوم مقاله**

نام نام خانوادگی نویسنده سوم: **امضاء نویسنده سوم مقاله**

نام نام خانوادگی نویسنده چهارم: **امضاء نویسنده چهارم‌مقاله**

اسامی داوران	تعداد داوری
دکتر هادی اسدی رحمانی	۱
دکتر احمد اصغرزاده	۲
دکتر کبری ثقفی	۱
دکتر وحیداله جهاندیده مهجن‌آبادی	۳
دکتر هوشنگ خسروی	۱
دکتر بهمن خوشرو	۲
دکتر شایان شریعتی	۴
دکتر مهدیه شمشیری‌پور	۱
دکتر علی عبادی	۳
دکتر ناصر علی اصغرزاد	۳
دکتر حسینعلی علیخانی	۱

Publisher: Soil Science Society of Iran

Journal of Soil Biology

https://sbj.areeo.ac.ir/

Research Article

Preliminary Screening and Identification of Biosurfactant-Producing Bacteria Derived from Olive Waste and Petroleum Hydrocarbon–Contaminated Soils

Ali Ebadi[1*], Sepideh Al-Sadat Jamali[1], and Mehran Kamrani[1]

[1] Nuclear Agriculture Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute (NSTRI), Karaj, Iran.

Article Info

Received: 2026-01-05

Accepted: 2026-02-21

Keywords:
Biosurfactant,
Molecular identification,
Native strains,
Pseudomonas,
Screening of biosurfactant production.

Corresponding author's email:
aebadi@aeoi.org.ir

Doi:
10.22092/SBJ.2026.371894.292

Extended Abstract

Background and Objectives: The global shift toward sustainable agriculture has intensified interest in environmentally friendly alternatives to conventional chemical inputs. Biofertilizers, which exploit beneficial microorganisms and their secondary metabolites, play a critical role in improving nutrient availability, solubility, and uptake efficiency in plants. Among these metabolites, biosurfactants—surface-active compounds of microbial origin—have attracted increasing attention due to their high biodegradability, low toxicity, and production from renewable resources. These characteristics make biosurfactants promising substitutes for synthetic surfactants in both agricultural and environmental applications. In agricultural systems, biosurfactants contribute to soil quality improvement by enhancing the solubilization of hydrophobic compounds, increasing the bioavailability of micronutrients such as iron and phosphorus, and facilitating the mobilization of heavy metals. These properties are particularly relevant in contaminated or nutrient-deficient soils, where biosurfactants can support phytoremediation processes and improve plant growth under stress conditions. Anionic biosurfactants, especially rhamnolipids, are of particular interest because of their strong surface activity, metal-chelating capacity, and compatibility with soil–plant systems. Despite their considerable potential, the practical application of biosurfactants is constrained by the limited availability of efficient, high-yield microbial producers, particularly indigenous strains adapted to harsh or contaminated environments. Systematic screening and comparative evaluation of biosurfactant-producing bacteria are therefore essential to identify promising candidates for future development of biofertilizers and nano-biofertilizer formulations. The present study aimed to isolate, screen, and characterize indigenous bacterial strains from olive oil mill waste and petroleum-contaminated soils, with a specific focus on identifying efficient producers of anionic biosurfactants using a combination of qualitative, semi-quantitative, chromatographic, and molecular approaches.

Materials and Methods: Soil and waste samples were collected under sterile conditions from olive oil mill residues in Tarom region and from petroleum-contaminated soil at Pond No. 4 of the Shahid Tondguyan Oil Refinery, Tehran. Samples were transported to the laboratory under cooled conditions and subjected to an enrichment process in mineral salt medium supplemented with 3% (v/v) vegetable oil as the sole carbon source. Enrichment was conducted at 30 °C with shaking at 120 rpm over three successive cycles, totaling 21 days. Following enrichment, serial dilutions were prepared and plated on blood agar medium. Isolates exhibiting alpha or beta hemolysis were selected and purified on tryptic soy agar. A total of 30 bacterial isolates were retained for further analysis. Hemolytic activity was evaluated by measuring colony diameter and hemolytic zone, and the halo-to-colony ratio was calculated. To specifically screen for anionic biosurfactant production, isolates were tested on CTAB–methylene blue agar, and complex formation around colonies was recorded. Biosurfactant production was further assessed in liquid biosurfactant-forming broth, after which cell-free supernatants were obtained by centrifugation. Oil spreading and drop collapse assays were performed as indicators of surface tension reduction. Thin-layer

chromatography (TLC) was used for preliminary chemical characterization of biosurfactants. Extracted compounds were separated using chloroform–methanol–water solvent systems and visualized with phenol–sulfuric acid, ninhydrin, and iodine reagents to detect glycolipid, lipopeptide, and lipid components, respectively. Molecular identification of the four most promising isolates was carried out by amplification and sequencing of the 16S rRNA gene. Phylogenetic analysis was performed using the Maximum Likelihood method with the Tamura–Nei model, and statistical analyses were conducted using one-way ANOVA and Duncan's multiple range test at a 5% significance level.

Results: Analysis of variance revealed significant differences among the isolates for all evaluated traits at the 1% probability level. All 30 isolates exhibited hemolytic activity, with halo-to-colony ratios ranging from 1.28 to 2.90. Isolate 23 showed the highest hemolytic index, while isolate 21 displayed the lowest value. However, only approximately 23% of the isolates formed visible complexes on CTAB agar, indicating the production of anionic biosurfactants. The halo-to-colony ratio in this assay ranged from 1.42 to 2.23, with isolate 28 exhibiting the highest anionic biosurfactant activity. Oil spreading diameters varied widely, from 3.46 to 50.6 mm. Isolates 19 and 17 demonstrated significantly greater oil displacement compared to other isolates, reflecting superior surface tension–reducing capability. Drop collapse assay results showed droplet diameters ranging from 3.93 to 14.8 mm, with more than 73% of isolates outperforming the distilled water control. A significant positive correlation was observed between CTAB complex formation and both oil spreading and drop collapse assays, whereas hemolytic activity did not correlate significantly with other traits. TLC analysis revealed distinct biosurfactant profiles among the superior isolates. Isolates 17 and 23 reacted positively with all three detection reagents, suggesting the production of polymeric lipo-glyco-protein biosurfactants with strong emulsifying properties. Isolate 19 showed positive reactions with phenol–sulfuric acid and iodine, indicating glycolipid biosurfactants, likely rhamnolipids. Isolate 28 reacted with phenol–sulfuric acid and ninhydrin, suggesting mixed carbohydrate–peptide biosurfactants. Phylogenetic analysis identified isolate 17 as closely related to *Klebsiella sp.*, isolates 19 and 28 as members of the genus *Pseudomonas*, and isolate 23 related to *Microbacterium paraoxydans*.

Conclusion: This study demonstrated substantial diversity among indigenous bacterial isolates in terms of biosurfactant production, chemical composition, and functional performance. While hemolytic activity served as a useful preliminary screening tool, it was insufficient for identifying anionic biosurfactant producers without complementary assays. Indigenous Pseudomonas isolates exhibited the highest surface activity and glycolipid production potential, whereas Klebsiella and Microbacterium isolates primarily produced polymeric biosurfactants with strong emulsifying properties. The strong agreement between chromatographic profiles, functional assays, and phylogenetic identification highlights the importance of an integrated screening strategy. Overall, isolates 17, 19, 23, and 28 represent promising candidates for further optimization and development of biosurfactant-based biofertilizers and bioremediation agents. These findings provide a solid foundation for future studies focusing on production optimization, molecular characterization, and application of indigenous biosurfactants in sustainable agriculture and environmental management.

Cite this article:Ebadi, A., Jamali, S., Kamrani,M., 2026. Preliminary Screening and Identification of Biosurfactant-Producing Bacteria Derived from Olive Waste and Petroleum Hydrocarbon–Contaminated Soils. Research article, *Journal of Soil Biology, 14 (1)*,1-18 .



DOI: 10.22092/SBJ.2026.371894.292
Publisher: Soil Science Society of Iran

دو فصلنامه

نشریه زیست‌شناسی خاک

https://sbj.areeo.ac.ir/

مقاله پژوهشی

غربالگری و شناسایی اولیه باکتری‌های تولیدکننده بیوسورفکتانت حاصل از پسماند زیتون و خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌های نفتی

علی عبادی[1*]، سپیده السادات جمالی[1] و مهران کامرانی[1]

[1] پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای (NSTRI)، کرج، ایران.

دریافت: ۱۴۰۴/۱۰/۱۵ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۲/۰۲

چکیده

بیوسورفکتانت‌ها ترکیبات زیستی فعال سطحی با کاربردهای گسترده در کشاورزی و حفاظت محیط‌زیست هستند. شناسایی سویه‌های بومی تولیدکننده بیوسورفکتانت، گامی مهم در توسعه کاربردهای زیست‌فناورانه این ترکیبات در کشاورزی و محیط‌زیست است. هدف این پژوهش شناسایی و ارزیابی توان تولید بیوسورفکتانت در باکتری‌های جداشده از محیط‌های آلوده به ترکیبات هیدروکربنی بود. در این پژوهش، باکتری های بالقوه تولیدکننده بیوسورفکتانت به روش غنی‌سازی انتخابی از پسماند زیتون و خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌های نفتی جداسازی و خالص‌سازی شدند. پس از جداسازی و خالص‌سازی اولیه، مجموعه‌ای از آزمون‌های فیزیکوشیمیایی شامل همولیز خون، تشکیل کمپلکس در محیط آگار آبی حاوی CTAB، آزمون پخش نفت و پاشش قطره برای غربال‌گری توان کاهش کشش سطحی انجام شد. تمامی جدایه‌ها توان همولیز مثبت نشان دادند، اما تنها حدود ۲۳ درصد قادر به تشکیل کمپلکس آنیونی در محیط CTAB بودند. دامنه پخش نفت بین ۳/۴۶ تا ۵۰/۶ میلی‌متر متغیر بود و سویه‌های ۱۷ (PX944924) و ۱۹ (PX944925) بالاترین مقادیر را نشان دادند، درحالی‌که بالاترین توان پاشش قطره مربوط به سویه ۲۸ (PX944927) بود. تحلیل کروماتوگرافی لایه نازک ترکیب بیوسورفکتانت‌ها را در چهار سویه منتخب مشخص کرد؛ به‌طوری‌که سویه‌های ۱۷ و ۲۳ (PX944926) ترکیبات لیپوگلیکوپروتئینی، سویه ۱۹ گلیکولیپیدهای مشابه رامنولیپید و سویه ۲۸ ترکیبات مختلط قندی–پپتیدی تولید کردند. شناسایی فیلوژنتیکی نیز نشان داد این چهار سویه به جنس‌های *Klebsiella*، *Pseudomonas* و *Microbacterium* تعلق دارند. هم‌پوشانی نتایج ساختاری و عملکردی بیانگر پتانسیل بالای این جدایه‌ها برای کاربرد در زیست‌پالایی هیدروکربن‌ها و توسعه زیست‌کودهای مبتنی بر بیوسورفکتانت‌های بومی است.

واژه‌های کلیدی: بیوسورفکتانت، شناسایی مولکولی، سویه‌های بومی، سودوموناس، غربال‌گری تولید بیوسورفکتانت.

استناد: عبادی، ع.، جمالی، س.، کامران، م.، ۱۴۰۵. غربالگری و شناسایی اولیه باکتری‌های تولیدکننده بیوسورفکتانت حاصل از پسماند زیتون و خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌های نفتی. مقاله پژوهشی، *نشریه زیست‌شناسی خاک*، *۱۳(۲)*، ۱۸-۱.

مقدمه

توجه جهانی به توسعه پایدار در کشاورزی باعث شده است که استفاده از مواد سبز و دوستدار محیط‌زیست جایگزین ترکیبات شیمیایی پرخطر شود. کودهای زیستی با بهره‌گیری از زادمایه کارآمد و متابولیت‌های ثانویه آن‌ها، از جمله بیوسورفکتانت‌ها، با افزایش حلالیت، تحرک و فراهمی زیستی عناصر غذایی، نقش مؤثری در بهبود جذب عناصر معدنی توسط گیاه ایفا می‌کنند. بیوسورفکتانت‌ها ترکیبات فعال سطحی زیستی هستند که توسط میکروارگانیسم‌ها تولید می‌شوند و می‌توانند کشش سطحی و بین‌سطحی را کاهش دهند. این ترکیبات به دلیل زیست‌تخریب‌پذیری، سمیت پایین و سازگاری با محیط، کاربردهای گسترده‌ای در کشاورزی، محیط‌زیست و صنایع مختلف دارند. در این میان، توسعه کودهای مرکب زیستی- شیمیایی به‌عنوان سامانه‌های نوین تلفیقی، امکان هم‌افزایی میان نهاده‌های میکروبی، کودهای شیمیایی و فناوری نانو را فراهم ساخته و با افزایش کارایی مصرف عناصر غذایی و کاهش تلفات و آلودگی‌های زیست‌محیطی، مسیر گذار به کشاورزی پایدار را تقویت می‌کند (Lahiji & Rejali, 2025; Khoshru et al., 2025). در این میان، بیوسورفکتانت‌ها، ترکیبات فعال سطحی با منشأ میکروبی، به دلیل ویژگی‌هایی همچون زیست‌تجزیه‌پذیری بالا، سمیت اندک و قابلیت تولید از منابع تجدیدپذیر، به عنوان جایگزین‌های مناسب برای سورفکتانت‌های شیمیایی مطرح شده‌اند (Pacwa-Płociniczak et al., 2011; Garg et al., 2025). اهمیت این ترکیبات در کشاورزی زمانی دوچندان می‌شود که بهبود تغذیه گیاه، افزایش قابلیت دسترسی به عناصر غذایی و نیز کنترل عوامل بیماری‌زا مورد توجه قرار گیرد. یکی از اصلی‌ترین حوزه‌های کاربرد بیوسورفکتانت‌ها در بهبود کیفیت خاک است. این ترکیبات توانایی بالایی در افزایش حلالیت ترکیبات هیدروفوب مانند آلاینده‌های نفتی و همچنین در دسترس‌سازی فلزات سنگین دارند و بدین‌ترتیب نقش اساسی در فرآیندهای زیست پالایی ایفا می‌کنند (Singh et al., 2007; Pacwa-Płociniczak et al., 2011). علاوه بر این، توانایی آن‌ها در کلاته‌سازی و تشکیل میسل موجب افزایش دسترسی گیاه به عناصر کم‌مصرفی چون فسفات و آهن می‌شود که این امر مستقیماً بر افزایش رشد و کارایی فتوسنتز گیاهان اثرگذار است (Singh et al., 2018; Stacey et al., 2008). در این میان، بیوسورفکتانت‌های آنیونی، به‌ویژه رامنولیپیدها[1]، اهمیت ویژه‌ای دارند. پژوهش‌ها نشان داده‌اند که این ترکیبات در حلال‌سازی فلزات سمی مانند سرب، روی و آهن بسیار مؤثر هستند و حتی بازدهی بالای ۷۰ درصد در حذف این عناصر از محیط گزارش شده است (Garg et al., 2025).

بیوسورفکتانت‌ها علاوه بر اثرات مستقیم بر محیط خاک و گیاه، در تعاملات گیاه-ریزویسفر نیز نقش کلیدی دارند. آن‌ها با تقویت توانایی ریزوباکتری‌ها در تشکیل بیوفیلم، حرکت و پیامک‌های بین سلولی، شرایط را برای کلونیزاسیون موفق ریشه فراهم می‌کنند (Nihorimbere et al., 2012). این امر در نهایت منجر به افزایش دسترسی گیاه به مواد مغذی و نیز افزایش تحمل به تنش‌های محیطی می‌شود. از سوی دیگر، اثرات زیست کنترلی بیوسورفکتانت‌ها به‌ویژه در مهار قارچ‌ها و باکتری‌های بیماری‌زا اثبات شده است. به عنوان مثال، لیپوپپتیدها توانسته‌اند رشد قارچ‌های عامل آنتراکوز را مهار کنند و سورفاکتین[2] نیز با القای تولید آنزیم‌های دفاعی در ذرت، مقاومت گیاه

[1] Rhamnolipids
[2] Surfactin

در برابر بیماری‌ها را افزایش داده است (Borah et al., 2016; Ali et al., 2022). ترکیب این ویژگی‌ها موجب شده است که بیوسورفکتانت‌ها در کشاورزی نه تنها به‌عنوان عوامل اصلاح‌کننده خاک بلکه به‌عنوان ابزارهای بالقوه برای ارتقای سلامت گیاه و افزایش عملکرد محصول مورد توجه قرار گیرند. به‌ویژه بیوسورفکتانت‌های آنیونی به دلیل بار منفی سطحی، سازگاری بالایی با سیستم‌های خاک و گیاه دارند و در کاربردهایی نظیر افزایش جذب مواد مغذی، بهبود ریزوسفر و کنترل عوامل بیماری‌زا پتانسیل چشمگیری از خود نشان داده‌اند. با وجود این مزایا، چالش‌های مهمی نیز وجود دارد. یکی از اصلی‌ترین موانع، شناسایی و جداسازی سویه‌های بومی میکروبی است که توانایی تولید بیوسورفکتانت‌ها را با بازدهی بالا داشته باشند. ارزیابی و مقایسه نظام‌مند این ویژگی در میان گروه‌های مختلف باکتریایی، گامی کلیدی در شناسایی و انتخاب سویه‌های برتر با بیشترین کارایی زیستی و پتانسیل کاربردی در توسعه کودهای زیستی نسل جدید محسوب می‌شود (Khosravi et al., 2025). علاوه بر این، شرایط محیطی، ترکیب خاک و نوع آلودگی می‌توانند بر میزان و نوع بیوسورفکتانت تولیدی تأثیر بگذارند؛ بنابراین، غربالگری دقیق و انتخاب سویه‌های امیدبخش در این حوزه اهمیت اساسی دارد. بر همین اساس، هدف مطالعه حاضر تمرکز بر غربالگری سویه‌های باکتریایی جداشده از منابعی مانند پسماند زیتون و خاک‌های آلوده به نفت است. این منابع به دلیل غنای زیستی و حضور میکروارگانیسم‌های سازگار با شرایط سخت، می‌توانند بستری مناسب برای یافتن تولیدکنندگان کارآمد بیوسورفکتانت‌های آنیونی باشند. پسماند زیتون به‌عنوان یک منبع غنی از ترکیبات آلی، فنولیک و لیپیدی، بستر مناسبی برای رشد و انتخاب میکروارگانیسم‌های سازگار با ترکیبات هیدروفوب و تولیدکننده بیوسورفکتانت محسوب می‌شود. در این مطالعه، جداسازی باکتری‌ها از پسماند زیتون در کنار خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌های نفتی انجام شد تا نقش منشأ اکولوژیک متفاوت در تنوع و عملکرد بیوسورفکتانت‌های تولیدی مورد بررسی قرار گیرد. در این پژوهش، از مجموعه‌ای از آزمون‌های غربالگری شامل همولیز خون، آزمون انتشار نفت، آزمون پاشش قطره، آگار CTAB و کروماتوگرافی لایه نازک[3] استفاده شد تا سویه‌های با پتانسیل بالا برای کاربردهای کشاورزی و زیست‌محیطی شناسایی شوند. این رویکرد می‌تواند گامی مهم در جهت استفاده عملی از بیوسورفکتانت‌ها در کشاورزی پایدار باشد، چرا که شناسایی و توسعه سویه‌های کارآمد امکان جایگزینی پایدارتر و ایمن‌تر برای سورفکتانت‌های شیمیایی را فراهم می‌سازد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و جداسازی

در این پژوهش جهت دستیابی به جدایه‌های مولد بیوسورفکتانت نمونه‌برداری در شرایط استاندارد از دو منبع پسماند صنایع روغن‌کشی منطقه طارم و خاک آلوده پوند شماره چهار پالایشگاه نفت شهید تندگویان تهران انجام شد و نمونه‌ها در جعبه‌های حاوی یخ به آزمایشگاه انتقال یافت. جهت غنی‌سازی[4] و افزایش جمعیت هدف ۱۰ گرم از هر نمونه در محیط کشت معدنی[5] حاوی روغن دانه آفتابگردان (۳ درصدحجمی) به عنوان منبع کربن اضافه و در دمای ۳۰°C با سرعت ۱۲۰ دور بر دقیقه به مدت ۷ روز گرماگذاری شدند. غنی‌سازی با استفاده از ۱۰ میلی‌لیتر

[3] Thin Layer Chromatography
[4] Enrichment
[5] Mineral Salt Medium

سوسپانسیون حاصل تا دو مرتبه دیگر تکرار و در مجموع در ۲۱ روز انجام شد. پس از آن سری رقت دهی از نمونه نهایی تهیه و بر روی محیط کشت آگار خونی[6] انتقال و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰°C گرماگذاری شد (Ebadi et al., 2018). در ادامه جدایه‌هایی با توانایی همولیز گلبول‌های قرمز خون (همولیز بتا و آلفا) انتخاب و در محیط کشت عمومی تریپتیک سوی آگار[7] کشت شد. در نهایت ۳۰ جدایه پس از انجام دو مرتبه واکشت و خالص سازی جهت انجام آزمون‌های مختلف در دمای ۴ °C ذخیره‌سازی شدند. برای انجام هر آزمون سوسپانسیون میکروبی هر جدایه با کشت در محیط TSB و گرماگذاری در دمای ۳۰°C به مدت ۲۴ ساعت تهیه و به عنوان زادمایه استفاده گردید. در (جدول ۱) خلاصه‌ای از آزمون‌های مختلف انجام شده در این مطالعه برای ارزیابی میزان و نوع بیوسورفکتانت را نشان می‌دهد.

جدول ۱- روش‌ها و شاخص‌های مورد استفاده جهت شناسایی و ارزیابی تولید بیوسورفکتانت

Table 1. Methods and indicators used for the identification and evaluation of biosurfactant production

ردیف Row	آزمون Test	هدف Purpose	شاخص بررسی Evaluation Indicator	منبع Reference
1	همولیز خون Hemolysis of blood	بررسی غیرمستقیم توانایی تولید ترکیبات سطح‌فعال Indirect assessment of the ability to produce surfactant compounds	اندازه گیری قطر هاله و کلنی Measuring the diameter of the halo and colony	Zhang et al., 2012
2	آگار آبی Blue Agar	شناسایی کیفی تولید بیوسورفکتانت‌های آنیونی Identification of the qualitative production of anionic biosurfactants	قطر هاله Halo diameter	Siegmund & Wagner, 1991
3	پخش نفت Oil spreading	ارزیابی توانایی بیوسورفکتانت تولیدی در کاهش کشش سطحی Evaluation of the effectiveness of the produced biosurfactant in reducing surface tension	قطر ناحیه شفاف ایجادشده روی سطح آب A transparent area created on the water surface	Zhang et al., 2012
4	پاشش قطره Drops collapse	ارزیابی توانایی بیوسورفکتانت تولیدی در کاهش کشش سطحی Evaluation of the effectiveness of the produced biosurfactant in reducing surface tension	قطر پخش‌شدن قطره The drop's diameter	Sass et al., 2023
5	کروماتوگرافی لایه نازک Thin layer chromatography	شناسایی کیفی و نیمه‌کمی ترکیبات بیوسورفکتانتی و تعیین نوع کلی آن‌ها Identification of qualitative and semi-quantitative bio-surfactant compounds and determination of their general type	وجود/عدم وجود لکه و تعیین ضریب نگهداری (Rf) Presence/absence of a spot and determination of the retention factor (Rf) value	Zhang et al., 2012

آزمون همولیز خون

آزمون همولیز خون برای شناسایی و مقایسه اولیه سویه‌های تولید کننده بیوسورفکتانت انجام شد. برای انجام این آزمون از محیط کشت پایه آگار خونی به همراه خون دفیبرینه[8] گوسفندی (۵ درصد حجمی) استفاده شد. برای تهیه این محیط بعد از ساخت و استریل کردن محیط کشت آگار خونی، خون دفیبرینه گوسفندی در دمای ۵۰°C به آن اضافه شده و درون

[6] Blood agar
[7] Tryptic Soy Agar
[8] Defibrinated

ظروف پتری پخش گردید. در ادامه میزان ۳۰ میکرولیتر از زادمایه هر جدایه در محیط کشت مذکور به‌صورت نقطه‌گذاری تلقیح شده و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰°C گرماگذاری شدند (Zhang et al., 2012). به منظور مقایسه توان تولید بیوسورفکتانت قطر هاله و کلونی در جدایه‌های مختلف اندازه‌گیری و نسبت هاله به کلونی محاسبه شد.

آزمون آگار آبی

برای غربالگری تولید بیوسورفکتانت‌های آنیونی از محیط آگار آبی بر پایه روش سیگموند- واگنر استفاده شد (Siegmund & Wagner, 1991). محیط کشت شامل ترکیبات زیر (گرم در لیتر) بود: مانیتول (۱۰) به‌عنوان منبع کربن، KH_2PO_4 (۲)، Na_2HPO_4 (۳)، NH_4NO_3 (۱)، $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (۰/۲)، $CaCl_2$ (۰/۰۲)، آگار (۱۵ گرم)، CTAB (۰/۲) و متیلن‌بلو (۰/۰۰۵). ابتدا محیط پایه بدون CTAB و متیلن‌بلو تهیه و استریل شد و پس از کاهش دما به حدود ۵۰°C، محلول‌های استریل CTAB و متیلن‌بلو افزوده و سپس محیط در ظروف پتری ریخته شد. پس از جامد شدن، مقدار ۳۰ میکرولیتر از زادمایه جدایه‌ها به‌صورت نقطه‌گذاری تلقیح گردید و ظروف پتری به مدت ۹۶ ساعت در دمای ۳۰°C گرماگذاری شدند. تشکیل هاله آبی یا رسوبی در اطراف کلنی‌ها به‌عنوان شاخص تولید بیوسورفکتانت آنیونی ثبت شد و برای مقایسه عملکرد جدایه‌ها، قطر کلنی و هاله اندازه‌گیری و نسبت هاله به کلنی محاسبه گردید.

آزمون پخش نفت

برای اندازه‌گیری مقدار و نوع بیوسورفکتانت تولید شده توسط جدایه‌ها از محیط کشت مایع تولید بیوسورفکتانت[9] استفاده شد (Zhang et al., 2012). ترکیبات و مقادیر (گرم بر لیتر) موجود در این محیط عبارت بودند از: $NaNO_3$ ۲/۵، K_2HPO_4 ۴، KH_2PO_4 ۴، $CaCl_2$ ۰/۱، $MgSO_4$ ۰/۲، NaCl ۱۷/۵۵، KCl ۱، عصاره مخمر ۱ و روغن دانه آفتابگردان ۳ درصد (حجمی/حجمی) و pH=۷. بعد از ساخت و استریل کردن محیط BFB ۵۰ میلی‌لیتر از این محیط توسط ۲/۵ میلی‌لیتر مایه تلقیح تهیه شده برای هر جدایه در محیط TSB تلقیح شده و در دمای ۳۰ °C بر روی شیکر با سرعت (rpm) ۱۲۰ گرماگذاری شد. بعد از گذشت ۵ روز از زمان تلقیح، سوسپانسیون میکروبی با سرعت ۴۰۰۰g سانتریفیوژ شده و محلول صاف رویی برای اندازه‌گیری میزان پخش نفت، پاشش قطره و کروماتوگرافی لایه نازک جداسازی گردید. اندازه‌گیری میزان پخش نفت بر اساس روش ارائه شده توسط ژانگ و همکاران انجام گرفت (Zhang et al., 2012). در این روش ابتدا ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر درون ظروف پتری ۹۰ میلی‌متری ریخته و ۵۰ میکرولیتر نفت خام به سطح آن اضافه گردید تا لایه نازکی از نفت در سطح آب تشکیل شود. در ادامه مقدار ۵ میکرولیتر از محلول صاف رویی حاصل از محیط BFB که با استفاده از آب دیونیزه ۱۰ برابر رقیق شده بود در وسط لایه نفتی قرار داده شد و میزان عقب رانده شدن نفت در سطح آب برای جدایه‌های مختلف اندازه‌گیری گردید.

آزمون پاشش قطره

برای اجرای آزمایش، یک برگه معمولی چاپگر روی یک صفحه شیشه‌ای قرار داده شده و سطح آن با روغن معدنی سبک[10] پوشش داده می‌شود تا سطح روغنی یکنواخت ایجاد شود. سپس ۱۰ میکرولیتر از محلول صاف رویی حاصل از محیط BFB به همراه

[9] Biosurfactant Fermentation Broth

[10] Light Mineral Oil

۰/۰۱ درصد معرف رنگی (Orange G) روی سطح روغنی کاغذ ریخته شد. پس از خشک شدن قطره در دمای اتاق، قطر آن در دو جهت عمود بر هم (عرض و طول) اندازه‌گیری گردید (Sass et al., 2023).

آزمون کروماتوگرافی لایه نازک

آزمون TLC برای تعیین ساختار شیمیایی و دسته‌بندی کلی بیوسورفکتانت تولید شده توسط جدایه‌ها انجام پذیرفت. در این روش بیوسورفکتانت تولید شده توسط جدایه میکروبی با استفاده از حلال آلی کلروفرم: متانول با نسبت ۱:۲ (حجمی/حجمی) از مایه رویی سوسپانسیون میکروبی محیط کشت BFB عصاره‌گیری و بر روی صفحه TLC نقطه‌گذاری گردید. در این مرحله از مخلوط کلروفرم: متانول: آب با نسبت حجمی/ حجمی ۶۵: ۱۵: ۲ به عنوان حلال انتقال‌دهنده درون تانک استفاده شد. در ادامه بعد از خشک کردن صفحه TLC، محلول تثبیت کننده فنول- سولفوریک اسید (۳ گرم فنول در ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول اتانول: سولفوریک اسید با نسبت ۹۵: ۵)، محلول نین هیدرین (۰/۵ درصد) و بخار ید به ترتیب جهت تشخیص ترکیبات گلیکولیپیدی، لیپوپپتیدی و لیپیدی به صورت یکنواخت بر روی صفحه اسپری شده و نقاط رنگی به عنوان شاخص حضور گروه‌های عاملی مشاهده و ثبت گردید (Zhang et al., 2012).

شناسایی مولکولی جدایه‌ها

برای شناسایی مولکولی چهار جدایه برتر، از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) استفاده شد. استخراج DNA ژنومی با استفاده از کیت شرکت سیناژن و مطابق دستورالعمل سازنده انجام گرفت. ژن 16S rRNA با به‌کارگیری پرایمرهای اختصاصی الیگونوکلئوتیدی تکثیر شد. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل: ۱۰ نانوگرم DNA الگو، ۰/۴ میکرومولار از هر پرایمر، ۰/۲ میکرومولار dNTP ، ۲ میلی‌مولار $MgCl_2$ ، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR و یک واحد آنزیم Taq DNA Polymerase آماده گردید. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (Bio-Rad) با یک مرحله واسرشت اولیه در ۹۴ °C به مدت ۵ دقیقه آغاز شد و سپس ۳۵ چرخه شامل واسرشت در ۹۴°C به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در ۵۵ °C به مدت ۴۵ ثانیه (یا دمای اتصال مورد استفاده در مطالعه)، و طویل‌سازی در ۷۲ °C به مدت ۹۰ ثانیه انجام شد. در پایان، مرحله طویل‌سازی نهایی در ۷۲ °C به مدت ۵ دقیقه اجرا گردید. محصول PCR بر روی ژل آگارز یک درصد حاوی اتیدیوم بروماید الکتروفورز شد و باندها پس از یک ساعت ران در ولتاژ ۸۰ ولت مشاهده گردید. توالی‌یابی به روش سنگر انجام شد و توالی‌های خام پس از بازبینی و ویرایش اولیه با نرم‌افزار BioEdit تصحیح شدند. در ادامه، توالی نهایی‌شده برای تعیین جنس و گونه باکتری‌ها در پایگاه داده NCBI تحت فرآیند BLAST مورد مقایسه قرار گرفت. درخت فیلوژنیک با استفاده از روش بیشترین احتمال[11] و بر اساس مدل جانشینی نوکلئوتیدی Tamura-Nei ترسیم شد. انتخاب مدل تکاملی با استفاده از آزمون انتخاب بهترین مدل در نرم‌افزار MEGA انجام گرفت. به‌منظور یکنواختی، تمامی توالی‌ها به ناحیه مشترک (~۷۰۰ جفت‌باز) برش داده شدند. پایداری شاخه‌ها با آزمون ۱۰۰۰ بوت استرپ[12] ارزیابی شد.

آنالیز آماری

در این پژوهش، کلیه آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی و با سه تکرار زیستی مستقل انجام

[11] Maximum Likelihood
[12] Bootstrap

شد. داده‌های حاصل از آزمون‌های کمی پس از بررسی نرمال بودن، با استفاده از نرم‌افزار SPSS مورد تجزیه‌وتحلیل قرار گرفتند. برای مقایسه میانگین‌ها، از تحلیل واریانس یک‌طرفه استفاده شد و در صورت مشاهده اختلاف معنی‌دار، مقایسه میانگین‌ها با آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد ($P < 0.05$) انجام و داده‌ها به صورت میانگین گزارش شدند.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس نشان داد باکتری‌های مورد ارزیابی از نظر فعالیت همولیتیک، توانایی تشکیل کمپلکس، پخش نفت و پاشش قطره در سطح احتمال یک درصد دارای اختلاف معنی‌دار بودند (جدول ۲). نتایج ارزیابی فعالیت همولیتیک نشان داد تمامی ۳۰ جدایه مورد بررسی دارای این توانایی بالقوه تولید بیوسورفکتانت بودند که دامنه آن بین ۱/۲۸ تا ۲/۹۰ بود. با انجام آزمون مقایسه میانگین مشخص شد جدایه شماره ۲۳ با اختلاف معنی‌دار بیشترین نسبت هاله به کلونی (۲/۹) در محیط آگار- خونی را داشت. کمترین مقدار این صفت نیز در جدایه شماره ۲۱ به میزان ۱/۲۸ مشاهده شد (جدول ۳). این شاخص بیانگر شدت فعالیت همولیتیک بوده و به‌طور غیرمستقیم به توان فعالیت سورفکتانتی جدایه‌ها وابسته است. هرچند یک معیار غربالگری کیفی-نیمه‌کمی است و به‌تنهایی مبنای شناسایی قطعی نوع بیوسورفکتانت قرار نمی‌گیرد.

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس صفات اندازه‌گیری شده در جدایه‌های جداسازی شده از منابع مختلف

Table 2. Results of analysis of variance for measured traits in strains separated from different sources

منبع تغییرات SOV	درجه آزادی df	مجموع مربعات SS			
		فعالیت همولیتیک Hemolytic activity	تشکیل کمپلکس Complex formation	پخش نفت Oil dispersion	پاشش قطره Drop collapse
باکتری Bacteria	29	8.48**	9.75**	10653**	913**
خطا Error	60	0.84	0.30	770	5
کل Total	89	9.32	10.05	11423	918
ضریب تغییرات (٪) CV (%)		7.5	11.3	8.6	8.3

** و * معنی‌داری در سطح یک و پنج درصد، ns غیرمعنی‌داری.

** and * indicate significance at the 1% and 5% levels, and ns indicates non-significance.

آزمون همولیز خون به‌عنوان یک معیار غربالگری سریع برای کشف تولیدکنندگان بیوسورفکتانت به‌طور گسترده‌ای در مطالعات میکروبیولوژی کاربرد دارد؛ اگرچه باید به‌عنوان یک شاخص اولیه و نه قطعی تفسیر شود. مطالعات مروری و مقالات تجربی نشان داده‌اند که همولیز با تولید مولکول‌های آمفی‌فیلیک همراه است که قادرند ساختار غشایی اریتروسیت‌ها را تخریب کنند، اما حساسیت و ویژگی اختصاصی بودن این آزمون نسبت به انواع مختلف بیوسورفکتانت متغیر است و همواره نیاز به تأییدهای کمّی و شیمیایی وجود دارد (Youssef 2004; Ebadi, 2018). بر اساس گزارش‌های پیشین، در محیط‌های آلوده به هیدروکربن فشار انتخابی ناشی از ترکیبات آب‌گریز می‌تواند به‌طور کلی موجب غلبه باکتری‌هایی از جنس‌هایی مانند *Pseudomonas* و *Klebsiella* به‌عنوان تولیدکنندگان بالقوه

بیوسورفکتانت شود. گزارش‌های مروری جدید نشان می‌دهند که گونه‌ها و ساختارهای مولکولی (گلیکولیپیدها، لیپوپپتیدها، گلیکوپروتئین‌ها) خواص فیزیکوشیمیایی و زیستی متفاوتی دارند که رفتار همولیتیک و توانایی کاهش کشش سطحی را تعیین می‌کنند. (Markam, 2024; Dini, 2024) نتایج همولیتیک مشاهده شده در این مطالعه باید به‌عنوان شاخص اولیه تعبیر شوند: همولیز مثبت احتمال تولید ترکیبات فعال سطحی را نشان می‌دهد اما نمی‌تواند نوع مولکولی (مثلاً گلیکولیپید در برابر لیپوپروتئین) را با قطعیت مشخص کند. لذا توصیه می‌شود که همولیز به‌همراه مجموعه‌ای از آزمون‌های تکمیلی شامل اندازه‌گیری کشش سطحی، شاخص امولسیون‌سازی (E24)، واکنش فنول–سولفوریک برای شناسایی گروه‌های قندی و تعیین بار یونی (CTABیا سایر تست‌های انتخابی) به‌کار رود تا ماهیت و کارآیی بیوسورفاکتانت‌ها به‌درستی تعیین شوند (Ebadi, 2018). در نتیجه، آزمون همولیز یک ابزار کاربردی و اقتصادی برای غربالگری اولیه است ولی برای ادعاهای قطعی درباره پتانسیل بیوسورفاکتانت و کاربردهای زیست‌محیطی آن لازم است ارزیابی‌های کمّی و شیمیایی پی‌درپی انجام شود تا از تفسیرهای نادرست جلوگیری شود.

نتایج این پژوهش نشان داد که تمامی جدایه‌های باکتریایی مورد بررسی قادر به همولیز خون بودند که این ویژگی معمولاً به‌عنوان شاخصی از توان بالقوه در تولید ترکیبات فعال سطحی تلقی می‌شود. با این حال، ارزیابی اختصاصی‌تر در محیط آگار آبی حاوی CTAB و متیلن آبی نشان داد تنها حدود ۲۳ درصد از جدایه‌ها توانایی تشکیل کمپلکس آنیونی داشتند. دامنه نسبت هاله به کلونی در محیط آگار آبی بین ۱/۴۲ تا ۲/۲۳ بدست آمد. بیشترین میزان تشکیل کمپلکس آنیونی در جدایه شماره ۲۸ (۲/۲۳) و کمترین مقدار آن نیز در جدایه شماره ۵ (۱/۴۲) مشاهده شد (جدول ۳). این یافته نشان می‌دهد که اگرچه همولیز خون نشان‌دهنده فعالیت سطحی است، اما همه‌ی بیوسورفکتانت‌های تولیدی الزاماً دارای بار منفی و از نوع آنیونی (مانند گلیکولیپیدها یا رامنولیپیدها) نیستند (Dini et al., 2024). دامنه نسبت قطر هاله به کلونی بین ۱/۴۲ تا ۲/۲۳ متغیر بود، به‌طوری‌که بیشترین مقدار در جدایه شماره ۲۸ و کمترین در جدایه شماره ۵ مشاهده شد (جدول ۳). تفاوت مشاهده‌شده احتمالاً به اختلاف در نوع و غلظت ترکیبات ترشح‌شده، تفاوت در مسیرهای متابولیکی مرتبط با تولید بیوسورفکتانت و یا ساختار بار سطحی مولکول‌ها باز می‌گردد. در مطالعات مشابه، گونه‌های *Pseudomonas* معمولاً با تشکیل هاله آبی پررنگ در محیط CTAB شناسایی شده‌اند، در حالی که برخی سویه‌های *Klebsiella* و *Mycobacterium* ترکیبات خنثی یا کاتیونی تولید می‌کنند (Markam et al., 2024; Youssef et al., 2004). از آنجا که آزمون CTAB بر پایه برهم‌کنش بین مولکول‌های بیوسورفکتانت با بار منفی و کاتیون چهارتایی CTAB است، مشاهده کمپلکس رنگی تنها در بخشی از جدایه‌ها حاکی از وجود بیوسورفکتانت‌های آنیونی در میان جمعیت میکروبی است. این نتایج نشان می‌دهد که ترکیب دو شاخص همولیز و CTAB می‌تواند در کنار آزمون‌های کمی مانند کاهش کشش سطحی و شاخص امولسیون‌سازی، ابزار غربالگری مؤثری برای شناسایی سویه‌های دارای بیشترین پتانسیل زیست‌فناورانه در فرآیندهای پاکسازی زیستی ترکیبات هیدروکربنی باشد (Carrillo et al., 1996).

در (جدول ۳) میزان پخش نفت لایه نفتی به عنوان شاخصی از کاهش کشش سطحی در جدایه‌های مختلف را نشان می‌دهد. دامنه پخش نفت در جدایه‌های مختلف بین ۳/۴۶– ۵۰/۶ میلی‌متر بدست

آمد. جدایه‌های شماره ۱۹ و ۱۷ به ترتیب با میانگین ۵۰/۶ و ۴۴/۸ میلی‌متر به طور معنی‌داری نسبت به سایر جدایه‌ها بالاتر بودند. کمترین میزان پخش نفت نیز در جدایه شماره ۱ با میانگین ۳/۴۶ مشاهده شد. میزان پاشش قطره توسط جدایه‌های مختلف نیز بین ۳/۹۳ تا ۱۴/۸ میلی‌متر متغیر بود. در بیش از ۷۳ درصد جدایه‌ها توانایی پاشش قطره نسبت به نمونه شاهد (آب مقطر) مشاهده شد. نتایج مقایسه میانگین نشان داد جدایه شماره ۲۸ با میانگین ۱۴/۸ میلی‌متر به طور معنی‌داری از سایر جدایه‌ها بالاتر بود (جدول ۳). همچنین بررسی همبستگی بین صفات بررسی شده نشان داد میزان همولیز خون فاقد همبستگی معنی‌داری سایر صفات مورد بررسی بود. با این حال تشکیل کمپلکس در محیط آگار آبی همبستگی مثبت معنی‌دار با پخش نفت و پاشش قطره (به ترتیب $r=۰/۴۰^{*}$ و $r=۰/۷۸^{**}$) نشان داد.

نتایج (جدول ۳) نشان می‌دهد که دامنه پخش نفت در جدایه‌های مختلف بین ۳/۴۶ تا ۵۰/۶ میلی‌متر بوده است، به‌طوری که جدایه‌های شماره ۱۹ و ۱۷ به ترتیب با میانگین‌های ۵۰/۶ و ۴۴/۸ میلی‌متر به‌طور معناداری از سایر جدایه‌ها جلوتر بوده‌اند. این پدیده نشان‌دهنده توانایی بالاتر این جدایه‌ها در کاهش کشش سطحی یا بین فازی است که یکی از شاخص‌های قدرتمند تولید بیوسورفکتانت محسوب می‌شود. در این مطالعه، کاهش کشش سطحی توسط سویه‌های مورد بررسی با استفاده از آزمون‌های پخش نفت و پاشش قطره ارزیابی شد. اگرچه این روش‌ها شاخص‌های کیفی و نیمه‌کمی خوبی برای غربالگری بیوسورفکتانت‌ها فراهم می‌کنند، اندازه‌گیری مستقیم کشش سطحی با تانسیومتر که در مطالعات مرجع به‌عنوان استاندارد اصلی شناخته می‌شود، امکان‌پذیر نبود. با این حال، الگوی تغییرات پخش نفت و قطره‌های آب با نتایج گزارش‌شده برای بیوسورفکتانت‌های میکروبی معتبر همخوانی دارد. آزمایش‌های متعدد در پژوهش‌های پیشین نشان داده‌اند که افزایش قطر حلقه پخش نفت رابطه مستقیم با کاهش کشش سطحی ناشی از بیوسورفکتانت ترشح شده دارد (Li et al., 2023; Sun et al., 2018). علاوه بر این، نتایج نشان داد که میزان پاشش قطره توسط جدایه‌ها بین ۳/۹۳ تا ۱۴/۸ میلی‌متر متغیر بوده است و در بیش از ۷۳ درصد از جدایه‌ها، توانایی پاشش قطره نسبت به نمونه شاهد دیده شده است. این یافته نیز تأییدگر فعالیت سطحی بالا در بسیاری از جدایه‌هاست؛ زیرا پاشش قطره معمولاً هنگامی رخ می‌دهد که ترکیب فعال سطحی کافی وجود داشته باشد تا کشش سطحی قطره را کاهش دهد و باعث گسترش آن شود. با این حال، قابل‌توجه است که اگرچه همه جدایه‌ها در آزمون همولیز مثبت بوده‌اند، اما فقط برخی از آن‌ها در آزمون‌های پخش نفت و پاشش قطره عملکرد برجسته‌ای داشته‌اند. این موضوع بر تنوع تولید و کیفیت بیوسورفکتانت‌ها تأکید می‌کند. به‌عنوان مثال نوع مولکولی، غلظت و ساختار بار سطحی مولکول می‌تواند کارایی کاهش کشش سطحی را تحت تأثیر قرار دهد. مطالعات اخیر نشان داده‌اند که بیوسورفکتانت‌هایی که بار منفی بالاتری دارند و زنجیره هیدروفوب قوی‌تر، عملکرد بهتر در کاهش کشش سطحی و ایجاد پخش بیشتر نفت دارند (Shaimerdenova et al., 2024). در نتیجه، نتایج (جدول ۳) به ما این امکان را می‌دهد که جدایه‌های شماره ۱۹ و ۲۸ را به‌عنوان کاندیداهای خوب برای تولید بیوسورفکتانت با قابلیت بالا در کاهش کشش سطحی شناسایی کنیم.

جدول ۳- مقایسه میانگین میزان فعالیت همولیتیک (تولید بیوسورفکتانت)، تشکیل کمپلکس (بیوسورفکتانت آنیونی)، پخش نفت (کاهش کشش سطحی) و پاشش قطره (کاهش کشش سطحی) توسط جدایه‌های جداسازی شده از منابع مختلف. میانگین‌های دارای حروف مشترک فاقد تفاوت معنی‌دار بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن ($p< 0.05$) می‌باشند.

Table 3. Comparison of the average levels of hemolytic activity (biosurfactant production), complex formation (anionic biosurfactant), oil dispersion (reduction of surface tension), and droplet spreading (reduction of surface tension) by strains isolated from different sources. Means with the same letters are not significantly different based on Duncan's multiple range test ($p< 0.05$)

جدایه Isolate	فعالیت همولیتیک (هاله/ کلونی) Hemolytic activity (halo/colony)	تشکیل کمپلکس (هاله/ کلونی) Complex formation (halo/colony)	پخش نفت (mm) Oil spreading	پخش قطره (mm) Drop collapse
1	1.43 $^{g-l}$	1 ^{f}	3.46^{k}	5.92^{jk}
2	1.48 $^{f-k}$	1 ^{f}	8.20^{ijk}	5.36^{lm}
3	1.77 ^{cde}	1.60 ^{cd}	15.5^{e-h}	9.91^{def}
4	1.25 ^{k}	1.65 ^{c}	21.6^{de}	9.55^{fgh}
5	1.55 $^{e-ı}$	1.42 ^{e}	15.5^{e-h}	10.2^{de}
6	1.63 $^{d-g}$	1.68 ^{c}	21.8^{de}	10.3^{d}
7	1.50 $^{f-k}$	1 ^{f}	7.18^{ijk}	6.18^{j}
8	1.54 $^{f-j}$	1 ^{f}	11.6^{f-j}	5.50^{klm}
9	1.40 $^{g-l}$	1 ^{f}	21.6^{de}	9.15^{h}
10	1.83 ^{bcd}	1 ^{f}	10.6^{g-j}	3.98^{n}
11	1.85 ^{bc}	1 ^{f}	15.1^{e-h}	3.93^{n}
12	1.32 ^{ıjk}	1 ^{f}	16.7^{efg}	5.38^{lm}
13	1.54 $^{f-j}$	1 ^{f}	32^{bc}	9.79^{efg}
14	1.36 $^{ı-l}$	1 ^{f}	17.9^{ef}	5.39^{lm}
15	1.83 ^{bcd}	1 ^{f}	28^{bcd}	9.34^{gh}
16	1.36 $^{ı-l}$	1 ^{f}	14.5^{f-i}	4.06^{n}
17	1.53 $^{f-j}$	1 ^{f}	44.8^{a}	8.38^{i}
18	1.49 $^{f-k}$	1 ^{f}	12^{f-j}	4.05^{n}
19	1.99 ^{b}	1.95 ^{b}	50.6^{a}	13.5^{b}
20	1.57 $^{e-ı}$	1 ^{f}	16.1^{e-h}	4.07^{n}
21	1.28 ^{jk}	1 ^{f}	7.94^{ijk}	5.10^{m}
22	1.68 $^{e-f}$	1 ^{f}	33.5^{b}	6.40^{j}
23	2.90 ^{a}	1 ^{f}	30.1^{bc}	11.1^{c}
24	1.39 $^{h-l}$	1 ^{f}	9.37^{h-k}	5.07^{m}
25	1.60 $^{e-h}$	1 ^{f}	13.6^{f-j}	3.97^{n}
26	1.36 $^{ı-l}$	1 ^{f}	25.5^{cd}	4.25^{n}
27	1.61 $^{e-h}$	1 ^{f}	11.6^{f-j}	5.64^{lm}
28	1.47 $^{f-l}$	2.23 ^{a}	28.8^{bc}	14.8^{a}
29	1.62 $^{e-h}$	1.49 ^{de}	27.5^{bcd}	13.2^{b}
30	1.25 ^{k}	1 ^{f}	13.5^{f-j}	4.24^{n}

بررسی نوع بیوسورفکتانت تولیدشده توسط سویه‌های برتر با استفاده از آزمون کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) نشان داد که الگوی واکنش جدایه‌ها به شناساگرهای شیمیایی مختلف، همراه با مقادیر نسبی ضریب نگهداری[13] (Rf)، امکان طبقه‌بندی اولیه ترکیبات را فراهم می‌کند. سویه‌های شماره ۱۷ و ۲۳ در حضور هر سه شناساگر فنول–سولفوریک اسید، نایِن‌هیدرین و ید واکنش مثبت نشان دادند که بیانگر حضور هم‌زمان اجزای قندی، پروتئینی و لیپیدی است. تحرک متوسط این ترکیبات روی صفحه سیلیکا با ماهیت چندجزئی و قطبیت بالای بیوسورفکتانت‌های پلیمری سازگار بوده و از این‌رو، این ترکیبات به‌عنوان بیوسورفکتانت‌های پلیمری از نوع لیپوگلیکوپروتئینی (بیوامولسیفایر) در نظر گرفته شدند. در مقابل، سویه شماره ۱۹ واکنش مثبت به شناساگرهای فنول–سولفوریک اسید و ید و واکنش منفی به نایِن‌هیدرین نشان داد و دارای Rf بالاتری نسبت به سایر جدایه‌ها بود که این الگو با ماهیت آمفی‌فیلیک ترکیبات گلیکولیپیدی، به‌ویژه رامنولیپیدها، همخوانی دارد. همچنین سویه شماره ۲۸ واکنش مثبت به فنول–سولفوریک اسید و نایِن‌هیدرین و عدم واکنش به ید را نشان داد که مؤید غالب بودن اجزای قندی و پروتئینی و فقدان بخش لیپیدی قابل‌توجه است. Rf پایین‌تر این جدایه نیز با ماهیت غالباً قطبی بیوسورفکتانت‌هایی نظیر امولسان مطابقت دارد (جدول ۴). به‌طور کلی، با توجه به چندجزئی بودن بیوسورفکتانت‌های میکروبی، مقادیر Rf به‌صورت نسبی تفسیر شده و در کنار واکنش به شناساگرهای شیمیایی، به‌عنوان شاخص‌های مکمل برای شناسایی اولیه نوع بیوسورفکتانت‌ها به‌کار گرفته شدند (Satpute et al., 2010).

جدول ۴- آزمون کروماتوگرافی لایه نازک جهت شناسایی نوع بیوسورفکتانت‌های تولید در جدایه‌های برتر با استفاده از شناساگرهای مختلف

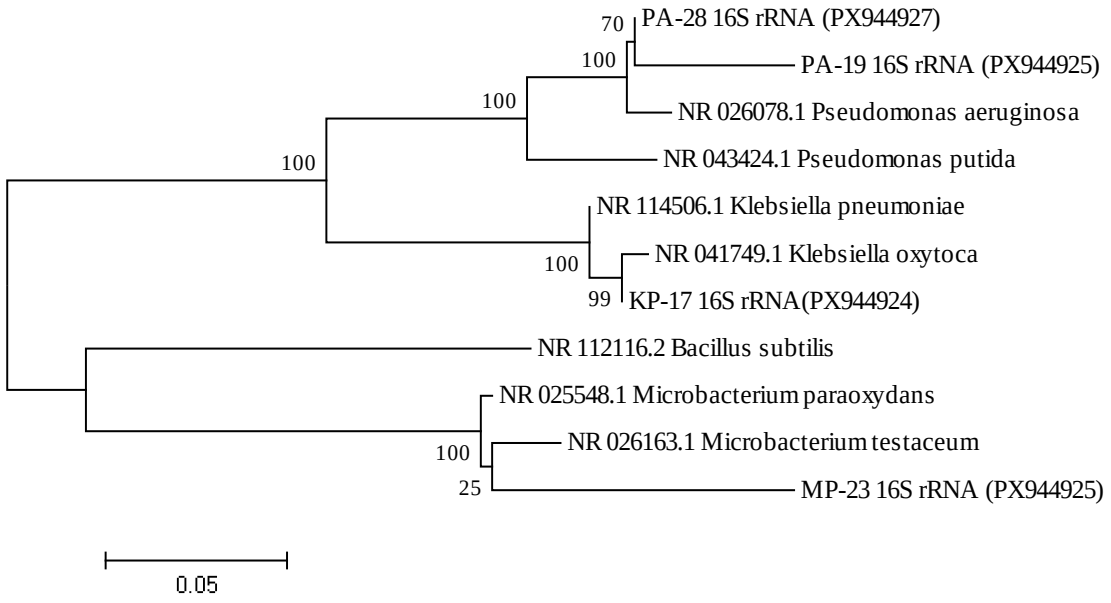
Table 4- Thin layer chromatography test for identification of the type of biosurfactants produced in the top isolates using different indicators

جدایه Isolate	شناساگر Indicator			نوع ترکیب/بیوسورفکتانت احتمالی Possible type of biosurfactant	ضریب نگهداری (Rf) Retention factor
	فنول–سولفوریک اسید Phenol-sulfuric acid	نین هیدرین Ninhydrin	ید Iodine		
17	+	+	+	لیپوگلیکو پروتئین/امولسفایر Lipoglycoprotein/Emulsifier	0.25-0.40
19	+	−	+	گلیکولیپید/رامنولیپید Glycolipid/Rhamnolipid	0.41-0.65
23	+	+	+	لیپوگلیکوپروتئین/امولسیفایر Lipoglycoprotein/Emulsifier	0.25-0.40
28	+	+	−	گلیکوپروتئین/امولسان- الاسان Glycoprotein/Emulsan- Alasan	0.17-0.43

[13] Retention factor

به‌منظور تعیین جایگاه فیلوژنتیکی جدایه‌های بومی جداسازی‌شده، توالی ژن 16S rRNA آن‌ها تعیین و با توالی‌های مرجع موجود در پایگاه داده‌ی NCBI GenBank مقایسه گردید. هم‌ترازسازی چندگانه[۱۴] با استفاده از الگوریتم ClustalW انجام شد و درخت فیلوژنتیکی با روش حداکثر احتمال[۱۵] و با مدل جایگزینی Tamura–Nei در نرم‌افزار MEGA 6 ترسیم گردید. اعتبار شاخه‌ها با بوت‌استرپ بر پایه‌ی ۱۰۰۰ تکرار ارزیابی شد تا اطمینان آماری ساختار درخت تضمین گردد. درخت حاصل جایگاه چهار جدایه‌ی مورد مطالعه را (PX944924- PX944927) نشان می‌دهد. جدایه‌ی شماره ۱۷ در شاخه‌ای با اطمینان بالای بوت‌استرپ (۹۹ درصد) در کنار گونه‌ی *Klebsiella oxytoca* (NR041749.1) قرار گرفت.

جدایه‌های ۱۹ و ۲۸ در خوشه‌ای مشترک از جنس *Pseudomonas* و در نزدیکی گونه‌ی *Pseudomonas aeruginosa* (NR_026078.1) جای گرفتند، که نشان‌دهنده‌ی هم‌تبار بودن این دو جدایه و شباهت ژنتیکی بالای آن‌ها با *P. aeruginosa* است. جدایه‌ی ۲۳ در شاخه‌ای مجزا از جنس *Microbacterium* قرار گرفت. نتایج حاصل از تحلیل فیلوژنتیکی تأیید می‌کند که جدایه‌های بومی شناسایی‌شده به ترتیب متعلق به جنس‌های *Klebsiella*، *Pseudomonas* و *Microbacterium* هستند. هدف از این درخت، تعیین جایگاه نسبی سویه‌های مورد مطالعه در میان جنس‌های مختلف بوده و مقایسه درون‌جنسی مدنظر نبود. *Bacillus subtilis* به‌عنوان گونه خارج‌گروه[۱۶] استفاده شد.



شکل ۱- درخت فیلوژنیک سویه‌های باکتریایی مورد مطالعه (PX944924- PX944927) جهت تعیین جایگاه نسبی آن‌ها بر اساس توالی ژن 16S rRNA به روش Maximum Likelihood.

Figure 1. Phylogenetic tree of the studied bacterial strains (PX944924- PX944927) for determining their relative position based on the 16S rRNA gene sequence using the Maximum Likelihood method.

[14] Multiple Sequence Alignment
[15] Maximum Likelihood
[16] Outgroup

نتایج کروماتوگرافی لایه نازک نشان داد که بین ترکیب شیمیایی بیوسورفکتانت‌ها و توانایی کاهش کشش سطحی در آزمون‌های پخش نفت و پاشش قطره ارتباط مستقیمی وجود دارد. سویه‌های شماره ۱۷ و ۲۳ که در آزمون‌های فنول–سولفوریک‌اسید، نایِن هیدرین و ید هر سه واکنش مثبت نشان دادند، احتمالاً بیوسورفکتانت‌های پلیمری از نوع لیپوگلیکوپروتئین تولید کرده‌اند. این گروه از ترکیبات معمولاً پتانسیل امولسیون‌سازی بالایی دارند و قادرند فازهای آبی و آلی را به‌طور پایدار مخلوط نگه دارند، بنابراین برای فرآیندهای زیستی مانند پالایش و افزایش استخراج نفت بسیار ارزشمندند (Begum et al., 2023). در مقابل، سویه ۱۹ که در آزمون‌های فنول–سولفوریک‌اسید و ید مثبت بود، نشان‌دهنده تولید گلیکولیپیدهایی از نوع رامنولیپید است؛ ترکیباتی که به‌ویژه در گونه‌های *Pseudomonas* شایع بوده و یکی از قوی‌ترین بیوسورفکتانت‌های شناخته‌شده از نظر کاهش کشش سطحی محسوب می‌شوند (Shaimerdenova et al., 2024). این موضوع با نتایج آزمون پخش نفت که در آن سویه ۱۹ بالاترین قطر پخش را داشت، همخوانی کامل دارد و تأکید می‌کند که ساختار گلیکولیپیدی موجب کارایی بالاتر در کاهش کشش سطحی می‌شود. از سوی دیگر، سویه ۲۸ که نسبت به شناساگرهای فنول–سولفوریک‌اسید و نایِن هیدرین واکنش مثبت داشت، احتمالاً ترکیباتی از نوع امولسان یا بیوسورفکتانت‌های دارای گروه‌های قندی و پپتیدی تولید می‌کند. این ترکیبات معمولاً نسبت به گلیکولیپیدها بار سطحی قوی‌تری ندارند، اما پایداری بالاتری در امولسیون‌ها نشان می‌دهند (Sharma et al., 2023). در مجموع، هم‌پوشانی داده‌های حاصل از TLC با آزمون‌های عملکردی مانند پخش نفت و پاشش قطره نشان می‌دهد که تنوع ساختاری بیوسورفکتانت‌ها نقش تعیین‌کننده‌ای در کارکرد فیزیکوشیمیایی آن‌ها دارد (Li et al., 2023). این نتایج تأیید می‌کند که سویه‌های ۱۹ و ۱۷ به‌ترتیب نماینده تولید گلیکولیپید و لیپوگلیکوپروتئین با پتانسیل اولیه برای توسعه در مقیاس صنعتی هستند. بررسی‌های آینده شامل طیف‌سنجی جرمی (LC-MS) و آنالیز FTIR می‌تواند نوع دقیق پیوندها و گروه‌های عاملی را تعیین کند تا کارایی این ترکیبات در کاربردهای زیست‌فناورانه، به‌ویژه در افزایش فراهمی و جذب عناصر ریزمغذی، به‌صورت دقیق‌تر ارزیابی شود. یکی از محدودیت‌های این مطالعه، عدم استفاده از کنترل مثبت استاندارد (شیمیایی یا بیولوژیک) در آزمون‌های غربالگری شامل پخش نفت، پاشش قطره و CTAB است. این انتخاب به دلیل هدف اصلی مطالعه که غربالگری اولیه و شناسایی کیفی/نیمه‌کمی سویه‌های بومی بوده است، اتخاذ شد؛ بنابراین، نتایج ارائه‌شده صرفاً به‌صورت مقایسه نسبی بین جدایه‌ها قابل تفسیر هستند و قدرت عملکرد سویه‌ها نسبت به استانداردهای تجاری یا شیمیایی تعیین نشده است. این محدودیت می‌تواند موضوعی برای مطالعات آتی باشد تا عملکرد کمی و مقایسه با کنترل‌های استاندارد مورد ارزیابی دقیق قرار گیرد. نتایج تحلیل فیلوژنتیکی در تداوم یافته‌های کروماتوگرافی و آزمون‌های عملکردی، هم‌تراز با ویژگی‌های بیوسورفکتانت تولیدی هر سویه بود. حضور جدایه‌های ۱۹ و ۲۸ در خوشه‌ی *Pseudomonas* با توان بالای کاهش کشش سطحی و تولید گلیکولیپیدها سازگار است، زیرا این جنس به‌طور شناخته‌شده‌ای تولیدکننده‌ی رامنولیپیدها است. در مقابل، جدایه‌ی ۱۷ از جنس *Klebsiella* که بیوسورفکتانت‌های لیپوگلیکوپروتئینی تولید کرد، با نقش غالب این جنس در تولید امولسیفایرهای پلیمری همخوانی دارد. همچنین، شناسایی جدایه ۲۳ به‌عنوان *Microbacterium* تولیدکننده‌ی ترکیبات مختلط پروتئینی–قندی، نشانگر تنوع بیوسنتزی میان

جدایه‌های بومی و ارزش بالقوه‌ی آن‌ها برای کاربردهای زیستی است.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه، مجموعه‌ای از باکتری‌های جداشده از محیط‌های آلوده به هیدروکربن با بهره‌گیری از آزمون‌های فیزیکوشیمیایی، کروماتوگرافی و فیلوژنتیکی مورد ارزیابی قرار گرفتند تا توان بالقوه آن‌ها در تولید بیوسورفکتانت مشخص شود. نتایج نشان داد که جدایه‌ها از نظر ساختار، نوع و کارایی بیوسورفکتانت‌ها تنوع قابل‌توجهی دارند. سویه‌های ۱۷ و ۱۹ که از پسماند زیتون جداسازی شدند، شامل *Klebsiella* و *Pseudomonas* بومی بودند و به ترتیب به تولید بیوسورفکتانت‌های پلیمری/لیپوگلیکوپروتئینی و گلیکولیپیدها با توانایی کاهش کشش سطحی بالا مرتبط بودند. در مقابل، سویه‌های ۲۳ و ۲۸ که از خاک آلوده به نفت جدایه شدند، شامل *Pseudomonas* و *Microbacterium* بودند و بیشترین توانایی در تولید لیپوگلیکوپروتئین و گلیکوپروتئین و توانایی بالقوه امولسیون کنندگی نشان دادند. هم‌ترازی نتایج کروماتوگرافی لایه نازک، آزمون‌های پخش نفت، پاشش قطره و همولیز با یافته‌های فیلوژنتیکی، مؤید نقش تعیین‌کننده منشأ تبارشناختی و اکولوژیک در نوع و عملکرد بیوسورفکتانت‌ها بود. به طور کلی، جدایه‌های شناسایی شده، به‌ویژه سویه‌های ۱۷، ۱۹، ۲۳ و ۲۸، گزینه‌هایی ارزشمند برای توسعه بیوسورفکتانت‌های بومی در کاربردهایی مانند زیست‌پالایی هیدروکربن‌ها، بهبود جذب عناصر غذایی و تولید زیست‌کودهای مبتنی بر یوسورفکتانت‌ها به شمار می‌آیند. این نتایج مسیر تحقیقات آینده را برای بهینه‌سازی تولید، خالص‌سازی و ارزیابی تولید اقتصادی کاربری صنعتی این بیوسورفکتانت‌ها با هموار می‌کند.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تعارض منافعی در خصوص انتشار این مقاله وجود ندارد.

References

1. Ali, S. A. M., Sayyed, R. Z., Mir, M. I., Mir, M., Khan, M. Y., Bee, H. and Poczai, P., 2022. Induction of systemic resistance in maize and antibiofilm activity of surfactin from *Bacillus velezensis* MS20. *Frontiers in Microbiology*, 13, 879739, pp.1–13. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.879739
2. Begum, W., Saha, B. and Mandal, U., 2023. A comprehensive review on production of bio-surfactants by bio-degradation of waste carbohydrate feedstocks: an approach towards sustainable development. *RSC Advances*, 13(36), pp.25599–25615. https://doi.org/10.1039/D3RA05051C
3. Borah, S. N., Goswami, D., Sarma, H. K., Cameotra, S. S. and Deka, S., 2016. Rhamnolipid biosurfactant against *Fusarium verticillioides*: potential biocontrol agent. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1505, pp.1–10. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01505
4. Carrillo, P. G., Mardaraz, C., Pitta-Álvarez, S. I. and Giulietti, A. M., 1996. Isolation and selection of biosurfactant-producing bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 12(1), pp.82–84. https://doi.org/10.1007/BF00327807
5. Dini, S., Bekhit, A.-E.-D. A., Roohinejad, S., Vale, J. M. and Agyei, D., 2024. The physicochemical and functional properties of biosurfactants: a review. *Molecules*, 29(11), 2544, pp.1–37. https://doi.org/10.3390/molecules29112544
6. Ebadi, A., Olamaee, M., Khoshkholgh Sima, N. A., Ghorbani Nasrabadi, R. and Hashemi, M., 2018. Isolation and characterization of biosurfactant producing and crude oil degrading bacteria from oil contaminated soils. *Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science*, 42(3), pp.1149–1156. https://doi.org/10.1007/s40995-018-0521-8
7. Garg, R., Garg, R., Anjum, A., Eddy, N.O. and Watandost, H., 2025. Comprehensive review of the synthesis and sustainable applications of biosurfactants. *Discover Applied Sciences*, *7*(10), p.1168. https://doi.org/ 10.1007/s42452-025-07603-z
8. Khoshru, B., Fallah Nosratabad, A., Khosravi, H., Asgharzadeh, A., Faridian, L. (2025). 'Enhancing agricultural productivity using PGPR and nanoparticles: mechanisms, challenges, and future directions', *Journal of Soil Biology*, 12(2), pp. 279-313. (In Persian). doi: 10.22092/sbj.2025.368425.277
9. Khosravi, H., Otadi, A., Alikhani, H., Etesami, H. (2025). 'Evaluation and Comparative Analysis of Plant Growth-Promoting Traits in Diverse Groups of Rhizosphere Bacteria', *Journal of Soil Biology*, 12(2), pp. 235-260. (In Persian). doi: 10.22092/sbj.2025.367286.271
10. Lahiji, A., Rejali, F. (2025). 'Investigating the effect of biofertilizers on improving the absorption of nutrients,growth and yield of hazelnut (Corylus avellana L.) trees in Eshkavrat area of Rudsar city in Gilan province', *Journal of Soil Biology*, 12(2), pp. 213-233. (In Persian). doi: 10.22092/sbj.2024.366006.264
11. Li, H., Fang, C., Liu, X., Bao, K., Li, Y. and Bao, M., 2023. Quantitative analysis of biosurfactants in water samples by a modified oil spreading technique. *RSC Advances*, 13(15), pp.9933–9944. https://doi.org/10.1039/D3RA00102D
12. Markam, S. S., Raj, A., Kumar, A. and Khan, M. L., 2024. Microbial biosurfactants: Green alternatives and sustainable solution for augmenting pesticide remediation and management of organic waste. *Current Research in Microbial Sciences*, 13, 100266, pp.1–14. https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2024.100266
13. Nihorimbere, V., Cawoy, H., Seyer, A., Brunelle, A., Thonart, P. and Ongena, M., 2012. Impact of rhizosphere factors on cyclic lipopeptide signature from the plant-beneficial strain *Bacillus amyloliquefaciens* S499. *FEMS Microbiology Ecology*, 79(1), pp.176–191. https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01208.x
14. Pacwa-Płociniczak, M., Płaza, G. A., Piotrowska-Seget, Z. and Cameotra, S. S., 2011. Environmental applications of biosurfactants: Recent advances. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(1), pp.633–654. https://doi.org/10.3390/ijms12010633
15. Satpute, S. K., Banpurkar, A. G., Dhakephalkar, P. K., Banat, I. M., and Chopade, B. A., 2010. Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: a review. *Critical reviews*

in biotechnology, 30(2), pp.127-144. https://doi.org/10.3109/07388550903427280

16. Sass, G., Groleau, M.C., Déziel, E. and Stevens, D.A., 2023. Simple method for quantification of anionic biosurfactants in aqueous solutions. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 11, Article 1253652, pp.1–10. DOI: https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1253652
17. Siegmund, I. and Wagner, F., 1991. New method for detecting rhamnolipids excreted by *Pseudomonas* species during growth on mineral agar. *Biotechnology Techniques*, 5(4), pp.265–268. https://doi.org/10.1007/BF00165127
18. Shaimerdenova, U., Kaiyrmanova, G., Lewandowska, W., Bartoszewicz, M., Swiecicka, I. and Yernazarova, A., 2024. Biosurfactant and biopolymer producing microorganisms from West Kazakhstan oilfield. *Scientific Reports*, 14(1), 2294, pp.1–15. https://doi.org/10.1038/s41598-024-52906-7
19. Sharma, N., Lavania, M. and Lal, B., 2023. Biosurfactant: an emerging tool for the petroleum industries. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1254557, pp.1–12. https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1254557
20. Singh, A., Van Hamme, J. D. and Ward, O. P., 2007. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. *Biotechnology Advances*, 25(1), pp.99–121. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.10.004
21. Singh, R., Glick, B. R. and Rathore, D., 2018. Biosurfactants as a biological tool to increase micronutrient availability in soil: A review. *Pedosphere*, 28(4), pp.561–576. https://doi.org/10.1016/S1002-0160(18)60029-1
22. Stacey, S. P., McLaughlin, M. J., Hettiarachchi, G. M. and Lombi, E., 2008. Root uptake of lipophilic zinc–rhamnolipid complexes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(15), pp.5775–5781. https://doi.org/10.1021/jf0729311
23. Sun, W., Cao, W., Jiang, M., Saren, G., Liu, J., Cao, J. and Naz, I., 2018. Isolation and characterization of biosurfactant-producing and diesel oil degrading *Pseudomonas* sp. CQ2 from Changqing oil field, China. *RSC Advances*, 8(69), pp.39710–39720. https://doi.org/10.1039/C8RA06917J
24. Youssef, N. H., Duncan, K. E., Nagle, D. P., Savage, K. N., Knapp, R. M. and McInerney, M. J., 2004. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, 56(3), pp.339–347. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2003.11.001
25. Zhang, X., Xu, D., Zhu, C., Lundaa, T. and Scherr, K.E., 2012. Isolation and identification of biosurfactant producing and crude oil degrading *Pseudomonas aeruginosa* strains**.** *Chemical Engineering Journal*, 209, pp.138–146. https://doi.org/10.1016/j.cej.2012.08.058

Publisher: Soil Science Society of Iran

Journal of Soil Biology

https://sbj.areeo.ac.ir/

Review article

Plant-mycorrhiza responses to drought stress: Analysis of vital processes and defense mechanisms

Habiballah Nadian Ghomsheh[1*]

[1] Professor, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khozestan
E-mail: nadian_habib@yahoo.com

Article Info

Received: 2025-12-16

Accepted: 2026-02-24

Keywords:
Aquaporin,
Enzymatic and non-enzymatic antioxidants,
Drought stress,
Mycorrhizal fungi,
Reactive oxygen species (ROS).

Corresponding author's email:
nadian_habib@yahoo.com

Doi:
10.22092/SBJ.2026.371633.290

Extended Abstract

Background and Objectives: Drought stress is one of the most critical challenges in agriculture, especially in arid and semi-arid regions. In light of ongoing climate change and prolonged drought periods, this issue has posed a serious threat to food security, particularly in countries located in Western Asia. Drought stress severely affects many physiological, enzymatic, biochemical, and nutritional processes in plants. Among the most important physiological and biochemical effects of drought stress are disturbances in photosynthesis and the photosynthetic electron transport chain, intercellular CO_2 concentration, photosynthetic rate, stomatal conductance, transpiration rate, excessive production of reactive oxygen species (ROS), disruptions in plant water potential, and alterations in the regulation and synthesis of enzymatic, non-enzymatic, and hormonal osmolytes. To cope with the damage caused by drought stress, plants—alongside appropriate morphological adjustments activate a set of protective mechanisms (such as increased synthesis of antioxidant metabolites) and regulatory mechanisms (such as enhancing osmotic regulators) in conjunction with molecular responses. In fact, upon perceiving stress signals through the roots, the plant increases the expression of regulatory protein genes such as calcium-dependent protein kinases and mitogen-activated protein kinases, as well as the expression of genes involved in the synthesis of osmolytes including proline, glycine betaine, LEA proteins, and soluble sugars. These responses not only mitigate oxidative stress but also help improve plant water relations. The defensive mechanisms of plants in symbiosis with arbuscular mycorrhizal fungi are activated synergistically to counteract drought stress.

Review Methods: Numerous studies have highlighted the pivotal role of soil organisms, particularly arbuscular mycorrhizal fungi, in alleviating the detrimental effects of drought stress and mediating the shared defense mechanisms between plants and fungi. These investigations encompass a wide range of plant responses under drought conditions, both in the presence and absence of mycorrhizal associations, and are derived from peer-reviewed journals and reputable scientific databases. This analytical review synthesizes the findings of researchers in the field, drawing on up-to-date studies on drought stress physiology, antioxidant metabolism, osmolyte accumulation, and molecular responses, accessed through major international databases including Web of Science and Scopus. Furthermore, Google Scholar provided a freely accessible platform for identifying recent publications, while specialized resources such as ScienceDirect, SpringerLink and Taylor & Francis offered valuable journal articles, book chapters, and authoritative reference works in the fields of mycorrhizal symbiosis and soil ecology.

Results: Under drought stress, plant water relations are disrupted due to a reduction in the moisture potential gradient between the soil solution and plant tissues. Stomatal closure, aimed at reducing water loss, is one of the plant's earliest responses to drought conditions. This stress not only impairs photosynthetic processes but also leads to excessive production and accumulation of reactive oxygen species (ROS), resulting in oxidative damage at the cellular level. To cope with the damaging effects of drought stress, plants along with appropriate morphological adjustments activate a series of protective mechanisms (such as enhanced synthesis of antioxidant metabolites), regulatory mechanisms (such as increased osmotic adjustment), and molecular responses. Numerous studies have shown that mycorrhizal fungi can participate in these protective and regulatory mechanisms, thereby enhancing the host plant's adaptive capacity through various pathways. Mycorrhizal colonization supports the plant by promoting the synthesis and accumulation of osmotic regulators and antioxidant compounds, thus providing effective protection under drought conditions. A reduction in osmotic metabolites is considered a drought avoidance mechanism, whereas increased accumulation of osmotic regulators and antioxidant compounds represents a drought tolerance strategy. In the interaction between mycorrhizal fungi and aquaporins in reducing drought stress in the host plant, several mechanisms are involved. Among these mechanisms is the upregulation or stabilization of key aquaporin genes such as PIP1;6, PIP2;1, and PIP2;5. Gene expression regulation—particularly when mediated by mycorrhizal fungi—constitutes one of the earliest and most important mechanisms enabling drought tolerance. The interaction between aquaporins and stomata under drought conditions is coordinated by mycorrhizal fungi in a manner that ensures optimal water relations depending on the intensity of the drought and the plant's sensitivity to it. Upon sensing drought stress through their root system, plants transmit signals to various organs to adjust cellular processes accordingly. One such response is the synthesis of osmolytes such as proline, glycine betaine, and LEA proteins, which contribute to physiological, biochemical, and molecular adjustments that improve osmotic potential, enhance water relations, maintain cellular homeostasis, and ultimately increase drought tolerance—particularly in the presence of mycorrhizal fungi. Additionally, mycorrhizal plants exhibit enhanced synthesis of enzymatic antioxidants such as superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT), as well as antioxidant-related phytohormones including gibberellic acids, abscisic acid (ABA), indole-3-acetic acid (IAA), and jasmonic acid (JA). These compounds, each with distinct and sometimes contrasting physiological roles, act in a coordinated and synergistic manner to substantially mitigate the detrimental effects of drought stress on plant growth, nutrition, and physiological performance.

Conclusion: Plants employ complex antioxidant defense systems to mitigate the damaging effects of drought stress, relying on both enzymatic and non-enzymatic metabolites. Arbuscular mycorrhizal fungi substantially strengthen these defenses by enhancing ROS scavenging, stabilizing photosynthetic and redox processes, and improving osmotic adjustment, nutrient uptake, and the expression of drought-responsive genes. This symbiosis effectively contributes to ROS homeostasis and reduces oxidative damage, thereby improving plant resilience under water-limited conditions. Despite recent advances in molecular biology that have clarified elements of ROS signaling, antioxidant pathways, and hormonal crosstalk, many aspects of plant–mycorrhiza interactions under drought remain unresolved. Continued research using modern biotechnological approaches is essential for uncovering these mechanisms and developing more drought-tolerant crops that can support future global food security.

Cite this article: Nadian Ghomsheh, H., 2026. Plant-mycorrhiza responses to drought stress: Analysis of vital processes and defense mechanisms. Review article, *Journal of Soil Biology, 14 (1),*19-60 .



DOI: 10.22092/SBJ.2026.371633.290
Publisher: Soil Science Society of Iran

دو فصلنامه

نشریه زیست‌شناسی خاک

https://sbj.areeo.ac.ir/

مقاله مروری

پاسخ‌های گیاه– قارچ میکوریز به تنش خشکی: واکاوی فرآیندهای زیستی و سازوکارهای دفاعی

حبیب‌اله نادیان قمشه[1*]

[1] استاد دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، nadian_habib@yahoo.com

دریافت: ۱۴۰۴/۰۹/۲۵ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۲/۰۵

چکیده

تنش خشکی یکی از مهم‌ترین چالش‌های کشاورزی در مناطق خشک و نیمه‌خشک است که سبب آسیب‌های فراوان از جمله صدمات اکسیداتیو در گیاهان می‌شود. تحت تنش خشکی، بسیاری از فرایندهای زیستی گیاه عمدتا به سبب انباشت گونه‌های فعال اکسیژن مختل می‌شود. سازوکارهای متنوع دفاع آنتی‌اکسیدانی، گیاهان را قادر می‌سازد تا ضمن مقابله با تنش اکسیداتیو، توازن ردوکس و همستازی گونه‌های فعال اکسیژن را در شرایط تنش تا حدودی حفظ کنند. آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان کلیدی مانند سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز نقش بسیار مهمی در خنثی کردن گونه‌های فعال اکسیژن دارند، حال آنکه آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی بیشتر از طریق مهار و دفع گونه‌های فعال اکسیژن در کاهش تنش اکسیداتیو شرکت می‌کنند. سازوکارهای دفاعی گیاهان در همزیستی با قارچ‌های میکوریز آربسکولار در مقابله با تنش خشکی به صورت هم‌افزایی مشاهده می‌شود. قارچ‌های میکوریز علاوه بر فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی خود از طریق طیف وسیعی از متابولیت‌ها، قادرند با تنظیمات اسمزی، بیان ژن‌های کلیدی پاسخ‌دهنده به خشکی و نیز بهبود تغذیه گیاه آسیب‌های ناشی از تنش خشکی در گیاه میزبان خود را کاهش دهند. هر چند پیشرفت‌های اخیر با استفاده از زیست‌شناسی مولکولی و مهندسی ژنتیک تا حدودی توانسته است چگونگی سیگنال‌دهی گونه‌های فعال اکسیژن و سیستم‌های آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیر آنزیمی و نیز برهمکنش‌های پیچیده هورمونی در پاسخ به تنش خشکی را روشن کنند، ولی هنوز بسیاری از این سازوکارها ناشناخته باقی مانده است. بدون شک پژوهش‌های آینده با تمرکز بر زوایای ناشناخته و پنهان تنظیم‌کننده‌های اصلی پاسخ‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی گیاه در برابر تنش خشکی می‌توانند به توسعه کشاورزی پایدار و مقاوم به خشکی کمک کنند.

واژه‌های کلیدی: آکواپورین، آنتی اکسیدان‌های آنزیمی و غیر آنزیمی، تنش خشکی، قارچ‌های میکوریز، گونه‌های فعال اکسیژن.

استناد: نادیان قمشه، ح. ۱۴۰۵. پاسخ‌های گیاه– قارچ میکوریز به تنش خشکی: واکاوی فرآیندهای زیستی و سازوکارهای دفاعی. مقاله مروری، *نشریه زیست شناسی خاک*، *۱۴(۱)*، ۶۰-۱۹.

مقدمه

تنش خشکی به عنوان یکی از مهم‌ترین تنش‌های غیر زنده از عوامل عمده و محدود کننده تولیدات کشاورزی در مناطق خشک و نیمه‌خشک است. این موضوع با توجه به بروز تغییرات آب و هوایی و خشک‌سالی‌های طولانی و ممتد امنیت غذایی را به خصوص در کشورهای واقع در غرب آسیا از جمله ایران با خطر جدی مواجه ساخته است. مناطق خشک که شامل مناطق فراخشک، خشک و نیمه‌خشک می‌شوند (بدون احتساب قطب جنوب و گرینلند)، بیش از ۴۰ درصد از سطح خشکی‌های کره زمین را تشکیل می‌دهند (United Nation, 2024). این مناطق در آفریقا، آسیا و بخش‌هایی از آمریکای لاتین و استرالیا گسترده‌اند. حدود ۲/۸ میلیارد نفر از جمعیت جهان در این مناطق زندگی می‌کنند و این رقم در حال افزایش است. مطالعات اقلیمی و نقشه‌های پوشش زیست‌محیطی ایران نشان می‌دهند که **بیش از** ۸۰ درصد از مساحت ایران در مناطق خشک و نیمه‌خشک قرار دارد. در واقع فقط بخش کوچکی (حدود ۷ درصد) از ایران در عرصه‌های جنگلی و پرآب واقع شده است (OECD[1], 2025).

تنش خشکی به بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیک، آنزیمی، بیوشیمیایی و تغذیه‌ای گیاه آسیب جدی می‌رساند. از مهم‌ترین اثرات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی تنش خشکی بر گیاه می‌توان به اختلال در فتوسنتز و زنجیره انتقال الکترون فتوسنتزی، غلظت CO_2 بین سلولی، سرعت فتوسنتز، هدایت روزنه‌ای، سرعت تعرق، تولید بیش از حد گونه‌های فعال اکسیژن، اختلال در پتانسیل آبی گیاه، تغییر در تنظیمات و سنتز اسمولیت‌های آنزیمی، غیرآنزیمی و هورمونی گیاه اشاره نمود (Li et al., 2017; Li et al., 2022, Sood, 2025). بخشی از آسیب‌های وارده به گیاه در شرایط تنش خشکی مربوط است به افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن[2] و گونه‌های فعال نیتروژن[3] است. اگر چه تولید این گونه‌ها نقش بسیار ارزنده در فرایندهای مهم گیاه دارند ولی عدم توازن بین تولید و از بین رفتن این گونه‌های فعال هم‌چنانکه خواهیم دید منجر به آسیب‌های زیستی فراوان می‌شود (Maurya, 2020; Khatri and Rathore, 2022). جهت کاهش اثرات زیان‌آور تنش خشکی بر گیاه راهکارهای مدیریتی از جمله مدیریت مصرف کود به‌ویژه کودهای نیتروژنی، مدیریت مصرف آب و استفاده از رقم‌های گیاهی مقاوم به تنش خشکی پیشنهاد شده است. این راهکارها بسته به ویژگی‌های خاک، نوع گیاه و مراحل رشد آن متفاوت‌اند. استفاده از برقراری همزیستی گیاه با قارچ‌های میکوریز آربسکولار و بهبود روابط آبی آن از جمله راهکارهایی است که طی دهه‌های اخیر توصیه شده است. تأثیر تنش خشکی بر گیاهان همزیست با قارچ‌های میکوریز آربسکولار تا کنون در مطالعات زیادی مورد بررسی قرار گرفته شده است. از سال ۱۹۷۱، زمانی که Mosse و Hyman و پس از آن Safir و همکاران (۱۹۷۱) برای نخستین بار نشان دادند که همزیستی میکوریزی می‌تواند پیامدهای تنش خشکی در گیاه پیاز را کاهش دهد، تاکنون یافته‌های متعددی در این زمینه ارائه‌شده است. اگر چه تمام این نتایج تأثیر مثبت قارچ‌های میکوریز بر کاهش تنش خشکی در گیاه را تائید نمی‌کنند (Pons and muller, 2022; Orine et al., 2022; Auge et al., 1995; Matur and Yas, 1995) ولی در بسیاری از کارهای انجام شده اثرات مثبت این همزیستی در کاهش تنش خشکی در گیاهانی نظیر سیب (Huang et al., 2020)، انگور (Ye et al., 2022)، لیمو (Haghighat Nia et al., 2013)، سورگوم (Nadian, 2011)، بلوبری (Gui et al., 2021). ذرت (Alizadeh and Nadian, 2010)، برنج (Chareesri et al., 2020)، گندم دروم (Al-Karaki, 1998)، سویا (Grumberg et al., 2015)، گوجه فرنگی (Tahiri et al., 2022)، لوبیا (Al-Amiri, 2021)، تره (Jokar et al., 2015) و غیره به خوبی گزارش شده است. نتایج مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که قارچ‌های

[1] The Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD)
[2] Reactive oxygen spices (ROS)
[3] Reactive nitrogen spices (RNS)

میکوریز در طی دوره تنش خشکی از راه‌های مختلف نظیر افزایش جذب آب و عناصر غذایی به خصوص فسفر، سنتز و تجمع تنظیم کننده‌های اسمزی نظیر قندها، پرولین و پلی امین‌ها، افزایش متابولیت‌های آنتی‌اکسیدان نظیر گلوتاتیون و فلاونوئیدها، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نظیر سوپر اکسید دیسموتاز و نیز بهبود تبادلات گازی نظیر فتوسنتز، هدایت روزنه‌ای و تعرق باعث کاهش اثرات مخرب تنش خشکی بر گیاه میزبان می‌شوند (Ding et al., 2016; Ye et al., 2022). در شرایط تنش خشکی، وابستگی گیاه به قارچ‌های میکوریز معمولاً افزایش می‌یابد (Jokar et al., 2013) و این می‌تواند به کارایی بیشتر قارچ، هم‌چنانکه خواهیم دید، در جذب بیشتر فسفر (Nadian, 2025) و کاهش تنش خشکی منجر شود.

در شرایط تنش خشکی، روابط آبی گیاه به علت کاهش اختلاف پتانسیل رطوبتی بین محلول خاک و گیاه دچار آسیب می‌شود. بسته شدن روزنه‌ها به منظور کاهش از دست دادن آب از اولین اقدامات گیاه در مقابله با تنش خشکی است. این اقدام منجر به کاهش جذب دی‌اکسید کربن به سبب بسته شدن روزنه‌ها و در نتیجه کاهش فرایندهای فتوسنتزی است. این کاهش در فتوسنتز باعث ناتوانی گیاه در استفاده و جذب الکترون‌ها شده و به این‌ترتیب نشت الکترون‌ها سبب احیای اکسیژن و تولید بیش از حد گونه‌های فعال اکسیژن و نیتروژن می‌شود. گیاهان برای مقابله با آسیب‌های ناشی از تنش خشکی علاوه بر تغییرات مرفولوژیک مناسب مجموعه‌ای دیگر از سازوکارهای حفاظتی (افزایش سنتز متابولیت‌های ضد اکساینده)، سازوکارهای تنظیمی (افزایش تنظیم کننده‌های اسمزی) در برهمکنش با سازوکارهای ملکولی را بکار می‌برند. در واقع، گیاه پس از دریافت سیگنال‌های تنش از طریق ریشه با بیان افزایشی ژن‌های پروتئین‌های تنظیمی نظیر پروتئین کینازهای وابسته به کلسیم[1] و پروتئین کینازهای فعال شده توسط میتوژن و نیز بیان ژن‌های دخیل در سنتز اسمولیت‌ها نظیر پرولین، گلیسین بتائین، پروتئین‌های LEA[2] و قندهای محلول، نه تنها قادر است تنش‌های اکسیداتیو وارده را کاهش دهد بلکه قادر است روابط آبی خود را بهبود بخشد (Ashraf and Foolad, 2007; Nawaz and Wang, 2020). نتایج بسیاری از مطالعات نشان می‌دهد که قارچ‌های میکوریز قادرند در سازو کارهای حفاظتی و تنظیمی گیاه در مقابله با تنش خشکی شرکت کنند و توانایی گیاه میزبان خود را به راه‌های گوناگون هم‌چنان که خواهیم دید افزایش دهد. اگر چه نقش مثبت قارچ‌های میکوریز در کاهش اثرات تنش خشکی در گیاهان میزبان به خوبی نشان داده شده است ولی اینکه این نقش بیشتر از کدام طریق مرفولوژیک، فیزیولوژیک، ملکولی و یا ترکیبی از آنها باشد به خوبی شناخته نشده است. به سبب پیچیدگی سازوکارها در مقابله با تنش خشکی و متغیر بودن عوامل دخیل نظیر نوع گیاه، شدت تنش خشکی، زمان اعمال تنش (مراحل رشدی گیاه) از یک طرف و از طرف دیگر چگونگی فعال شدن سازوکارهای دفاعی و تنظیمی گیاه در سیگنال‌های محیطی و مسیرهای مختلف سیگنال‌دهی در اندام‌های گیاه، نیاز است تا مطالعات بیشتری برای درک بهتر این سازو کارها صورت گیرد. این مقاله‌ی تحلیلی یک بررسی موشکافانه از دانش بدست آمده از پاسخ گیاه در مواجه با تنش خشکی است. در این بررسی، سازوکارهای مختلفی که گیاه، با حضور و بدون حضور قارچ میکوریز آربسکولار، در مواجه با تنش خشکی بکار می‌برند و مبتنی است بر پاسخ‌های مرفولوژیک، فیزیولوژیک و ملکولی که به عنوان سازوکارهای دفاعی گیاه نیز شناخته می‌شوند ارائه و مورد بحث قرار می‌گیرند.

مقابله گیاهان با تنش خشکی

بر اساس یک تعریف پذیرفته شده، گیاهان در مواجه با تنش خشکی عمدتاً به دو دسته تقسیم می‌شوند: گیاهان اجتناب‌کننده از خشکی[3] و گیاهان متحمل به خشکی[4]. در "اجتناب از خشکی" گیاهِ تحت تنش با ایجاد

[1] Calcium-dependent protein kinase
[2] Late embryogenesis abundant
[3] Drought avoidance
[4] Drought resistance

تغییراتی مانند اصلاح ویژگی‌های مورفولوژیک، می‌تواند با افزایش جذب آب یا به حداقل رساندن تلفات آن، میزان آب موجود در اندام‌های خود را حفظ کند. تغییرات مرفولوژیک شامل توسعه مؤلفه‌های رشدی ریشه نظیر افزایش انشعاب بندی ریشه (انبوهی ریشه)، قطر ریشه و افزایش تراکم ریشه‌های مویی جهت جذب بیشتر آب (کاهش نسبت برگ به ریشه) و نیز افزایش ضخامت کوتیکول غیرقابل نفوذ برگ‌ها جهت کاهش تبخیر از اندام‌های هوایی گیاه است. علاوه براین، گیاه جهت اجتناب از خشکی با انجام اقدامات دیگری نظیر کاهش پتانسیل آب برگ، بسته نگاه داشتن روزنه‌های خود، بهبود تغذیه، بهبود کارایی فتوسنتزی (سیستم نوری II) و نیز بهبود هدایت هیدرولیکی خود با خشکی مقابله می‌کند. در "تحمل به خشکی" گیاه با انجام فرایندهای مختلف فیزیولوژیک، بیوشیمیایی و ملکولی با خشکی مقابله می‌کند (Parent et al., 2009; Candar-Cakir et al., 2016; Xie et al., 2018; Haung et al., 2020) این اقدام به خصوص زمانی که گیاه با قارچ‌های میکوریز آربسکولار همزیست است به میزان قابل‌توجهی افزایش می‌یابد. در واقع، کلونیزاسیون میکوریزی هم از طریق اجتناب از خشکی و هم از طریق تحمل به خشکی گیاه میزبان خود را در شرایط تنش خشکی محافظت می‌کند (Ruiz-Sanchez et al., 2010, 2011). در اجتناب از خشکی، میزان این اجتناب با حضور قارچ میکوریزا به میزان بهبود مؤلفه‌های رشدی و تغذیه‌ای گیاه میزبان بستگی دارد. با این حال، چنانچه میزان رشد و وضعیت تغذیه‌ای گیاه میکوریزی در نظر گرفته نشود، می‌توان کاهش تنش خشکی در گیاه میکوریزی را به جذب بیشتر آب مرتبط دانست. به بیان دیگر، وجود شبکه گسترده‌ای از هیف‌های خارجی[1] قارچ‌های میکوریز در خاک به عنوان ادامه سیستم ریشه‌ای گیاه میزبان عمل نموده و قادر است آب و مواد غذایی را از مناطق دور از دسترس ریشه به گیاه انتقال دهد. در تحمل به خشکی، کلونیزاسیون میکوریزی با ساخت و تجمع بیشتر تنظیم کننده‌های اسمزی و ترکیب‌های آنتی‌اکسیدان قادر است گیاه را در شرایط تنش خشکی محافظت کند (Laxa et al., 2019). می‌توان گفت که کاهش در متابولیت‌های اسمزی به عنوان یک سازوکار اجتناب از خشکی و افزایش و تجمع تنظیم کننده‌های اسمزی و ترکیبات آنتی‌اکسیدان (ضد اکساینده) به عنوان یک سازوکار مقاومت به خشکی تلقی میشود. در خصوص تحمل گیاهان میکوریزی به تنش خشکی در ادامه به‌طور مبسوط بحث و توضیح داده خواهد شد. در ارتباط با سازوکارهای مقابله گیاه با تنش خشکی، علاوه بر استفاده از "اجتناب از خشکی" و "تحمل به خشکی" که در بالا به آنها اشاره گردید، دو اصطلاح دیگر نیز بکار برده می‌شود: یکی "فرار از خشکی[2]" و دیگری "بازیابی از خشکی[3]" (Lou, 2010; Shavrukov et al., 2017; Volaire, 2018). در شرایط وجود تنش خشکی، چنانچه گیاه بتواند چرخه زندگی خود را قبل از مواجه با شرایط خشکسالی شدید کامل کند به نوعی توانسته است از تنش خشکی فرار کند. این استراتژی شامل رشد سریع و گلدهی زودهنگام برای اطمینان از تولید مثل قبل از محدود شدن شدید آب است. اساساً، گیاهانی که از این سازوکار استفاده می‌کنند، با تکمیل مرحله تولید مثل خود قبل از شروع دوره خشکی، از پیامدهای اثرات آن "فرار" می‌کنند. در تعریف بازیابی از خشکی، می‌توان گفت بازیابی از خشکی به توانایی گیاه در بازیابی پس از یک دوره خشکسالی شدید و تحمل صدمات اشاره دارد که طی آن آثار تنش خشکی پس از بازیابی تا حدودی از بین می‌رود.

جریان آب در ریشه

یکی از مسیرهای جریان آب در امتداد شعاعی ریشه (فاصله بین اپیدرم ریشه و آوند چوبی) مسیر آب از طریق منافذ موجود در دیواره سلولی است. به این مسیر حرکت آب، مسیر آپوپلاستی[4] گفته می‌شود که توسط تعرق و بر پایه شیب هیدرواستاتیک صورت می‌گیرد. به منافذ موجود در دیواره سلولی که مسیر پیوسته‌ای را از اپیدرم

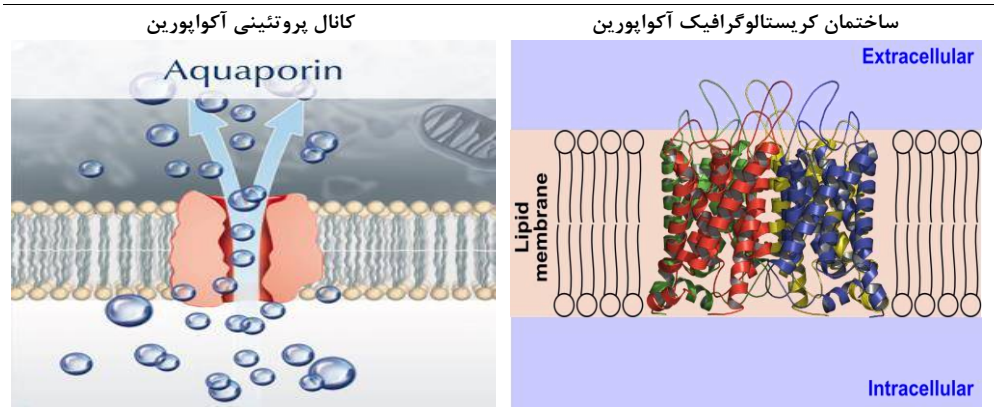
[1] Extraradical hyphae
[2] Drought escape
[3] Drought recovery
[4] Apoplastic

ریشه تا آوندهای چوبی ایجاد می‌کند فضای آزاد دونان نیز گفته می‌شود (Marschner, 2012). حرکت آب در ریشه از طریق مسیر آپوپلاستی بیشتر زمانی صورت می‌گیرد که گیاه تحت تنش خشکی خاک قرار ندارد. مسیر دیگر حرکت آب در امتداد شعاعی ریشه، انتقال سلول‌به‌سلول است که از طریق پلاسمودسماتا انجام می‌شود و به آن مسیر سیمپلاستی[1] گفته می‌شود. این مسیر بر اساس اختلاف پتانسیل اسمزی بین محلول خاک و شیره آوند چوبی تنظیم می‌گردد (Steudle and Peterson, 1998; Steudle, 2000). زمانی که گیاه تحت تنش خشکی قرار دارد مسیر سلول به سلول اهمیت بیشتری پیدا می‌کند و این مسیر نیز متأثر از تعداد و فراوانی منافذ آکواپورین[2]ها قرار می‌گیرد (Maurel et al., 2008). به آکواپورین‌ها پروتئین‌های غشایی و یا کانال‌های پروتئینی گفته می‌شود که عبور آب و یا سایر ملکول‌های کوچک را از غشاهای سلولی تسهیل می‌کنند. این منافذ در غشا پلاسمایی، شبکه‌های اندوپلاسمایی، پلاستیدها و نیز در غشاهای واکوئلی (تونوپلاست) سلول حضور دارند. دو زیر خانواده این پروتئین‌ها شامل آکواپورین‌های غشای پلاسمایی[3] و غشای واکوئلی[4] نقش مهمی را در تورژنسانس سلولی در شرایط تنش خشکی به عهده دارند. آکوآپورین‌ها نه تنها در سیگنال‌دهی اسید آبسیزیک و گونه‌های فعال اکسیژن نقش دارند بلکه در همستازی آب و املاح در ریشه‌ها و برگ‌ها به خصوص در شرایط تنش خشکی با حضور قارچ‌های میکوریز نیز نقش مهمی به عهده دارند (Conner et al., 2013; Paluch-Lubawa et al., 2024). بعضی از آکوآپورین‌های ریشه مانند PIP1;2، PIP2;1 و TIP در هدایت هیدرولیکی ریشه و همان‌طور میزان جذب آب از خاک نقش دارند. اکواپورین‌های غشایی به تعداد زیاد و وظایف گوناگون در گیاهان یافت می‌شوند. مثلاً در گیاه ذرت میکوریزی شده و تحت تنش خشکی، با استفاده از الکتروفورز ایزوالکتریک تعداد ۱۳ کمپلکس آکوآپورین شناسایی شده است (Paluch-Lubawa et al., 2024). در گیاه *آرابیدوپسیس تالیانا*[5] تعداد ۳۵ تا ۳۸ ژن (Quigley et al. 2001)، در پنبه تعداد ۷۱ ژن (Park et al., 2010)، در گوجه فرنگی تعداد ۴۷ ژن (Reuscher et al., 2013) و در خیار تعداد ۳۹ ژن (Zhu et al., 2019) اکواپورین گزارش شده است.

در برهمکنش قارچ‌های میکوریز و آکواپورین‌ها در کاهش تنش خشکی در گیاه میزبان می‌توان گفت که این کاهش از مسیرهای مختلف صورت می‌گیرد. از جمله این مسیرها می‌توان به افزایش یا تثبیت بیان ژن‌های آکوآپورین‌های کلیدی مانند PIP1;6، ***PIP2;1***، *PIP2;5* اشاره نمود. تنظیم بیان ژن به خصوص وقتی با وساطت قارچ میکوریز همراه باشد، نخستین گام و مهمترین سازوکاری است که مقاومت گیاه به تنش خشکی را فراهم می‌کند. علاوه براین، قارچ‌های میکوریز از طریق بهبود تغذیه به خصوص تغذیه فسفری گیاه، کنترل‌های هورمونی (نظیر کاهش سنتز اسید آبسیزیک) و کاهش تنش‌های اکسیداتیو (پراکسید هیدرژن) قادر است توانایی گیاه میزبان را برای جذب و انتقال آب تحت تنش خشکی افزایش دهد. تحت تنش خشکی، قارچ‌های میکوریز قادرند جریان آب را طی مسیر آپوپلاستی و نیز از طریق سیمپلاستی در گیاه میزبان و هماهنگ با افزایش بیان ژن‌های آکواپورین افزایش دهند و به این ترتیب با افزایش کارایی مصرف آب مقاومت گیاه را در مقابل تنش خشکی افزایش دهند (Barzana et al., 2012; Paluch-Lubawa et al., 2024). اینکه کدام‌یک از این مسیرها سهم بیشتری در انتقال آب در ریشه گیاه دارد بستگی به عواملی نظیر درجه تحمل گیاه به تنش خشکی، شرایط محیطی و در اینجا میزان شدت تنش خشکی و هم‌چنین میزان وابستگی گیاه به قارچ‌های میکوریز[6] دارد. با توجه به اینکه قارچ‌های میکوریز قادرند هدایت هیدرولیکی ریشه گیاه میزبان را در جهت مقابله با تنش خشکی افزایش و تنظیم نمایند، حال پرسش این است که این بهبود در هدایت هیدرولیکی ریشه توسط قارچ میکوریز بیشتر از

[1] Symplastic
[2] Aquaporin
[3] Plasma membrane Intrinsic Proteins (PIP)
[4] Tonoplast membrane Intrinsic Proteins (TIP)
[5] *Arabidopsis thalian*
[6] Mycorrhizal dependency

کدام طریق آپوپلاستی و یا سلول به سلول (آکواپورین) صورت می‌گیرد؟ برای پاسخ به این پرسش نتایج نشان می‌دهد که قارچ میکوریز *رایزوفاگوس اینترارادیسز*[1] همزیست با ذرت و گوجه فرنگی قادر است تغییر بین مسیرهای انتقال آب آپوپلاستی و سیمپلاستی را بر حسب نیاز گیاه تحت تنش تنظیم کند (Barzana et al., 2012). در واقع، توانایی گیاهان میکوریزی در انتخاب مسیر مناسب برای انتقال آب می‌تواند انعطاف‌پذیری بیشتری را در پاسخ گیاه به شدت تنش خشکی و سایر عوامل محیطی فراهم کرده و انتقال آب را مطابق با نیاز اندام‌های هوایی گیاه میزبان تنظیم کند.



شکل ۱ - در تصویر سمت چپ یک منفذ آکواپورین در میان لایه لیپیدی غشا پلاسمایی سلول به همراه حرکت ملکول‌های آب از این منفذ و در تصویر سمت راست ساختار کریستالوگرافیک پروتئینی آکواپورین که مشتمل بر زنجیره‌ای از اسید آمینه‌های سازنده است.(Nadian, 2025**).**

Figure 1. In the left image, an aquaporin pore is shown within the lipid bilayer of the cell plasma membrane, along with the movement of water molecules through this pore; and in the right image, the crystallographic structure of the aquaporin protein is illustrated, which consists of a chain of its constituent amino acids (Nadian, 2025).

میزان تأثیر قارچ میکوریز در افزایش و گسترش آکوپورین‌ها بستگی به درجه تحمل گیاه میزبان به تنش خشکی و شیوه مقابله با آن دارد. به عنوان مثال، زمانی که گیاه همزیست با قارچ میکوریز از طریق "اجتناب از خشکی" با خشکی مقابله می‌کند قارچ میکوریز اقدام به تنظیم کاهشی بیان ژن‌های آکواپورین دخیل می‌کند. این اقدام سبب می‌شود تا با بسته نگاه داشتن روزنه‌ها گیاه بتواند آب کمتری را از دست بدهد و با خشکی بیشتر مقاومت کند. به عکس در گیاهانی که از طریق "تحمل به خشکی" با تنش مقابله می‌کنند قارچ‌های میکوریز با بیان افزایشی ژن‌های دخیل نظیر *PIP1;6*، *PIP2;1*، *PIP2;5* به بهبود روابط آبی گیاه کمک می‌کنند. در این راستا، پژوهش‌های متعدد نشان می‌دهد که هم در ریشه گیاهان میزبان و هم در ساختارهای قارچ میکوریز، بیان ژن‌های کدکننده آکواپورین‌ها در شرایط خشکی افزایش می‌یابد. برای مثال، در ذرت، قارچ میکوریز موجب افزایش بیان ژن‌های *ZmPIP* و *ZmTIP* در تنش خشکی می‌شود (Barzana et al., 2014; Wang et al., 2024). بیان افزایشی ژن‌های آکواپورین منجر به بهبود انتقال آب و افزایش هدایت هیدرولیکی ریشه گیاه میزبان می‌شود (Aroca et al., 2007). این نتایج نشان می‌دهد که آکواپورین‌ها در هموستازی آب بافت‌های گیاهی نقش بسیار حیاتی ایفا می‌کنند. هر چند در بعضی از مطالعات، افزایش مقاومت به تنش خشکی در گیاه میکوریزی مشاهده شده است ولی هیچگونه افزایش بیان ژن‌های دخیل در منافذ آکواپورین‌ها ملاحظه نشد (Porcel et al., 2006; Aroca et al., 2006;

[1] *Rhizophagus intraradices*

Uehlein, et al., 2007). نتایج این مطالعه و مطالعات ملکولی مشابه دیگر (Paluch-Lubawa and Polcyn, 2024; Wang et al., 2024) مبنی بر تسهیل و افزایش انتقال آب از قارچ میکوریز به گیاه میزبان نشان می‌دهد که تنظیم همزمان فعالیت‌های آنتی‌اکسیدان و بیان ژن‌های آکواپورین هم در گیاه میزبان و هم در قارچ سازوکار لازم برای افزایش مقاومت گیاه به تنش خشکی را مهیا می‌سازد. تعامل بین آکواپورین‌ها و روزنه‌ها در شرایط تنش خشکی به گونه‌ای توسط قارچ‌های میکوریز هماهنگ می‌شود تا با توجه به شدت تنش خشکی و میزان حساس بودن گیاه به تنش خشکی بهترین روابط آبی که مناسب با نیاز گیاه میزبان است فراهم شود. مطمئناً تأمین این شرایط برای گیاه با دخالت و وساطت فعالیت‌های هورمونی و آنزیمی در یک سلسله فرایندهای پیچیده و بعضاً ناشناخته صورت می‌گیرد. با توجه به مطالب فوق، می‌توان گفت که آکواپورین‌ها نه تنها در انتقال آب و هموستازی آن نقش مهمی دارند بلکه در بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیک و بیوفیزیک نیز دخیل می‌باشند (Sun et al., 2024).

رادیکال‌های آزاد

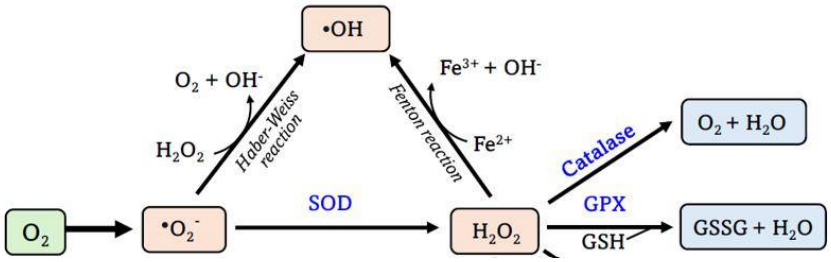
رادیکال‌های آزاد ملکول‌های ناپایداری هستند که حداقل یک الکترون جفت نشده در پوسته بیرونی خود دارند و این سبب شده تا عموماً آن‌ها واکنش‌پذیری بسیار بالایی داشته باشند. از مهمترین رادیکال‌های آزاد (جدول ۱) در سیستم‌های زیستی می‌توان به گونه‌های فعال اکسیژن و گونه‌های فعال نیتروژن اشاره نمود. این گونه‌های فعال در خلال واکنش‌های متابولیکی در اجزا سلولی مانند کلروپلاست‌ها، میتوکندری‌ها، پراکسی‌زوم‌ها، غشای پلاسمایی و دیواره سلولی تولید می‌شوند. آنها در طیف گسترده‌ای از فرایندهای زیستی مانند چرخه سلولی، جوانه‌زنی بذر، رشد و نمو، باز و بسته شدن روزنه‌ها، سیگنال دهی هورمونی، رسیدن میوه، پیری و در پاسخ به تنش‌ها غیر زنده و زنده نقش بسیار مهمی دارند (Mittler, 2017, Mhamdi and Van- Breusegem, 2018; Mansoor et al., 2022; Khan et al., 2023). علاوه بر این، گونه‌های فعال اکسیژن با حس کردن تنش‌های غیرزیستی و زیستی و با سیگنال دهی، سلول‌ها را قادر می‌سازند تا به محرک‌های مختلف پاسخ‌های دفاعی لازم را بدهند. مجموعه‌ی این پاسخ‌ها به ایجاد سازوکارهای دفاعی گیاه کمک می‌کند. گونه‌های فعال اکسیژن و گونه‌های فعال نیتروژن ممکن است به طور هم‌افزایی وظایف مشترکی را در پاسخ به تنش‌های زنده و غیر زنده از خود نشان دهند. به عنوان مثال، مونواکسید نیتروژن (NO•) در برهمکنش با گونه‌های فعال اکسیژن قادرند نقش لازم برای مقابله با پاتوژن‌های گیاهی را ایجاد نمایند (Wang et al., 2014). علی‌رغم اثرات مفید این گونه‌ها در فرایندهای حیاتی گیاه، تولید بیش از حد آنها تحت تأثیر سموم، عناصر سنگین و تنش‌ها از جمله تنش خشکی بسیار خطرناک بوده و سبب آسیب‌های فراوان اکسیداتیو سلولی می‌شوند (Maurya, 2020; Khatri and Rathore, 2022)؛ بنابراین، هموستازی گونه‌های فعال برای حفظ سطوح مناسب رادیکال‌ها در یک تعادل پویا در فرایندهای فیزیولوژیک بسیار مهم است. توضیح این‌که گونه‌های فعال نظیر اکسیژن منفرد ($^1O_2$) و یا پراکسید هیدروژن (H_2O_2) گونه‌های غیر رادیکالی نیز نامیده می‌شوند (Corpas et al., 2018). مهمترین گونه‌های فعال اکسیژن و نیتروژن در (جدول ۱) به همراه نحوه تولید آنها نشان داده شده است.

جدول ۱ - تولید برخی از گونه‌های فعال اکسیژن و نیتروژن مهم در خلال فرایندهای متابولیک

Table 1. Production of some important reactive oxygen and nitrogen species during metabolic processes.

گونه اکسیژن فعال Reactive Oxygen Species	تولید از طریق Production via	منبع Source
Superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$)	۱- فرایندهای آنزیمی و غیر آنزیمی ۲- واکنش‌های انتقال الکترون، ۳- واکنش‌های خود-اکسیداتیو، ۴- احیای تک الکترونی، ۵-تولید عمده در میتوکندری، ۶- تولید با وساطت آنزیم‌هایی مانند سیکلواکسیژناز، لیپوکسیژناز و NADH دهیدروژناز	Karpinska and Foyer, 2024; Foyer and Hanke, 2022
Hydroxyl ($OH^{\bullet}$)	۱- تولید در واکنش‌های فنتون و هابر-وایس: $Fe^{+2} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{+3} + OH^{\bullet} + OH^-$ (Fenton reaction) $O_2^{\bullet-} + H_2O_2 \rightarrow O_2 + OH^{\bullet} + OH^-$ (Haber-Weiss reaction) ۲- تولید از فرم خنثی یون‌های هیدروکسید	Halliwell and Gutteridge, 1999; Chen and Schopfer, 1999; Smirnoff and Arnaud, 2019
Peroxyl ($ROO^{\bullet}$)	۱- تولید پروکسیل از طریق واکنش بین اکسیژن ملکولی و رادیکال‌های R· و نیز تولید از طریق تجزیه پراکسیدهای آلکیل (ROOH): $R\cdot + O2 \rightarrow ROO\cdot$ $2ROOH \rightarrow ROO\cdot + RO\cdot + H_2O$ ۲- تولید توسط برهمکنش‌های رادیکالی با لیپیدها و DNA	Jomova et al. 2023; Smirnoff and Arnaud, 2019; Kozlov et al., 2024
Hydrogen peroxide H_2O_2	۱-فعال شدن آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز تحت تنش خشکی منجر به تولید سوپراکسید و پس از آن پراکسید هیدروژن. ۲- افزایش اسید آبسیزیک تحت تنش خشکی با وساطت آنزیمNADH اکسیداز و تولید پراکسید هیدروژن.	Smirnoff and Arnaud, 2019; Mak et al., 2014; Reis et al., 2022
Nitric oxide ($NO^{\bullet}$)	۱- تولید از مسیر احیایی و واکنش‌های آنزیمی: نیترات و نیتریت ردوکتاز، گزانتین اکسیدوردوکتاز، ۲- تولید از طریق واکنش‌های غیر آنزیمی نیترات در محیط اسیدی سلول گیاهی (آپوپلاسمی): $2NO_2 + 2H^+ \leftrightarrow 2HNO_2 \leftrightarrow NO^{\bullet} + NO_2 + H_2O$ $\leftrightarrow 2NO + 1/2O_2 + H_2O$	Wang et al., 2010 Leon and Costa-Broseta, 2020; Bethke et al., 2004
Peroxynitrite (OONO−)	پروکسی‌نیتریت از واکنش بین نیتریک اکسید ($NO^{\bullet}$) و آنیون سوپر اکسید ($O_2^{\bullet-}$) تشکیل می‌شود: $NO^{\bullet} + O_2^{\bullet-} \rightarrow OONO-$	Staszek and Gniazdowska, 2020

تحت تنش خشکی اولین پاسخ گیاه کاهش جذب دی‌اکسید کربن به سبب بسته شدن روزنه‌ها و نتیجتا کاهش فرایندهای فتوسنتزی است. اختلال ایجاد شده در زنجیره انتقال الکترون و عدم مصرف الکترون‌ها در فرایندهای فتوسنتزی سبب می‌شود تا الکترون‌ها پس از نشت و رسیدن به اکسیژن ملکولی (کادر سبز) قادر باشند آنرا احیا و به رادیکال‌های خطرناک سوپر اکسید ($O_2^{\cdot-}$) تبدیل نمایند (کادر صورتی). سوپراکسید تولید شده قادر است صدمات فراوانی را به اجزا سلولی و پروتئین‌های حاوی آهن و گوگرد و یا آنزیم‌های محتوی آهن (کاتالاز) و گوگرد (سیستئین و متیونین) وارد نماید. رادیکال سوپراکسید ($O_2^{\cdot-}$) توسط آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) تبدیل به پراکسید هیدروژن (H_2O_2) می‌شود، کادر صورتی (شکل ۲).



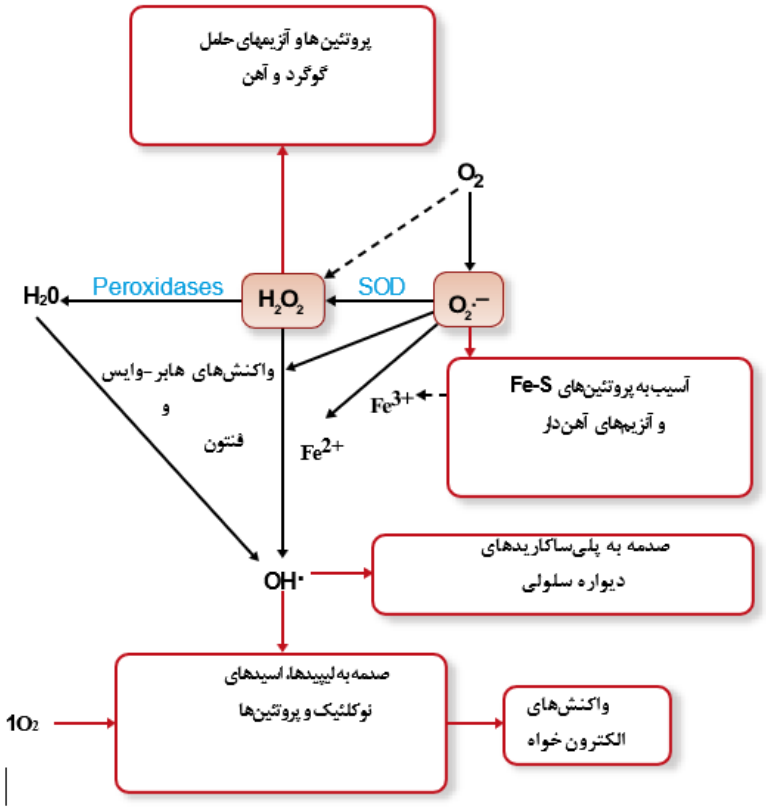
شکل ۲- مهمترین گونه‌های اکسیژن فعال و مسیر تولید آنها (با تغییراتی از Kozlov, et al., 2024)

Figure 2. Major Reactive Oxygen Species and Their Production Pathways (Adapted from Kozlov, et al., 2024)

پراکسید هیدروژن تولید شده طی دو واکنش پنتون و هابر–وایس قادر است رادیکال بسیار واکنش پذیر هیدروکسیل (OH•) را تولید کند. یون‌های هیدروکسیل، پراکسید هیدروژن، رادیکال سوپراکسید و اکسیژن تک اتمی ($^1O_2$) قادرند به کلیه ملکول‌های زیستی نظیر لیپیدها، اسیدهای نوکلئیک، پروتئین‌ها و سایر ترکیبات ساده‌تر آسیب جدی برساند (شکل۳). پراکسیداسیون لیپید به عنوان نمادی از آسیب سلولی اکسیداتیو ناشی از گونه‌های فعال اکسیژن در نظر گرفته می‌شود. از بین رفتن تمامیت سلولی نتیجه تخریب فسفولیپیدهای غشا پلاسمایی سلول است (Li et al., 2022; Sood, 2025). توجه شود در (شکل ۳) فلش‌های قرمز اثرات زیان آور گونه‌های اکسیژن فعال بر ملکول‌های زیستی را نشان می‌دهد. در (شکل ۲) اثرات سمی پراکسید هیدروژن توسط آنزیم‌های کاتالاز و گلوتامین پراکسداز (GPX) از بین می‌رود.

گیاه برای مقابله با آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از تنش سازوکارهای دفاعی خود را فعال می‌کند. گیاه پس از دریافت سیگنال‌های تنش از طریق ریشه با بیان ژن‌های پروتئین‌های تنظیمی نظیر پروتئین کینازهای وابسته به کلسیم[1] و پروتئین کینازهای فعال شده توسط میتوژن و نیز بیان ژن‌های دخیل در سنتز اسمولیت‌ها نظیر پرولین، گلیسین بتائین، پروتئین‌های LEA و قندهای محلول قادر است تنش‌های اکسیداتیو وارده را کاهش دهند (Ashraf and Foolad, 2007; Nawaz and Wang, 2020). پروتئین کینازهای وابسته به کلسیم بسیار متنوع می‌باشند و جمعاً در چهار خانواده تقسیم می‌شوند. این پروتئین‌های متصل به کلسیم نقش مهمی در فرایندهای دفاعی گیاه در شرایط تنش خشکی بازی می‌کنند. به عنوان مثال، با کلون نمودن دو ژن پروتئین کیناز وابسته به کلسیم در گیاه *آرابیدوپسیس تالیانا* و اعمال تنش خشکی در گیاه مشاهده گردید که این دو ژن در انتقال سیگنال تنش اسمزی در گیاه و افزایش مقاومت به خشکی نقش دارند (Urao et al., 1994; Delormel, and Boudsocq, 2019). نتایج مشابهی برای برنج تحت تنش نیز گزارش‌شده است (Saijo, 2001). گیاهان در شرایط طبیعی ممکن است هم‌زمان در معرض تنش‌های مختلفی قرار گیرند. در این حالت مجموعه‌ای پیچیده از پاسخ‌ها و برهمکنش آنها در سطوح فیزیولوژیک، متابولیک و مولکولی در گیاه فعال می‌شوند که با آنچه در شرایط تنش فردی رخ می‌هد متفاوت است (Demirel, et al., 2020). لذا نتایج بسیاری از مطالعات گزارش شده در این خصوص صرفاً تحت شرایط آزمایش انجام شده معتبر است و این ممکن است با آنچه در شرایط مزرعه رخ می‌دهد کاملاً مطابقت نداشته باشد.

[1] Calcium-dependent protein kinase



شکل ۳- تولید رادیکال‌های آزاد تحت تنش خشکی و اثرات زیان‌بار آنها بر ملکول‌های زیستی(با تغییراتی از Smirnoff and Arnaud, 2019).

Figure 3. Production of Free Radicals under Drought Stress and Their Deleterious Effects on Biomolecules (Adapted from Smirnoff and Arnaud, 2019)

نقش اسمولیت‌ها (متابولیت‌های) غیر آنزیمی در کاهش تنش خشکی در گیاهان میکوریزی

اسمولیت‌های گیاهی دسته‌ای از ترکیبات آلی می‌باشند که با انجام وظایف گوناگون قادرند گیاهان را در برابر تنش‌های غیر زیستی به خصوص تنش خشکی کمک کنند. مهمترین وظایف کلیدی اسمولیت‌ها تنظیم پتانسیل رطوبتی گیاه و حفظ تورژنساس سلولی، حذف گونه‌های فعال اکسیژن و به طور کلی برقراری هموستاز سلولی است که طی آن حفاظت از تمامیت سلولی و فرایندهای آن را امکان پذیر می‌سازد. نمونه‌های رایج اسمولیت‌ها شامل اسیدهای آمینه (مانند پرولین و پروتئین‌های محلول)، بتائین‌ها (مانند گلیسین بتائین)، قندها (مانند فروکتوز، گلوکز، ساکاروز)، پلی‌ال‌ها[۱] (مانند مانیتول) و غیره می‌باشند. در اینجا تنها به نقش بعضی از اسمولیت‌ها که نقش کلیدی و مهم‌تری در کاهش تنش خشکی دارند و پژوهش‌های فراوانی در مورد آن‌ها صورت گرفته شده پرداخته می‌شود.

پرولین

اسید آمینه پرولین که به عنوان یک الفا ایمینو اسید طبقه‌بندی می‌شود نقش بسیار حیاتی در افزایش مقاومت گیاه به تنش‌های محیطی نظیر خشکی و شوری دارد. پرولین به عنوان یک اسمولیت در مقایسه با سایر اسید امینه‌ها نقش مهم‌تری در تنظیم پتانسیل اسمزی بافت‌های گیاهی دارد. گیاهان معمولاً پس از دریافت تنش از طریق

[۱] پلی‌ال‌ها (Polyols) یکی از انواع الکل‌ها هستند که در ساختمان پلیمری خود حد اقل دو گروه هیدروکسیل دارند.

سیستم ریشه‌ای خود سیگنال‌هایی را برای مقابله با تنش وارده به بسیاری از اندام‌های گیاه ارسال می‌کنند تا تنظیمات سلولی خود را تغییر دهند. یکی از پاسخ‌های گیاه به تنش خشکی سنتز بیشتر پرولین است که طی آن با انجام تغییراتی از جمله در فرایندهای فیزیولوژیک، بیوشیمیایی و ملکولی قادر است پتانسیل اسمزی و در پی آن روابط آبی خود را بهبود بخشیده و امکان افزایش مقاومت گیاه به تنش خشکی را فراهم نماید (Khoyerdi et al., 2016). به طور کلی، تحت تنش خشکی گیاه با سنتز بیشتر پرولین از یک طرف باعث کاهش صدمات اکسیداتیو وارده می‌شود و از طرف دیگر با تنظیم پتانسیل اسمزی، حفظ هموستاز سلولی، بهبود هدایت هیدرولیکی نقش مهمی در حفظ متابولیسم و رشد گیاه بازی می‌کند (Chun et al., 2018; Ghosh et al., 2022; Lee et al., 2024).

افزایش دستی پرولین به گیاه تحت تنش خشکی و مقایسه آن با شرایط بدون افزایش پرولین این امکان را فراهم می‌سازد تا پاسخ‌های گوناگون گیاه به تنش خشکی مطالعه شود. در این مورد، زمانی که ذرت[1] در برابر تنش خشکی قرار گرفت مشاهده گردید در تیماری که پرولین به صورت دستی به گیاه افزوده شده بود مؤلفه‌های رشدی ذرت در مقایسه با تیمار شاهد (بدون افزایش پرولین) بهبود چشمگیر یافت (Khan et al., 2024). این بهبود رشد (۱۵۴ درصد افزایش وزن ماده خشک ریشه نسبت به تیمار شاهد) تحت تنش خشکی با افزایش پرولین به سبب بهبود پایداری غشاء سلولی، حفظ آب و محتوای کلروفیل، کاهش سطح پراکسید هیدروژن و مالون دی‌آلدئید (به ترتیب ۳۸ و ۶۷ درصد) در مقایسه با ذرت تیمار نشده با پرولین بود. افزون بر این، در تیمار افزایش پرولین و تنش خشکی فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز افزایش معنی‌داری پیدا نمود که نشان‌دهنده افزایش دفاع آنتی‌اکسیدانی گیاه است. از این گذشته، پرولین جهت انجام فرایندهای انرژی‌خواه نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد، زیرا تجزیه یک ملکول پرولین معادل تجزیه ۳۰ ملکول ATP است (Atkinson, 1977).

نتایج کارهای انجام شده نشان می‌دهد که غلظت پرولین در گیاهان میکوریزی تحت تنش خشکی نسبت به گیاهان غیر میکوریزی می‌تواند بیشتر و یا کمتر باشد (جدول ۲). تفاوت مشاهده‌شده در تجمع پرولین در گیاهان میکوریزی تحت تنش خشکی می‌تواند به اختلاف در گونه‌های گیاهی مورد استفاده، جدایه‌ها و گونه‌های مختلف قارچ‌های میکوریز آربسکولار و همچنین تفاوت در شرایط رشد، به‌ویژه شدت و مدت زمان اعمال تنش خشکی مربوط باشد. به عنوان مثال زمانی که گیاه با قارچ میکوریز گونه *دزرتیکولا*[2] همزیست شد میزان سنتز پرولین برابر با ۱۲۰ نانومول پرولین در هر گرم وزن تر گیاه بود، ولی وقتی با *رایزوفاگوس ایریگولاریس* کلنی شد میزان پرولین سنتز شده برابر با ۴۰ نانومول پرولین در هر گرم وزن تر گیاه بود (Ruiz-Lozano et al., 1995). علاوه بر این، نتایج گزارش شده نشان می‌دهد که هنگامی که گیاهان تحت تنش خشکی قرار می‌گیرند، همزیستی میکوریزی سبب بهبود در پارامترهای فیزیولوژیک در گیاهان حساس به خشکی نسبت به گیاهان مقاوم به خشکی می‌شود (Quiroga et al., 2017). لذا می‌توان گفت گیاهان میکوریزی به طور نسبی آسیب‌های ناشی از خشکی را کاهش می‌دهند و با محتوای پرولین کمتر تنش را در مقایسه با گیاهان شاهد تحمل می‌کنند. کاهش پرولین در گیاهان میکوریزی تحت تنش خشکی می‌تواند توسط افزایش اسمولیت‌های دیگری نظیر فروکتوز، ساکارز و گلوکز نیز جبران شوند، همچنانکه نتایج گزارش شده توسط Wu et al., (2017) تائیدی است بر این مطلب. بر این اساس می‌توان گفت که تجمع بیشتر پرولین در گیاهان با تحمل به خشکی کمتر به عنوان یک عامل قوی در مقابله با تنش خشکی و نیز برقراری پتانسیل رطوبتی مناسب در گیاه و خاک شناخته می‌شود (Ruiz-Lozano et al., 2011).

جدول ۲- مقایسه میزان پرولین در گیاهان میکوریزی (M) و غیر میکوریزی (NM) تحت تنش خشکی

[1] *Zea mays* L.

[2] *Blaszkowskia deserticola.*

Table 2. Comparison of Proline Content in Mycorrhizal (M) and Non-Mycorrhizal (NM) Plants under Drought Stress

کلونیزاسیون Colonization	میزان پرولین Proline Content	گیاه Plant	منبع Source
M	کمتر	زنجبیل	Bhosale1 and Shinde, 2011
NM	بیشتر		
M	بیشتر	برنج	Ruiz-Sanchez et al., 2010
NM	کمتر		
M	کمتر	*Cyclobalanopsis glauca*	Zhang et al., 2014
NM	بیشتر		
M	بیشتر	گوجه فرنگی	Chitarra et al., 2016b
NM	کمتر		
M	بیشتر	کاهو	Ruiz-Lozano et al., 2011
NM	کمتر		
M	کمتر	پرتقال سه‌برگه	Wu et al., 2017
NM	بیشتر		
M	بیشتر	نیشکر	Spinoso-Castillo, et al., 2023
NM	کمتر		
M	بیشتر	گردو	Wen et al., 2024
NM	کمتر		
M	کمتر	تره فرنگی	Jokar et al., 2015
NM	بیشتر		

افزایش و یا کاهش پرولین در گیاهان میکوریزی تحت تنش خشکی توسط سازوکارهای ملکولی تنظیم می‌شود. پرولین دارای رفتار سیگنال‌دهی برای فعال کردن عملکردهای ژنی خاص است که برای بازیابی گیاه از تنش‌ها بسیار مهم هستند؛ به عبارت دیگر، افزایش سنتز پرولین با دریافت سیگنال‌دهی تنش خشکی آغاز می‌شود و منجر به القای فاکتورهای رونویسی پاسخ‌دهنده به تنش می‌شود و در نتیجه ژن‌های دخیل در سنتز و تجمع پرولین بیان می‌شوند. زمانی که تحت تنش خشکی میزان پرولین در گیاه میکوریزی افزایش می‌یابد، این افزایش به دلیل فعالیت بیشتر آنزیم دخیل در سنتز پرولین[1] (*P5CS*) است (Abo-Doma et al. 2011). در واقع قارچ میکوریز قادر است بیان ژن‌های کدکننده آنزیم فوق‌الذکر را افزایش دهد که منجر به سنتز بیشتر پرولین و در نتیجه تجمع بیشتر آن خواهد شد. در صورتی‌که امکان جذب بیشتر عناصر غذایی و کاهش استرس خشکی توسط قارچ میکوریز فراهم شود، بخشی از پرولین می‌تواند توسط آنزیم دی‌هیدروژناز پرولین (*PrDH*) تجزیه شود و تجمع آن در گیاه کاهش یابد. مطمئناً نوع گیاه، نوع قارچ میکوریز و شدت تنش می‌تواند بر این سازوکارها و سنتز پرولین اثر گذار باشد. اگر چه نقش مثبت قارچ‌های میکوریز در کاهش اثرات تنش خشکی در گیاه میزبان به خوبی نشان داده شده است ولی اینکه این نقش از کدام طریق مرفولوژیک، فیزیولوژیک، بیوشیمیایی، ملکولی و یا ترکیبی از آنها باشد به خوبی شناخته نشده است. نتایج یک مطالعه مولکولی نشان داد که در شرایط تنش خشکی، گیاهان میکوریزیِ سویا و کاهو در مقایسه با گیاهان غیرمیکوریزی، تجمع پروتئین کمتری دارند که می‌تواند با تغییر در بیان ژن‌های سنتز پرولین مرتبط باشد. افزون بر این، پژوهشگران گزارش کردند که القای ژن *p5cs* تنها سازوکار دخیل در حفاظت گیاهان میکوریزی در برابر تنش خشکی نیست (Porcel et al., 2005)

نتایج بعضی از مطالعات نشان می‌دهد که اثرات مثبت پرولین در کاهش تنش خشکی می‌تواند در بر همکنش با دسته‌ای از هورمون‌ها قرار گیرد و میزان این اثرات را افزایش و یا کاهش دهد. به عنوان مثال زمانی که گیاه *آرابیدوپسیس تالیانا* تحت تنش خشکی قرار می‌گیرد سنتز بیشتر هورمون براسینواستروئید[2] در گیاه سبب افزایش بیشتر تحمل گیاه به تنش خشکی می‌شود (Fabregas et al.,

[1]- *پیرولین-۵-کربوکسیلات سنتتاز* (p5CS)

[2] Brassinosteroid

2018). براسینواستروئیدها (BRs) ششمین دسته از هورمون‌های گیاهی هستند که برای اولین بار در دانه‌های گرده کلزا کشف شدند. این هورمون‌های استروئیدی ضمن بهبود مؤلفه‌های رویشی و زایشی گیاه قادرند پاسخ گیاه به تنش‌های محیطی مانند خشکی را تنظیم کنند. نتایج مشابهی مبنی بر اثر براسینواستروئید در افزایش پرولین در گیاه مریم گلی قرمز (Zhu et al., 2014)، لوبیا سبز (Anuradha and Rao, 2008)، فلفل (Khamsuk et al., 2018) نیز گزارش‌شده است (جدول ۳). علاوه بر براسینواستروئیدها، اتیلن در گندم نیز افزایش پرولین را سبب می‌شود (Khan et al. 2015). طبق جدول ۳، مشاهده می‌شود که هورمون اسید سالیسیک سبب کاهش پرولین در گیاه لولیوم چند ساله (Wang et al., 2013) و گیاه *آرابیدوپسیس تالیانا* میشود (Alcazar et al. 2006). به منظور درک بهتر از روابط پیچیده و تقریباً ناشناخته بین فیتوهورمون‌ها و اسمولیت‌های اسمزی در کاهش تنش خشکی لازم است مطالعات بیشتری به خصوص با استفاده از زیست‌شناسی مولکولی مسیرهای سیگنال‌دهی فیتوهورمونی در طول تنش‌های غیرزیستی را مشخص نمود و با تغییرات و بهبود ویژگی‌های مولکولی لازم مقاومت و تاب‌آوری گیاهان را در مواجه با تنش خشکی افزایش داد.

جدول ۳- ذیل سنتز و تجمع پرولین در گیاهان مختلف در برهمکنش با بعضی از هورمون‌های گیاهی

Table 3. Below the synthesis and accumulation of proline in different plants in interaction with some plant hormones

منبع Source	گیاه Plant	هورمون Hormone	پاسخ پرولین Proline Response
Zhu, et al., 2014	مریم گلی	براسینواستروئید[1]	افزایش
Anuradha andRao,2008	لوبیا سبز	براسینواستروئید	افزایش
Khamsuk, et al., 2018	فلفل تند	براسینواستروئید	افزایش
Fabregas, et al., 2018	*آرابیدوپسیس تالیانا*	براسینواستروئید	افزایش
Alcazar, et al. 2006	*آرابیدوپسیس تالیانا*	سالیسیک اسید	کاهش
Wang, et al. 2013	لولیوم چند ساله	سالیسیک اسید	کاهش
Khan, et al. 2015	گندم	اتیلن	افزایش

پروتئین‌های LEA

در شرایط تنش خشکی، افزون بر تجمع ترکیبات آلی با وزن‌های مولکولی متفاوت که پیش‌تر به عنوان ترکیبات محافظت‌کننده به آن‌ها اشاره شد، شواهد جدید نشان می‌دهد که تجمع پروتئین‌های نوشناخته‌ای موسوم به LEA[2] در گیاه، نقش مؤثری در کاهش تنش‌های غیرزیستی مانند خشکی، شوری و سرما ایفا می‌کنند. این پروتئین‌ها بسیار آب‌دوست هستند و اولین بار در پنبه به عنوان "وفور پروتئین‌های اواخر دوره جنینی" (LEA) " شناسایی و مطرح شدند و دارای انواع مختلفی می‌باشند و جمعاً به هشت گروه تقسیم می‌شوند (Abdul-Aziz et al., 2021). ژن‌های پروتئین LEA در اکثر گیاهان وجود دارند و در زمان بروز تنش با بیان این ژن‌ها مقاومت و پایداری در گیاه افزایش می‌یابد (Sun et al., 2021). در یک مطالعه‌ی انتقال ژن[3]، با انتقال *HAV1*، ژن پروتئین LEA ، از جو به برنج تجمع فراوان این پروتئین در برگ و ریشه برنج مشاهده گردید (Xu et al., 1996). در واقع در نسل دوم برنج تراریخته شده، افزایش مقاومت به تنش خشکی به خوبی مشاهده گردید. بر اساس این نتایج و دیگر نتایج مشابه (Zhang et al., 2009) می‌توان، گفت با فعال نمودن و بیان ژن‌های متنوع LEA در گیاهان مختلف و یا با انتقال این ژن‌ها به گیاهان دیگر می‌توان مقاومت به تنش در گیاه را بالا برد. در مطالعاتی چند، میزان بیان این ژن‌ها تحت تأثیر

[1] Brassinosteroid
[2] Late Embryogenesis Abundant proteins
[3] Transgenic

قارچ‌های میکوریز نیز مورد ارزیابی قرار گفته است. به عنوان مثال، تأثیر قارچ‌های میکوریز *گلوموس موسه* (*فنلیفورمیس موسه*) و *گلوموس اینترارادیسز* (*رایزوفاگوس اینترارادیسز*) بر روی فعالیت و بیان ژن دیهیدرین[1] (پروتئین‌های گروه LEA D-11) در گیاه سویا تحت تنش خشکی نشان می‌دهد که میزان تجمع پروتئین LEA و یا به عبارت دیگر سطح بیان ژن کد کننده پروتئین LEA در گیاهان میکوریزی تحت تنش خشکی کمتر بود تا در گیاهان غیر میکوریزی (Porcel, et al., 2005). نتایج مشابه دیگری نیز گزارش شده است (Ruiz-Lozano, et al., 2006). این نتایج نشان می‌دهد که تجمع پروتئین احتمالاً تنها سازوکاری نیست که از طریق آن قارچ‌های میکوریز آربسکولار قادرند گیاه میزبان را در برابر تنش خشکی محافظت کنند. به بیان دیگر، کاهش تجمع پروتئین‌های LEAدر گیاهان میکوریزی نسبت به گیاهان غیرمیکوریزی ممکن است ناشی از کاهش شدت تنش خشکی در گیاه میکوریزی باشد، وضعیتی مشابه آنچه در مورد پرولین نیز گزارش شده است.

گلیسین بتائین

گلیسین بتائین یکی دیگر از تنظیم کنندگان اسمزی است که سنتز و تجمع آن تحت تنش‌های غیر زنده نظیر خشکی در گیاه افزایش می‌یابد. بتائین علاوه بر آنکه تنظیم اسمزی در گیاه را بر عهده دارد قادر است محافظت از تمامیت سلولی، خنثی نمودن گونه‌های فعال اکسیژن و نیز محافظت از فرایندهای فتوسنتزی در شرایط تنش خشکی را به عهده گیرد (Ma et al., 2007; Hussain et al., 2008). بعضی از گیاهان تحت تنش خشکی قادر به سنتز و تجمع گلیسین بتائین می‌باشند نظیر لوبیا، پنبه، جو و نخود حال آنکه گیاهانی نظیر برنج، سیب‌زمینی، فلفل، سویا و گوجه‌فرنگی به عنوان گیاهان غیر تجمع‌کننده گلیسین بتائین شناخته شده‌اند. با این حال، برخی از گیاهان که قادر به تجمع گلیسین بتائین نیستند، از نظر ژنتیکی اصلاح شده‌اند تا تولید گلیسین بتائین را از طریق بیان بیش از حد ژن‌های سنتز کننده بتائین مانند کولین اکسیداز، کولین مونواکسیژناز و بتائین آلدهید دهیدروژناز افزایش دهند (Li et al., 2025). نقش قارچ‌های میکوریزا–آربسکولار در سازوکارهای دفاعی گیاه میزبان از طریق سنتز و انباشت گلیسین بتائین در مطالعات تنش خشکی نیز مورد مطالعه قرار گرفته است. به عنوان نمونه، در گوجه‌فرنگی تیمار شده با گونه‌های مختلف قارچ‌های میکوریز آربسکولار سنتز و افزایش تجمع گلیسین بتائین را نشان می‌دهد. این سازوکار دفاعی ضمن افزایش مؤلفه‌های رشدی و تغذیه‌ای، مقاومت گیاه میزبان را در مقابل تنش خشکی افزایش می‌دهد (Said et al, 2025). سنتز بیشتر گلیسین بتائین در گیاه تحت تنش خشکی قادر است سازو کارهای دفاعی گیاه در مقابله و کاهش تنش‌های اکسیداتیو از طریق کاهش غلظت گونه‌های فعال اکسیژن را در ذرت افزایش دهد (Begum et al., 2019). این مثال‌ها نشان می‌دهند که گوناگونی گیاهان میزبان می‌تواند تحت تأثیر همزیستی با قارچ‌های میکوریز آربسکولار و تنش خشکی سطح گلیسین بتائین را افزایش دهد، هرچند نوع و شدت پاسخ ممکن است به گونه‌های قارچی و شرایط تنش وابسته باشد.

نقش فیتوهورمون‌های آنتی‌اکسیدان در کاهش تنش خشکی

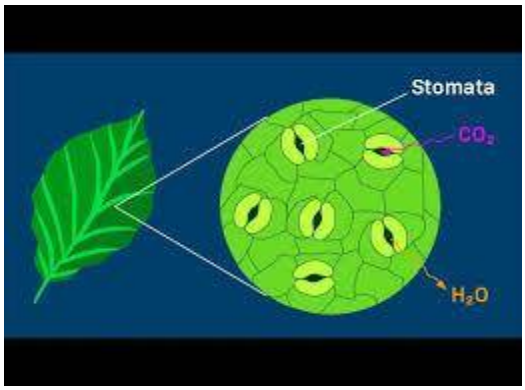
هورمون‌های گیاهی نقش مهمی در مقاومت گیاهان به تنش خشکی ایفا می‌کنند. آنها به عنوان یک پیام‌رسان کلیدی در پاسخ گیاه به تنش خشکی عمل می‌کنند و با تنظیم فرآیندهایی مانند بسته شدن روزنه‌ها، کاهش تعرق و تنظیم مؤلفه‌های رشد به گیاهان کمک می‌کنند تا از آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از خشکی در امان بمانند. این اثرات هورمونی با حضور قارچ‌های میکوریز توانایی گیاهان در مقابله با تنش خشکی را بیشتر می‌کنند. هورمون‌های متعددی نظیر اسید آبسیزیک، اسید جیبرلیک، اسید ایندول استیک، اسید ایندول بوتریک، اسید جاسمونیک واتانول با

[1] Dehydrin

وظایف مختلف و در یک هماهنگی و هم‌افزایی به هم پیوسته و گاها متضاد قادرند اثرات مخرب تنش خشکی در مؤلفه‌های رشدی، تغذیه‌ای و فیزیولوژیک گیاه را به مقدار قابل‌توجهی کاهش دهند.

اسید آبسیزیک

اسید آبسیزیک به عنوان یک هورمون حیاتی در فرایندهای مهم نظیر تنظیم بسته شدن روزنه‌ها، کاهش تعرق، تنظیم رشد و تحریک سازوکارهای دفاعی گیاه شرکت می‌کند و بنابراین نقش اساسی در افزایش مقاومت گیاهان به تنش خشکی ایفا می‌کند (Hsu et al., 2021). سنتز بیشتر اسید آبسیزیک یکی از پاسخ‌های اولیه و مهم گیاه در شرایط تنش خشکی است. اسید آبسیزیک توسط آنزیم NCED[1] در گیاه سنتز می‌شود و تحت تنش‌های غیر زنده فعالیت این آنزیم بیشتر و نتیجتاً سنتز اسید آبسیزیک نیز بیشتر می‌شود (Gavassi et al., 2021).



شکل ۴- سلول‌های محافظ روزنه‌ها
Figure 4 - Stomatal Guard Cells

شاید بسته شدن روزنه‌ها اولین پاسخ بیشتر گیاهان به تنش خشکی باشد که طی آن هدر رفتن آب از طریق تعرق را کاهش می‌دهد و این منجر به بهبود کارایی مصرف آب[2] می‌شود (Nemeskeri et al., 2015). اگر چه گفته می‌شود که بسته شدن روزنه‌ها صرفاً یک واکنش فیزیکی است بدون آنکه فرایند متابولیکی در آن صورت گیرد (Pirasteh-Anosheh et al., 2016)، باوجود این، اسید آبسیزیک تولید شده در ریشه از طریق یک مسیر سیگنال‌دهی مولکولی در سلول‌های محافظ روزنه با دخالت پروتئین فسفاتاز و پروتئین کیناز و خروج یون‌های Ca^{2+} از کانال‌های یونی کلسیم شرایط بسته شدن روزنه‌ها را فراهم می‌کند (Wei et al., 2025). تحت تنش خشکی اسید آبسیزیک در برگ‌ها تجمع می‌یابد. مثلاً در ذرت ابتدا در برگ‌های جوان‌تر و سپس در برگ‌های مسن‌تر و سپس به سلول‌های محافظ اطراف روزنه‌ها منتقل می‌شود. این افزایش در انباشت اسید آبسیزیک باعث ایجاد یک دسته سیگنال‌دهی مولکولی می‌شود که در پی آن بسته شدن روزنه‌ها و نتیجتاً کاهش تلفات آب را به دنبال خواهد داشت (Wilkinson and Davies, 2010; Li et al., 2017). علاوه بر این، اسید آبسیزیک قادر است به طور غیرمستقیم باعث بهبود تغذیه گیاه و نتیجتاً افزایش مقاومت گیاه به تنش خشکی شود. به عنوان مثال جمعیت و وظایف بسیاری از باکتری‌های دخیل در بهبود تغذیه گیاه توسط اسید آبسیزیک تنظیم می‌شود (Salas-Gonzalez et al., 2021). همزیستی گیاه و قارچ میکوریز تحت تنش خشکی منجر به سنتز بیشتر اسید آبسیزیک می‌شود. این افزایش نه تنها باعث بسته شدن روزنه‌های گیاه می‌شود بلکه با هم‌افزایی وظایف قارچ‌های میکوریز و گروه‌های میکروبی مفید خاک

[1] Nine-cis-epoxycarotenoid dioxygenase

[2] Water use efficiency

مقاومت گیاه به تنش خشکی بیشتر افزایش می‌یابد. نتایج مطالعات نشان می‌دهد زمانی که گیاهانی نظیر کاهو[1] و گوجه‌فرنگی[2] که با کمبود اسید آبسیزیک مواجه هستند، توسط قارچ *رایزوفاگوس اینترارادیسز* کلونیز می‌شوند و تحت تنش خشکی قرار می‌گیرند، میزان تحمل به خشکی در گیاهان میکوریزی به‌طور چشمگیری بیشتر از گیاهان شاهد است. این افزایش تحمل به خشکی در تیمارهای میکوریزی به تنظیم افزایشی بیان ژن‌های کلیدی دخیل در سنتز اسید آبسیزیک نسبت داده می‌شود؛ فرآیندی که در نهایت موجب بهبود کارایی مصرف آب در گیاه می‌شود (Porcel et al., 2005; Porcel et al., 2006; Xu et al., 2018). این یافته‌ها نشان می‌دهد که نقش قارچ‌های میکوریز آربوسکولار در افزایش تحمل به خشکیِ گیاه میزبان ممکن است با دخالت ژن مربوط به گروهی از پروتئین‌های آنزیمی (*Gi14-3-3*) که تنظیم‌کننده پاسخ‌های نهایی گیاه هستند، انجام شود. مطمئناً عوامل متعدد دیگری می‌تواند بر این نتایج اثر گذار باشند. مثلاً زمانی که تنش خشکی ملایم باشد سنتز اسید آبسیزیک در گیاه میکوریزی افزایش می‌یابد ولی با شدت یافتن تنش خشکی (۱/۳– مگاپاسکال) میزان سنتز اسید آبسیزیک در گیاه (گوجه‌فرنگی) میکوریزی نسبت به گیاه غیرمیکوریزی کاهش می‌یابد (Chitarra et al., 2016a,b). این موضوع نشان می‌دهد که گیاهان غیرمیکوریزی احتمالاً با تنش خشکی شدیدتری نسبت به گیاهان میکوریزی مواجه هستند و در نتیجه، برای مقابله با شدت بیشتر تنش و فعال‌سازی سازوکارهای دفاعی متنوع، مقادیر بالاتری اسید آبسیزیک تولید و انباشت می‌کنند.

اینکه چرا میزان اسید آبسیزیک در گیاهان میکوریزی برخلاف برخی گزارش‌های پیشین تحت تنش خشکی کمتر مشاهده می‌شود، احتمالاً می‌تواند به نقش ژن‌های دخیل در تنظیم این مسیر مربوط باشد. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که بیان ژن‌های مرتبط با سنتز و سیگنال‌دهی اسید آبسیزیک شامل *LeNCED1* و ۳ ژن دیگر *LePYL*، *LePP2C*، *LeSnR2K* در بسته شدن سلول‌های روزنه نقشی نداشتند. در عوض، تحت تنش خشکی شدید، ژن‌های اختصاصی کدکننده آکواپورین‌ها مانند *NIP (LeNIP1)* بیان می‌شوند، موضوعی که بیانگر نقش مستقیم آکواپورین‌ها در تنظیم پاسخ روزنه‌ای و سازگاری گیاهان میکوریزی با خشکی است. القای هم‌زمان ژن‌های آکواپورینِ قارچی و گیاهی تحت تنش خشکی در این مطالعه نشان می‌دهد که هر دو همزیست به‌صورت فعال و هماهنگ در تنظیم پاسخ گیاه به تنش خشکی مشارکت می‌کنند، مشارکتی که در نهایت به بهبود وضعیت آبی گیاه در شرایط کم‌آبی منجر می‌شود. با توجه به مطالعات انجام‌شده، می‌توان نتیجه گرفت که تنش‌های محیطی بسته به شدت و مدت تنش و همچنین بر اساس گونه گیاه و قارچ میکوریز، قادرند مجموعه‌ای از تغییرات فیزیولوژیک، هورمونی و ملکولی را از طریق تغییر در بیان ژن‌های مرتبط در گیاه ایجاد کنند. هر یک از این تغییرات می‌تواند به‌عنوان سیگنالی برای گیاه عمل کرده و مسیرهای مختلف پاسخ به استرس را فعال نماید.

اسیدهای جیبرلیک

اسیدهای جیبرلیک (GAs) به عنوان یک گروه هورمون‌های گیاهی نقش بسیار مهمی در تنظیم فرایندهای چندگانه رشد و توسعه گیاه (نظیر جوانه زنی بذر، گلدهی، طویل شدن ساقه و هیپوکوتیل) دارند. این هورمون‌ها دارای انواع بسیار زیادی می‌باشند که هرکدام ساختار شیمیایی و خواص منحصر به‌فردی دارند. بعضی از اسیدهای جیبرلیک فقط در قارچ‌ها وجود دارند، گروه دیگر فقط در گیاه و بعضی دیگر هم در گیاه و هم در قارچ وجود دارند. در بین آنها GA3 پرکاربردترین است و نقش آن در فرایندهای رشد گیاه به خوبی نشان داده شده است (Gupta and Chakrabarty, 2013). اسیدهای جیبرلیک نه تنها در مؤلفه‌های رشدی و تغذیه‌ای گیاه دخالت دارند بلکه

[1] *Lactuca sativa*

[2] *Lycopersicon esculentum*

وظایف دیگری نظیر تنظیم روابط آبی در گیاه و کاهش تنش خشکی را به عهده دارند.

بسیاری از مطالعات نشان می‌دهند که اسید آبسیزیک و جیبرلیک‌ها که تعادل بهینه آنها برای رشد طبیعی گیاه ضروری است، در فرآیندهای متعدد به طور متضاد با هم تعامل دارند (Rodríguez-Gacio et al., 2009, Zhou et al., 2022). به عنوان مثال، این دو هورمون در درمانسی (خواب) و جوانه زنی بذر به طور متضاد عمل می‌کنند. اسید آبسیزیک بر عکس اسیدهای جیبرلیک یک تنظیم‌کننده مثبت القای خواب و حفظ آن است و مانع جوانه زنی بذر است (Kucera et al., 2005). این دو هورمون همچنین فرآیندهای متابولیکی خود را به صورت آنتاگونیسمی تنظیم می‌کنند. بنابراین، سطح پایین اسید آبسیزیک بیوسنتز اسید جیبرلیک را افزایش می‌دهد و برعکس (Seo et al., 2006; Oh et al., 2007; Martin-Rodrigues et al., 2016). این برهمکنش آنتاگونیسمی بین اسید آبسیزیک و اسید جیبرلیک می‌تواند به گونه‌ای در تنظیم و توسعه قارچ‌های میکوریز نیز دخیل شود. افزایش اسید جیبرلیک فراوانی آربسکول‌ها در هیف‌های داخلی ریشه گوجه فرنگی همزیست با قارچ میکوریز را کاهش می‌دهد، این کاهش توسط اسید آبسیزیک جبران و افزایش می‌یابد (Martin-Rodriguez et al., 2016). لذا ملاحظه می‌شود که نسبت متعادل GA/ABA برای رشد طبیعی گیاه بسیار مهم است. از سوی دیگر، مشخص شده است که غلظت‌های پایین اسید آبسیزیک موجب افزایش کلونیزاسیون میکوریزی در یونجه سربریده[1] می‌شود، در حالی‌که افزایش غلظت این هورمون باعث کاهش کلونیزاسیون میکوریزی می‌گردد. با این حال، برای تنظیم مثبت کلونیزاسیون میکوریزی از طریق مسیر وابسته به اسید آبسیزیک، زیرواحد هولوآنزیمِ پروتئین فسفاتاز (PP2AB'1) قادر است این کاهش را جبران کند (Charpentier et al., 2014). این نشان می‌دهد که اسید آبسیزیک در سطوح مختلف غلظتی در گیاه همزیست با قارچ میکوریز و در فرایندهایی نظیر فعال نمودن آنزیم فسفاتاز PP2A امکان برقراری و پیش‌برد کلونیزاسیون میکوریزی را فراهم می‌سازد. لذا می‌توان گفت که گیاهان در تعاملات هورمونی شامل روابط هم‌افزایی و آنتاگونیسمی چگونه پاسخ خود را جهت بیشترین بهره‌برداری تنظیم می‌کنند، هر چند سازوکار بسیاری از این پاسخ‌ها در تعاملات هورمونی هنوز به خوبی شناخته نشده است.

نتایج یک مطالعه دیگر نشان داد که وقتی پرتقال سه برگچه[2] با قارچ میکوریز *رایزوفاگوس اینترارادیسز* همزیست می‌شود و تحت تنش خشکی قرار می‌گیرد، نه تنها مؤلفه‌های رشدی گیاهان میکوریزی مانند وزن ریشه، برگ و ساقه در مقایسه با گیاهان شاهد افزایش می‌یابد، بلکه مؤلفه‌های فیزیولوژیک گیاه نظیر سرعت فتوسنتز خالص، غلظت دی‌اکسیدکربن بین‌سلولی و هدایت روزنه‌ای نیز به‌طور معنی‌داری بهبود می‌یابند (Zou et al., 2025). با این حال، در شرایط تنش خشکی، غلظت هر دو نوع اسید جیبرلیک (GA3 و GA1) در گیاهان میکوریزی کمتر از گیاهان غیرمیکوریزی بود. این کاهش ناشی از تنظیم کاهشی بیان ژن‌های دخیل در بیوسنتز اسید جیبرلیک (*PtCPS, PtKAO* و *PtGA3ox*) و تنظیم افزایشی بیان ژن دخیل در غیرفعال‌سازی اسید جیبرلیک (*PtGA2ox*) است که توسط قارچ میکوریز تنظیم می‌شود. در واقع، تحت تنش خشکی، کلونیزاسیون میکوریزی با کاهش بیوسنتز اسید جیبرلیک و محدود کردن بیومس گیاهی، شرایطی شبیه به «اجتناب از خشکی» را برای گیاه میکوریزی فراهم می‌کند. علاوه بر این تحت تنش خشکی، کاهش اسمولیت‌های اسمزی و هورمن‌های گیاهی درگیاهان میکوریزی در مقایسه با گیاهان غیرمیکوریزی که در بعضی از نتایج گزارش شده است (Ruiz-Lozano et al., 2001) می‌تواند به دلیل شدت بیشتر تنش بر گیاهان غیرمیکوریزی نسبت به گیاهان میکوریزی باشد (Chen et al., 2020)، هر چند تداخل وظایف هورمون‌های آنتی اکسیدان و همین‌طور سایر شرایط محیطی و خاکی نیز دخیل می‌باشند.

[1] *Medicago truncatula*

[2] Trifoliate orange (*Poncirus trifoliata L.)*

اسید جیبرلیک و قارچ‌های میکوریز آربوسکولار هر دو می‌توانند به طور مثبت بر رشد گیاه و تحمل به خشکی تأثیر بگذارند. به عنوان مثال در یک فرایند هم‌افزایی اسید جیبرلیک و قارچ میکوریز، اسید جیبرلیک قادر است رشد ریشه و تراکم ریشه‌های مویی گیاه را افزایش دهد و این سطح بیشتری از ریشه را برای کلونیزاسیون فراهم می‌نماید و به این ترتیب قارچ‌های میکوریز جذب مواد غذایی و آب را بهبود بخشیده و منجر به افزایش مقاومت گیاه به تنش خشکی می‌شود. با وجود این، نتایج یک مطالعه نشان می‌دهد که در همزیستی میکوریز نوع "آروم[1]" اسید جیبرلیک مانع از کلونیزاسیون ریشه می‌شود (Tominaga et al., 2020a,b) حال آنکه در قارچ میکوریز نوع "پاریس[2]" اسید جیبرلیک تشکیل هیفوپودیوم[3] در سطح ریشه گیاه و ورود هیف‌های خارجی به داخل ریشه گیاه میزبان را تسهیل و تشدید می‌کند (McGuiness, et al., 2019, Tominaga, et al., 2020b). علت عدم کلونیزاسیون ریشه گیاه در قارچ میکوریز نوع آروم ممانعت اسید جیبرلیک از بیان ژن‌های *RAM1*[4] و همولوگ آن *RAM2* دخیل در برقراری کلونیزاسیون ریشه است.

پروتئین‌های DELLA

پروتئین‌های DELLA[5] یک خانواده از مهار کننده‌های رشد هستند که در مسیر سیگنال دهی اسید جیبرلیک به عنوان پاسخی به تنش‌های محیطی نقش دارند. هنگامی که سطح اسید جیبرلیک بالا است، پروتئین‌های DELLA تخریب می‌شوند و امکان انجام فرآیندهای رشد مانند گسترش سلول‌ها، جوانه‌زنی و گلدهی را فراهم می‌کنند. بالعکس هنگامی که سطح اسید جیبرلیک پایین است یا سایر تنش‌ها حضور دارند، پروتئین‌های DELLA تجمع یافته و رشد را سرکوب می‌کنند. همان‌طور که در بالا اشاره گردید افزایش اسید جیبرلیک تشکیل و فراوانی آربسکول‌ها را در ریشه‌های گیاه میکوریزی کاهش می‌دهد. لذا، پروتئین‌های DELLA، که سرکوب‌کننده‌های سیگنال‌دهی اسید جیبرلیک هستند و در پیوند چندین مسیر سیگنال‌دهی عمل می‌کنند، امکان افزایش تشکیل آربوسکول‌ها را فراهم می‌سازند (Floss, et al., 2013). پروتئین‌های DELLA در تعاملات تقابلی با اسیدهای جیبرلیک (GA- DELLA) می‌توانند به عنوان تنظیم‌کننده‌های کلیدی در تمام فرآیندهای رشد گیاه از جمله جوانه‌زنی بذر، طویل شدن ساقه، گسترش برگ، القای گلدهی و طویل شدن هیپوکوتیل عمل نمایند. ویرایش هدفمند DELLA با استفاده از ابزارهای مهندسی ژنتیک امکان دستیابی به ارقام زراعی با صفات مورد نظر (نظیر عملکرد بالا، مقاوم به تنش‌ها، زودرس نمودن) را فراهم می‌سازد. پروتئین‌های DELLA برای تشکیل آربسکول در همزیستی گیاه با قارچ‌های آربسکولار میکوریزا ضروری هستند. اسید آبسیزیک با تنظیم فعالیت DELLAو مسیرهای سیگنال‌دهی مرتبط، تشکیل آربسکول و کلونی‌سازی قارچ میکوریزا را تقویت می‌کند. بیان بیش از حد DELLA می‌تواند نقص‌های تشکیل آربسکول در جهش‌های فاقد DELLA را جبران کند. این تعامل اسید آبسیزیک و پروتئین‌های DELLA نقش مهمی در بهبود مقاومت گیاه به تنش‌های محیطی و کارایی همزیستی میکوریزایی ایفا می‌کند (Floss et al., 2013). به طور خلاصه، پروتئین‌های DELLA نقش کلیدی در تشکیل آربسکول و عملکرد همزیستی میکوریزایی دارد و اسید آبسیزیک با تنظیم فعالیت پروتئین‌های DELLA مسیرهای سیگنال‌دهی مرتبط، مقاومت گیاه به تنش‌ها را تقویت می‌کند.

اسید ایندول استیک

[1] Arum type
[2] Paris type
[3] Hyphopodium
[4] RAM1 یک فاکتور رونویسی است که بیان ژن‌های ضروری برای توسعه قارچ‌های میکوریزا را تنظیم می‌کند.
[5] پروتئین DELLA یک تنظیم کننده منفی سیگنال دهی اسید جیبرلیک و متشکل از اسید امینه‌های اسید آسپارتیک، اسید گلوتامیک، لوسین و آلانین می‌باشد.

اسید ایندول استیک یا اکسین یکی دیگر از هورمون‌هایی است که نقش حیاتی در کاهش تنش خشکی در گیاهان همزیست با قارچ‌های میکوریز دارد. این هورمون کلیدی نقش حیاتی در توسعه ریشه به خصوص ریشه‌های مویی، پاسخ به تنش خشکی، تنظیم و تسهیل انتقال آب، کاهش تنش‌های اکسیداتیو و تأثیر بر سیگنال‌دهی هورمونی را به عهده دارد. این اثرات با حضور قارچ‌های میکوریز در شرایط تنش خشکی تشدید می‌شود (Chareesri et al., 2020; Chareesri et al., 2020). این هورمون همچنین نقشی بسیار مهم در تنظیم سنتز استریگولاکتون[1] دارد. استریگولاکتون‌ها بر روی رشد هیف‌های قارچ‌های میکوریز و انشعاب‌بندی آنها و بطور کلی برقراری همزیستی میکوریزا نقش مهمی دارند(Mitra et al., 2022). پروتئین‌های PIN[2] خانواده‌ای از پروتئین‌ها در گیاهان هستند که نقش اساسی در انتقال هورمون گیاهی اکسین ایفا می‌کنند. این پروتئین‌ها به عنوان حامل‌های خروجی عمل می‌کنند و حرکت اکسین به خارج از سلول‌ها را تسهیل می‌کنند (Mohanta and Bae, 2017). این انتقال قطبی برای بسیاری از فرآیندهای رشد و تکوین گیاه ضروری است. در تائید این نتایج، زمانی که پرتقال ۳ برگچه توسط قارچ میکوریز *فنلیفورمیس موسه* همزیست می‌شود ساختار و معماری ریشه گیاه میزبان شامل مجموع طول ریشه، حجم ریشه، تراکم ریشه‌های مویی به میزان قابل توجهی افزایش می‌یابد (Guo et al.,2024). این افزایش با سرعت جریان کل اسید ایندول استیک و رشد مجموع ریشه‌های مویی همبستگی قابل توجهی دارد. این یافته‌ها نشان می‌دهد که اکسین نقش مهمی در رشد ریشه‌های مویی مرکباتِ همزیست با قارچ‌های میکوریز ایفا می‌کنند و ژن *PtPIN6* نیز به‌عنوان یک ژن کلیدی بالقوه، در تنظیم انتقال اکسین از ریشه به برگ‌ها اهمیت ویژه‌ای دارد. علاوه بر این، زمانی که برنج با ترکیبی از قارچ‌های میکوریز *رایزوفاگوس ایریگولاریس* و *فنلیفورمیس موسه* همزیست و تحت تنش خشکی قرار می‌گیرد غلظت ایندول استیک اسید با افزایش تنش خشکی به شدت افزایش می‌یابد. این افزایش در میزان ایندول استیک اسید در برنج میکوریزی به بهبود هدایت روزنه‌ای و نتیجتا به افزایش مقاومت گیاه به تنش خشکی منجر می‌شود (Chareesri et al., 2020)؛ بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که هم‌افزایی میان قارچ‌های میکوریز و ایندول‌استیک اسید نقش مهمی در تقویت مقاومت گیاهان میکوریزی در برابر خشکی دارد. این بهبود از طریق تقویت پاسخ‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی، افزایش بیان ژن‌های دخیل در مقاومت به تنش و تنظیم مولفه‌های رشدی مرتبط با سنتز بیشتر اکسین در گیاه حاصل می‌شود.

اسید جاسمونیک

اسید جاسمونیک و از مشتقات آن متیل جاسمونات[3] که هر دو به عنوان جاسمونات‌ها شناخته می‌شوند از هورمون‌های مهم گیاهی هستند که به شیوه‌های مختلف نظیر کاهش اتلاف آب اندام هوایی با بسته نگاه داشتن روزنه‌ها، بهبود فعالیت‌های ضد اکسایشی، بهبود تغذیه گیاه، حفظ تمامیت غشا سلولی، برقراری توازن با وظایف سایر هورمون‌های گیاهی قادر است توان دفاعی گیاه در برابر استرس‌های محیطی از جمله تنش خشکی را افزایش دهند. جاسمونات‌ها همچنین به عنوان ملکول‌های سیگنال‌دهی قادرند بیان ژن‌های متعدد دخیل در پاسخ به تنش‌های غیر زنده را تنظیم نمایند (Li et al., 2018). اسید جاسمونیک به همراه اسید سالیسیلیک با اثرات هم‌افزایی خود قادرند مقاومت به تنش خشکی را در گیاه بابونه آلمانی[4] به شدت افزایش دهند. این اثر هم‌افزایی ضمن حفظ تمامیت غشا سلولی سبب افزایش غلظت پرولین و قندهای محلول شده که در نهایت کاهش پتانسیل آب سلولی و نیز افزایش مقاومت گیاه به تنش خشکی را در پی دارد (Nazarli et al., 2014). در یک مطالعه دیگر، محلول‌پاشی برگی گیاه سویا[5] با متیل جاسمونات تحت

[1] Strigolactone
[2] PIN= Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1
[3] Methyl jasmonate
[4] *Matricaria chamomilla*
[5] *Glycine max* L.

تنش خشکی سبب افزایش اسمولیت‌های آلی نظیر اسیدهای چرب اشباع و غیراشباع، فلاونوئیدها، اسید فنولیک و هیدروکربورهای محلول گردید و این افزایش‌ها منجر به افزایش مقاومت گیاه در مقابل تنش خشکی گردید (Mohamad and Latif, 2017).

متیل جاسمونات قادر است با بعضی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نظیر پراکسیداز، کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز رابطه هم‌افزایی بر قرار کند و به این طریق تحمل گیاه به تنش خشکی را افزایش دهد. (Zhang et al., 2024). هم‌افزایی این دو هورمون و آنزیم نه تنها موجب فعال‌سازی مسیرهای دفاعی وابسته به گونه‌های فعال اکسیژن می‌شود بلکه به بیان بیشتر ژن‌های دخیل در سنتز اسید جاسمونیک و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان منجر می‌شود و در نهایت موجب کاهش اثرات اکسیداتیو در گیاه می‌شود (Wasternack and Song, 2017). بطور کلی می‌توان گفت اسید جاسمونیک و مشتقات آن نقش‌های اساسی در افزایش مقاومت گیاهان به تنش‌های زیستی و غیر زیستی دارند. اسیدهای جاسمونیک عمدتاً با فعال کردن مکانیسم‌های دفاعی گیاه که عمدتاً شامل آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و سایر ترکیبات دفاعی هستند، تحمل به تنش در گیاه را القا می‌کنند. به منظور درک بهتر ما از سازوکارهای مولکولی اسیدهای جاسمونیک لازم است دقیقا مکانیسم‌های حرکت آن‌ها از طریق ناقل و نیز تعاملات هم‌افزایی یا آنتاگونیستی بین اسیدهای جاسمونیک و سایر مسیرهای سیگنال‌دهی هورمونی مورد مطالعه دقیق‌تر قرار گیرد.

در خصوص نقش برهمکنش قارچ‌های میکوریز آربوسکولار و اسید جاسمونیک در کاهش تنش خشکی در گیاه میزبان مطالعاتی نیز صورت گرفته شده است. از جمله نتایج نشان می‌دهد که گیاه لوبیا[1] ، همزیست با قارچ میکوریز آربوسکولار و تحت تنش خشکی، موجب افزایش قابل توجه مؤلفه‌های رشدی ریشه در تیمارهای دریافت متیل جاسمونات می‌شود. بیشترین افزایش رشد ریشه زمانی مشاهده شد که هم قارچ میکوریزا حضور داشت و هم تیمار متیل جاسمونات اعمال شده بود. این افزایش رشد، ناشی از بیان افزایشی ژن‌های آکوآپورین و بهبود هدایت هیدرولیکی ریشه در مقایسه با گیاهان شاهد است (Romera et al., 2016). شنبلیله[2] یک گیاه لگومینوز است که متابولیت‌های ثانویه‌ای مانند تریگونلین[3] و دیوسژنین[4] تولید می‌کند. این ترکیبات به‌طور گسترده در پزشکی و صنایع غذایی مورد استفاده قرار دارد. در یک پژوهش، نقش تلقیح قارچ میکوریز آربسکولار به‌تنهایی یا در ترکیب با تیمار متیل‌جاسمونات بر تولید این متابولیت‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که هم قارچ میکوریز و هم متیل‌جاسمونات، به‌ویژه در ترکیب با یکدیگر، نه تنها سبب بهبود مؤلفه‌های رشدی گیاه می‌شود بلکه نقش مؤثری در افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه شنبلیله تحت تنش خشکی ایفا می‌کنند (Irankhah et al., 2020). این همرفزایی قارچ میکوریز و متیل جاسمونات می‌تواند راهبردی کارآمد برای افزایش تولید ترکیبات مهم مورد نیاز و سازگاری گیاهان دارویی با تنش خشکی باشد.

اتیلن

اتیلن (C_2H_4) اگر چه سالهاست که به عنوان هورمون گیاهی مسئول رسیدن میوه شناخته شده است ولی وظایف گوناگون دیگری در گیاه را به عهده دارد. این هورمون گازی شکل نه تنها در تنظیم انواع مؤلفه‌های رشدی از جمله جوانه‌زنی بذر، رشد ریشه، طویل شدن ساقه و دمبرگ، باز و بسته شدن روزنه‌ها، فرایند پیری و ریزش برگ‌ها دخالت دارد بلکه دفاع در برابر عوامل بیماری‌زا، پاسخ به تنش‌های غیرزنده و تنظیم و هموستاز وظایف هورمون‌ها را نیز به عهده دارد. اتیلن بر خلاف سایر فیتوهورمون‌ها اثرات بازدارندگی بر کلونیزاسیون میکوریزی دارد. این بازدارندگی به دلیل سرکوب بیان ژن‌های دخیل در بیوسنتز استریگولاکتون است که برای تشکیل، فعال‌سازی و توسعه قارچ‌های میکوریز مورد نیاز هستند.

[1] *Phaseolus vulgaris*
[2] *Trigonella foenum-graecum*
[3] Trigonelline
[4] Diosgenin

سنتز و تجمع SMAX1[1] در گیاه که با افزایش غلظت اتیلن همراه است عامل اصلی بازدارندگی همزیستی میکوریزی می‌باشد. نتایج نشان می‌دهد زمانی که SMAX1 از گیاه برنج حذف گردید توسعه کلونیزاسیون میکوریزی توسط *رایزوفاگوس ایریگولاریس* در گیاه برنج تحت تنش خشکی ظاهر گردید (Choi et al., 2020; Das et al., 2025). غلظت اتیلن در شدت بازدارندگی کلونیزاسیون میکوریزی بسیار مهم است. در غلظت‌های بسیار جزئی اتیلن (بین ۰/۰۱ تا ۰/۱ میلی‌لیتر در لیتر) جوانه‌زنی اسپور و رشد هیف‌ها به خوبی صورت می‌گیرد، ولی زمانی که غلظت اتیلن به ۰/۲ میلی‌لیتر در لیتر می‌رسد رشد هیف‌ها به شدت کاهش پیدا می‌کند و با افزایش غلظت اتیلن به ۱/۰ میلی‌لیتر در لیتر توسعه میکوریزی از جمله درصد کلونیزاسیون ریشه‌ی پرتقال سه برگچه به شدت با کاهش مواجه می‌شود (Ishii et al., 1996). در مورد پاسخ گیاه پیاز به افزایش اتیلن، نتایج نشان می‌دهد که اتیلن در مقدار بسیار جزئی (۰/۶ میکرولیتر بر لیتر) سبب کاهش توسعه میکوریزی پیاز می‌شود، هر چند ریشه‌های میکوریزی قادر بودند اتیلن را پس از ۲۰ روز، احتمالاً از طریق اکسیداسیون و یا متابولسیم از بین ببرند (Geil and Guienl, 2002).

علاوه بر نقش تنظیم‌کنندگی منفی اتیلن در همزیستی میکوریزی که به خوبی ثابت شده است، اتیلن با بعضی از هورمون‌ها در پاسخ گیاه به تنش‌های محیطی نیز برهمکنش از خود نشان می‌دهد. به عنوان مثال، زمانی که نخود[2] با قارچ میکوریز *رایزوفاگوس ایریگولاریس* تلقیح و اثر اتیلن در برهمکنش با دو هورمون اسید جیبرلیک و براسینواستروئید[3] در توسعه کلونیزاسیون میکوریزی مطالعه گردید، نتایج نشان داد که نقش منفی اتیلن نه تنها بر مؤلفه‌های رشدی گیاه و کلونیزاسیون قارچی مستقل از دو هورمون دیگر عمل می‌نماید بلکه بر میزان گره‌زایی در ریشه نخود نیز اثر منفی دارد (Foo et al., 2016). با توجه به تداخل نقش‌های هورمونی در گیاه، به‌ویژه در شرایط تنش‌های محیطی و در تعامل با قارچ‌های میکوریزا، مطالعاتی برای بررسی چگونگی این برهمکنش‌ها انجام شده است. نتایج نشان می‌دهد که هورمون‌های اسید آبسیزیک و اتیلن در تنظیم کلونیزاسیون میکوریزی نقش دارند و بخشی از اثرات منفی کمبود اسید آبسیزیک در گیاهان میکوریزی، ناشی از تولید بیش از حد اتیلن است (Feraceto et al., 2017). این یافته‌ها ضمن تأیید نتایج پیشین، نشان می‌دهد که علاوه بر تعاملات هورمونی، تنظیم دقیق سطح هر هورمون برای توسعه بهینه کلونیزاسیون قارچی ضروری است (Martin-Rodrigues et al., 2011; Feraceto et al., 2017). در نمودار ذیل در (شکل ۵) اثرات آنتاگونیسمی اتیلن و اسید آبسیزیک بر مؤلفه‌های رشدی گیاه تحت تنش خشکی خلاصه شده است.

بهبود تغذیه فسفری گیاه

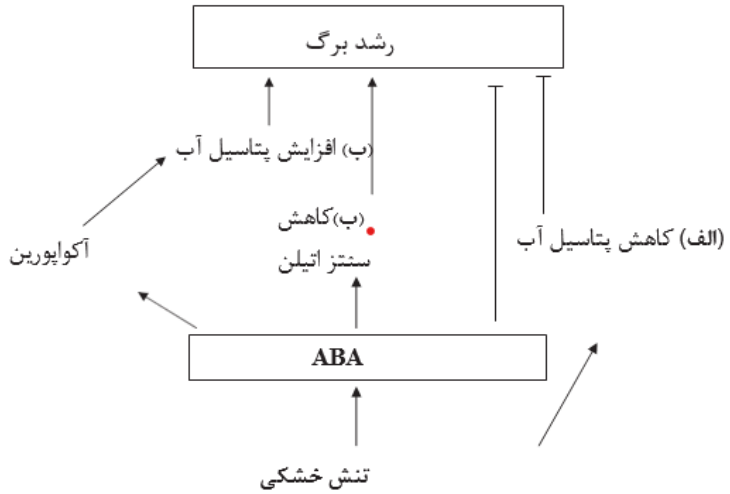
گیاهان میکوریزی در شرایط تنش خشکی، افزون بر فعال‌سازی مجموعه‌ای از سازوکارهای فیزیولوژیک (مانند افزایش آسیمیلاسیون دی‌اکسید کربن و بهبود کارایی سیستم نوری II)، بیوشیمیایی (از جمله سنتز تنظیم‌کننده‌های اسمزی و آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی) و بهبود روابط آبی گیاه (نظیر افزایش هدایت روزنه‌ای)، قادرند از طریق بهبود وضعیت تغذیه‌ای گیاه، به‌ویژه تغذیه فسفری نیز نقش مهمی در افزایش تحمل گیاه به تنش خشکی ایفا کنند. سرعت جریان انتقال فسفر (میزان فسفر جذب شده در واحد طول ریشه و در واحد زمان) در گیاهان میکوریزی نسبت به گیاهان غیر میکوریزی بسیار بیشتر است (Nadian et al., 2013b). لذا این می‌تواند به رشد بیشتر ریشه، انشعاب بندی و انبوهی آن کمک کرده و در پی آن توانایی گیاه میکوریزی را در جذب بیشتر آب بالا ببرد. به عنوان مثال افزایش تنش خشکی اگرچه جذب کل

[1] یک پر.تئین گیاهی است که در فرایندهای گیاهی نظیر رشد، جوانه زنی بذر، معماری ریشه و در پاسخ به استرس‌ها عمل می‌کند. این مهارکننده جزء کلیدی مسیر سیگنال‌دهی کاریکین (Karrikin) است.

[2] *Pisum sativum* L.

[3] brassinosteroid

(محتوی) فسفر را در دو رقم سورگوم کلنی شده با قارچ میکوریز کاهش داد ولی میزان فسفر جذب شده در واحد طول ریشه کلنی شده افزایش پیدا نمود (Nadian, 2011). در این مطالعه، افزایش تنش خشکی با افزایش مجموع طول هیف‌های خارجی قارچ میکوریز (*Rhizophagus intraradices*) در واحد طول ریشه کلنی شده نیز مشاهده شد که با میزان فسفر جذب شده در واحد طول ریشه کلنی شده کاملاً همخوانی دارد. این نشان می‌دهد که قارچ میکوریز در شرایط تنش خشکی برای آسیب کمتر به مؤلفه‌های رشدی و تغذیه‌ای گیاه میزبان کارایی جذب عناصر غذایی را افزایش می‌دهد. تحت تنش‌های محیطی مانند شوری، خشکی و تراکم خاک اگر چه طول ریشه گیاه میکوریز کاهش معنی‌داری پیدا می‌کند، ولی هر سانتیمتر از این ریشه در مقایسه با ریشه‌ی شاهد (شرایط بدون تنش) توانایی جذب بیشتری از عناصر غذایی به خصوص عناصر کم تحرکی نظیر فسفر را دارد (Nadian et al., 2013a; Nadian et al., 1997).



شکل ۵- کاهش پتانسیل آب برگ (الف) تحت تأثیر تنش خشکی و افزایش پتانسیل آب برگ (ب) تحت تأثیر آنتاگونیسمی دو هورمون اسید آبسیزیک، ABA (افزایش سنتز) و اتیلن (کاهش سنتز) با وساطت منافذ آکواپورین در شرایط تنش خشکی (با تغییراتی از Wilkinson and Davies, 2010)

Figure 5. Reduction in leaf water potential (A) under drought stress and increase in leaf water potential (B) under the antagonism of two hormones, abscisic acid, ABA (increased synthesis), and ethylene (decreased synthesis), mediated by aquaporin channels under drought stress conditions (modified from Wilkinson and Davies, 2010)

نقش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در کاهش تنش خشکی در گیاهان میکوریزی

همان‌طور که قبلاً اشاره گردید رادیکال‌های آزاد در بسیاری از فعالیت‌های متابولیکی گیاه نقش بسیار مهم و حیاتی دارند. تحت شرایط معمول و بدون تنش، توازن و پایداری بین تولید و مصرف گونه‌های فعال اکسیژن برقرار است و فعالیت‌های متابولیک گیاه به خوبی انجام می‌گیرد. با وجود این، تحت تأثیر تنش‌های محیطی مانند تنش خشکی تولید گونه‌های فعال در مقایسه با مصرف و حذف آن‌ها پیشی می‌گیرد و سبب انباشت آن‌ها و شروع فرایندهای اکسیداتیو در سلول‌های گیاهی می‌شود. در ابتدای افزایش این گونه‌های فعال، سیگنال‌های تنش شامل هموستاز ردوکس، سیگنال‌دهی آنتی‌اکسیدان‌ها و تولید/حذف گونه‌های فعال در سطح سلولی جهت فرایندهای حفاظتی به خصوص در گیاهان میکوریزی صورت می‌گیرد (Jajic et al., 2015; Nath et al., 2016; Mansoor et al., 2022). گیاهان با افزایش فعالیت

آنزیم‌های آنتی اکسیدان که در ذیل به دسته‌ای از مهم‌ترین آنها اشاره مختصر خواهد شد قادرند اثرات مخرب ناشی از فرایندهای اکسیداتیو را کاهش دهند. در واقع، نتیجه فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان حفظ تعادل اکسیداتیو، پایداری ساختارهای سلولی، بهبود کارایی فتوسنتز و افزایش تحمل کلی گیاه در برابر خشکی است (Gill and Tuteja, 2010; Hasanuzzaman et al., 2020).

سوپراکسید دیسموتاز یک آنزیم کلیدی است که نقش حیاتی در سیستم‌های دفاع سلولی ایفا می‌کند. آنزیم آنتی‌اکسیدان سوپراکسید دیسموتاز در سه شکل مجزا وجود دارند: Cu/Zn-SOD، Fe-SOD و Mn-SOD (Khan et al., 2023). ایزوفرم‌های این آنزیم در سیتوزول، کلروپلاست‌ها، پراکسی‌زوم‌ها و میتوکندری‌ها وجود دارند و نقش عمده‌ای را درکاتالیز نمودن رادیکال‌های سوپراکسید ($O_2^{\bullet-}$) به پراکسید هیدروژن (H_2O_2) به عهده دارند. پراکسید هیدرژن حاصل، سوبسترای لازم برای واکنش هابر–وایس را فراهم می‌کند (جدول ۱ و شکل ۲) و به این ترتیب خطر تولید رادیکال‌های هیدرواکسید را کاهش می‌دهد. در ژنوم گیاه *آرابیدوپسیس تالیانا* تا کنون سه نوع متالوآنزیم سوپراکسید دیسموتاز شامل: ژن *Cu/Zn-SOD* (در کلروپلاست، پراکسی‌زوم و سیتوزول)، ژن *Fe-SOD* (در تیلاکوئید، استرومای کلروپلاست و هسته) و ژن *Mn-SOD* (در میتوکندری) گزارش شده است (Tyagi et al., Jamdhade et al., 2017; 2019). این در حالی است که در آنالیز فیلوژنی گیاه پنبه ابریشم قرمز[1] از راسته پنیرک سانان جمعاً ۱۳ژن در سه گروه *FeSODs*، *MnSODs* و *Cu/ZnSODs* شناسایی شده‌اند (Luo, et al., 2024).

مطالعات متعددی به بررسی برهم‌کنش آنزیم سوپراکسید دیسموتاز با قارچ‌های میکوریز آربسکولار تحت شرایط تنش خشکی پرداخته‌اند تا مشخص شود آیا این دو عامل می‌توانند اثر هم‌افزایی در کاهش آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از گونه‌های فعال اکسیژن داشته باشند یا خیر. نتایج این مطالعات نشان می‌دهد که کلونیزاسیون میکوریزی (*رایزوفاگوس ایریگولاریس*) قادر است فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز را در گیاه پنبه ابریشم قرمز تحت تنش خشکی به مقدار قابل توجهی افزایش دهد (جدول ۴). این تشدید فعالیت آنزیمی نتیجه بیان افزایشی انواع ژن‌های دخیل در فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز در گیاهان میکوریزی در مقایسه با گیاهان غیرمیکوریزی می‌باشد. در واقع، تحت تنش خشکی، همزیستی میکوریزی نه تنها قادر است مؤلفه‌های رشدی گیاه را افزایش دهد بلکه با افزایش بیان ژن‌های سوپراکسید دیسموتاز قادر است بسیاری از گونه‌های مخرب اکسیژن فعال (نظیر پراکسید هیدروژن و آنیون سوپراکسید) را کاهش دهد (Li, et al., 2022; Luo, et al., 2024).

اثرات مشترک آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی که در بالا به آنها اشاره گردید و آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی نظیر آسکوربیک اسید و گالوتاتیون نیز قدرت دفاعی گیاهان میکوریزی را در سمیت زدایی از گونه‌های اکسیژن فعال و همستازی آن افزایش می‌دهند. افزون بر این، کلونیزاسیون میکوریزی به منظور افزایش توانمندی گیاه در مقابل تنش خشکی قادر است بیان ژن‌های پروتئین کیناز فعال‌شده با میتوژن[2] (MAPK) را افزایش دهد. به این ترتیب، این پروتئین‌های پیام رسان با انتقال سیگنال‌های تنش خشکی از سطح سلول به داخل سلول (DNA هسته سلول) وظایف سلولی را تنظیم و نهایتاً در هموستازی گونه‌های فعال اکسیژن نقش مهمی را بازی می‌کنند (Huang et al., 2020). افزایش بیان ژن‌های دخیل در فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در قارچ میکوریز جیگسپورا *مارگاریتا* همزیست *با گیاهان* یونجه سربریده[3] و آهو ماش ژاپنی[4] تحت تنش به کاهش اثرات اکسیداتیو منجر می‌شود (Lanfranco, et

[1] *Bombax ceiba*

[2] MAPK (Mitogen-activated protein kinase)، یک نوع پروتئین کیناز است که در انتقال سیگنال‌های سلولی نقش دارد و در پاسخ به تحرکات خارجی (نظیر تنش‌ها) فعال می‌شود.

[3] *Medicago truncatula*

[4] *Lotus japonicus*

al., 2005). نتایج مشابه دیگری مبنی بر افزایش فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز در گیاهان (کاهو و گوجه‌فرنگی) تحت تنش خشکی و همزیست با قارچ‌های میکوریز نیز گزارش‌شده است (Ruiz-Lozano et al., 1996, 2001; Pozo et al., 2002). هرچند نقش هم‌افزایی قارچ‌های میکوریز و آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز در کاهش تنش خشکی در گیاه میزبان به خوبی شناخته شده است ولی مسیر و سازوکارهای آن به خوبی مشخص نشده است. لذا لازم است مطالعات بیشتری صورت گیرد تا معلوم شود که این هم‌افزایی در کاهش اثرات تنش خشکی صرفاً به علت افزایش فعالیت ایزوفرم‌های آنزیم سوپراکسید دیسموتاز است و یا در ترکیب با بهبود مؤلفه‌های رشدی، هورمونی و مؤلفه‌های کلونیزاسیون (تراکم آربسکول‌ها و طول مجموع هیف‌های بیرونی و درون‌سلولی) است.

کاتالاز یکی دیگر از شناخته‌شده‌ترین متالوآنزیم‌هایی است که عمدتاً در اندامک‌های سلولی به نام پراکسی‌زوم‌ها قرار دارد و وظایف متعددی را به عهده دارد. از مهم‌ترین نقش آن‌ها می‌توان به محافظت سلولی در مقابل صدمات اکسیداتیو، برقراری توازن (هموستازی) واکنش‌های اکسیداسیون و احیا و فرایندهای فتوسنتز اشاره نمود. در واقع، آنزیم کاتالاز در گیاهان به صورت انواع مختلفی وجود دارد که هر یک از آن‌ها که به آن ایزومر گفته می‌شود، وظایف خاص خود را ایفا می‌کند. مهم‌ترین نقش ضداکسایندگی کاتالاز کاهش صدمات اکسیداتیو ناشی از تأثیر پراکسید هیدروژن است. این آنزیم قادر است پراکسید هیدروژن بسیار مخرب را به دو مولکول آب و یک ملکول اکسیژن ($2H_2O_2 \rightarrow 2\ H_2O + O_2$) تجزیه و اثرات اکسایندگی آن را از بین ببرد (شکل ۶). این فرایند طی دو مرحله (Bendou et al., 2021) بر طبق واکنش‌های ذیل صورت می‌گیرد:

مرحله اول $H_2O_2 + \text{Enzyme-Fe}^{3+} \rightarrow H_2O +$ ترکیب اول

مرحله دوم ترکیب اول $+ H_2O_2 \rightarrow \text{Enzyme-Fe}^{3+} + H_2O + O_2$

ترکیب اول[1]، ترکیب ناپایدار و واسطه‌ای است و شامل آنزیم اکسیده شده‌ای است که طی آن آهن آنزیم به ظرفیت بیشتر (Fe^{+4}) می‌رسد. به این ترتیب حضور آنزیم کاتالاز از تجمع پراکسید هیدرژن و اثرات اکسیداتیو آن در گیاه تحت تنش جلوگیری می‌نماید.

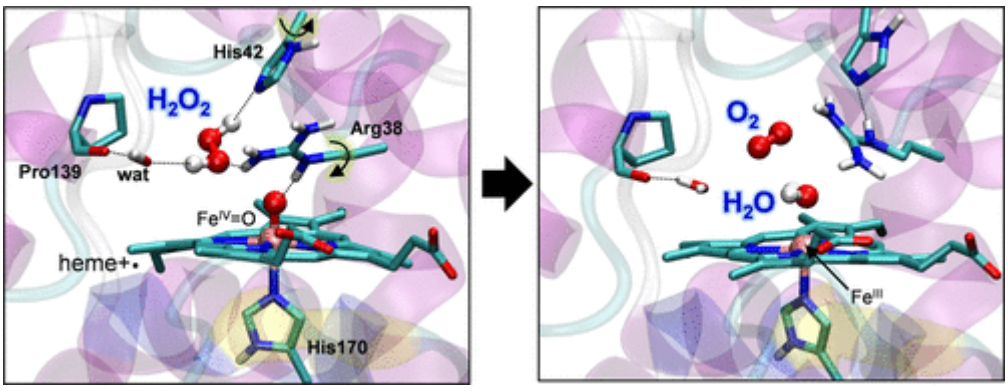
جدول ۴- میزان فعالیت برخی از آنزیم‌های ضد اکساینده (میکرومول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین) در ریشه گیاه پنبه ابریشم قرمز (Bombax ceiba) میکوریزی (M) توسط رایزوفاگوس ایریگولاریس و غیر میکوریزی (NM) تحت تنش خشکی (Li, et al.2022).

[1] یک رادیکال π-کاتیون پورفیرین حاوی Fe^{IV} . منظور از پورفیرین بخشی از آنزیم کاتالاز است که محتوی آهن است.

Table 4. Activity of some antioxidant enzymes (µmol/min/mg protein) in the root of Red Silk Cotton tree (Bombax ceiba), mycorrhizal (M) by Rhizophagus irregularis and non-mycorrhizal (NM) under drought stress (Li, et al. 2022.(

ریشه گیاه میکوریزی Mycorrhizal plant root	ریشه گیاه غیرمیکوریزی Mycorrhiza-enriched plant root	فعالیت آنزیم‌های ضد اکساینده Activity of antioxidant enzymes
33.2a	17.70_b	سوپراکسید دیسموتاز
02.59_a	02.05_b	کاتالاز
22.58_a	19.63_b	آسکوربات پراکسیداز
29.01_a	19.23_b	گلوتاتیون ردوکتاز
25.23_a	17.84_b	پراکسید
83.65_a	50.15_b	گلوتاتیون پراکسیداز
29.66_a	12.81_b	دهیدرو اسکوربات ردوکتاز
06.30_a	03.49_b	مونودهیدروآسکوربات ردوکتاز

صدمات اکسیداتیو ناشی از پراکسید هیدروژن در گیاه می‌تواند هم‌زمان با حضور قارچ‌های میکوریز و هم با فعالیت کاتالاز شدیداً کاهش پیدا نماید. در واقع، کلونیزاسیون میکوریزی ریشه گیاه میزبان سبب می‌شود تا پراکسید هیدروژن ناشی از تنش خشکی در گیاه به خارج از غشا پلاسمایی سلول‌های ریشه گیاه انتشار یابد[1] و به این ترتیب از صدمات این اکساینده مهم کاسته شود. از طرف دیگر آنزیم کاتالاز همان‌طور که در بالا به آن اشاره گردید قادر است بخش دیگری از پراکسید هیدروژن را تجزیه و آنرا به آب و ملکول اکسیژن تبدیل نماید. به عنوان مثال در گیاه داغداغان یا تادار[2] افزایش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز با حضور قارچ میکوریز منجر به کاهش غلظت پراکسید هیدروژن و نتیجتا کاهش صدمات اکسیداتیو می‌شود (Sepahvand et al., 2021).



[1] Efflux

[2] *Celtis Caucasica* L.

شکل ۶- مراحل و مسیر تجزیه پراکسید هیدروژن در برهمکنش با آنزیم کاتالاز: مرحله اول: تصویر سمت چپ و مرحله دوم: تصویر سمت راست (Campomanes, et al., 2015**). در مرحله اول: اتصال پراکسید هیدروژن به قسمت انتهایی هِم، نزدیک مرکز آهن سه ظرفیتی. دپروتونه شدن O-H پراکسید هیدروژن به توسط هستیدین آنزیم کاتالاز (His42) که طی آن آهن آنزیم به طور موقت به ظرفیت ۴ میرسد. این ماده حد واسط (ترکیب یک) بسیار واکنش پذیر و ناپایداراست. در مرحله دوم: ترکیب اول با یک مولکول دیگر پراکسید هیدروژن واکنش داده، ضمن خنثی شدن کامل پراکسید هیدروژن و تبدیل آن به آب و مولکول اکسیژن آنزیم کاتالاز مجدداً به وضعیت قبلی و نرمال خود که محتوی آهن سه ظرفیتی است بر میگردد.**

Figure 6 - Stages and pathway of hydrogen peroxide decomposition in interaction with the enzyme catalase: First stage: left image and Second stage: right image (Campomanes, et al., 2015). In the first stage: Binding of hydrogen peroxide to the distal end of the heme, near the ferric iron center. Deprotonation of the O-H of hydrogen peroxide by the histidine of the catalase enzyme (His42), during which the enzyme's iron temporarily reaches a valence of 4. This intermediate (Compound I) is highly reactive and unstable. In the second stage: Compound I reacts with another molecule of hydrogen peroxide, completely neutralizing the hydrogen peroxide and converting it to water and an oxygen molecule, while the catalase enzyme returns to its original, normal state containing ferric iron.

علاوه بر سازو کارهای اشاره شده قبلی که قارچ‌های میکوریز جهت کاهش تنش خشکی بکار می‌برند، کلونیزاسیون میکوریزی می‌تواند شیوه‌های دیگری را نیز برای کاهش تنش اکسیداتیو در گیاه میزبان فعال کند. یکی از این سازوکارها، افزایش انتشار یا خروج پراکسید هیدروژن از غشای پلاسمایی به خارج از سلول است؛ فرآیندی که موجب کاهش تجمع این مولکول اکسیداتیو درون سلول و در نتیجه کاهش آسیب‌های ناشی از آن می‌شود. این همستازی سطح پراکسید هیدروژن در بافت‌های گیاهی به حفظ تعادل ردوکس، کاهش آسیب غشایی و بهبود تحمل گیاه به تنش خشکی کمک می‌کند (Li et al., 2014; Zou et al., 2015; Huang et al., 2017).

بحث و چشم‌اندازهای آینده

تنش خشکی یکی از مهم‌ترین تنش‌های غیرزیستی محدودکننده تولیدات کشاورزی به‌شمار می‌رود که علاوه بر کاهش عملکرد گیاهان، امنیت غذایی و پایداری اکوسیستم‌های زراعی و طبیعی را نیز با چالش مواجه می‌سازد. گیاهان در پاسخ به این تنش، مجموعه‌ای از سازوکارهای تطبیقی شامل تغییرات مرفولوژیک، فیزیولوژیک، بیوشیمیایی و مولکولی را فعال می‌کنند. در این راستا، همزیستی با قارچ‌های میکوریز آربسکولار به‌عنوان یک مکانیسم طبیعی و کارآمد، نقش مهمی در افزایش تحمل گیاهان نسبت به تنش خشکی ایفا می‌کند. این همزیستی از طریق برهمکنش‌های هم‌افزا در سطح سلولی و مولکولی تنظیم هماهنگ مسیرهای سیگنال‌دهی و الگوهای بیان ژنی در هر دو همزیست، موجب بهبود سازگاری گیاهان در شرایط کمبود آب می‌شود؛ فرایندی پیچیده که برخی از جنبه‌های آن همچنان نیازمند بررسی‌های بیشتر است (Ruiz-Lozano et al., 2012).

یکی از مسیرهای این تنظیم، مربوط به کنترل هیدرولیکی آب و هدایت روزنه‌ای گیاه میکوریزی تحت تنش خشکی است. در یک مطالعه متاآنالیز[1] از ۴۶۰ مطالعه تحقیقاتی منتشر شده و جمع‌بندی آماری آنها مشاهده گردید که حضور قارچ میکوریز آربسکولار قادر است ۲۴ درصد هدایت آبی را درگیاهان تحت تنش خشکی افزایش دهد (Auge et al., 2015). این درصد افزایش برای زمانی که گیاه میزبان تحت تنش شدید بود به بیش از دو برابر برآورد شد. در این مطالعه متاآنالیز، توانایی قارچ‌های میکوریز در بهبود هدایت آبی گیاهان تک‌لپه بسیار متفاوت بود. تأثیر بخشی این قارچ‌ها در کاهش تنش خشکی از طریق بهبود هدایت آبی در گیاهان دو لپه بیشتر از تک لپه مشاهده شد

[1] متاآنالیز (Meta-Analysis) یک روش آماری پیشرفته است که نتایج مطالعات مستقل و مرتبط را به صورت سیستماتیک ترکیب و تحلیل می‌کند تا به یک نتیجه کلی، جامع و معتبر دست یابد. این نوع مطالعه به ویژه زمانی که نتایج مطالعات پراکنده یا متناقض باشند با ترکیب داده‌ها به شناسایی الگوهای کلی کمک کرده و تصمیم گیری از شواهد را معتبر می‌سازد.

(Auge et al., 2015). همانطور که قبلا اشاره گردید آکواپورین‌های غشای پلاسمایی و غشای واکوئلی نقش مهمی در تورژنسانس سلولی در شرایط تنش خشکی به‌عهده دارند. آنها نه تنها در سیگنال‌دهی اسید آبسیزیک و گونه‌های فعال اکسیژن نقش دارند بلکه در همستازی آب و املاح در ریشه‌ها و برگ‌ها به خصوص در شرایط تنش خشکی با حضور قارچ‌های میکوریز نیز نقش مهمی به‌عهده دارند (Conner et al., 2013; Paluch-Lubawa et al., 2024). اولین بار Roussel و همکاران (۱۹۹۷) و پس از آن Krajinski و همکاران (۲۰۰۰) در مورد ژن‌های آکواپورین در گیاهان میکوریزی گزارش دادند. آنها بیان ژن‌های اکوآپورین واقع در غشای واکوئولی در گیاهان جعفری و یونجه میکوریزی شده را مشاهده نمودند (Krajinski, et al., 2000). علاوه بر این، ژن‌های اکوآپورین غشا سلولی در یونجه توسط میکوریزا بیان می‌شوند، در حالی که چهار ژن آکواپورین دیگر که مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند، الگوی بیان خود را در نتیجه میکوریزی شدن تغییر ندادند (Uehlein, et al., 2007). آنها بیان ژن‌های غشا سلولی در یونجه میکوریزی شده را مربوط به تغییرات فیزیولوژیک در ریشه‌های گیاه، یعنی فرآیندهای تبادل همزیستی واقع در غشای پیش‌اربوسکولار دانستند (Uehlein, et al., 2007). بیشتر نتایج مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که بیان افزایشی ژن‌های آکواپورین‌ها در گیاهان میکوریزی تحت تنش خشکی صورت نمی‌گیرد و یا حتی بیان کاهشی در مقایسه با گیاهان غیر میکوریزی تحت تنش خشکی صورت می‌گیرد (Porcel et al., 2006; Aroca et al., 2006; Uehlein, et al., 2007). بیان کاهشی ژن‌های آکواپورین غشای سلولی در طول تنش خشکی در گیاهان میکوریزی می‌تواند یک سازوکار تنظیمی برای محدود کردن آب از دست رفته از سلول‌ها باشد (Porcel, et al., 2006). در هر صورت، بیان افزایشی یا کاهشی (مهار یا سرکوب) ژن‌های آکواپورین‌ها توسط همزیستی میکوریزی به گونه‌ای با دیگر سازوکارها تنظیم و هماهنگ می‌شود تا روابط آبی گیاه میزبان بهبود و تحمل به خشکی آن افزایش یابد.

نقش قارچ‌های میکوریز در کاهش تنش خشکی

از طریق بهبود تغذیه گیاه میزبان به خصوص عناصر کم‌تحرکی نظیر فسفر به خوبی شناخته‌شده است (Nadian, 2011; Mansoor et al., 2022; Khan et al., 2023; Paluch-Lubawa et al., 2024). تحت تنش خشکی نه تنها توسعه ریشه که مهم‌ترین عامل در جذب فسفر از خاک است کاهش می‌یابد بلکه میزان انتشار فسفر در خاک نیز کاهش قابل توجه پیدا می‌کند. هیف‌های خارجی قارچ‌های میکوریز به عنوان ادامه سیستم ریشه‌ای گیاه میزبان قادرند فسفر و آب را از مناطق دور از دسترس ریشه گیاه جذب و آن را به گیاه میزبان منتقل نمایند. گونه‌های مختلف قارچ‌های میکوریز توانایی‌های مختلفی در تولید و انتشار هیف‌های خارجی در خاک دارند. در این رابطه، با استفاده از فسفر نشاندار (^{32}P یا ^{33}P) و سیستم گلدانی چند قسمتی مشاهده شد که در بین سه گونه قارچ میکوریز شامل *آکولوسپرا لویس*[1]، *گلوموس اس پی*[2] و *اسکتلوسپورا کالوسپورا*[3]، قارچ میکوریز *آکولوسپرا لویس* به علت توانایی بیشتر در تولید و انتشار هیف‌های خارجی (تا فاصله ۱۱ سانتیمتری از سطح ریشه در بخش هیف گلدان) فسفر را با سرعت بیشتری در مقایسه با دو گونه دیگر قارچ به داخل ریشه گیاه شبدر جاری ساختند. ضمناً سرعت جاری شدن فسفر به داخل ریشه شبدر کلنی شده با *آکولوسپرا لویس* حدود ۷ برابر بیشتر از سرعت آن در گیاه شاهد در یک دروه زمانی ۲۸ روزه بود (Jakabson et al., 1992)؛ بنابراین، می‌توان گفت که قارچ‌های میکوریز در افزایش جذب عناصر غذایی، آب و در نتیجه در مقابله با تنش خشکی نقش بسیار مهم و نیز متفاوتی دارند. در اینجا لازم است تأکید شود که مؤلفه‌های مرفولوژی ریشه اعم از مجموع طول ریشه، سطح و حجم ریشه که توسط کلونیزاسیون قارچی افزایش می‌یابد به شدت توانایی ریشه گیاه را در جذب آب و مواد غذایی بالا می‌برد

[1] *Acaulospora laevis*
[2] *Glomus sp*
[3] *Scutellospora calospor*a

(Chandrasekaran 2022). در خصوص نقش مؤلفه‌ی ریشه گیاه میکوریزی و اثر بخشی آن در کاهش تنش خشکی، نتایج یک متاآنالیز از شمار زیادی از مقالات تحقیقاتی منتشر شده نشان می‌دهد که تجزیه‌وتحلیل صفات مورفولوژیک ریشه با افزایش طول ریشه (۳۷ درصد)، سطح ریشه (۳۱ درصد) و حجم ریشه (۶۵ درصد) مطابقت داشت (Chandrasekaran 2022)؛ بنابراین، نتایج متاآنالیز حاضر تأیید می‌کند که کاهش تنش خشکی ناشی از قارچ‌های میکوریز با اصلاح صفات ریشه و کارایی جذب فسفر انجام می‌شود. از این رو، متاآنالیزها با ارزیابی‌های آماری و جامع خود، قادرند تحقیقات قارچ‌های میکوریز را برای کاربردهای گسترده‌تر و بهره‌وری بهتر گیاه، کاهش استرس و کشاورزی پایدار فراهم کنند.

با توجه به توانمندی‌های مختلف قارچ‌های میکوریز در کاهش تنش خشکی در گیاه میزبان، انتخاب سویه مناسب قارچ میکوریز در استفاده از کودهای زیستی برای به حداکثر رساندن مزایا در گیاه تحت تنش خشکی بسیار مهم است. به عنوان مثال، زمانی که انگور[1] به طور جداگانه با چهار گونه قارچ میکوریز همزیست شد مؤلفه‌های اندازه‌گیری شده شامل درصد کلونیزاسیون ریشه، فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان سوپر اکسید دیسموتاز، پراکسیداز و کاتالاز جذب عناصر غذایی (نظیر فسفر، نیتروژن، آهن و مس)، مرفولوژی ریشه و خالص فتوسنتز کاملاً با هم متفاوت بودند (Peng et al., 2025). لذا، با توجه به پاسخ‌های متفاوت در گونه‌ها و حتی سویه‌های مختلف قارچ‌های میکوریز، انتخاب سویه مناسب قارچ میکوریز برای اهداف مورد نظر بسیار مهم است.

یکی دیگر از مسیرهای دفاعی و مقابله‌ای که قارچ‌های میکوریز در کاهش تنش خشکی در گیاه میزبان بکار می‌برند کاهش اثرات مخرب آنتی‌اکسیدان‌هاست. نتایج متاآنالیز که از یک مجموعه داده‌ها از ۸۴ مقاله تحقیقاتی منتشرشده برای پاسخ گیاهان به تنش آبی استفاده‌شده است نشان می‌دهد که تنش آبی در درجه اول از طریق تولید بیش از حد گونه‌های فعال اکسیژن و آسیب بر فرایندهای فتوسنتزی و غشاهای پلاسمایی رخ می‌دهد. در واقع، با شروع تنش خشکی بر گیاه و در پی آن بسته شدن روزنه‌ها ورود دی‌اکسید کربن به گیاه محدود و نتیجتاً فرایندهای فتوسنتزی مختل میشود. الکترون‌های آزاد شده ناشی از عدم مصرف الکترون‌ها در فرایندهای فتوسنتزی سبب می‌شود تا الکترون‌ها پس از نشت و رسیدن به اکسیژن مولکولی آنرا احیا و به گونه‌های فعال اکسیژن تبدیل نمایند. با افزایش و تجمع این گونه‌ها که ناشی از اختلال در هموستازی این رادیکال‌ها است سیستم دفاعی گیاه فعال می‌شود. برقراری دفاع آنتی اکسیدانی با حضور قارچ میکوریز تقویت شده و این دو همزیست قادرند بسیاری از این گونه‌های فعال اکسیژن را خنثی نمایند (Nawaz and Wang, 2020; Li, et al., 2022; Luo, et al., 2024). درواقع، تعامل بین گیاه–قارچ، هموستازی گونه‌های فعال برای حفظ سطوح مناسب رادیکال‌ها در یک تعادل گسترده در فرایندهای مهم فیزیولوژیک را برقرار می‌سازند.

به طور کلی، بهره‌گیری از توانمندی قارچ‌های میکوریز در مدیریت تنش‌های زنده و غیر زنده، علاوه بر افزایش کارایی مصرف آب و بهبود عملکرد گیاهان، می‌تواند به پایداری اکوسیستم‌ها، کاهش مصرف کودهای شیمیایی و ارتقای سلامت محصولات کشاورزی و خاک منجر شود. هر چند مطالعات بسیار گسترده‌ای در خصوص روابط گیاه و قارچ‌های میکوریز تحت تنش خشکی صورت گرفته شده است ولی به سبب پیچیدگی‌های این روابط بسیاری از سازوکارهای تعاملات گیاه–قارچ تا کنون به خوبی شناخته نشده است. برای درک اثر واقعی همزیستی میکوریزی و سازوکارهای دفاعی گیاه میکوریزی تحت تنش خشکی پژوهش‌های آینده نه تنها به آزمایشات بلند مدت میدانی و تحلیل‌های متاآنالیز نیاز است، بلکه به شناخت دقیق‌تر سازوکارهای مولکولی تنظیم‌کننده این همزیستی نظیر شناسایی ژن‌های دخیل و مسیرهای پیام‌رسانی مشترک میان گیاه و قارچ که مقاومت به خشکی را تقویت می‌کنند نیاز

[1] *Vitis vinifera* L.

است. همچنین توسعه سویه‌های بومی و کارآمد میکوریز سازگار با شرایط اقلیمی هر منطقه، استفاده از روش‌های کشت مخلوط و مدیریت تلفیقی آب و کود می‌تواند به بهره‌گیری مؤثرتر از مزایای این همزیستی منجر شود.

نتیجه‌گیری نهایی

به طور کلی، تنش خشکی با ایجاد اختلال در فرآیندهای فیزیولوژیک و متابولیکی گیاه و افزایش انباشت گونه‌های فعال اکسیژن، موجب بروز آسیب‌های اکسیداتیو و کاهش عملکرد گیاه می‌شود. در این شرایط، فعال‌سازی مسیرهای دفاع آنتی‌اکسیدانی گیاه نقش اساسی در حفظ تعادل ردوکس و پایداری سلولی دارد. همزیستی با قارچ‌های میکوریز آربسکولار با تقویت سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی، تنظیم اسمزی، بهبود تغذیه و تعدیل بیان ژن‌های پاسخ‌دهنده به خشکی، تحمل گیاه به تنش خشکی را به‌طور مؤثری افزایش می‌دهد. هر چند پیشرفت‌های اخیر با استفاده از زیست‌شناسی مولکولی و مهندسی ژنتیک تا حدودی توانسته است چگونگی سیگنال‌دهی گونه‌های فعال اکسیژن و مسیرهای دفاعی آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیر آنزیمی و نیز برهمکنش‌های پیچیده هورمونی در پاسخ به تنش خشکی را روشن کند، ولی هنوز بسیاری از این سازوکارها ناشناخته باقی‌مانده است. به ویژه آنکه حضور گونه‌های فراوان قارچ‌های میکوریز در کنار گونه‌های مختلف گیاهی که هر کدام سازوکارهای مختلف و تعاملات تنظیمی پیچیده‌ی مربوط به خود را در پاسخ به تنش خشکی دارند. لذا تحقیقات آینده با استفاده از فناوری‌های زیستی می‌تواند به درک بهتر سازوکارهای دفاعی گیاه در مواجه با تنش خشکی منجر شود که زمینه لازم برای مهندسی نمودن محصولات مقاوم در برابر تنش خشکی با سازگاری بیشتر را فراهم می‌سازد و در نهایت به امنیت غذایی جهانی کمک می‌کند.

References

1. Abdul-Aziz, M., Sabeem, M., Mullath, S.K., Brini, F. and Masmoudi, K. 2021. Plant group II LEA proteins: Intrinsically disordered structure for multiple functions in response to environmental stresses. *Biomolecules*, 11: 1662. doi: org/ 10.3390/biom11111662.
2. Abo-Doma, A., Edrees, S. and Abdel-Aziz, S.H. 2011. The effect of mycorrhiza growth and expression of some genes in barley. *Egyptian Journal of Genetics and Cytology*, 40:2, 301-313. doi: 10.21608/ejgc.2011.10794.
3. Al-Amri, S.M. 2021. Application of bio-fertilizers for enhancing growth and yield of common bean plants grown under water stress conditions. *Saudi Journal of Biological Sciences*, vol. 28 (7) 3901–3908. doi: 10.1016/j.sjbs.2021.03.064.
4. Alcazar, R., Cuevas, J.C., Patron, M., Altabella, T. and Tiburcio, A.F. 2006. Abscisic acid modulates polyamine metabolism under water stress in *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia plantarum, 128*, 448–455. doi: 10.1111/j.1399-3054.2006.00780.x.
5. Alizadeh, O. and Nadian, H. 2010. Evaluation effect of water stress and nitrogen rates on amount of uptake some macro and micro elements in mycorrhizal and non-mycorrhizal corn plant. *Research Journal of Biological Sciences*, 5(5): 350-355, doi: 10.36478/rjbsci.2010.350.355 [In Persian].
6. Anuradha, S. and Rao, S.S.R. 2008. The effect of brassinosteroids on radish (*Raphanus sativus* L.) seedlings growing under cadmium stress. *Plant, Soil and Environment*, 53, 465–472. doi: org/10.17221/2307-pse..
7. Al-Karaki, G.N. 1998. Benefit, cost and water-use efficiency of arbuscular mycorrhizal durum wheat grown under drought stress, *Mycorrhiza*, 8 (1), 41–45. doi: org/10.1007/s005720050209.
8. Aroca, R., Porcel, R., Ruiz-Lozano, J.M. 2006. How does arbuscular mycorrhizal symbiosis regulate root hydraulic properties and plasma membrane aquaporins in *Phaseolus vulgaris* under drought, cold or salinity stresses? *New Phytologist*, 173(4), 808-816. doi: org/10.1111/j.1469 8137.2006.01961.x.
9. 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. doi: org/10.1016/j.envexpbot.2005.12.006.
10. Atkinson, D.E. 1977. Cellular energy metabolism and its regulation. Academic Press, London, UK. NLM Unique ID: 7708918, MMS ID 994946603406676; ISBN 9780120661503; ISBN 0120661500; NLM Unique ID 7708918. P 293.
11. Auge, R.M., Toler, H.D. and Saxton, A.M. 2015. Arbuscular mycorrhizal symbiosis alters stomatal conductance of host plants more under drought than under amply watered conditions: a meta-analysis. *Mycorrhiza*, 25(1):13-24. doi:10.1007/s00572-014-0585-4. Epub 2014 May 16.
12. Auge, R.M., Stodola, A.J.W., Ebel, R.C. and Duan, X. 1995. Leaf elongation and water relations of mycorrhizal sorghum in response to partial soil drying: two Glomus species at varying phosphorus fertilization. *Journal of Experimental Botany*, 46: 297-307. doi: org/10.1093/jxb/46.3.297.
13. Barzana, G., Aroca, R., Paz, J.A., Chaumont, F., Martinez-Ballesta, M.C., Carvajal, M. and Ruiz-Lozano, J.M. 2012. Arbuscular mycorrhizal symbiosis increases relative apoplastic water flow in roots of the host plant under both well-watered and drought stress conditions. *Annals Botany*, 109: 1009-1017. doi: 10.1093/aob/mcs007.
14. Barzana, G., Arco, R., Bienert, G.P. Chaumont, F. and Ruiz-Lozano, J.M. 2014. New Insights into the regulation of aquaporins by the arbuscular mycorrhizal symbiosis in maize plants under drought stress and possible implications for plant performance. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 27(4), 349-363, doi: org/10.1094/MPMI-09-13-0268-R.
15. Begum, N., Ahanger, M.A., Su, Y., Lei, Y., Mustafa, N.S.A., Ahmad, P., Lixin Zhang, L. 2019. Improved drought tolerance by AMF inoculation in Maize (*Zea mays*) involves physiological and biochemical implications. *Plants (Basel),* 6;8(12):579. doi: 10.3390/plants8120579.
16. Bendou, O., Gutierrez-Fernandez, I., Marcos-Barbero, E., Bueno-Ramos, N., Gonzalez-Hernandez, A., Morcuende, R. and Arellano, J.B. 2021. Theoretical and experimental considerations for a rapid and high throughput measurement of catalase *in vitro*. *Antioxidants*, 11(1):21, doi: 10.3390/antiox11010021.
17. Bethke, P.C., Badger, M.R., Russell, L. and Jonesa, R.L. 2004. Apoplastic synthesis of

nitric oxide by plant tissues. *The Plant Cell*, 16: 332–341. doi: 10.1105/tpc.017822.

18. Bhosale, K.S. and Shinde, B.P. 2011. Influence of arbuscular mycorrhizal fungi on proline and chlorophyll content in *Zingiber Officinale* Rosc grown under water stress. *Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences,* 1 (3) :172-176. doi: http://www.cibtech.org/jls.htm
19. Campomanes, P., Rothlisberger, U. Alfonso-Prieto, M. and Rovira, C. 2015. The Molecular mechanism of the catalase-like activity in horseradish peroxidase. *Journal of the American Chemical Society*, 137 (34), doi: org/10.1021/jacs.5b06796.
20. Candar-Cakir, B.; Arican, E.; Zhang, B. 2016. Small RNA and degradome deep sequencing reveals drought-and tissue-specific micrornas and their important roles in drought-sensitive and drought-tolerant tomato genotypes. *Plant Biotechnology Journal*, 14, 1727–1746. doi: 10.1111/pbi.12533.
21. Chareesri, A., Deyn, G,B.D., Sergeeva, L., Polthanee, A. and Kuyper, T.W. 2020. Increased arbuscular mycorrhizal fungal colonization reduces yield loss of rice (*Oryza sativa* L.) under drought. *Mycorrhiza*, 30 (2-3), 315–328. doi: 10.1007/s00572-020-00953-z.
22. Charpentier, M., Sun, J., Wen, J., Mysore, K.S. and Oldroyd, G. 2014. ABA promotion of arbuscular mycorrhizal colonization requires a component of the PP2A protein phosphatase complex. *Plant Physiology,* 166, 2077–2090. doi:10.1104/pp.114.246371.
23. Chandrasekaran, M. 20220. Arbuscular mycorrhizal fungi mediated enhanced biomass, root morphological traits and nutrient uptake under drought stress: A Meta-Analysis. *Journal of Fungi* , *8*(7), 660; https://doi.org/10.3390/jof8070660.
24. Chitarra, W., Maserti, B., Gambino, G., Guerrieri, E. and Balestrini, R. 2016a. Arbuscular mycorrhizal symbiosis-mediated tomato tolerance to drought. *Plant Signaling and Behaviour*, 11(7):00-00, doi:10.1080/15592324.2016.1197468.
25. Chitarra, W., Pagliarani, C., Maserti, B., Lumini, E., Siciliano, I., Cascone, P., Schubert, A., Gambino, G., Balestrini, R. and Guerrieri, E. 2016b. Insights on the impact of arbuscular mycorrhizal symbiosis on tomato tolerance to water stress. *Plant Physiology*, 171: 1009–1023. doi: 10.1104/pp.16.00307.
26. Chen, S. and Schopfer, P. 1999. Hydroxyl-radical production in physiological reactions: a novel function of peroxidase. *European journal of biochemistry*, 260, 726-735. doi: 10.1046/j.1432-1327.1999.00199.x.
27. Chen, W., Men, P., Feng, H. and Wang, C. 2020. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on growth and physiological performance of *Catalpa bungei* C.A.Mey. under drought stress. *Forests*, 11:10, 1117, doi: org/10.3390/f11101117.
28. Choi, J., Lee, T., Cho, J., Servante, E.K., Pucker, B., Summers, W., Bowden, S., Rahimi, M., An, K., An, G., Bouwmeester, H.J., Wallington, E.J., Oldroyd, G. and Paszkowski, U. 2020. The negative regulator SMAX1 controls mycorrhizal symbiosis and strigolactone biosynthesis in rice. *Nature Communications,* 11:2114, doi: org/10.1038/s41467-020-16021-1.
29. Chun, S.C., Paramasivan, M. and Chandrasekaran, M. 2018. Proline accumulation influenced by osmotic stress in arbuscular mycorrhizal symbiotic plants. *Frontiers in Microbiology*, 9:2525, doi: 10.3389/fmicb.2018.02525.
30. Conner, A.C., Bill, R.M. and Conner, M.T. 2013. An emerging consensus on aquaporin translocation as a regulatory mechanism. *Molecular Membrane Biology*, 30:1–12. doi: 10.3109/09687688.2012.743194
31. Corpas, F.J., Freschi, L., Rodriguez-Ruiz, M., Mioto, P.T. and Gonzalez-Gordo, S. 2018. Nitro-oxidative metabolism during fruit ripening. *Journal of Experimental Botany*, 69(14), 3449–3463. doi:10.1093/jxb/erx453.
32. Das, D., Varshney, K., Ogawa, S., Torabi, S., Hüttl, R., Nelson, D.C. and Gutjahr, C. 2025. Ethylene promotes SMAX1 accumulation to inhibit arbuscular mycorrhiza symbiosis. *Nature Communications*, 16, Article No., doi: org/10.1038/s41467-025-57222-w.
33. Demirel, U., Morris, W.L., Ducreux, L.J., Yavuz, C., Asim, A., Tindas, I., Campbell, R., Morris, J.A., Verrall, S.R., Hedley, P.E., Gokce, Z.N.O., Caliskan, S., Aksoy, E., Caliskan, M.E., Taylor, M.A. and Handcock, R.D. 2020, Physiological, biochemical, and transcriptional responses to single and combined abiotic stress in stress-tolerant and stress-sensitive potato genotypes. *Frontiers in Plant Science,* 11: 169, doi: org/10.3389/fpls.2020.00169.
34. Delormel, T.Y. and Boudsocq, M. 2019. Properties and functions of calcium-dependent protein kinases and their relatives in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*, 224(2), 585-604. doi: org/10.1111/nph.16088.

35. Fabregas, N., Lozano-Elena, F., Blasco-Escámez, D., Tohge, T., Martínez-Andújar, C., Albacete, A., Osorio, S., Bustamante, M., Riechmann, J.L., Nomura, T., Yokota, T., Conesa, A., Pérez Alfocea, F., Fernie, F.R., Cano-Delgado, A.I. 2018. Overexpression of the vascular brassinosteroid receptor BRL3 confers drought resistance without penalizing plant growth. *Nature Communications*, 9:4680, doi: 10.1038/s41467-018-06861-3.
36. Floss, D.S., Levy, J.G., Lévesque-Tremblay, V., Pumplin, V.N. and Harrison, M.J. 2013. DELLA proteins regulate arbuscule formation in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 110(51), 5025-34. doi: 10.1073/pnas.1308973110.
37. Foo, E., McAdam, E.L., Weller, J.L. James, B. and Reid, J.B. 2016. Interactions between ethylene, gibberellins, and brassinosteroids in the development of rhizobial and mycorrhizal symbioses of pea. *Journal of Experimental Botany*, 67(8), 2413–2424, doi: org/10.1093/jxb/erw047.
38. Foyer, C.H. and Hanke, G. 2022. ROS production and signalling in chloroplasts: cornerstones and evolving concepts. *The Plant Journal*, 111, 642–661. doi: 10.1111/tpj.15856.
39. Fracetto, G.G.M., Peres, L.E.P. and Lambais, M.R. 2017. Gene expression analyses in tomato near isogenic lines provide evidence for ethylene and abscisic acid biosynthesis fine-tuning during arbuscular mycorrhiza development. *Archives of Microbiology*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2017, doi: 10.1007/s00203-017-1354-5.
40. Gavassi, M.A., Silva, G.S., Carolina de Marchi Santiago da Silva, C.M.S., Thompson, A.J., Macleod, K., Oliveira, P.M.R., Cavalheiro, M.F., Douglas Domingues, S. and Habermann, G. 2021, NCED expression is related to increased ABA biosynthesis and stomatal closure under aluminum stress. *Environmental and Experimental Botany*, 185: 104404, doi: org/10.1016/j.envexpbot.2021.104404.
41. Ghosh, U.K., Islam, M.N., Siddiqui, M.N., Cao, X. and Khan, M.A.R. 2022. Proline, a multifaceted signalling molecule in plant responses to abiotic stress: understanding the physiological mechanisms. *Plant Physiology*, ISSN 1435-8603, doi:10.1111/plb.13363.
42. Giel, R.D. and Guinel, F.C. 2002. Effects of elevated substrate-ethylene on colonization of leek (*Allium porrum*) by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus aggregatum*. *Biology Faculty Publications*. 21, University of Guelp, hhttps://scholars.wlu.ca/biol_faculty/21.
43. 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(12), 909-30. doi: 10.1016/j.plaphy.2010.08.016. Epub 2010 Sep 15.
44. Grumberg, B.C., Urcelay, C., Shroeder, M.A., Vargas-Gil, S. and Luna, C.M. 2015. The role of inoculum identity in drought stress mitigation by arbuscular mycorrhizal fungi in soybean. *Biology and Fertility of Soils*, 51, 1–10. doi: 10.1007/s00374-014-0942-7.
45. Gui, L.X., Lu, S.S., Chen, Q., Yang, L. and Xiao, J.X. 2021. iTRAQ based proteomic analysis reveals positive impacts of arbuscular mycorrhizal fungi inoculation on photosynthesis and drought tolerance in blueberry. *Trees*, 35(1), 81– 92. doi: 10.1007/s00468-020-02015-5.
46. Guo, X.N., Lu, W., Liu, C.Y. and Q.S. 2024. Regulation of arbuscular mycorrhizal fungi in citrus root hairs mediated by auxin efflux carrier protein *PtPINs*. *Scientia Horticulturae,* 337:113574, doi:org/10.1016/j.scienta.2024.113574.
47. Gupta, R. and S.K. Chakrabarty, S.K. 2013. Gibberellic acid in plant, still a mystery unresolved. *Plant Signaling and Behavior*, 8:9, e25504. doi: 10.4161/psb.25504.
48. Haghighania, H. Nadian, H. Ragali, F. Tavakoli, A.R. 2012. Effect of two species of arbuscular mycorrhizae on vegetative growth and P uptake by Mexican Lime Rootstock (*Citrus aurantifolia*) under drought stress. *Journal of Seed and Plant Production***,** 28(4), 403-417. doi: 10.22092/sppj.2017.110486. [In Persian].
49. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. 1999. Free radicals in biology and medicine. Oxford, UK, Oxford University Press. SBN (1999 edition)**:** 0198500459 (10-digit) / 9780198500452 (13-digit) pp**:** 936
50. Hasanuzzaman, M., Borhannuddin-Bhuyan, M.H.M., Zulfiqar, F., Raza, A., Mohsin, S.M., Mahmud, J.A., Fujita, M. and Fotopoulos, V. 2020. Reactive oxygen species and antioxidant defense in plants under abiotic stress: Revisiting the crucial role of a universal defense regulator. *Antioxidants*, 29;9(8), 681. doi: 10.3390/antiox9080681.

51. Hsu, P., Dubeaux, G., Takahashi, Y. and Schroeder, J.I. 2021. Signaling mechanisms in abscisic acid-mediated stomatal closure. *The Plant Journal*, 105, 307–321. doi: 10.1111/tpj.15067.
52. Huang, D., Ma, M., Wang, Q., Zang, M., Jing, G., Li, C. and Ma, F. 2020. Arbuscular mycorrhizal fungi enhanced drought resistance in apple by regulating genes in the MAPK pathway. *Plant Physiology and Biochemistry*, 149, 245–255. doi: org/10.1016/j.plaphy.2020.02.020.
53. Huang, Y.M., Zou, Y.N. and Wu, Q.S. 2017. Alleviation of drought stress by mycorrhizas is related to increased root H_2O_2 efflux in trifoliate orange. *Scientific Reports*, 7(42335), doi: 10.1038/srep42335.
54. Hussain, M., Malik, M.A., Farooq, M., Ashraf, M.Y., Cheema, M.A. 2008. Improving drought tolerance by exogenous application of glycine betaine and salicylic acid in sunflower. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 194: 193–199. doi: 10.1111/j.1439-037X.2008.00305.x.
55. Irankhah, S., Chitarra, W., Mashreghi, M., Nerva, L., Ganjeali, A., Balestrini, R., Antoniou, C., Cheniany, M., and Lumini, E. 2020. Impact of an arbuscular mycorrhizal fungal inoculum and exogenous methyl jasmonate on fenugreek secondary metabolite production under water deficit. *Environmental and Experimental Botany*, 176, 104096. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2020.104096.
56. Jajic, I., Sarna, T. and trzalka, K. 2015. Senescence, stress and reactive oxygen species. *Plants*, 4, 393–411.doi:10.3390/plants4030393. doi: 10.3390/plants4030393.
57. Jamdhade, A.R., Sunkar, R. and Hivrale, V. 2017. Zymographic method for distinguishing different classes of superoxide dismutases in plants. *Springer Nature*, 221-227. doi: 10.1007/978-1-4939-7136-7_13.
58. Jokar, N., Nadian. H. Khalilimoghdam, B., Haydari, M. and Gharineh, M. 2015. Effect of myorrhizal colonization on plant growth and proline content in some genotype of leeks (*Allium ampeloprasum ssp. persicum* L, *Allium porrum* L.). *Plant production*, 38(1), 15-26. doi: org/10.22055/ppd.2015.11115 [In Persian].
59. Jokar, N., Nadian. H. Khalilimoghdam, B. and Haydari, M. 2013. Effects of arbuscular mycorrhizal fungus and drought stress on plant root growth, accumulation of proline and uptake some nutrients by three genotypes of leeks. *Journal of Soil Biology*. 1(2), doi:10.22092/sbj.2014.128410. [In Persian].
60. Jakobsen, I., Abbott, L.K. and Robson, A.D. 1992. External hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Trifolium subterraneum* L. 1. Spread of hyphae and phosphorus inflow into roots. *New Phytologist* 120: 371-380. doi: org/10.1111/j.1469-8137.1992.tb01077.x.
61. Jomova, K., Raptova, R., Y. Alomar, S.Y., Alwasel, S.H., Nepovimova, E., Kuca, K. and Valko, M. 2023. Reactive oxygen species, toxicity, oxidative stress, and antioxidants: chronic diseases and aging, *Archives of Toxicology*, 97:2499–2574, doi: org/10.1007/s00204-023-03562-9.
62. Ishii, T., Shrestha, Y. H., Matsumoto, I. and Kadoya, K. 1996. Effect of ethylene on the growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and on the mycorrhizal formation of trifoliate orange roots. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*. 65, 525–529. doi: 10.2503/jjshs.65.525.
63. Karpinska, B. and Foyer, C.H. 2024. Superoxide signalling and antioxidant processing in the plant nucleus. *Journal of Experimental Botany*, 75(15), 4599–4610, doi: org/10.1093/jxb/erae090.
64. Khamsuk, O., Sonjaroon, W., Suwanwong, S., Jutamanee, K. and Suksamrarn, A. 2018. Effects of 24-epibrassinolide and the synthetic brassinosteroid mimic on chili pepper under drought. *Acta Physiologiae Plantarum,* 40(6), 106. doi: 10.1007/s11738-018-2682-z.
65. Khan, M.I., Nazir, F., Asgher, M., Per, T.S., Khan, N.A. 2015. Selenium and sulphur influence ethylene formation and alleviate cadmium-induced oxidative stress by improving proline and glutathione production in wheat. *Journal of Plant Physiology*, 173, 9–18. doi:org/10.1016/j.jplph.2014.09.011.
66. Khan, M., Ali, S., Al Azzawi, T.N.I., Saqib, S. Ullah, F., Ayaz, A. and Zaman, W. 2023. The key roles of ROS and RNS as a signaling molecule in plant–microbe interactions. *Antioxidants*, 12, 268. doi: org/10.3390/ antiox12020268.
67. Khan, W.U., Khan, L.U., Chen, D. and Chen, F. 2023. Comparative analyses of superoxide dismutase (SOD) gene family and expression profiling under multiple abiotic stresses in water lilies. *Horticulturae*, 9(7), 781, doi: org/10.3390/horticulturae9070781.
68. Khan, P., Abdelbacki, A.M.M. Albaqami, M., Jan, R. and Kim, K.M. 2024. Proline

promotes drought tolerance in maize. *Biology*, *14*(1), 41, doi: org/10.3390/biology14010041.

69. Khatri, K. and Rathore, M.S. 2022. Salt and osmotic stress-induced changes in physio-chemical responses, PSII photochemistry and chlorophyll a fluorescence in peanut. *Plant Stress*, 3:100063. doi: org/10.1016/j.stress.2022.100063.
70. Khoyerdi, F.F., Shamshiri, M.H., Estaji, A. 1016. Changes in some physiological and osmotic parameters of several pistachio genotypes under drought stress. *Science of Horticulture*,198, 44–51. doi: 10.1016/j.scienta.2015.11.028.
71. Kozlov, A.V., Javadov, S. and Sommer, N. 2024. Cellular ROS and antioxidants: Physiological and pathological role. *Antioxidants*, 13, 602. doi: org/ 10.3390/antiox13050602.
72. Krajinski F, Biela A, Schubert D, Gianinazzi-Pearson V, Kaldenhoff R, Franken P (2000) Arbuscular mycorrhiza development regulates the mRNA abundance of Mtaqp1 encoding a mercury-insensitive aquaporin of *Medicago truncatula*. *Planta*, 211:85–90. doi: 10.1007/s004250000263.
73. Kucera, B., Cohn M. A. and Leubner-Metzger, G. 2005. Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. *Seed Science Research,* 15, 281–307. doi:10.1079/SSR2005218.
74. Lanfranco, L., Mara-Novero, M. and Paola Bonfante, P. 2005. The mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita* possesses a CuZn superoxide dismutase that is up-regulated during symbiosis with legume hosts. *Plant Physiology*, 137 (4) 1319–30 doi: org/10.1104/pp.104.050435.
75. Laxa, M., Liebthal, M., Telman, W., Chibani, K. and Dietz, K.J 2019. The role of the plant antioxidant system in drought tolerance. *Antioxidants*, 8, 94. doi: org/ 10.3390/antiox8040094.
76. Lee, Y., Yamamoto, A., Ragaey, M., Hashiguchi, M., Akashi, R. and Saeki, Y. 2024. Effect of drought stress and short-term recovery on proline and polyamine metabolism in *Lotus japonicus. Agricultural Research*, doi: org/10.1007/s40003-024-00832-5.
77. Leon, J. and Costa-Broseta, A. 2020. Present knowledge and controversies, deficiencies, and misconceptions on nitric oxide synthesis, sensing, and signaling in plants. *Plant Cell and Environment.*43,1–15. doi: 10.1111/pce.13617.
78. Li, J., Zhang, K., Meng, Y., Hu, J., Ding, M., Bian, J., Yan, M., Han, J. and Zhou, M. 2018. Jasmonic acid/ethylene signaling coordinates hydroxycinnamic acid amides biosynthesis through ORA59 transcription factor. *Plant Journal*,95, 444–457. doi: 10.1111/tpj.13960.
79. Li, R., Shen, J., Wilkinson, S., Ford, B.G. and Davies, W.J. 2017. Stomatal and growth responses to hydraulic and chemical changes induced by progressive soil drying. *Journal of Experimental Botany*, 68, 21–22, 5883–5894. doi:10.1093/jxb/erx381.
80. Li, J., Wang, Y., Pritchard, H.W. and Wang, X. 2014. The fluxes of H_2O_2 and O_2 can be used to evaluate seed germination and Vigor of Caragana korshinskii. *Planta*, 239(6):1363-73. doi: 10.1007/s00425-014-2049-7.
81. Li, Z., Zhang, Y., Liu, C., Gao, Y., Han, L. and Chu, H. 2022. Arbuscular mycorrhizal fungi contribute to reactive oxygen species homeostasis of *Bombax ceiba* L. under drought stress. *Frontier Microbiology*, 13,991781. doi: 10.3389/fmicb.2022.991781.
82. Li, N., Li, J., Xie, J., Wenjing Rui, W., Pu, K., Gao, Y., Tiantian Wang, T. and Zhang, M. 2025. Glycine betaine and plant abiotic stresses: Unravelling physiological and molecular responses. *Plant Science*, 355, 112479, doi: org/10.1016/j.plantsci.2025.112479Get rights and content.
83. Luo, C., Li, Z., Shi, Y., Gao, Y., Xu, Y., Zhang, Y. and Chu, H. 2024. Arbuscular mycorrhizal fungi enhance drought resistance in *Bombax ceiba* by regulating SOD family genes. *PeerJ* - (*Peer Journal*) 12:e17849, doi: 10.7717/peerj.17849.
84. Luo, L.J. 2010. Breeding for water-saving and drought-resistance rice (WDR) in China. *Journal of Experimental Botany*, 61(13), 3509–3517, doi:10.1093/jxb/erq185.
85. Ma, X.L., Wang, Y.J., Xie, S.L., Wang, C. and Wang, W. 2007. Glycine betaine application ameliorates negative effects of drought stress in tobacco. *Russian Journal of Plant Physiology,* 54, 472. doi: 10.1134/S1021443707040061.
86. Mak, M., Babla, M., Xu, S.C., O'Carrigan, A., Liu, X.H., Gong, Y.M., Holford, P. and Chen, Z.H., 2014. Leaf mesophyll K^+, H^+ and Ca^{2+} fluxes are involved in drought-induced decrease in photosynthesis and stomatal closure in soybean. Environmental and Experimental Botany, 98, 1-12. Doi: org/10.1016/j.envexpbot.2013.10.003.

87. Mansoor S, Ali Wani O, Lone JK, Manhas S, Kour N, Alam P, Ahmad A, Ahmad P 2022. Reactive oxygen species in plants: from source to sink. *Antioxidants* 11(2):225. Doi:org/10.3390/ antiox11020225.
88. Martın-Rodrıguez, J.A., Morcillo, R.L., Vierheilig, H., Ocampo, J.A. Muller, J.L. and Jose Garrido, M.G. 2011. Ethylene-dependent/ethylene-independent ABA regulation of tomato plants colonized by arbuscular mycorrhiza fungi. *New Phytologist,* 190: 193–205, doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03610.x.
89. Marschner, H. 2012. Marschner's mineral nutrition of higher plants, edited by: Petra Marschner, Academic Press/ Elsevie, third edition, SBN**:** 978-0-12-384905-2 (hardback).
90. Martín-Rodríguez, J., Huertas, R., Ho-Plagaro, T., Ocampo, J.A., Tureckova, V., Tarkowska, D., Ludwig-Muller, J., José, M. and García-Garrido, J.M. 2016, Arbuscular mycorrhizal symbiosis induces strigolactone biosynthesis under drought and improves drought tolerance in lettuce and tomato. *Plant Cell and Environment.* 39, 441–452. doi:10.1111/pce.1263.
91. Mathur, N. and Yas. A.V. 1995. Influence of VA mycorrhizae on net photosynthesis and transpiration of *Ziziphus mauritiana*. *Journal of Plant Physiology*, 147, 328-330. doi: 10.1016/S0176-1617(11)82161-9.
92. Maurya, A.K., 2020. Oxidative stress in crop plants, *In: Agronomic Crops*: Stress responses and tolerance; Hasanuzzaman, M., Ed.; Springer: Singapore, 2020; pp. 349–380. doi: 10.1007/978-981-15-0025-1.
93. Maurel, C., Verdoucq, L., Luu, D.T. and Santoni, V. 2008. Plant aquaporins: membrane channels with multiple integrated functions. *Annual Review of Plant Biology*, 59: 595–624. doi**:** 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092734.
94. McGuiness, P.N., Reid, J.B. and Foo, E. 2019. The role of gibberellins and brassinosteroids in nodulation and arbuscular mycorrhizal associations. *Frontiers in Plant Science*, 10, 443790. doi: org/10.3389/fpls.2019.00269.
95. Mitra, D., Priyadarshini, A., Senapati, A. Behera, S., Chatterjee, I., Das Mohapatra, P.K. and Panneerselvam, P. 2022. Ecological importance of strigolactones hormone on arbuscular mycorrhizal fungi symbiosis in plant. *Journal of Microbiology Research*, 9, 160–163. doi: org/10.18231/j.ijmr.2022.029.
96. Mittler, R. 2017. ROS are good. *Trends in Plant Science*, *A Cell Press Journal*, 22(1), 11-19. doi: 10.1016/j.tplants.2016.08.002.
97. Mhamdi, A. and Van Breusegem, F. 2018. Reactive oxygen species in plant development. *Development*, 145(15), dev164376. doi: 10.1242/dev.164376.
98. Mohanta, T.K., Bae, H. 2017. Cloning and characterization of auxin efflux carrier genes *EcPIN1a* and *EcPIN1b* from finger millet. *Eleusine coracana* L. *Biology, Environmental Science*, 7:51. doi:10.1007/s13205-017-0689-6.
99. Mosse, B. and Hyman. D.S. 1971. Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhizae, in unsterilized field soils. *New Phytologist*,70: 29-34. doi: 10.1111/j.1469-8137.1971.tb02505.x.
100. Mohamed, H.I. and Latif, H.H. 2017. *Physiology and Molecular Biology of Plants*. 23(3):545–556, doi:10.1007/s12298-017-0451-x.
101. Mosse, B. and Hyman. D. S. 1971. Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhizae. in unsterilized field soils. *New Phytologist*,70: 29-34. https://www.jstor.org/stable/2431048.
102. Nadian, H. 2025. Phosphorus uptake and transport mechanism in symbiotic plants with arbuscular mycorrhizal fungi (Knowns and unknowns). *Journal of Soil Biology*, 12(2), doi: 10.22092/SBJ.2024.366288.267.[In Persian].
103. Nadian H., Smith S.E., Alston, A.M. and Murray R.S. 1997. Effects of soil compaction on plant growth, phosphorus uptake and morphological characteristics of vesicular-arbuscular mycorrhizal colonisation of *Trifolium subterraneum*. *New Phytologist*, 135 :303-311. doi**:** 10.1046/j.1469-8137.1997.00653.x.
104. Nadian, H. 2011. The effect of drought stress and mycorrhizal symbiosis on growth and phosphorus uptake by two different sorghum cultivars in root morphology. *Journal of Water and Soil Science*, Esfahan University of Technology, 57: 25-30 doi: 20.1001.1.24763594.1390.15.57.10.2, [In Persian].
105. Nadian, H., Haydari, M., Gharineh, M.H., Daneshvar, M.H. 2013a. Effect of different levels of sodium chloride and mycorrhizal and uptake of P, Na and K by saffron (*Crucus sativus*, L.). *Journal of Plant Production* (*Journal of Scientific Agriculture*), 36(2), doi: article_10149_456a73c2053ee12bb0f96353c36d5a87.pdf [In Persian].

106. Nadian, H. Fathi, G. and Abdollahi, 2013b. Phosphorus Inflow into Two Species of Clover Root with Different Morphology Colonized by AM Fungi. *Iran Agricultural Research*, 32(1), 41-54 Shiraz University. doi: 10.22099/iar.2013.1816.
107. Nath, M., Bhatt, D., Prasad, R., Gill, S.S., Anjum, N.A. and Tuteja, T. 2016. Reactive oxygen species generation-scavenging and signaling during plant-arbuscular mycorrhizal and piriformospora indica interaction under stress condition. *Frontier in Plant Science*, 7:1574. doi: 10.3389/fpls.2016.01574.
108. Nawaz, M. and Wang, Z. 2020. Abscisic acid and glycine betaine mediated tolerance mechanisms under drought stress and recovery in axonopus compressus: A New Insight. *Scientific Reports*, 10: 6942. doi: 10.1038/s41598-020-63447-0.
109. Nazarli, H., Ahmadi, A. and Hadian, J. 2014. Salicylic acid and methyl jasmonate enhance drought tolerance in chamomile plants. *Journal of HerbMed Pharmacology*, 2014; 3(2), 87-92. eISSN: 2345-5004.
110. Nemeskeri, E., Molnar, K., Vigh, R., Nagy, J. and Dobos, A. 2015. Relationships between stomatal behaviour, spectral traits and water use and productivity of green peas (*Pisum sativum* L.) in dry seasons. *Acta physiologiae plantarum,* 37, 1–16. doi:10.1007/s11738-015-1776-0.
111. OECD. (2025). *Development finance to combat desertification, land degradation and drought* (OECD Publishing, Paris). https://doi.org/10.1787/23f62ad9-en.
112. Oh, E., Yamaguchi, S., Hu, J.H., Yusuke, J., Jung, B., Paik, I., Li, H.S., Sun, T.P., Kamia, Y. and Choi, G. 2007. PIL5, a phytochrome-interacting bHLH protein, regulates gibberellin responsiveness by binding directly to the GAI and RGA promoters in *Arabidopsis* seeds. *Plant Cell*, 19 (4), 1192–1208, doi: 10.1105/tpc.107.050153.
113. Orine, D., Defossez, E., Vergara, F., Uthe, H., van Dam, N.M. and Rasmann, S. 2022. Arbuscular mycorrhizal fungi prevent the negative effect of drought and modulate the growth-defence trade-off in tomato plants. *Journal of Sustainable Agriculture and Environment*. 1(3), 177-190. doi: org/10.1002/sae2.12018.
114. Paluch-Lubawa, E., Prosicka, B. and Polcyn, W. 2024. Expression patterns of maize PIP aquaporins in middle or upper leaves correlate with their different physiological responses to drought and mycorrhiza. *Frontier in Plant Science*, 13, doi: 10.3389/fpls.2024.1459016. eCollection 2024.
115. Paluch-Lubawa, E. and Polcyn, W. 2024. Tissue-specific accumulation of PIP aquaporins of a particular heteromeric composition is part of the maize response to mycorrhiza and drought. *Scientific Reports*, 17, 14(1):21712. doi: 10.1038/s41598-024-72828-8.
116. Parent, B., Hachez, C., Redondo, E., Simonneau, T., Chaumont, F. and Tardieu, F. 2009. Drought and abscisic acid effects on aquaporin content translate into changes in hydraulic conductivity and leaf growth rate: a trans-scale approach. *Plant Physiology*, 149, 2000–2012. doi: org/10.1104/pp.108.130682.
117. Park, W., Scheffler, B.E., Bauer, P.J., Campbell, B.T. 2010. Identification of the family of aquaporin genes and their expression in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *BMC Plant Biology*, 10:142, http://www.biomedcentral.com/1471-2229/10/142.
118. Peng, Y.Y., Liu, C.Y. and Hao, Y. 2025 . Differential effects of arbuscular mycorrhizal fungi on rooting and physiology of Summer Black'Grape Cuttings. *Horticulturae*, 11, 825. Doi: org/10.3390/horticulturae11070825.
119. Pirasteh-Anosheh, H., Saed-Moucheshi, A., Pakniyat, H. and Pessarakli, M. 2016. Stomatal responses to drought stress. In: Ahmad, P. (Ed.), *Water Stress and Crop Plants*: A Sustainable approach. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, 24–40, https:// doi.org/10.1002/9781119054450.ch3.
120. Pons, C. and Muller, C. 2022. Impacts of drought stress and mycorrhizal inoculation on the performance of two spring wheat cultivars. *Plants*, 11, 2187. doi:org/10.3390/plants11172187.
121. Porcel, R., Arco, R., Cano, C., Bago, A. and Ruiz-Lozano, J.M. 2006. Identification of a gene from the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* encoding for a *14-3-3 Protein* that is up-regulated by drought stress during the AM symbiosis. *Microbial Ecology*, 52(3), 575-582, doi: 10.1007/s00248-006-9015-2.
122. Porcel, R., Azcon, R. and Ruiz-Lozano, J.M. 2005. Evaluation of the role of genes encoding for dehydrin proteins (LEA D-11) during drought stress in arbuscular mycorrhizal Glycine max and Lactuca sativa plants. *Journal of Experimental Botany*, 56: 1933-1942. doi: org/10.1093/jxb/eri188.

123. Pozo, M.J., Cordier, C., Dumas-Gaudot, E., Gianinazzi S., Barea, J.M. and Azcón-Aguilar, C. 2002. Localized versus systemic effect of arbuscular mycorrhizal fungi on the defence responses to *Phytophthora* infection in tomato plants. *Journal of Experimental Botany* 53, 525–534. doi: org/10.1093/jexbot/53.368.525.

124. Quiroga, G., Erice, G., Aroca, R., Chaumont, F., and Ruiz-Lozano, J.M. 2017. Enhanced drought stress tolerance by the arbuscular mycorrhizal symbiosis in a drought-sensitive Maize Cultivar Is Related to a Broader and Differential Regulation of Host Plant aquaporins than in a drought-tolerant cultivar. *Frontier in Plant Science*, 8,1056, Open access, doi: 10.3389/fpls.2017.01056.

125. Quigley, F., Rosenberg, J.M., Shachar-Hill, Y. and Bohnert, H.J. 2001. *Genome Biology,* 7;3(1):17. doi:10.1186/gb-2001-3-1-research0001.

126. Reis, A.D.P., Carvalhob, R.F., Costaa, I.B., Girioa, R.J.S., Gualbertoa, R., Spersa, R.C. and Gaiona, L.A. 2022. Hydrogen peroxide is involved in drought stress long-distance signaling controlling early stomatal closure in tomato plants. *Brazilian Journal of Biology*, 82, e267343, https://doi.org/10.1590/1519-6984.267343.

127. Reuscher, S., Akiyama, M., Mori, C., Aoki, K., Shibata, D., Shiratake, K. 2013. Genome-wide identification and expression analysis of aquaporins in tomato. *PLoS One*, 19, 8(11), e79052. doi: 10.1371/journal.pone.0079052. eCollection 2013.

128. Rodriguez-Gacio, M., Matilla-Vázquez, M.A. and Matilla, A.J. 2009. Seed dormancy and ABA signaling. *Plant Signaling and Behavior,* 4, 1035–1048, doi:10.4161/psb.4.11.9902 .

129. Romera, S.R., Ruiz-Lozano, J.M., Zamarreño, A.M., Garcia-Mina, J.M. and Aroca-Ramal, R. 2016. Arbuscular mycorrhizal symbiosis and methyl jasmonate avoid the inhibition of root hydraulic conductivity caused by drought. *Mycorrhiza,* 26, 111–122. doi: 10.1007/s00572-016-0728-2.

130. Roussel, H., Bruns, S., Gianinazzi-Pearson, V., Hahlbrock, K. and Franken, P. 1997. Induction of a membrane intrinsic protein-encoding mRNA in arbuscular mycorrhiza and elicitor-stimulated cell suspension cultures of parsley. *Plant Science*, 126:203–210.

131. Ruiz-Sanchez, M., Armada, E., Munoz, Y., Garcia de Salamone, I.E, Aroca, R., Ruíz-Lozano, J.M. and Azcón, R. 2011. Azospirillum and arbuscular mycorrhizal colonization enhance rice growth and physiological traits under well-watered and drought conditions. *Journal of Plant Physiology.* 168(10)**,** 1031–1037, doi: 10.1016/j.jplph.2010.12.019. Epub 2011 Mar 5.

132. Ruiz-Sanchez, M., Aroca, R., Munoz, Y., Polon, R. and Ruiz-Lozano, J.M. 2010. The arbuscular mycorrhizal symbiosis enhances the photosynthetic efficiency and the antioxidative response of rice plants subjected to drought stress. *Journal of Plant Physiology*, 167: 862-869. https://doi.org/10.1016/j.jplph.2010.01.018 .

133. Ruiz-Lozano, J.M., Collados, C., Barea, J.M., Azcón, R. 2001. Clonig of cDNAs encoding SODs from lettuce plants which show differential regulation by arbuscular mycorhizal symbiosis and by drought stress. *Journal of Experimental Botany* 52, 2241–2242.

134. Ruiz-Lozano, J.M., Perálvarez, M.C., Aroca, R. and Azcón, R. 2011. The application of a treated sugar beet waste residue to soil modifies the responses of mycorrhizal and non-mycorrhizal lettuce plants to drought stress. *Plant Soil*, 346, 153–166. doi: 10.1007/s11104-011-0805-z.

135. Ruiz-Lozano, J.M., Azcon, R., Gomez, M. 1995. Effects of arbuscular mycorrhizal Glomus species on drought tolerance: physiological and nutritional plant responses. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 456–60. doi: 10.1128/aem.61.2.456-460.1995.

136. Ruiz-Lozano, J.M., Azcón R. and Palma, J.M. 1996. Superoxide dismutase activity in arbuscular mycorrhizal *Lactuca sativa* plants subjected to drought stress. *New Phytologist,* 134, 327–333. doi: 10.1111/j.1469-8137.1996.tb04637.x

137. Ruiz-Lozano, D., Porcel, R. and Aroca, R. 2006. Does the enhanced tolerance of arbuscular mycorrhizal plants to water deficit involve modulation of drought-induced plant genes? *New Phytologist*, 171 (4): 693-698. doi: org/10.1111/j.1469-8137.2006.01841.x.

138. Ruiz-Lozano, J.M., Porcel, R., Bárzana, G., Azcón, R. and Aroca, R., 2012. Contribution of arbuscular mycorrhizal symbiosis to plant drought tolerance: State of the art. In: Aroca, R. (ed.) *Plant Responses to Drought Stress*. Springer, Berlin, pp.335–362. doi: 10.1007/978-3-642-32653-0_13.

139. Safir, G.R., Boyer, J.S. and Gerdemann. J.W. 1971. Mycorrhizal enhancement of water transport in soybean. *Science*, 172, 581-583. doi: org/10.1126/science.172.3983.581.
140. Said, A.F., Alwutayd, K.M., KaAma, N., and Ghanem, O.M. 2025. Diversity and effectiveness of arbuscular mycorrhizal fungi species in alleviating drought stress in tomato. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, *53*(2), 14382. https://doi.org/10.15835/nbha53214382.
141. Saijo, Y. 2001. A Ca^{2+}-dependent protein kinase that endows rice plants with cold- and salt-stress tolerance functions in vascular bundles. *Plant Cell Physiol*ogy, 42(11), 1228–1233. doi: org/10.1093/pcp/pce158.
142. Salas-González, I., Reyt, G., Flis, P., Custódio, V., Gopaulchan, D., Bakhoum, N., Dew, T.P. Suresh, K., Franke, R.B., Dang, J.L., Salt, D.E. and Castrillo, G. 2021. Coordination between microbiota and root endodermis supports plant mineral nutrient homeostasis. *Science*, 8: 371 (6525) eabd0695, doi: 10.1126/science.abd0695.
143. Seo, M., Hanada, A., Kuwahara, A., Endo, A., Okamoto, M., Yamauchi, Y., North, H., Marion-Poll, A., Sun, T.P., Koshiba, T., Kamiaya, Y., Yamaguchi, S. and Nambara, E. 2006. Regulation of hormone metabolism in *Arabidopsis* seeds: phytochrome regulation of abscisic acid metabolism and abscisic acid regulation of gibberellin metabolism. *Plant Journal,* 48, 354–366. doi:10.1111/j.1365-313X.2006.02881.x.
144. Sepahvand, T., Etemad, V., Matinizadeh, M., Shirvany, A. 2021. Symbiosis of AMF with growth modulation and antioxidant capacity of Caucasian Hackberry (*Celtis Caucasica* L.) seedlings under drought stress. *Central Asian Journal of Environmental Science and Technology Innovation*, 2(1), 20-35. doi: org/10.22034/CAJESTI.2021.01.03.
145. Shavrukov, Y., Kurishbayev, A., Jatayev, S., Shvidchenko, V., Zotova, L., Koekemoer, F., de Groot, S., Soole, K. and Peter Langridge, P. 2017. Early flowering as a drought escape mechanism in plants: How can it aid wheat production? *Frontiers in Plant Science*, 8:1950. doi: 10.3389/fpls.2017.01950.
146. Staszek, P. and Gniazdowska, A. 2020. Peroxynitrite induced signaling pathways in plant response to non-proteinogenic amino acids. *Planta*, 252:5. https://doi.org/10.1007/s00425-020-03411-4.
147. Smirnoff, N. and Arnaud, D. 2019. Hydrogen peroxide metabolism and functions in plants. *New Phytologist*, 221, 1197–1214, doi: 10.1111/nph.15488.
148. Sood, M. 2025. Reactive oxygen species (ROS): plant perspectives on oxidative signalling and biotic stress response. *Discover Plants*, 2,187. doi: org/10.1007/s44372-025-00275-4.
149. Spinoso-Castillo, J.L., Moreno-Hernandez, M.D.R., Mancilla-Alvarez, E., Sanchez-Segura, L., Sanchez-Paez, R. and Bello-Bello, J.J. 2023. Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis improves ex vitro acclimatization of sugarcane plantlets (*Saccharum* Spp.) under drought stress conditions. *Plants*, 12(3), 687. doi: org/10.3390/plants12030687.
150. Steudle E. 2000. Water uptake by roots: effects of water deficit. *Journal of Experimental Botany* 51, 1532–1542. doi:org/10.1093/jexbot/51.350.1531.
151. Steudle, E. and Peterson, C.A. 1998. How does water get through roots? *Journal of Experimental Botany* 49: 775–788. doi: org/10.1093/jxb/49.322.775.
152. Sun, Z., Li, S., Chen, W., Zhang, J., Zhang, L., Sun, W. and Wang, Z. 2021. Plant dehydrins: expression, regulatory networks, and protective roles in plants challenged by abiotic stress. *International journal of Molecular Science*, 23(22),12619. doi: 10.3390/ijms222312619.
153. Sun, Q., Liu, X., Kitagawa, Y., Calamita, G., Ding, X. 2024. Plant aquaporins: Their roles beyond water transport. *The Crop Journal*, 12(3), 641-655. https://doi.org/10.1016/j.cj.2024.04.00.
154. Tahiri, A. Meddich, A. Raklami, A., Alahmad, A., Bechtaoui, B., Anli, M., Göttfert, M., Heulin, T., Wafa Achouak, W. and Oufdou, K. 2022. Assessing the potential role of compost, PGPR, and AMF in improving tomato plant growth, yield, fruit quality, and water stress tolerance. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 22(1), 743–764. doi: 10.1007/s42729-021-00684-w.
155. Tominaga, T., Yamaguchi, K., Shigenobu, S., Yamato, M. and Kaminaka, H. 2020a. The effects of gibberellin on the expression of symbiosis-related genes in Paris-type arbuscular mycorrhizal symbiosis in *Eustoma grandiflorum*. *Plant Signaling & Behavior* 15, 1784544. doi: org /10.1080/15592324.2020.1784544.

156. Tominaga, T., Miura, C., Takeda, N., Yuri Kanno, Y., Takemura, Y., Seo, M., Yamato, M. and Kaminaka, H. 2020b. Gibberellin promotes fungal entry and colonization during Paris-type arbuscular mycorrhizal symbiosis in *Eustoma grandi-florum*. *Plant and Cell Physiology*, 61, 565–575. doi: org/10.1093/pcp/pcz222.
157. Tyagi, S., Shumayla, Singh, S.P. and Upadhyay, S.K. 2019. Role of superoxide dismutases (SODs) in stress tolerance in plants. *Springer Nature*, In: *Molecular Approaches in Plant Biology and Environmental Challenges*, 51-77. doi: org/10.1007/978-981-15-0690-1_3.
158. Uehlein, N, Fileschi, K., Eckert, M., Bienert, G.P., Bertl, A. and Kaldenhoff, R. 2007. Arbuscular mycorrhizal symbiosis and plant aquaporin expression. *Phytochemistry,* 68:122–129. doi: 10.1016/j.phytochem.2006.09.033.
159. UN Convention to Combat Desertification (UNCCD). UN Press Release, 9 December 2024.
160. Urao, T., Katagiri, T., Mizoguchi, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Hayashida, N., Shinozaki, K. 1994. Two genes that encode Ca^{2+}-dependent protein kinases are induced by drought and high-salt stresses in *Arabidopsis thaliana*, *Molecular Genetics and Genomics*, 244(4), 331–340. doi: org/10.1007/BF00286684.
161. Volaire, F. 2018. A unified framework of plant adaptive strategies to drought: crossing scales and disciplines. *Global Change Biology*, 24(7), 2929–2938. doi: org/10.1111/gcb.14062.
162. Wang, C., El-Shetehy, M., Shine, M.B., Yu, K., Navarre, D., Wendehenne, D., Kachroo A. and Kachroo, P. 2014. Free radicals mediate systemic acquired resistance. *Cell Reports* 7(2), 3,48–355. doi: org/10.1016/j.celrep.2014.03.032
163. Wang, B.L., Tang, X.Y., Cheng, L.Y., Zhang, A.Z., Zhang, W.H., Zhang, F.S., Liu, J.Q., Cao, Y., Allan, D.L., Vance, C.P. and Shen, J.B. 2010. Nitric oxide is involved in phosphorus deficiency-induced cluster-root development and citrate exudation in white lupin. *New Phytol*ogist, 2010, 187:1112–1123. doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03323.x.
164. Wang, Q., Liang, X., Dong, Y., Xu, L., Zhang, X., Kong, J. and Liu, S. 2013. Effects of exogenous salicylic acid and nitric oxide on physiological characteristics of perennial ryegrass under cadmium stress. *Journal of Plant Growth Regulation*, 32, 721–731. doi: org/10. 1007/s00344-013-9339-3.
165. Wang, D., Ni, Y., Xi., K., Li, Y., Wu, W., Shan, H., Cheng, B. and Li, X. 2024. Aquaporin ZmTIP2;3 promotes drought resistance of maize through symbiosis with arbuscular mycorrhizal fungi. *International Journal of Molecular Science, 25*(8), 4205. doi: org/10.3390/ijms25084205.
166. Wasternack, C., and Song, S. 2017. Jasmonates: biosynthesis, metabolism, and signaling by proteins activating and repressing transcription. *Journal of Experimental Botany*, 68(6), 1303–1321. doi: org/10.1093/jxb/erw443.
167. Wei, Y. S., Javed, T., Liu, T.T., Ahmad Ali, A. and Gao, S.J. 2025. Mechanisms of Abscisic acid (ABA)-mediated plant defense responses. *Plant stress*, 15, 100724. doi: org/10.1016/j.stress.2024.100724.
168. Wen, Y., Zhou, L.J., Xu, Y.J., Hashem, A., Abd_Allah, E.F. and Wu, Q.S. 2024. Growth performance and osmolyte regulation of drought-stressed walnut plants are improved by mycorrhiza. *Agriculture*, 14, 367. doi: org/10.3390/agriculture14030367.
169. Wilkinson, S., Davies and W.J. 2010. Drought, ozone, ABA and ethylene: new insights from cell to plant to community. *Plant, Cell & Environment*, 33, 510–525. doi: org/10.1111/j.1365-3040.2009.02052.x
170. Wu, H.H., Zou, Y.N., Rahman, M.M., Ni, Q.D., and Wu, Q.S. 2017. Mycorrhizas alter sucrose and proline metabolism in trifoliate orange exposed to drought stress. *Scientific Reports*, 7, 42389. doi: 10.1038/srep42389.
171. Xie, W., Hao1, Z., Zhou, X. Jiang, X., Xu, L., Wu, S., Zhao, A., Xin Zhang, X. and Chen, B. 2018. Arbuscular mycorrhiza facilitates the accumulation of glycyrrhizin and liquiritin in *Glycyrrhiza uralensis* under drought stress. *Mycorrhiza*, Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018. doi: org/10.1007/s00572-018-0827-y.
172. Xu, L., Li, T., Wu, Z., Feng, H., Yu, M., Zhang, X. and Hen, B.C. 2018. Arbuscular mycorrhiza enhances drought tolerance of tomato plants by regulating the 14-3-3 genes in the ABA signaling pathway. *Applied Soil Ecology*, 125, 213-221, doi: org/10.1016/j.apsoil.2018.01.012.
173. Xu, D., Duan, X. Wang, B., Hong, B., Ho, T.H.D. and Wu, R. 1996. Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, *HVA7,* from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. *Plant Physiology*, 110, 249-257. doi: 10.1104/pp.110.1.249.

174. Ye, Q., Wang, H. and Li, H. 2022. Arbuscular Mycorrhizal fungi improve growth, photosynthetic activity, and chlorophyll fluorescence of *Vitis vinifera* L. cv. ecolly under drought stress. *Agronomy*, *12*(7), 1563, doi: org/10.3390/agronomy12071563.

175. Zhang, S.W., Li, C.H., Cao, J., Zhang, Y.C., Zhang, S.Q., Xia, Y.F., Sun, D.Y. and Sun, Y. 2009. Altered architecture and enhanced drought tolerance in rice via the down-regulation of indole-3-acetic acid byTLD1/OsGH3.13 Activation. *Plant Physiology*, 151, 1889–1901. doi: org/10.1104/pp.109.146803.

176. Zhang, Z., Zhang, J. and Huang, Y., 2014. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on the drought tolerance of *Cyclobalanopsis glauca* seedlings under greenhouse conditions. *New Forests*, 45(4), 545-556. doi:10.1007/s11056-014-9417-9.

177. Zhang, X., Yu, Y., Zhang, J., Qian, X., Li, X. and Sun, X. 2024. Recent progress regarding jasmonates in tea plants: Biosynthesis, signaling, and function in stress responses. *International Journal of Molecular Sciences*, 25, 1079. doi: org/10.3390/ijms25021079.

178. Zhu, Y.X., Yang, L., Liu, N., Yang, J., Zhou, X.K., Xia, Y.C., He, Y., He, Y.Q., Gong , H.J. Ma, D.F. and Yin, J.L. 2019. Genome-wide identification, structure characterization, and expression pattern profiling of aquaporin gene family in cucumber. *BMC Plant Biology,* 7,19(1), 345. doi: 10.1186/s12870-019-1953-1.

179. Zhu, J., Lu, P., Jiang, Y., Wang, M. and Zhang, L. 2014. Botany, Effects of brassinosteroid on antioxidant system in *Salvia miltiorrhiza* under drought stress. *Journal of Research in Agriculture and Animal Science*, 2(1), 01-06, www.questjournals.org, ISSN(Online): 2321-9459.

180. Zhao, H., Zhang, Y. and Zheng, Y. 2022. Integration of ABA, GA, and light signaling in seed germination through the regulation of ABI5. *Frontier in Plant Science*, 13, doi: org/10.3389/fpls.2022.1000803.

181. Zou, Y.N., Wan, Y.X., Zheng, F.L., Cheng, X.F., Hashem, A. and Wu, Q.S. 2025. Mycorrhizal trifoliate orange plants tolerate soil drought by enhancing photosynthetic physiological activities and reducing active GA3 levels. *Tree Physiology*, 45:8, tpaf073, doi: org/10.1093/treephys/tpaf073.

182. Zou, Y.N., Huang, Y.M., Wu, Q.S. and He, X.H. 2015. Mycorrhiza-induced lower oxidative burst is related with higher antioxidant enzyme activities, net H_2O_2 effluxes, and Ca^{2+} influxes in trifoliate orange roots under drought stress. *Mycorrhiza*, 25(2),143-52, doi: 10.1007/s00572-014-0598-z. Epub 2014 Aug 3.

Publisher: Soil Science Society of Iran

Journal of Soil Biology

https://sbj.areeo.ac.ir/

Research article

Comparison of Ecotoxicity of Copper Oxide and Nickel Oxide Nanoparticles on Soil Enzyme Activities in Two Different Soil Textures

Shekoofeh Rezaei[1]*, Ali Khanmirzaei[1], and Vahideh Sharifi Golro[1]

[1] Department of Soil Science, Ka,C., Islamic Azad University, Karaj, Iran.

Article Info

Received: 2026-01-05

Accepted: 2026-04-25

Keywords:
Metal oxide nanoparticles,
Phosphatases,
Soil pollution,
Soil texture,
Urease

Corresponding author's email:
Shekoofeh.rezaei@iau.ac.ir
Rezaee_sh@yahoo.com

Doi:
10.22092/sbj.2026.371895.293

Extended Abstract

Background and Objectives: In recent decades, the rapid advancement of nanotechnology has revolutionized various sectors, including agriculture, medicine, and electronics. Consequently, the release of engineered nanoparticles (ENPs) into the environment has become increasingly unavoidable. Soil serves as a primary sink for these pollutants and accumulates nanoparticles through the application of nano-fertilizers, pesticides, wastewater sludge, and atmospheric deposition. Among various nanomaterials, metal oxide nanoparticles (MO-NPs), particularly copper oxide (CuO) and nickel oxide (NiO), are widely used due to their unique catalytic and antimicrobial properties. However, their accumulation in soil ecosystems raises serious concerns regarding their potential ecotoxicity to non-target organisms. Soil health and fertility are closely linked to the activity of soil microorganisms and their extracellular enzymes. Enzymes such as urease and phosphatases play pivotal roles in the biogeochemical cycling of nitrogen (N) and phosphorus (P), respectively. Any disruption in their functionality can lead to the deterioration of soil quality and nutrient availability. The toxicity of nanoparticles in soil is a complex phenomenon governed not only by the type and concentration of the contaminant but also by the physicochemical properties of the soil, such as texture and organic matter content. While studies have assessed the toxicity of individual nanoparticles, comparative research on the time-dependent effects of CuO and NiO nanoparticles in calcareous soils with distinct textures remains limited. Therefore, this study aimed to comparatively evaluate the ecological toxicity of CuO and NiO nanoparticles on key soil biochemical indicators (urease, acid phosphatase, and alkaline phosphatase) in two soils with contrasting textural properties (Sandy Loam vs. Clay) to understand the interaction between soil matrix and nanoparticle toxicity kinetics.

Materials and Methods: To investigate the role of soil texture in modulating nanoparticle toxicity, two surface soil samples (0–30 cm) were collected from agricultural lands with distinct physicochemical characteristics. The first soil was characterized as Sandy Loam (Sand: 58.2%, Clay: 19.8%, Organic Carbon: 0.70%), while the second soil was classified as Clay (Sand: 18.2%, Clay: 49.8%, Organic Carbon: 1.37%). The study was conducted as a factorial experiment based on a Completely Randomized Design (CRD) with three replications under controlled laboratory conditions at 25°C. The experimental factors included Nanoparticle Type (Copper oxide ~40 nm and Nickel oxide 10–20 nm, both with 99% purity), Concentration (four levels: 0, 100, 500, and 1000 mg kg^{-1} dry soil), and Incubation Time (three intervals: 7, 24, and 72 days) to assess toxicity kinetics. To simulate realistic exposure conditions and avoid any solvent-related interference, nanoparticles were added to the soil as dry powder (uncoated) and thoroughly mixed. Soil moisture was maintained at 60% of field capacity (FC) throughout the incubation. At each sampling time, enzyme activities were assayed using standard spectrophotometric methods: Urease activity was quantified by measuring the ammonium released during urea hydrolysis, while Acid and Alkaline Phosphatase activities were quantified by the release of p-nitrophenol (pNP) using p-nitrophenyl phosphate as the substrate. Statistical analyses, including Independent

Samples t-test for baseline comparison and ANOVA followed by Duncan's multiple range test for treatment effects, were performed to interpret the data.

Results: Independent t-test results revealed a significant inherent difference in the biological potential of the two soils. The baseline activity of acid phosphatase in the Clay soil (658 µg pNP g^{-1} h^{-1}) was approximately 66% higher than that of the Sandy Loam soil (396 µg pNP g^{-1} h^{-1}) ($P < 0.01$), emphasizing the role of clay and organic matter in supporting enzymatic pools. Analysis of variance revealed significant main effects and interactions (Time × Type × Concentration). CuO nanoparticles exerted consistently higher and more persistent toxicity than NiO across both soil types. In the Sandy Loam soil, the impact was severe due to low buffering capacity. At the highest concentration (1000 mg kg^{-1}) of CuO, urease activity plummeted by over 90% relative to the control by the end of the incubation period (day 72). This inhibition is primarily attributed to the relatively high solubility of CuO and the interaction of Cu^{2+} ions with thiol (-SH) groups in enzyme active sites. Conversely, NiO nanoparticles exhibited a time-lag toxicity pattern, where significant inhibition in Sandy Loam soil was delayed until day 72. In contrast, the inhibitory effects were notably ameliorated in the Clay soil. A key finding was the non-significant main effect of incubation time on urease activity ($P > 0.05$) in the clay soil. This suggests that the high clay content (49.8%) facilitated the formation of stable enzyme-clay-humus complexes, which protected urease enzyme from denaturation and proteolytic degradation over time. Interestingly, NiO nanoparticles at lower concentrations (100 mg kg^{-1}) occasionally demonstrated a hormetic effect (stimulation of activity), particularly for alkaline phosphatase in the early stages, contrasting with CuO which generally followed a strict dose-dependent inhibition pattern.

Conclusion: This study provides robust evidence that soil texture is a key determinant in the ecological risk assessment of engineered nanoparticles. Light-textured (Sandy Loam) soils exhibit significantly higher ecological sensitivity to metal oxide contamination compared to heavy-textured (Clay) soils, which possess a "protective effect" due to higher colloidal content. Among the tested pollutants, CuO nanoparticles pose a more severe and immediate threat to soil nutrient cycling than NiO due to their higher chemical reactivity. The findings suggest that environmental risk assessments for nanomaterials must account for site-specific soil properties and the dynamic nature of toxicity (aging effect) over time. Future research should focus on molecular‑level mechanisms and long-term field monitoring to further validate these interactions.

Cite this article: Rezaei, Sh., khanmirzaei, A., Sharifi Golro, V., 2026. Comparison of Ecotoxicity of Copper Oxide and Nickel Oxide Nanoparticles on Soil Enzyme Activities in Two Different Soil Textures. Research article, *Journal of Soil Biology, 14 (1),*61-80 .



DOI: 10.22092/sbj.2026.371895.293
Publisher: Soil Science Society of Iran

دو فصلنامه

نشریه زیست‌شناسی خاک

https://sbj.areeo.ac.ir/

مقاله پژوهشی

مقایسه سمیت اکولوژیک نانوذرات اکسید مس و اکسید نیکل بر فعالیت‌های آنزیمی در دو خاک با بافت متفاوت

شکوفه رضائی[1*]، علی خانمیرزایی[1] و وحیده شریفی‌گلرو[1]

[1] گروه خاکشناسی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران.

دریافت: ۱۴۰۴/۱۰/۱۵ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۲/۰۵

چکیده

گسترش روزافزون کاربرد نانوذرات مهندسی‌شده در صنایع و کشاورزی نگرانی‌هایی را در خصوص سلامت بستر خاک ایجاد کرده است. این پژوهش با هدف ارزیابی و مقایسه سمیت اکولوژیک نانوذرات اکسید مس و اکسید نیکل بر شاخص‌های بیوشیمیایی در دو نوع خاک با ویژگی‌های بافتی متفاوت انجام شد. آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه فاکتور شامل نوع نانوذره (CuO و NiO)، غلظت نانوذره (۰، ۱۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک خشک) و زمان انکوباسیون (۷، ۲۴ و ۷۲ روز) در دو خاک با بافت لوم شنی و رسی اجرا گردید. فعالیت آنزیم‌های اوره‌آز، فسفاتاز اسیدی و فسفاتاز قلیایی به‌عنوان شاخص‌های پاسخ زیستی اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که نوع بافت خاک نقش تعیین‌کننده‌ای در شدت پاسخ آنزیمی ایفا می‌کند؛ به‌طوری‌که میانگین پایه فعالیت فسفاتاز اسیدی در خاک رسی (۶۵۸µg pNP g-1 h-1) حدود ۶۶ درصد بالاتر از خاک لوم شنی (۳۹۶µg pNP g-1 h-1) بود (P< ۰,۰۱). نانوذرات اکسید مس سمیت شدیدتری نسبت به نیکل اعمال کردند؛ به‌گونه‌ای که در غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم CuO، فعالیت آنزیم اوره‌آز در خاک لوم شنی در انتهای دوره (روز ۷۲) تا بیش از ۹۰ درصد نسبت به شاهد کاهش یافت. در مقابل، نانوذرات NiO در غلظت پایین (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) در برخی موارد موجب افزایش فعالیت آنزیمی شدند. همچنین، اثر زمان بر فعالیت اوره‌آز در خاک رسی تفاوت معنی‌داری را نشان نداد (P > 0.05) که نشان‌دهنده پایداری آنزیمی در حضور ۴۹/۸ درصد رس است، در حالی‌که در خاک لوم شنی (با ۱۹/۸ درصد رس) فعالیت آنزیم‌ها نوسانات زمانی و کاهش معنی‌داری را تجربه کردند. به طور کلی، خاک‌های با بافت سبک حساسیت اکولوژیک بسیار بالاتری نسبت به آلودگی نانوذرات اکسید فلزی دارند و نانوذرات اکسید مس حتی در غلظت‌های پایین تهدیدی جدی‌تر نسبت به اکسید نیکل برای چرخه عناصر غذایی خاک محسوب می‌شوند.

واژه‌های کلیدی: آلودگی خاک، اوره‌آز، بافت خاک، فسفاتازها، نانوذرات اکسید فلزی.

استناد: رضائی، ش.، خانمیرزایی، ع.، شریفی‌گلرو، و.، ۱۴۰۵. مقایسه سمیت اکولوژیک نانوذرات اکسید مس و اکسید نیکل بر فعالیت‌های آنزیمی در دو خاک با بافت متفاوت. مقاله پژوهشی، *نشریه زیست شناسی خاک*، *۱۴(۱)*، ۸۰-۶۱.

مقدمه

در دهه‌های اخیر، فناوری نانو به عنوان یکی از پیشران‌های کلیدی انقلاب صنعتی نوین، تحولات شگرفی در حوزه‌های مختلف از جمله پزشکی، الکترونیک، صنایع شیمیایی و کشاورزی ایجاد کرده است (Khan et al., 2023). تولید جهانی نانوذرات مهندسی شده (ENPs[1]) به دلیل ویژگی‌های فیزیکو شیمیایی منحصربه‌فرد آن‌ها، نظیر نسبت سطح به حجم بالا و واکنش‌پذیری شیمیایی زیاد، به شدت در حال افزایش است. برآورد می شود که بخش قابل‌توجهی از این نانوذرات در نهایت از طریق مسیرهای مختلفی همچون کاربرد مستقیم کودها و سموم نانوپایه، استفاده از لجن فاضلاب در اراضی کشاورزی و نهشت اتمسفری وارد بستر خاک می‌شوند (Rajput et al., 2021). در میان انواع نانومواد، نانوذرات اکسید فلزی[2] به دلیل کاربردهای گسترده در کاتالیزورها، حسگرها و عوامل ضدمیکروبی، سهم بزرگی از آلاینده‌های نوظهور خاک را به خود اختصاص داده‌اند (Yousefi et al., 2023). با توجه به اینکه خاک مخزن نهایی بسیاری از آلاینده های زیست‌محیطی است، نگرانی‌های فزاینده‌ای در خصوص پایداری اکوسیستم‌های خاکی و سلامت زنجیره غذایی در اثر تجمع این نانوذرات وجود دارد.

کیفیت و سلامت خاک تابعی از تعادل پیچیده بین ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی و زیستی آن است (Aliasgharzad, 2026). در این میان، جوامع میکروبی خاک و فعالیت‌های آنزیمی آن‌ها نقش بنیادینی در تجزیه مواد آلی، چرخه عناصر غذایی و پایداری ساختمان خاک ایفا می‌کنند (Datta et al., 2020; Fallah Nosratabad & Khoshru, 2024). آنزیم‌های خارج سلولی خاک، به عنوان کاتالیزورهای زیستی، نسبت به تغییرات محیطی و حضور آلاینده‌ها بسیار حساس بوده و اغلب به عنوان هشدارهای زودهنگام[3] برای پایش آلودگی خاک مورد استفاده قرار می‌گیرند (Alkorta et al., 2017).

در بین آنزیم‌های خاک، اوره‌آز (EC 3.5.1.5) و فسفاتازها (EC 3.1.3) از اهمیت ویژه‌ای برخوردار ند. اوره‌آز با هیدرولیز اوره به آمونیاک و دی‌اکسید کربن، نقشی حیاتی در چرخه نیتروژن ایفا می‌کند، در حالی که فسفاتازها (اسیدی و قلیایی) مسئول معدنی‌کردن فسفر آلی و تأمین فسفر قابل جذب برای گیاهان و ریزجانداران هستند (Cui et al., 2022). هرگونه اختلال در فعالیت این آنزیم ها می‌تواند منجر به کاهش حاصلخیزی خاک و اختلال در عملکرد اکوسیستم‌های زراعی شود.

امروزه نانوذرات اکسید فلزی جایگاه ویژه‌ای در صنعت و کشاورزی هوشمند پیدا کرده‌اند (Khoshru et al., 2025). نانوذرات اکسید مس (CuO-NPs) به دلیل خواص ضدقارچی و ضدباکتری قوی، به عنوان نسل جدیدی از آفت‌کش‌ها و قارچ‌کش‌های نانوپایه و همچنین به عنوان نانوکود برای تأمین مس (ریزمغذی ضروری فتوسنتز) کاربرد گسترده‌ای دارند (Parween et al., 2021). نانوذرات اکسید نیکل (NiO-NPs) نیز علاوه بر کاربرد وسیع در تولید باتری‌ها و کاتالیزورهای شیمیایی، به عنوان منبع تأمین نیکل (کوفاکتور آنزیم اوره‌آز) و ساخت حسگرهای زیستی جهت پایش کیفیت خاک مورد توجه قرار گرفته‌اند (Faisal et al., 2024). با این حال، استفاده گسترده و ورود بی‌رویه این نانوذرات به خاک می‌تواند اثرات سمیت زیست‌محیطی مخربی داشته باشد. مکانیسم‌های اصلی سمیت این نانوذرات شامل تولید گونه‌های فعال اکسیژن(ROS[4]) ، ایجاد تنش اکسیداتیو، آسیب به غشای سلولی ریزجانداران و آزادسازی یون‌های فلزی سمی (Cu^{2+} و Ni^{2+}) است (Rastogi et al., 2017). مطالعات نشان داده‌اند که حساسیت ریزجانداران و آنزیم‌های خاک نسبت به نانوذرات اکسید فلزی متفاوت است و اکسید مس به دلیل انحلال‌پذیری بالاتر، اغلب سمیت حادتری نسبت به سایر اکسیدها نشان می‌دهد (Jośko et al., 2014; Wu et al., 2020). با این وجود،

[1] Engineered Nanoparticles
[2] Metal Oxide NPs
[3] Early warning indicators
[4] Reactive Oxygen Species

مطالعات مقایسه‌ای دقیقی که رفتار این دو نانوذره را به طور همزمان بررسی کند، کمتر انجام شده است.

سمیت نانوذرات در خاک تابعی ساده از غلظت آن‌ها نیست، بلکه به شدت تحت تأثیر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی خاک نظیر بافت (درصد رس و شن)، مقدار ماده آلی، pH و ظرفیت تبادل کاتیونی قرار دارد (Wang et al., 2022). کلوئیدهای خاک (رس و هوموس) می‌توانند از طریق جذب سطحی نانوذرات یا تشکیل کمپلکس با یون‌های آزاد شده، زیست‌فراهمی[۵] آن‌ها را کاهش دهند (Cornelis et al., 2014). خاک‌های با بافت سبک (شنی) به دلیل سطح ویژه کمتر و کمبود جایگاه‌های اتصال، ممکن است سمیت بالاتری را نسبت به خاک‌های سنگین (رسی) نشان دهند. درک برهمکنش بین ماتریس خاک و نانوذرات برای ارزیابی دقیق مخاطرات بوم‌شناختی آن‌ها ضروری است.

در ایران اگرچه هنوز گزارش جامع و دقیقی از پایش سطح آلودگی خاک های زراعی به نانوذرات مهندسی‌شده منتشر نشده است، اما مطالعات متعدد حاکی از تجمع نگران‌کننده فرم های متعارف (توده‌ای) فلزات سنگین مس و نیکل در خاک‌های پیرامون مناطق صنعتی و اراضی کشاورزی تحت کشت فشرده است. با توجه به توسعه روزافزون فناوری نانو در صنایع داخلی و پتانسیل تبدیل و تغییر شکل این آلاینده‌ها، ارزیابی پیشگیرانه سمیت اکولوژیک فرم‌های نانویی این فلزات در بوم‌سازگان‌های خاکی کشور ضرورتی اجتناب‌ناپذیر است. علیرغم مطالعات انجام شده در زمینه سمیت نانوذرات، دانش فعلی در خصوص مقایسه اثرات نانوذرات CuO و NiO در خاک‌های آهکی ایران با ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی متفاوت (به‌ویژه بافت و ماده آلی) محدود است. همچنین، بررسی سینتیک سمیت[۶] این نانوذرات و تأثیر گذشت زمان بر تغییر شدت سمیت آن‌ها نیازمند واکاوی بیشتر است. لذا، این پژوهش با هدف (۱) ارزیابی و مقایسه اثرات غلظت‌های مختلف نانوذرات CuO و NiO بر فعالیت آنزیم‌های کلیدی خاک (اوره‌آز، فسفاتاز اسیدی و فسفاتاز قلیایی) و (۲) بررسی نقش بافت خاک (لوم شنی در مقابل رسی) در تعدیل سمیت این نانوذرات در دوره‌های زمانی مختلف طراحی و اجرا گردید.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و آماده‌سازی خاک

دو نمونه خاک سطحی (عمق ۰ تا ۳۰ سانتی‌متری) با ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی متفاوت از اراضی کشاورزی کرج با مختصات جغرافیایی ۵۰ درجه و ۵۵ دقیقه طول شرقی و ۳۵ درجه و ۴۸ دقیقه عرض شمالی و چیتگر با مختصات جغرافیایی ۵۱ درجه و ۱۳ دقیقه طول شرقی و ۳۵ درجه و ۴۳ دقیقه عرض شمالی انتخاب و جمع‌آوری گردید. نمونه ها پس از انتقال به آزمایشگاه، در دمای محیط، هواخشک[۷] شدند و پس از حذف سنگریزه‌ها و بقایای گیاهی، از الک با منافذ ۲ میلی‌متری عبور داده شدند. ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک‌ها شامل بافت خاک به روش هیدرومتری (Gee and Bauder, 1986)، کربن آلی به روش اکسیداسیون مرطوب (Walkley and Black, 1934) و واکنش خاک (pH) در سوسپانسیون خاک و آب (با نسبت ۱ به ۲/۵) اندازه‌گیری شد.

بر اساس نتایج آنالیز اولیه، خاک با بافت لوم شنی (Sandy loam) دارای میزان رس پایین (۱۹/۸ درصد) و کربن آلی کم (۰/۷ درصد) بود، در حالی که خاک با بافت رسی (Clay) از میزان رس بالا (۴۹/۸ درصد) و کربن آلی نسبتاً بیشتر (۱/۳۷ درصد) برخوردار بود. انتخاب این دو خاک با ویژگی‌های متضاد، امکان ارزیابی دقیق نقش کلوئیدهای معدنی و آلی را در تعدیل سمیت نانوذرات فراهم نمود.

---

[۵] Bioavailability

[۶] Toxicity kinetics

[۷] Air-dried

مشخصات نانوذرات مهندسی شده

در این مطالعه، نانوذرات اکسید مس و اکسید نیکل با درجه خلوص صنعتی بالا (۹۹ در صد) از شرکت پیشگامان نانو مواد ایرانیان (مشهد، ایران) تهیه گردیدند. طبق آنالیزهای فنی ارائه‌شده توسط شرکت سازنده، نانوذرات اکسید مس دارای مورفولوژی کروی، میانگین اندازه ذرات ۴۰ نانومتر، رنگ سیاه، چگالی توده ۰/۷۹ گرم بر سانتی‌متر مکعب و سطح ویژه (SSA[۸]) تقریبی ۲۰ مترمربع بر گرم بودند. در مقابل، نانوذرات اکسید نیکل دارای مورفولوژی شبه‌کروی، دامنه اندازه ذرات بین ۱۰ تا ۲۰ نانومتر، رنگ خاکستری تیره، چگالی توده ۰/۸گرم بر سانتی‌متر مکعب و سطح ویژه بین ۵۰ تا ۱۰۰ مترمربع بر گرم گزارش شدند. شایان ذکر است که به منظور شبیه سازی شرایط واقعی نهشت غبارات نانو در خاک و همچنین جلوگیری از تداخلات احتمالی ناشی از افزودن حلال‌ها یا سورفکتانت‌های شیمیایی، نانوذرات در این پژوهش بدون استفاده از حلال واسط و به صورت پودر خشک توزین و مستقیماً به نمونه‌های خاک اضافه شدند. نانوذرات مورد استفاده در این پژوهش فاقد هرگونه پوشش سطحی[۹] یا مواد پایدارکننده پلیمری بودند تا اثرات خالص سمیت نانوذرات اکسید فلزی مورد ارزیابی قرار گیرد.

طراحی آزمایش و اعمال تیمارها

این تحقیق به‌صورت آزمایش فاکتوریل سه‌عاملی در چارچوب طرح پایه کاملاً تصادفی (CRD) با سه تکرار و در شرایط گلخانه‌ای انجام شد. آزمایش در مجموع با ۱۴۴ واحد آزمایشی مستقل (۷۲ واحد برای هر نوع خاک) اجرا گردید. عامل های مورد آزمون عبارت بودند از: ۱) نوع نانوذره در دو سطح (اکسید نیکل و اکسید مس)، ۲) غلظت نانوذره در چهار سطح (۰ (شاهد)، ۱۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و ۳) زمان نمونه‌برداری (۷، ۲۴ و ۷۲ روز). آزمایش‌ها بر روی دو نوع خاک با درصد کربن آلی و بافت متفاوت انجام گرفت. در پایان آزمایش فعالیت آنزیم‌های فسفاتاز قلیایی، فسفاتاز اسیدی و اوره‌آز به‌عنوان متغیرهای پاسخ اندازه‌گیری شد.

برای آماده‌سازی تیمارها، ابتدا مقدار وزنی محاسبه‌شده از هر نانوذره (متناسب با سطوح غلظت مورد نظر) به ۱۰۰ گرم از نمونه‌های خاک خشک اضافه شد. به منظور اطمینان از توزیع یکنواخت و همگن شدن نانوذرات در بستر خاک، نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه با استفاده از همزن مکانیکی مخلوط گردیدند. سپس رطوبت نمونه‌ها با افزودن آب مقطر به حد ۶۰ درصد ظرفیت زراعی (FC[۱۰]) رسانده شد. نمونه‌های تیمارشده درون ظروف پلی‌اتیلنی درب‌دار قرار گرفته و جهت طی دوره خواب به انکوباتور تاریک با دمای ثابت ۲۵ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. طی دوره آزمایش، رطوبت خاک‌ها به صورت وزنی پایش شد و با افزودن آب مقطر در حد ثابت ۶۰ درصد ظرفیت زراعی نگهداری گردید. در نهایت، نمونه‌برداری از خاک‌ها جهت انجام سنجش‌های بیوشیمیایی در سه مقطع زمانی ۷، ۲۴ و ۷۲ روز پس از آغاز انکوباسیون صورت پذیرفت.

سنجش فعالیت‌های آنزیمی خاک

به منظور تعیین تغییرات بیوشیمیایی خاک تحت تیمار نانوذرات، فعالیت آنزیم های اوره‌آز و فسفاتاز (اسیدی و قلیایی) با استفاده از روش‌های استاندارد رنگ‌سنجی[۱۱] و دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد.

برای سنجش فعالیت آنزیم اوره‌آز، از روش توصیف‌شده توسط زانتوا و برمنر (Zantua and Bremner, 1977) استفاده گردید. بدین منظور، ۵ گرم از نمونه خاک مرطوب در ارلن مایر توزین شد و جهت متوقف کردن فعالیت تکثیر میکروبی حین سنجش، ۱/۵ میلی‌لیتر تولوئن به آن اضافه گردید. پس از گذشت ۱۰

[۸] Specific Surface Area
[۹] Uncoated
[۱۰] Field Capacity
[۱۱] Colorimetry

دقیقه، ۲/۵ میلی‌لیتر محلول اوره به عنوان سوبسترا به خاک افزوده شد و نمونه‌ها به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از اتمام زمان واکنش، سوسپانسیون خاک با استفاده از محلول اسید استیک ۰/۰۳ مولار عصاره‌گیری و صاف شد. غلظت یون آمونیوم آزاد شده در عصاره، با افزودن معرف نسلر[۱۲] و در حضور تارتارات پتاسیم-سدیم تعیین گردید و جذب نوری محلول‌ها در طول موج ۴۱۰ نانومتر قرائت شد. برای حذف اثر آمونیوم موجود در خاک، نمونه‌های شاهد (Control) نیز آماده شدند که در آن‌ها محلول اوره پس از پایان زمان انکوباسیون و بلافاصله قبل از عصاره‌گیری اضافه گردید.

فعالیت آنزیم‌های فسفاتاز اسیدی و قلیایی نیز بر اساس روش عیوضی و طباطبایی (Eivazi and Tabatabai, 1977) اندازه‌گیری شد. برای این منظور، ۱ گرم خاک با ۰/۲۵ میلی‌لیتر تولوئن و ۴ میلی‌لیتر بافر اصلاح شده (MUB[۱۳]) مخلوط گردید. اسیدیته (pH) بافر برای سنجش فسفاتاز اسیدی روی ۶/۵ و برای فسفاتاز قلیایی روی ۱۱ تنظیم شد. واکنش آنزیمی با افزودن محلول پارا-نیتروفنیل فسفات (p-NPP[۱۴]) آغاز و نمونه‌ها به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از گذشت زمان واکنش، فرآیند هیدرولیز با افزودن محلول‌های کلرید کلسیم و سدیم هیدروکسید متوقف شد. میزان پارا-نیتروفنول (pNP[۱۵]) آزاد شده (که منجر به ایجاد رنگ زرد در محیط می شود) پس از صاف کردن نمونه‌ها، در طول موج ۴۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

تجزیه‌وتحلیل آماری

پیش از انجام تجزیه واریانس، فرض نرمال بودن توزیع داده‌های حاصل از سنجش‌های آنزیمی بر اساس قضیه حد مرکزی[۱۶] در نظر گرفته شد. سپس تجزیه واریانس[۱۷] جهت بررسی اثرات اصلی فاکتورها (نوع نانوذره، غلظت نانوذره و زمان) و برهمکنش‌های متقابل آن‌ها به تفکیک هر بافت خاک با استفاده از نرم‌افزار آماری Minitab انجام پذیرفت. مقایسه میانگین تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن[۱۸] در سطوح احتمال ۵ درصد ($P<0.05$) و ۱ درصد ($P<0.01$) صورت گرفت. برای مقایسه دو نوع خاک نیز از آزمون T-Test استفاده شد و در نهایت، رسم نمودارها و گراف‌های مربوطه با استفاده از نرم‌افزار Microsoft Excel انجام شد. لازم به ذکر است که به دلیل تفاوت فاحش ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی دو خاک و در نتیجه ناهمگنی واریانس خطای آزمایشی (بر اساس آزمون بارتلت)، امکان تجزیه واریانس مرکب[۱۹] برای دو خاک فراهم نبود؛ لذا تجزیه واریانس برای هر خاک به صورت مستقل انجام پذیرفت.

نتایج و بحث

ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک‌های مورد مطالعه

نتایج تجزیه و تحلیل آزمایشگاهی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی دو خاک مورد استفاده در این پژوهش در (جدول ۱) ارائه شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، دو خاک انتخاب شده از نظر بافت و میزان ماده آلی تفاوت‌های آشکاری با یکدیگر دارند که این امر امکان بررسی دقیق‌تر نقش ویژگی‌های خاک در تعدیل سمیت نانوذرات را فراهم می‌کند.

خاک با بافت لوم شنی با دارا بودن ۵۸/۲ درصد شن و ۱۹/۸ درصد رس، در کلاس بافت سبک قرار گرفت. در مقابل، خاک با بافت رسی با محتوای رس بالا (۴۹/۸ درصد) و درصد شن پایین (۱۸/۲ درصد)، به عنوان بافت سنگین شناسایی شد. همچنین، خاک رسی با داشتن ۱/۳۷ درصد کربن آلی، از نظر محتوای کربن آلی غنی‌تر از خاک لوم شنی (۰/۷۰ درصد) بود. واکنش خاک (pH) هر

[۱۲] Nessler
[۱۳] Modified Universal Buffer
[۱۴] para-Nitrophenyl phosphate
[۱۵] para-Nitrophenol
[۱۶] Central Limit Theorem
[۱۷] ANOVA
[۱۸] Duncan's Multiple Range Test
[۱۹] Combined ANOVA

دو نمونه در محدوده خنثی تا کمی قلیایی قرار داشـــت و تفاوت چندانی از این نظر مشـــاهده نشـــد (۷/۶۶ در برابر ۷/۷).

جدول ۱- برخی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک‌های مورد مطالعه (لوم شنی و رسی)

Table 1. Physicochemical properties of the studied soils (Sandy Loam and Clay)

ویژگی‌ها (Properties)	خاک لوم شنی (Sandy Loam)	خاک رسی (Clay)
شن (٪)	58.2	18.2
سیلت (٪)	22	32
رس (٪)	19.8	49.8
کربن آلی (٪)	0.70	1.37
pH	7.66	7.7

در این پژوهش، به منظور بررسی دقیق‌تر اثرات نانوذرات بر بیولوژی خاک، نتایج تجزیه و تحلیل آماری برای هر یک از خاک‌های لوم شنی و رسی به تفکیک ارائه شده است.

مقایســه آماری ســطح فعالیت آنزیمی بین دو نوع خاک

پیش از بررسی اثر تیمارهای نانوذرات، به منظور ارزیابی تفاوت کلی پتانســیل زیســتی بین دو خاک مورد مطالعه (فارغ از نوع تیمار)، میانگین فعالیت آنزیم‌ها در دو خاک رســی و لوم شــنی با اســتفاده از آزمون تی[۲۰] مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج آزمون تی (جدول ۲ و شکل ۱) نشان داد که تفاوت معنی‌داری در سطح ۱ در صد ($P < 0.01$) بین دو خاک از نظر فعالیت آنزیم های فســفاتاز اســیدی و فســفاتاز قلیایی وجود دارد. میانگین فعالیت فسفاتاز اسیدی در خاک رسی به طور معنی‌داری بالاتر از خاک لوم شــنی بود (۶۵۸ در برابر ۳۹۶). برعکس، فعالیت فسفاتاز قلیایی در خاک لوم شنی (۹۶۱) به مراتب بیشتر از خاک رسی (۶۶۳) مشاهده شد.

در خصــوص آنزیم اوره‌آز، اگرچــه میــانگین فعالیت در خاک لوم شــنی (۵۸/۷) نســبت به خاک رســی (۴۶/۹) حدود ۲۵ درصد بیشتر بود اما این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نبود. این نتایج نشــان می‌دهد که نوع بافت خاک و ویژگی های فیزیکوشــیمیایی آن، تأثیر پایه‌ای متفاوتی بر گروه‌های مختلف آنزیمی داشته است.

جدول ۲- نتایج آزمون تی برای مقایسه میانگین فعالیت آنزیم‌ها در دو خاک لوم شنی و رسی

Table 2. Independent t-test results comparing mean enzyme activities in Sandy Loam and Clay soils

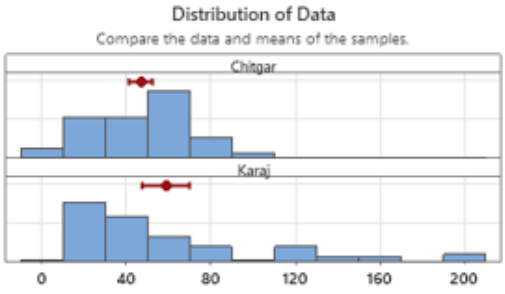
نام آنزیم	بافت خاک	میانگین	انحراف معیار	خطای استاندارد	آماره تی	درجه آزادی*	سطح معنی‌داری	تفاوت میانگین	فاصله اطمینان ۹۵٪
اوره آز	رسی	46.9	23.8	2.8	-1.89ns	104	0.062	-11.82	(-24.23،0.58)
	لوم شنی	58.7	47.5	5.6					
فسفاتاز اسیدی	رسی	658	306	36	6.22**	116	0.000	262.1	(178.6،345.6)
	لوم شنی	396	185	22					
فسفاتاز قلیایی	رسی	663	203	24	-7.44**	131	0.000	-298.5	(-377.8 ، -219.1)
	لوم شنی	961	273	32					

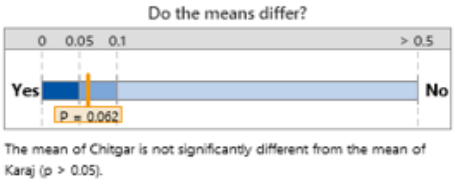
*با وجود یکسان بودن تعداد نمونه برای هر سه آنزیم تفاوت در درجه آزادی به دلیل تفاوت در واریانس نمونه‌ها در دو نوع خاک است.

*Although the sample size was the same for all three enzymes, the difference in degrees of freedom is due to the difference in sample variances between the two soil types (equal variances not assumed).

[۲۰] Independent Samples t-test

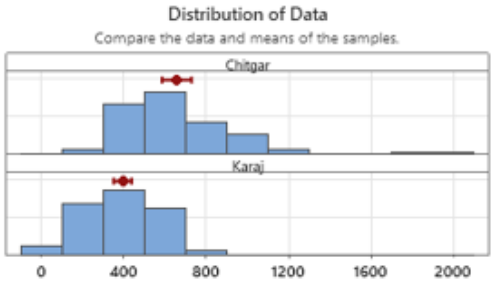
(ب) (الف)





The mean of Chitgar is not significantly different from the mean of Karaj (p > 0.05).

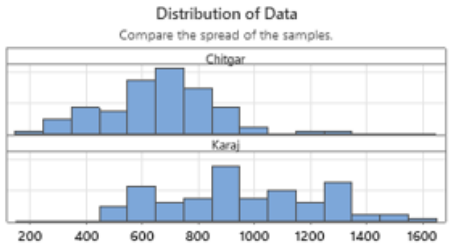
اوره آز

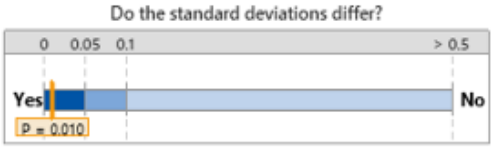




The mean of Chitgar is significantly different from the mean of Karaj (p < 0.05)

فسفاتاز اسیدی





The standard deviation of Chitgar is significantly different from Karaj (p < 0.05).

فسفاتاز قلیایی

شکل ۱- مقایسه آماری و توزیع داده‌های فعالیت آنزیمی در دو نوع خاک؛ الف) تست معنی‌داری تفاوت میانگین‌ها، ب) نمودار هیستوگرام پراکندگی داده‌ها در دو خاک لوم شنی و رسی

Figure 1. Statistical comparison and data distribution of enzyme activities in two soil types

خاک با بافت لوم شنی

در ادامه، نتایج مربوط به خاک با بافت لوم شنی ارائه می‌شود؛ خاکی که به دلیل درصد کمتر رس و ظرفیت تبادل کاتیونی پایین‌تر، معمولاً حساسیت بیشتری نسبت به حضور نانوذرات فلزی دارد. به منظور ارزیابی دقیق پاسخ زیستی این خاک، ابتدا نتایج تجزیه‌وتحلیل واریانس (ANOVA)برای سه آنزیم شاخص شامل فسفاتاز قلیایی، فسفاتاز اسیدی و اوره‌آز بررسی شده و سپس براساس اثرات اصلی و متقابل، روند تغییرات فعالیت آنزیمی در دوره‌های زمانی مختلف ارائه می‌شود. این ساختار امکان مقایسه منسجم اثر نوع نانوذره، غلظت و زمان را فراهم کرده و پایه تفسیرهای بعدی را تشکیل می‌دهد.

جدول ۳- تجزیه واریانس اثرات نوع و غلظت نانوذره اکسید فلزی و زمان بر فعالیت آنزیمی در خاک با بافت لوم شنی

Table 3. Analysis of variance (ANOVA) for the effects of metal oxide nanoparticle type, concentration, and time on enzyme activities in Sandy Loam soil

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی	فعالیت آنزیم فسفاتازاسیدی	فعالیت آنزیم اوره آز
زمان	2	481614**	277 ns	10795.4**
نوع نانوذره	1	134832**	466052**	3034.09*
غلظت نانوذره	3	56113*	415860**	24940.4**
تکرار	2	2722	58337**	89.4
زمان × نانو ذره	2	655ns	47549**	1201.5*
زمان × غلظت نانو ذره	6	33843*	66520*	1782.6*
نوع نانوذره× غلظت نانوذره	3	45601**	68233*	4575.8**
زمان× نوع نانوذره× غلظت نانوذره	6	32141*	96675**	3725.2**
خطا	46	13750	47435	241.7
ضریب تغییرات		18.93	21.36	19.27

* و **: به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪؛ ns: غیر معنی‌دار.

*and **: Significant at 5% and 1% probability levels, respectively; ns: Not significant.

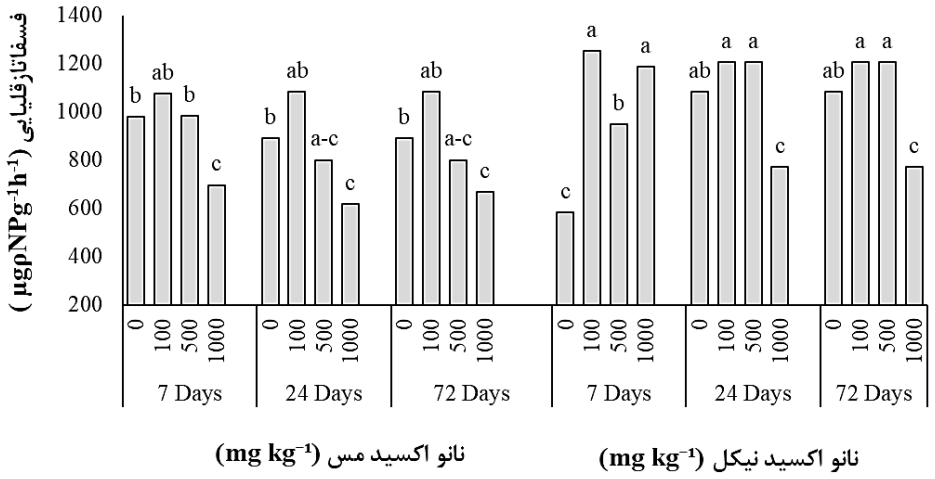
فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۳) نشان داد که اثرات اصلی نوع و غلظت نانوذره و همچنین اثر متقابل سه‌گانه (زمان × نوع × غلظت) بر فعالیت این آنزیم در سطح ۱ درصد معنی‌دار بود. بررسی مقایسه میانگین اثرات متقابل زمان × نوع نانوذره × غلظت نانوذره (شکل ۲) نشان داد که فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی در خاک لوم شنی تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی تغییرات معنی‌داری داشته است. در تمامی زمان‌های نمونه‌برداری (۷، ۲۴ و ۷۲ روز)، کمترین میزان فعالیت آنزیمی مربوط به تیمار ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانوذرات اکسید مس بود که اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد و غلظت‌های پایین‌تر (۱۰۰ میلی‌گرم) نشان داد. در مقابل، نانوذرات اکسید نیکل رفتار متفاوتی را به نمایش گذاشتند؛ به طوری که در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در برخی بازه‌های زمانی (به‌ویژه روز ۷)، منجر به تحریک جزئی و افزایش فعالیت آنزیم نسبت به شاهد شدند که بیانگر وقوع اثر هرمسیس[۲۱] است.

با گذشت زمان از روز ۷ به ۷۲، اگرچه فعالیت آنزیم در تیمارهای نانوذرات مس همچنان در سطوح سرکوب‌شده باقی ماند، اما تیمارهای نانوذرات نیکل پایداری نسبی بیشتری را نشان دادند. به طور کلی، الگوی پاسخ وابسته به دوز[۲۲] برای هر دو اکسید فلزی مشهود بود، اما شیب کاهش فعالیت برای اکسید مس به مراتب تندتر از اکسید نیکل ارزیابی گردید.

[۲۱] Hormesis effect

[۲۲] Dose-dependent response



شکل ۲- اثر متقابل غلظت و نوع نانوذره بر تغییرات فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی در خاک لوم شنی طی دوره‌های زمانی مختلف. حروف غیرمشترک روی ستون‌ها نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد است.

Figure 2- Interaction effect of concentration and nanoparticle type on Alkaline Phosphatase activity in Sandy Loam soil over different times. Different letters above the columns indicate significant differences according to Duncan's Multiple Range Test at P < 0.05.

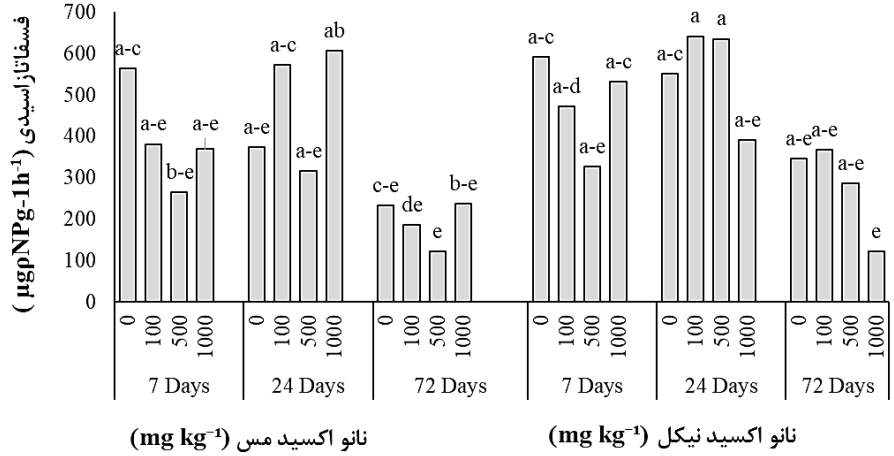
کاهش معنی‌دار فعالیت فسفاتاز قلیایی در غلظت‌های بالا، به ویژه در حضور نانوذرات اکسید مس، عمدتاً ناشی از انحلال پذیری بالاتر این نانوذرات و آزادسازی یون‌های مس (Cu^{2+}) در محلول خاک است. یون های فلزی آزاد شده می‌توانند با گروه های عاملی پروتئین‌ها (مانند گروه‌های سولفیدریل، کربوکسیل و ایمیدازول) در جایگاه فعال آنزیم برهمکنش داده و موجب تغییر در ساختار فضایی و غیرفعال شدن آن شوند (Wang et al., 2022). مطالعات پیشین نیز تأیید کرده‌اند که نانوذرات اکسید مس سمیت شدیدتری نسبت به سایر اکسیدهای فلزی (نظیر نیکل و روی) بر جوامع میکروبی و فعالیت های آنزیمی خاک (به‌ویژه فسفاتازها) اعمال می‌کنند (Wu et al., 2020). علاوه بر سمیت یونی، نانوذرات می‌توانند از طریق تماس مستقیم با دیواره سلولی ریزجانداران و تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)، منجر به تنش اکسیداتیو، پراکسیداسیون لیپیدی و در نهایت مرگ سلول‌های ترشح‌کننده آنزیم شوند (Khan et al., 2023). در مقابل، مشاهده اثر تحریکی در غلظت های پایین نانوذرات نیکل (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) با پدیده هرمسیس قابل توجیه است. طبق این پدیده، مقادیر اندک یک عامل تنش‌زا یا سمی می‌تواند موجب تحریک فرآیندهای زیستی و فعال‌سازی مکانیسم‌های دفاعی و ترمیمی در ریزجانداران شود که نتیجه آن افزایش فعالیت متابولیکی و آنزیمی است. نیکل به عنوان یک کوفاکتور ضروری برای برخی آنزیم‌ها (مانند اوره‌آز و هیدروژنازها) عمل می‌کند و در غلظت‌های پایین ممکن است به عنوان کوفاکتور یا محرک متابولیسم عمل نماید، در حالی که مس در غلظت‌های بالا به سرعت آستانه سمیت را رد می‌کند (Datta et al., 2020). همچنین، مشاهده فعالیت بالاتر فسفاتاز قلیایی در خاک لوم شنی نسبت به خاک رسی (در مقایسه کلی) می‌تواند ناشی از کاهش ممانعت فضایی در بافت سبک و دسترسی راحت‌تر سوبسترا به آنزیم باشد، برخلاف خاک رسی که جذب سطحی شدید ممکن است فعالیت ظاهری را محدود کند (Margasin et al., 2011).

فعالیت آنزیم فسفاتاز اسیدی

بر اساس جدول تجزیه واریانس (جدول ۳)، اثر اصلی زمان بر فعالیت فسفاتاز اسیدی معنی‌دار نشد (ns)، اما اثرات اصلی نوع و غلظت نانوذره و برهمکنش های متقابل آن‌ها در سطح ۱ درصد معنی‌دار بودند. نکته حائز اهمیت، معنی‌دار شدن اثرات متقابل زمان × نوع نانوذره ($P<0.01$) و زمان × غلظت نانوذره ($P<0.05$) بود که

بیانگر وابستگی الگوی پاسخ آنزیم در طول زمان به نوع و غلظت نانوذره است.

مقایسه میانگین داده‌ها (شکل ۳) نشان داد که تأثیر نانوذرات اکسید مس بر فعالیت آنزیم ناپایدار بوده است. در غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، تنها در روز ۷ کاهش فعالیت آنزیم نسبت به شاهد مشاهده شد؛ اما با گذشت زمان، در روز ۲۴ فعالیت آنزیم در این غلظت افزایش یافت (حتی بالاتر از شاهد) و در روز ۷۲ نیز تفاوت معنی‌داری با شاهد نشان نداد. در مقابل، نانوذرات اکسید نیکل الگوی متفاوتی داشتند؛ در روزهای ابتدایی (روز ۷) حتی در غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کاهش شدیدی مشاهده نشد، اما با گذشت زمان و رسیدن به روز ۷۲، فعالیت آنزیم در این غلظت به شدت افت کرد و به پایین‌ترین سطح خود رسید. این تفاوت در شیب تغییرات زمانی نشان می‌دهد که سمیت نیکل برای فسفاتاز اسیدی در خاک لوم شنی دارای یک تأخیر زمانی[۲۳] بوده است، در حالی که نانوذرات مس تنها شوک اولیه ایجاد کرده و سپس اثر بازدارندگی آن‌ها از بین رفته است.



شکل ۳- اثر متقابل غلظت و نوع نانوذره بر تغییرات فعالیت آنزیم فسفاتاز اسیدی در خاک لوم شنی طی دوره‌های زمانی مختلف حروف غیرمشترک روی ستون‌ها نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد است.

Figure 3- Interaction effect of concentration and nanoparticle type on Acid Phosphatase activity in Sandy Loam soil over different times. Different letters above the columns indicate significant differences according to Duncan's Multiple Range Test at P < 0.05.

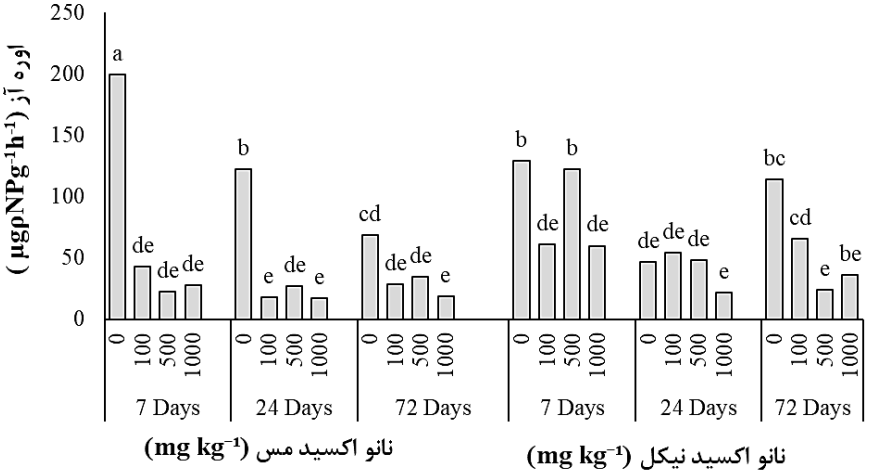
عدم معنی‌داری اثر اصلی زمان ممکن است ناشی از پایداری کلی فسفاتاز اسیدی (که عمدتاً منشأ خارج سلولی دارد) در بافت لوم شنی باشد (Burns et al., 2013)، اما معنی‌داری اثرات متقابل نشان می‌دهد که مکانیسم اثرگذاری دو نانوذره متفاوت بوده است. سمیت تأخیری و شدید نیکل در روز ۷۲ می‌تواند به دلیل حلالیت آهسته‌تر اکسید نیکل و تجمع تدریجی یون‌های Ni^{2+} در محلول خاک باشد که در نهایت از آستانه تحمل جامعه میکروبی فراتر رفته است (Gong et al., 2019). در مقابل، نانوذرات اکسید مس به دلیل پتانسیل اکسیداسیون بالاتر، احتمالاً سریع‌تر یونیزه شده و با ایجاد تنش اکسیداتیو زودهنگام، فعالیت میکروبی و ترشح آنزیم را محدود کرده‌اند (Rastogi et al., 2017). همچنین، کاهش فعالیت در غلظت‌های بالا می‌تواند ناشی از اتصال مستقیم نانوذرات به جایگاه‌های کاتالیزوری آنزیم فسفاتاز اسیدی و تغییر آرایش ساختاری آن باشد (Wang et al., 2022). نتایج نشان می‌دهد که در بازه‌های زمانی طولانی‌تر (۷۲ روز)، اکسید نیکل در غلظت بالا (۱۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) سمیت شدیدتری نسبت به اکسید مس بر فسفاتاز اسیدی در خاک لوم شنی اعمال کرده است.

[۲۳] Time-lag

فعالیت آنزیم اوره‌آز

نتایج آماری (جدول ۳) حاکی از آن بود که تمامی اثرات اصلی و متقابل (دوگانه و سه‌گانه) بر فعالیت اوره‌آز در خاک لوم شنی در سطح ۱ درصد معنی‌دار بودند. معنی‌داری اثر متقابل سه‌گانه ($P<0.01$) بیانگر آن است که روند تغییرات فعالیت آنزیم تحت تأثیر همزمان هر سه فاکتور قرار داشته است.

بررسی مقایسه میانگین‌ها (شکل ۴) نشان داد که فعالیت اوره‌آز به شدت وابسته به دوز بوده و با افزایش غلظت نانوذرات اکسید فلزی، فعالیت آنزیم به طور چشمگیری کاهش یافته است. در تمامی زمان‌ها، بیشترین میزان بازدارندگی مربوط به غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بود که اختلاف معنی‌داری با شاهد و سایر سطوح داشت. بررسی فاکتور زمان نشان داد که بیشترین سطح فعالیت آنزیمی در روزهای ابتدایی (روز ۷) مشاهده شد و با گذشت زمان روند کاهشی پیدا کرد. مقایسه دو نانوذره حاکی از آن است که اکسید مس در غلظت‌های بالا (۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم) سمیت شدیدتر و پایدارتری اعمال کرده است؛ به طوری که فعالیت آنزیم از روز ۷ به ۷۲ به شدت سرکوب شد. در مقابل، اگرچه اکسید نیکل نیز باعث کاهش فعالیت نسبت به شاهد شد، اما در روز ۷۲ (پایان دوره) در تیمارهای نیکل مقداری بازگشت یا نوسان فعالیت مشاهده گردید که نشان‌دهنده تفاوت در الگوی اثرگذاری این دو نانوذره در طول زمان است.



شکل ۴- اثر متقابل غلظت و نوع نانوذره بر تغییرات فعالیت آنزیم اوره‌آز در خاک لوم شنی طی دوره‌های زمانی مختلف. حروف غیرمشترک روی ستون‌ها نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد است.

Figure 4- Interaction effect of concentration and nanoparticle type on Urease activity in Sandy Loam soil over different times. Different letters above the columns indicate significant differences according to Duncan's Multiple Range Test at $P < 0.05$.

یون های فلزی آزاد شده (به‌ویژه مس) با گروه‌های سولفیدریل یا تیول (SH-) که در جایگاه فعال بسیاری از آنزیم‌ها وجود دارند، واکنش می‌دهند. به‌طور اختصاصی در مورد اوره‌آز که یک متالوآنزیم وابسته به نیکل است، یون‌های مس (Cu^{2+}) می‌توانند با جایگزینی یون‌های نیکل (Ni^{2+}) در مرکز فعال آنزیم، عملکرد کاتالیزوری آن را مختل کنند. این حساسیت با توجه به ماهیت عمدتاً خارج سلولی (Extracellular) اوره‌آز و عدم محافظت آن توسط غشای سلولی تشدید می‌شود. کاهش کلی فعالیت از روز ۷ به روزهای ۲۴ و ۷۲ (به‌ویژه در نمونه‌های شاهد و اکسید مس) را می‌توان به کاهش طبیعی سوبسترا (اوره) در محیط خاک و همچنین اثرات طولانی‌مدت سمیت نانوذرات نسبت داد. با این حال، نوسان مشاهده شده در تیمارهای نیکل ممکن است ناشی از سازگاری نسبی برخی جوامع میکروبی مقاوم به نیکل در انتهای دوره باشد. نتایج این پژوهش همسو با یافته‌های کیم و همکاران (۲۰۱۵) تأیید می‌کند که نانوذرات اکسید مس به دلیل حلالیت و واکنش‌پذیری شیمیایی بیشتر،

پتانسیل بالاتری در مهار فعالیت اوره‌آز نسبت به اکسید نیکل در خاک لوم شنی دارند (Kim et al., 2015).

خاک با بافت رسی

در ادامه، نتایج مربوط به خاک با بافت رسی ارائه می شود. خاک‌های رسی به دلیل در صد بالاتر ذرات رس، ظرفیت تبادل کاتیونی بیشتر و سطح ویژه بالاتر، توانایی بیشتری در جذب و نگهداشت یون‌ها و ذرات فلزی دارند و از این رو ممکن است الگوی متفاوتی از پاسخ‌های زیستی در مواجهه با نانوذرات فلزی نشان دهند. به منظور بررسی این موضوع، اثر نوع و غلظت نانوذرات اکسید فلزی و همچنین عامل زمان بر فعالیت آنزیم‌های شاخص خاک شامل فسفاتاز قلیایی، فسفاتاز اسیدی و اوره‌آز در این خاک مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج تجزیه واریانس ابتدا برای تعیین معنی‌داری اثرات اصلی و متقابل ارائه شده و سپس تغییرات فعالیت آنزیمی در تیمارهای مختلف بر اساس مقایسه میانگین‌ها مورد تفسیر قرار می‌گیرد تا الگوی پاسخ آنزیم‌ها در خاک رسی با دقت بیشتری مشخص شود.

جدول ۴- تجزیه واریانس اثرات نوع و غلظت نانوذره اکسید فلزی و زمان بر فعالیت آنزیمی در خاک با بافت رسی

Table 4- Analysis of variance (ANOVA) for the effects of metal oxide nanoparticle type, concentration, and time on enzyme activities in Clay soil

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی	فعالیت آنزیم فسفاتازاسیدی	فعالیت آنزیم اوره آز
زمان	2	24156 ns	116077*	88.96 ns
نوع نانوذره	1	542294*	200289**	6894.11**
غلظت نانوذره	3	53244*	83020*	3994.41**
تکرار	2	3010	10657	22.46
زمان × نانو ذره	2	25013 ns	159271*	2803.24**
زمان × غلظت نانو ذره	6	38599ns	173594*	946.71**
نوع نانوذره× غلظت نانوذره	3	268949	86867*	271.65ns
زمان× نوع نانوذره× غلظت نانوذره	6	28280*	476585**	455.60**
خطا	46	20026	31748	135.66
ضریب تغییرات		19.21	17.36	14.45

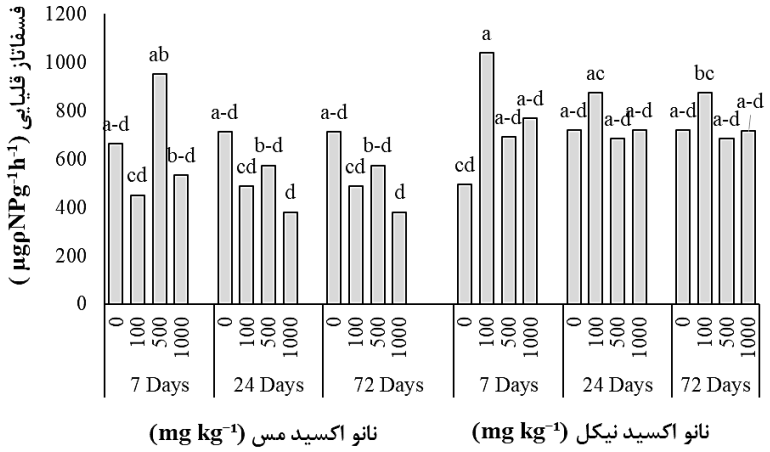
* و **: به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪؛ ns: غیر معنی‌دار.

*and **: Significant at 5% and 1% probability levels, respectively; ns: Not significant.

فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی

طبق نتایج جدول ۴، اثر اصلی زمان بر فعالیت این آنزیم در خاک رسی معنی‌دار نبود؛ که بیانگر پایداری نسبی فعالیت این آنزیم در طول دوره انکوباسیون (۷ تا ۷۲ روز) است. با این وجود، اثرات اصلی نوع نانوذره ($P<0.01$) و غلظت نانوذره ($P<0.05$) و اثر متقابل سه‌گانه (زمان × نوع نانوذره × غلظت نانوذره) معنی‌دار بودند.

مقایسه میانگین داده‌ها (شکل ۵) نشان داد که نانوذرات اکسید مس در مقایسه با اکسید نیکل، اثر بازدارندگی شدیدتری بر فعالیت آنزیم داشته‌اند. در تیمار نانوذرات مس، با افزایش غلظت به ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، فعالیت آنزیم در تمام زمان‌ها کاهش یافت و در روزهای ۲۴ و ۷۲ به پایین‌ترین سطح آماری رسید. در مقابل، نانوذرات نیکل در اکثر غلظت ها تأثیر منفی معنی‌داری نسبت به شاهد نداشتند و حتی در برخی موارد (مانند غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در روز ۷) منجر به افزایش فعالیت آنزیم و ثبت بیشترین میزان فعالیت شدند. مقایسه دو نانوذره نشان می‌دهد که خاک رسی در برابر سمیت نیکل مقاومت بیشتری از خود نشان داده، اما همچنان نسبت به غلظت‌های بالای مس آسیب‌پذیر بوده است.



شکل ۵- اثر متقابل غلظت و نوع نانوذره بر تغییرات فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی در خاک با بافت رسی طی دوره‌های زمانی مختلف. حروف غیرمشترک روی ستون‌ها نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد است.

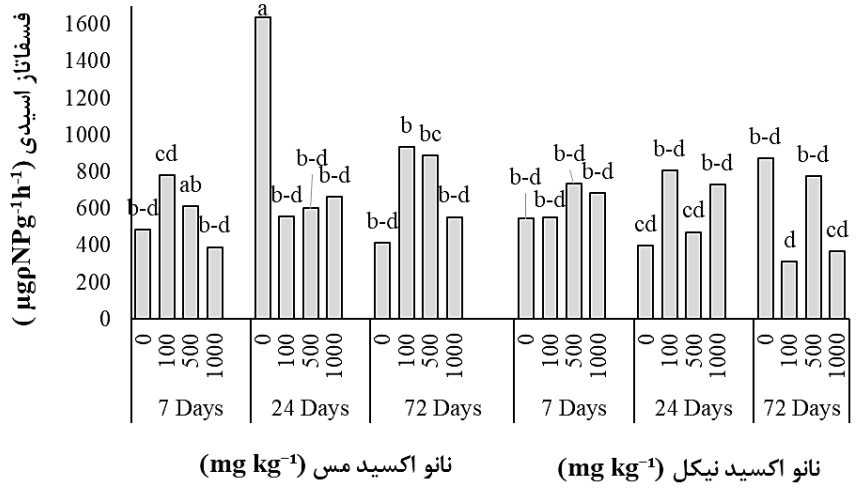
Figure 5. Interaction effect of concentration and nanoparticle type on Alkaline Phosphatase activity in Clay soil over different times. Different letters above the columns indicate significant differences according to Duncan's Multiple Range Test at $P < 0.05$.

عدم معنی‌داری اثر زمان در خاک رسی را می‌توان به ظرفیت بافری بالاتر و حضور مقادیر بیشتر کلوئیدهای رس (۴۹/۸ درصد) و کربن آلی (۱/۳۷ درصد) در این خاک نسبت داد. این ترکیبات می‌توانند با جذب سطحی نانوذرات و یون‌های فلزی آزاد شده، از تماس مستقیم آن‌ها با سلول‌های میکروبی و آنزیم‌ها جلوگیری کرده و سمیت آن‌ها را تعدیل کنند (Mishra and Kumar, 2009). با این حال، سمیت شدیدتر نانوذرات اکسید مس نسبت به نیکل در این خاک نیز مشهود است که ناشی از انحلال‌پذیری بیشتر مس و توانایی بالای یون‌های Cu^{2+} در ایجاد تنش اکسیداتیو و اختلال در فعالیت آنزیم های فسفاتاز است. پایداری فعالیت آنزیم در حضور نانوذرات نیکل احتمالاً به دلیل تشکیل کمپلکس‌های پایدار نیکل-رس یا نیکل-ماده آلی است که زیست‌فراهمی این فلز را کاهش داده و به ریزجانداران فرصت سازگاری داده است. این نتایج تأیید می‌کند که بافت خاک نقش کلیدی در تعیین سرنوشت و سمیت نانوذرات فلزی ایفا می‌کند و خاک‌های سنگین‌تر پتانسیل بالاتری برای کاهش اثرات سوء این آلاینده‌ها دارند (Jośko et al., 2014).

فعالیت آنزیم فسفاتاز اسیدی

نتایج آنالیز واریانس (جدول ۴) نشان داد که تمامی اثرات اصلی شامل زمان ($P<0.05$)، نوع نانوذره ($P<0.01$) و غلظت نانوذره ($P<0.05$) و همچنین اثرات متقابل زمان × نوع نانوذره بر فعالیت فسفاتاز اسیدی در خاک رسی معنی‌دار بودند.

بررسی مقایسه میانگین داده‌ها (شکل ۶) نشان داد که نانوذرات اکسید مس در غلظت های بالا، تأثیر بازدارندگی شدیدی را به‌ویژه در روز ۲۴ اعمال کرده‌اند؛ در این روز، فعالیت آنزیم در تیمار شاهد به حداکثر میزان خود رسید، اما حضور نانوذرات مس (حتی در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم) مانع از این افزایش شدید شد و فعالیت را به کمتر از نصف کاهش داد. در مقابل، نانوذرات اکسید نیکل الگوی نوسانی‌تری داشتند. در روزهای اولیه (روز ۷)، غلظت‌های ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم حتی باعث تحریک جزئی فعالیت نسبت به شاهد شدند، اما با گذشت زمان و رسیدن به روز ۷۲، در غلظت‌های ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم کاهش فعالیت نسبت به شاهد مشاهده گردید. این تفاوت در الگوی پاسخ نشان می‌دهد که سمیت نیکل در خاک رسی با تأخیر زمانی ظاهر شده و در انتهای دوره خود را نشان داده است.



شکل ۶- اثر متقابل غلظت و نوع نانوذره بر تغییرات فعالیت آنزیم فسفاتاز اسیدی در خاک با بافت رسی طی دوره‌های زمانی مختلف. حروف غیرمشترک روی ستون‌ها نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد است.

Figure 6. Interaction effect of concentration and nanoparticle type on Acid Phosphatase activity in Clay soil over different times. Different letters above the columns indicate significant differences according to Duncan's Multiple Range Test at $P < 0.05$.

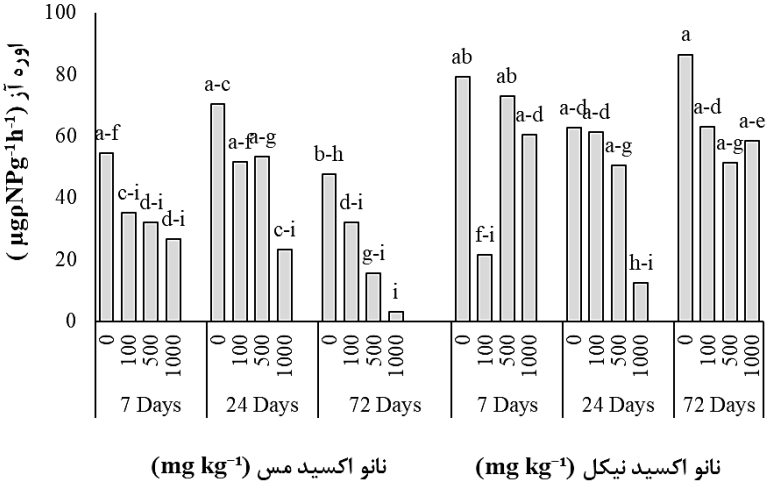
تفاوت در رفتار سمیت نانوذرات مس و نیکل در خاک رسی را می‌توان به ویژگی‌های کلوئیدی خاک و شیمی سطح نانوذرات نسبت داد. خاک رسی به دلیل داشتن ظرفیت تبادل کاتیونی (CEC) بالا و گروه های عاملی منفی روی سطح ذرات رس و ماده آلی، توانایی بالایی در جذب سطحی کاتیون های فلزی و نانوذرات دارد. در مورد نیکل، احتمالاً در روزهای ابتدایی، جذب سطحی قوی نانوذرات بر روی کلوئیدهای رس باعث کاهش زیست‌فراهمی یون‌های Ni^{2+} و تعدیل سمیت شده است، اما با گذشت زمان و اشباع سایت‌های جذبی یا تغییر در حلالیت نانوذرات (Aging)، یون های نیکل آزاد شده و سمیت خود را نشان داده‌اند (Gong et al., 2019). در مقابل، اگرچه مس به طور کلی تمایل بالایی به تشکیل کمپلکس های پایدار با ماده آلی خاک دارد که می‌تواند زیست‌فراهمی آن را کاهش دهد، اما در غلظت‌های بکار رفته در این آزمایش، احتمالاً ظرفیت کمپلکس‌سازی ماده آلی خاک اشباع شده است؛ بنابراین، مس آزاد شده به دلیل تمایل شدید به واکنش با گروه های عاملی پروتئین ها (آنزیم‌ها)، حتی در حضور کلوئیدهای خاک نیز توانسته است با جایگاه‌های فعال آنزیم برهمکنش داده و فعالیت کاتالیزوری آن را به ویژه در زمان اوج فعالیت میکروبی (روز ۲۴) مهار کند (Wang et al., 2022). کاهش فعالیت در روز ۷۲ برای نانوذره نیکل در غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، نشان‌دهنده اثرات تجمعی و بلندمدت فلزات سنگین بر جمعیت میکروبی و آنزیم‌های خاک است.

فعالیت آنزیم اوره‌آز

نکته قابل توجه در نتایج آنالیز واریانس (جدول ۴)، غیرمعنی‌دار شدن اثر اصلی زمان بر فعالیت اوره‌آز در خاک رسی است، در حالی که این اثر در خاک لوم شنی در سطح ۱ درصد معنی‌دار گزارش شده بود. این عدم معنی‌داری نشان‌دهنده ثبات و پایداری نسبی آنزیم اوره‌آز در بستر خاک رسی طی دوره ۷۲ روزه است. با این وجود، اثرات اصلی نوع نانوذره و غلظت نانوذره همچنان در سطح ۱ درصد معنی‌دار بودند و معنی‌دار شدن اثر متقابل سه‌گانه زمان × نوع نانوذره × غلظت نانوذره ($P < 0.01$) بیانگر پیچیدگی پاسخ آنزیم و وابستگی همزمان آن به هر سه فاکتور است.

مقایسه میانگین داده‌ها (شکل ۷) نشان داد که نانوذرات مس سمیت به مراتب بیشتری را نسبت به نیکل در مهار فعالیت اوره‌آز در این خاک اعمال کرده‌اند؛ به

طوری که در غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانوذرات مس، فعالیت آنزیم در انتهای دوره (روز ۷۲) تقریباً متوقف شد، در حالی که در تیمار مشابه نیکل، سطح قابل توجهی از فعالیت آنزیمی حفظ گردید.



شکل ۷- اثر متقابل غلظت و نوع نانوذره بر تغییرات فعالیت آنزیم اوره‌آز در خاک با بافت رسی طی دوره‌های زمانی مختلف. حروف غیرمشترک روی ستون‌ها نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد است.

Figure 7. Interaction effect of concentration and nanoparticle type on Urease activity in Clay soil over different times. Different letters above the columns indicate significant differences according to Duncan's Multiple Range Test at *P < 0.05*.

پایداری فعالیت اوره‌آز در خاک رسی (عدم تأثیر پذیری از فاکتور زمان) را می‌توان به تشکیل کمپلکس‌های پایدار آنزیم-رس و آنزیم-هوموس نسبت داد. اوره‌آز به عنوان یک آنزیم خارج سلولی، دارای گروه‌های عاملی باردار است که می‌توانند با سطح کلوئیدهای رس و مواد آلی (که در این خاک به ترتیب ۴۹/۸ و ۱/۳۷ درصد بودند) پیوند برقرار کنند. این تثبیت فیزیکی و شیمیایی، آنزیم را در برابر تجزیه پروتئینی و تغییرات نامطلوب محیطی محافظت کرده و پایداری کاتالیزوری آن را در طول زمان به طور قابل توجهی افزایش می‌دهد.

در خصوص تفاوت سمیت نانوذرات، اوره‌آز یک متالوآنزیم وابسته به نیکل است و وجود مقادیر متعادل یون نیکل Ni^{2+} در جایگاه فعال برای حفظ ساختار چهارم و فعالیت کاتالیزوری آن ضروری است. از این رو، ریزجانداران و آنزیم‌های آزاد اوره‌آز به طور ذاتی تحمل بالاتری نسبت به نانوذرات نیکل دارند و حتی در غلظت‌های پایین ممکن است اثر تحریکی مشاهده شود. در مقابل، مس(Cu^{2+}) به عنوان یک بازدارنده قوی غیررقابتی یا مخلوط، با گروه‌های تیول (SH-) مربوط به اسید آمینه سیستئین در زبانه[۲۴] جایگاه فعال آنزیم واکنش می‌دهد. این برهمکنش منجر به تغییرات آرایش ساختاری شدید و بلوکه شدن جایگاه فعال شده و عملکرد آنزیم را مختل می‌کند (Kim et al., 2015). نتایج این پژوهش همسو با یافته‌های بیک و آن (۲۰۱۱) نشان می‌دهد که در خاک رسی نیز علی‌رغم وجود ظرفیت بافری بالا، غلظت‌های بالای مس به دلیل انحلال‌پذیری و واکنش‌پذیری بالاتر، توانسته‌اند بر مکانیسم‌های محافظتی خاک غلبه کرده و فعالیت آنزیم را سرکوب کنند (Baek and An, 2011).

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که سمیت نانوذرات اکسید فلزی بر فعالیت‌های آنزیمی خاک، تابعی پیچیده از برهمکنش میان نوع نانوذره، ویژگی‌های بافتی خاک و مدت زمان تماس است. یافته‌ها حاکی از آن بود که بافت

[۲۴] Flap

خاک نقش تعیین‌کننده‌ای در تعدیل شدت تنش دارد؛ به‌طوری‌که خاک رسی به واسطه محتوای بالاتر رس و ماده آلی، از طریق مکانیسم‌های تثبیت فیزیکی و تشکیل کمپلکس های رس-نانوذره-آنزیم، پایداری قابل توجهی برای آنزیم‌ها (به‌ویژه اوره‌آز) فراهم کرد. در مقابل، خاک لوم شنی به دلیل فقر کلوئیدی و ظرفیت بافری پایین، حساسیت بسیار بالایی به آلاینده‌ها نشان داد و شدیدترین کاهش فعالیت‌های آنزیمی در این بستر مشاهده شد.

از منظر نوع آلاینده، نانوذرات اکسید مس به دلیل انحلال‌پذیری بالاتر و تمایل شدید یون‌های مس به واکنش با گروه‌های تیول در جایگاه فعال آنزیم‌ها، سمیت شدیدتر و پایدارتری را نسبت به نانوذرات اکسید نیکل اعمال کردند. اکسید نیکل رفتاری متفاوت شامل اثرات تحریکی در غلظت های پایین و سمیت تأخیری در انتهای دوره آزمایش از خود نشان داد. این مطالعه تأکید می‌کند که در ارزیابی ریسک اکولوژیک نانوذرات مهندسی‌شده، نباید تنها بر غلظت تمرکز کرد، بلکه ظرفیت محافظتی خاک و ماهیت دینامیک سمیت در طول زمان، پارامترهای حیاتی برای پیش‌بینی سلامت اکوسیستم‌های خاکی هستند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از حمایت‌های دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج جهت فراهم آوردن امکانات انجام این پژوهش تشکر و قدردانی نمایند.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تعارض منافعی در خصوص انتشار این مقاله وجود ندارد.

References

1. Aliasgharzad, N., 2026. Implication of biological indices for assessing soil health. *Journal of Soil Biology*, 13(2), 171–191. https://doi.org/10.22092/sbj.2025.370174.283
2. Alkorta, I., Epelde, L. and Garbisu, C., 2017. Environmental parameters altered by climate change affect the activity of soil microorganisms involved in bioremediation. *FEMS Microbiology Letters*, 364(19), fnx200. DOI: 10.1093/femsle/fnx200
3. Baek, Y.W. and An, Y.J., 2011. Microbial toxicity of metal oxide nanoparticles (CuO, NiO, ZnO, and Sb2O3) to *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, and *Streptococcus aureus*. *Science of the Total Environment*, 409(8), pp.1603-1608. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2011.01.014
4. Burns, R.G., DeForest, J.L., Marxsen, J., Sinsabaugh, R.L., Stromberger, M.E., Wallenstein, M.D., Weintraub, M.N. and Zoppini, A., 2013. Soil enzymes: A key to nature's cycling of nutrients. Soil Biology and Biochemistry, 58, pp.216-234 .
5. Cornelis, G., Hund-Rinke, K., Kuhlbusch, T., van den Brink, N. and Nickel, C., 2014. Fate and effect of engineered nanomaterials in soils and soil organisms. *Ecotoxicology*, 23(8), pp.1603-1628. DOI: 10.1007/s10646-014-1262-1
6. Cui, Y., Fang, L., Deng, Y., Guo, X. and Zhang, X., 2022. Patterns of soil extracellular enzyme activities and their stoichiometry in relation to soil properties in the loess plateau, China. *Catena*, 217, p.106503. DOI: 10.1016/j.catena.2022.106503
7. Datta, R., Baraniya, D., Wang, S., Kelkar, A., Meena, R.S., Yadav, G.S., Teresa Ceccherini, M. and Formoon, J., 2020. Amino acid: its dual role as a plant growth promoter and bio-stimulant in sustainable agriculture. In *Carbon and Nitrogen Cycling in Soil* (pp. 175-188). Springer, Singapore. DOI: 10.1007/978-981-13-7264-3_6
8. Datta, R., Baraniya, D., Wang, S., Kelkar, A., Meena, R.S., Yadav, G.S., Teresa Ceccherini, M. and Formoon, J., 2020. Amino acid: its dual role as a plant growth promoter and bio-stimulant in sustainable agriculture. In Carbon and Nitrogen Cycling in Soil (pp. 175-188). Springer, Singapore.
9. Eivazi, F. and Tabatabai, M.A., 1977. Phosphatases in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 9(3), pp.167-172. DOI: 10.1016/0038-0717(77)90070-0
10. Faisal, S., Jan, H., Shah, S.A., Shah, S., Khan, A., Akbar, M.T., Rizwan, M., Jan, F., Wajidullah, N., Akhtar, N. and Khattak, A., 2024. Green synthesis of nickel oxide nanoparticles using *Punica granatum* peel extract and their applications as photocatalyst and antibacterial agent. *Results in Physics*, 56, p.107263. DOI: 10.1016/j.rinp.2023.107263
11. Fallah Nosratabad, A., & Khoshru, B., 2024. Potentials and challenges of biofertilizers in sustainable agriculture. *Journal of Soil Biology*, 12(1), 19–63. https://doi.org/10.22092/sbj.2024.366090.265
12. Gee, G.W. and Bauder, J.W., 1986. Particle-size analysis. In: A. Klute (Ed.), *Methods of Soil Analysis: Part 1—Physical and Mineralogical Methods* (pp. 383-411). SSSA Book Series, No. 5, ASA and SSSA, Madison. DOI: 10.2136/sssabookser5.1.2ed.c15
13. Gong, X., Huang, D., Liu, Y., Zeng, G., Chen, S., Wang, R., Deng, J. and Cheng, M., 2019. Toxic effects of nickel oxide nanoparticles on soil enzyme activities and microbial community. *Chemosphere*, 215, pp.56-64. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2018.09.176
14. Gong, X., Huang, D., Liu, Y., Zeng, G., Chen, S., Wang, R., Deng, J. and Cheng, M., 2019. Toxic effects of nickel oxide nanoparticles on soil enzyme activities and microbial community. Chemosphere, 215, pp.56-64.
15. Jośko, I., Oleszczuk, P. and Futa, B., 2014. The effect of inorganic nanoparticles (ZnO, Cr2O3, CuO and Ni) and their bulk counterparts on enzyme activities in different soils. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 11(8), pp.2311-2320. DOI: 10.1007/s13762-013-0427-y
16. Khan, M.N., Li, Y., Khan, Z., Chen, L., Liu, Y., Khan, Z., Wu, H. and Li, Z., 2023. Nanoparticles in sustainable agriculture: Recent advances, challenges, and future perspectives. *Chemosphere*, 312, p.137286. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2022.137286
17. Khan, M.N., Li, Y., Khan, Z., Chen, L., Liu, Y., Khan, Z., Wu, H. and Li, Z., 2023. Nanoparticles in sustainable agriculture: Recent advances, challenges, and future perspectives. Chemosphere, 312, p.137286.

18. Khoshru, B., Fallah Nosratabad, A., Khosravi, H., Asgharzadeh, A., & Faridian, L., 2025. Enhancing agricultural productivity using PGPR and nanoparticles: Mechanisms, challenges, and future directions. *Journal of Soil Biology*, 12(2), 279–313. https://doi.org/10.22092/sbj.2025.368425.277
19. Kim, S., Kim, J. and Lee, I., 2015. Effects of copper nanoparticles on soil enzyme activities and bacterial community composition. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 50(4), pp.265-271. DOI: 10.1080/03601234.2015.999602
20. Mishra, V.K. and Kumar, A., 2009. Impact of metal nanoparticles on the plant growth promoting rhizobacteria. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 4(3), pp.587-592. URL: http://www.chalcogen.ro/587_Mishra.pdf
21. Parween, T., Jan, S. and Mahmooduzzafar, 2021. Bio-interaction of CuO nanoparticles with agricultural crops: A review. *Vegetos*, 34, pp.1-12. DOI: 10.1007/s42535-020-00173-w
22. Rajput, V.D., Minkina, T., Sushkova, S., Mandzhieva, S., Singh, R., Burachevskaya, M. and Chaplygin, V., 2021. Nano-biochar: A novel solution for sustainable agriculture and environmental remediation. *Environmental Geochemistry and Health*, 44, pp.1-22. DOI: 10.1007/s10653-021-01168-w
23. Rastogi, A., Zivcak, M., Sytar, O., Kalaji, H.M., He, X., Mbarki, S. and Brestic, M., 2017. Impact of metal and metal oxide nanoparticles on plant: A critical review. *Frontiers in Chemistry*, 5, p.78. DOI: 10.3389/fchem.2017.00078
24. Walkley, A. and Black, I.A., 1934. An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Science*, 37(1), pp.29-38. DOI: 10.1097/00010694-193401000-00003
25. Wang, J., Wang, J., Zhang, Z. and Dong, Y., 2022. Environmental risks of metal-based engineered nanoparticles in soil: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 20, pp.2393–2407. DOI: 10.1007/s10311-022-01438-x
26. Wang, J., Wang, J., Zhang, Z. and Dong, Y., 2022. Environmental risks of metal-based engineered nanoparticles in soil: a review. Environmental Chemistry Letters, 20, pp.2393–2407.
27. Wu, J., Yu, Z., Cai, L. and Sun, Y., 2020. Ecotoxicity of copper oxide nanoparticles to soil microorganisms: A review. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 105, pp.1-9. DOI: 10.1007/s00128-020-02917-y
28. Wu, J., Yu, Z., Cai, L. and Sun, Y., 2020. Ecotoxicity of copper oxide nanoparticles to soil microorganisms: A review. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 105, pp.1-9.
29. Yousefi, S., Kartoolinejad, D. and Naghdi, R., 2023. Effects of metal oxide nanoparticles on soil enzyme activities and microbial biomass in a forest soil. *Eurasian Journal of Soil Science*, 12(1), pp.55-63. DOI: 10.18393/ejss.1130638
30. Zantua, M.I. and Bremner, J.M., 1977. Stability of urease in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 9(2), pp.135-140. DOI: 10.1016/0038-0717(77)90050-5.

Publisher: Soil Science Society of Iran

Journal of Soil Biology

https://sbj.areeo.ac.ir/

Research article

Development and Validation of a Novel Rapid Three-Dimensional Assay for Phosphate Solubilization in Spore-Forming Gram-Positive Bacteria

Shakiba Reisi[1], Hossein Ali Alikhani[1], Alireza Fallah Nosrat Abad[2]*, Bahman Khoshru[2]*, and Ahmad Ali Pourbabaei[1]

[1] Department of Soil Science and Engineering, Faculty of Agriculture, University of Tehran, Karaj, Iran.
[2] Soil and Water Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

Article Info

Received: 2026-06-03
Accepted: 2026-07-12

Keywords:
Bacillus,
Microbial screening,
Biofertilizer,
Semi-solid medium,
Solubilization halo

Corresponding author's email:
a.r.fallah1350@gmail.com
bahmankhoshru@yahoo.com

Doi:
10.22092/SBJ.2026.372945.294

Author Contributions:

Sh. Reisi: Investigation, Data curation, Formal analysis, Writing – original draft.

H.A. Alikhani: Conceptualization, Supervision, Validation.

A. Fallah Nosrat-Abad: Conceptualization, Methodology, Resources, Supervision, Writing – review & editing.

Extended Abstract

Background and Objectives: Insoluble phosphates are among the major factors limiting phosphorus nutrition in calcareous soils, and the accurate selection of efficient phosphate solubilizing bacteria (PSB) is essential for the development of P biofertilizers. This study aimed to design and evaluate a new culture medium formulation (FKR), in combination with a semi solid three dimensional platform, for quantitative and qualitative screening of PSB, mainly belonging to the genus Bacillus.

Materials and Methods: A collection of 299 Gram positive bacterial isolates, predominantly Bacillus spp. obtained from the rhizosphere of maize plants under different field conditions and cultivars, was first grown on the FKR medium and on three standard media, Pikovskaya (PVK), NBRIP and Sperber (SP). The percentage of positive isolates, halo diameter and two dimensional solubilization index (SI) on plates were measured and evaluated using appropriate statistical tests (one way ANOVA and Duncan's multiple range test at 5% probability, as well as suitable tests for comparison of proportions such as chi square or Fisher's exact test). The performance of the same isolates was then assessed in semi solid three dimensional FKR tubes (with and without the BCP pH indicator), based on solubilization depth (SD) and solubilization volume (SV) indices, growth patterns along the oxygen gradient, and secondary metabolic traits (gas production, liquefaction, and medium alkalization).

Results: The FKR medium alone identified 164 isolates as PSB (55% of the 299 isolates), whereas the mean percentage of positive isolates on the three standard media PVK, NBRIP and SP was only 19.3% (20, 20 and 18%, respectively). This difference in the proportion of positive isolates was statistically significant ($P<0.05$), indicating that the FKR formulation increased screening efficiency by approximately 2.95 fold compared with the average of the three standard media. At the same time, the proportion of false negative results on the standard media was about 80–82% (239–245 isolates without halos), whereas this proportion decreased to 45% (135 isolates) on FKR, revealing part of the hidden phosphate solubilizing potential under nutrient limited standard conditions. In terms of qualitative differentiation based on SI, the FKR medium detected eight isolates in the very strong class (class A; SI $\geq$ 2.5), while the three standard media together detected only two isolates in this class and NBRIP did not detect any class A isolate, highlighting a systematic limitation

B. Khoshru: Conceptualization, Methodology, Validation, Formal analysis, Writing – review & editing.

A.A. Pourbabaei: Supervision, Validation.

All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

of minimal formulations in detecting high performance strains. In the three dimensional evaluation, the semi solid FKR–BCP tube method exhibited a clear advantage over plate assays in terms of speed and clarity of response: within the first 24 h, more than 75% of the solubilizing isolates produced a distinct yellow zone along the semi solid column, whereas in the same period fewer than 5% of these isolates formed a reliable clear halo on solid FKR plates ($P \leq 0.05$). Three dimensional quantification based on SD showed that top performing isolates could generate solubilization depths exceeding 40 mm along the column, and calculation of the volumetric SV index (mm^3) provided a more comprehensive picture of the intensity and spatial extent of activity. Comparison of the ranking of the ten best isolates according to SI and SV revealed substantial changes in the relative position of some strains. For instance, isolate FKR S10, with the highest SI (3.50), ranked first in two dimensional assays but dropped to rank 61 in terms of SV (2,031 mm^3), whereas isolate FKR S94, with a moderate SI (2.47; rank eight), showed the highest SV (10,244 mm^3) and ranked first in three dimensional assays. Overall, about 15% of ranks were markedly shifted between the two approaches, indicating that two dimensional evaluation may underestimate the true potential of isolates with invasive and deep growth. From a metabolic perspective, the three dimensional system led to the discovery of phenomena that were not visible in plate assays. In total, six isolates (≈3.8% of the population evaluated in tubes) exhibited an alkalinizing solubilization pattern and produced a dark purple halo in FKR–BCP due to local pH increase, likely associated with alkaline phosphatase activity or secretion of calcium chelating and other complexing agents. Moreover, about 7% of active isolates produced gas (fine bubbles along the diffusion path) and around 2% liquefied the semi solid matrix, indicating the production of extracellular hydrolytic enzymes. Finally, three main growth patterns along the oxygen gradient of the semi solid column surface (pellicle/ring), continuous vertical, and banded (layered) were recorded, providing valuable qualitative information on the ecophysiology and respiratory preferences of the isolates.

Conclusion: The results demonstrate that combining the FKR chemical formulation with a semi solid three dimensional system markedly increases the sensitivity and resolution of detection, quantification and functional differentiation of Bacillus PSB compared with classical plate based methods. By substantially reducing false negatives, enabling volumetric quantification (SV), revealing both acidic and non acidic solubilization mechanisms, and capturing secondary metabolic activities and growth patterns along oxygen gradients, this platform provides an efficient and exploratory tool for targeted selection of robust, high performance strains for the development of phosphate biofertilizers, particularly for calcareous and alkaline soils.

Cite this article: Reisi, Sh., Alikhani, H., Fallah Nosratabad, A., Khoshru, B., Pourbabaei, A.A., 2026. Development and validation of a novel rapid three-dimensional assay for phosphate solubilization in spore-forming gram-positive bacteria. *Journal of Soil Biology, 14 (1),*81- 103.

DOI: 10.22092/SBJ.2026.372945.294
Publisher: Soil Science Society of Iran

دو فصلنامه

نشریه زیست‌شناسی خاک

https://sbj.areeo.ac.ir/

مقاله پژوهشی

توسعه و اعتبارسنجی یک روش نوین ارزیابی سریع و سه‌بعدی انحلال فسفات در باکتری‌های گرم‌مثبت اسپوردار

شکیبا رئیسی[۱]، حسینعلی علیخانی[۱]، علیرضا فلاح نصرت‌آباد[۲*]، بهمن خوشرو[۲*] و احمدعلی پوربابائی[۱]

[۱] گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران، کرج، ایران.

[۲] مؤسسه تحقیقات خاک و آب کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

دریافت: ۱۴۰۵/۰۳/۱۳ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۴/۲۱

چکیده

این پژوهش با هدف طراحی و ارزیابی یک محیط کشت جدید (FKR) همراه با یک بستر سه‌بعدی نیمه‌جامد برای غربالگری کمی و کیفی PSB، عمدتاً از جنس *Bacillus*، انجام شد. ۲۹۹ جدایه گرم‌مثبت، عمدتاً *Bacillus* از ریزوسفر ذرت، روی محیط‌های جامد FKR و سه محیط استاندارد Pikovskaya (PVK)، NBRIP و Sperber (SP) کشت داده شدند. سپس جدایه‌ها در لوله‌های حاوی FKR–BCP نیمه‌جامد بر اساس شاخص عمق (SD) و حجم انحلال (SV)، الگوهای رشد در گرادیان اکسیژن و ویژگی‌های متابولیکی ثانویه بررسی شدند. محیط FKR به‌تنهایی ۵۵ درصد سویه‌ها را به عنوان PSB شناسایی کرد، در حالی‌که میانگین سه محیط استاندارد تنها ۱۹/۳درصد (۲۰، ۲۰ و ۱۸ درصد) بود ($P<0.05$)، که بیانگر افزایش حدود ۲/۹۵ برابری کارایی غربالگری است. سهم نتایج منفی کاذب در محیط‌های استاندارد حدود ۸۰–۸۲ درصد و در FKR فقط ۴۵ درصد بود. در سامانه سه‌بعدی، طی ۲۴ ساعت نخست، بیش از ۷۵ درصد سویه‌های فعال، ناحیه زرد مشخص در ستون نیمه‌جامد ایجاد کردند، در حالی‌که در همان بازه، کمتر از ۵ درصد روی پلیت FKR هاله قابل‌اعتماد داشتند ($P<0.05$). سویه‌های برتر موفق به ایجاد عمق انحلالی بیش از ۴۰ میلی‌متر شدند. بررسی‌ها نشان داد که با تغییر رویکرد از ارزیابی دوبعدی (SI) به سه‌بعدی (SV)، جایگاه حدود ۱۵ درصد از سویه‌ها تغییر می‌کند. در مجموع، ۶ سویه (۳/۸ درصد) الگوی انحلال قلیایی، حدود ۷ درصد تولید گاز و حدود ۲ درصد مایع‌سازی محیط نیمه‌جامد را نشان دادند. ترکیب فرمولاسیون FKR با روش سه‌بعدی نیمه‌جامد و کمی‌سازی حجمی (SV)، ابزاری کارآمد برای انتخاب هدفمند سویه‌های مناسب توسعه کودهای زیستی فسفاته در خاک‌های آهکی و قلیایی فراهم می‌کند.

واژه‌های کلیدی: *باسیلوس*، غربالگری میکروبی، کود زیستی، محیط کشت نیمه‌جامد، هاله انحلال.

استناد: رئیسی، ش.، علیخانی، ح.، فلاح نصرت آباد، ع.، خوشرو، ب.، پوربابائی، ا.، ۱۴۰۵. توسعه و اعتبارسنجی یک روش نوین ارزیابی سریع و سه‌بعدی انحلال فسفات در باکتری‌های گرم‌مثبت اسپوردار. *نشریه زیست شناسی خاک*، *۱۴(۱)*، ۸۱- ۱۰۳.

مقدمه

فسفر (P) به‌عنوان یکی از عناصر اصلی و درشت‌مغذی گیاه، نقشی بنیادی و غیرقابل‌جایگزین در فرآیندهای فیزیولوژیک و بیوشیمیایی کلیدی دارد. با وجود این اهمیت، بخش قابل‌توجهی از فسفر کل در اغلب خاک‌های زراعی جهان، به‌ویژه در خاک‌های آهکی و قلیایی که سهم بالایی از اراضی ایران را تشکیل می‌دهند، به‌صورت ترکیبات معدنی نامحلول یا در قالب ترکیبات آلی پیچیده تثبیت شده و برای ریشه گیاه غیرقابل دسترس باقی می‌ماند (Alori et al., 2017; Menezes-Blackburn et al., 2018). این وضعیت که به طور گسترده با عنوان «معضل فسفر» شناخته می‌شود، فراهمی فسفر را به طور چشمگیری محدود کرده و کشاورزان را به مصرف مقادیر بالای کودهای فسفاته شیمیایی وا می‌دارد. اتکای مداوم به این نهاده‌ها، علاوه بر تحمیل هزینه‌های اقتصادی، با پیامدهای نامطلوب زیست‌محیطی از جمله آلودگی منابع آب، بروز اوتروفیکاسیون و تشدید نگرانی‌ها درباره پایداری ذخایر محدود سنگ فسفات همراه است (Alewell et al., 2020).

در چارچوب گذار به نظام‌های کشاورزی پایدار، باکتری‌های حل‌کننده فسفات (PSB[1]) به عنوان یکی از اجزای کلیدی کودهای زیستی، توجه روزافزون پژوهشگران و صنایع را به خود جلب کرده‌اند. این ریزجانداران با بهره‌گیری از سازوکارهایی نظیر تولید اسیدهای آلی، ترشح آنزیم‌های فسفاتاز اسیدی و قلیایی، رهاسازی کلات‌کننده‌های فلزی و تولید متابولیت‌های تنظیم‌کننده رشد، قادرند فسفات‌های معدنی و آلی نامحلول را به فرم‌های قابل‌حل و قابل‌جذب برای گیاه ($H_2PO_4^-$ و HPO_4^{2-}) تبدیل کنند (Rawat et al., 2021; Bargaz et al., 2018). استفاده هدفمند از PSB نه تنها وضعیت تغذیه‌ای فسفر را در گیاه بهبود می‌بخشد، بلکه در ارتقای کیفیت زیستی و ساختاری خاک، افزایش کارایی مصرف نهاده‌های شیمیایی و کاهش اثرات مخرب زیست‌محیطی نیز نقش مهمی ایفا می‌کند (Castanheira et al., 2021; Khoshru et al., 2020). در این چارچوب، انتخاب و شناسایی سویه‌های PSB با کارایی بالا، نخستین گام حیاتی در توسعه کودهای زیستی مؤثر و پایدار به‌شمار می‌رود.

روش رایج برای غربالگری اولیه PSB، استفاده از محیط‌های کشت جامد نظیر پیکوفسکایا، NBRIP[2] و اسپربر است که در آن توانایی انحلال فسفات از طریق تشکیل هاله شفاف اطراف کلنی و بر اساس یک شاخص دوبعدی سطحی (SI[3]) ارزیابی می‌شود (Nautiyal, 1999; Mendes et al., 2021). با وجود کاربرد گسترده، این رویکرد با محدودیت‌های متعددی همراه است. تشکیل هاله اغلب کند بوده و ممکن است چند روز تا بیش از یک هفته زمان نیاز داشته باشد؛ و ضوح هاله برای برخی سویه‌ها پایین است؛ و مهم‌تر آن‌که، ارتباط بین اندازه هاله در این محیط‌ها و توان واقعی انحلال فسفات در شرایط پیچیده و چندفازی خاک، ضعیف و در بسیاری موارد غیرخطی گزارش شده است (Rodríguez & Fraga, 1999; Behera et al., 2017). در نتیجه، عملکرد مطلوب یک سویه در شرایط کنترل‌شده آزمایشگاهی لزوماً تضمین‌کننده موفقیت آن در محیط ناهمگن و رقابتی خاک نیست. این شکاف عملکردی یکی از عوامل اصلی ناکامی برخی فرمولاسیون‌های کود زیستی در آزمایش‌های مزرعه‌ای محسوب می‌شود و نیاز به توسعه رویکردهای دقیق‌تر، سریع‌تر و واقع‌بینانه‌تر برای غربالگری PSB را برجسته می‌سازد (Bashan et al., 2013; Malusá et al., 2016; Timmusk et al., 2017; Khosravi et al., 2024).

این محدودیت‌ها در مورد باکتری‌های گرم‌مثبت، به‌ویژه اعضای جنس *Bacillus*، شدیدتر بروز می‌کند و از

[1] Phosphate-Solubilizing Bacteria

[2] National Botanical Research Institute's phosphate growth medium

[3] Solubilization Index

منظر کاربردی نیز اهمیت بالایی دارد. بسیاری از محیط‌های استاندارد رایج، دارای فرمولاسیون حداقلی بوده و فاقد منابع غنی نیتروژن آلی (مانند پپتون) و فاکتورهای رشد موجود در عصاره مخمر هستند؛ در نتیجه، تأمین نیازهای متابولیکی پیچیده‌تر و مسیرهای اسیدزایی در این گروه از ریزجانداران به طور کامل صورت نمی‌گیرد. پیامد این وضعیت، بروز درصد بالایی از نتایج منفی کاذب است؛ بدین معنا که سویه‌هایی با پتانسیل ژنتیکی و متابولیکی بالا برای انحلال فسفات، به دلیل شرایط فقیر محیط‌های استاندارد قادر به ایجاد هاله شفاف نیستند و در مراحل اولیه غربالگری حذف می‌شوند (Bashan et al., 2013; Sharma et al., 2013). این در حالی است که *Bacillus*های اسپوردار به دلیل مقاومت بالای اسپور در برابر خشکی، حرارت، فشار اسمزی و سایر تنش‌های فیزیکی و شیمیایی، از مناسب‌ترین گزینه ها برای کاربردهای صنعتی و تولید کودهای زیستی پایدار، به‌ویژه در قالب فرمولاسیون‌های گرانولی و محصولات تجاری بلندمدت، به‌شمار می‌روند (Schisler et al., 2004; Malusá & Vassilev, 2014; Rouphael et al., 2015). چنین ناهمخوانی نشان‌دهنده یک شکاف روش‌شناختی جدی بین نیاز صنعت به سویه‌های مقاوم و چندمنظوره و توان محدود روش‌های استاندارد در شناسایی مؤثر آن‌ها است.

در راستای کاهش این شکاف و بهبود پتانسیل حل‌کنندگی باکتری‌ها (Khoshru et al., 2023)، در یک مطالعه پیشین، یک محیط کشت نوین با عنوان FKR[4] به طور ویژه برای غربالگری باکتری‌های گرم‌مثبت حل‌کننده فسفات، با تمرکز بر جنس *Bacillus*، طراحی و به‌صورت اولیه اعتبارسنجی شد (Reisi et al., 2025). در آن مطالعه، محیط FKR به طور میانگین حدود ۵۲ در صد از سویه‌ها را به عنوان PSB شناسایی کرد، در حالی‌که این نسبت برای مجموعه‌ای از محیط های استاندارد (NBRIP، پیکوفسکایا و اسپربر) در حدود ۱۹ در صد گزارش شد؛ به‌عبارت دیگر، کارایی شناسایی در FKR تقریباً ۲/۵ تا ۲/۷ برابر بالاتر بود. علاوه بر این، FKR مجموعاً ۹ سویه را در کلاس بسیار قوی (SI≥ ۲/۵) شناسایی نمود، در حالی‌که سه محیط استاندارد در مجموع تنها دو سویه را در این کلاس ثبت کردند. استفاده از نسخه حاوی شناساگر pH (FKR-BCP) نیز نشان داد که در صد قابل توجهی از سویه‌ها، علیرغم تولید اسید، در محیط‌های استاندارد، هاله انحلال شفافی ایجاد نمی‌کنند و در نتیجه به عنوان منفی کاذب طبقه‌بندی می‌شوند. این یافته‌ها FKR را به عنوان یک بستر غربالگری حساس‌تر و دقیق‌تر برای انتخاب سویه های برتر معرفی کردند، اما ارزیابی انجام‌شده همچنان عمدتاً بر اساس یک شاخص دوبعدی سطحی (SI) و سامانه‌های مبتنی بر محیط کشت جامد[5] صورت گرفته بود (Reisi et al., 2025; Bashan et al., 2013).

با این وجود، چندین جنبه کلیدی در ارزیابی عملکرد این محیط نوین و رفتار واقعی باکتری‌های حل‌کننده فسفات در شرایط شبه سه‌بعدی، هنوز به طور نظام‌مند بررسی نشده است. از جمله این جنبه‌ها می‌توان به دینامیک عمقی انحلال فسفات، اثر هندسه محیط کشت (مانند شعاع لوله آزمایش، ارتفاع ستون محیط و نسبت سطح به حجم) بر انتشار اسید و گرادیان pH، و نیز ارتباط کمی بین شاخص‌های دوبعدی (SI) و شاخص‌های حجمی جدید اشاره کرد؛ موضوعاتی که در سال‌های اخیر در قالب مدل‌سازی انتشار در محیط‌های متخلخل و ریزوسفر مورد توجه قرار گرفته‌اند (Hinsinger et al., 2011; van der Bom et al., 2018). درک این ابعاد برای نزدیک‌تر کردن شرایط غربالگری آزمایشگاهی به وضعیت واقعی ریزوسفر و انتخاب دقیق‌تر سویه‌های کارآمد، ضروری به نظر می‌رسد.

مطالعه حاضر با هدف پر کردن این خلأ، به توسعه و ارزیابی یک سامانه نیمه‌جامد لوله‌ای مبتنی بر محیط FKR می‌پردازد. در این سامانه، با کاهش تراکم آگار، فضای فیزیکی رشد باکتری و انتشار اسید از یک

[4] Fallah-Khoshru-Reisi

[5] Plate-based

سطح دوبعدی (پلیت) به یک ماتریکس حجمی و سه‌بعدی (سیلندر نیمه‌جامد) تغییر می‌یابد و بر این اساس، یک شاخص سه‌بعدی انحلال(SV[6]) تعریف و محاسبه می‌شود و رابطه آن با SI، رفتار اسیدی/غیراسیدی سویه‌های گرم‌مثبت و هند سه سامانه کشت مورد تحلیل جامع قرار می‌گیرد. این رویکرد می‌تواند گامی در جهت طراحی پروتکل‌های غربالگری واقع‌بینانه‌تر برای انتخاب PSB، به‌ویژه در میان باکتری‌های اسپوردار جنس *Bacillus*، و در نهایت بهبود کارایی کودهای زیستی فسفاته در شرایط مزرعه‌ای باشد.

مواد و روش‌ها

سویه‌های باکتریایی و آماده‌سازی مایه‌تلقیح

در این پژوهش از مجموعه‌ای شامل ۲۹۹ سویه باکتریایی گرم‌مثبت و مولد اندوسپور، عمدتاً متعلق به جنس *Bacillus*، استفاده شد. این سویه‌ها پیش‌تر مطابق پروتکل‌های استاندارد رقیق‌سازی سریالی و کشت سطحی از خاک ریزوسفر گیاه ذرت (*Zea mays* L.) در مناطق مختلف ایران جداسازی، خالص‌سازی و شناسایی اولیه شده بودند (Reisi et al., 2025). این جدایه‌ها در مرحله خالص‌سازی، تحت تیمار شوک حرارتی (۸۰ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه) جهت انتخاب اختصاصی باکتری‌های اسپوردار قرار گرفته‌اند و هویت آن‌ها با رنگ‌آمیزی گرم و آزمون‌های پایه بیوشیمیایی (نظیر کاتالاز) به عنوان *Bacillus* تأیید شده است. تمام باکتری‌ها با جمعیت مناسب (10^8 CFU/mL) تکثیر شدند و سوسپانسیون‌های تازه برای تمامی آزمون‌ها به عنوان مایه‌تلقیح استاندارد مورد استفاده قرار گرفت و برای هر سویه و هر تیمار محیطی، تلقیح‌ها به صورت مستقل و با سه تکرار انجام شدند.

طراحی و آماده‌سازی محیط‌های کشت

محیط‌های کشت استاندارد برای غربالگری PSB

به منظور ایجاد یک مبنای معتبر برای ارزیابی کارایی محیط کشت نوین، سه محیط کلاسیک و پرکاربرد از جمله Pikovskaya, Sperber و NBRIP در غربالگری باکتری‌های حل‌کننده فسفات (PSB) انتخاب و به عنوان شاهد مورد استفاده قرار گرفتند. ترکیبات شیمیایی این سه محیط در (جدول ۱) ارائه شده است.

جدول ۱- ترکیبات شیمیایی محیط‌های کشت استاندارد مورد استفاده برای غربالگری باکتری‌های حل‌کننده فسفات (PSB).

Table 1. Chemical compositions of standard culture media used for screening phosphate-solubilizing bacteria (PSB).

Sperber's Medium (Sperber, 1958)	NBRIP (Nautiyal, 1999)	PVK (Pikovskaya, 1948)	ترکیب / Component (g L^{-1})
20.0	10.0	10.0	Glucose
2.0	5.0	5.0	$Ca_3(PO_4)_2$
—	0.1	0.5	$(NH_4)_2SO_4$
0.5	—	—	NH_4Cl
0.5	0.25	0.1	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$
—	5.0	—	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$
—	0.2	0.2	KCl
—	0.2	—	NaCl
—	0.1	—	K_2SO_4
0.002	—	0.002	$MnSO_4 \cdot H_2O$
0.002	—	0.002	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$
0.5	—	0.5	Yeast extract
15.0	15.0	15.0	Agar
7.0	7.0	7.0	pH

[6] Solubilization Volume

فرمولاسیون شیمیایی محیط کشت نوین FKR

محیط کشت نوین FKR با هدف اصلی رفع محدودیت های تغذیه‌ای محیط های استاندارد برای باکتری‌های گرم‌مثبت، به‌ویژه گونه‌های جنس *Bacillus*، طراحی و فرموله شد.

این محیط در دو نسخه مورد استفاده قرار گرفت: الف) FKR به عنوان محیط پایه بهینه‌سازی‌شده، و ب) FKR-BCP، که همان فرمولاسیون پایه به همراه شناساگر pH بروموکرزول ارغوانی (BCP) است. ترکیبات کامل این دو نسخه محیط در (جدول ۲) آورده شده است.

جدول ۲- فرمولاسیون شیمیایی کامل محیط کشت نوین FKR و FKR-BCP.

Table 2. Complete chemical formulation of the novel FKR and FKR-BCP culture media.

FKR-BCP	FKR*	جزء ترکیبی / Component (g L^{-1})
		منبع کربن / Carbon source
10.0	10.0	Glucose (Dextrose)
		منبع فسفات نامحلول / Insoluble phosphate source
2.0	2.0	Tricalcium Phosphate (TCP)
		منابع نیتروژن و فاکتورهای رشد / Nitrogen sources and growth factors
1.0	1.0	Yeast Extract
0.2	0.2	Peptone
0.5	0.5	Ammonium Sulfate ($(NH_4)_2SO_4$)
		نمک‌های پایه و عناصر / Basal salts and elements
0.2	0.2	Potassium Chloride (KCl)
0.25	0.25	Magnesium Sulfate ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)
–	–	Magnesium Chloride ($MgCl_2$)
–	–	Calcium Chloride ($CaCl_2$)
		عناصر کمیاب (Trace Elements; TE)
0.01	0.01	Manganese Sulfate ($MnSO_4$)
0.01	0.01	Ferrous Sulfate ($FeSO_4$)
0.01	0.01	Zinc Sulfate ($ZnSO_4$)
0.01	0.01	Copper Sulfate ($CuSO_4$)
		اجزای دیگر / Other components
15.0	15.0	Agar
0.02	–	pH Indicator (BCP)
~7.0	~7.0	pH

*فرمولاسیون پایه FKR پیش‌تر به صورت اولیه توسط Reisi و همکاران (۲۰۲۵) معرفی شده بود. در مطالعه حاضر، این فرمولاسیون با افزودن BCP تکمیل و در قالب سامانه لوله‌ای نیمه‌جامد برای غربالگری سه‌بعدی ارزیابی شد.

*The basal formulation of FKR was previously introduced preliminarily by Reisi et al. (2025). In the present study, this formulation was supplemented with BCP and evaluated in a semi-solid tube system for three-dimensional screening.

توسعه و پیاده‌سازی روش غربالگری سه‌بعدی

آماده‌سازی محیط نیمه‌جامد لوله‌ای

برای گذار از یک سیستم ارزیابی دوبعدی (سطحی) به یک سیستم سه‌بعدی (حجمی)، حالت فیزیکی محیط های FKR و FKR-BCP از حالت کاملاً جامد به نیمه‌جامد تغییر داده شد. بدین منظور، ترکیب شیمیایی هر دو محیط دقیقاً مطابق (جدول ۲) حفظ گردید، اما غلظت آگار از ۱/۵درصد (w/v) که برای محیط جامد استاندارد به کار می‌رود، به ۰/۵درصد (w/v) کاهش یافت. این کاهش غلظت آگار، بافتی ژل‌مانند و نیمه‌جامد ایجاد می‌کند که ضمن جلوگیری از جابجایی آزادانه سلول‌ها، انتشار متابولیت‌ها (مانند اسیدهای آلی) را در یک ماتریکس سه‌بعدی امکان‌پذیر می‌سازد (Atlas, 2010).

پس از حل کامل ترکیبات و تنظیم pH (تقریباً ۷)، محیط‌ها در فلاسک‌های شیشه‌ای اتوکلاو شدند. سپس، در شرایط استریل (هود میکروبیولوژی)، محیط‌های نیمه‌جامد مذاب به میزان ۱۰ میلی‌لیتر در لوله‌های آزمایش شیشه‌ای استریل با ابعاد ۱۳ × ۱۰۰ میلی‌متر (شعاع داخلی ۵/۵ میلی‌متر) توزیع شد.

تلقیح و شرایط انکوباسیون

برای اطمینان از یکسان بودن شرایط اولیه در مقایسه بین روش های دوبعدی (پلیت) و سه‌بعدی (لوله‌ای)، حجم مایه‌تلقیح در هر دو سیستم یکسان در نظر گرفته شد. با استفاده از سمپلر، مقدار ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون استاندارد هر سویه ($OD_{600} = 0.5$) برداشت شد. در روش لوله‌ای نیمه‌جامد، نوک سرسمپلر مرکز ستون محیط فرو برده شده و حجم تلقیح دقیقاً کمی پایین‌تر از سطح محیط تزریق گردید. برای استانداردسازی عمق تلقیح در تمامی تکرارها، از سرسمپلرهای مدرج (دارای نشانگر خطی) استفاده شد و نوک سرسمپلر دقیقاً تا عمق ۵ میلی‌متری از سطح محیط نیمه‌جامد فرو برده شد.

به طور همزمان، برای روش پلیت جامد، همین حجم ۱۰ میکرولیتر در مرکز سطح محیط‌های جامد PVK، NBRIP، Sperber و FKR (با آگار ۱/۵درصد) به صورت نقطه‌ای تلقیح شد. تمامی لوله‌ها و پلیت‌های تلقیح شده به مدت ۵ روز در دمای ۲۸ درجه سلسیوس و در تاریکی انکوبه شدند. مشاهدات و اندازه‌گیری‌ها در فواصل زمانی ۲۴، ۷۲ و ۱۲۰ ساعت پس از تلقیح انجام گرفت. برای هر سویه و هر نوع محیط، حداقل سه تکرار مستقل در نظر گرفته شد تا امکان تحلیل‌های آماری مناسب فراهم گردد. در طول اجرای آزمایش، لوله‌های شاهد تلقیح‌نشده برای پایش تغییرات خودبه‌خودی[7] پی‌اچ در تمامی انکوباتورها قرار داده شده بودند.

ارزیابی مقایسه‌ای و سنجش شاخص‌ها

اندازه‌گیری شاخص انحلال (SI) در روش پلیت جامد

برای ارزیابی کمی توان انحلال فسفات در روش استاندارد پلیت، از شاخص انحلال (SI[8]) استفاده شد. پس از تلقیح نقطه‌ای و انکوباسیون پلیت‌ها در شرایط ذکر شده، در زمان‌های ۲۴، ۷۲ و ۱۲۰ ساعت، قطر کلنی باکتری (CD) و قطر کل ناحیه شفاف (شامل کلنی و هاله انحلال؛ HD) به‌وسیله کولیس دیجیتال با دقت ۰/۰۱ میلی‌متر اندازه‌گیری شد. شاخص SI بر اساس رابطه زیر محاسبه گردید (Nautiyal, 1999; Mendes et al., 2021):

شاخص انحلال (SI) = قطر هاله شفاف (HD) / قطر کلنی (CD)

برای حصول اطمینان از دقت اندازه‌گیری ها، برای هر سویه و هر محیط، حداقل سه کلنی نماینده در هر پلیت بررسی و میانگین آن‌ها به عنوان SI آن سویه در زمان مورد نظر ثبت شد. در تحلیل‌های مقایسه‌ای اصلی، SI مربوط به زمان ۷۲ ساعت به عنوان شاخص معیار در نظر گرفته شد، مگر آن‌که در نتایج خلاف آن ذکر شده باشد.

برای ارزیابی کیفی توان انحلال فسفات در روش دوبعدی، از شاخص انحلال فسفات (SI=CD/HD) استفاده شد و سویه‌ها بر اساس مقدار این شاخص در محیط‌های مختلف طبقه‌بندی شدند. نظام طبقه‌بندی به صورت زیر تعریف گردید:

- کلاس A: SI≥2.5 (سویه‌های بسیار قوی)
- کلاس B: 2.5>SI≥2
- کلاس C: 2>SI≥1.5
- کلاس D: SI<1.5 (سویه‌های ضعیف یا فاقد هاله قابل اتکا)

این طبقه‌بندی مبنای مقایسه کیفی عملکرد محیط‌های مختلف در شناسایی و تفکیک سویه‌های برتر قرار گرفت.

محاسبه شاخص تولید اسید (API[9]) در محیط FKR-BCP

به‌منظور ارزیابی توان تولید اسید جدایه‌ها، از محیط FKR حاوی شناساگر pH بروموکروزول ارغوانی (FKR-BCP) استفاده شد. در این محیط، تغییر رنگ شناساگر از بنفش به زرد نشان‌دهنده اسیدی شدن محیط اطراف کلنی است. برای هر جدایه‌ای که در اطراف کلنی

[7] Autohydrolysis

[8] Solubilization Index

[9] Acid Production Index

آن هاله زردِ مشخص تشکیل شد، دو پارامتر قطر کلنی (CD) و قطر هاله اسیدی (AD[10])زیر اندازه‌گیری گردید. سپس، شاخص تولید اسید (API) برای هر جدایه، با اقتباس از منطق ریاضی شاخص انحلال (Nautiyal, 1999; Edi-Premono et al., 1996)، به‌صورت نسبت قطر هاله رنگی اسیدی به قطر کلنی محاسبه گردید:

API=AD/CD

که در آن: AD قطر هاله زرد اسیدی (میلی‌متر) و CD قطر کلنی (میلی‌متر) است.

برای جلوگیری از تداخل بین شاخص انحلال فسفات و شاخص تولید اسید، در محیط FKR-BCP دو نوع هاله شفاف انحلال فسفات (HD) و هاله رنگی ناشی از تغییر pH (AD): به طور مستقل ارزیابی شدند.

اندازه‌گیری عمق انحلال (SD) و حجم انحلال (SV) در روش لوله‌ای نیمه‌جامد

با توجه به ماهیت سه‌بعدی سیستم لوله‌ای، استفاده صرف از شاخص دوبعدی SI برای توصیف فعالیت باکتری‌ها کافی نبود. از این‌رو، دو شاخص جدید عمق انحلال (SD[11]) و حجم انحلال (SV[12]): برای ارزیابی عملکرد سویه‌ها در محیط نیمه‌جامد تعریف و از رابطه زیر محاسبه شد:

$SV\ (mm^3)=\pi \times r^2 \times SD$

که در آن، r شعاع داخلی لوله آزمایش (mm) و SD عمق انحلال اندازه‌گیری‌شده (mm) است. در این مطالعه، شعاع داخلی لوله‌ها ۵/۵ میلی‌متر در نظر گرفته شد و در تمامی محاسبات، مقدار ثابت r = 5.5 mm مورد استفاده قرار گرفت. (Crank, 1975; Berg et al., 2002). پیش‌فرض فرمول این است که ناحیه انحلال یک استوانه کامل است. لازم به توضیح است که این یک "ساده سازی هندسی" است، زیرا الگوی انحلال در واقعیت ممکن است مخروطی یا نامنظم باشد.

اندازه‌گیری SD و محاسبه SV در همان فواصل زمانی ۲۴، ۷۲ و ۱۲۰ ساعت انجام گرفت و به طور مشابه، برای هر سویه و هر تیمار، سه تکرار مستقل در نظر گرفته شد. در تحلیل‌های مربوط به مقایسه حجمی، SV مربوط به ۷۲ ساعت به عنوان شاخص اصلی مورد استفاده قرار گرفت، مگر آن‌که در نتایج به طور جداگانه به تغییرات زمانی اشاره شده باشد.

تجزیه و تحلیل آماری

تمامی آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی (CRD[13]) و با سه تکرار مستقل برای هر سویه و هر تیمار محیطی اجرا شدند. داده‌های کمی حاصل از اندازه‌گیری شاخص‌های SI، SD و SV در ابتدا از نظر نرمال بودن توزیع با استفاده از آزمون شاپیرو–ویلک (Shapiro–Wilk test) بررسی شدند. در مواردی که فرض نرمال بودن برقرار بود، برای ارزیابی وجود تفاوت‌های معنی‌دار بین محیط‌های کشت و بین سویه‌های باکتریایی، از تحلیل واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS (نسخه ۹/۳) استفاده شد.

در صورت معنی‌دار بودن اثر تیمارها در سطح احتمال ۵ درصد ($P<0.05$)، مقایسه میانگین‌ها با آزمون چنددامنه‌ای دانکن (DMRT[14]) انجام گرفت. برای مقایسه نسبت سویه های مثبت PSB در محیط های مختلف، آزمون کای‌دو[15] به کار گرفته شد. تمامی آزمون‌ها در سطح معنی‌داری $P<0.05$ تفسیر و گزارش شدند (Malusá et al., 2016; Behera et al., 2017).

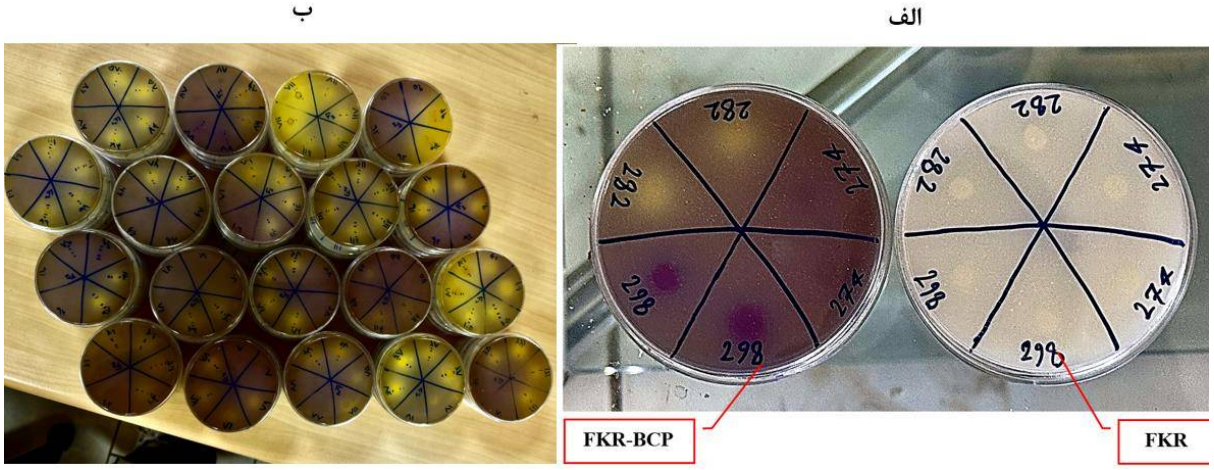
نتایج

اعتبارسنجی فرمولاسیون شیمیایی FKR در بستر استاندارد (روش دوبعدی)

نمونه‌ای از مقایسه مستقیم عملکرد محیط‌های FKR و FKR–BCP در غربالگری اولیه سویه‌ها در شکل

10 Acid halo Diameter
11 Solubilization Depth
12 Solubilization Volume
13 Completely Randomized Design
14 Duncan's Multiple Range Test
15 Chi-square test

۱ (الف) نشان داده شده است و نمای کلی صفحات مورد استفاده برای غربالگری گسترده تمامی سویه‌ها در شکل ۱ (ب) قابل مشاهده است.



شکل ۱- الف) مقایسه عملکرد محیط‌های FKR و FKR–BCP در غربالگری اولیه سویه‌ها، ب) نمایی از محیط جامد FKR–BCP مورد استفاده در غربالگری سویه‌های مختلف جنس *Bacillus*.

Figure 1. a) Comparison of the performance of FKR and FKR-BCP media in the primary screening of strains, b) A view of the solid FKR-BCP medium used in screening various Bacillus strains.

مقایسه کمی کارایی FKR با محیط‌های کشت استاندارد

افزایش معنی‌دار توان شناسایی سویه‌های مثبت

غربالگری انجام‌شده بر روی ۲۹۹ سویه باکتریایی نشان داد که فرمولاسیون غنی شده FKR از نظر تعداد سویه‌های مثبت شناسایی‌شده، به طور معنی‌داری از محیط‌های استاندارد متداول برتر است. همان‌گونه که در (جدول ۲) خلاصه شده است، محیط FKR به‌تنهایی موفق به شناسایی ۱۶۴ سویه به عنوان باکتری‌های حل‌کننده فسفات (PSB) شد که معادل ۵۵ درصد کل سویه‌های مورد آزمون است. در مقابل، میانگین درصد شناسایی سویه‌های مثبت در سه محیط استاندارد Pikovskaya، NBRIP و Sperber تنها حدود ۱۹/۳ درصد بود.

تحلیل آماری (با استفاده از آزمون مناسب مقایسه نسبت‌ها؛ مثلاً آزمون کای‌دو یا آزمون دقیق فیشر) نشان داد که این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار است ($P<0.05$). بر این اساس، می‌توان نتیجه گرفت که فرمولاسیون FKR، به‌تنهایی کارایی فرآیند غربالگری سویه‌های حل‌کننده فسفات را تقریباً ۲/۹۵ برابر نسبت به میانگین سه محیط استاندارد افزایش می‌دهد.

کاهش چشمگیر نتایج منفی کاذب

یکی از یافته های کلیدی در این بخش، کاهش قابل توجه سهم نتایج منفی کاذب در حضور محیط FKR بود. در محیط‌های استاندارد، حدود ۸۰ درصد از سویه‌ها فاقد هرگونه هاله انحلال قابل مشاهده بودند و به عنوان منفی طبقه‌بندی شدند؛ در حالی که این نسبت در محیط FKR به حدود ۴۵ درصد کاهش یافت (جدول ۳). به بیان دیگر، محیط FKR توانست بخشی از پتانسیل انحلال فسفات که در شرایط تغذیه‌ای محدود محیط‌های استاندارد پنهان می‌ماند، آشکار کند.

این یافته نشان می‌دهد که غنای تغذیه‌ای و طراحی شیمیایی FKR، شرایط فیزیولوژیک مناسب‌تری برای بیان ژن‌های مرتبط با انحلال فسفات فراهم می‌آورد و از برآورد کمتر از واقع توان واقعی سویه‌ها جلوگیری می‌کند.

جدول ۳- مقایسه کمی عملکرد محیط‌های کشت در شناسایی سویه‌های مثبت و منفی کاذب در روش پلیت دوبعدی.
Table 3. Quantitative comparison of the performance of culture media in identifying false-positive and false-negative strains using the two-dimensional plate method.

محیط کشت / Culture medium	تعداد سویه‌های مثبت / Number of positive strains	شناسایی سویه‌های مثبت (٪) / Positive strain identification (٪)	تعداد سویه‌های فاقد هاله (منفی کاذب) / Number of strains lacking halo (false negative)	درصد نتایج منفی کاذب (٪) / False negative results (٪)
FKR	164	55	135	45
FKR–BCP	150	50	149	50
Pikovskaya (PVK)	60	20	239	80
NBRIP	60	20	239	80
Sperber (SP)	54	18	245	82

مقایسه کیفی کارایی FKR با محیط‌های کشت استاندارد (توانایی برتر در تفکیک و شناسایی سویه‌های بسیار قوی)

برتری محیط FKR تنها به افزایش تعداد سویه‌های مثبت محدود نشد، بلکه در قابلیت تفکیک کیفی و شناسایی سویه‌های بسیار قوی نیز به طور بارزی مشاهده گردید. بر اساس طبقه‌بندی مبتنی بر شاخص SI، محیط FKR توانست ۸ سویه را در کلاس بسیار قوی (کلاس A؛ 2.5≤SI) شناسایی کند؛ در حالی که مجموع سه محیط استاندارد، با وجود ارزیابی همان مجموعه سویه‌ها، تنها ۲ سویه را در این کلاس ثبت کردند (جدول۴).

مقادیر عددی نشان‌دهنده درصد سویه‌های دارای آن ویژگی در هر محیط کشت است (مبتنی بر جمعیت ۲۹۹ جدایه‌ای مورد مطالعه). فراوانی مطلقِ سویه‌های مثبت در ردیف "مجموع سویه‌های مثبت" در این جدول، با نتایج ارائه شده در (جدول ۲) مطابقت کامل دارد.

جدول ۴- مقایسه توانایی برتر محیط FKR نسبت به محیط‌های مرسوم در تفکیک و شناسایی سویه‌های کارآمد.
Table 4. Comparison of the superior capability of FKR medium with conventional media in the differentiation and identification of efficient strains.

ویژگی میکروبی / شاخص ارزیابی / Microbial characteristic / Evaluation index	(٪) FKR	(٪) FKR-BCP	(٪) Sperber (SP)	(٪) Pikovskaya (PVK)	(٪) NBRIP
الگوهای فنوتیپی کلنی‌ها / Phenotypic patterns of colonies					
فاقد هاله اسید و فاقد هاله انحلال / Lacking acid halo and lacking solubilization halo	35	35	35	35	35
دارای هاله اسید (تغییر رنگ محیط) / Having acid halo (medium color change)	—	65	—	—	—
دارای هاله اسید و فاقد هاله انحلال / Having acid halo and lacking solubilization halo	11	15	47	45	45
دارای هاله انحلال (مجموع سویه‌های مثبت) / Having solubilization halo (total positive strains)	55	50	18	20	20
تفکیک کیفی سویه‌های دارای هاله / Qualitative differentiation of halo-producing strains (SI)					
کلاس D (ضعیف یا فاقد هاله[16]؛ SI < 1.5)	33	33	7	13	12
کلاس C (متوسط[17]؛ 1.5 ≤ SI < 2)	15	11	8	6	8
کلاس B (قوی[18]؛ 2 ≤ SI < 2.5)	3	3	3	0	0
کلاس A (بسیار قوی[19]؛ SI ≥ 2.5)	3	4	1	1	0

16 Weak or lacking halo
17 Moderate
18 Strong
19 Very strong

الگوهای فنوتیپی کلنی‌ها

نتایج این بخش به وضـــوح نشـــان‌دهنده پدیده «منفی کاذب» در محیط‌های ا ستاندارد ا ست. در حالی که درصـــد بالایی از ســـویه‌ها (حدود ۴۵ تا ۴۷ درصـــد) در محیط‌های کلاســـیک توانایی تولید اســـید را دارند، اما به دلیل محدودیت‌های تغذیه‌ای این محیط‌ها، نمی‌توانند هاله انحلال شـــفافی ایجاد کنند. در مقابل، محیط FKR این محدودیت را شکسته و توانسته مجموع سویه‌های مثبت (دارای هاله انحلال) را به ۵۰ الی ۵۵ درصد برساند. محیط حاوی شـناسـاگر (FKR-BCP) نیز به خوبی اثبات می‌کند که ۶۵ درصد از کل سویه‌های بررسی‌شده، دارای پتانسیل اســـیدزایی هســـتند که این ظرفیت در محیط‌های قدیمی پنهان می‌ماند.

تفکیک کیفی سویه‌های دارای هاله

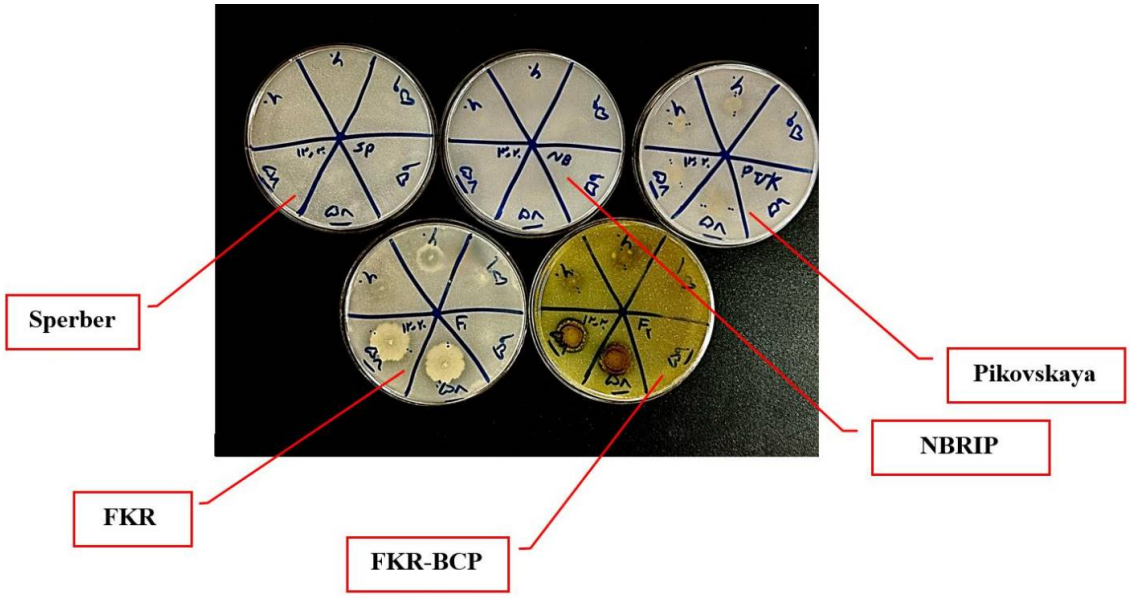
ین بخش برتری کیفی محیط جدید را ثابت می‌کند. محیط‌های استاندارد مانند NBRIP و PVK در شناسایی سویه‌های قدرتمند (کلاس A و B) کاملاً ناتوان بوده‌اند (صفر درصد). در حالی که محیط FKR توانسته است با فراهم کردن شرایط بهینه، پتانسیل واقعی این سویه‌های ارزشمند را که کاندیداهای اصلی برای تولید کود زیستی هستند، با دقت بالایی شناسایی و غربال کند.

نکته قابل توجه اینکه محیط NBRIP، با وجود شناخته‌شدن به عنوان محیطی بافر شده و نسبتاً دقیق برای مطالعات انحلال فسفات، در شناسایی هیچ‌یک از سویه‌های بسیار قوی (کلاس A) موفق نبود. این الگو نشان می‌دهد که فرمولاسیون‌های حداقلی استاندارد، به طور سیستماتیک پتانسیل واقعی برخی از سویه‌های با عملکرد بالا را دست‌کم می‌گیرند و قدرت تفکیک آن‌ها در انتخاب کاندیداهای برتر برای تولید کود زیستی محدود است.

بهبود وضوح و شفافیت هاله‌های انحلال

علاوه بر تفاوت‌های کمی، اختلافات کیفی بارزی نیز در ویژگی‌های بصری هاله‌های انحلال بین محیط‌ها مشاهده شد. هاله‌های تشکیل‌شده بر روی محیط FKR عموماً دارای لبه‌های واضح‌تر، شفافیت بیشتر و قطر بزرگ‌تر بودند؛ ویژگی‌هایی که اندازه‌گیری دقیق قطر هاله (HD) را تسهیل می‌کردند و خطای دیداری را کاهش می‌دادند. در مقابل، هاله‌های تشکیل‌شده بر روی محیط‌های استاندارد، به ویژه Pikovskaya، اغلب محو، کم‌رنگ و در مواردی همراه با رسوبات موضعی بودند که تشخیص دقیق مرز هاله را دشوار کرده و عدم قطعیت در اندازه‌گیری را افزایش می‌داد.

این بهبود در کیفیت بصری، تکرارپذیری اندازه‌گیری‌ها و قابلیت اعتماد به ارزیابی کیفی را در محیط FKR به طور محسوسی افزایش داد. نمونه‌ای از این تفاوت بصری برای یک سویه معرف در (شکل ۲) ارائه شده است.



شکل ۲- مقایسه بصری عملکرد سویه‌های *Bacillus* بر روی محیط کشت نوین FKR در مقایسه با محیط‌های استاندارد.
Figure 2. Visual comparison of the performance of Bacillus strains on the novel FKR culture medium compared to standard media.

ارزیابی روش نوین غربالگری سه‌بعدی (روش لوله‌ای نیمه‌جامد)

برتری سینتیک و وضوح بصری روش نوین (تشخیص فعالیت انحلال در کمتر از ۲۴ ساعت)

مهم‌ترین مزیت روش لوله‌ای نیمه‌جامد، کاهش قابل توجه زمان لازم برای تشخیص فعالیت انحلال بود. پایش روزانه نمونه‌ها نشان داد که در طی ۲۴ ساعت اولیه پس از تلقیح، بیش از ۷۵ درصد از سویه های دارای پتانسیل انحلال، فعالیت متابولیکی خود را به صورت ناحیه‌ای زردرنگ و کاملاً مشخص در محیط نیمه‌جامد FKR–BCP نشان دادند. در مقابل، در همین بازه زمانی، کمتر از ۵ درصد از سویه‌های مشابه روی محیط جامد FKR در پلیت، هاله شفاف قابل مشاهده و قابل اندازه‌گیری ایجاد کردند.

این اختلاف چشمگیر ($P\leq0.05$) نشان می‌دهد که تغییر از سطح دوبعدی به ماتریکس سه‌بعدی نیمه‌جامد، با افزایش سطح تماس، بهبود انتشار متابولیت‌ها و فراهم کردن ریزمحیط‌های منا سب‌تر، زمان لازم برای شنا سایی اولیه سویه‌های فعال را از چندین روز به کمتر از یک روز کاهش می‌دهد و کارایی فرآیند غربالگری را به طور معنی‌داری افزایش می‌بخشد.

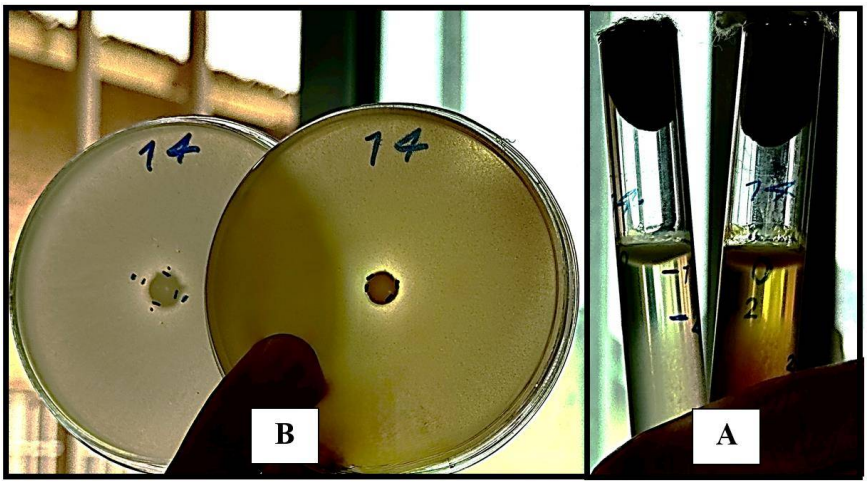
وضوح بالاتر در تفسیر نتایج: ناحیه زرد در مقابل هاله شفاف

علاوه بر سرعت، وضوح و قطعیت در تفسیر نتایج نیز در روش لوله‌ای به‌مراتب بالاتر بود. تغییر رنگ شدید و مشخص شناساگر BCP از بنفش به زرد، یک پاسخ تقریباً دوتایی و بدون ابهام (فعال/غیرفعال) برای تشخیص تولید اسید فراهم آورد. این نوع پاسخ، وابستگی به قضاوت چشمی اپراتور را کاهش داده و خطاهای ناشی از تفسیرهای متفاوت را به حداقل می‌رساند.

در مقابل، تشخیص و اندازه‌گیری هاله های شفاف در روش پلیت، به‌خصوص برای سویه‌های با فعالیت مرزی، اغلب با چالش‌هایی نظیر محو بودن لبه‌ها، تداخل با بافت کلنی و آرتیفکت های[۲۰] سطحی محیط همراه بود. این تفاوت، روش لوله‌ای نیمه‌جامد را به ابزاری

[۲۰] منظور ایرادات و خطاهای فیزیکی روی سطح همان ژل (محیط کشت) است. مثلاً حباب‌های ریز هوا، خراش‌های کوچک، سایه‌روشن‌ها یا توده‌های حل‌نشده‌ی پودر در کف ظرف، چشم شما را به اشتباه می‌اندازند و ممکن است آن‌ها را با هاله واقعی اشتباه بگیرید.

مناسب برای غربالگری سریع، دقیق و قابل اعتماد تعداد زیادی از سویه‌ها تبدیل می‌کند (شکل ۳).



شکل ۳- مقایسه وضوح نتایج پس از ۲۴ ساعت؛ (A) پاسخ سریع و واضح در روش لوله‌ای نیمه‌جامد با محیط‌های FKR و FKR–BCP، (B) هاله ضعیف در روش استاندارد پلیت برای همان سویه. (قطر پلیت‌ها: ۹۰ میلی‌متر، قطر لوله‌های آزمایش: ۱۳ میلی‌متر).

Figure 3. Comparison of result clarity after 24 hours; (A) Rapid and clear response in the semi-solid tube method with FKR and FKR-BCP media, (B) Weak halo in the standard plate method for the same strain. (Plate diameter: 90 mm, test tube diameter: 13 mm).

کمی‌سازی حجمی و ارز یابی عمودی فعالیت انحلال

شاخص‌های نوین برای کمی‌سازی سه‌بعدی (SD و SV)

نتایج نشان داد که سویه‌های برتر قادر به ایجاد عمق انحلال (SD) معنی‌دار تا بیش از ۴۰ میلی‌متر در طول دوره انکوباسیون بودند. بررسی دقیق‌تر داده‌ها حاکی از تنوع بالای سویه‌ها در میزان نفوذ عمقی است؛ به‌طوری‌که در برخی سویه‌های با کارایی پایین، عمق انحلال به کمتر از ۱۰ میلی‌متر محدود می شد، درحالی‌که سویه‌های بسیار فعالی مانند FKR-S94 و FKR-S2 توانستند تقریباً در تمام طول ستون محیط کشت نفوذ کرده و به‌ترتیب عمق انحلالی در حدود ۱۰۷ و ۹۸ میلی‌متر را ثبت کنند. این دامنه گسترده از تغییراتِ عمق، مستقیماً در شاخص حجم انحلال (SV) نیز بازتاب یافت و مقادیر متنوعی از چند صد میلی‌متر مکعب تا بیش از ۱۰۰۰۰ میلی‌متر مکعب)برای سویه (FKR-S94 را رقم زد. این تنوعِ نتایج نشان‌دهنده قدرت بالای روش سه‌بعدی در تفکیک و کمی‌سازی دقیق پتانسیل حل‌کنندگی باکتری‌هاست.

مقایسه رتبه‌بندی سویه‌ها بر ا ساس شاخص‌های دوبعدی (SI) و سه‌بعدی (SV)

مقایسه رتبه‌بندی سویه‌ها بر اساس شاخص دوبعدی SI (حا صل از روش پلیت) و شاخص سه‌بعدی SV (حاصل از روش لوله‌ای) نشان داد که تصویر ما از برترین سویه‌ها به شدت وابسته به نوع سیستم ارزیابی است. همان‌گونه که در (جدول ۵) برای ۱۰ سویه برتر مجموعه نمایش داده شده ا ست، در حدود ۱۵ در صد از موارد، رتبه‌بندی سویه‌ها بین دو روش به طور محسوس تغییر کرده است.

به عنوان مثال، برخی سویه‌ها با SI نسبتاً بالا در روش پلیت، در سیستم سه‌بعدی حجم انحلال پایینی داشتند و در رتبه های پایین‌تر قرار گرفتند؛ در مقابل، سویه‌ای که در روش پلیت در رتبه هفتم قرار داشت، با توجه به الگوی رشد نفوذی و کارآمد خود در ماتریکس نیمه‌جامد، حجم انحلال بسیار بالایی ثبت کرده و به رتبه دوم بر ا ساس SV صعود کرد. این تغییرات نشان می‌دهد

که روش دوبعدی ممکن است پتانسیل واقعی بخشی از سویه‌ها را به‌ویژه آن‌هایی که در عمق محیط فعال‌تر هستند، دست‌کم بگیرد؛ در حالی‌که روش سه‌بعدی با ارائه شاخص حجمی، ابزار دقیق‌تر و واقع‌بینانه‌تری برای انتخاب کاندیداهای برتر جهت مراحل بعدی، از جمله آزمون‌های گلخانه‌ای، فراهم می‌آورد.

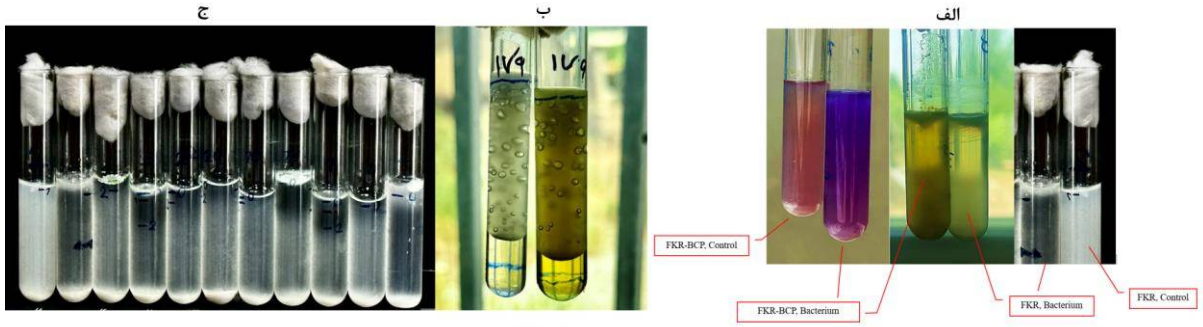
جدول ۵- مقایسه رتبه‌بندی ۱۰ سویه برتر بر اساس شاخص انحلال دوبعدی (SI) از روش پلیت و حجم انحلال سه‌بعدی (SV) در روش لوله‌ای نیمه‌جامد، در بین تمامی سویه‌های غربال‌شده.

Table 5. Comparison of the ranking of the top 10 strains based on the two-dimensional solubilization index (SI) from the plate method and the three-dimensional solubilization volume (SV) in the semi-solid tube method, among all screened strains.

Rank based on SV / رتبه بر اساس	SV (mm^3)	Rank based on SI / رتبه بر اساس	SI	Top / کد سویه برتر strain code
61	2031	1	3.50	FKR-S10
3	9361	2	2.84	FKR-S2
50	2384	3	2.66	FKR-S12
41	3797	4	2.50	FKR-S3
47	2914	5	2.50	FKR-S1
58	2120	6	2.50	FKR-S19
62	1943	7	2.50	FKR-S20
1	10244	8	2.47	FKR-S94
78	1236	9	2.45	FKR-S148
48	2650	10	2.43	FKR-S107

شبیه‌سازی شرایط ریزوسفر و کشف پدیده‌های متابولیکی جدید

یکی از مهم‌ترین یافته‌های سیستم سه‌بعدی لوله‌ای، آشکارسازی تنوع چشمگیر در فعالیت‌های متابولیکی و اکوفیزیولوژیک سویه‌ها بود. در این ارزیابی، ۶ سویه (حدود ۳/۸ درصد) با تغییر رنگ شناساگر BCP به بنفش تیره، سازوکار انحلال غیراسیدی (قلیایی‌کننده) را نشان دادند. علاوه بر این، در حدود ۷ درصد از سویه‌های فعال، تولید گاز به صورت حباب‌های ریز در امتداد مسیر رشد مشاهده شد که بیانگر استفاده از مسیرهای متابولیکی بی‌هوازی یا تخمیری در عمق محیط است (Vessey, 2003; Kuzyakov & Blagodatskaya, 2015). همچنین، حدود ۲ درصد از سویه‌ها توانایی مایع‌سازی ماتریکس نیمه جامد را بروز دادند. از سوی دیگر، ایجاد طبیعی گرادیان اکسیژن در ستون نیمه‌جامد منجر به شکل‌گیری سه الگوی رشد متمایز (سطحی، عمودی پیوسته و لایه‌ای) شد که نشان‌دهنده ترجیحات تنفسی متفاوت سویه‌ها در شرایط ریزوسفری است. تمامی این پدیده‌های متابولیکی و الگوهای رشد در (شکل ۴) خلاصه شده‌اند.



شکل ۴- پدیده‌های متابولیکی و الگوهای رشد در محیط سه‌بعدی نیمه‌جامد؛ الف) تنوع پاسخ pH شامل تولید اسید (ناحیه زرد) و سازوکار قلیایی‌کننده (هاله بنفش)، ب) فعالیت‌های متابولیکی ثانویه نظیر تولید گاز و مایع‌سازی ماتریکس، ج) الگوهای متنوع رشد و نفوذ در امتداد گرادیان اکسیژن.

Figure 4. Metabolic phenomena and growth patterns in the semi-solid three-dimensional medium; a) Diversity of pH response including acid production (yellow zone) and alkalinizing mechanism (purple halo), b) Secondary metabolic activities such as gas production and matrix liquefaction, c) Diverse growth and penetration patterns along the oxygen gradient.

بحث

برتری فرمولاسیون FKR در غربالگری PSB

نتایج این مطالعه نشان داد که فرمولاسیون FKR عملکردی به‌مراتب کارآمدتر از محیط‌های استاندارد رایج (Pikovskaya, NBRIP, Sperber) در شناسایی باکتری‌های حل‌کننده فسفات دارد. افزایش چشمگیر درصد سویه‌های مثبت در FKR، همراه با کاهش قابل توجه منفی های کاذب، نشان می‌دهد که ترکیب تغذیه‌ای و فیزیکوشیمیایی این محیط با نیازهای تغذیه‌ای و الگوی رشد باکتری‌های گرم‌مثبت ریزوسفری، به‌ویژه جنس *Bacillus*، سازگاری بیشتری دارد. در مطالعه پیشین ما نیز فرمولاسیون FKR توانست کارایی شناسایی PSB را به طور معنی‌داری نسبت به محیط های حداقلی متداول افزایش داده و طیفی از سویه‌های $Acid^{+}/Halo^{-}$ را آشکار کند که در محیط‌های کلاسیک به عنوان منفی کاذب گزارش می‌شوند (Reisi et al., 2025). داده‌های حاضر این یافته را تأیید کرده و نشان می‌دهند که بخش مهمی از ظرفیت واقعی سویه‌ها تنها زمانی بروز می‌کند که محیط کشت، محدودیت های تغذیه‌ای و تنشی غیرواقع‌بینانه‌ی محیط‌های حداقلی را بر آن‌ها تحمیل نکند. محیط‌های کلاسیک نظیر NBRIP فاقد منابع غنی نیتروژن آلی (پپتون) و فاکتورهای رشد هستند؛ کمبودی که به اثبات رسیده است باعث خاموشی مسیرهای متابولیک تولید اسیدهای آلی در باکتری‌های پرنیازتر نظیر *Bacillus*ها می شود (Sharma et al., 2023; Zhang et al., 2024). محیط FKR با جبران این محدودیت، به عنوان یک بستر محرک عمل می‌کند.

این نتیجه با گزارش‌های متعددی هم‌خوان است که نشان می‌دهند فرمولاسیون و شرایط کشت، به‌ویژه نوع منبع کربن و فسفر، حضور عناصر کم‌مصرف، pH اولیه و بافرها، نقش تعیین‌کننده‌ای در بیان پتانسیل حل‌کنندگی فسفات و تولید اسیدهای آلی دارند (Illmer & Schinner, 1995; Nautiyal, 1999; Chen et al., 2006). در واقع، آنچه در بسیاری از مطالعات به عنوان "فاقد توان حل‌کنندگی" گزارش می‌شود، در مواردی ممکن است صرفاً بازتاب یک طراحی محیطی ناکافی با شد نه ضعف ذاتی سویه. محیط طبیعی خاک در مجاورت ریشه (ریزوسفر)، به دلیل حضور مداوم ترشحات ریشه‌ای، سرشار از قندها، اسیدهای آمینه و ویتامین‌ها ست. غنای تغذیه‌ای اعمال شده در محیط FKR (نظیر حضور عصاره مخمر و پپتون) در واقع شبیه‌سازی همین ریزمحیط غنی است. در غیاب این پیش‌سازها در محیط‌های استاندارد، باکتری دچار سوءتغذیه شده و ژن‌های مسیر اسیدزایی آن خاموش می‌ماند که منجر به بروز "منفی کاذب آزمایشگاهی" می‌گردد. از این منظر، FKR را می‌توان نه

تنها یک محیط شناسایی، بلکه یک پلتفرم بیان پتانسیل دانست که به سویه‌ها فرصت می‌دهد توان واقعی خود را در شرایطی نزدیک‌تر به وضعیت ریزوسفری بروز دهند. این مسئله در خاک‌های آهکی و قلیایی ایران که با بافر کربناتی شدید و دسترسی پایین فسفر همراه‌اند، اهمیت مضاعف پیدا می‌کند؛ زیرا در چنین خاک‌هایی، محیط‌های حداقلی کلاسیک حتی اگر از نظر شیمیایی پاسخ دهند، الزاماً رفتار واقعی سویه را در شرایط مزرعه بازتاب نمی‌دهند (Hinsinger, 2001; Alori et al., 2017).

تفکیک کیفی، وضوح بصری و کاهش منفی‌های کاذب

یکی از نقاط قوت کلیدی FKR در این پژوهش، توان تفکیک کیفی و وضوح بصری بالاتر نسبت به محیط‌های مقایسه‌ای بود. این محیط، علاوه بر افزایش تعداد سویه‌های مثبت، امکان طبقه‌بندی آن‌ها را در کلاس‌های کیفی مختلف (A–D) بر اساس شاخص انحلال دوبعدی (SI) فراهم کرد و تعداد سویه‌های بسیار قوی (کلاس A) را به طور معنی‌داری نسبت به محیط‌های استاندارد افزایش داد. به‌خصوص، شناسایی چندین سویه کلاس A در حالی که برخی محیط‌های مرجع هیچ سویه‌ای در این کلاس آشکار نکردند، نشان می‌دهد که حساسیت FKR نه صرفاً کمی، بلکه کیفی نیز بالاتر است. این موضوع از دیدگاه غربالگری صنعتی و توسعه کودهای زیستی اهمیت دارد، زیرا تمرکز غالباً بر انتخاب «برترین» سویه‌ها است و از دست رفتن حتی درصد کمی از سویه‌های کلاس A می‌تواند پیامدهای عملی قابل توجهی داشته باشد.

از سوی دیگر، وضوح هاله‌های انحلال در FKR از نظر شفافیت، کنتراست و مرزبندی — دقت و تکرارپذیری اندازه‌گیری SI را بهبود بخشید و وابستگی به قضاوت شخصی مشاهده‌گر را کاهش داد. این مسئله در مطالعه حاضر با کاهش در صد منفی‌های کاذب نسبت به محیط‌های استاندارد همراه بود و نشان داد که بخشی از منفی‌های کاذب گزارش‌شده در ادبیات می‌تواند ناشی از هاله‌های مبهم و تفسیرپذیر در پلیت‌های کلاسیک باشد (Rao et al., 1999; Collavino et al., 2010). در عین حال، مشاهده سویه‌های $Acid^{+}/Halo^{-}$ در FKR، که در محیط‌های دیگر فاقد هاله قابل قبول بودند، تأکیدی است بر این‌که اتکای صرف به حضور هاله شفاف سطحی می‌تواند منجر به حذف سیستماتیک گروهی از سویه‌های بالقوه ارزشمند شود.

مزایای روش سه‌بعدی نیمه‌جامد (روش لوله‌ای) تسریع فرآیند غربالگری

پلتفرم سه‌بعدی مبتنی بر محیط نیمه جامد لوله‌ای، نسبت به روش کلاسیک پلیت (محیط جامد)، توانست زمان موردنیاز برای شناسایی سویه‌های فعال را به طور چشمگیری کاهش دهد. بیش از سه‌چهارم سویه‌های مثبت در این روش در کمتر از ۲۴ ساعت شناسایی شدند، در حالی که در روش پلیت، تشخیص قابل اعتماد به چند روز انکوباسیون نیاز داشت. این تسریع، هم برای مطالعه فرآیندهای متابولیکی و هم برای برنامه‌های غربالگری انبوه[21] اهمیت دارد و می‌تواند هزینه و زمان توسعه فرمولاسیون‌های جدید کود زیستی را به طور محسوسی کاهش دهد. از آنجا که بسیاری از ژن‌های مرتبط با حل‌کنندگی فسفات در فاز رشد فعال و اوایل ورود به فاز سکون بیشترین بیان را دارند، امکان رصد زودهنگام آن‌ها در روش سه‌بعدی می‌تواند تصویر پویاتری از پاسخ میکروبی ارائه دهد (Kim et al., 1997; Rodríguez & Fraga, 1999).

[21] High throughput

وضوح پاسخ و تفکیک متابولیک

استفاده از نشانگر pH (BCP) در محیط نیمه‌جامد، یک پاسخ رنگی دوتایی و بسیار واضح (زرد برای اسیدی شدن، بنفش برای قلیایی شدن) ایجاد کرد که نسبت به هاله‌های گاهی مبهم پلیت، از نظر تشخیصی مزیت کاملاً قابل ملاحظه‌ای دارد. این پاسخ نه‌تنها تمایز سویه‌های اسیدزا و غیر اسیدزا را ساده می‌کند، بلکه امکان شناسایی سریع سویه‌های دارای مکانیسم‌های غیر اسیدی (از جمله قلیایی‌کننده‌ها) را نیز فراهم می سازد؛ گروهی که در بسیاری از روش های سنتی به‌کلی نادیده گرفته می شوند (Sharma et al., 2013). علاوه بر این، مشاهده تولید گاز و مایع‌شدن محیط در بخشی از سویه‌ها، نشان‌دهنده قابلیت این سامانه برای ثبت هم‌زمان چندین فعالیت متابولیک مرتبط با چرخه کربن و فسفر است، که می‌تواند در طراحی کنسرسیوم‌های چندکارکردی مورد استفاده قرار گیرد.

کمی‌سازی حجمی و بازآرایی رتبه‌بندی سویه‌ها

یکی از نوآوری‌های کلیدی این پژوهش، معرفی شاخص‌های عمق انحلال (SD) و حجم انحلال (SV) به عنوان مکمل SI دوبعدی بود. در حالی که SI تنها بُعد سطحی و شعاعی هاله یا ناحیه تغییر رنگ را لحاظ می‌کند، SD و SV امکان ارزیابی توزیع عمقی و سه‌بعدی متابولیت‌ها را فراهم آوردند. نتایج نشان داد که رتبه‌بندی ۱۰ سویه برتر بر اساس SV به طور معنی‌داری با رتبه‌بندی مبتنی بر SI تفاوت داشت و برخی سویه‌ها که در سامانه دوبعدی در رده های میانی قرار می‌گرفتند، در ارزیابی حجمی به رتبه‌های بالاتر صعود کردند. این پدیده نشان می‌دهد که الگوی فضایی انتشار اسیدها و سایر عوامل حل‌کننده، لزوماً با اندازه هاله سطحی همبستگی خطی ندارد و سویه‌هایی وجود دارند که به‌جای گسترش شعاعی وسیع، نفوذ عمقی و کارآمدتری دارند.

از منظر اکوفیزیولوژیک، این تفاوت می تواند بازتاب استراتژی‌های مختلف سازگاری با شرایط ریزوسفری باشد؛ در محیط واقعی خاک، ریشه‌ها و لنزهای ذرات فسفات غالباً در عمق‌های متفاوت و منافذ محدود قرار دارند، و نفوذ عمقی مؤثرتر از گسترش سطحی صرف می‌تواند مزیت عملکردی ایجاد کند (Hinsinger, 2001; Kuzyakov & Blagodatskaya, 2015). بنابراین، ترکیب SI با SV و SD می‌تواند ابزار دقیق‌تری برای انتخاب سویه‌هایی فراهم کند که در شرایط مزرعه، خصوصاً در خاک‌های آهکی و لایه‌دار، کارایی بالاتری دارند، حتی اگر در آزمون‌های صرفاً دوبعدی چندان برجسته به نظر نرسند. اگرچه سنجش کمی فسفر محلول در محیط مایع همواره به عنوان استاندارد نهایی برای ارزیابی سویه‌های منتخب ضروری است، اما اجرای آن برای جوامع آماری بزرگ (نظیر غربالگری اولیه صدها سویه) بسیار زمان‌بر و پرهزینه است. سامانه سه‌بعدی با ارائه شاخص SV، به عنوان یک حلقه واسط و فیلتر اولیه قدرتمند عمل می‌کند تا پژوهشگران تنها برترین کاندیداها را برای آزمون‌های کمی محیط مایع و ارزیابی‌های گلخانه‌ای انتخاب نمایند.

کشف سازوکارهای نوین و الگوهای رشد اکوفیزیولوژیک

یکی از یافته‌های برجسته این مطالعه، شناسایی گروه کوچکی از سویه‌ها با واکنش قلیایی‌کننده بود که در محیط FKR-BCP با ایجاد نواحی بنفش مشخص شدند. مکانیسم‌های احتمالی در این گروه می‌تواند شامل تولید فسفاتازهای قلیایی، ترشح لیگاندها و کلات‌کننده‌های آلی یا معدنی، و نیز مبادله یونی همراه با آزادسازی آلومینیوم/آهن از فاز جامد باشد (Jones, 1998; Richardson et al., 2009). مشاهده تولید گاز و مایع‌شدن محیط در درصدی از سویه‌ها حاکی از آن است که بخش قابل توجهی از PSB های شناسایی‌شده در این مطالعه، علاوه بر حل‌کنندگی فسفات، از نظر فعالیت‌های متابولیکی دیگر نیز پویا هستند. تولید گاز می‌تواند نشانه برخی مسیرهای تخمیری، دنیتریفیکاسیون جزئی، یا تجزیه ترکیبات آلی پیچیده باشد، در حالی که مایع‌شدن محیط

نشانه تولید آنزیم‌ها و اگزولاکتیات‌ها یا پلی‌ساکاریدهای خارج‌سلولی ویژه است که ساختار ژل مانند محیط را تغییر می‌دهد. بستر نیمه‌جامد لوله‌ای با ایجاد گرادیان اکسیژن، pH و مواد غذایی در طول عمق ستون، شرایطی نزدیک‌تر به ریزوسفر واقعی را شبیه‌سازی می‌کند. در این محیط، الگوهای متنوعی از رشد (از جمله الگوهای سطحی، عمودی، لایه‌ای و تجمع در عمق‌های خاص، مشاهده شد که می‌توانند بازتاب استراتژی‌های متفاوت سازگاری میکروارگانیسم‌ها با میکروزیستگاه‌های ریزوسفری باشند

پیامدها، محدودیت‌ها و چشم‌اندازهای آینده

از منظر کاربردی، ترکیب محیط FKR و پلتفرم سه‌بعدی معرفی‌شده در این مطالعه، یک سامانه غربالگری قدرتمند برای شناسایی و انتخاب باکتری‌های حل‌کننده فسفات در خاک‌های آهکی و قلیایی فراهم می‌آورد. شناسایی سویه‌های بسیار قوی (کلاس A)، سویه‌های با الگوی نفوذ عمقی بالا (SV برتر)، و نیز سویه‌های قلیایی‌کننده با مکانیسم‌های غیراسیدی، مجموعه‌ای از کاندیداهای ارزشمند را برای توسعه فرمولاسیون‌های کود زیستی فسفاته، به‌ویژه برای خاک‌های ایران، در اختیار قرار می‌دهد. افزون بر این، قابلیت سامانه در آشکارسازی فعالیت‌های متابولیکی ثانویه و الگوهای رشد متنوع، امکان طراحی کنسرسیوم‌های چندکارکردی را فراهم می‌کند که می‌توانند هم‌زمان بر چرخه‌های فسفر، کربن و ساختار خاک تأثیر بگذارند.

با این حال، چند محدودیت مهم باید مدنظر قرار گیرد. نخست آن‌که این مطالعه در مقیاس آزمایشگاهی و در شرایط کنترل شده انجام شد و انتقال نتایج به سطح مزرعه ضروری است. کارایی واقعی سویه‌ها و کنسرسیوم‌های پیشنهادی در خاک طبیعی، تحت تأثیر عوامل متعددی چون رطوبت، دما، ترکیب جامعه میکروبی بومی، ریشه و ترشحات گیاه قرار می‌گیرد و بدون آزمایش‌های مزرعه‌ای چندمکانی و چندفصلی، نمی‌توان در مورد پایداری و اثرگذاری آن‌ها قضاوت قطعی کرد (Vessey, 2003; Alori et al., 2017). دوم آن‌که این مطالعه عمدتاً بر شاخص‌های فنوتیپی (SI, SD, SV و پاسخ رنگی) متکی بود و اطلاعات مولکولی در مورد ژن‌ها و مسیرهای دخیل در حل‌کنندگی فسفات در دسترس نیست؛ بنابراین، ادغام این پلتفرم با روش‌های ژنومیک، ترنسکریپتومیک و متابولومیک می‌تواند در آینده، تصویر بسیار دقیق‌تری از مکانیسم‌های دخیل و پتانسیل سازگاری بلندمدت این سویه‌ها ارائه دهد.

سوم آن‌که، اگرچه استفاده از شناساگر رنگی (BCP) در محیط نیمه‌جامد سرعت غربالگری و تشخیص تولید اسید را به شدت افزایش می‌دهد، اما باید توجه داشت که تری‌کلسیم فسفات (TCP) دارای خاصیت بافری بالایی است. در بسیاری از موارد، پروتون‌های تولیدشده توسط باکتری مستقیماً صرف شکستن پیوندهای TCP و رها سازی فسفات می شوند و در نتیجه، افت pH در محیط به حدی نمی‌رسد که تغییر رنگ ملموسی ایجاد نماید. افزون بر این، برخی باکتری‌ها از طریق مکانیسم‌های کاملاً غیراسیدی (نظیر ترشح کلات‌کننده‌های قوی مانند سیدروفورها) اقدام به کیلیت نمودن کاتیون کلسیم و انحلال فسفات می‌کنند که فاقد تغییرات اسیدی است. بنابراین، اتکای انحصاری به تغییر رنگ می‌تواند منجر به از دست رفتن بخشی از جدایه‌های توانمند (منفی کاذب رنگی) شود. به همین دلیل، همان‌گونه که پیش‌تر اشاره شد، سامانه FKR-BCP صرفاً یک فیلتر اولیه با توان عملیاتی بالا [۲۲] برای انتخاب کاندیداهای مستعد است و اندازه‌گیری کمی غلظت فسفر آزادشده در محیط مایع [۲۳] برای تأیید نهایی قدرت انحلال این سویه‌ها، یک ضرورت روش‌شناسی و غیرقابل‌انکار به شمار می‌رود.

[22] High-throughput screening

[23] Broth assay

نتیجه‌گیری

این پژوهش نشـــان داد که ترکیب محیط جدید FKR با یک روش سه‌بعدی نیمه‌جامد می‌تواند کاستی‌های روش‌های سـنتی غربالگری باکتری‌های حل‌کننده فسـفات را تا حد زیادی برطرف کند. محیط FKR، در مقایســـه با محیط‌های رایج، تعداد بیشـتری از سـویه‌های *باسـیلوس* حل‌کننده فسفات را شناسایی کرد، منفی کاذب را کاهش داد و تفکیک دقیق‌تری از کلاس‌های عملکردی ســـویه‌ها ارائه داد. رویکرد ســـه‌بعدی لوله‌ای با امکان اندازه‌گیری شـــاخص‌های حجمی (SD و SV)، نســـبت به هاله‌های دوبعدی محیط‌های جامد، تصویر واقع‌بینانه‌تری از کارایی انحلال فسـفات فراهم سـاخت و نشـان داد که رتبه‌بندی ســـویه‌ها در ارزیابی دوبعدی می‌تواند گمراه‌کننده باشـــد. مشـاهده سـویه‌های قلیایی‌کننده و الگوهای متنوع رشـد، وجود مکانیســـم‌های انحلال غیراســـیدی و تفاوت‌های اکوفیزیولوژیک مهم میان ســـویه‌ها را آشـــکار کرد؛ ویژگی‌هایی که در آزمون‌های پلیت معمولاً نادیده می‌مانند. به طور کلی، روش ســـه‌بعدی مبتنی بر FKR با افزایش سرعت، دقت و عمق ارزیابی، بستر مناسبی برای انتخاب هدفمند ســـویه‌های کارآمد و پایدار جهت تولید کودهای زیســـتی به‌ویژه برای خاک‌های آهکی و قلیایی فراهم می‌کند. با این حال، تأیید میدانی عملکرد ســـویه‌های منتخب و تکمیل داده‌ها با تحلیل‌های مولکولی و ابزارهای پیشـــرفته (امثال تصـــویربرداری و میکروفلوئیدیک) برای بهره‌برداری کامل از ظرفیت این روش ضروری است.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی و تجهیزاتی موسسه تحقیقات خاک و آب کشـور (SWRI) انجام شـده اسـت. نویسندگان از همکاری صمیمانه پرسنل آزمایشگاهی این مجموعه‌ها کمال تشکر را دارند.

ملاحظات اخلاقی و شفافیت در پژوهش

تعارض منافع

نویسندگان صراحتاً اعلام می‌دارند که در رابطه با انتشار این مقاله، هیچ‌گونه تعارض منافع مالی، شخصی یا حرفه‌ای که بتواند بر روند پژوهش، تحلیل داده‌ها و تفسیر نتایج تأثیرگذار باشد، وجود ندارد.

بیانیه مشارکت نویسندگان

ش. رئیسی: انجام آزمایش‌ها، گردآوری و تحلیل داده‌ها و نگارش پیش‌نویس اصـــلی. ح. ع. علیخانی: مفهوم‌سازی، نظارت و اعتبارسنجی. ع. فلاح نصرت‌آباد: مفهوم‌سازی، روش‌شناسی، تأمین منابع، نظارت، بازبینی و ویرایش نهایی. ب. خوشـــرو: مفهوم‌ســـازی، نظارت، روش‌شـــناســـی، اعتبارســـنجی، تحلیل آماری، بازبینی و ویرایش نهایی. ا. ع. پوربابائی: اعتبارسنجی.
تمامی نویسندگان نسخه نهایی مقاله را مطالعه نموده و با چاپ آن موافقت کرده‌اند.

بیانیه دسترسی به داده‌ها

داده‌های خام و مجموعه‌داده‌های پشـــتیبان نتایج این پژوهش، در صـــورت درخواســـت معقول و منطقی، توسط نویسندگان مسئول در دسترس سایر پژوهشگران قرار خواهد گرفت.

References

1. Alewell, C., Ringeval, B., Ballabio, C., Robinson, D.A., Panagos, P. and Borrelli, P., 2020. Global phosphorus shortage will be aggravated by soil erosion. *Nature Communications*, 11, pp.4546. DOI: https://doi.org/10.1038/s41467-020-18326-7
2. Alori, E.T., Glick, B.R. and Babalola, O.O., 2017. Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture. *Frontiers in Microbiology*, 8, pp.971. DOI: https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00971
3. Atlas, R.M., 2010. *Handbook of Microbiological Media*. 4th ed. CRC Press.
4. Bakker, P.A.H.M., Berendsen, R.L., Doornbos, R.F., Wintermans, P.C.A. and Pieterse, C.M.J., 2020. The rhizosphere revisited: Root microbiomics. *Frontiers in Plant Science*, 11, pp.581. DOI: https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00165
5. Bargaz, A., Lyamlouli, K., Chtouki, M., Zeroual, Y. and Dhiba, D., 2018. Soil microbial resources for improving fertilizers efficiency in an integrated plant nutrient management system. *Frontiers in Microbiology*, 9, pp.1606. DOI: https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01606
6. Bashan, Y., Kamnev, A.A. and de-Bashan, L.E., 2013. Tricalcium phosphate is inappropriate as a universal selection factor for isolating and testing phosphate-solubilizing bacteria. *Biology and Fertility of Soils*, 49, pp.465-479. DOI: https://doi.org/10.1007/s00374-012-0737-7
7. Behera, B.C., Singdevsachan, S.K., Mishra, R.R., Dutta, S.K. and Thatoi, H., 2017. Diversity, mechanism and biotechnology of phosphate solubilising microorganism in mangrove—a review. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 8, pp.130-141. DOI: https://doi.org/10.1016/j.bcab.2013.09.008
8. Berg, H.C., Brown, D.A. and Turner, L., 2002. Chemotaxis in Escherichia coli analysed by three-dimensional tracking. *Nature*, 239, pp.500-504. DOI: https://doi.org/10.1038/239500a0
9. Castanheira, N.L., Dourado, M.N., Pais, I. and Moreira, H., 2021. Microbial-based bioproducts as a sustainable approach to improve phosphorus availability in agricultural soils. *Journal of Environmental Management*, 287, pp.112322. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.112322
10. Chen, Y.P., Rekha, P.D., Arunshen, A.B., Lai, W.A. and Young, C.C., 2006. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Applied Soil Ecology*, 34, pp.33-41. DOI: https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2005.12.002
11. Collavino, M.M., Sansberro, P.A., Mroginski, L.A. and Aguilar, O.M., 2010. Comparison of in vitro phosphate-solubilizing activity and phosphorus uptake by soybean plants inoculated with efficient and inefficient phosphate-solubilizing bacteria. *Biology and Fertility of Soils*, 46, pp.427-438. DOI: https://doi.org/10.1007/s00374-010-0480-x
12. Crank, J., 1975. *The Mathematics of Diffusion*. 2nd ed. Oxford University Press.
13. Edi-Premono, M., Moawad, A.M. and Vleck, P.L.G., 1996. Effect of phosphate solubilizing Pseudomonas putida on the growth of maize and its survival in the rhizosphere. Indonesian Journal of Crop Science, 11, pp.13-23.
14. Glick, B.R., 2012. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica*, 2012, pp.963401. DOI: https://doi.org/10.6064/2012/963401
15. Gupta, G., Parihar, S.S., Ahirwar, N.K., Snehi, S.K. and Singh, V., 2015. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): current and future prospects for development of sustainable agriculture. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*, 7(2), pp.96-102. DOI: https://doi.org/10.4172/1948-5948.1000187
16. Hinsinger, P., 2001. Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. *Plant and Soil*, 237, pp.173-195. DOI: https://doi.org/10.1023/A:1013351617532
17. Hinsinger, P., Bengough, A.G., Vetterlein, D. and Young, I.M., 2009. Rhizosphere: biophysics, biogeochemistry and ecological relevance. *Plant and Soil*, 321, pp.117-152. DOI: https://doi.org/10.1007/s11104-008-9797-1
18. Hinsinger, P., Herrmann, L., Lesueur, D., Robin, A., Trap, J., Waithaisong, K. and Plassard, C., 2011. Impact of roots, microorganisms and microfauna on the fate of soil phosphorus in the rhizosphere. In: Bünemann, E.K., Oberson, A. and Frossard, E. (eds.) *Phosphorus in Action*. Springer, pp.177-199.
19. Illmer, P. and Schinner, F., 1995. Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soils. *Soil Biology & Biochemistry*, 27, pp.257-263. DOI: https://doi.org/10.1016/0038-0717(94)00190-C
20. Jones, D.L., 1998. Organic acids in the rhizosphere—a critical review. *Plant and Soil*, 205, pp.25-44. DOI: https://doi.org/10.1023/A:1004356007312
21. Khoshru, B., Fallah Nosratabad, A., Mitra, D., Chaithra, M., et al., 2023. Rock phosphate solubilizing potential of soil microorganisms: Advances in sustainable crop production. *Bacteria*, 2(2), pp.98-115. DOI: https://doi.org/10.3390/bacteria2020008
22. Khoshru, B., Mitra, D., Khoshmanzar, E., Myo, E. M., Uniyal, N., Mahakur, B., et al., 2020.

Current scenario and future prospects of plant growth-promoting rhizobacteria: An economic valuable resource for the agriculture revival under stressful conditions. *Journal of Plant Nutrition*, 43(20), pp.3062-3092. DOI: https://doi.org/10.1080/01904167.2020.1799004

23. Khosravi, H., Khoshru, B., Fallah Nosratabad, A., and Mitra, D., 2024. Exploring the landscape of biofertilizers containing plant growth-promoting rhizobacteria in Iran: Progress and research prospects. *Current Research in Microbial Sciences*, 7, pp.100268. DOI: https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2024.100268
24. Kim, K.Y., Jordan, D. and McDonald, G.A., 1997. Solubilization of hydroxyapatite by Enterobacter agglomerans and cloned Escherichia coli in culture medium. *Biology and Fertility of Soils*, 24, pp.347-352. DOI: https://doi.org/10.1007/s003740050256
25. Kuzyakov, Y. and Blagodatskaya, E., 2015. Microbial hotspots and hot moments in soil: Concept & review. *Soil Biology & Biochemistry*, 83, pp.184-199. DOI: https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.01.014
26. Malusá, E. and Vassilev, N., 2014. A contribution to set a legal framework for biofertilisers. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, pp.6599-6607. DOI: https://doi.org/10.1007/s00253-014-5828-y
27. Malusá, E., Sas-Paszt, L. and Ciesielska, J., 2016. Technologies for beneficial microorganisms inocula used as biofertilizers. *The Scientific World Journal*, 2016, pp.1-12. DOI: https://doi.org/10.1155/2016/4910412
28. Mendes, G.O., Freitas, A.L.M., Pereira, O.L., da Silva, I.R. and Vassilev, N.B., 2021. Biochar enhances Aspergillus niger rock phosphate solubilization by increasing organic acid production and alleviating fluoride toxicity. *Applied Soil Ecology*, 158, pp.103809. DOI: https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2020.103809
29. Mendes, R., Garbeva, P. and Raaijmakers, J.M., 2014. The rhizosphere microbiome: Significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews*, 37, pp.634-663. DOI: https://doi.org/10.1111/1574-6976.12028
30. Menezes-Blackburn, D., Giles, C., Darch, T., George, T.S., Blackwell, M., Stutter, M., Shand, C., Lumsdon, D., Cooper, P., Wendler, R., Brown, L., Almeida, D.S., Wearing, C., Mezeli, M.M. and Haygarth, P.M., 2018. Opportunities for mobilizing recalcitrant phosphorus forms in soil as a fertilizer resource. *Frontiers in Earth Science*, 6, pp.140. DOI: https://doi.org/10.3389/feart.2018.00140
31. Nannipieri, P., Giagnoni, L., Landi, L. and Renella, G., 2011. Role of phosphatase enzymes in soil. In: Bünemann, E.K., Oberson, A. and Frossard, E. (eds.) *Phosphorus in Action*. Springer, pp.215-243.
32. Nautiyal, C.S., 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 170, pp.265-270. DOI: https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13383.x
33. Pande, A., Pandey, P., Mehra, S., Singh, M. and Kaushik, S., 2017. Phosphate solubilizing bacteria: Mechanisms and their role in phosphate solubilization and uptake. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 17, pp.1128-1147. DOI: https://doi.org/10.4067/S0718-95162017000400004XX
34. Pereira, S.I.A. and Castro, P.M.L., 2014. Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance Zea mays growth in agricultural P-deficient soils. *Ecological Engineering*, 73, pp.526-535. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2014.09.060
35. Pikovskaya, R.I., 1948. Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species. *Mikrobiologiya*, 17, pp.362-370.
36. Rao, N.S.S., 1999. *Soil Microorganisms and Plant Growth*. 2nd ed. Oxford & IBH Publishing.
37. Rawat, P., Das, S., Shankhdhar, D. and Shankhdhar, S.C., 2021. Phosphate-solubilizing microorganisms: mechanism and their role in phosphate solubilization and uptake. In: Rakshit, A., Singh, H.B. and Sen, A. (eds.) *Nutrient Use Efficiency: From Basics to Advances*. Springer, pp.137-162.
38. Reisi, S., Alikhani, H., Fallah Nosratabad, A., Pourbabaee, A.A. and Khoshru, B., 2025. Development and evaluation of a new culture medium for effective screening of phosphate-solubilizing bacteria: A case study on Gram-positive bacteria isolated from soil. In: *19th Iranian Soil Science Congress*, 16-18 September 2025, Karaj, Iran. (In Persian).
39. Richardson, A.E., Lynch, J.P., Ryan, P.R., Delhaize, E., Smith, F.A., Smith, S.E., Harvey, P.R., Ryan, M.H., Veneklaas, E.J., Lambers, H., Oberson, A., Culvenor, R.A. and Simpson, R.J., 2009. Plant and microbial strategies to improve the phosphorus efficiency of agriculture. *Plant and Soil*, 321, pp.305-339. DOI: https://doi.org/10.1007/s11104-009-9895-2
40. Rodríguez, H. and Fraga, R., 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, 17, pp.319-339. DOI: https://doi.org/10.1016/S0734-9750(99)00014-2
41. Rouphael, Y., Franken, P., Schneider, C., Schwarz, D., Giovannetti, M., Agnolucci, M.,

De Pascale, S., Bonini, P. and Colla, G., 2015. Arbuscular mycorrhizal fungi act as biostimulants in horticultural crops. *Scientia Horticulturae*, 196, pp.91-108. DOI: https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.002

42. Satyaprakash, M., Nikitha, T., Reddi, E.U.B., Sadhana, B. and Vani, S.S., 2017. Phosphorus solubilizing microbes: Sustainability boon for agricultural production. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(10), pp.1304-1315. DOI: https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.610.XXX
43. Schisler, D.A., Slininger, P.J., Behle, R.W. and Jackson, M.A., 2004. Formulation of Bacillus spp. for biological control of plant diseases. *Phytopathology*, 94, pp.1267-1271. DOI: https://doi.org/10.1094/PHYTO.2004.94.11.1267
44. Sharma, S.B., Sayyed, R.Z., Trivedi, M.H. and Gobi, T.A., 2013. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *SpringerPlus*, 2, pp.587. DOI: https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-587
45. Sonenshein, A.L., Hoch, J.A. and Losick, R. (eds.), 2002. *Bacillus subtilis and Its Closest Relatives: From Genes to Cells*. ASM Press.
46. Sperber, J.I., 1958. Solution of apatite by soil microorganisms producing organic acids. *Australian Journal of Agricultural Research*, 9, pp.782-787.
47. Timmusk, S., Behers, L., Muthoni, J., Muraya, A. and Aronsson, A.-C., 2017. Perspectives and challenges of microbial application for crop improvement. *Frontiers in Plant Science*, 8, pp.49. DOI: https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00049
48. van der Bom, F., Nunes, I., Raymond, N.S., Hansen, V., Bonnichsen, L., Magid, J. and Nybroe, O., 2018. Long-term fertilisation form, level and duration affect the diversity, structure and functioning of soil microbial communities in the field. *Soil Biology & Biochemistry*, 122, pp.91-103. DOI: https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.04.001
49. Vessey, J.K., 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*, 255, pp.571-586. DOI: https://doi.org/10.1023/A:1026037216893
50. Yadav, B.K. and Verma, A., 2018. Phosphate solubilization and mobilization in soil through microorganisms under arid ecosystems. In: Rakshit, A., Singh, H.B. and Sen, A. (eds.) *Nutrient Use Efficiency: From Basics to Advances*. Springer, pp.199-212.
51. Zhang, X., Li, Y., Liu, X., Wang, C. and Chen, Q., 2024. Screening and characterization of phosphate-solubilizing Bacillus strains for improving phosphorus availability in calcareous soils. *Applied Soil Ecology*, 190, pp.104918. DOI: https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2023.104918

Publisher: Soil Science Society of Iran

Journal of Soil Biology

https://sbj.areeo.ac.ir/

Research article

The Effect of Zinc, Phosphorus and Bioiofertilizers Application on Yield and Growth Indices in Pinto Bean

Akbar Hemmati[1]*, Ahmad Asgharzadeh[2], and yaghoubali Karami[1]

[1] Soil and Water Research Department, Fars Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Shiraz, Iran.

[2] Soil and Water Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

Article Info

Received: 2025-12-15

Accepted: 2026-09-12

Keywords:
Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF),
Azotobacter,
Growing degree days (GDD),
Nutrient use efficiency,
Rhizobium

Corresponding author's email:
a.hemati@areeo.ac.ir.

Doi:
10.22092/SBJ.2026.371700.291

Extended Abstract

Background and Objectives: Beans are highly effective in fixing nitrogen and enhancing the fertility of agricultural soils due to their symbiosis with bacteria, contributing large amounts of nitrogen to the soil annually after harvest. Pinto bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is one of the major pulse crops grown in Iran. It is widely cultivated in dry and semi-arid regions. Cold stress is a major challenge for global agriculture, especially in cold regions. In these areas, the sowing date is delayed due to low temperatures or high moisture in the soil. Consequently, the seed yield of pinto beans significantly decreases with delayed sowing. Previous studies suggest that the application of chemical fertilizers (particularly zinc and phosphorus) and bio-fertilizers can induce early maturity under such conditions. Biofertilizers are important for improving the qualitative and biochemical properties of plants by enhancing soil quality, which is directly related to producing high-quality and functional food. Their use is particularly valuable in the cultivation of common beans. Phosphorous and zinc are the major potential yield-limiting nutrients in Iran. The deficiency of these nutrients becomes even more serious in alkaline calcareous dry soils. Another important aspect of P and Zn nutrition is the interaction effect between them, especially in soils marginally deficient in both elements. When P and Zn are applied together to such soils, crop yields are reported to increase due to the positive interaction of P and Zn. Therefore, considering the importance of the above, this study was conducted to assess the effect of the combined application of different rates of P, Zn, and bio-fertilizers on the yield and yield components of dry bean plants grown in a soil deficient in P and Zn in the north of Fars province, Iran.

Materials and Methods: A factorial experiment was conducted based on a randomized complete block design (RCBD) with three replications over two growing seasons (2022 and 2023) to evaluate the effects of biofertilizer application and different phosphorus and zinc fertilizer levels on the seed yield and growth indices of pinto beans. The experimental factors were: (1) phosphorus at three levels: the recommended rate based on soil test results (P1), 30% above the recommended rate (P2), and 30% below the recommended rate (P3); (2) zinc at three levels: the recommended rate based on soil test results (Zn1), 30% above the recommended rate (Zn2), and 30% below the recommended rate (Zn3); and (3) biofertilizer at two levels: seed inoculation with an inoculant containing *Rhizobium*, *Azotobacter*, and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) (B1), and no seed inoculation (B0). The

measured traits included seed yield, root colonization, growing degree days (GDD), crop growth rate (CGR), 100-seed weight, seed nutrient contents (N, P, K, and Zn), seed protein content, plant height, and number of pods per plant.

Results: The results of the analysis for some selected physical and chemical properties of the soil used are given in Table 1. The soil has a silty clay texture, an alkaline pH, and is calcareous with a calcium carbonate content of 25%. The soil is non-saline with a low organic matter content (<5%) and is deficient in total N content, which is typical for semi-arid soils. ANOVA revealed significant ($P < 0.01$) effects of phosphorus, zinc, and bio-fertilizers on yield, CGR, biomass (dry and fresh weight), and pod and seed counts per plant. The highest yield (2170 kg ha^{-1}) was recorded in the P1Zn2B0 treatment (30% more P, 30% less Zn, and no inoculation). GDD averaged 1056 and 1088 in the first and second years, respectively. The maximum CGR (5.5 g m^{-2} day^{-1}) occurred in inoculated seeds under the P2Zn3B0 treatment. The highest pod (14.3) and seed counts per plant (48) were observed in the P3Zn3B0 treatment, while seeds per pod peaked at 1.4 in the P3Zn2B0 treatment. The maximum plant height (94 cm) was observed in the P2Zn1B1 and P2Zn3B1 treatments. Seed phosphorus was elevated by bio-fertilizer inoculation, and root colonization peaked at 72.7% in the P1Zn3B0 treatment. The highest 100-seed weights were 46.2 and 50.7 g in the two years of the experiment. The 100-seed weight was increased by zinc and bio-fertilizer treatments, whereas phosphorus did not affect the 100-seed weight. Economic analysis favored the P3Zn3B0 treatment with the highest gross return (1255.8 Rials).

Conclusion: Bean responses to P, Zn, and biofertilizers were strongly dependent on environmental conditions and nutrient interactions, with variations in grain yield primarily associated with the seed number per plant. The inconsistent effects of biofertilizers and year-dependent treatment responses highlight the need for balanced, site-specific nutrient management rather than fixed fertilizer rates. Seed nutritional quality was largely stable, while root colonization suggested a potential contribution from indigenous mycorrhizal populations. Overall, optimizing the P–Zn balance according to soil and environmental conditions appears more promising than increasing fertilizer inputs, although multi-year validation is required.

Cite this article: Hemmati, A., Asgharzadeh, A., Karami, Y., 2026. The Effect of Zinc, Phosphorus and Bioiofertilizers Application on Yield and Growth Indices in Pinto Bean. Research article *Journal of Soil Biology, 14 (1),*105-128 .

DOI: 10.22092/SBJ.2026.371700.291
Publisher: Soil Science Society of Iran

دو فصلنامه

نشریه زیست‌شناسی خاک

https://sbj.areeo.ac.ir/

مقاله پژوهشی

پیامد کاربرد روی، فسفر و کودهای زیستی در عملکرد و شاخص‌های رشد لوبیا چیتی

اکبر همتی[۱*]، احمد اصغرزاده[۲] و یعقوبعلی کرمی[۱]

[۱] بخش تحقیقات خاک و آب، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی فارس، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شیراز، ایران.

[۲] مؤسسه تحقیقات خاک و آب کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

دریافت: ۱۴۰۴/۰۹/۲۴ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۶/۲۱

چکیده

به‌منظور بررسی تأثیر سطوح مختلف فسفر، روی و کودهای زیستی بر عملکرد و سرعت رشد لوبیا چیتی، آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار به‌مدت دو سال (۱۴۰۱ و ۱۴۰۲) در مزرعه تحقیقاتی مرکز تحقیقات کشاورزی استان فارس اجرا گردید. فاکتورهای آزمایش شامل: ۱) فسفر در سه سطح: مقدار توصیه‌شده بر اساس آزمون خاک (P_1)، ۳۰ درصد بیشتر از P_1 (P_2) و ۳۰ درصد کمتر از P_1 (P_3)؛ ۲) روی در سه سطح: مقدار توصیه‌شده بر اساس آزمون خاک (Zn_1)، ۳۰ درصد بیشتر از Zn_1 (Zn_2) و ۳۰ درصد کمتر از Zn_1 (Zn_3)؛ ۳) کودهای زیستی: تلقیح بذور با مایه تلقیح حاوی باکتری *ریزوبیوم*، *ازتوباکتر* و قارچ میکوریز آربوسکولار (B_1) و عدم تلقیح بذور (B_0) بود. صفات مورد بررسی شامل عملکرد دانه، درصد کلونیزاسیون ریشه، روز درجه رشد، سرعت رشد، وزن صد دانه، مقادیر نیتروژن، فسفر، پتاسیم و روی دانه، پروتئین دانه، ارتفاع گیاه و تعداد دانه در بوته بود. تجزیه واریانس مرکب نتایج نشان داد، اثرات فسفر، روی و کودهای زیستی بر عملکرد دانه و سرعت رشد در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. بیشترین عملکرد دانه برابر ۲۱۷۰ کیلوگرم در هکتار از تیمار $P_1Zn_2B_0$ بدست آمد. روز درجه رشد در سال اول ۱۰۵۶ و در سال دوم ۱۰۸۸ بود. بیشترین سرعت رشد برابر ۵/۵ گرم در تیمار $P_2Zn_3B_0$ و بیشترین مقدار کلونیزاسیون برابر ۷۲/۷ درصد در تیمار P1Zn3B0 دیده شد. بر اساس ارزیابی‌های اقتصادی، تیمار $P_3Zn_3B_0$ با بازده ناخالص ۱۲۵۵/۸۰ ریال در هکتار دارای بیشترین بازده ناخالص اقتصادی در بین تیمارهای اعمالی بود.

واژه‌های کلیدی: *ازتوباکتر*، درجه روز رشد، *ریزوبیوم*، قارچ‌های میکوریز آربوسکولار، کارایی مصرف عناصر غذایی.

استناد: همتی، ا.، اصغرزاده، ا.، کرمی، ی.، ۱۴۰۵. پیامد کاربرد روی، فسفر و کودهای زیستی در عملکرد و شاخص‌های رشد لوبیا چیتی. مقاله پژوهشی، *نشریه زیست شناسی خاک*، *۱۴(۱)*، ۱۲۸-۱۰۵.

مقدمه

لوبیا (Phaseolus vulgaris L.) پس از نخود، دومین گیاه مهم خانواده حبوبات از نظر سطح زیر کشت در جهان محسوب می‌شود (Beebe et al., 2013). بر اساس آمار سال زراعی ۱۴۰۲–۱۴۰۱، سطح زیر کشت لوبیا در کشور ۱۰۱۳۶۷ هکتار، با متوسط عملکرد ۲۳۵۷ کیلوگرم در هکتار و تولید کل ۲۳۷۰۰۳ تن بوده است. در این سال، استان فارس با سطح زیر کشت ۲۶۱۵۹ هکتار و تولید ۶۳۴۴۰ تن، رتبه نخست تولید لوبیا در کشور را به خود اختصاص داد. پس از استان فارس، استان‌های لرستان و زنجان بیشترین سطح زیر کشت این محصول را دارا هستند. متوسط عملکرد لوبیا در استان فارس ۲۴۲۶ کیلوگرم در هکتار گزارش شده است (Anonymous, 2024). لوبیا قادر است سالانه بین ۲۰ تا ۶۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار تثبیت کند، اما این مقدار برای تأمین کامل نیاز نیتروژنی گیاه کافی نبوده و مصرف تکمیلی نیتروژن ضروری است (Bliss, Henson and 1991). برای دستیابی به حداکثر عملکرد، وجود هر دو منبع نیتروژن معدنی خاک و نیتروژن تثبیت‌شده زیستی ضروری است (Barbosa, 2018). مصرف مقادیر زیاد نیتروژن، به‌ویژه در مراحل رشد رویشی، موجب افزایش طول دوره گل‌دهی و تأخیر در رسیدگی لوبیا است (Reinprecht et al., 2020). مطالعات اخیر نیز نشان داده‌اند که مصرف محدود نیتروژن در ابتدای فصل رشد (Starter N)، با جبران کمبود نیتروژن پیش از آغاز تثبیت مؤثر نیتروژن اتمسفری، موجب بهبود رشد اولیه و استقرار گیاه شده و در صورت مدیریت صحیح، اثر منفی قابل‌توجهی بر همزیستی ریزوبیوم ندارد (Zoffoli et al., 2021). همچنین، استفاده هم‌زمان از منابع آلی و شیمیایی نیتروژن، در مقایسه با مصرف صرف کودهای شیمیایی، نیاز گیاه را در مراحل مختلف رشد بهتر تأمین کرده و موجب تسریع در رسیدگی فیزیولوژیک گیاه می‌شود (Onyango Ogutu, 2013). در یک مدیریت تلفیقی مبتنی بر مصرف کودهای شیمیایی، آلی و زیستی، فرآیندهای فیزیولوژیکی از جمله فتوسنتز، رشد و توسعه شاخص سطح برگ بهبود یافته و در نتیجه، رسیدگی فیزیولوژیک گیاه تسریع می‌شود (Sadeghi et al., 2015). فسفر یکی از عناصر کلیدی در تشکیل و عملکرد گره‌های ریشه است و کمبود فسفر قابل جذب، از طریق کاهش تشکیل گره، فعالیت آنزیم نیتروژناز و تأمین انرژی موردنیاز همزیستی، تثبیت زیستی نیتروژن را در لوبیا و سایر لگوم‌ها به‌طور قابل‌توجهی محدود می‌کند (Nyoki and Ndakidemi, 2021; Jithesh et al., 2024). کمبود فسفر در لوبیا موجب تأخیر در رسیدگی دانه و در نهایت کاهش عملکرد می‌شود. بر اساس نتایج تحقیقات، در صورتی که فسفر قابل جذب خاک کمتر از ۱۵ میلی‌گرم در کیلوگرم باشد، مصرف حداقل ۱۲۰ کیلوگرم P_2O_5 در هکتار توصیه می‌شود (Heinrich et al., 2013). نتایج پژوهشی بر روی لوبیا سفید نشان داد که بیشترین عملکرد دانه، معادل ۲۵۹۵ کیلوگرم در هکتار، با مصرف ۴۶ کیلوگرم P_2O_5 و ۵۰ کیلوگرم K_2O در هکتار حاصل شد (Hemmati and Nasrollahi, 2009). با این وجود پاسخ عملکرد لوبیا به مصرف فسفر به‌شدت تحت تأثیر وضعیت فسفر قابل جذب خاک، شرایط محیطی و ژنوتیپ گیاه قرار دارد. با این حال، مطالعات نشان داده‌اند که کاربرد متعادل فسفر، به‌ویژه در خاک‌های دارای کمبود این عنصر، موجب بهبود رشد، افزایش اجزای عملکرد و در نهایت افزایش عملکرد دانه می‌شود. ازاین‌رو، توصیه مقدار مصرف فسفر باید بر پایه آزمون خاک و شرایط مزرعه انجام گیرد (Silva et al., 2022; Zewdie and Hassen, 2021).

لوبیا نسبت به کمبود روی حساس بوده و علائم این کمبود را به‌سرعت بروز می‌دهد (Ozbahce and Zengin, 2014). برای تأمین این عنصر، مصرف خاکی سولفات روی توصیه شده است. کاربرد ۱۰ تا ۵۰ کیلوگرم در هکتار کودهای حاوی عناصر کم‌مصرف به‌صورت خاکی یا محلول‌پاشی با غلظت سه در هزار، موجب رفع علائم

کمبود روی در لوبیا می‌شود (Hemmati, 2004). همچنین، گزارش شده است که مصرف روی با افزایش فعالیت فتوسنتزی، رشد گیاه را تسریع کرده و موجب کوتاه‌تر شدن دوره رشد تا رسیدگی فیزیولوژیک می‌شود.

کودهای زیستی، به‌ویژه قارچ‌های میکوریزا، از طریق افزایش فراهمی عناصر غذایی، تولید ترکیبات شبه‌هورمونی و کاهش تولید اتیلن، موجب افزایش پایداری گیاه در برابر تنش‌های محیطی می‌شوند (Amiri, 2021). نتایج بررسی ۲۱ ژنوتیپ لوبیا تلقیح‌شده با چهار گونه قارچ میکوریز نشان داد که گیاهان تلقیح‌شده، در مقایسه با شاهد، از رشد بهتر ریشه، اندام هوایی و نیز درصد کلونیزاسیون بیشتری برخوردار بودند (Erdinc, 2017)). مطالعات انجام‌شده در کشور نیز نشان داده است که کاربرد قارچ میکوریز آربسکولار موجب افزایش عملکرد لوبیا می‌شود (Hemmati et al., 2017b; 2020a). همچنین، گزارش شده است که پاسخ گیاه به تلقیح به نوع ریزجاندار، مرحله رشد گیاه و برهم‌کنش بین ریزجاندارهای مصرفی بستگی دارد؛ به‌طوری‌که تعداد غلاف در بوته و ارتفاع بوته بیشتر تحت تأثیر باکتری ازتوباکتر و عملکرد دانه عمدتاً تحت تأثیر باکتری ریزوبیوم قرار گرفته است (Jarak et al., 2012). استفاده از باکتری‌های محرک رشد گیاه (PGPR)، به‌ویژه سویه‌های دارای آنزیمACC deaminase، موجب بهبود رشد، افزایش جذب عناصر غذایی و افزایش عملکرد گیاهان زراعی می‌شود (Shaharoona et al., 2006 a, b). در برخی مطالعات مشاهده شده است که حتی در شرایط تأمین کافی نیتروژن معدنی، تلقیح گیاهان با باکتری‌های دیازوتروف، از جمله ازتوباکتر، موجب افزایش رشد، نمو و زودرسی گیاهان شده است. در چنین شرایطی، به‌نظر می‌رسد مکانیسم‌هایی غیر از تثبیت زیستی نیتروژن، از جمله تولید تنظیم‌کننده‌های رشد مانند اکسین، در بهبود رشد گیاه نقش داشته باشند (Kader et al., 2002). با توجه به نقش مؤثر عناصر فسفر و روی در تغذیه گیاه و همچنین اهمیت کودهای زیستی شامل ریزوبیوم، ازتوباکتر و قارچ میکوریزا آربسکولار در بهبود جذب عناصر غذایی، رشد و عملکرد لوبیا، این پژوهش با هدف بررسی اثر سطوح مختلف فسفر، روی و کودهای زیستی بر عملکرد و شاخص‌های رشد لوبیا چیتی انجام شد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار طی دو سال زراعی (۱۴۰۱ و ۱۴۰۲) در مزرعه تحقیقاتی مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان فارس اجرا شد. فاکتورهای آزمایش شامل: ۱) فسفر در سه سطح: مقدار توصیه‌شده بر اساس آزمون خاک (P1)، ۳۰ درصد بیشتر از P1 (P2) و ۳۰ درصد کمتر از P1 (P3)؛ ۲) روی در سه سطح: مقدار توصیه‌شده بر اساس آزمون خاک (Zn1)، ۳۰ درصد بیشتر از Zn1 (Zn2) و ۳۰ درصد کمتر از Zn1 (Zn3)؛ ۳) کودهای زیستی: تلقیح بذور با مایه تلقیح حاوی باکتری Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli (CCSM-B00141) ، Azotobacter chroococcum (CCSM-A00482) وقارچ میکوریزا آربوسکولار (B1) و عدم تلقیح بذور(B0) بود. فسفر و روی به‌ترتیب از منابع سوپرفسفات تریپل و سولفات روی تأمین شدند. مایه تلقیح ریزوبیوم و ازتوباکتر به‌صورت جامد (۴×۱۰۷ CFU) و هر یک به میزان دو کیلوگرم در ۱۰۰ کیلوگرم بذر مصرف شدند. قارچ میکوریز آربوسکولار (مایکوروت) به‌صورت مایع با حدود ۲۰ هزار اندام فعال در هر میلی‌لیتر و به میزان دو لیتر در ۱۰۰ کیلوگرم بذر استفاده شد (Jarak et al., 2012). جمعیت باکتری‌های خاک نیز با روش رقت متوالی تعیین گردید. در تیمارهای تلقیح‌شده، ۳۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار هنگام کاشت و در تیمارهای فاقد کود زیستی، بر اساس آزمون خاک (جدول۱)، ۱۵۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار در سه نوبت کاشت، گل‌دهی و پر شدن غلاف‌ها

مصرف شد. با توجه به کفایت پتاسیم خاک، کود پتاسیمی مصرف نشد و سایر عناصر غذایی بر اساس نتایج آزمون خاک تأمین شدند. بذور لوبیا چیتی (Phaseolus vulgaris L.) رقم «کوشا» با تراکم ۴۰ بوته در مترمربع، در تاریخ ۲۵ خرداد در کرت‌هایی شامل چهار ردیف پنج‌متری با فاصله ۵۰ سانتی‌متر بین ردیف‌ها کشت شدند. آبیاری به‌روش قطره‌ای نواری انجام گرفت. کنترل علف‌های هرز با ترفلان پیش از کاشت و وجین دستی طی فصل رشد و کنترل کنه با پروفنفوس (۲/۵ لیتر در هکتار) انجام شد. صفات اندازه‌گیری‌شده شامل عملکرد و اجزای عملکرد، طول دوره رشد، درصد نیتروژن، فسفر و روی دانه (Bremner, 1996; Reed and Martens, 1996)، درجه‌روز رشد (Snyder, 1985)، سرعت رشد محصول (Campbell and Kondra, 1978)، درصد پروتئین دانه (نیتروژن × ۶/۲۵) و درصد کلونیزاسیون ریشه بود (لازم به توضیح است که نتایج درصد نیتروژن، فسفر، پتاسیم، روی و پروتین دانه و درصد کلنیزاسیون ریشه در سال اول قابل تجزیه آماری نبود و در این صفات فقط از نتایج سال دوم آزمایش استفاده شده است). عملکرد دانه از دو ردیف میانی هر کرت اندازه‌گیری شد و سرعت رشد بر اساس وزن خشک بوته‌های برداشت‌شده از یک مترمربع محاسبه گردید. درصد کلونیزاسیون میکوریزایی نیز مطابق روش (Phillips and Hayman, 1970) تعیین شد. به‌منظور تعیین طول دوره رویش، مراحل فنولوژیک لوبیا در طول فصل رشد ثبت شد و درجه‌روز رشد تجمعی (Growing Degree Days; GDD) از زمان کاشت تا هر مرحله فنولوژیک، با در نظر گرفتن دمای پایه ۱۰ درجه سانتی‌گراد (Snyder, 1985) محاسبه شد. سرعت رشد محصول (Crop Growth Rate; CGR) در سه مرحله ساقه‌دهی، قبل از گل‌دهی و پس از گل‌دهی (Campbell and Kondra, 1978) و با استفاده از اختلاف وزن خشک گیاه در دو نمونه‌برداری متوالی محاسبه شد. پیش از برداشت، از تمامی کرت‌ها نمونه ریشه تهیه و در الکل ۵۰ درصد نگهداری شد تا درصد کلونیزاسیون میکوریزایی تعیین شود. ارزیابی اقتصادی تیمارها با استفاده از روش بودجه‌بندی جزئی و شاخص بازده ناخالص (GM) انجام گرفت. داده‌ها با نرم‌افزار SAS تجزیه‌وتحلیل و میانگین‌ها با آزمون LSD در سطح ۵ درصد مقایسه شدند.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه نمونه خاک محل انجام آزمایش در جدول یک ارائه شده است. خاک محل آزمایش غیرشور، آهکی و از نظر مواد آلی فقیر است. مقادیر فسفر و پتاسیم آن کمتر از حد بحرانی است. تمامی مقادیر عناصر کم مصرف به‌غیر از منگنز در خاک محل آزمایش کمتر از حد بحرانی آنها می‌باشد. حد بحرانی عناصر غذایی قابل استفاده در خاک برای لوبیا برابر ۳۰۰، ۱۵، ۱، ۸، ۶، ۲ و ۱ میلی‌گرم در کیلوگرم به‌ترتیب برای پتاسیم، فسفر، مس، منگنز، آهن، روی و بر گزارش شده است. بافت خاک نیز رسی است. جمعیت کل باکتری‌ها در خاک محل آزمایش برابر ۹۶۰۰ باکتری در یک گرم خاک بود (جدول ۱).

جدول ۱- برخی ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی خاک قبل از اجرای آزمایش.

Table 1. Some physical, chemical, and biological properties of the soil before conducting the experiment.

عمق Depth (cm)	هدایت الکتریکی EC (dSm^{-1})	اسیدیته pH	مواد خنثی شونده TNV	نیتروژن N	کربن آلی OC	فسفر P	پتاسیم K	روی Zn	آهن Fe	منگنز Mn	مس Cu	شن Sand	لای Silt	رس Clay	جمعیت کل باکتری Total Bacteria
			%	%	%	%	(ppm)					%	%	%	$cfug^{-1}$
0-30	0.96	7.7	25	0.06	0.55	6.6	254	0.58	5.5	13.5	0.72	30.6	26.4	43	9.6×10^{3}

عملکرد دانه

نتایج تجزیه واریانس مرکب نشان داد که اثرات ساده سال، فسفر، روی و کودهای زیستی و همچنین برهم‌کنش‌های دوگانه به‌جز برهمکنش کود زیستی × سال، سه‌گانه و چهارگانه آن‌ها بر عملکرد دانه در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بودند (جدول ۲).

در سال اول، بیشترین عملکرد دانه در تیمار P1Zn2B0 با ۲۱۷۰ کیلوگرم در هکتار و کمترین عملکرد در تیمار P3Zn3B0 با ۱۶۴۶ کیلوگرم در هکتار مشاهده شد؛ این دو تیمار به‌ترتیب در گروه‌های آماری a و c قرار گرفتند (جدول۳). بیشترین عملکرد در سال اول از تیمار مصرف فسفر مطابق با توصیه آزمون خاک، مصرف روی به میزان ۳۰ درصد بیشتر از مقدار توصیه‌شده و بدون تلقیح بذور با کود زیستی حاصل شد. این پاسخ را با احتیاط می‌توان نشان‌دهنده مناسب بودن ترکیب این سطوح تغذیه‌ای در شرایط سال اول دانست؛ با این حال، با توجه به معنی‌دار بودن برهم‌کنش سه‌گانه فسفر × روی × کود زیستی، نمی‌توان برتری این تیمار را صرفاً به افزایش مصرف روی یا عدم استفاده از کود زیستی نسبت داد. از نظر فیزیولوژیک، تعامل فسفر و روی می‌تواند پاسخ گیاه به تغذیه معدنی را تغییر دهد، زیرا جذب، انتقال و هم‌ایستایی این دو عنصر در گیاه به‌صورت مستقل عمل نمی‌کنند و وضعیت یکی از آن‌ها می‌تواند بر دسترسی و استفاده از دیگری اثرگذار باشد (Bouain et al., 2014; Xie et al., 2019). همچنین، افزایش عملکرد در اثر تأمین روی در شرایط مناسب تغذیه‌ای با نتایج Merkeb and Yoseph, (2024) همخوانی دارد؛ آنان نشان دادند که کاربرد روی همراه با آهن در لوبیا موجب بهبود برخی صفات زراعی و افزایش بهره‌وری گیاه شد.

در سال دوم، بیشترین عملکرد دانه (۲۱۳۵ کیلوگرم در هکتار) در تیمار P3Zn3B0، یعنی در شرایط مصرف فسفر و روی به میزان ۳۰ درصد کمتر از مقادیر توصیه‌شده بر اساس آزمون خاک و بدون تلقیح بذور با کودهای زیستی، به‌دست آمد (جدول ۴). این نتیجه نشان می‌دهد که پاسخ عملکرد به‌میزان مصرف عناصر غذایی ثابت و مستقل از شرایط محیطی نیست؛ بنابراین، مشاهده بیشترین عملکرد در سطح پایین‌تر فسفر و روی در سال دوم را نباید به‌عنوان شواهدی مبنی بر مطلوبیت ذاتی کاهش مصرف این عناصر تفسیر کرد؛ بلکه احتمالاً بیانگر تغییر نیاز واقعی گیاه و کارایی استفاده از عناصر غذایی تحت شرایط متفاوت محیطی و تغذیه‌ای سال دوم است. در چنین شرایطی، وضعیت اولیه حاصلخیزی خاک، میزان عناصر قابل‌جذب، رطوبت خاک و شرایط رشد می‌توانند تعیین کنند که چه مقدار از کود افزوده‌شده واقعاً به نیاز گیاه پاسخ می‌دهد. مطالعات انجام‌شده روی حبوبات نیز بر ضرورت تطبیق میزان مصرف کود با ویژگی‌های خاک و شرایط محلی تأکید کرده‌اند؛ پاسخ عملکرد به کود فسفاته و کودهای مرکب تابع شرایط منطقه و حاصلخیزی خاک بوده و تعیین نرخ مناسب کود باید به‌صورت منطقه‌ای انجام شود (Daemo et al., 2024) افزون بر این، مطالعات اخیر در لوبیا نشان داده است که پاسخ عملکرد به مدیریت تغذیه‌ای به‌شدت به ترکیب منابع غذایی و شرایط خاک وابسته است؛ به‌طوری‌که

کاربرد تلفیقی کودهای معدنی و آلی/زیستی در برخی شرایط موجب افزایش عملکرد شده، اما میزان این پاسخ بین مکان‌ها و فصل‌های مختلف متفاوت بوده است (Wabela et al., 2024). بنابراین، تفاوت تیمار برتر بین سال‌های اول و دوم در پژوهش حاضر را می‌توان بیشتر به تغییر شرایط محیطی و تغذیه‌ای و پاسخ متقابل فسفر، روی و کود زیستی نسبت داد تا یک رابطه خطی بین مقدار مصرف کود و عملکرد. این یافته از نظر کاربردی نیز اهمیت دارد، زیرا نشان می‌دهد توصیه ثابت و یکسان برای مصرف فسفر و روی ممکن است در همه شرایط سالانه بهینه نباشد و تفسیر و توصیه کودی باید بر پایه آزمون خاک و شرایط واقعی تولید انجام شود.

ارتفاع گیاه

نتایج تجزیه واریانس مرکب (جدول ۲) نشان داد که به‌جز اثر اصلی ساده کودهای زیستی که در سطح احتمال یک درصد و برهم‌کنش فسفر × روی که در سطح پنج درصد بر این صفت معنی‌دار شدند، هیچ اثر اصلی ساده و برهمکنش دو، سه و یا چهارگانه¬ای بر صفت ارتفاع گیاه تأثیر معنی‌داری نداشت. در سال اول، بیشترین ارتفاع در تیمارP2Zn3B1 با ۹۱/۷ سانتی‌متر و کمترین آن در تیمارP3Zn3B0 با ۵۷/۷ سانتی‌متر مشاهده شد که به‌ترتیب در گروه‌های آماری a و c قرار گرفتند (جدول ۳). در سال دوم نیز بیشترین ارتفاع گیاه (۹۶/۳ سانتی‌متر) در تیمار P2Zn3B1 ثبت شد (جدول ۴). بررسی ترکیب تیمارها نشان داد که پاسخ ارتفاع به سطوح فسفر و روی روند خطی مشخصی نداشت. همچنین، اثر متقابل فسفر و روی در پژوهش حاضر با گزارش‌هایی مبنی بر وابستگی پاسخ رشد لوبیا به تعامل این دو عنصر سازگار است (Gianquinto et al., 2000). با توجه به اینکه اثر اصلی فسفر و روی معنی‌دار نبود، اما برهم‌کنش آنها معنی‌دار شد، به‌نظر می‌رسد ارتفاع گیاه بیش از پاسخ مستقل به‌مقدار هر یک از عناصر، به‌ترکیب سطوح فسفر و روی و وضعیت زیستی ریزوسفر وابسته بوده است؛ بنابراین، برتری P2Zn3B1 را نمی‌توان به اثر مستقل فسفر، روی یا کود زیستی نسبت داد؛ بلکه احتمالاً حاصل پاسخ گیاه به‌ترکیب این عوامل در شرایط آزمایش بوده است.

جدول ۲- تجزیه واریانس مرکب عملکرد دانه، سرعت رشد نسبی، وزن صد دانه، ارتفاع گیاه و تعداد دانه در بوته.

Table 2. Combined analysis of variance the grain yield, relative growth rate, 100S eed weight, plant height and noumber of seeds per plant.

میانگین مربعات Mean Squares					درجه آزادی Degree of freedom	منابع تغییر Sources of changes
تعداد دانه در بوته Noumber of seeds per plant	ارتفاع گیاه Plant height	وزن صد دانه 100 seed weight	سرعت رشد نسبی Relative growth rate	عملکرد دانه Grain yield		
21329.24**	127.36 ns	581.82**	0.94ns	9429421**	1	سال Year
221.96	892.75	18.95	0.55	24514.04	4	تکرار Replication
39.9 ns	85.3 ns	6.49 ns	5.59**	280515.43**	2	فسفر Phosphorus
1189.07**	25.38 ns	15.11ns	2.74**	6436.72**	2	سال×فسفر Phosphorus × Year
343.37**	27.33ns	26.75*	9.45**	863807.18**	2	روی Zinc
111.79 ns	23.19 ns	15.76ns	0.17 ns	962374.46**	2	سال×روی Zinc ×Year
338.70**	517.25*	5.35ns	24.59**	233854.77**	2	روی×فسفر Phosphorus × Zinc
743.40 ns	27.05 ns	16.65ns	2.97**	437469.26*	4	روی×فسفر×سال year× phosphorus× zinc
169.55 ns	2969.66**	2.22ns	5.51ns	555293.26**	1	کود زیستی biofertilizer
22.52 ns	1.20 ns	9.53ns	0.10**	76309.64ns	1	کود زیستی×سال Year ×Biofertilizer
124.3 ns	572.65 ns	0.27ns	14.06**	412296.71**	2	کود زیستی×فسفر Phosphorus× Biofertilizer
47.12 ns	11.04 ns	8.36ns	9.49**	108915.60**	2	کودزیستی×فسفر×سال year×Phosphorus× Biofertilizer
156.27 ns	452.06 ns	2.13ns	3.08**	40078.10ns	2	کود زیستی×روی Zinc ×Biofertilizer
410.71**	18.82 ns	12.72ns	1.96**	227267.29**	2	کودزیستی×روی×سال Year×Zinc ×Biofertilizer
514.11**	124.21 ns	7.37 ns	8.64**	359397.75**	4	کودزیستی×روی×فسفر Phosphorus ×Zinc ×Biofertilizer
300.37**	4.37 ns	2.60 ns	3.70**	835505.78**	44	روی×فسفر×کود زیستی × سال Year× Phosphorus ×Zinc×Biofertilizer
50.26	201.77	8.27	0.15	30420.93	68	خطا Error
17.79	18.57	3.26	19.40	10.74		ضریب تغییرات (درصد٪) Coefficient of Variation (%)

*و** به ترتیب معنی‌دار در سطح ۵ درصد٪ و ۱ درصد٪ احتمال آماری و ns معنی دار نیست.

*, ** Indicates that the effect of the experimental factors is significant at the 5% and 1% probability level and ns isn't significant.

جدول ۳- مقایسه میانگین عملکرد، تعداد دانه در بوته، ارتفاع گیاه، وزن صد دانه و سرعت رشد در سال اول.

Table 3. Mean comparison of grain yield, number of seeds per plant, plant height, 100-seed weight, and growth rate in the first year.

ردیف Row	تیمار Treatment	عملکرد دانه Grain yield ($kgha^{-1}$)	تعداد دانه در بوته Noumber of seeds per plant	ارتفاع گیاه Plant height (cm)	وزن صد دانه 100 seed weight (g)	سرعت رشد Growth rate ($gday^{-1}$)
1	$P_1Zn_1B_0$	1913*	46.7a	79.3abc	41.3ab	0.7b
2	$P_1Zn_1B_1$	2000*	56.7a	73.3abc	43.1ab	1.3ab
3	$P_1Zn_2B_0$	2170*	55a	79.3abc	45.7a	3.3ab
4	$P_1Zn_2B_1$	1956ab	55.3a	85ab	42.5ab	0.9b
5	$P_1Zn_3B_0$	1716c	50a	76.7abc	43.1ab	3.6ab
6	$P_1Zn_3B_1$	1890ac	48a	85.7ab	43.4ab	4.7ab
7	$P_2Zn_1B_0$	2106a	61.7a	76abc	42.1ab	2.2ab
8	$P_2Zn_1B_1$	1910ab	50.3a	86ab	40.8ab	3.0ab
9	$P_2Zn_2B_0$	1813ab	57a	64.3bc	42.1ab	1.9ab
10	$P_2Zn_2B_1$	1983ab	62.3a	70.7abc	44.1ab	2.3ab
11	$P_2Zn_3B_0$	2140a	64.3a	72abc	40.1b	5.5a
12	$P_2Zn_3B_1$	2003ab	62.7a	91.7a	41.9ab	2.5ab
13	$P_3Zn_1B_0$	1970ab	41.7a	69.3abc	43.6ab	1.9ab
14	$P_3Zn_1B_1$	1906ab	62a	79.3abc	41.5ab	3.9ab
15	$P_3Zn_2B_0$	1853ab	56.7a	71abc	45.0ab	2.6ab
16	$P_3Zn_2B_1$	1823ab	38a	88.3ab	46.2a	1.4ab
17	$P_3Zn_3B_0$	1646c	62.7a	57.7c	40.0b	4.7ab
18	$P_3Zn_3B_1$	1973ab	55a	79.7ab	43.9ab	1.8ab
LSD		432.22	28	26.27	5.39	4.40

میانگین‌های با حروف مشابه اختلاف معنی‌داری ندارند.P_1: فسفر بر اساس آزمون خاک،P_2: فسفر ۳۰ درصد بیشتر از آزمون خاک،P_3: فسفر ۳۰ درصد کمتر از آزمون خاک،Zn_1: روی بر اساس آزمون خاک،Zn_2: روی ۳۰ درصد بیشتر از آزمون خاک،Zn_3: روی ۳۰ درصد کمتر از آزمون خاک،B_1 وB_0: به ترتیب مایه‌زنی بذر با کودهای زیستی و عدم مایه‌زنی. (در هر ستون میانگین‌های با حروف یکسان ناهمانندی چشمگیری ندارند).

Means with the same letters are not significantly different. P_1: phosphorus based on the soil test; P_2: phosphorus at 30% above the soil-test recommendation; P_3: phosphorus at 30% below the soil-test recommendation; Zn_1: zinc based on the soil test; Zn_2: zinc at 30% above the soil-test recommendation; Zn_3: zinc at 30% below the soil-test recommendation; B_1 and B_0: seed inoculation with biofertilizers and no seed inoculation, respectively. (Within each column, means followed by the same letter are not significantly different).

جدول ۴- مقایسه میانگین عملکرد، تعداد دانه در بوته، ارتفاع گیاه، وزن صد دانه و سرعت رشد در سال دوم آزمایش.

Table 4. Mean comparison of grain yield, noumber of seeds per plant, plant height, 100 seed weight and growth rate in the second year.

ردیف Row	تیمار Treatment	عملکرد دانه Grain yield ($kgha^{-1}$)	تعداد دانه در بوته Noumber of seeds per plant	ارتفاع گیاه Plant height (cm)	وزن صد دانه 100 seed weight (g)	سرعت رشد Growth rate ($gday^{-1}$)
1	$P_1Zn_1B_0$	1537bcd	51.6a	76.3 abc	49.1abc	0.83defg
2	$P_1Zn_1B_1$	1555bcd	25.6efg	68bc	50.76a	1.51d
3	$P_1Zn_2B_0$	810fg	29.3def	75abc	48.26 abc	3.78b
4	$P_1Zn_2B_1$	735 fg	12.3ij	78abc	49.53ab	1.06def
5	$P_1Zn_3B_0$	1482bcd	18ghi	73 abc	46.23 bcd	4.12b
6	$P_1Zn_3B_1$	1625bcd	42.3bc	85.7ab	43.43d	5.48a
7	$P_2Zn_1B_0$	1435de	24.3fgh	73.3 abc	47abcd	2.52c
8	$P_2Zn_1B_1$	1815abc	11.3ij	82ab	46.66 bcd	3.49b
9	$P_2Zn_2B_0$	1650bcd	8.6 j	65bc	49.06 abc	2.29c
10	$P_2Zn_2B_1$	675g	14.3 ij	70 bc	48.1abc	2.7c
11	$P_2Zn_3B_0$	1825ab	29.6def	70.7bc	48.9abc	1.06def
12	$P_2Zn_3B_1$	1075ef	26.3def	96.3a	46.7 bcd	0.2g
13	$P_3Zn_1B_0$	1417de	8.6j	72bc	49.26 abc	1.18de
14	$P_3Zn_1B_1$	655g	17 hij	80abc	47 bcd	0.25g
15	$P_3Zn_2B_0$	535g	34.6 cd	69.3 bc	46.06 cd	4.18b
16	$P_3Zn_2B_1$	1470bcd	44 ab	86ab	45.33 cd	2.29c
17	$P_3Zn_3B_0$	2135a	33.3de	57.7 c	47.23 bcd	0.76fg
18	$P_3Zn_3B_1$	1460cd	31def	79.3 abc	46.54 bcd	0.37fg
LSD		147.9	3.57	9.79	1.65	0.28

میانگین‌های با حروف مشابه اختلاف معنی‌داری ندارند. P_1: فسفر بر اساس آزمون خاک،P_2: فسفر ۳۰ درصد بیشتر از آزمون خاک،P_3: فسفر ۳۰ درصد کمتر از آزمون خاک، Zn_1: روی بر اساس آزمون خاک، Zn_2: روی ۳۰ درصد بیشتر از آزمون خاک، Zn_3: روی ۳۰ درصد کمتر از آزمون خاک، B_1: و B_0: به ترتیب مایه زنی بذر با کودهای زیستی و عدم مایه زنی. (در هر ستون میانگین‌های با حروف یکسان ناهمانندی چشمگیری ندارند).

Means with the same letters are not significantly different. P_1: phosphorus based on the soil test; P_2: phosphorus at 30% above the soil-test recommendation; P_3: phosphorus at 30% below the soil-test recommendation; Zn_1: zinc based on the soil test; Zn_2: zinc at 30% above the soil-test recommendation; Zn_3: zinc at 30% below the soil-test recommendation; B_1 and B_0: seed inoculation with biofertilizers and no seed inoculation, respectively. (Within each column, means followed by the same letter are not significantly different.)

وزن صد دانه

وزن صد دانه، اگرچه تحت کنترل ژنتیکی قابل‌توجهی قرار دارد، از شرایط محیطی و تغذیه‌ای، به‌ویژه در مرحله پر شدن دانه، نیز تأثیر می‌پذیرد (Qodsevali et al., 2015). در پژوهش حاضر، فقط اثر سال و روی به‌ترتیب در سطوح احتمال یک و پنج درصد بر وزن صد دانه معنی‌دار بود و هیچ اثر اصلی ساده دیگر و برهمکنش دو، سه و یا چهارگانه‌ای بر صفت وزن صد دانه تأثیر معنی-داری نداشتند (جدول۲). بیشترین وزن صد دانه در سال اول و دوم به‌ترتیب با مقادیر ۴۶/۲ و ۵۰/۷۶ گرم از تیمارهای P3Zn2B1 و P1Zn1B1 ثبت شد و مقایسه میانگین‌ها نشان داد که پاسخ این صفت در تیمارهای مختلف بین دو سال الگوی یکنواختی نداشت (جداول ۳ و ۴). معنی‌دار شدن اثر سال نشان می‌دهد که شرایط محیطی حاکم بر دوره تشکیل و پر شدن دانه می‌تواند در تعیین وزن نهایی دانه نقش داشته باشد؛ در مقابل، معنی‌دار شدن اثر روی نشان‌دهنده حساسیت این صفت به وضعیت تغذیه‌ای روی است. روی با مشارکت در فعالیت آنزیم‌های مختلف، متابولیسم کربوهیدرات و پروتئین و حفظ عملکرد فتوسنتزی، می‌تواند در تأمین و انتقال مواد پرورده طی پر شدن دانه نقش داشته باشد (Hafeez et al., 2013). در مطالعات انجام‌شده روی لوبیا نیز کاربرد روی، به‌ویژه در مراحل زایشی، با بهبود وزن دانه و برخی اجزای عملکرد همراه بوده است (Jalal et al., 2023; Merkeb and Yoseph, 2024). با این حال، در پژوهش حاضر، عدم معنی‌داری اثر فسفر و کودهای زیستی نشان داد که پاسخ وزن صد دانه به این دو عامل، در دامنه تیمارهای مورد بررسی، محدودتر از پاسخ آن به روی بوده است؛ بنابراین، برخلاف صفاتی که عمدتاً از طریق تغییرات تعداد دانه تحت تأثیر مدیریت تغذیه قرار می‌گیرند، وزن صد دانه در این آزمایش بیشتر تحت تأثیر سال و وضعیت روی قرار گرفت و تغییرات آن را نمی‌توان به اثر مستقل فسفر یا کودهای زیستی نسبت داد.

تعداد دانه در بوته

نتایج تجزیه واریانس مرکب نشان داد که تعداد دانه در بوته تحت تأثیر معنی‌دار با احتمال سطح یک درصد اثرات ساده سال، روی، برهم‌کنش فسفر × روی، سال × فسفر، سال × روی × کودزیستی، فسفر × روی × کودزیستی و سال × فسفر × روی × کودزیستی قرار گرفت (جدول ۲).این نتایج نشان می‌دهد که تعداد دانه در بوته، به‌عنوان یکی از مهم‌ترین اجزای عملکرد، بیش از اثر مستقل هر عامل، به مدیریت تلفیقی عناصر غذایی و شرایط محیطی وابسته است. همان‌طور که در جداول مقایسه میانگین‌ها (جداول ۳ و ۴) مشاهده می‌شود در سال اول تیمارها از نظر تعداد دانه در بوته اختلاف معنی‌داری نداشتند، در عین حال بیشترین مقدار دانه در بوته برابر ۶۴/۳ عدد بود که در تیمار P2Zn3B0 مشاهده شد. هرچند در سال اول تیمارها از نظر تعداد دانه در بوته اختلاف معنی‌داری نداشتند، اما در سال دوم دامنه تغییرات افزایش یافت و بیشترین تعداد دانه در بوته برابر ۵۱/۶ عدد بود که در تیمار P1Zn1B0 مشاهده شد؛ که بیانگر تأثیر شرایط محیطی، به‌ویژه در مراحل گل‌دهی و تشکیل غلاف، بر تشکیل دانه است. اثر مثبت روی را می‌توان به نقش آن در سنتز اکسین، تشکیل و زنده‌مانی دانه گرده، رشد لوله گرده، لقاح و افزایش انتقال مواد فتوسنتزی به اندام‌های زایشی نسبت داد که در نهایت موجب افزایش تشکیل غلاف و کاهش ریزش گل می‌شود. در آزمایشی دلیل افزایش تعداد غلاف، تعداد دانه و عملکرد لوبیا را، استفاده از روی گزارش کردند (Yousefi et al., 2023). معنی‌دار بودن برهم‌کنش فسفر و روی نیز نشان داد که پاسخ گیاه به هر یک از این عناصر به فراهمی عنصر دیگر وابسته است؛ به‌طوری‌که تأمین متعادل آن‌ها با بهبود رشد ریشه و جذب عناصر غذایی، تشکیل غلاف و دانه را

افزایش می‌دهد. این یافته با نتایج (Jalal et al., 2023) مبنی بر اثر هم‌افزایی نانوروی و باکتری‌های محرک رشد بر اجزای عملکرد لوبیا مطابقت دارد. همچنین، اگرچه اثر اصلی کودهای زیستی معنی‌دار نبود، معنی‌دار شدن برخی برهم‌کنش‌ها نشان داد که کارایی آن‌ها به وضعیت تغذیه‌ای و شرایط محیطی وابسته است؛ موضوعی که با گزارش (Yarnia et al., 2024) نیز همخوانی دارد .در مجموع، افزایش عملکرد دانه در این پژوهش عمدتاً از طریق افزایش تعداد دانه در بوته حاصل شد، در حالی که وزن صد دانه تغییر اندکی داشت. بنابراین، مدیریت تلفیقی فسفر، روی و کودهای زیستی بیش از آنکه بر پر شدن دانه مؤثر باشد، بر تشکیل گل، غلاف و بقای دانه‌ها اثر گذاشت و تعداد دانه در بوته مهم‌ترین جزء تبیین‌کننده تغییرات عملکرد دانه بود.

سرعت رشد

نتایج تجزیه واریانس مرکب نشان داد که سرعت رشد تحت تأثیر فسفر، روی و طیف گسترده‌ای از برهم‌کنش‌های این عوامل با یکدیگر، سال و کودهای زیستی قرار گرفت، در حالی‌که اثر اصلی سال و کودهای زیستی و برهم‌کنش سال × روی بر این صفت معنی‌دار نبودند (جدول۲). این الگو بیانگر آن است که سرعت رشد تابع پاسخ یک عامل منفرد نبوده، بلکه تنظیم رشد در نتیجه تعامل وضعیت فسفر و روی با شرایط محیطی و وضعیت زیستی ریزوسفر شکل گرفته است. فسفر از طریق مشارکت در انتقال انرژی، متابولیسم و توسعه ریشه و روی از طریق نقش در فعالیت آنزیم‌ها، تنظیم متابولیسم و عملکرد فتوسنتزی، هر دو در تشکیل ماده خشک نقش دارند؛ از این‌رو، تغییر نسبت این دو عنصر می‌تواند پاسخ رشد را تغییر دهد. در لوبیا نیز نشان داده شده است که کمبود روی می‌تواند طول میان‌گره، کارایی استفاده از نور و حداکثر فتوسنتز را کاهش دهد و اثر فسفر بر وضعیت روی برگ نیز به سطح عرضه روی وابسته است؛ بنابراین، رابطه فسفر و روی الزاماً خطی و مستقل نیست (Gianquinto et al., 2000). نتایج این آزمایش نشان داد که در سال اول بیشترین سرعت رشد برابر ۵/۵ گرم در روز در تیمار $P_2Zn_3B_0$حاصل شد. در این تیمار بذر با کودهای زیستی تلقیح و فسفر ۳۰ درصد بیشتر از آزمون خاک و روی ۳۰ درصد کمتر از آزمون خاک مصرف شده بود. در حالی‌که در سال دوم بیشترین مقدار، ۵/۴۸ گرم در روز، در تیمار $P_1Zn_3B_1$مشاهده شد؛ یعنی فسفر در سطح آزمون خاک، روی ۳۰ درصد کمتر از آزمون خاک و همراه با تلقیح زیستی (جداول ۳ و ۴). از نظر فیزیولوژیک، این وابستگی قابل توجیه است. فسفر کافی می‌تواند رشد ریشه و تأمین انرژی فرایندهای متابولیکی را پشتیبانی کند، در حالی‌که وضعیت مناسب روی برای حفظ عملکرد فتوسنتزی و فعالیت آنزیمی اهمیت دارد. مطالعه (Gianquinto et al., 2000) در لوبیا نشان داد که در شرایط عرضه پایین روی، افزایش فسفر می‌تواند غلظت روی برگ را کاهش دهد و کاهش وضعیت روی با افت فتوسنتز و برخی شاخص‌های رشد همراه شود؛ بنابراین، افزایش فسفر لزوماً به معنای افزایش رشد نیست و باید در ارتباط با وضعیت روی تفسیر شود. کودهای زیستی نیز احتمالاً از طریق تغییر فراهمی عناصر غذایی، توسعه ریشه و تنظیم فرایندهای رشد می‌توانند این روابط را تعدیل کنند. در لوبیا، سویه‌های دارای توانایی حل‌کنندگی فسفات و کاربرد آنها می‌تواند رشد، جذب فسفر و رنگیزه‌های فتوسنتزی را بهبود دهند (Bedine et al., 2022). همچنین گزارش کرده‌اند که کاربرد روی همراه با تلقیح باکتری‌های محرک رشد در لوبیا می‌تواند ارتفاع، ماده خشک و برخی شاخص‌های کارایی مصرف روی را افزایش دهد (Jalal et al., 2023). با این حال، پاسخ این عوامل در سال‌های مختلف یکسان نبود. این یافته‌ها با نتایج حاضر همخوانی دارد، زیرا در این آزمایش نیز اثر اصلی کود زیستی معنی‌دار نبود، اما برهم‌کنش‌های آن با فسفر، روی و سال معنی‌دار بودند؛ بنابراین، نقش کود زیستی را نباید به‌عنوان یک عامل مستقل، بلکه به‌عنوان عاملی تعدیل‌کننده پاسخ گیاه به شرایط تغذیه‌ای تفسیر کرد. در مجموع، نتایج نشان داد که

سرعت رشد در لوبیا به تعامل فسفر، روی و کود زیستی حساس بود و افزایش مقدار مصرف یک عنصر به‌تنهایی الزاماً رشد را افزایش نداد. جالب آنکه بیشترین سرعت رشد در هر دو سال در سطح ۳۰ درصد کمتر از آزمون خاک برای روی مشاهده شد، اما ترکیب فسفر و کود زیستی در دو سال متفاوت بود؛ بنابراین، یافته‌های حاضر بیشتر از «افزایش مصرف نهاده‌ها»، بر تناسب بین سطوح مصرف عناصر و استفاده هدفمند از کودهای زیستی تأکید دارد.

درجه‌روز رشد(Growing Degree Days; GDD)

درجه‌روز رشد (GDD) شاخصی کارآمد برای توصیف سرعت نمو گیاه است، زیرا تجمع انرژی حرارتی مورد نیاز برای تکمیل مراحل فنولوژیک را نشان می‌دهد و نسبت به‌طول دوره تقویمی، معیار دقیق‌تری برای مقایسه رشد در شرایط محیطی مختلف محسوب می‌شود (McMaster and Wilhelm, 1997). در این پژوهش، طول دوره رشد لوبیا در سال‌های اول و دوم به‌ترتیب ۱۰۴ و ۱۰۵ روز بود و درجه‌روز رشد تجمعی به‌ترتیب ۱۰۵۶/۵ و ۱۰۸۸/۵ درجه‌روز (جداول ۵ و۶) محاسبه شد. این مقادیر کمتر از دامنه ۱۲۰۰ تا ۱۶۰۰ درجه‌روز گزارش‌شده برای لوبیا هستند (White and Izquierdo, 1991) که احتمالاً ناشی از تفاوت رقم، شرایط اقلیمی، تاریخ کاشت و مدیریت زراعی است. از آنجا که نیاز حرارتی گیاه، حاصل برهم‌کنش ژنوتیپ و محیط است، تغییرات دمایی منطقه و افزایش دما در اواخر فصل رشد می‌تواند با تسریع فرآیندهای متابولیکی، طول دوره رشد را کاهش دهد (Wang et al., 2017؛Summerfield et al., 1991). بیشترین تجمع درجه‌روز رشد در مراحل آغاز گل‌دهی (R5)و پر شدن دانه (R8) مشاهده شد که بیانگر حساسیت بالای این مراحل به‌شرایط حرارتی است. هرگونه تنش دمایی در این مراحل می‌تواند از طریق کاهش تشکیل گل، محدود شدن انتقال مواد فتوسنتزی و کاهش تجمع ماده خشک، عملکرد نهایی را تحت تأثیر قرار دهد (Prasad et al., 2002؛Dapaah et al., 2000). ازسوی دیگر، تأمین متعادل فسفر و روی با بهبود انتقال انرژی، توسعه ریشه، فعالیت آنزیمی و تنظیم رشد، می‌تواند روند تکمیل مراحل فنولوژیک را تسریع کند، در حالی که کمبود این عناصر معمولاً موجب تأخیر در نمو گیاه می‌شود (Vance et al., 2003؛Cakmak, 2008). همچنین، کودهای زیستی از طریق افزایش جذب عناصر غذایی، توسعه سیستم ریشه و بهبود همزیستی میکوریزی، کارایی تغذیه‌ای گیاه را افزایش داده و می‌توانند زمان لازم برای رسیدن به مراحل مختلف رشد را کاهش دهند (Begum et al., 2019). از دیدگاه کاربردی، نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که مدیریت متعادل تغذیه، علاوه بر افزایش کارایی رشد، می‌تواند با تسریع تکمیل مراحل فنولوژیک، احتمال مواجه شدن مراحل حساس رشد با تنش‌های دمایی پایان فصل را کاهش دهد؛ بنابراین، استفاده تلفیقی از کودهای شیمیایی و زیستی می‌تواند راهبردی مناسب برای افزایش سازگاری لوبیا در مناطق با فصل رشد محدود باشد.

جدول ۵- درجه روز رشد (GDD) تجمعی دوره رشد لوبیا در شهرستان اقلید در سال اول آزمایش.

Table 5. Growth degree days of Bean in Eqlid city in first year of the experiment.

مهر October	شهریور September	مرداد August	تیر July	خرداد June	روز Day
9	9.5	12	10.5	-	1
9	9.5	12.5	10	-	2
9	7.5	11	10.5	-	3
9	8	10	10	-	4
-	7	13	10	-	5
-	7.5	13	10	-	6
-	8	12.5	10	-	7
-	8.5	۱۲	10.5	-	8
-	8.5	12.5	10	-	9
-	9	10.5	10.5	-	10
-	8.5	11.5	10.5	-	11
-	8.5	10.5	12	-	12
-	9	11.5	11.5	-	13
-	9	11	12	-	14
-	9.5	11	11	-	15
-	10	11	14	-	16
-	10	11	13	-	17
-	9.5	12	12.5	-	18
-	9.5	12.5	12	-	19
-	10	11	12.5	-	20
-	9.5	13	12.5	-	21
-	9	8.5	10	-	22
-	9	10	9.5	-	23
-	9	10	10	-	24
-	9	10	9.5	10	25
-	8.5	10	9.5	10	26
-	8.5	8.5	10	10	27
-	10	10	10	10.5	28
-	8.5	9	10	10	29
-	8.5	9.5	10	11	30
-	8	9.5	10.5	10.5	31
36	274	340	334.5	72	مجموع
1056.5					Total

جدول ۶- درجه روز رشد (GDD) تجمعی دوره رشد لوبیا در شهرستان اقلید در سال دوم آزمایش .

Table 6. Growth degree days of Bean in Eqlid city in second year of the experiment.

روز Day	خرداد June	تیر July	مرداد August	شهریور September	مهر October
1	-	10.5	17.5	10	7.5
2	-	10.5	16.5	11	6.5
3	-	9.5	17	11.5	5.5
4	-	10	14	11.5	6.5
5	-	11.5	13.5	11	5
6	-	11.5	13	10	-
7	-	11.5	12.5	9	-
8	-	13	12.5	10.5	-
9	-	9.5	13	10.5	-
10	-	10	12.5	10	-
11	-	10	11	10.5	-
12	-	11.5	12	11.5	-
13	-	10.5	12.5	13	-
14	-	12.5	11	10	-
15	-	12	10.5	9.5	-
16	-	11	10	11.5	-
17	-	11.5	11	11	-
18	-	11.5	14	10.5	-
19	-	12	10	10	-
20	-	11	8.5	8.5	-
21	-	11	8.5	10.5	-
22	-	12	8	10	-
23	-	12	7	9.5	-
24	-	11.5	7.5	8.5	-
25	10	11	5	8	-
26	9	12.5	5.5	7	-
27	8	11.5	5.5	6.5	-
28	7	11.5	6	6	-
29	8.5	13	8	7	-
30	10	13.5	11	7.5	-
31	10	14	10.5	8	-
مجموع Total					1088.5

عناصر غذایی دانه، پروتئین و کلونیزاسیون ریشه

عناصر غذایی دانه

همانگونه که در بخش مواد و روش‌ها ذکر گردید، نتایج درصد نیتروژن، فسفر، پتاسیم، روی، پروتئین دانه و درصد کلنیزاسیون ریشه در سال اول قابل تجزیه آماری نبود و در این صفات فقط از نتایج سال دوم استفاده شده است. یکی از شاخص‌های مهم پایداری گیاه در برابر تنش‌های محیطی، جذب و تجمع عناصر غذایی است. گیاهانی که قادر به جذب و تجمع بیشتر عناصر غذایی در طول دوره رشد در اندام خود باشند، در مقابل تنش‌های محیطی مقاومت بیشتری خواهند داشت. نتایج تجزیه واریانس مرکب نشان داد که از نظر آماری اختلاف معنی-داری بین تیمارها در مقدار نیتروژن، روی، فسفر، پتاسیم و پروتئین دانه وجود نداشت (جدول ۷). ولی آزمون مقایسه میانگین‌ها (LSD) نشان داد که در مقدار فسفر و پتاسیم دانه بین تیمارها اختلاف معنی‌دار بود (جدول ۸). بطوریکه تیمار P1Zn2B1 (مصرف فسفر بر اساس آزمون خاک و روی ۳۰ درصد کمتر از آزمون خاک همراه با تلقیح بذر با کودهای زیستی) منجر به حصول بیشترین مقدار فسفر در دانه به میزان ۰/۳۹ درصد شده است. بیشترین مقدار پتاسیم دانه برابر ۱/۹ درصد نیز در تیمار P2Zn3B0 (مصرف ۳۰ درصد فسفر بیشتر از آزمون خاک و روی ۳۰ درصد کمتر

از آزمون خاک و بدون تلقیح بذر) مشاهده شد (جدول ۸). این نتایج نشان می‌دهد که مدیریت تلفیقی عناصر غذایی، در شرایط این پژوهش، بیشتر فرآیندهای جذب، انتقال و باز توزیع عناصر را طی رشد تحت تأثیر قرار داده تا تجمع نهایی آن‌ها در دانه. در گیاهان لگومی، انتقال مجدد عناصر از اندام‌های رویشی به دانه تحت کنترل سازوکارهای فیزیولوژیکی پیچیده است؛ بنابراین افزایش جذب عناصر الزاماً به افزایش غلظت آن‌ها در دانه منجر نمی‌شود(Begum et al., 2019; Smith and Smith, 2011.) در این مورد می‌توان به این نکته هم اشاره نمود که اگرچه قارچ‌های میکوریز آربوسکولار با افزایش جذب عناصر غذایی، به‌ویژه فسفر، نقش مهمی در بهبود تغذیه و رشد گیاه دارند، اما افزایش جذب عناصر الزاماً به افزایش غلظت آن‌ها در دانه یا سایر اندام‌های گیاه منجر نمی‌شود و این پاسخ به عواملی مانند افزایش زیست‌توده، الگوی تخصیص عناصر و شرایط رشد بستگی دارد (Smith et al., 2011; Smith and Smith, 2011a, b). نتایج مقایسه میانگین‌ها (جدول۸) نیز اختلاف معنی‌داری در غلظت عناصر و پروتئین دانه بین تیمارها نشان نداد که احتمالاً ناشی از حاصلخیزی مناسب خاک و سازوکارهای تنظیمی گیاه در حفظ تعادل تغذیه‌ای دانه بوده است. در چنین شرایطی، بخشی از عناصر جذب‌شده صرف رشد رویشی و فعالیت‌های متابولیکی شده و تغییری در غلظت نهایی عناصر دانه ایجاد نمی‌کند؛ الگویی که در سایر مطالعات نیز گزارش شده است (Begum et al., 2019; Ben Mrid et al., 2022). عدم تغییر معنی‌دار پروتئین دانه (جدول۷) نیز با ثابت ماندن غلظت نیتروژن قابل انتظار بود، زیرا تجمع پروتئین به نیتروژن ذخیره‌شده در مراحل پایانی رشد وابسته است. اگرچه کودهای زیستی می‌توانند از طریق بهبود رشد ریشه، تثبیت زیستی نیتروژن و جذب عناصر غذایی وضعیت تغذیه‌ای گیاه را ارتقا دهند، در خاک‌های فاقد محدودیت شدید تغذیه‌ای این اثرات لزوماً به افزایش پروتئین دانه منجر نمی‌شود (Ben Mrid et al., 2022; Sharma et al., 2023).

جدول ۷- تجزیه واریانس تأثیر تیمارها بر غلظت عناصر غذایی و پروتئین دانه و کلونیزاسیون ریشه.

Table 7. Analysis of variance of the effects of treatments on seed nutrient concentrations, seed protein content and root colonization.

منابع تغییر Sources of change	درجه آزادی Degree of Freedom	میانگین مربعات Mean Squares					
		نیتروژن Nitrogen	فسفر Phosphorus	پتاسیم Potassium	روی Zinc	پروتئین دانه Seed Protein	کلونیزاسیون ریشه Root colonization
تکرار Replication	2	0.20	0.0003	0.010 ns	0.89	7.91	105.12
فسفر Phosphorus	2	0.17ns	0.0001ns	0.006ns	1.37ns	6.88ns	937.71**
روی Zinc	2	0.15 ns	0.0001 ns	0.011 ns	4.91 ns	5.99 ns	2.65 ns
فسفر×روی Phosphorus × Zinc	4	0.07 ns	0.0001 ns	0.010 ns	2.83 ns	3.16 ns	284.86**
کود زیستی Biofertilizer	1	0.02 ns	0.0003 ns	0.001 ns	1.44 ns	1.01 ns	1608.00**
فسفر ×کود زیستی Phosphorus× Biofertilizer	2	0.01 ns	0.0001 ns	0.002 ns	0.40 ns	0.42 ns	449.26**
کود زیستی ×روی Biofertilizer × Zinc	2	0.11 ns	0.0001 ns	0.006 ns	0.36 ns	4.48 ns	18.84ns
کود زیستی × فسفر× روی Phosphorus×Zinc ×Biofertilizer	4	0.04 ns	0.0002 ns	0.013 ns	0.92 ns	1.64ns	672.51**
خطا Error	34	0.236	0.0003	0.005	0.12	9.25	44.54
ضریب تغییرات Coefficient of Variation		15.9	4.8	4.2	5.9	15.9	13.1

*و** به ترتیب معنی‌دار در سطح ۵ درصد٪ و ۱ درصد٪ احتمال آماری و ns معنی دارنیست.

*, ** Indicates that the effect of the experimental factors is significant at the 5% and 1% probability level and ns isn't significant.

جدول ۸- مقایسه میانگین غلظت عناصر غذایی و پروتئین دانه و درصد کلونیزاسیون ریشه.

Table 8. Mean comparison of the seed nutrient elements, Protein and root colonization.

ردیف Row	تیمار Treatment	نیتروژن Nitrogen (%)	فسفر Phosphoruse (%)	پتاسیم Potassium (%)	روی Zinc (ppm)	پروتئین دانه Seed Protein (%)	کلونیزاسیون ریشه Root colonization (%)
1	$P_1Zn_1B_0$	3.1 a	0.37 ab	1.7 bcd	31 a	19.4 a	55.5 cde
2	$P_1Zn_1B_1$	3.1 a	0.38 ab	1.7 d	30.6 a	19.5 a	51.3 cde
3	$P_1Zn_2B_0$	2.8 a	0.38 ab	1.7 bcd	30.6 a	17.8 a	60.4 bcd
4	$P_1Zn_2B_1$	2.9 a	0.39 a	1.7 bcd	30.3 a	18.3 a	70 ab
5	$P_1Zn_3B_0$	3.2 a	0.38 ab	1.7 bcd	29 a	20 a	72.7 a
6	$P_1Zn_3B_1$	3.4 a	0.37 ab	1.8 ab	29 a	21.2 a	40 fg
7	$P_2Zn_1B_0$	3.1 a	0.38 ab	1.7 bcd	30 a	19.5 a	61.2 bc
8	$P_2Zn_1B_1$	2.9 a	0.37 ab	1.7 bcd	29 a	18.1 a	49.7 def
9	$P_2Zn_2B_0$	3 a	0.37 ab	1.7 bcd	29.6 a	18.8 a	47.2 ef
10	$P_2Zn_2B_1$	3.3 a	0.37 ab	1.8 ab	29.3 a	20.6 a	52.3 cde
11	$P_2Zn_3B_0$	3.1 a	0.37 ab	1.9 a	29.3 a	19.4 a	46.3 efg
12	$P_2Zn_3B_1$	3.2 a	0.38 ab	1.7 bcd	30.3 a	19.9 a	46.6 efg
13	$P_3Zn_1B_0$	2.9 a	0.36 b	1.7 bcd	31 a	18.2 a	49.5 def
14	$P_3Zn_1B_1$	2.7 a	0.38 ab	1.7 bcd	30.3 a	17.4 a	35.7 g
15	$P_3Zn_2B_0$	2.9 a	0.38 ab	1.8 ab	29.3 a	18.5 a	60.4 bcd
16	$P_3Zn_2B_1$	2.8 a	0.38 ab	1.8 ab	29.3 a	18 a	16.7 h
17	$P_3Zn_3B_0$	2.9 a	0.37 ab	1.7 bcd	29.6 a	18.2 a	54.4 cde
18	$P_3Zn_3B_1$	3.1 a	0.37 ab	1.7 bcd	28.3 a	19.6 a	46.8 ef
	LSD	0.32	0.1	0.55	1.95	2.06	4.2

میانگین‌های با حروف مشابه اختلاف معنی‌داری ندارند.P_1 : فسفر بر اساس آزمون خاک، P : فسفر ۳۰ درصد بیشتر از آزمون خاک، P_3 : فسفر ۳۰ درصد کمتر از آزمون خاک،Zn_1 : روی بر اساس آزمون خاک، Zn_2 : روی ۳۰ درصد بیشتر از آزمون خاک، Zn_3 : روی ۳۰ درصد کمتر از آزمون خاک، B_1 و B_0 : به‌ترتیب مایه زنی بذر با کودهای زیستی و عدم مایه‌زنی. (در هر ستون میانگین‌های با حروف یکسان ناهمانندی چشمگیری ندارند).

Means with the same letters are not significantly different. P_1: phosphorus based on the soil test; P_2: phosphorus at 30% above the soil-test recommendation; P_3: phosphorus at 30% below the soil-test recommendation; Zn_1: zinc based on the soil test; Zn_2: zinc at 30% above the soil-test recommendation; Zn_3: zinc at 30% below the soil-test recommendation; B_1 and B_0: seed inoculation with biofertilizers and no seed inoculation, respectively. (Within each column, means followed by the same letter are not significantly different.)

درصد پروتئین دانه

جدول تجزیه واریانس آزمایش نشان داد که اثر تیمار ها در پروتئین دا نه معنی‌دار نبود (جدول ۷). در آزمون مقایسه میانگین‌ها، بیشترین درصد پروتئین برابر ۲۱/۲ درصد در تیمار $P_1Zn_3B_1$ بود. در این تیمار فسفر بر اساس آزمون خاک و روی ۳۰ درصد کمتر از میزان توصیه بر اساس آزمون خاک مصرف شده و بذر با کودهای زیستی نیز تلقیح شده بود (جدول ۸). عدم تغییر معنی‌دار پروتئین دانه بین تیمارها نیز با ثابت ماندن غلظت نیتروژن قابل انتظار بود، زیرا تجمع پروتئین به نیتروژن ذخیره‌شده در مراحل پایانی رشد وابسته است. اگرچه کودهای زیستی می‌توانند از طریق بهبود رشد ریشه، تثبیت زیستی نیتروژن و جذب عنا صر غذایی و ضعیت تغذیه‌ای گیاه را ارتقا دهند، در خاک‌های فاقد محدودیت شدید تغذیه‌ای این اثرات لزوماً به افزایش پروتئین دانه منجر نمی‌شود (Ben Mrid et al., 2022; Sharma et al., 2023).

درصد کلونیزاسیون ریشه

بر اساس نتایج جدول تجزیه واریانس (جدول۷)، درصد کلونیزاسیون ریشه به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر فسفر، کودهای زیستی و برهم‌کنش‌های فسفر × روی، فسفر × کود زیستی و برهم‌کنش سه‌گانه قرار گرفت. این نتایج نشان داد که استقرار همزیستی میکوریزایی در شرایط این آزمایش تابع یک عامل تغذیه‌ای منفرد نبوده و تحت تأثیر تعامل وضعیت تغذیه‌ای گیاه و عوامل زیستی ریزوسفر قرار داشته است. بر اساس آزمون مقایسه میانگین‌ها (جدول ۸)، بیشترین مقدار کلونیزاسیون ریشه برابر ۷۲/۷ درصد در تیمار $P_1Zn_3B_0$ بود که از نظر آماری با تیمار $P_1Zn_2B_1$ با

۷۰ درصد کلونیزاسیون تفاوت معنی‌داری نداشت؛ بنابراین، با وجود اختلاف عددی، نمی‌توان برتری یکی از این دو تیمار را از نظر کلونیزاسیون ریشه مطرح کرد. میزان کلونیزاسیون ۷۰ تا ۷۳ درصدی مشاهده‌شده در برخی تیمارها از مقادیر ۳۰ تا ۴۰ درصد گزارش‌شده برای لوبیا در برخی مطالعات (Hemmati et al., 2017; Mohammadi, 2014) بیشتر بود. با این حال، مقایسه مستقیم این مقادیر باید با احتیاط انجام شود، زیرا کلونیزاسیون به‌ویژگی‌های گیاه و قارچ، شرایط خاک، رطوبت و وضعیت تغذیه‌ای وابسته است (Choi et al., 2018; Begum et al., 2019). کلونیزاسیون بالای تیمار P1Zn3B0، با وجود عدم مصرف کود زیستی، نیز می‌تواند بدلیل طبیعی بودن خاک (عدم‌استریل خاک)، ناشی از حضور و فعالیت جمعیت‌های بومی قارچ‌های میکوریزایی باشد. وضعیت فسفر یکی از عوامل مهم تنظیم‌کننده همزیستی میکوریزایی است؛ محدودیت فسفر می‌تواند از طریق تغییر سیگنال‌های ریشه‌ای، از جمله استریگولاکتون‌ها، بر برقراری ارتباط گیاه و قارچ و توسعه کلونیزاسیون اثر بگذارد (Akiyama et al., 2005)؛ بنابراین، تغییرات کلونیزاسیون در تیمارهای فسفری ممکن است ناشی از تغییر در وضعیت تغذیه‌ای و پاسخ همزیستی گیاه باشد؛ بااین‌حال، از آنجا که ترکیبات سیگنال‌دهنده و شاخص‌های مستقیم این فرایند در آزمایش حاضر اندازه‌گیری نشده‌اند، نسبت دادن تغییرات کلونیزاسیون به افزایش استریگولاکتون‌ها قطعی نیست. معنی‌دار شدن برهم‌کنش فسفر × روی و برهم‌کنش سه‌گانه نیز نشان می‌دهد که پاسخ کلونیزاسیون به یک عنصر غذایی به سطح سایر عوامل تغذیه‌ای و زیستی وابسته است. همچنین، کاهش کلونیزاسیون در برخی تیمارهای تلقیح‌شده را نمی‌توان صرفاً به رقابت میان میکروارگانیسم‌های ریزوسفر نسبت داد، زیرا جمعیت و فعالیت آنها اندازه‌گیری نشده است. در مجموع، نتایج نشان می‌دهد که کلونیزاسیون ریشه حاصل تعامل وضعیت تغذیه‌ای گیاه، جمعیت‌های میکوریزایی بومی و تلقیحی و شرایط ریزوسفر بوده است.

ارزیابی اقتصادی تیمارهای آزمایش

از بعد اقتصادی توجه به این نکته ضروری است که در این مطالعه از میان نهاده‌های تولید، صرفاً مقدار کود مصرفی در بین تیمارها متغیر بوده و این امر موجب گردیده که هزینه متغیر بین تیمارها صرفاً هزینه کودهای مصرفی و هزینه عملیات کودپاشی باشد و هزینه سایر عملیات‌ها با تغییر در تیمارها، ثابت بوده و تغییر نکند. بدین ترتیب، مجموع هزینه‌های غیرمشترک بین تیمارها فقط دربرگیرنده هزینه خرید کود و هزینه عملیات کودپاشی است. لذا به‌دلیل این که کل هزینه‌های تولید احصا نشده است، بلکه صرفاً داده‌های مربوط به هزینه کود موجود است، بر این اساس، در این پروژه امکان محاسبه شاخص نسبت منفعت به هزینه وجود ندارد. بر اساس نتایج آزمایش، از نظر درآمدی، تیمار P3Zn3B0 با درآمدی معادل ۱۴۹۴/۵۰ میلیون ریال در هکتار، دارای بیشترین درآمد و تیمار P3Zn2B0 با درآمد ۳۷۴/۵۰ میلیون ریال در هکتار، کمترین درآمد را به خود اختصاص داده‌اند. سایر تیمارها از لحاظ درآمدی در بین این دو تیمار قرار گرفته‌اند. از بعد هزینه، کمترین هزینه مربوط به تیمار P3Zn3B1 با هزینه‌ای معادل ۱۷۱/۳۵ میلیون ریال در هکتار و بیشترین هزینه مربوط به تیمار P2Zn2B0 با هزینه‌ای معادل ۳۴۵/۵۰ میلیون ریال در هکتار است. بدین ترتیب، از بعد درآمدی بهترین تیمار، تیمار P3Zn3B0 و از بعد هزینه، بهترین تیمار P3Zn3B1 هستند. تیمار P3Zn3B0 با بازده ناخالص ۱۲۵۵/۸۰ ریال در هکتار دارای بیشترین و تیمار P3Zn2B0 با بازده ناخالص ۱۱۹ میلیون ریال در هکتار دارای کمترین بازده ناخالص اقتصادی هستند. همچنین از نظر تغییرات بازده ناخالص نسبت به تیمار اول (به‌عنوان تیمار شاهد)، تیمار و نرخ این تغییرات تیمار P3Zn3B0 بهترین تیمار اقتصادی است. در این تیمار مقدار ۱۷۵ کیلوگرم سوپر فسفات تریپل، ۲۸ کیلوگرم سولفات روی و ۵۰ کیلوگرم کود اوره مصرف شده و عملکردی معادل ۲۱۳۵ کیلوگرم دانه لوبیا داشت.

لازم به ذکر است که این تیمار با هزینه‌ای معادل ۱۷۹/۷۵ میلیون ریال در هکتار، پس از تیمار P3Zn3B1، در زمره کم هزینه‌ترین تیمارهای مطالعه، قرار دارد. در تیمار P3Zn3B0 مقدار مصرف کودهای فسفر و روی ۳۰ درصد کمتر از آزمون خاک بود. همچنین بذر با کودهای زیستی در هنگام کاشت تلقیح نشده است. از نظر اقتصادی بعد از تیمار P3Zn3B0 تیمار P2Zn1B1 قرار دارد. در این تیمار مصرف فسفر۳۰ درصد بیشتر از آزمون خاک و مصرف روی بر اساس آزمون خاک بود و بذر با کودهای زیستی شامل باکتری ریزوبیوم، باکتری ازتوباکتر و قارچ مایکوریزا تلقیح شده بود.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این پژوهش نشان داد که پاسخ لوبیا به مدیریت تغذیه حاصل برهم‌کنش پیچیده میان فسفر، روی، کودهای زیستی و شرایط محیطی است و بررسی هر یک از این عوامل به‌صورت مستقل نمی‌تواند رفتار واقعی گیاه را تبیین کند. معنی‌دار بودن اغلب اثرات متقابل نیز بیانگر آن بود که کارآیی عناصر غذایی و کودهای زیستی به وضعیت تغذیه‌ای گیاه و شرایط محیطی وابسته است. در میان عوامل مورد بررسی، فسفر مهم‌ترین عامل محدودکننده تولید در خاک مورد مطالعه بود و مدیریت متعادل آن نقش تعیین‌کننده‌ای در افزایش عملکرد دانه داشت، در حالی که روی عمدتاً از طریق بهبود اجزای عملکرد، به‌ویژه وزن صد دانه و تنظیم رشد، موجب افزایش بهره‌وری گیاه شد. افزایش عملکرد دانه نیز بیشتر ناشی از افزایش تعداد دانه در بوته بود تا افزایش وزن صددانه که اهمیت بیشتر اجزای زایشی در پاسخ به مدیریت تغذیه را نشان می‌دهد. اگرچه کودهای زیستی موجب بهبود برخی صفات رویشی و افزایش کلونیزاسیون ریشه شدند، اما اثر آن‌ها بر عملکرد و غلظت عناصر غذایی دانه پایدار نبود و به شرایط محیطی، ویژگی‌های خاک و جمعیت میکروبی بومی وابسته بود. همچنین، عدم انطباق تیمارهای دارای بیشترین سرعت رشد با تیمارهای دارای بیشترین عملکرد نشان داد که افزایش رشد رویشی به‌تنهایی تضمین‌کننده افزایش عملکرد نیست و کارآیی انتقال ماده خشک به اندام‌های زایشی نقش مهم‌تری در تولید نهایی دارد. افزون بر این، مدیریت متعادل تغذیه با تنظیم روند فنولوژیک، احتمال مواجهه مراحل حساس رشد با تنش‌های دمایی پایان فصل را کاهش داده و سازگاری گیاه را در شرایط اقلیمی مشابه بهبود می‌بخشد. این نتایج همچنین نشان می‌دهد که موفقیت برنامه‌های تغذیه‌ای در چنین خاک‌هایی بیش از افزایش مقدار نهاده‌ها، به ایجاد تعادل تغذیه‌ای، بهره‌گیری از برهم‌کنش‌های مثبت میان عناصر غذایی و فرآیندهای زیستی ریزوسفر و هماهنگی آن‌ها با شرایط محیطی وابسته است.

تشکر و قدردانی

اندازه‌گیری درصد کلونیزاسیون ریشه و تهیه‌ی مایه‌های تلقیح توسط بخش تحقیقات بیولوژی و بیوتکنولوژی مؤسسه تحقیقات خاک وآب انجام شده است که مراتب تشکر و سپاسگزاری به‌عمل می‌آید.

References

1. Akiyama, K., Matsuzaki, K. and Hayashi, H. 2005. Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi, Nature, 435(7043), pp. 824–827. https://doi.org/10.1038/nature03608
2. Amiri, S., 2021. Application of bio-fertilizers for enhancing growth and yield of common bean plants grown under water stress conditions, Saudi Journal of Biological Sciences, 28, pp. 3901–3908. https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.03.044
3. Barbosa, N., Portilla, E., Buendía, F., Raatz, B., Beebe, S. and Rao, I., 2018. Genotypic differences in symbiotic nitrogen fixation ability and seed yield of climbing bean', Plant and Soil, 428, pp. 223–239. https://doi.org/10.1007/s11104-018-3668-6
4. Bedine, M. A. B., Iacomi, B., Tchameni, S. N., Sameza, M. L., & Fekam, F. B. (2022). Harnessing the phosphate-solubilizing ability of Trichoderma strains to improve plant growth, phosphorus uptake and photosynthetic pigment contents in common bean (Phaseolus vulgaris). Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 45, 102510.
5. Beebe, S., Rao, I.M., Blair, M.W. and Acosta-Gallegos, J.A., 2013. Phenotyping common beans for adaptation to drought, Frontiers in Physiology, 4, Article 35. https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00035
6. Begum, N., Qin, C., Ahanger, M.A., Raza, S., Khan, M.I., Ashraf, M., Ahmed, N. and Zhang, L., 2019. Role of arbuscular mycorrhizal fungi in plant growth regulation: Implications in abiotic stress tolerance', Frontiers in Plant Science, 10, Article 1068. https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01068
7. Ben Mrid, R., El Omari, N., Balahbib, A., Bakrim, S., Abdelouahid, D.E., Zengin, G., Bouyahya, A. and Bnouham, M., 2022. Biofertilizers as a sustainable tool for improving soil fertility and crop productivity: Current status and future perspectives', Sustainability, 14(23), Article 15849.
8. Bouain, N., Shahzad, Z., Rouached, A., Khan, G. A., Berthomieu, P., Abdelly, C., ... & Rouached, H. (2014). Phosphate and zinc transport and signalling in plants: toward a better understanding of their homeostasis interaction. Journal of experimental botany, 65(20), 5725-5741.
9. Bremner, J.M., 1996. Nitrogen-total, in Sparks, D.L. (ed.) Methods of Soil Analysis. Part 3: Chemical Methods. Madison, WI: Soil Science Society of America and American Society of Agronomy, pp. 1085–1122. https://doi.org/10.2136/sssabookser5.3.c37
10. Cakmak, I., 2008. Enrichment of cereal grains with zinc: Agronomic or genetic biofortification, Plant and Soil, 302, pp. 1–17. https://doi.org/10.1007/s11104-007-9466-3
11. Campbell, D.C. and Kondra, Z.P., 1978. Relationships among growth patterns, yield components and yield of rapeseed', Canadian Journal of Plant Science, 58, pp. 87–93. https://doi.org/10.4141/cjps78-013
12. Choi, J., Summers, W. and Paszkowski, U., 2018. Mechanisms underlying establishment of arbuscular mycorrhizal symbioses, Annual Review of Phytopathology, 56, pp. 135–160.
13. Daemo, B.B., Wolancho, G.B. and Wakalto, D.D., 2024. Determination of the appropriate blended inorganic fertilizer rate recommendation for the optimal common bean (Phaseolus vulgaris L.) grain yield and profitability in the Dawuro Zone, Ethiopia. International Journal of Agronomy, 2024, 7169608. https://doi.org/10.1155/2024/7169608
14. Dapaah, H.K., McKenzie, B.A. and Hill, G.D., 2000. Influence of sowing date on phenological development and yield of common bean (Phaseolus vulgaris L.) in Canterbury, New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 28, pp. 1–9.
15. Gianquinto, G., Abu-Rayyan, A., Di Tola, L., Piccotino, D., & Pezzarossa, B. (2000). Interaction effects of phosphorus and zinc on photosynthesis, growth and yield of dwarf bean grown in two environments. Plant and Soil, 220(1), 219-228.
16. Heinrich, A., Sullivan, D. and Peachey, E., 2013. Improving fertilizer P and N

use efficiency in sweet corn. Research Report to the Oregon Processed Vegetable Commission.
17. Hemmati, A., 2004. Study the application of micronutrients in yield and quality of pinto bean. Final Research Report No. 1192. Tehran: Soil and Water Research Institute. (In Persian).
18. Hemmati, A. and Nasrollahi, Kh., 2009. Determination of phosphorus and potassium requirement for Prosper white bean line of Jules. Final Research Report No. 88/638. Tehran: Soil and Water Research Institute. (In Persian).
19. Hemmati, A., Feizian, M., Asadi Rahmani, H. and Azizi, Kh., 2017. The effects of rhizobium bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi on water use efficiency and yield of common bean under drought stress conditions. PhD dissertation. Khorramabad: Lorestan University, Iran.
20. Hemmati, A., Barkhordar, M. and Hemmati, S., 2020. Effect of Rhizobium (R. leguminosarum bv. *phaseoli*) and arbuscular mycorrhizal fungi on yield and decreasing nitrogen application of pinto bean in Fars Province. Final Research Report No. 57885. Tehran: Soil and Water Research Institute. (In Persian).
21. Henson, R.A. and Bliss, F.A., 1991. Effects of N fertilizer application timing on common bean production, Fertilizer Research, 29, pp. 133–138. https://doi.org/10.1007/BF01048989
22. Jalal, A., Mortinho, E.S., Oliveira, C.E.S., Fernandes, G.C., Furlani Junior, E., Lima, B.H., Moreira, A., Nogueira, T.A.R., Galindo, F.S. and Teixeira Filho, M.C.M., 2023. Nano-zinc and plant growth-promoting bacteria is a sustainable alternative for improving productivity and agronomic biofortification of common bean', Chemical and Biological Technologies in Agriculture, 10(77).
23. Jarak, M., Jafari, T.H. and Djuric, S., 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria in bean production, Acta Horticulturae, 960, pp. 409–415. https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2012.960.58
24. Jarak, M., Mrkovacki, N., Bjelic, D., Josic, D., Hajnal-Jafari, T. and Stamenov, D., 2012. Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on growth and yield of bean', African Journal of Microbiology Research, 6(11), pp. 2784–2788. https://doi.org/10.5897/AJMR11.1406
25. Jithesh, T., James, E.K., Iannetta, P.P.M., Howard, B., Dickin, E. and Monaghan, J.M., 2024. Recent progress and potential future directions to enhance biological nitrogen fixation in faba bean (Vicia faba L.)', Plant-Environment Interactions, 5(3), e10145. https://doi.org/10.1002/pei3.10145
26. Kader, M.A., Mian, M.H. and Hoque, M.S., 2002. Effects of Azotobacter inoculant on the yield and nitrogen uptake by wheat, Journal of Biological Sciences, 2(4), pp. 259–261.
27. McMaster, G.S. and Wilhelm, W.W., 1997. Growing degree-days: One equation, two interpretations, Agricultural and Forest Meteorology, 87, pp. 291–300. https://doi.org/10.1016/S0168-1923(97)00027-0
28. Merkeb, F. and Yoseph, T., 2024. Improving nutritional values and yield in common bean (Phaseolus vulgaris L.) cultivars via foliar application of zinc and iron fertilizers. Crop, Forage & Turfgrass Management, 10(2), e70004. https://doi.org/10.1002/cft2.70004
29. Nyoki, D. and Ndakidemi, P.A., 2021. Will phosphate bio-solubilization stimulate biological nitrogen fixation in grain legumes, Frontiers in Agronomy, 3, 637196. https://doi.org/10.3389/fagro.2021.637196
30. Onyango Ogutu, P., 2013. Effect of integrated nutrient management on growth and yield of navy bean (Phaseolus vulgaris L.). MSc thesis. Nairobi: University of Nairobi, Kenya.
31. Ozbahce, A. and Zengin, M., 2014. Effects of foliar and soil applications of different manganese fertilizers on yield and net return of bean, Journal of Plant Nutrition, 37(2), pp. 161–171.
32. Phillips, J.M. and Hayman, D.S., 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection, Transactions of the British Mycological Society, 55(1), pp. 158–161. https://doi.org/10.1016/S0007-1536(70)80110-3
33. Prasad, P.V.V., Boote, K.J., Allen Jr, L.H. and Thomas, J.M., 2002. Effects of elevated temperature and carbon

dioxide on seed-set and yield of kidney bean (Phaseolus vulgaris L.), Global Change Biology, 8(8), pp. 710–721. https://doi.org/10.1046/j.1365-2486.2002.00518.x

34. Qodsevali, A. R. M., Mokhtarian, H., Bakhsh Abadi, M. & Nematshahi, M., 2015. Investigation of
35. engineering properties and optimization of 1000 kernel mass of chickpea by genetic algorithm. Journal of
36. Research and Innovation in Food Science and Technology, 7, 1-13.
37. Reed, S.T. and Martens, D.C., 1996. Copper and zinc, in Sparks, D.L. (ed.) Methods of Soil Analysis. Part 3: Chemical Methods. Madison, WI: Soil Science Society of America and American Society of Agronomy, pp. 703–722. https://doi.org/10.2136/sssabookser5.3.c23
38. Reinprecht, Y., Schram, L., Marsolais, F., Smith, T.H., Hill, B. and Pauls, K.P., 2020. Effects of nitrogen application on nitrogen fixation in common bean production', Frontiers in Plant Science, 11, Article 1172. https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01172
39. Sadeghi, S., Heidari, G. and Sohrabi, Y., 2015. Effect of biological fertilizer and fertilization management on some growth indices of two maize varieties', Journal of Agricultural Science and Sustainable Production, 25(3), pp. 43–60.
40. Shaharoona, B., Arshad, M. and Zahir, Z.A., 2006. Effect of plant growth promoting rhizobacteria containing ACC-deaminase on maize (Zea mays L.) growth under axenic conditions and on nodulation in mung bean (Vigna radiata L.), Letters in Applied Microbiology, 42(2), pp. 155–159.
41. Shaharoona, B., Arshad, M., Zahir, Z.A. and Khalid, A., 2006. Performance of Pseudomonas spp. containing ACC-deaminase for improving growth and yield of maize (Zea mays L.) in the presence of nitrogenous fertilizer, Soil Biology and Biochemistry, 38(9), pp. 2971–2975.
42. Sharma, S., Compant, S., Reddy, M.S. and Kaushal, R., 2023. Microbial consortia for sustainable agriculture: Current status and future perspectives, Frontiers in Microbiology, 14, Article 1184562. https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1184562
43. Silva, E.M., Lacerda, J.J.J., Silva, L.H.C., 2022. Agronomic practices to increase the yield and quality of common bean (Phaseolus vulgaris L.): A systematic review, Agronomy, 12(2) https://doi.org/10.3390/agronomy12020271
44. Smith, S.E., Jakobsen, I., Grønlund, M. and Smith, F.A., 2011. Roles of arbuscular mycorrhizas in plant phosphorus nutrition, Plant Physiology, 156, pp. 1050–1057. https://doi.org/10.1104/pp.111.174581
45. Smith, S.E. and Smith, F.A., 2011. Roles of arbuscular mycorrhizas in plant nutrition and growth: New paradigms from cellular to ecosystem scales, Annual Review of Plant Biology, 62, pp. 227–250.
46. Smith, S.E. and Smith, F.A., 2011. Roles of arbuscular mycorrhizas in plant nutrition and growth, Plant and Soil, 348, pp. 1–12. https://doi.org/10.1007/s11104-011-0985-6
47. Summerfield, R.J., Huxley, P.A. and Minchin, F.R., 1991. Plant and crop modelling: The need for improved crop weather relationships, Agricultural and Forest Meteorology, 56, pp. 1–15.
48. Snyder, R.L., 1985. Hand calculating degree days, Agricultural and Forest Meteorology, 35(1–4), pp. 353–358. https://doi.org/10.1016/0168-1923(85)90095-9
49. Vance, C.P., Uhde-Stone, C. and Allan, D.L., 2003. Phosphorus acquisition and use: Critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource, New Phytologist, 157, pp. 423–447.
50. Wang, E., Martre, P., Zhao, Z., Ewert, F., Maiorano, A., Rötter, R.P. and Asseng, S., 2017. The uncertainty of crop yield projections is reduced by improved temperature response functions, Nature Plants, 3, Article 17102. https://doi.org/10.1038/nplants.2017.102
51. Yarnia, M., Soltani Bouljak, M., Bolouri, P. and Tolay, İ., 2024. Zinc and manganese effect seed quality and germination in common bean (Phaseolus vulgaris L.). Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 50(1), pp.154–168.

https://doi.org/10.55730/1300-011X.3170.

52. Yousefi, Z., Sharifi, P. and Rabiee, M., 2023. Effect of foliar application of zinc and iron on seed yield and yield components of common bean (Phaseolus vulgaris L.). Iranian Journal of Seed Research. AGRIS
53. Zewdie, T. and Hassen, E., 2021. Review on effects of phosphorus fertilizer rates on growth, yield components and yield of common bean (Phaseolus vulgaris L.), Journal of Current Research in Food Science, 2(1), pp. 34–39.
54. Zoffoli, B.C., Brito, L.F., Straliotto, R. and Araújo, A.P., 2021. Early nitrogen supplementation stimulates the nodulation and growth of common bean plants inoculated with rhizobium', Acta Scientiarum. Agronomy, 43, e55105. https://doi.org/10.4025/actasciagron.v43i1.55105

Publisher: Soil Science Society of Iran

Journal of Soil Biology

https://sbj.areeo.ac.ir/

Research article

The effect of *Bradyrhizobium* inoculation on nitrogen fixation, yield, and its components in soybean cultivars (*Glycine max* L.) under waterlogging stress

Serollah Galeshi[1], Mitra Toloo Hafezian[1]*, AbdolRahman Daz[1], and Ebrahim Zeinali[1]

[1] Department of Agronomy, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

Article Info

Received: 2026-08-17

Accepted: 2026-10-18

Keywords:
Bradyrhizobium japonicum bacteria,
Nodule Number,
Chlorophyll,
Grain yield

Corresponding author's email:
mitra.toloo73@gmail.com

Doi:
10.22092/SBJ.2026.373894.299

Extended Abstract

Background and Objectives: Soybean (*Glycine max* L.) is widely recognized as one of the most important crops within the legume family, and it is undeniably one of the main sources of protein and vegetable oil in the world, and plays an exceptionally important role in human nutrition, animal feed, and the food industry. Despite the immense economic and nutritional importance of this plant, the occurrence of environmental stresses, especially flooding or waterlogging, can significantly reduce its overall growth and performance. Flooding disrupts root activity as well as water and nutrient absorption by severely reducing the available oxygen levels in the root zone, and consequently, it negatively affects the overall nutritional status of the plant by reducing root nodule activity and disrupting the vital process of biological nitrogen fixation. Therefore, the strategic use of symbiotic nitrogen-fixing bacteria, especially *Rhizobium* species, can be considered as one of the most effective biological solutions to reduce the adverse effects of this particular stress. Given the inherent genetic differences between soybean cultivars in their natural tolerance to flooding and their specific response to bacterial inoculation, identifying highly tolerant and efficient cultivars in terms of symbiosis with *Rhizobium* is of particular importance. Accordingly, this study was specifically conducted to evaluate the effect of waterlogging stress and *Rhizobium* inoculation on yield, yield components, and biological nitrogen fixation in selected soybean cultivars.

Materials and Methods: This research was conducted during the course of the 2022-2023 crop year as a controlled pot experiment at the Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources. The experiment was carried out as a factorial arrangement structured within a completely randomized design with three replications. The experimental treatments included four distinct soybean cultivars, specifically including Sari, Saman, Ketul, and Amir; two levels of bacterial inoculation, specifically including active inoculation and no inoculation; and two levels of waterlogging stress, specifically including no flooding and flooding for a consecutive period of 15 days. The seeds designated for the inoculation treatment were inoculated with *Bradyrhizobium japonicum* bacteria before the sowing process. Waterlogging stress was applied at the beginning of the flowering stage (referred to as the R1 developmental stage). At the end of the applied stress period, physiological traits including chlorophyll *a*, chlorophyll *b*, and carotenoids; traits related to nitrogen nutrition status and biological nitrogen fixation including leaf nitrogen content, as well as the number and diameter of root nodules; as well as yield components including the total number and weight of pods, the number of seeds per pod, and the final grain yield were meticulously measured and compared. After collecting the experimental data, they were statistically analyzed using an analysis of variance (ANOVA) procedure and comparing the means of the treatments.

Results: The analytical results showed that waterlogging stress and bacterial inoculation, as well as their mutual interaction with the cultivar, had significantly different effects on the measured physiological traits, nitrogen fixation, and the ultimate soybean

yield. Under normal, non-stress conditions, *Rhizobium* inoculation increased the overall content of chlorophyll *a* and *b* in the majority of the evaluated cultivars; so that the highest proportional increase in chlorophyll *a* was observed in the Sari cultivar, and the highest increase in chlorophyll *b* was observed in the Saman cultivar. Also, bacterial inoculation successfully increased the content of carotenoids in all of the tested cultivars. Waterlogging stress substantially reduced photosynthetic pigments and leaf nitrogen, but the severity of this decrease was notably different across the different cultivars. Bacterial inoculation under waterlogging conditions was able to compensate for a significant part of the reduction in photosynthetic pigments. In terms of traits related to nitrogen fixation, *Rhizobium* inoculation increased the number of root nodules per plant under non-stress conditions in the Ketul and Amir cultivars from 12 to 28 and from 18 to 31 nodules, respectively. Under waterlogging conditions, the evaluated cultivars Ketul and Amir showed a more favorable response to the bacterial inoculation by successfully maintaining a higher number of functional root nodules. The detailed study of yield components also showed that the effect of inoculation on the number of pods was different in the different cultivars, and the response of the cultivars to waterlogging conditions was not the same across the board. Under non-stress conditions, bacterial inoculation increased the grain yield of the cultivar Sari from 28.6 to 68.4 g/plant; while a decrease in yield was observed in the cultivar Ketul. Also, under waterlogging conditions, bacterial inoculation increased the grain yield from 29.5 to 55.4 g/plant, indicating a clear and partial reduction in the overall stress-induced damage.

Conclusion: In general, waterlogging stress negatively affected the overall soybean yield by disrupting the essential photosynthetic activity, leaf nitrogen status, and the total number of active root nodules; however, the intensity of the physiological stress response and the degree of benefit derived from the bacterial inoculation varied among the tested cultivars. *Bradyrhizobium japonicum* inoculation helped to successfully maintain the optimum nitrogen nutrition status and effectively reduce the negative effects of waterlogging stress by improving some key physiological traits and increasing the overall capacity for nodulation. Among the cultivars that were studied, the Sari cultivar showed better performance in terms of maintaining photosynthetic pigments and sustaining final grain yield, and the Ketul and Amir cultivars showed better performance in terms of nodulation efficiency and positive response to the applied bacterial inoculation. Therefore, selecting an appropriate cultivar along with using *Bradyrhizobium japonicum* inoculation can be highly recommended as an effective and practical strategy to increase soybean tolerance to waterlogging stress and to significantly improve production sustainability under environmental conditions that are susceptible to this type of stress.

Cite this article: Galeshi, S., Toloo Hafezian, M., Daz, A. Zeinali, E., 2026. The effect of *Bradyrhizobium japonicum* inoculation on nitrogen fixation, yield and its components in soybean cultivars (*Glycine max* L.) under waterlogging stress. Research article *Journal of Soil Biology*, *14 (1)*,129-150.



DOI: 10.22092/SBJ.2026.373894.299
Publisher: Soil Science Society of Iran

دو فصلنامه

نشریه زیست‌شناسی خاک

https://sbj.areeo.ac.ir/

مقاله پژوهشی

اثر تلقیح باکتری *برادی‌ریزوبیوم ژاپونیکوم* بر تثبیت نیتروژن، عملکرد و اجزای عملکرد ارقام سویا (***Glycine max L.***) تحت تنش غرقابی

سراله گالشی[۱]، میترا طلوع حافظیان[۱*]، عبدالرحمان داز[۱] و ابراهیم زینلی[۱]

[۱] گروه زراعت، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

دریافت: ۱۴۰۵/۰۵/۲۶ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۷/۲۵

چکیده

سویا (*Glycine max* L.) یکی از مهم‌ترین گیاهان زراعی لگومی، نقش اساسی در تأمین پروتئین و روغن گیاهی دارد، اما تنش غرقابی با ایجاد اختلال در تثبیت بیولوژیک نیتروژن و فعالیت‌های فیزیولوژیک، رشد و عملکرد آن را محدود می‌کند. این پژوهش با هدف ارزیابی اثر تنش غرقابی و تلقیح باکتری برادی‌ریزوبیوم ژاپونیکوم بر عملکرد، اجزای عملکرد و تثبیت بیولوژیک نیتروژن در چهار رقم سویا (ساری، سامان، کتول و امیر) در سال زراعی ۱۴۰۲-۱۴۰۱ به‌صورت آزمایش گلدانی بر پایه طرح کاملاً تصادفی با آرایش فاکتوریل و سه تکرار در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام شد. تیمارها شامل دو سطح تنش غرقابی (عدم غرقابی و غرقابی ۱۵ روزه در مرحله آغاز گلدهی) و دو سطح تلقیح باکتری (تلقیح و عدم تلقیح) بودند. نتایج نشان داد تلقیح باکتری موجب بهبود صفات فیزیولوژیک و تثبیت نیتروژن شد؛ به‌طوری‌که در شرایط بدون تنش، کلروفیل a و b به‌ترتیب تا ۸۹ و ۷۴ درصد افزایش یافت. همچنین تعداد گره در رقم کتول از ۱۲ به ۲۸ و در رقم امیر از ۱۸ به ۳۱ گره در بوته رسید .تنش غرقابی عملکرد دانه را کاهش داد، درحالی‌که تلقیح باکتری خسارت تنش را جبران کرد و عملکرد دانه را از ۴/۵۵ به ۵/۲۹ گرم در بوته (حدود ۱۶ درصد) افزایش داد. بیشترین پاسخ به تلقیح در رقم ساری) افزایش ۳۴ درصدی نسبت به عدم تلقیح (مشاهده شد، ولی بیشترین عملکرد دانه) ۶/۵۶ گرم در بوته) در رقم امیر ثبت گردید .به‌طور کلی، تلقیح باکتری با بهبود فعالیت فتوسنتزی، افزایش تثبیت بیولوژیک نیتروژن و کاهش اثرات منفی تنش غرقابی، موجب بهبود عملکرد سویا شد. در میان ارقام مورد بررسی، بیشترین برتری در رقم ساری از نظر حفظ عملکرد دانه و در ارقام کتول و امیر از نظر کارایی همزیستی و تثبیت نیتروژن مشاهده شد.

واژه‌های کلیدی: باکتری *برادی ریزوبیوم ژاپونیکوم*، *تعداد گره*، *کلروفیل*، *عملکرد دانه*.

استناد: گالشی، س.، طلوع حافظیان، م.، داز ، ع.، زینلی، ا.، ۱۴۰۵. اثر تلقیح باکتری *برادی ریزوبیوم ژاپونیکوم* بر تثبیت نیتروژن، عملکرد و اجزای عملکرد ارقام سویا (*Glycine max L.*) تحت تنش غرقابی. مقاله پژوهشی، *نشریه زیست‌شناسی خاک* ، *۱۴(۱)*، ۱۲۹-۱۵۰.

مقدمه

سویا (*Glycine max* [L.] Merr.) یکی از مهم‌ترین گیاهان زراعی خانواده بقولات و پرکشت‌ترین محصولات لگومی جهان است که نقش مهمی در تأمین پروتئین و روغن گیاهی مورد نیاز انسان، خوراک دام و صنایع مختلف دارد (Qin et al., 2022; Pandit et al., 2026). اهمیت این گیاه علاوه بر ارزش غذایی و اقتصادی، به توانایی آن در تثبیت بیولوژیکی نیتروژن از طریق همزیستی با *باکتری برادی ریزوبیوم ژاپونیکوم* نیز مربوط است. در این فرآیند، *باکتری برادی ریزوبیوم ژاپونیکوم* با استقرار در گره‌های ریشه و استفاده از آنزیم نیتروژناز، نیتروژن مولکولی اتمسفر را به ترکیبات قابل استفاده برای گیاه تبدیل کرده و در مقابل، ترکیبات کربنی و انرژی مورد نیاز خود را از گیاه دریافت می‌کنند (Ladha et al., 2022; Garcia et al., 2020). اگر این همزیست‌ها به‌خوبی با ژنوتیپ‌های گیاه میزبان خود مطابقت داشته باشند، در شرایط رشد مطلوب، همزیستی سویا با باکتری برادی ریزوبیوم ژاپونیکوم می‌تواند سالانه بیش از ۳۰۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار را تثبیت کند (Maluk et al., 2023)، که حدود ۷۷ درصد از کل نیتروژن تثبیت‌شده توسط گیاهان لگومی زراعی را شامل می‌شود (Pandit et al., 2026). این فرآیند ضمن کاهش وابستگی به کودهای نیتروژنی، نقش مهمی در بهبود تغذیه نیتروژنی، رشد و عملکرد گیاه و افزایش پایداری تولید دارد. کارایی تثبیت بیولوژیکی نیتروژن تحت تأثیر عوامل مختلفی از جمله ژنوتیپ گیاه میزبان، سویه باکتری و شرایط محیطی قرار می‌گیرد. محققان نشان دادند که پاسخ ارقام مختلف سویا به تلقیح *باکتری برادی ریزوبیوم ژاپونیکوم* متفاوت است و میزان افزایش عملکرد دانه به نوع رقم و سویه باکتری وابسته است. ازاین‌رو، انتخاب رقم مناسب و استفاده از سویه‌های کارآمد *باکتری برادی ریزوبیوم ژاپونیکوم* می‌تواند در افزایش بهره‌وری تولید سویا مؤثر باشد (Zimmer et al., 2016). با وجود اهمیت اقتصادی و زراعی سویا، توسعه کشت این محصول با محدودیت‌های مختلفی از جمله تنش‌های محیطی مواجه است (Daneshian, 2020). در میان تنش‌های غیرزنده، غرقابی یکی از عوامل مهم کاهش رشد و عملکرد سویا به شمار می‌رود (Wu et al., 2017). بارندگی شدید، آبیاری بیش از حد و زهکشی نامناسب با کاهش تبادل گازها و محدود کردن دسترسی ریشه به اکسیژن، فعالیت‌های متابولیکی گیاه را مختل می‌کنند (Kim et al., 2015). کاهش فعالیت ریشه، اختلال در جذب آب و عناصر غذایی، محدودیت تولید انرژی و تجمع ترکیبات سمی ناشی از تنفس بی‌هوازی، از پیامدهای اصلی این تنش هستند که در نهایت موجب کاهش رشد و عملکرد گیاه می‌شوند (Xuewen et al., 2014; Herzog et al., 2016; Zhang et al., 2017). همچنین، غرقابی با اختلال در عملکرد گره‌های ریشه می‌تواند تثبیت بیولوژیکی نیتروژن را کاهش دهد. در این شرایط، حفظ فعالیت گره‌های ریشه و تداوم تثبیت نیتروژن می‌تواند در افزایش تحمل سویا به تنش مؤثر باشد. در همین راستا، پژوهشگران گزارش کردند که همزیستی مؤثر سویا با *باکتری برادی ریزوبیوم ژاپونیکوم* از طریق بهبود وضعیت تغذیه نیتروژنی و حفظ فعالیت گره‌های ریشه می‌تواند بخشی از آثار منفی غرقابی را کاهش دهد (Pucciariello et al., 2019). همچنین محققان کاهش معنی‌دار صفات رشدی و عملکردی و عملکرد دانه سویا را تحت تنش غرقابی گزارش کردند (Krisnawati et al., 2021). واکنش سویا به غرقابی علاوه بر شرایط محیطی، به ویژگی‌های ژنتیکی ارقام نیز وابسته است. ارقام سویا بر اساس تیپ رشد به گروه‌های محدود، نامحدود و نیمه‌محدود تقسیم می‌شوند که از نظر الگوی رشد، طول دوره رشد و نحوه تخصیص مواد فتوسنتزی با یکدیگر تفاوت دارند (Khadempir, 2013). در میان ارقام متداول سویا در ایران، به‌ویژه مناطق شمالی کشور، ارقام ساری، سامان، کتول و امیر از اهمیت زراعی برخوردارند (Razmi, 2022) و تفاوت‌های ژنتیکی آن‌ها می‌تواند موجب واکنش متفاوت به تنش غرقابی و تلقیح باکتری شود.

با توجه به اهمیت تثبیت بیولوژیکی نیتروژن، اثرات نامطلوب غرقابی بر رشد، عملکرد و فعالیت گره‌های ریشه و نیز تفاوت واکنش ارقام سویا به این تنش، شناسایی ارقام متحمل و بررسی راهکارهای مدیریتی مؤثر ضروری است. بنابراین، پژوهش حاضر با هدف ارزیابی واکنش ارقام مختلف سویا به تنش غرقابی و بررسی نقش تلقیح *باکتری برادی ریزوبیوم ژاپونیکوم* در بهبود تثبیت بیولوژیکی نیتروژن، رشد و عملکرد گیاه تحت شرایط غرقابی انجام شد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش به‌صورت آزمایش گلدانی و در قالب طرح کاملاً تصادفی با آرایش فاکتوریل در سه تکرار طی سال زراعی ۱۴۰۲-۱۴۰۱ در محوطه دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان اجرا شد. تیمارهای آزمایش شامل چهار رقم سویا (ساری، سامان، امیر و کتول)، تنش غرقابی در دو سطح (عدم غرقابی و غرقابی به مدت ۱۵ روز) و تلقیح با *باکتری برادی ریزوبیوم ژاپونیکوم* (*Bradyrhizobium japonicum*) در دو سطح (تلقیح و عدم تلقیح) بودند. گلدان‌های مورد استفاده از جنس پلاستیک با قطر دهانه ۳۰ سانتی‌متر و ارتفاع ۲۷ سانتی‌متر بوده و به‌منظور تأمین زهکشی مناسب، در کف آن‌ها منافذی برای خروج آب اضافی تعبیه شد. بذر ارقام مورد مطالعه از سازمان جهاد کشاورزی گرگان تهیه و در گلدان‌ها کشت شد. پس از استقرار کامل گیاهچه‌ها در مرحله ۴-۶ برگی، عملیات تنک‌کردن انجام گرفت و تعداد ۳ بوته یکنواخت در هر گلدان حفظ شد. در مجموع ۴۸ گلدان شامل ۱۶ ترکیب تیماری و سه تکرار مورد استفاده قرار گرفت. خاک مورد استفاده دارای بافت لومی-رسی-شنی (بافت متوسط) با ترکیب ۵۰ درصد شن، ۳۰ درصد رس و ۲۰ درصد سیلت بود. پیش از اجرای آزمایش، نمونه خاک از نظر ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی در آزمایشگاه خاک مورد تجزیه قرار گرفت. بر اساس نتایج حاصل از آزمون خاک، مقادیر مورد نیاز کودهای مصرفی تعیین و در طول دوره رشد گیاه اعمال شد. همچنین عملیات مدیریتی شامل کنترل علف‌های هرز، آفات و بیماری‌ها در زمان مناسب و مطابق با توصیه‌های فنی انجام گرفت تا شرایط رشد مطلوب برای گیاهان فراهم شود. نتایج تجزیه فیزیکی و شیمیایی خاک مورد استفاده در جدول (۱) ارائه شده است

جدول ۱- مشخصات خاک موردمطالعه.

Table 1- Characteristics of the studied soil.

Characteristic	pH	EC ds/m	Organic carbon percentage ٪	Total nitrogen	Saturation percentage %	Available P mg/kg	Available K mg/kg
Amount	7.8	0.53	1.4	0.093	56.8	9.9	93.6

در زمان کاشت به خاک تمام گلدان‌ها کود اوره به میزان۵۰ کیلوگرم در هکتار به‌عنوان آغازگر اضافه شد. بذرها پیش از کاشت با *باکتری برادی ریزوبیوم ژاپونیکوم* تلقیح شدند. باکتری مورد نظر از مؤسسه تحقیقات آب‌وخاک استان گلستان تهیه شد. بذرها با مایه تلقیح که هر گرم آن حاوی $۱۰^{۷}$ عدد باکتری زنده و فعال بود، استفاده گردید. همچنین برای چسبندگی بهتر مایه تلقیح به بذرها از محلول آب- شکر به نسبت ۱۰ درصد استفاده شد. اعمال تنش غرقابی در مرحله آغاز گلدهی (R1) انجام گرفت. بدین منظور، حوضچه‌هایی به مساحت ۱۲ مترمربع و عمق ۵۰ سانتی‌متر احداث و کف و دیواره‌های آن با پلاستیک ضخیم عایق‌بندی شد. پس از رسیدن گیاهان به مرحله شروع گلدهی، از هر رقم شش گلدان تلقیح‌شده و شش گلدان بدون تلقیح انتخاب و به مدت ۱۵ روز در شرایط غرقابی داخل حوضچه‌ها قرار داده شدند. پس از پایان دوره غرقابی، گلدان‌ها از حوضچه

خارج و نمونه‌برداری لازم برای اندازه‌گیری صفات رنگیزه‌های فتوسنتزی (کلروفیل a، b و کاروتنوئید)، نیتروژن برگ، تعداد گره در بوته و میانگین قطر گره انجام شد. سپس گیاهان تا پایان دوره رشد در شرایط مطلوب نگهداری شدند و در مرحله رسیدگی، اندازه‌گیری صفات عملکردی و اجزای عملکرد شامل تعداد غلاف در بوته، وزن غلاف در بوته، تعداد دانه در غلاف و عملکرد دانه مورد نظر صورت گرفت.

به‌منظور اندازه‌گیری رنگیزه‌های فتوسنتزی، از روش آرنون (Arnon, 1949) استفاده شد. بدین منظور، ۰/۲۵ گرم از بافت تازه برگ‌های کاملاً توسعه‌یافته فوقانی برداشت و در هاون چینی حاوی ۱۰ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد کاملاً ساییده و همگن گردید. عصاره حاصل به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۱۸ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. سپس فاز شفاف جدا و حجم آن با استون ۸۰ درصد به ۲۵ میلی‌لیتر رسانده شد. جذب نوری نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر UV/VISمدل S2000 در طول موج‌های ۴۸۰، ۵۱۰، ۶۴۵ و ۶۶۳ نانومتر اندازه‌گیری شد. پیش از انجام قرائت‌ها، دستگاه با استفاده از استون ۸۰ درصد به‌عنوان شاهد (بلانک) تنظیم و صفر گردید. در نهایت، مقادیر کلروفیل a، کلروفیل b و کاروتنوئیدها با استفاده از روابط مربوطه محاسبه شدند.

$$Chla=12.7\ (A663) - 2.69\ (A645) \times \frac{V}{1000 \times W}$$

$$Chlb=22.9\ (A645) - 4.68\ (A663) \times \frac{V}{1000 \times W}$$

$$C\ (\text{کاروتنوئید}) = 7.6(A480) - 1.49(A510) \times \frac{V}{1000 \times w}$$

در روابط فوق، V بیانگر حجم نهایی عصاره استخراج‌شده (میلی‌لیتر)، W وزن تر نمونه برگ (گرم) و Chla، Chlb و C به‌ترتیب نشان‌دهنده غلظت کلروفیل a، کلروفیل b و کاروتنوئیدها بر حسب میلی‌گرم در گرم وزن تر بافت گیاهی هستند.

برای اندازه‌گیری نیتروژن برگ، از دستگاه کجلدال (آلمان Behr–D–40599-) بر اساس روش شومان و همکاران (۱۹۷۳) استفاده شد. نمونه‌برداری برگ در مرحله آغاز گلدهی (R1) و قبل و بعد از اعمال تنش غرقابی انجام شد. بدین منظور، یک گرم از نمونه‌های خشک و آسیاب‌شده در دمای ۴۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ تا ۴ ساعت خاکسترگیری شد، سپس با ۱۰ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۲ نرمال هضم گردید. محلول حاصل پس از صاف شدن، در بالن ژوژه ۱۰۰ میلی‌لیتری به حجم رسانده شد (Ali Ehyaei, 2007; Ghazan Shahi, 2006). در نهایت، مقدار نیتروژن با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر UV/VIS مدل S2000 در طول موج ۴۳۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

در پایان دوره رشد و در زمان رسیدگی کامل گیاه، به‌منظور ارزیابی عملکرد و اجزای عملکرد، صفاتی شامل تعداد غلاف در بوته، وزن غلاف، تعداد دانه در هر غلاف و عملکرد دانه در بوته اندازه‌گیری شدند. پس از برداشت، نمونه‌ها خشک شده و وزن خشک اندام‌های مورد نظر با استفاده از ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۱ گرم تعیین گردید. عملکرد دانه نیز پس از جداسازی و توزین دانه‌های هر بوته محاسبه شد. تجزیه و تحلیل آماری داده‌های حاصل از آزمایش با استفاده از نرم‌افزار SAS انجام شد. مقایسه میانگین تیمارها نیز به‌وسیله آزمون LSDدر سطح احتمال ۵ درصد صورت گرفت.

نتایج و بحث

رنگیزه‌های فتوسنتزی

کلروفیل a

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که برهم‌کنش رقم، تلقیح باکتری و تنش غرقابی بر محتوای کلروفیل a در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۲). مقایسه میانگین‌ها نشان داد که در شرایط بدون تنش غرقابی، تلقیح باکتری موجب افزایش محتوای کلروفیل a در تمامی ارقام شد؛ به‌طوری‌که این افزایش در ارقام

ساری، سامان، کتول و امیر به‌ترتیب ۸۹، ۷۶، ۲۹ و ۵۴ درصد نسبت به تیمار عدم تلقیح بود (شکل ۱). در شرایط غرقابی، پاسخ ارقام به تلقیح متفاوت بود؛ به‌گونه‌ای که محتوای کلروفیل a در ارقام سامان و کتول به‌ترتیب ۷۶ و ۵ درصد افزایش یافت، در حالی که در ارقام ساری و امیر به‌ترتیب ۱۸ و ۳۳ درصد کاهش مشاهده شد. بیشترین مقدار کلروفیل a در شرایط بدون تنش و همراه با تلقیح باکتری در رقم ساری (۸/۵۶ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) به دست آمد، در حالی که کمترین مقدار آن در شرایط غرقابی همراه با تلقیح در رقم امیر (۳/۶۹ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) مشاهده شد (شکل ۱). این نتایج بیانگر آن است که حفظ کلروفیل تحت تنش غرقابی به ویژگی‌های ژنتیکی ارقام و کارایی تلقیح باکتری وابسته است. اثر مثبت تلقیح باکتری احتمالاً ناشی از بهبود وضعیت تغذیه‌ای گیاه و افزایش دسترسی به نیتروژن، به‌عنوان یکی از اجزای اصلی ساختار کلروفیل، بوده است. این یافته‌ها با نتایج سیدشریفی (۲۰۱۳) مبنی بر نقش *باکتری برادی ریزوبیوم ژاپونیکوم* در بهبود تغذیه نیتروژنی و صفات فیزیولوژیک سویا همخوانی دارد.

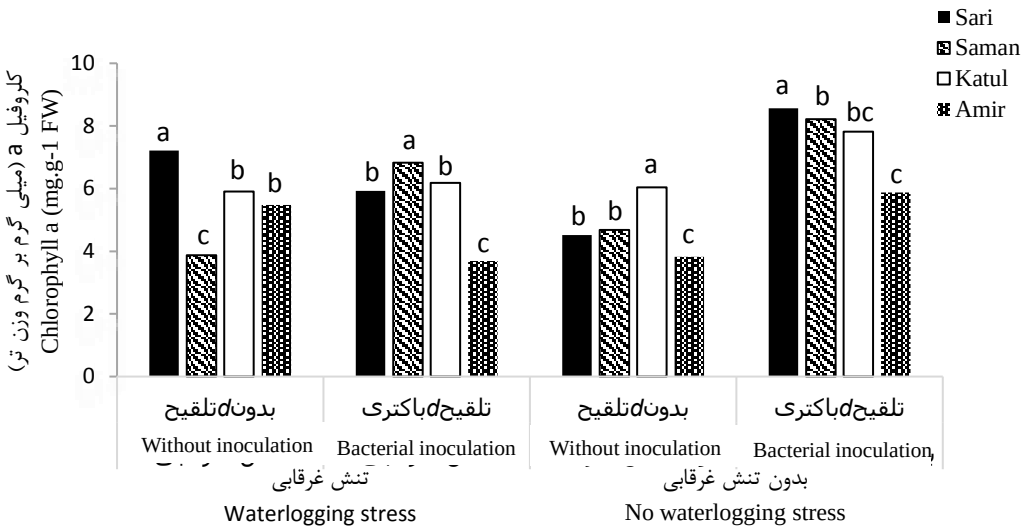
جدول ۲- تجزیه واریانس تأثیر تنش غرقابی و تلقیح باکتری بر صفات رنگیزه‌های فتوسنتزی، نیتروژن برگ و تعداد گره.

Table 2- Analysis of variance of the effect of waterlogging stress and bacterial inoculation on photosynthetic pigments, leaf nitrogen and nodule number.

S.O.V	df	Chlorophyll a	Chlorophyll b	Carotenoid	Leaf nitrogen	nodule number
		----------mg.g^{-1} FW----------			mg.g	
Cultivar (C)	3	8.7**	0.7**	0.8**	18.1**	1367.8**
Waterlogging stress (W)	1	3.7*	0.4**	3.3**	48.1**	494.1**
Bacterial inoculation (B)	1	25.1**	1.6**	2.7**	0.2ns	36.8**
C*W	3	0.8ns	0.012ns	0.1ns	5**	234.8**
C*B	3	5.2**	0.4**	0.3*	6.7**	49.7**
W*B	1	23.8**	1.4**	3.9**	0.1ns	972**
W*C*B	3	3.5**	0.2**	0.3*	2.1ns	265.2**
Erorr	32	0.6	0.04	0.1	0.8	5.95
C.V	-	13.1	11.4	17.2	18.9	20.3

ns، * و ** به ترتیب غیر معنی‌داری، معنی‌داری در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد است.

ns, *, and ** are non-significant and significant at the 5 and 1 percent probability levels, respectively.

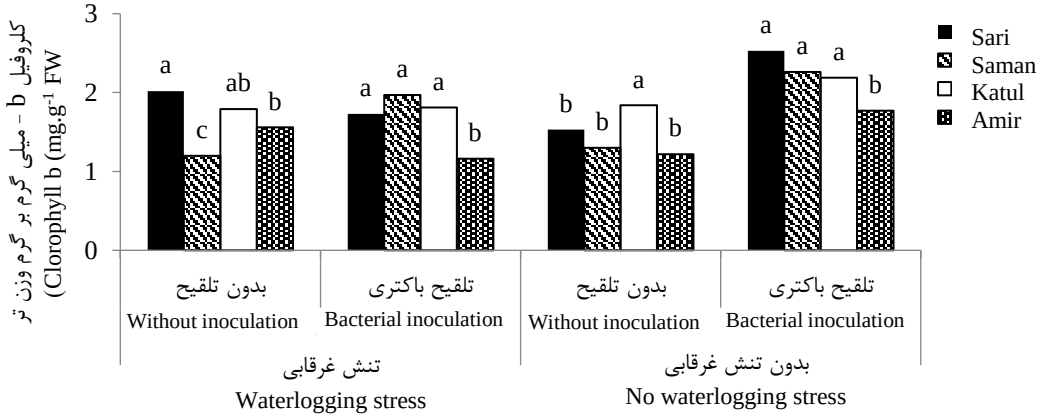


شکل ۱- مقایسه میانگین اثر متقابل رقم×تلقیح باکتری×تنش غرقابی بر میزان کلروفیل a در سویا.

Figure 1- Comparison of the average interaction effect of cultivar × bacterial inoculation × waterlogging stress on the amount of chlorophyll a in soybeans.

کلروفیل b

نتایج تجزیه واریانس نشان داد برهم‌کنش رقم، تلقیح باکتری و تنش غرقابی بر محتوای کلروفیل b در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۲). مقایسه میانگین‌ها نشان داد که در شرایط بدون تنش غرقابی، تلقیح *باکتری برادی ریزوبیوم ژاپونیکوم* موجب افزایش محتوای کلروفیل b در تمامی ارقام شد؛ به‌طوری‌که این افزایش در ارقام ساری، سامان، کتول و امیر به‌ترتیب ۶۵، ۷۴، ۱۹ و ۴۵ درصد نسبت به تیمار عدم تلقیح بود (شکل ۲). در شرایط غرقابی، پاسخ ارقام به تلقیح متفاوت بود؛ به‌گونه‌ای که محتوای کلروفیل b در ارقام سامان و کتول به‌ترتیب ۶۴ و ۱ درصد افزایش یافت، در حالی که در ارقام ساری و امیر به‌ترتیب ۱۴ و ۲۶ درصد کاهش نشان داد. بیشترین مقدار کلروفیل b در شرایط بدون تنش و همراه با تلقیح باکتری در رقم ساری (۲/۵۳ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) مشاهده شد، در حالی که کمترین مقدار آن در شرایط غرقابی همراه با تلقیح در رقم امیر (۱/۱۶ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) به دست آمد (شکل ۲). به‌طور کلی، نتایج نشان داد که تنش غرقابی موجب کاهش کلروفیل b می‌شود، اما تلقیح باکتری با بهبود وضعیت تغذیه‌ای گیاه و افزایش دسترسی به نیتروژن، به حفظ رنگیزه‌های فتوسنتزی و تداوم فعالیت فتوسنتزی کمک می‌کند. در این میان، رقم ساری به دلیل برخورداری از مقادیر بالاتر کلروفیل و پاسخ مناسب به تلقیح باکتری، عملکرد مطلوب‌تری در شرایط تنش غرقابی نشان داد.

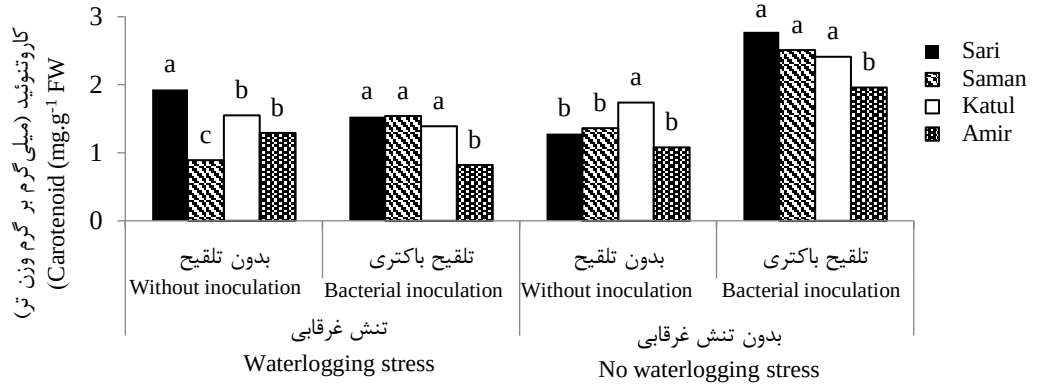


شکل ۲- مقایسه میانگین اثر متقابل رقم×تلقیح باکتری×تنش غرقابی بر میزان کلروفیل b در سویا.

Figure 2. Comparison of the average interaction effect of cultivar × bacterial inoculation × waterlogging stress on the amount of chlorophyll b in soybeans.

کاروتنوئید

نتایج تجزیه واریانس برهمکنش رقم، تلقیح باکتری و تنش غرقابی بر میزان کاروتنوئید در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۲). نتایج نشان داد که پاسخ کاروتنوئید به تنش غرقابی و تلقیح *باکتری برادی ریزوبیوم ژاپونیکوم* وابسته به رقم بود. در شرایط بدون تنش، تلقیح باکتری موجب افزایش محتوای کاروتنوئید در تمامی ارقام شد که بیشترین افزایش در رقم ساری (۲/۷۸ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) مشاهده گردید. در مقابل، در شرایط غرقابی، تنها رقم سامان به تلقیح پاسخ مثبت نشان داد و محتوای کاروتنوئید آن به‌طور قابل‌توجهی افزایش یافت (۷۳ درصد)، در حالی که در ارقام ساری، کتول و امیر تلقیح اثر افزایشی نداشت. همچنین تنش غرقابی به‌تنهایی موجب افزایش کاروتنوئید در ارقام ساری و امیر (به ترتیب ۵۱ و ۱۹ درصد)، اما کاهش آن در ارقام سامان و کتول شد. این نتایج نشان می‌دهد که واکنش سیستم آنتی‌اکسیدانی ارقام مختلف سویا در برابر تنش غرقابی متفاوت بوده و کارایی تلقیح *باکتری برادی ریزوبیوم ژاپونیکوم* در حفظ رنگیزه‌های محافظ نیز به ویژگی‌های ژنتیکی هر رقم وابسته است. افزایش کاروتنوئید در اثر تلقیح باکتری بیانگر نقش این باکتری در تقویت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی و حفظ دستگاه فتوسنتزی گیاه تحت شرایط تنش است؛ موضوعی که با نتایج پیردهقان و همکاران (۲۰۱۹) نیز همخوانی دارد.



شکل ۳- مقایسه میانگین اثر متقابل رقم× تلقیح باکتری× تنش غرقابی بر میزان کاروتنوئید در سویا.

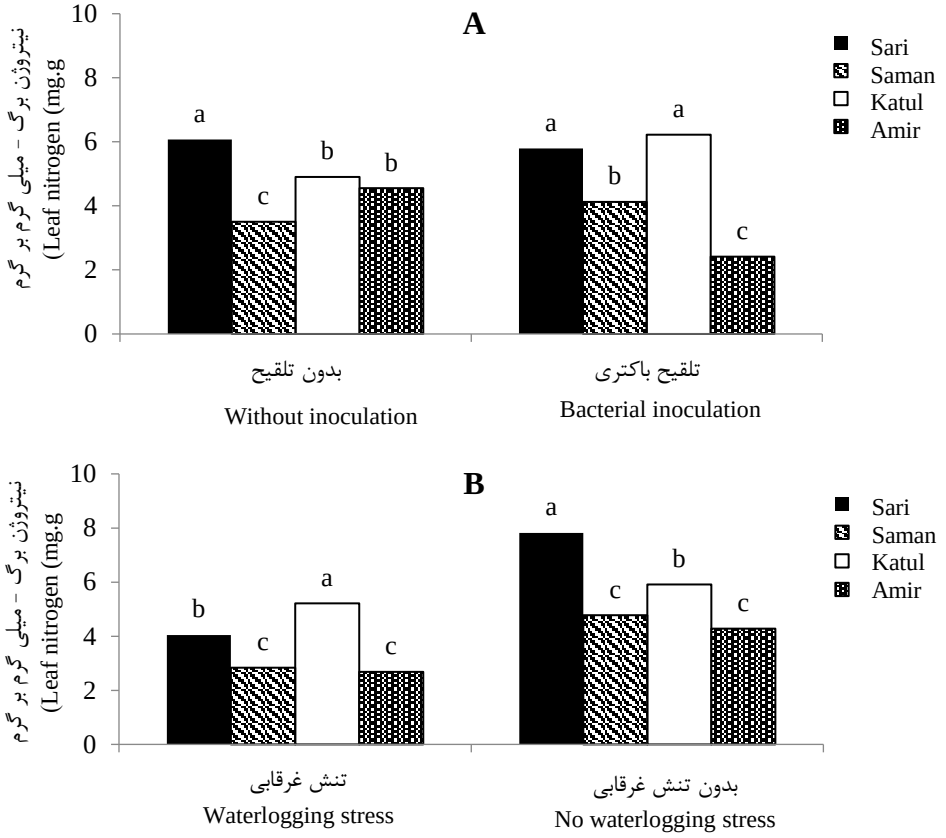
Figure 3. Comparison of the average interaction effect of cultivar × bacterial inoculation × waterlogging stress on carotenoid content in soybeans.

نیتروژن برگ

نتایج تجزیه واریانس نشان داد برهمکنش رقم × تلقیح باکتری و رقم × تنش غرقابی بر میزان نیتروژن برگ در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۲). نتایج نشان داد که پاسخ نیتروژن برگ به تلقیح باکتری به ارقام سویا وابسته بود. تلقیح باکتری موجب افزایش نیتروژن برگ در ارقام کتول و سامان (به ترتیب ۲۷ و ۱۷ درصد) شد که این افزایش در رقم کتول بارزتر بود، در حالی که در ارقام ساری و امیر کاهش نیتروژن برگ مشاهده شد. همچنین بیشترین مقدار نیتروژن برگ در رقم کتول تحت تلقیح باکتری به دست آمد (۶/۲۲ میلی‌گرم بر گرم) که بیانگر کارایی بیشتر این رقم در برقراری همزیستی مؤثر با *باکتری برادی ریزوبیوم ژاپونیکوم* و بهره‌گیری از تثبیت بیولوژیکی نیتروژن است (شکل ۴- a).

تنش غرقابی موجب کاهش نیتروژن برگ در تمامی ارقام سویا شد، اما شدت این کاهش به رقم وابسته بود (شکل ۴- b). رقم کتول با کمترین کاهش (حدود ۱۱ درصد) و بالاترین مقدار نیتروژن برگ در شرایط غرقابی (۵/۲۱ میلی‌گرم بر گرم)، توانایی بیشتری در حفظ وضعیت تغذیه نیتروژنی خود نشان داد، در حالی که رقم ساری بیشترین کاهش (حدود ۴۸ درصد) را تجربه کرد. این نتایج بیانگر تفاوت ژنتیکی ارقام در تحمل تنش غرقابی و حفظ جذب یا تثبیت نیتروژن تحت شرایط کمبود اکسیژن است.

به‌طور کلی تنش غرقابی موجب کاهش نیتروژن برگ در تمامی ارقام شد که می‌توان علت آن را به محدود شدن فعالیت ریشه، کاهش جذب عناصر غذایی و اختلال در فرآیند تثبیت بیولوژیک نیتروژن در شرایط کمبود اکسیژن نسبت داد. غرقاب با کاهش تهویه خاک، فعالیت باکتری‌های همزیست و تشکیل گره‌های فعال را محدود کرده و در نتیجه توانایی گیاه در تأمین نیتروژن کاهش می‌یابد. در مقابل، تلقیح باکتری در برخی ارقام، به‌ویژه کتول و سامان، توانست با افزایش کارایی همزیستی و تثبیت نیتروژن، بخشی از اثرات منفی تنش را جبران کند. این تفاوت پاسخ ارقام نشان‌دهنده وجود تنوع ژنتیکی در توانایی برقراری همزیستی مؤثر با باکتری و حفظ جذب نیتروژن در شرایط تنش است. در مجموع، نتایج نشان داد انتخاب رقم مناسب نقش مهمی در حفظ وضعیت تغذیه نیتروژنی گیاه تحت شرایط غرقابی دارد. رقم کتول توانست نیتروژن برگ را تحت تنش غرقابی بهتر از سایر ارقام حفظ کند و بالاترین مقدار نیتروژن برگ را در شرایط تنش داشت (۵/۲۱ میلی‌گرم بر گرم)، در حالی که رقم ساری در شرایط بدون تنش از بالاترین میزان نیتروژن برخوردار بود. نتایج این پژوهش با گزارش پیرولی بیرانوند و همکاران (۲۰۰۳) همخوانی دارد که نقش مؤثر سویه‌های *باکتری برادی ریزوبیوم ژاپونیکوم* را در تأمین نیتروژن مورد نیاز سویا تأیید کرده و نشان دادند حدود ۸۰ تا ۹۰ درصد نیتروژن مورد نیاز گیاه می‌تواند از طریق همزیستی با این باکتری تأمین شود.

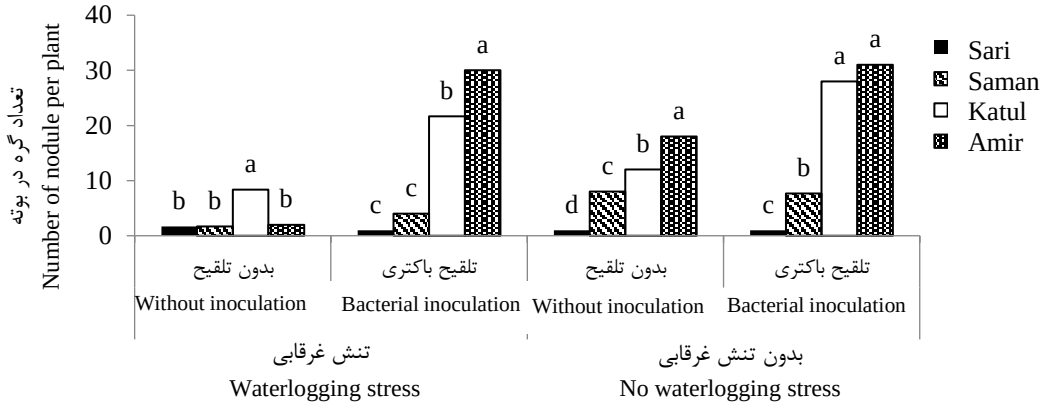


شکل ۴- مقایسه میانگین اثر متقابل رقم×تلقیح باکتری (A) و رقم×تنش غرقابی (B) بر نیتروژن برگ در سویا.
Figure 4. Comparison of the average interaction effect of cultivar × bacterial inoculation (A) and cultivar × waterlogging stress (B) on leaf nitrogen in soybean.

تعداد گره در بوته

نتایج تجزیه واریانس نشان داد برهمکنش رقم × تلقیح باکتری × غرقاب بر تعداد گره در بوته سویا در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۲). نتایج نشان داد که پاسخ تعداد گره به تلقیح باکتری و تنش غرقابی به ارقام سویا وابسته بود. در شرایط بدون تنش، تلقیح باکتری بیشترین افزایش تعداد گره را در ارقام کتول و امیر ایجاد کرد (به ترتیب ۲۸ و ۳۱ گره در بوته)، در حالی که در ارقام ساری و سامان تأثیر محسوسی نداشت. تنش غرقابی موجب کاهش شدید تعداد گره در اغلب ارقام شد، اما شدت این کاهش در رقم کتول کمتر از سایر ارقام بود. همچنین تلقیح *باکتری برادی ریزوبیوم ژاپونیکوم* در شرایط غرقابی توانست کاهش تعداد گره را به‌ویژه در ارقام کتول و امیر به‌طور چشمگیری جبران کند که بیانگر کارایی بالاتر این دو رقم در برقراری همزیستی مؤثر با باکتری تحت شرایط تنش است. بر این اساس، ارقام کتول و امیر پاسخ مطلوب‌تری به تلقیح باکتری در شرایط تنش نشان دادند. اگرچه در رقم امیر طی تنش غرقابی تعداد گره‌ها کاهش یافت، اما تلقیح باکتری توانست تعداد گره‌ها را تقریباً به سطح شرایط بدون تنش برگرداند. کاهش تعداد گره تحت شرایط غرقابی را می‌توان به محدودیت اکسیژن در ناحیه ریشه، اختلال در تنفس هوازی و کاهش تأمین انرژی مورد نیاز برای تشکیل و فعالیت گره‌ها نسبت داد. غرقاب با کاهش رشد ریشه و محدود کردن تبادلات گازی، فرآیند همزیستی بین گیاه و باکتری‌های تثبیت‌کننده نیتروژن را مختل کرده و در نتیجه موجب کاهش گره‌زایی می‌شود. از سوی دیگر، تلقیح باکتری از طریق افزایش جمعیت مؤثر باکتری در ناحیه ریشه و بهبود استقرار همزیستی، توانست بخشی از این خسارت را جبران کند. نتایج این پژوهش با یافته‌های

محققان مطابقت دارد که کاهش تعداد گره، وزن خشک گره، تثبیت نیتروژن و عملکرد دانه سویا را تحت تنش غرقابی گزارش کردند (Khan et al., 2022). همچنین دیگر پژوهشگران بیان کردند که غرقاب با کاهش گره‌زایی، تثبیت نیتروژن، فتوسنتز و رشد گیاه، از مهم‌ترین عوامل محدودکننده عملکرد سویا محسوب می‌شود (Mutava et al., 2015; Chen et al., 2016; Tewari and Arora. 2016).



شکل ۵- مقایسه میانگین اثر متقابل رقم×تلقیح باکتری×تنش غرقابی بر تعداد گره در بوته در سویا.

Figure 5- Comparison of the average interaction effect of cultivar × bacterial inoculation × waterlogging stress on the number of nodules per plant in soybean

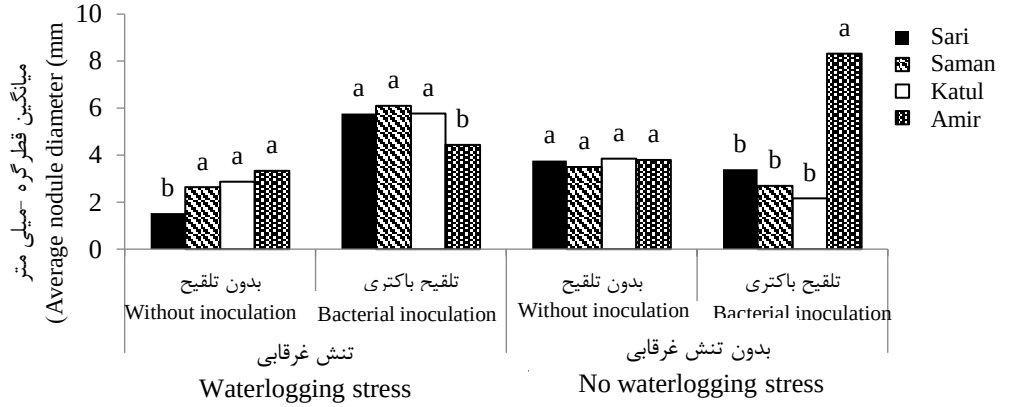
میانگین قطر گره

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که برهمکنش رقم و تلقیح باکتری و تنش غرقابی بر قطر گره سویا در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۲). نتایج نشان داد که پاسخ قطر گره به تلقیح باکتری و تنش غرقابی وابسته به رقم بود. در شرایط بدون تنش، تلقیح باکتری تنها در رقم امیر افزایش چشمگیری در قطر گره نشان داد، در حالی که در سایر ارقام تغییر محسوسی مشاهده نشد. تنش غرقابی قطر گره را در همه ارقام کاهش داد، اما تلقیح باکتری توانست این کاهش را به‌ویژه در ارقام ساری، سامان و کتول به‌طور قابل‌توجهی جبران کند. این نتایج نشان می‌دهد که اگرچه رقم امیر بیشترین ظرفیت تشکیل گره را داشت، اما ارقام کتول و ساری در حفظ یا افزایش اندازه گره تحت شرایط غرقابی عملکرد مطلوب‌تری داشتند که می‌تواند بیانگر پایداری بیشتر فعالیت همزیستی در این ارقام باشد. کاهش قطر گره در شرایط غرقابی را می‌توان به محدودیت اکسیژن در ناحیه ریشه، اختلال در تنفس سلولی و کاهش فعالیت گره‌های تثبیت‌کننده نیتروژن نسبت داد. علاوه بر این، افزایش تولید اتیلن و تسریع فرایند پیری سلولی در شرایط کمبود اکسیژن، موجب کاهش رشد و توسعه گره‌ها می‌شود (Qi et al., 2019). در مقابل، تلقیح باکتری از طریق بهبود تثبیت نیتروژن، افزایش دسترسی گیاه به این عنصر و همچنین تولید تنظیم‌کننده‌های رشد نظیر اکسین و سیتوکینین، موجب تحریک تقسیم و توسعه سلولی شده و در نتیجه به حفظ یا افزایش قطر گره کمک می‌کند (Wybouw and De Rybel, 2019). بنابراین، تلقیح باکتری می‌تواند به‌عنوان راهکاری مؤثر برای کاهش آثار منفی تنش غرقابی بر فعالیت همزیستی و رشد گره‌های ریشه در سویا مورد توجه قرار گیرد.

جدول ۳- تجزیه واریانس تأثیر تنش غرقابی و تلقیح باکتری بر عملکرد و اجزای عملکرد ارقام سویا.

Table 2- Analysis of variance of the effect of waterlogging stress and bacterial inoculation on growth traits and yield of soybean cultivars.

S.O.V	df	Average nodule diameter	Pod number per plant	Pod weight	Grain number per pod	Grain yield
		mm		gr		gr.plant
Cultivar (C)	3	10.4**	262.1**	3.6**	848.7**	2.03**
Waterlogging stress (W)	1	1.1ns	4.1ns	0.7ns	0.3ns	0.86*
Bacterial inoculation (B)	1	18.7**	47.9**	9.5**	65.4ns	3.34**
C*W	3	13.7**	17.3*	5.6**	14.8ns	3.69**
C*B	3	1.8ns	16.7*	2.9**	42.9ns	2.04**
W*B	1	33.8**	33.2*	4.3**	56.3ns	2.71**
W*C*B	3	6.3**	1.3ns	0.8*	36.1ns	0.47ns
Erorr	32	1.4	5.4	0.3	16.4	0.17
C.V	-	27	9.7	6.4	9.1	8.1



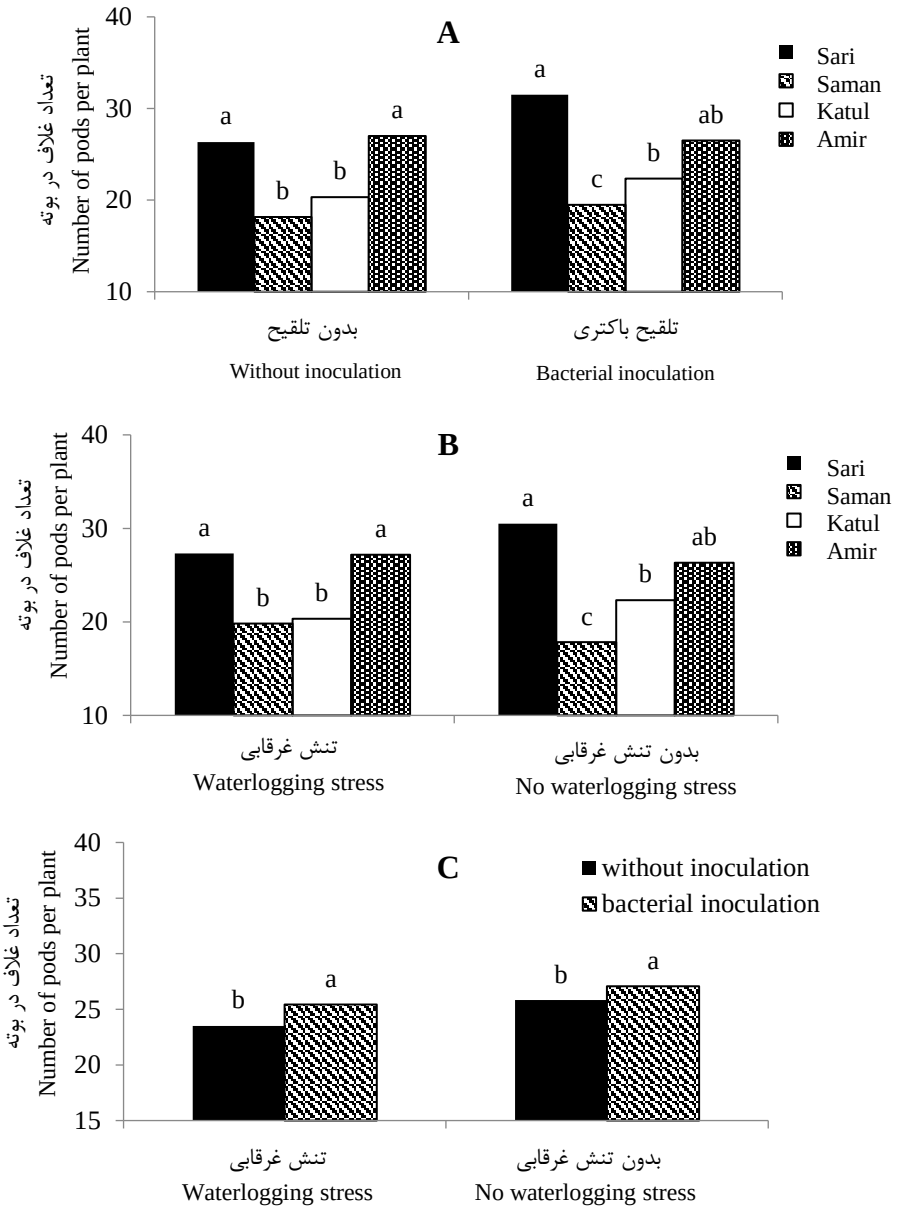
شکل ۶- مقایسه میانگین اثر متقابل رقم×تلقیح باکتری× تنش غرقابی بر میانگین قطر گره سویا.

Figure 6- Comparison of the average interaction effect of cultivar × bacterial inoculation × waterlogging stress on the average soybean nodule diameter.

تعداد غلاف در بوته

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثرات برهمکنش رقم × تلقیح باکتری، رقم × غرقاب و غرقاب × تلقیح باکتری بر تعداد غلاف در بوته سویا در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۳). تلقیح باکتری اثر متفاوتی بر تعداد غلاف ارقام سویا داشت. به‌طوری که موجب افزایش تعداد غلاف در ارقام ساری، کتول و سامان شد و بیشترین پاسخ در رقم ساری (۱۹ درصد) مشاهده گردید، در حالی که در رقم امیر تعداد غلاف کاهش یافت (شکل ۷- a). همچنین بیشترین تعداد غلاف در شرایط تلقیح به رقم ساری اختصاص داشت که نشان‌دهنده سازگاری بیشتر این رقم در تبدیل بهبود وضعیت تغذیه‌ای و فیزیولوژیکی به تشکیل اندام‌های زایشی است (شکل ۷- a). نتایج نشان داد تنش غرقابی اثر متفاوتی بر تعداد غلاف در ارقام سویا داشت. این تنش موجب کاهش تعداد غلاف در ارقام ساری و کتول شد، در حالی که در ارقام سامان و امیر تغییر محسوسی مشاهده نشد (شکل ۷- b). با وجود اثر غرقابی، ارقام ساری و امیر همچنان بیشترین تعداد غلاف را در بین ارقام مورد بررسی حفظ کردند که بیانگر پایداری بیشتر این دو رقم از نظر تشکیل اندام‌های زایشی تحت شرایط تنش است (شکل ۷- b). همچنین بررسی‌ها نشان داد اثر تلقیح *باکتری برادی ریزوبیوم ژاپونیکوم* بر تعداد غلاف به شرایط محیطی وابسته بود. در شرایط بدون تنش غرقابی،

تلقیح باکتری موجب افزایش تعداد غلاف در بوته شد، در حالی که در شرایط غرقابی، تلقیح باکتری توانست کاهش ناشی از تنش را جبران کند و اثر معنی‌داری بر این صفت داشت (شکل ۷- c). این نتایج نشان می‌دهد که کارایی باکتری در بهبود تشکیل غلاف، تحت شرایط مطلوب رشد بیشتر از شرایط غرقابی است (شکل ۷- c). کاهش تعداد غلاف تحت تنش غرقابی را می‌توان به اختلال در فعالیت ریشه، محدودیت جذب عناصر غذایی، کاهش فتوسنتز و اختلال در انتقال مواد فتوسنتزی به اندام‌های زایشی نسبت داد. این شرایط سبب کاهش تشکیل و بقای گل‌ها و در نهایت کاهش تعداد غلاف در بوته می‌شود. از سوی دیگر، بهبود تعداد غلاف در اثر تلقیح باکتری احتمالاً ناشی از افزایش دسترسی گیاه به نیتروژن، بهبود وضعیت تغذیه‌ای و تحریک رشد رویشی و زایشی است. با این حال، کاهش کارایی تلقیح در شرایط غرقابی نشان داد که کمبود اکسیژن در ناحیه ریشه توانست فعالیت باکتری‌های همزیست و فرآیند تثبیت نیتروژن را محدود کند و در نتیجه اثرات مثبت تلقیح را کاهش دهد. در میان ارقام مورد بررسی، رقم ساری با حفظ تعداد غلاف بیشتر در هر دو شرایط غرقابی و بدون غرقاب، عملکرد مطلوب‌تری نشان داد که بیانگر توانایی بالاتر این رقم در حفظ رشد زایشی تحت شرایط تنش است. نتایج این پژوهش با گزارش محققان مطابقت دارد که بیان کردند باکتری‌های محرک رشد گیاه از طریق بهبود جذب عناصر غذایی، تنظیم هورمون‌های رشد و افزایش کارایی فرآیندهای فیزیولوژیک می‌توانند رشد و اجزای عملکرد را بهبود بخشند. با این وجود، شدت تنش غرقابی می‌تواند اثربخشی این باکتری‌ها را محدود سازد (Chieb and Gachomo; 2023). بنابراین، انتخاب ارقام متحمل در کنار بهره‌گیری از میکروارگانیسم‌های مفید می‌تواند راهکاری مؤثر برای حفظ عملکرد سویا در شرایط مستعد غرقابی باشد.



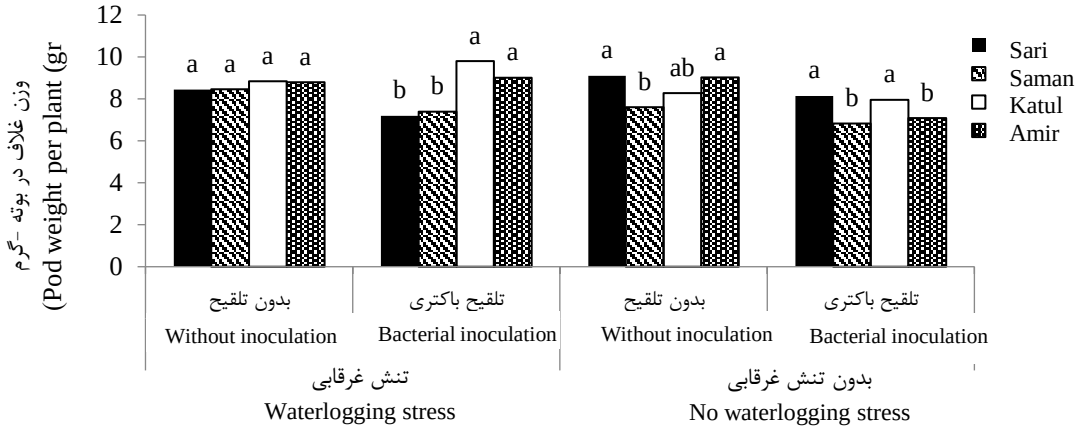
شکل ۷- مقایسه میانگین اثر متقابل رقم×تلقیح باکتری (الف)، رقم×تنش غرقابی (ب) و تنش غرقابی×تلقیح باکتری (ج) بر تعداد غلاف در بوته سویا.

Figure 7. Comparison of the average interaction effect of cultivar × bacterial inoculation (A), cultivar × waterlogging stress (B), and waterlogging stress × bacterial inoculation (C) on the number of pods per soybean plant.

وزن غلاف در بوته

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر متقابل رقم × تلقیح باکتری × غرقاب بر وزن غلاف در بوته سویا در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۳). پاسخ وزن غلاف به تلقیح باکتری به رقم و شرایط غرقابی وابسته بود. در شرایط بدون تنش، تلقیح موجب کاهش وزن غلاف در تمامی ارقام شد؛ به‌طوری‌که این کاهش در ارقام ساری، سامان، کتول و امیر به‌ترتیب ۱۰/۵۴، ۱۰/۱۳، ۳/۸۶ و ۲۱/۵۰ درصد بود، در حالی که تحت تنش غرقابی، این پاسخ بین ارقام متفاوت بود؛ به‌طوری‌که تلقیح در ارقام کتول و امیر موجب افزایش وزن غلاف شد، اما در ارقام ساری و سامان کاهش این صفت را به همراه

داشت. این نتایج نشان می‌دهد که کارایی باکتری در حفظ یا بهبود وزن غلاف تحت تنش غرقابی به ویژگی‌های ژنتیکی ارقام بستگی دارد. کاهش وزن غلاف تحت تنش غرقابی را می‌توان به اختلال در فرآیندهای فتوسنتزی، محدودیت انتقال مواد فتوسنتزی به اندام‌های زایشی و کاهش توان منبع و مخزن نسبت داد. تنش غرقابی با ایجاد شرایط کمبود اکسیژن در ناحیه ریشه، جذب آب و عناصر غذایی را محدود کرده و در نتیجه رشد و توسعه اندام‌های زایشی را تحت تأثیر قرار می‌دهد. از سوی دیگر، پاسخ متفاوت ارقام به تلقیح باکتری در شرایط غرقابی نشان‌دهنده تفاوت ژنتیکی در کارایی همزیستی با باکتری و توانایی حفظ رشد زایشی تحت شرایط تنش است. افزایش وزن غلاف در برخی ارقام می‌تواند ناشی از بهبود وضعیت تغذیه نیتروژنی، حفظ فعالیت فتوسنتزی و افزایش انتقال مواد پرورده به غلاف‌ها باشد. وزن غلاف به‌عنوان یکی از اجزای مهم عملکرد، ارتباط مستقیمی با ظرفیت تشکیل و پر شدن دانه دارد و هرگونه کاهش در این صفت می‌تواند در نهایت به افت عملکرد دانه منجر شود. حساسیت بالای مرحله گلدهی و تشکیل غلاف به تنش‌های محیطی، به‌ویژه غرقابی، موجب اختلال در گرده‌افشانی، افزایش سقط گل و کاهش تشکیل دانه می‌شود (Liu et al., 2020; Rasouli et al., 2014). نتایج این پژوهش با گزارش محقق دیگری همخوانی دارد که کاهش معنی‌دار وزن غلاف در رقم DPX (کتول) را در اثر تنش غرقابی گزارش کرد (Turani, 2013).



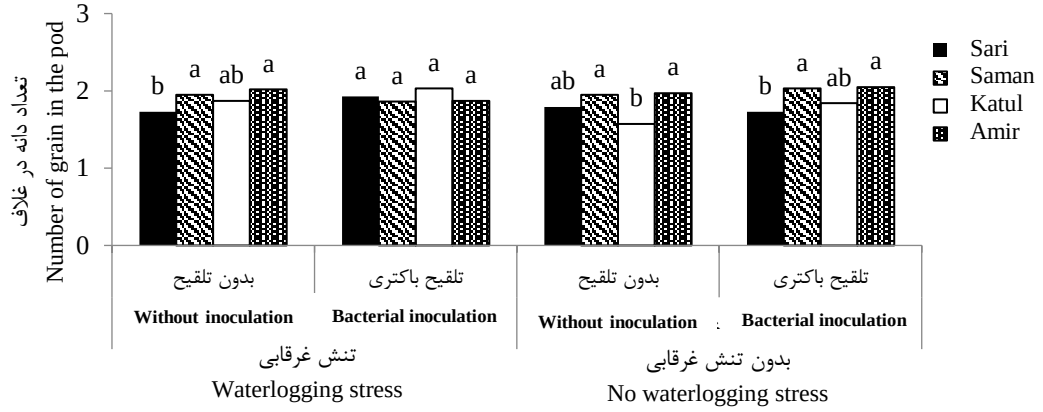
شکل ۸- مقایسه میانگین اثر متقابل رقم×تلقیح باکتری×تنش غرقابی بر وزن غلاف در بوته سویا.

Figure 8. Comparison of the average interaction effect of cultivar × bacterial inoculation × waterlogging stress on pod weight in soybean plants.

تعداد دانه در غلاف

نتایج تجزیه واریانس نشان داد اثر برهمکنش رقم × تلقیح باکتری × غرقاب بر تعداد دانه در غلاف در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۳). پاسخ تعداد دانه در غلاف به تلقیح باکتری و تنش غرقابی به رقم وابسته بود. در شرایط بدون تنش، تلقیح *باکتری برادی ریزوبیوم ژاپونیکوم* موجب افزایش تعداد دانه در ارقام سامان، کتول و امیر شد، در حالی که در رقم ساری تغییر محسوسی مشاهده نشد (شکل ۹). همچنین تنش غرقابی اثر یکنواختی بر این صفت نداشت و در برخی ارقام، به‌ویژه کتول، تعداد دانه در غلاف حفظ یا حتی افزایش یافت. در شرایط غرقابی، تلقیح *باکتری برادی ریزوبیوم ژاپونیکوم* بیشترین تأثیر مثبت را در رقم کتول نشان داد و موجب ثبت بالاترین تعداد دانه در غلاف شد (شکل ۹). تفاوت پاسخ ارقام به تلقیح باکتری و تنش غرقابی بیانگر نقش ویژگی‌های ژنتیکی در حفظ اجزای عملکرد است. افزایش تعداد دانه در غلاف در برخی ارقام احتمالاً ناشی از بهبود وضعیت تغذیه‌ای و حفظ فعالیت فیزیولوژیکی گیاه در شرایط تنش بوده است. در مجموع، رقم کتول با حفظ تعداد دانه در غلاف تحت شرایط

غرقابی و تلقیح باکتری، سازگاری مطلوب‌تری نسبت به سایر ارقام نشان داد.



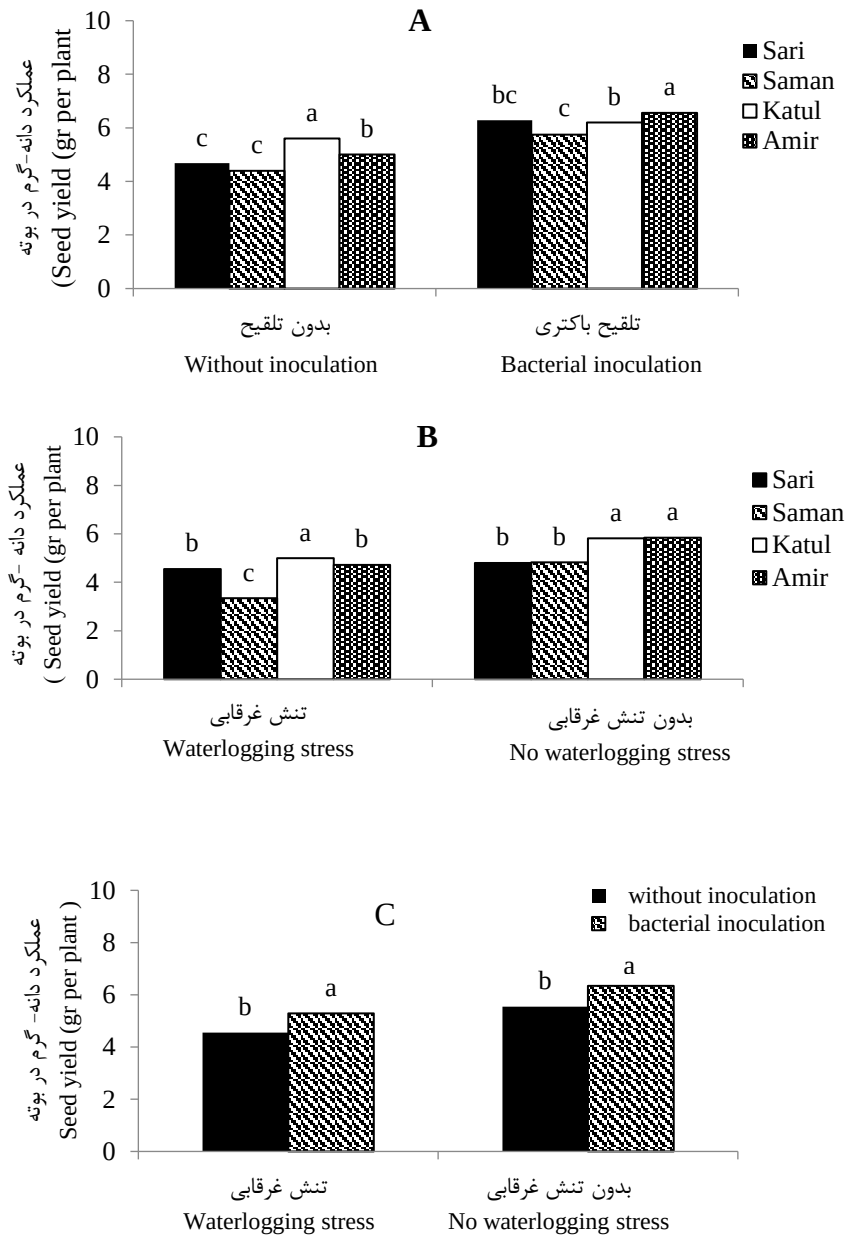
شکل ۹- مقایسه میانگین اثر متقابل رقم × تلقیح باکتری × تنش غرقابی بر تعداد دانه در غلاف سویا.

Figure 9. Comparison of the average interaction effect of cultivar × bacterial inoculation × waterlogging stress on the number of seeds in soybean pods.

عملکرد دانه

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثرات برهمکنش رقم × تلقیح باکتری، رقم × غرقاب و غرقاب × تلقیح باکتری بر عملکرد دانه در بوته در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۳). اثر تلقیح باکتری بر عملکرد دانه به رقم وابسته بود. تلقیح باکتری موجب افزایش عملکرد دانه در تمام ارقام موردبررسی شد و بیشترین عملکرد در رقم امیر مشاهده گردید (شکل ۱۰- a). بیشترین پاسخ به تلقیح در رقم ساری ثبت شد، به‌طوری‌که عملکرد دانه آن حدود ۳۴ درصد نسبت به عدم تلقیح افزایش یافت (شکل ۱۰- a). همچنین، در شرایط عدم تلقیح، رقم کتول بیشترین عملکرد دانه را داشت، اما پس از تلقیح، رقم امیر با ثبت ۶/۵۶ گرم در بوته، بالاترین عملکرد را در بین ارقام مورد بررسی به خود اختصاص داد (شکل ۱۰- a). همچنین نتایج نشان داد تنش غرقابی موجب کاهش عملکرد دانه در تمامی ارقام مورد بررسی شد، اما شدت این کاهش بین ارقام متفاوت بود (شکل ۱۰- b). در شرایط بدون تنش، ارقام امیر و کتول بیشترین عملکرد دانه را داشتند، در حالی که با اعمال تنش غرقابی، عملکرد تمامی ارقام کاهش یافت (شکل ۱۰- b). با این وجود، رقم کتول بالاترین عملکرد دانه را تحت تنش حفظ کرد، در حالی که رقم سامان بیشترین افت عملکرد را نشان داد (شکل ۱۰- b). این نتایج می تواند بیانگر تفاوت ژنتیکی ارقام در میزان تحمل به تنش غرقابی و توانایی حفظ عملکرد دانه تحت شرایط کمبود اکسیژن در ناحیه ریشه باشد (شکل ۱۰- b).

اثر تلقیح باکتری بر عملکرد دانه به شرایط غرقابی وابسته بود. در شرایط بدون تنش، تلقیح تأثیر معنی‌داری بر عملکرد دانه داشت و موجب کاهش عملکرد دانه شد (شکل ۱۰- c). در شرایط غرقابی، تلقیح باکتری توانست بخشی از کاهش عملکرد ناشی از تنش را جبران کرده و عملکرد دانه را نسبت به تیمار غرقابی بدون تلقیح افزایش دهد (شکل ۱۰- c). این نتایج بیانگر نقش مؤثر *باکتری برادی ریزوبیوم ژاپونیکوم* در کاهش آثار زیان‌بار تنش غرقابی و حفظ عملکرد دانه سویا است (شکل ۱۰- c). این نتایج نشان می‌دهد که کارایی تلقیح باکتری در شرایط تنش بیشتر بوده و احتمالاً از طریق بهبود تغذیه نیتروژنی و حفظ فعالیت‌های فیزیولوژیکی گیاه، به کاهش اثرات منفی غرقابی کمک کرده است. همچنین، تفاوت پاسخ ارقام بیانگر نقش مهم ویژگی‌های ژنتیکی در تحمل به غرقابی و بهره‌مندی از همزیستی با باکتری‌های تثبیت‌کننده نیتروژن است.



شکل ۱۰- اثر متقابل رقم×تلقیح باکتری، رقم× تنش غرقابی و تنش غرقابی× تلقیح باکتری بر عملکرد دانه در بوته سویا.

Figure 10. Interaction effect of cultivar × bacterial inoculation, cultivar × waterlogging stress, and waterlogging stress × bacterial inoculation on grain yield in soybean plants.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این پژوهش نشان داد که تنش غرقابی با کاهش رنگیزه‌های فتوسنتزی، اختلال در تثبیت بیولوژیک نیتروژن و افت عملکرد دانه، رشد و عملکرد سویا را تحت تأثیر قرار داد. با این حال، شدت این اثرات در ارقام مختلف متفاوت بود. تلقیح بذر با *باکتری برادی ریزوبیوم ژاپونیکوم* در شرایط بدون تنش، عملکرد دانه رقم ساری را حدود ۳۴ درصد نسبت به عدم تلقیح افزایش داد و بیشترین عملکرد دانه (۶/۵۶ گرم در بوته) در رقم امیر حاصل شد. همچنین در شرایط غرقابی، تلقیح *باکتری برادی ریزوبیوم ژاپونیکوم* عملکرد دانه را از ۴/۵۵ به ۵/۲۹ گرم در بوته (حدود ۱۶ درصد) افزایش داد که نشان‌دهنده نقش این باکتری در کاهش خسارت ناشی از تنش است.

از نظر صفات فیزیولوژیک، تلقیح باکتری موجب افزایش کلروفیل a و b در تمامی ارقام بدون تنش شد؛ به‌طوری‌که بیشترین افزایش کلروفیل a و b به‌ترتیب در ارقام ساری (۸۹ درصد) و سامان (۷۴ درصد) مشاهده شد. همچنین تلقیح باکتری در شرایط غرقابی سبب بهبود محتوای کلروفیل و کاروتنوئید، به‌ویژه در ارقام سامان و کتول، شد که بیانگر نقش آن در حفظ ظرفیت فتوسنتزی گیاه تحت تنش است. علاوه بر این، تلقیح *باکتری برادی ریزوبیوم ژاپونیکوم* موجب افزایش تعداد گره‌های ریشه در ارقام کتول و امیر شد؛ به‌گونه‌ای که تعداد گره در رقم امیر از ۱۸ به ۳۱ و در رقم کتول از ۱۲ به ۲۸ گره در بوته افزایش یافت و در شرایط غرقابی نیز این برتری حفظ شد.

در مجموع، رقم ساری با حفظ بهتر رنگیزه‌های فتوسنتزی، پاسخ مطلوب به تلقیح باکتری و دستیابی به بیشترین عملکرد دانه، تحمل بیشتری به تنش غرقابی نشان داد. از سوی دیگر، ارقام کتول و امیر از نظر صفات مرتبط با تثبیت بیولوژیک نیتروژن و گره‌زایی، پاسخ مناسب‌تری به تلقیح باکتری داشتند. بنابراین، استفاده از تلقیح *باکتری برادی ریزوبیوم ژاپونیکوم*، همراه با انتخاب رقم مناسب، می‌تواند راهکاری مؤثر برای کاهش اثرات منفی تنش غرقابی، بهبود تثبیت بیولوژیک نیتروژن و افزایش پایداری تولید سویا در مناطق مستعد غرقابی باشد.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تعارض منافعی در خصوص انتشار این مقاله وجود ندارد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از همکاری صمیمانه پرسنل آزمایشگاه به جهت فراهم آوردن امکانات انجام این پژوهش کمال تشکر را دارند.

References

1. Ali-Ehyaei, M. 2007. Description of Chemical Soil Analysis Methods (Volume 2). Publication No. 1024, *Soil and Water Research Institute*, Agricultural Research and Education Institute, Tehran, Iran.(in persian)
2. Ardakani, M. and Nadur, A. 2009. Principles and Techniques for Plant Scientists. Tehran University Press. 270p. (in persian)
3. Arnon D.I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in beta vulgaris. *Plant Physiology*. *24* (1): 1-15. https://doi.org/10.1104/pp.24.1.1
4. Chen, W., Yao, Q., Patil, G.B., Agarwal, G., Deshmukh, R.K., Lin, L., Wang, B., Wang, Y., Prince, S.J., Song, L., Xu, D., An, Y.C., Valliyodan, B., Varshney, R.K. and Nguyen, H.T. 2016. Identification and comparative analysis of differential gene expression in soybean leaf tissue under drought and flooding stress revealed by RNA-Seq. *Frontiers in Plant Science, 7:* 1044. doi: 10.3389/fpls.2016.01044
5. Chieb, M. and Gachomo, E.W. 2023. The role of plant growth promoting rhizobacteria in plant drought stress responses. *BMC plant biology*, *23*(1), 407. Doi: 10.1186/s12870-023-04403-8
6. Daneshian, j. 2020. Collection of publications on world experiences in the agricultural and natural resources sector; Comparison of soybean development in Iran with other countries (No. 4). Agricultural Education Publication. 60 pages. (in persian)
7. Garcia, N., da-Silva, C.J., Cocco, K.L.T., Pomagualli, D., de Oliveira, F.K., da Silva, J.V.L., de Oliveira, A.C.B. and do Amarante, L. 2020. Waterlogging tolerance of five soybean genotypes through different physiological and biochemical mechanisms. *Environmental and Experimental Botany*, *172*: 103975. Doi: 10.1016/j.envexpbot.2020.103975
8. Ghazan Shahi, J. 1997. Soil and Plant Analysis; *Aizh Publications:* Tehran, Iran. p 272. (In Persian)
9. Herzog, M., Striker, G.G., Colmer, T.D. and Pedersen, O. 2016. Mechanisms of waterlogging tolerance in wheat–a review of root and shoot physiology. *Plant, cell & environment*, *39*(5), 1068-1086. https://doi.org/10.1111/pce.12676
10. Khadempir, M. 2013. Effect of flooding period on reproductive stage on some anatomical physiological characteristics and soybean yield. Master's Degree in Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, 125 p. (In persian)(Dissertation)
11. Khan, M.N., Ahmed, I., Ud Din, I., Noureldeen, A., Darwish, H. and Khan, M. 2022. Proteomic insight into soybean response to flooding stress reveals changes in energy metabolism and cell wall modifications. *Plos one, 17*(5), e0264453. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0264453
12. Kim, Y.H., Hwang, S.J., Waqas, M., Khan, A.L., Lee, J.H., Lee, J.D., Nguyen, H.T. and Lee, I.J. 2015. Comparative analysis of endogenous hormones level in two soybean (*Glycine max* L.) lines differing in waterlogging tolerance. *Front. Plant Sci. 6*:714. doi: 10.3389/fpls.2015.00714
13. Krisnawati, A., Nuryati, & Adie, M.M. 2021. Agronomic tolerance changes of soybean genotypes under waterlogged condition. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 648, No. 1, p. 012046). IOP Publishing. DOI: 10.1088/1755-1315/648/1/012046
14. Ladha, J.K., Peoples, M.B., Reddy, P.M., Biswas, J.C., Bennett, A., Jat, M.L., Krupnik, T.J. 2022. Biological nitrogen fixation and prospects for ecological intensification in cereal-based cropping systems. *Field Crops Res*. 283, 108541. https://doi.org/10.1016/j.fcr.2022.108541.
15. Liu, K., Harrison, M.T., Ibrahim, A., Manik, S.N., Johnson, P., Tian, X., Meinke, H. and Zhou, M. 2020. Genetic factors increasing barley grain yields under soil waterlogging. *Food Energy Secur. 9*, e238. https://doi.org/10.1002/fes3.238
16. Maluk, M., Giles, M., Wardell, G.E., Akramin, A.T., Ferrando-Molina, F., Murdoch, A., Barros, M., Beukes, C., Vasconçelos, M., Harrison, E., Daniell, T.J., Quilliam, R.S., Iannetta, P.P.M. and James, E.K. 2023. Biological nitrogen fixation by soybean (*Glycine max* [L.] Merr.), a novel, high protein crop in Scotland, requires inoculation with non-native bradyrhizobia. *Front.*

Agron. *5*:1196873. doi: 10.3389/fagro.2023.1196873

17. Mutava, R.N., Prince, S.J.K., Syed, N.H., Song, L., Valliyodan, B., Chen, W. and Nguyen, H.T. 2015. Understanding abiotic stress tolerance mechanisms in soybean: A comparative evaluation of soybean response to drought and flooding stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, *86*, 109-120. Doi: 10.1016/j.plaphy.2014.11.010.
18. Pandit, M., Panthi, S. and Chiluwal, A. 2026. Biological Nitrogen Fixation in Soybean: Mechanisms, Benefits, Sustainability, and Future Prospects. *Agronomy*, *16*(10), 946. https://doi.org/10.3390/agronomy16100946
19. Pirdehghan, S., Rahemi-Karizaki, A., Gholamali Pouralemdari, A., Sabouri, H. 2019. Germination and growth of wheat seedlings in response to waterlogging stress. *Journal of applied research of plant ecophysiology. 7* (14):1-24. (in persian).
20. Pirvali Beiranvand, N., Afrideh, H., Saqeb, N.A. and Saleh Rastin, N. 2003. Study of the ability of some strains of *Rhizobium japonicum* to provide nitrogen to soybean cultivars. *Iranian Journal of Agriculture Science*, *34*(1), 97-104. (in persian).
21. Pucciariello, C., Boscari, A., Tagliani, A., Brouquisse, R. and Perata, P. 2019. Exploring legume-rhizobia symbiotic models for waterlogging tolerance. *Frontiers in Plant Science*, *10*, 578. https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00578
22. Qi, X., Li, Q., Ma, X., Qian, C., Wang, H., Ren, N., Shen, Ch., Huang, SH., Xu, W., Xu, Q. and Chen, X. 2019. Waterlogging-induced adventitious root formation in cucumber is regulated by ethylene and auxin through reactive oxygen species signalling. *Plant, Cell & Environment*, *42*(5), 1458-1470. https://doi.org/10.1111/pce.13504
23. Qin, P., Wang, T. and Luo, Y. 2022. A review on plant-based proteins from soybean: Health benefits and soy product development. *Journal of Agriculture and Food Research*, *7*, 100265. https://doi.org/10.1016/j.jafr.2021.100265
24. Rasouli, F., Galashi, S., Pirdashti, H. and Zeinali, E. 2014. Investigation of waterlogging stress effect on yield and yield components of rapeseed (*Brassica napus* L.). *Journal of Crop Production, 7*(2), 23-42. https://doi.org/20.1001.1.2008739.1393.7.2.2.7 (in persian)
25. Razmi, N. 2022. Soybean Production. Agricultural Education and Extension, *Agricultural Education Publication*. 72 pages. (in persian)
26. Seyed Sharifi, R. 2013. The effect of seed inoculation with rhizobium and nitrogen fertilizer application on soybean yield and agronomic characteristics under Ardabil conditions. *Iranian Agricultural Research. 11*(4): 618-628. (in persian)
27. Schuman, G.E., Stanley, M.A. and Knudsen, D. 1973. Automated total nitrogen analysis of soil and plant samples. *Soil Science Society of America Journal*, *37*(3): 480–481. https://doi.org/10.2136/sssaj1973.03615995003700030045x.
28. Tewari, S. and Arora, N.K. 2016. Soybean production under flooding stress and its mitigation using plant growth-promoting microbes. In Environmental stresses in soybean production (pp. 23-40). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801535-3.00002-4
29. Turani, M. 2013. Studying the effect of flooding period in the vegetative growth stage on some physiological and anatomical characteristics and yield of soybean. Master's thesis, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources. 117 pp. (in persian)
30. Wu, C., Zeng, A., Chen, P., Florez-Palacios, L., Hummer, W., Mokua, J., Klepadlo, M., Yan, L., MA, Q. and Cheng, Y. 2017. An effective field screening method for flood tolerance in soybean. Plant Breeding, 136(5), 710-719. https://doi.org/10.1111/pbr.12487
31. Wybouw, B. and De Rybel, B. 2019. Cytokinin–a developing story. Trends in plant science, 24(2), 177-185. https://doi.org/S1360-1385(18)30245-0
32. Xuewen, X., Huihui, W., Xiaohua, Q., Qiang, X. and Xuehao, C. 2014. Waterlogging-induced increase in fermentation and related gene expression in the root of cucumber (Cucumis sativus L.). Scientia Horticulturae, 179, 388-395.

https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.10.001

33. Zhang, P., Lyu, D., Jia, L., He, J. and Qin, S. 2017. Physiological and de novo transcriptome analysis of the fermentation mechanism of Cerasus sachalinensis roots in response to short-term waterlogging. BMC genomics, 18, 1-14. https://doi.org/10.1186/s12864-017-4055-1
34. Zimmer, S., Messmer, M., Haasec, Th., Piepho, H.P., Mindermann, A., Schulz, H., Habekub, A., Ordon, F., Wilbois, K.P. and Heb, J. 2016. Effects of soybean variety and Bradyrhizobium strains on yield, protein content and biological nitrogen fixation under cool growing conditions in Germany. Europ. J. Agron., 72: 38–46. https://doi.org/10.1016/j.eja.2015.09.008

.

Contents

Subject **Page**

Preliminary Screening and Identification of Biosurfactant-Producing Bacteria Derived from Olive Waste and Petroleum Hydrocarbon–Contaminated Soils ……..…..……1
Ali Ebadi , Sepideh Al-Sadat Jamali, and Mehran Kamrani

Plant–Mycorrhiza Responses to Drought Stress: Analysis of Vital Processes and Defense Mechanisms.....18
Habiballah Nadian Ghomsheh

Comparison of Ecotoxicity of Copper Oxide and Nickel Oxide Nanoparticles on Soil Enzyme Activities in Two Different Soil Textures.....61
Shekoofeh Rezaei, Ali Khanmirzaei, and Vahideh Sharifi Golro

Development and Validation of a Novel Rapid Three-Dimensional Assay for Phosphate Solubilization in Spore-Forming Gram-Positive Bacteria.....81
Shakiba Reisi, Hossein Ali Alikhani, Alireza Fallah Nosrat Abad, Bahman Khoshru , and Ahmad Ali Pourbabaei

The Effect of Zinc, Phosphorus and Bioiofertilizers Application on Yield and Growth Indices in Pinto Bean……...…...105
Akbar Hemmati , Ahmad Asgharzadeh, and yaghoubali Karami

The Effect of Bradyrhizobium Inoculation on Nitrogen Fixation, Yield, and Yield Components in Soybean Cultivars (*Glycine max L.*) under Waterlogging Stress ……..129
Serollah Galeshi , Mitra Toloo Hafezian , AbdolRahman Daz, and Ebrahim Zeinali

Soil Science Society of Iran Soil and Water Research Institute

Journal of Soil Biology

Vol. 14, No 1
2026

Manager-in–Charge; K. Bazargan, PhD
Associate Professor, Soil and Water Research Institute
Editor-in–Chief: Alireza Fallah Nosratabad, PhD
Professor (Research), Soil and Water Research Institute

Editorial Board

Hadi Asadi Rahmani, PhD	**Professor (Research), Soil and Water Research Institute**
Hossein Ali Alikhani, phD	**Professor, University of Tehran**
Naser Aliasgharzad, PhD	**Professor, University of Tabriz**
Hossein Besharati, PhD	**Professor, Soil and Water Research Institute**
Alireza Fallah Nosratabad, PhD	**Associate Professor, Soil and Water Research Institute**
Ahmad Golchin, PhD	**Professor, University of Zanjan**
Amir Lakzian, PhD	**Professor, Ferdowsi University of Mashhad**
Habibollah Nadian Ghomshe, PhD	**Professor, Ramin Agricultural and Natural Resources University of Khuzestan**
Farshid Norbakhsh, PhD	**Professor, Isfahan University of Technology**
Abdol Hossein. Ziaeian, PhD	**Associate Professor of Agricultural and Natural Resources Research Center of Fars**

English Editor:	**Bahman Khoshru, PhD**
Technical Editor:	**Eng. Kiana khamehchi**

Address: P. O. Box: 31785-311, Karaj – IRAN
Tel / Fax: 026-36208796
SSSI Website: www.soiliran.org
Soil and Water Research Institute Website: www.swri.ir
Journal Website: www.sbj.areeo.ir
E-mail: jsb.soilbiology@yahoo.com

Semiannual

Journal of Soil Biology

Contents

Subject Page

Preliminary Screening and Identification of Biosurfactant-Producing Bacteria Derived from Olive Waste and Petroleum Hydrocarbon–Contaminated Soils 1
Ali Ebadi , Sepideh Al-Sadat Jamali, and Mehran Kamrani

Plant–Mycorrhiza Responses to Drought Stress: Analysis of Vital Processes and Defense Mechanisms.....19
Habiballah Nadian Ghomsheh

Comparison of Ecotoxicity of Copper Oxide and Nickel Oxide Nanoparticles on Soil Enzyme Activities in Two Different Soil Textures.....61
Shekoofeh Rezaei, Ali Khanmirzaei, and Vahideh Sharifi Golro

Development and Validation of a Novel Rapid Three-Dimensional Assay for Phosphate Solubilization in Spore-Forming Gram-Positive Bacteria.....81
Shakiba Reisi, Hossein Ali Alikhani, Alireza Fallah Nosrat Abad, Bahman Khoshru , and Ahmad Ali Pourbabaei

The Effect of Zinc, Phosphorus and Bioiofertilizers Application on Yield and Growth Indices in Pinto Bean.....105
Akbar Hemmati , Ahmad Asgharzadeh, and yaghoubali Karami

The Effect of Bradyrhizobium Inoculation on Nitrogen Fixation, Yield, and Yield Components in Soybean Cultivars (*Glycine max L.*) under Waterlogging Stress 129
Serollah Galeshi , Mitra Toloo Hafezian , AbdolRahman Daz, and Ebrahim Zeinali

www.sbj.areeo.ir