Archive of SID

ارزیابی کلنیزاسیون ریشه و ترکیبات بیوشیمیایی زعفران تحت رژیم آبیاری، تلقیح قارچ میکوریز آربوسکولار و کود دهی آلی

مریم حبیبی، فرهاد رجالی[1]، فائزه زعفریان و نادعلی باقری

دانشجوی دکتری، گروه زراعت، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری؛ **Maryam.habibi462@gmail.com**

دانشیار موسسه تحقیقات خاک و آب سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی ، کرج ایران، **frejali@yahoo.com**

دانشیار گروه زراعت، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری؛ **fa_zaefarian@yahoo.com**

دانشیار گروه اصلاح نباتات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری؛ **bagherinadali@yahoo.com**

دریافت: **1400/6/1** پذیرش: **1400/10/29**

چکیده

به‌منظور ارزیابی پتانسیل گونه‌های بومی قارچ میکوریز آربوسکولار زعفران در شرایط تنش قطع آبیاری بر صفات فیزیولوژیک آن، آزمایشی به‌صورت اسپلیت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در طی سال‌های 98-1396 در مؤسسه تحقیقات خاک و آب واقع در شهرستان کرج اجرا شد. تیمارها شامل: رژیم آبیاری به‌عنوان عامل اصلی در سه سطح (آبیاری مطلوب، قطع آبیاری در ابتدای فصل رشد (محدودیت ملایم آبی) و قطع آبیاری در ابتدا و اواسط فصل رشد (محدودیت شدید آبی))، و عامل فرعی کود آلی در سه سطح (عدم مصرف کود آلی، ورمی‌کمپوست (20 تن در هکتار) و بیوچار (10 تن در هکتار)) و قارچ میکوریز آربوسکولار در سه سطح (عدم مصرف، جدایه a و جدایه b) بودند. بر اساس یافته‌های مولکولی هر دو جدایه جداسازی شده از ریزوسفر زعفران متعلق به گونه *Rhizophagus irregularis* بود. نتایج این مطالعه نشان داد برهمکنش رژیم آبیاری، کود آلی و قارچ *R. irregularis* اثر معنی‌داری بر تمام پارامترهای اندازه‌گیری شده داشت. بالاترین درصد کلنیزاسیون ریشه برای تیمار آبیاری مطلوب به‌همراه بیوچار با جدایه b (98/7 درصد) بود. بیشترین محتوای کلروفیل a، b و کاروتنوئید (به‌ترتیب با میانگین 5/74، 4/36 و 1/52 میکروگرم در میلی‌لیتر) در تیمار آبیاری مطلوب به همراه ورمی‌کمپوست با جدایه b مشاهده شد. همچنین تیمار محدودیت شدید آبی به‌همراه بیوچار با جدایه b به‌ترتیب موجب افزایش 253، 82، 95 و 165 درصد فعالیت آنزیم کاتالاز، پراکسیداز و سوپراکسید دسموتاز و پرولین در مقایسه با تیمار آبیاری مطلوب و عدم مصرف کود آلی و قارچ میکوریز شد که کمترین مقدار این صفات را به خود اختصاص داده بود. با توجه به نتایج به‌دست آمده از این مطالعه چنین استدلال می‌شود که استفاده از کودهای بیوچار و ورمی‌کمپوست همراه با جدایه b می‌تواند اثرات مخرب تنش رطوبت خاک را کاهش دهد.

واژه‌های کلیدی: آبیاری، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، بیوچار، پرولین، شناسایی قارچ میکوریز آربوسکولار، کلنیزاسیون ریشه

[1]. نویسنده مسئول، آدرس: مؤسسه تحقیقات خاک و آب سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، کرج ایران

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

زعفران (*Crocus sativus* L.) یکی از قدیمی‌ترین و گران‌قیمت‌ترین ادویه‌های دنیا به‌شمار می‌رود. اگرچه ایران 94 درصد از تولید سالانه زعفران در دنیا به خود اختصاص داده است (اسمی و همکاران، 1397)، اما میانگین عملکرد آن در واحد سطح 3/96 کیلوگرم در هکتار می‌باشد که در مقایسه با کشورهایی مانند اسپانیا با 15 و پاکستان با 9 کیلوگرم در هکتار تفاوت قابل ملاحظه‌ای دارد (رضوانی‌مقدم و همکاران، 1393). کاهش عملکرد اقتصادی در واحد سطح علیرغم افزایش سطح زیرکشت به دلایل مختلف منجمله گرم شدن هوا و کاهش میزان بارش‌های جوی و عدم آبیاری کافی، عدم تأمین مواد آلی و عناصر غذایی مورد نیاز گیاه، عدم کاشت بنه استاندارد و تاریخ کاشت می‌باشد (رمضانی و همکاران، 1399). تنش رطوبتی یکی از مهمترین عوامل کاهش عملکرد ماده خشک به‌ویژه عملکرد اقتصادی در زعفران می‌باشد (ثابت‌تیموری و همکاران، 1389).

خشکی می‌تواند طیف وسیعی از واکنش‌های اساسی فیزیولوژیکی و متابولیکی را که در تنظیم رشد و عملکرد گیاه نقش دارند، مختل کند. تنش خشکی باعث تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) از جمله پراکسید هیدروژن (H2O2)، رادیکال هیدروکسیل (OH) و آنیون سوپراکسید (O_2^-) می‌شود، که منجر به آسیب اکسیداتیو رنگیزه‌های فتوسنتزی، متابولیسم سلولی و ماکرومولکول‌هایی چون لیپیدهای غشایی، اسیدهای نوکلئیک و پروتئین‌ها می‌شود (قربانپور و همکاران، 2020). سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی متشکل از آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی باعث کاهش مؤثر اثرات منفی گونه‌های فعال اکسیژن می‌شود. آنتی‌اکسیدان‌ها مولکول‌های ویژه‌ای هستند که از اکسیداسیون سایر مولکول‌ها توسط گونه‌های فعال اکسیژن جلوگیری می‌کنند و به عنوان سپر دفاعی گیاهان در برابر آسیب اکسیداتیو ناشی از گونه‌های فعال اکسیژن عمل می‌کنند (اسلام و همکاران، 2015). سوپراکسید دسموتاز (SOD)، پراکسیداز (POD) و کاتالاز (CAT) مهمترین سیستم آنزیمی برای حذف گونه‌های فعال اکسیژن و مهمترین پارامتر برای اندازه‌گیری مقاومت به تنش در گیاهان می‌باشد (دیو و همکاران، 2020). بسیاری از مطالعات گزارش کرده‌اند که تنش اکسیداتیو حاصل از خشکی نقش ویژه‌ای در تخریب سامانه فتوسنتزی، تخریب غشای سلولی و کلروپلاستی و کاهش کلروفیل a و b دارد (رسام و همکاران، 1393). تحقیقات مختلف نشان داده‌اند که یک سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی کاملا هماهنگ می‌تواند ظرفیت سمیت بیش از اندازه گونه‌های فعال اکسیژن را کاهش داده و به محافظت از سلول در برابر آسیب اکسیداتیو و افزایش تحمل به خشکی گیاهان کمک کند (ژنگ و همکاران، 2018). کوماری و همکاران (2018) افزایش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز را در واکنش به تنش خشکی در ارقام مختلف گیاه ماش (*Vigna radiata*) و مالکی و همکاران (2011) آنزیم سوپراکسید دسموتاز در برگ، ریشه و پیاز زعفران گزارش نمودند.

پرولین یک اسید آمینه غیر پروتئینی است که به‌عنوان محافظ اسمزی (یامچی و همکاران، 1383) در ایجاد و حفظ فشار اسمزی درون گیاه نقش مؤثری داشته و در شرایط تنش، تولید و تجمع آن از سایر اسیدهای آمینه بیشتر بوده و به‌عنوان منبع ذخیره ازت و کربن عمل می‌کند. دلیل تجمع پرولین در تنش خشکی، افزایش سنتز آن در اثر کاهش اکسیداسیون گلوتامات و همچنین کاهش مصرف آن برای سنتز پروتئین‌ها به خاطر توقف رشد گیاه می‌باشد (فتحی و همکاران، 1398). مطالعات انجام شده توسط ژنگ و همکارن (2019) در گیاه کاتوس (*Cynanchum thesioides*) و دیو و همکارن (2020) در سویا (*Glycine max*) نشان داد تنش خشکی موجب افزایش معنی‌دار مقدار پروتئین محلول و پرولین می‌شود.

پایداری در سیستم‌های کشاورزی بر لزوم توسعه فناوری‌ها و روش‌هایی متمرکز است که اثر سوئی بر محیط‌زیست نداشته (پرتی، 2007) و منجر به بهبود

www.SID.ir

Archive of SID

بازده اقتصادی و تولید بیشتر برای حفظ مشاغل کشاورزی شود (معروفی و همکاران، 1388). استفاده از کودهای آلی و زیستی به‌دلیل بهبود مواد آلی خاک، زیست‌توده و فعالیت میکروبی خاک و افزایش مقاومت خاک در برابر فرسایش می‌تواند یک جایگزین مناسب برای تداوم تولید محصولات کشاورزی با حداکثر صرفه اقتصادی و حداقل آسیب به محیط‌زیست باشد (دباغیان و همکاران، 1394 و تودان و همکاران، 2015). بیوچار که در کشاورزی به طلای سیاه مشهور است، از طریق فرآیند گرماکافت ترکیبات آلی تولید شده (اختر و همکاران، 2014) و به‌دلیل سطح ویژه، ساختار آروماتیک و نسبت O/C و H/C پایین دارای ثبات بالا بوده (برگمن و همکاران، 2014) و تجزیه آن نسبت به دیگر مواد آلی در خاک بسیار کند می‌باشد، در نتیجه می‌تواند سال‌های متمادی در خاک باقی بماند (100- 1000 سال). علاوه براین به‌دلیل توانایی بالای آن در جذب و نگهداری عناصر غذایی به‌ویژه نیتروژن و فسفر و جلوگیری از آبشویی آنها موجب بهبود رشد و عملکرد گیاهان می‌شود (برک و همکاران، 2011). بسیاری از تحقیقات نشان داده‌اند که ورمی‌کمپوست از جمله مناسب‌ترین منابع غیرشیمیایی تغذیه گیاهی می‌باشد که موجب بهبود عملکرد در زعفران به دلیل افزایش دسترسی به عناصر غذایی می‌شود (سیدی و همکاران، 2018 و امینی‌فرد و همکاران، 1398).

استراتژی حفظ رشد و نمو گیاهان در شرایط تنش خشکی را می‌توان با ارتباط بین ریشه گیاهان با قارچ میکوریز آربوسکولار و مدیریت آب تقویت کرد. میکوریز آربوسکولار به‌عنوان یکی از مهم‌ترین و گسترده‌ترین انواع همزیستی، گسترش و تکامل گیاهان عالی را تحت تأثیر قرار می‌دهد. این همزیستی شامل مجموعه‌ای از فرآیندهای به هم پیوسته است که از یک سو تنش خشکی را از طریق جذب مستقیم آب و انتقال از طریق هیف‌های قارچی به گیاه میزبان کاهش می‌دهد و ازسوی دیگر سبب افزایش جذب عناصر غذایی و سرعت فتوسنتز خالص در گیاه میزبان می‌شود (بدر و همکاران، 2020). علاوه براین قارچ‌های میکوریز با تأثیر بر پایداری خاکدانه‌ها باعث سهولت حرکت آب در خاک و افزایش ظرفیت نگهداری آب و جلوگیری از آبشویی عناصر غذایی می‌شوند (یانگ و همکاران، 2015). هاشم و همکاران (2019) گزارش کردند که تنش خشکی محتوای نسبی آب و شاخص پایداری غشا را در گیاه نخود (*Cicer arietinum* L.) کاهش داد، در حالی که تیمار مصرف بیوچار و قارچ میکوریز آربوسکولار به صورت جداگانه یا ترکیب با هم اثرات مخرب تنش خشکی را تا حد قابل توجهی کاهش دادند و سبب افزایش مقدار این صفات در آبیاری نرمال شدند. این مطالعه به‌منظور ارزیابی پتانسیل گونه‌های بومی قارچ میکوریز آربوسکولار در دو خاک تیمار شده با بیوچار و ورمی‌کمپوست در شرایط تنش قطع آبیاری بر محتوای متابولیت‌های تنشی در زعفران انجام شد.

مواد و روش‌ها

جداسازی و خالص‌سازی اسپور قارچ‌های میکوریز آربوسکولار

نمونه‌برداری از خاک برای جداسازی قارچ میکوریز آربوسکولار در پایان فصل رشد گیاه به‌صورت مرکب از عمق صفر تا 30 سانتی‌متری خاک و در جهت قطر مزرعه در دو شهرستان قائنات و نیشابور به‌ترتیب دارای اقلیم خشک و نیمه خشک در استان خراسان جنوبی و شمالی انجام شد. برای به‌دست آوردن حداکثر تنوع گونه‌ای نمونه‌برداری در مزارعی با فاصله حداقل دو کیلومتر از یکدیگر انجام شد. در مجموع 36 نمونه تهیه و پس از هوا خشک شدن به آزمایشگاه بیولوژی مؤسسه تحقیقات خاک و آب واقع در شهرستان کرج منتقل و در دمای 4 درجه سلسیوس نگهداری شد. با استفاده از استریومیکروسکوپ (x 200)، تعداد هشت جدایه قارچ میکوریز آربوسکولار به روش الک مرطوب و سانتریفوژ در محلول ساکارز 60 درصد، بر اساس ویژگی‌های ظاهری اسپورها شامل رنگ، اندازه، شکل دیواره و نحوه اتصال هیف به دیواره و به‌صورت مورفوتایپ‌های متمایز جداسازی شدند (گردمان و نیکولسن، 1963). برای تهیه

www.SID.ir

Archive of SID

تعداد زیادی اسپور سالم جهت شناسایی و خالص‌سازی و تولید مایه تلقیح اقدام به برقراری کشت تله گلدانی شد. در کشت تله که با گیاه ذرت و در بستر ماسه و در شرایط کاملا استریل انجام گردید از 100 اسپور از هر جدایه برای تلقیح استفاده شد. گیاهان در شرایط گلخانه در دمای 30 درجه سانتی‌گراد و 14 ساعت دوره نوری نگهداری شدند. در پایان سه ماه بخش هوایی گیاه حذف و ریشه‌ها رنگ‌آمیزی شده و جهت اثبات برقراری رابطه همزیستی با استفاده از استریومیکروسکوب بررسی شدند. در نهایت تعداد دو جدایه که دارای رابطه همزیستی موفق و تعداد کافی اسپور بودند، برای شناسایی مولکولی انتخاب و محتویات گلدان‌ها شامل بستر، اسپورها، هیف و ریشه‌های میکوریزی کاملاً با هم مخلوط و به عنوان مایه تلقیح در کشت زعفران استفاده شد.

شناسایی مولکولی جدایه‌ها

ابتدا اسپورها به روش اسرینواسان (2014) استریل و سپس استخراج DNA از اسپور به روش سمانزیک و همکاران (2014) انجام شد. پس از استخراج DNA به آن دو میکرولیتر بافر PCR اضافه و نمونه‌ها برای واسرشت‌سازی اولیه به مدت 15 دقیقه در دمای 94 درجه سانتی‌گراد در ترموسایکلر (Techne, Genius FGEN02TP, USA) گذاشته شدند. PCR به صورت آشیانه‌ای و با کمی تغییر انجام شد (رنکر و همکاران، 2003). برای تکثیر ناحیه ژنی SSU-ITS1-5.8S-ITS2-LSU در قارچ میکوریز آربوسکولار از جفت آغازگرهای SSUmAf و LSUmAr در مرحله اول و جفت آغازگرهای SSUmCf و LSUmBr در مرحله دوم PCR (جدول 1) استفاده شد. واکنش تکثیری در PCR اول و دوم برای یک نمونه به‌ترتیب 20 و 50 میکرولیتر بود که در PCR اول شامل 16/8 میکرولیتر آب مقطر استریل، 0/4 میکرولیتر $dNTP_s$، 0/24 میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای مرحله اول و 0/32 میکرولیتر از Pfu DNA polymerase، و در PCR دوم، 39/2 میکرولیتر آب مقطر استریل، پنج میکرولیتر بافر PCR، یک میکرولیتر $dNTP_s$، یک میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای مرحله دوم، 0/8 میکرولیتر از Pfu DNA polymerase و دو میکرولیتر از محصول PCR اول بود. برنامه دمایی در هر دو PCR یکسان و شامل واسرشتگی اولیه، 4 دقیقه در دمای ^{o}C 94 و 30 چرخه (واسرشتگی 60 ثانیه در دمای ^{o}C 94، اتصال آغازگر 60 ثانیه در دمای ^{o}C 58، بسط 120 ثانیه در دمای ^{o}C 72) و بسط نهایی 7 دقیقه در دمای ^{o}C 72 بود. پس از اتمام واکنش 6 میکرولیتر از محصول مرحله دوم PCR با 3 میکرولیتر بافر لودینگ روی ژل آگارز 1/2 درصد الکتروفورز گردید و اندازه هر محصول به کمک نشانگر مولکولی (bp1500) تخمین زده شد. توالی‌های به‌دست آمده با استفاده از ابزار جستجوی BLAST با سایر توالی-های موجود در بانک ژن NCBI (National Center for Biotechnology Information) مورد مقایسه قرار گرفتند.

مطالعات گلدانی پژوهش

به منظور بررسی اثر قارچ میکوریز آربسکولار جداسازی شده بر صفات فیزیولوژیک زعفران در خاک تیمار شده با بیوچار و ورمی‌کمپوست در شرایط تنش قطع آب، آزمایشی به‌صورت اسپلیت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در طی سال‌های 99 - 1397 در مؤسسه تحقیقات خاک و آب واقع در شهرستان کرج اجرا شد. تیمارها شامل رژیم آبیاری به‌عنوان عامل اصلی در سه سطح [آبیاری مطلوب، قطع آبیاری در ابتدای فصل رشد یا مرحله ظهور برگ‌ها (محدودیت ملایم آبی) و قطع آبیاری در ابتدا و اواسط فصل رشد یا مرحله ظهور برگ‌ها و افزایش وزن بنه‌ها (محدودیت شدید آبی)]، کود آلی در سه سطح [عدم مصرف کود آلی، ورمی‌کمپوست (20 تن در هکتار) و بیوچار (10 تن در هکتار) و قارچ میکوریز در سه سطح عدم مصرف قارچ میکوریز، مصرف جدایه a و جدایه b] به‌عنوان عامل فرعی در نظر گرفته شد.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول 1- نام و توالی آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه

آغازگر	توالی
SSUmAf1	5’-TGGGTAATCTTTTGAAACTTYA-3’
SSUmAf2	5’-TGGGTAATCTTRTGAAACTTCA-3’
SSUmCf1	5’-TCGCTCTTCAACGAGGAATC-3’
SSUmCf2	5’-TATTGTTCTTCAACGAGGAATC-3’
SSUmCf3	5’-TATTGCTCTTNAACGAGGAATC-3’
LSUmAr1	5’-GCTCACACTCAAATCTATCAAA-3’
LSUmAr2	5’-GCTCTAACTCAATTCTATCGAT-3’
LSUmAr3	5’-TGCTCTTACTCAAATCTATCAAA-3’
LSUmAr4	5’-GCTCTTACTCAAACCTATCGA-3’
LSUmBr1	5’-DAACACTCGCATATATGTTAGA-3’
LSUmBr2	5’-AACACTCGCACACATGTTAGA-3’
LSUmBr3	5’-AACACTCGCATACATGTTAG-3’
LSUmBr4	5’-AAACACTCGCACATATGTTAGA-3’
LSUmBr5	5’-AACACTCGCATATATGCTAGA-3’

در این آزمایش گلدان‌هایی به عمق 30 و قطر 26 سانتی‌متر و گنجایش 15 کیلوگرم درنظرگرفته شد. ورمی‌کمپوست و بیوچار به‌ترتیب به‌مقدار پنج و 2/5 گرم در کیلوگرم خاک به خاک الک شده گلدان‌ها اضافه شد. بیوچار باگاس نیشکر از شرکت نوآوران زیست بنیان آویسا و ورمی‌کمپوست بقایای گیاهی از موسسه تحقیقات خاک و آب تهیه شد. نتایج حاصل از تجزیه خاک و نهاده‌های آلی استفاده شده در این بررسی در جدول 2 ارایه شده است. جمعیت قارچ میکوریز در هر گرم خاک و مایه تلقیح مورد استفاده به‌ترتیب حاوی 21 و 630 عدد اندام فعال قارچ بود که به روش دالپی (1993) شمارش شدند. کاشت در تاریخ 29 شهریور 1397 انجام شد. ابتدا نصف ارتفاع گلدان از خاک پر شده، بعد مایه تلقیح به مقدار 5 گرم برای هر گلدان به‌صورت یک لایه در مرکز بستر قرار گرفته و سپس تعداد چهار عدد بنه (میانگین وزن بنه بین 8 تا 11 گرم) روی مایه تلقیح قرار داده و در نهایت بخش دوم خاک به آن اضافه شد. گلدان‌ها در هوای آزاد قرار داده شدند. در شرایط آبیاری کامل، آبیاری به صورت یکنواخت هر 15 روز یک‌بار انجام شد و در فاکتور قطع آبیاری در اوایل فصل رشد قطع آب در 5 آذر (قطع یک دور آبیاری) و در عامل قطع آب در اوایل و اواسط فصل رشد در 5 آذر و 20 اسفند (قطع دو دور آبیاری) انجام شد. قبل و بعد از اتمام دوره قطع آب (یک‌ماهه)، آبیاری به صورت منظم انجام شد. با توجه به احتمال وقوع بارندگی در زمان قطع آبیاری از پوشش پلاستیکی برای جلوگیری از ریزش باران روی گلدان‌ها استفاده شد. عملیات آبیاری و اعمال تنش قطع آب در سال دوم همانند سال نخست انجام گرفت.

جدول 2- ویژگی‌های بیوچار، ورمی‌کمپوست و خاک مورد استفاده در آزمایش

	بافت	pH	هدایت الکتریکی ($dS\ m^{-1}$)	نسبت C/N	خاکستر	کربن آلی (%)	نیتروژن (%)	فسفر ($mg\ kg^{-1}$)	پتاسیم ($mg\ kg^{-1}$)
خاک	لوم رسی	8/4	1/4	-	-	0/68	0/08	11/5	142
بیوچار	-	7/5	0/84	249/3	5/6	69/7	0/279	459	2568
ورمی‌کمپوست	-	7/8	2/8	-	-	26/9	1/84	13200	15400

www.SID.ir

Archive of SID

اندازه‌گیری کلنیزاسیون ریشه

برداشت ریشه در پایان دوره رشد ریشه‌ها در اوایل دی ماه یعنی پس از تخلیه کامل رطوبت بنه‌ها انجام شد. در زعفران به‌دلیل تحلیل رشد ریشه از دی ماه و از بین رفتن کامل آن در فروردین، کلنیزاسیون ریشه تحت تأثیر سطح سوم تنش قرار نگرفته و اندازه‌گیری آن با دوسطح تنش انجام شد (ثابت تیموری و همکاران، 1389 و کاسر و همکاران، 2019). درصد کلونیزاسیون ریشه بوسیله روش نوریس و همکاران (1992) تعیین شد.

اندازه‌گیری رنگیزه‌های فتوسنتزی: اندازه‌گیری محتوای کلروفیل a، b، کل و کارتنوئید بر اساس روش آرنون (1949) و از طریق ساییدن 0/2 گرم نمونه برگی در استن 80 درصد و قرائت جذب نور در طول موج‌های 652/4، 665/2 و 470 انجام شد

تعیین مقدار پروتئین محلول و آنزیم‌های آنتی اکسیدان

برای استخراج عصاره‌ی گیاهی مقدار 0/2 گرم نمونه برگی را در ازت مایع در هاون کاملاً پودر کرده سپس پودر حاصل به میکروتیوپ 2 میلی‌لیتر منتقل و 1800 میکرولیتر بافر فسفات به آن اضافه شد. همگن‌های حاصل به مدت 18 دقیقه در دمای 4 درجه‌ی سانتی‌گراد با سرعت 20000 دور سانتریفوژ شد. در نهایت محلول رویی از بخش ته‌نشین شده جدا و برای سنجش پروتئین محلول به روش بردفورد (1976) و فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و سوپراکسید دسموتاز به‌ترتیب به روش‌های ابی (1984)، تنگ و نیوتن (2005) و بیوچامپ و فریدویچ (1971) مورد استفاده قرار گرفت.

اندازه‌گیری پرولین

به‌منظور اندازه‌گیری پرولین با روش بیتس و همکاران (1973) مقدار 0/5 گرم از نمونه‌های تر برگ با نیتروژن مایع درون هاون ساییده و در 10 میلی‌لیتر اسید سولفوسالیسیلیک 3 درصد هموژنیزه شد. ماده همگن حاصل را با دور 15000 دور به‌مدت 15 دقیقه در دمای 4 درجه‌سانتی‌گراد با سانتریفوژ یخچال‌دار (مدل KUBOTA-6900) سانتریفوژ نموده تا مواد اضافی از محلول جدا شود. سپس 1 میلی‌لیتر از روشناور حاصل را به لوله‌های آزمایش منتقل نموده و به همه لوله‌ها 1 میلی-لیتر اسید استیک گلاسیال و 1 میلی‌لیتر اسید نین‌هیدرین اضافه شد. ترکیب حاصل به‌مدت 1 ساعت در حمام گرم و در دمای 100 درجه سانتی‌گراد گذاشته شد. پس از این مرحله برای پایان یافتن واکنش، لوله‌های آزمایش در داخل یک بستر یخی قرار گرفته و 2 میلی‌لیتر تولوئن به هر لوله اضافه و به مدت 20 ثانیه ورتکس شد. سرانجام فاز رویی که به رنگ قرمز درآمده و حاوی پرولین محلول در تولوئن بوده را برداشته و همزمان با نمونه‌های استاندارد، با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج 520 نانومتر در مقایسه با شاهد که محتوی تولوئن بود قرائت شد؛ و در نهایت با توجه به منحنی استاندارد حاصل از غلظت‌های مختلف پرولین، میزان پرولین نمونه‌ها بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر محاسبه شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS (9.1) و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) در سطح احتمال پنج درصد انجام شد.

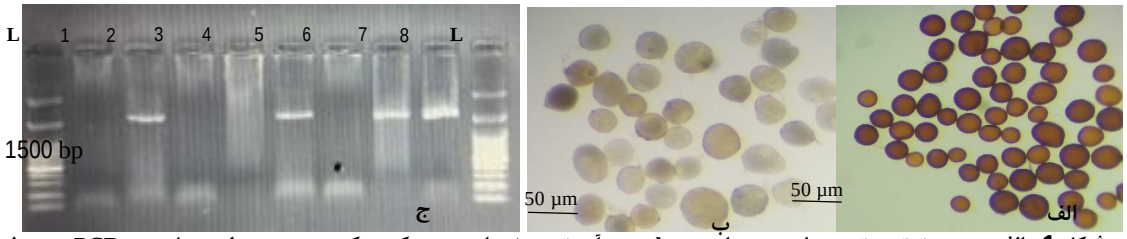
نتایج و بحث

شناسایی مولکولی

نتایج حاصل از تکثیر ناحیه SSU-ITS1-5.8S-ITS2-LSU منجر به شناسایی قطعه‌ای ژنومی به طول 1500 جفت‌باز شد (کروگر و همکاران، 2009) که پس از بررسی در بانک ژن NCBI نشان داد که جدایه a با شماره دسترسی MW254988 و جدایه b با شماره دسترسی MW254990 متعلق به گونه *Rhizophagus irregularis* می‌باشد.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل 1- الف و ب به ترتیب تصویر اسپور جدایه a و b درون آب تحت نور استریو میکروسکوپ. ج محصول مرحله دوم PCR روی ژل آگارز 1/2 درصد، L: نشانگر، 4- 1: جدایه a، 7- 5: جدایه b و 8: شاهد

درصد کلنیزاسیون ریشه

درصد کلنی‌زایی ریشه تحت تأثیر معنی‌دار برهمکنش رژیم آبیاری، کود آلی و قارچ *R. irregularis* قرار گرفت ($p\leq0.01$) (جدول 3). در صفت درصد کلنی-زایی ریشه هر دو جدایه موجب افزایش این صفت شدند به‌طوری‌که بین دو جدایه در تیمار بیوچار و در هر دو سطح آبیاری تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد؛ اما در تیمار ورمی‌کمپوست در شرایط آبیاری مطلوب جدایه b بهتر از جدایه a عمل کرد. بر اساس نتایج مقایسه میانگین بیشترین درصد کلنی‌زایی ریشه در گلدان در تیمار آبیاری مطلوب به‌همراه بیوچار و جدایه b (98/7 درصد) به‌دست آمد که با تیمارهای آبیاری مطلوب به‌همراه بیوچار و جدایه a، آبیاری مطلوب به‌همراه ورمی‌کمپوست و جدایه b، محدودیت ملایم آبی به‌همراه بیوچار و جدایه a و b و محدودیت ملایم آبی به‌همراه ورمی‌کمپوست و جدایه b تفاوت آماری نداشت. همچنین کمترین درصد کلنی‌زایی ریشه برای تیمار محدودیت ملایم آبی و عدم مصرف کود آلی و قارچ میکوریز (47/4 درصد) بود (جدول 4)؛ که این نتایج با مطالعه میکان و همکاران (2016) در برهمکنش بیوچار و قارچ میکوریز در شرایط تنش خشکی بر کلنیزاسیون ریشه گیاه شبدر (*Trifolium subterraneum*) مطابقت دارد، اما با نتایج لیو و همکاران (2017) در گیاه سیب زمینی (*Solanum tuberosum*) کاملا تفاوت دارد. تلقیح بنه‌های زعفران با قارچ *R. intraradis* به‌صورت منفرد و ترکیب با قارچ *F. mosseae* در شرایط تنش خشکی نشان داد تلقیح با هر دو گونه بالاترین درصد کلنی‌زایی ریشه (100 درصد) را نسبت به کاربرد قارچ *R. intraradis* به‌صورت تنها (82 درصد) داشت (کاسر و همکاران، 2018).

محتوای کلروفیل

براساس نتایج به دست آمده برهمکنش رژیم آبیاری، کود آلی و قارچ *R. irregularis* اثر معنی‌داری بر محتوای کلروفیل a، b و کل داشت ($p\leq0.01$) (جدول 3).

محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی با افزایش سطوح قطع آبیاری در همه تیمارها کاهش یافت این در حالی بود که تلقیح با هر دو جدایه *R. irregularis* در تمام تیمارهای کود آلی اثر مثبتی بر محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی نسبت به شاهد داشت. به طوری که تیمار محدودیت شدید آب و عدم مصرف کود آلی و قارچ میکوریز حداقل مقدار کلروفیل a، b و کل را داشت که نسبت به تیمار آبیاری مطلوب به همراه ورمی‌کمپوست با جدایه b که حداکثر مقدار کلروفیل a، b و کل را به خود اختصاص داد به‌ترتیب 117، 233 و 146 درصد کاهش یافت (جدول4). مطالعه پژوهشگران بر روی گیاه خارمریم (*Silybum marianum*) نشان داد که تلقیح با قارچ میکوریز به تنهایی و یا به‌صورت ترکیب با ورمی-کمپوست موجب افزایش قابل‌توجه محتوای کلروفیل a و b و کاروتنوئید نسبت به شاهد شد (نیکاه نائینی و همکاران، 2017). محتوای کلروفیل با مقدار عناصر جذب شده توسط گیاه از خاک ارتباط مستقیم دارد و به دلیل اینکه ورمی‌کمپوست حاوی عناصر غذایی ماکرو و میکرو می‌باشد می‌تواند اثر مثبتی بر تغذیه گیاهی، فتوسنتز و مقدار کلروفیل برگ داشته باشد (فیاضی و همکاران، 1397). اختر و همکاران (2015) افزایش محتوای کلروفیل برگ در گیاهان میکوریزی و غیرمیکوریزی گوجه‌فرنگی رشد یافته در بستر کمپوست + بیوچار گزارش کردند. شنگ و همکاران (2008) دلیل همبستگی مثبت بین محتوای کلروفیل و قارچ میکوریز در گیاه ذرت (*Zea mays*) را افزایش جذب عناصر غذایی به ویژه منیزیم معرفی کرده‌اند. کاهش میزان کلروفیل a، b و کل در شرایط تنش کم‌آبی توسط ثابت‌تیموری و همکاران (1389) در زعفران و توسط اصلانی و همکاران (1390) در گیاه ریحان (*Ocimum basilicum* L.) گزارش شده است.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول 3- نتایج تجزیه واریانس رژیم آبیاری، کود آلی و قارچ *R. irregularis* بر کلنیزاسیون ریشه و ترکیبات بیوشیمیایی در زعفران

منابع تغییر	درجه آزادی	کلنیزاسیون ریشه	کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل کل	کاروتنوئید	کاتالاز	گایاکول پراکسیداز	سوپراکسیداز دسموتاز	پروتئین محلول	پرولین
آبیاری	2	38/5**	36524/2**	294/8**	1598/5**	6167/8**	1980/9**	1430/6**	5714/2**	6/063E3**	3/481E5**
آبیاری × تکرار	6	0/563	1/43	1/41	1/26	1/08	0/806	1/65	2/33	2/34	1/76
کود آلی	2	379/45**	968/2**	429/04**	1045/1**	873/9**	63/8**	115/5**	615/6**	964/08**	2/253E3**
قارچ میکوریز	2	3629/7**	368/3**	103/9**	282/1**	204/7**	76/7**	39/8**	171/3**	202/4**	488/6**
آبیاری × کود آلی	4	1/25^{ns}	17/95**	4/65**	1/93^{ns}	21/3**	2/9*	18/3**	20/1**	58/19**	56/12**
آبیاری × میکوریز	4	4/71**	8/93**	4/81**	3/3*	16/5**	2/87*	1/99^{ns}	17/22**	3/82**	18/48**
کود آلی × میکوریز	4	2/33^{ns}	8/83**	5/34**	8/88**	5/3**	2/63*	2/96*	8/99**	14/42**	12/51**
آبیاری × کود آلی × میکوریز	8	4/4**	3/2**	6/71**	7/95**	15/8**	3/52**	9/39**	3/93**	21/002**	29/33**
خطای فرعی	48	2/248	0/009	0/002	0/001	0/006	9/22	0/116	0/008	0/008	0/001
ضریب تغییرات (%)		1/9	5/6	1/1	2/2	1/6	5/2	2/1	1/2	1/5	3/6

ns، * و** به ترتیب نبود اختلاف معنی‌دار و اختلاف معنی‌دار در سطح پنج و یک درصد

www.SID.ir

Archive of SID

کاروتنوئید

یافته‌های حاصل از این پژوهش نشان داد اثر برهمکنش رژیم آبیاری، کود آلی و قارچ *R. irregularis* بر محتوای کاروتنوئید معنی‌دار شد ($p\leq0.01$) (جدول 3). با افزایش سطوح قطع آبیاری محتوای کاروتنوئید در همه تیمارها کاهش یافت. در تمام سطوح رطوبتی کاربرد کودهای آلی و قارچ میکوریز موجب افزایش محتوای کاروتنوئید نسبت به شاهد شد، به نحوی که حداکثر و حداقل مقدار کاروتنوئید به ترتیب با میانگین 0/991 و 0/105 میلی‌گرم در گرم وزن تر در تیمارهای آبیاری مطلوب به همراه ورمی‌کمپوست با جدایه b و محدودیت شدید آب و عدم مصرف کود آلی و قارچ میکوریز حاصل شد (جدول 4) چن و همکاران (2020) گزارش کردند در شرایط تنش خشکی محتوای کاروتنوئید در گیاهچه‌های پیچ‌اناری (*Catalpa bungei*) تلقیح شده با قارچ میکوریز آربوسکولار بیشتر از گیاهان تلقیح نشده بود. همچنین بین قارچ میکوریز با محتوای کلروفیل و کاروتنوئید همبستگی مثبت و معنی‌داری وجود داشت که نقش مثبت قارچ میکوریز در تولید رنگدانه‌های فتوسنتزی را تأیید می‌کند. ضیایی و همکاران (1396) کاهش میزان کاروتنوئید در شرایط تنش کم‌آبی در ارقام مختلف ماش (*Vigna radiate* L.) را به دلیل اکسید شدن رنگدانه‌های فتوسنتزی توسط اکسیژن فعال و تخریب ساختار آنها نسبت داده‌اند.

آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان

بر اساس یافته‌ها برهمکنش رژیم آبیاری، کود آلی و قارچ *R. irregularis* اثر معنی‌داری بر فعالیت آنزیم کاتالاز، گایاکول پراکسیداز و سوپراکسید دسموتاز داشت ($p\leq0.01$) (جدول 3). مقایسه میانگین داده‌های مربوط به آنزیم کاتالاز (جدول 5) نشان می‌دهد که در آبیاری مطلوب بین تیمارها تفاوت معنی‌داری از لحاظ مقدار آنزیم وجود ندارد اما با افزایش قطع آبیاری فعالیت آنزیم افزایش یافت و تلقیح با دو جدایه قارچ *R. irregularis* در همه تیمارها بر فعالیت آنزیم کاتالاز اثر مثبت داشت. در بین تیمارها تیمار محدودیت شدید آبی به همراه بیوچار و ورمی‌کمپوست با جدایه b حداکثر مقدار کاتالاز داشت که نسبت به تیمار آبیاری مطلوب و عدم کاربرد کود آلی و قارچ میکوریز که حداقل مقدار کاتالاز را دارا بود 253 و 241 درصد افزایش داشت. در آنزیم‌های پراکسیداز و سوپراکسید دسموتاز قطع آبیاری بر فعالیت این آنزیم‌ها افزود. بیشترین مقدار پراکسیداز در تیمار محدودیت شدید آبی با جدایه b و a به‌همراه بیوچار مشاهده شد که نسبت به تیمار آبیاری مطلوب و عدم کاربرد کود آلی و قارچ میکوریز که کمترین مقدار این صفت را داشت به‌ترتیب 82 و 81 درصد افزایش نشان داد. در صفت سوپراکسید دسموتاز بیشترین مقدار این آنزیم در تیمار محدودیت شدید آبی به‌همراه بیوچار در هر دو جدایه به‌دست آمد که نسبت به شاهد به‌ترتیب 95 و 94 درصد افزایش داشت.

مطالعات نشان می‌دهند گیاهان مقاوم به تنش محیطی می‌توانند از طریق سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی با تنش‌های محیطی مقابله کنند، به‌طوری‌که افزایش میزان آنتی‌اکسیدان‌ها مقاومت گیاه به تنش‌های محیطی را افزایش می‌دهد (رضایی‌نیا و همکاران، 1398). نتایج واکنش گیاه کتان (*Linum Usitatissimum* L.) به کاربرد کود سبز، ورمی‌کمپوست و قارچ *R. irregularis* در تنش خشکی نشان داد محدودیت آب باعث افزایش فعالیت کاتالاز، پراکسیداز و سوپراکسید دسموتاز شد، کاربرد قارچ به‌همراه مصرف یا عدم مصرف ورمی‌کمپوست موجب افزایش فعالیت هر سه آنزیم در شرایط تنش خشکی داشت (فلاح و همکاران، 2020).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول 4- مقایسه میانگین برهمکنش رژیم آبیاری، بستر کاشت و قارچ *R. irregularis* بر کلنیزاسیون ریشه و محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی در زعفران

آبیاری	کود آلی	قارچ میکوریز آربوسکولار	کلنیزاسیون ریشه (%)	کلروفیل a ($mgg^{-1}FW$)	کلروفیل b ($mgg^{-1}FW$)	کلروفیل کل ($mgg^{-1}FW$)	کاروتنوئید ($mgg^{-1}FW$)
		عدم مصرف	48/7^{i}	0/922^{g}	0/301^{jkl}	1/22^{fg}	0/698^{f}
	عدم مصرف	جدایه a	85/5^{d}	0/935^{f}	0/352^{hij}	1/28^{ef}	0/831^{d}
		جدایه b	86/3^{d}	0/958^{e}	0/401^{fgh}	1/35^{cde}	0/834^{d}
		عدم مصرف	58/6^{g}	0/997^{c}	0/482^{bcd}	1/47^{bcd}	0/966^{ab}
I_1	ورمی‌کمپوست	جدایه a	93/1^{c}	1/02^{ab}	0/512^{ab}	1/53^{ab}	0/984^{a}
		جدایه b	97/5^{a}	1/03^{a}	0/551^{a}	1/58^{a}	0/991^{a}
		عدم مصرف	65/2^{f}	0/960^{e}	0/452^{cdef}	1/41^{cd}	0/852^{d}
	بیوچار	جدایه a	98/3^{a}	0/994^{d}	0/478^{bcde}	1/47^{bcd}	0/882^{cd}
		جدایه b	98/7^{a}	1/01^{b}	0/506^{abc}	1/51^{bc}	0/929^{bc}
		عدم مصرف	47/4^{j}	0/713^{m}	0/295^{jkl}	1/01^{klm}	0/225^{l}
	عدم مصرف	جدایه a	82/9^{e}	0/716^{m}	0/324^{ijk}	1/04^{ijk}	0/389^{jk}
		جدایه b	85/3^{d}	0/733^{l}	0/336^{ijk}	1/06^{hij}	0/447^{i}
		عدم مصرف	55/4^{h}	0/764^{j}	0/414^{fg}	1/18^{gh}	0/702^{f}
I_2	ورمی‌کمپوست	جدایه a	94/4^{bc}	0/800^{h}	0/424^{efg}	1/22^{fg}	0/719^{f}
		جدایه b	96/1^{ab}	0/807^{h}	0/439^{def}	1/25^{efg}	0/775^{e}
		عدم مصرف	59/8^{g}	0/752^{k}	0/349^{hij}	1/11^{hi}	0/535^{h}
	بیوچار	جدایه a	96/7^{ab}	0/769^{j}	0/376^{ghi}	1/14^{ghi}	0/638^{g}
		جدایه b	97/3^{a}	0/787^{i}	0/379^{ghi}	1/18^{gh}	0/690^{fg}
		عدم مصرف	-	0/475^{t}	0/165^{o}	0/640^{p}	0/105^{m}
	عدم مصرف	جدایه a	-	0/496^{s}	0/220^{mn}	0/716^{o}	0/132^{m}
		جدایه b	-	0/504^{rs}	0/229^{mn}	0/733^{o}	0/233^{l}
		عدم مصرف	-	0/517^{qr}	0/294^{jkl}	0/811^{jklm}	0/441^{ij}
I_3	ورمی‌کمپوست	جدایه a	-	0/535^{o}	0/297^{jkl}	0/832^{jkl}	0/562^{h}
		جدایه b		0/559^{n}	0/303^{jkl}	0/862^{jk}	0/676^{fg}
		عدم مصرف	-	0/508^{qrs}	0/258^{lmn}	0/766no	0/275^{l}
	بیوچار	جدایه a	-	0/517^{pq}	0/264^{lmn}	0/781^{mn}	0/376^{k}
		جدایه b	-	0/529^{op}	0/278^{klm}	0/807^{lm}	0/438^{ij}

I_1: آبیاری مطلوب، I_2: محدودیت ملایم آبی و I_3: محدودیت شدید آبی. در هر ستون میانگین‌های دارای حروف مشترک برمبنای آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند (LSD 5%).

اثر مثبت کاربرد بیوچار در شرایط تنش رطوبتی در گیاه ذرت بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان توسط ستار و همکاران (2019) گزارشد شده است. هی و همکاران (2017) نشان دادند فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان ریشه و برگ گیاهچه‌های اقاقیا (*Robinia pseudoacacia* L.) تلقیح شده با قارچ *R. irregularis* بالاتر از گیاهچه‌های تلقیح نشده در هر دو شرایط رطوبتی بود. همچنین عالم و همکاران (2019) به اثر مثبت قارچ میکوریز در کاهش تنش اکسیداتیو و اثرات نامطلوب آن در گیاه ماش (*Vigna radiata*) اشاره کرده‌اند.

پروتئین محلول

با توجه به جدول تجزیه واریانس (جدول 3) برهمکنش رژیم آبیاری، کود آلی و قارچ *R. irregularis* بر محتوای پروتئین محلول معنی‌دار شد ($p\leq0.01$). با افزایش سطوح قطع آبیاری مقدار پروتئین محلول افزایش یافت و این افزایش در گیاهان تلقیح شده با دو جدایه *R. irregularis* در تمام تیمارهای آلی بیشتر از شاهد بود، بر این اساس تیمار محدودیت شدید آب به همراه بیوچار

www.SID.ir

Archive of SID

با جدایه b حداکثر مقدار پروتئین محلول با میانگین 3/46 میلی‌گرم در گرم وزن تر داشت این در حالی بود که تیمار آبیاری مطلوب و عدم مصرف کود آلی و قارچ میکوریز حداقل مقدار پروتئین محلول با میانگین 2/9 میلی‌گرم در گرم وزن تر را دارا بود (جدول 5). محققان افزایش پروتئین محلول با کاربرد قارچ میکوریز به‌همراه ورمی-کمپوست در گیاه خارمریم (*Silybum marianum*) گزارش کرده‌اند (نیکاه نائینی و همکاران، 2017). همچنین بنابر گزارش بلترانو و رونکو (2008) در گندم (*Triticum aestivum*) محتوای پروتئین برگ در گیاهان میکوریزی و غیرمیکریزی در شرایط آبیاری نرمال تفاوت معنی‌داری باهم نداشت اما در شرایط تنش شدید آبی غلظت پروتئین محلول در گیاهان میکوریزی به‌طور معنی‌داری بیشتر از گیاهان غیرمیکوریزی بود. تنش آبی سبب هیدرولیز پروتئین‌های تیلاکوئیدی شده و تجزیه پروتئین‌های کلروپلاستی منبع با ارزشی برای اشکال قابل تحرک نیتروژن به محض ورود به شرایط تنش می‌باشد (قربانعلی و نیاکان، 1384). همچنین محققان گزارش کرده‌اند مدیریت تغذیه گیاه در شرایط تنش یکی از مسائل مهم در تولید محصولات گیاهی محسوب می‌شود (احمدیان و همکاران، 1390).

جدول 5- مقایسه میانگین برهمکنش رژیم آبیاری، بستر کاشت و قارچ *R. irregularis* بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، پروتئین محلول و پرولین در برگ زعفران

آبیاری	کود آلی	قارچ میکوریز آربوسکولار	کاتالاز (Umg^{-1} pro min^{-1})	گایاکول پراکسیداز (Umg^{-1} pro min^{-1})	سوپراکسید دسموتاز ($Ug^{-1}FW$)	پروتئین ($mgg^{-1}FW$)	پرولین ($\mu molg^{-1}FW$)
		عدم مصرف	0/94^{g}	11/56^{l}	5/31^{p}	2/89^{s}	0/451^{t}
	عدم مصرف	جدایه a	1/22^{g}	11/76^{l}	5/37^{p}	2/91^{r}	0/55^{s}
		جدایه b	1/23^{g}	11/93^{l}	5/49^{op}	2/92^{r}	0/571^{r}
		عدم مصرف	1/25^{g}	12/67^{k}	5/61no	2/94^{q}	0/593^{q}
I_1	ورمی‌کمپوست	جدایه a	1/26^{g}	13/01^{jk}	5/7^{mno}	3/01^{p}	0/621^{p}
		جدایه b	1/32^{g}	13/17^{jk}	5/81^{lmn}	3/04^{n}	0/625^{p}
		عدم مصرف	1/25^{g}	13/37^{ij}	5/9^{klm}	3/05^{n}	0/612^{p}
	بیوچار	جدایه a	1/29^{g}	13/95^{hi}	5/99^{kl}	3/06^{n}	0/667^{n}
		جدایه b	1/39^{g}	14/31^{h}	6/08^{k}	3/08^{m}	0/681^{n}
		عدم مصرف	1/94^{f}	16/51^{g}	7/92^{j}	3/04^{n}	0/559^{rs}
	عدم مصرف	جدایه a	1/98^{f}	16/77^{fg}	8/17^{i}	3/14^{l}	0/645^{o}
		جدایه b	2/00^{f}	17/32^{ef}	8/32^{hi}	3/15^{kl}	0/665^{n}
		عدم مصرف	2/11^{f}	16/8^{fg}	8/56^{h}	3/15^{kl}	0/712^{m}
I_2	ورمی‌کمپوست	جدایه a	2/12^{f}	18/4^{bcd}	8/98^{fg}	3/16^{kl}	0/736^{l}
		جدایه b	2/42^{e}	18/53^{bc}	9/17^{ef}	3/17^{jk}	0/752^{k}
		عدم مصرف	2/06^{f}	17/8de	8/84^{g}	3/15^{kl}	0/735^{l}
	بیوچار	جدایه a	2/45^{e}	18/52^{bc}	9/35de	3/18^{ij}	0/767^{k}
		جدایه b	2/54^{e}	18/53^{bc}	9/53^{cd}	3/19^{h}	0/784^{j}
		عدم مصرف	2/49^{e}	18/3^{cd}	8/91^{g}	3/31^{g}	0/903^{i}
	عدم مصرف	جدایه a	2/73^{d}	18/56^{bc}	9/25^{e}	3/36^{f}	0/929^{h}
		جدایه b	2/81^{cd}	18/66^{bc}	9/27^{e}	3/37^{ef}	0/961^{g}
		عدم مصرف	2/80^{cd}	18/7^{bc}	9/36de	3/38de	1/011^{f}
I_3	ورمی‌کمپوست	جدایه a	2/96^{bc}	18/84^{bc}	9/63^{c}	3/39^{d}	1/092^{d}
		جدایه b	3/21^{a}	19/09^{b}	9/87^{b}	3/41^{c}	1/122^{c}
		عدم مصرف	2/83^{cd}	18/73^{bc}	9/39de	3/44^{b}	1/072^{e}
	بیوچار	جدایه a	3/05^{b}	19/7^{a}	10/31^{a}	3/45^{ab}	1/157^{b}
		جدایه b	3/32^{a}	19/75^{a}	10/33^{a}	3/46^{a}	1/194^{a}

I_1: آبیاری مطلوب، I_2: محدودیت ملایم آبی و I_3: محدودیت شدید آبی. در هر ستون میانگین‌های دارای حروف مشترک برمبنای آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند (LSD 5%).

www.SID.ir

Archive of SID

پرولین

نتایج تجزیه داده‌های به دست آمده در این بررسی نشان داد اثر برهمکنش رژیم آبیاری، کود آلی و قارچ *Rhizophagus irregularis* بر محتوای پرولین معنی‌دار شد ($p\leq0.01$) (جدول 3). محتوای پرولین در گیاهان تلقیح شده هم در شرایط رطوبتی مطلوب و هم قطع آبیاری در تیمارهای بیوچار و ورمی‌کمپوست بیشتر از شاهد بود. بر این اساس تیمارهای محدودیت شدید آبی به‌همراه بیوچار با جدایه b و آبیاری مطلوب و عدم مصرف کود آلی و قارچ میکوریز به‌ترتیب حداکثر و حداقل مقدار پرولین با میانگین 1/194 و 0/451 میکرومول بر گرم وزن تر را داشتند (جدول 5). تجمع پرولین رابطه مثبت و مستقیم با افزایش مقاومت به خشکی در تنش‌های خشکی و شوری ایجاد شده در گیاهان دارد (کشاورزفرد و همکاران، 1399). فلاح و همکاران (2020) با کاربرد ورمی‌کمپوست و قارچ *R. Irregularis* در تنش خشکی در کتان گزارش کردند که بیشترین مقدار پرولین در تیمار مصرف توأم ورمی‌کمپوست و قارچ در شرایط تنش خشکی حاصل شد. بنابر گزارش کشاورزفرد و همکاران (1399) کاربرد بیوچار در شرایط تنش روی گیاه آهار (*Zinnia elegans*) تأثیر معنی‌داری بر مقدار پرولین نداشت در حالی که گزارش کامان و همکاران (2011) نشان داد کاربرد بیوچار در شرایط تنش بر روی گیاه کینوآ (*Chenopodium quinoa*) موجب کاهش مقدار پرولین شد. محققان سطوح بالایی از پرولین را در ریشه گیاه سویا (پورسل و ریز-لوزانو، 2005) و گیاهچه‌های رز (*Rosa hybrid* L.) (پینیور و همکاران، 2005) تلقیح شده با قارچ میکوریز آربوسکولار در مقایسه با گیاهان بدون تلقیح هم در شرایط رطوبتی مطلوب و هم تحت شرایط تنش خشکی گزارش کردند.

نتیجه‌گیری

به‌طور کلی نتیجه این بررسی نشان داد تلقیح هر دو جدایه موجب افزایش درصد کلنیزاسیون ریشه در تمام تیمارهای کود آلی شد. همچنین پاسخ تلقیح هر دو جدایه در تمام تیمارها به افزایش شدت تنش خشکی مثبت بود و موجب افزایش تولید کلروفیل، کاروتنوئید، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، پروتئین و پرولین در گیاهان تلقیح شده نسبت به شاهد شدند. علاوه بر این در بیشتر صفات اندازه‌گیری شده جدایه b به‌طور قابل توجهی بالاتر از جدایه a قرار داشت. همچنین در این پژوهش مشاهده شد که کاربرد قارچ *R. Irregularis* همراه با کودهای بیوچار و ورمی‌کمپوست در شرایط مختلف رطوبتی سبب افزایش چشمگیر عملکرد گل و کلاله و محتوای عناصر غذایی در زعفران شد. در این میان اثر جدایه b به‌همراه بیوچار در شرایط نرمال بر عملکرد گل و جذب عناصر غذایی به‌طور قابل‌توجهی بالاتر از دیگر تیمارها قرار داشت (حبیبی و همکاران، 1400). با توجه به نتایج این تحقیق به‌نظر می‌رسد استفاده از کودهای آلی به‌همراه جدایه b در شرایط کمبود رطوبت خاک می‌تواند نقش به‌سزایی در تولید پایدار این گیاه داشته باشد. بنابراین کاربرد آنها در شرایط مزرعه‌ای نیز پیشنهاد می‌گردد تا پس از مشاهده واکنش گیاه، به این نتیجه رسید که امکان توصیه این تیمارها در شرایط مزرعه‌ای وجود دارد یا خیر.

فهرست منابع:

1. احمدیان، ا. قنبری، ا. و سیاه‌سر، ب. 1390. اثر تنش خشکی و مصرف انواع کود آلی و معدنی و بقایای آنها بر عملکرد و اجزای عملکرد بابونه آلمانی (*Matricaria chamomilla* L.). نشریه بوم شناسی کشاورزی. جلد 3، شماره 3، ص395 -383.

www.SID.ir

Archive of SID

2. اصلانی، ز. حسنی، ع. رسولی صدقیانی، م.ح. سفیدکن، ف. و برین، م. 1390. تأثیر دو گونه قارچ آربوسکولار مایکوریزا بر رشد، مقادیر کلروفیل و جذب فسفر در گیاه ریحان (*Ocimum basilicum* L.) تحت شرایط تنش خشکی. فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران. جلد 27، شماره3، ص 486 -471.

3. امینی فرد، م.ح. افتاده فدافن، ع. مرادی نژاد، ف. و بهدانی، م .ع. 1398. بررسی تأثیر ورمی‌کمپوست و نیتروکسین بر ویژگی‌های بنه‌های دختری و عملکرد گل زعفران (*Crocus sativus* L.). نشریه زراعت و فناوری زعفران. جلد 7، شماره 2، ص 154 -139.

4. اسمی، ر. رضوانی مقدم، پ. کوچکی، ع.ر .و احمدیان، ا. 1397. اثر وزن بنه مادری و میزان کود گاوی بر عملکرد گل و بنه زعفران. نشریه زراعت و فناوری زعفران. جلد 6، شماره 4، ص 460 -445.

5. ثابت تیموری، م. کافی، م. اورسجی، ز. و اروجی، ک. 1389. اثر تنش خشکی، اندازه و پوشش بنه بر خصوصیات مورفو اکوفیزیولوژیکی زعفران (*Crocus sativus* L.) در شرایط گلخانه. بوم‌شناسی کشاورزی. جلد 2، شماره 2، ص 334-323.

6. حبیبی، م. زعفریان، ف. رجالی، ف. و باقری، ن. 1400. جداسازی و شناسایی قارچ‌های میکوریز آربوسکولار همزیست زعفران و بررسی اثر آنها بر عملکرد گل و جذب عناصر غذایی در شرایط قطع آبیاری و بسترهای مختلف کشت. مجله به‌زراعی. جلد 23، شماره 3، ص 391 -379.

7. دباغیان، ز. پیردشتی، ه. عباسیان، ا. و بهاری، ح. 1394. تأثیر کودهای زیستی تیوباسیلوس، ازتوباکتر، آزوسپیریلوم و گوگرد آلی بر گره زایی و عملکرد سویا (*Glycine Max* L.). نشریه زراعت. جلد 107، ص 25 -17.

8. رسام، ق.ع. دادخواه، ع.ر. و خوشنود یزدی، ا. 1393. ارزیابی تأثیر کمبود آب بر صفات مورفولوژیک و فیزیولوژیک گیاه دارویی زوفا. نشریه دانش زراعت. جلد 5، شماره 10، ص 12 -1.

9. رضایی‌نیا، م. بی‌همتا، م.ر. پیغمبری، س.ع. و عباسی، ع. ر. 1398. تاثیر تنش خشکی بر فعالیت برخی از آنزیم‌های آنتی-اکسیدانی و صفات فیزیولوژیکی در ژنوتیپ‌های نخود (*Cicer Arietinum* L.). پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی. جلد 11، شماره 30، ص 22 -11.

10. رضوانی‌مقدم، پ. کوچکی، ع.ر. ملافیلابی، ع. و سیدی س.م. 1393. اثر کودهای زیستی و شیمیایی بر عملکرد گل و بنه‌های دختری زعفران (*Crocus sativus* L.). مجله علوم زراعی ایران. جلد 15، شماره 3، ص 246 -234.

11. رمضانی، ا. آرویی، ح. عزیزی، م. و احمدیان، ا. 1399. ارزیابی تأثیر مدیریت آبیاری با کاربرد کود آلی و پلیمرهای ابر جاذب ریز ترکیب بر عملکرد اقتصادی و تولید مواد مؤثره در گیاه دارویی زعفران (*Crocus sativus* L.). نشریه زراعت و فناوری زعفران، جلد 8، شماره 1، ص 18 -3.

12. ضیایی، م. خزاعی، ح.ر. و نظامی، ا. 1396. بررسی اثر سطوح مختلف آبیاری بر صفات مورفوفیزیولوژیک و بیوشیمیایی در پنج ژنوتیپ ماش (*Vigna radiata* L.). فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی گیاهان زراعی.جلد 9، شماره 34، ص21-5.

13. فتحی، ح. ایمانی، ع. امیری، م.ع. حاجیلو، ج. و نیکبخت، ج. 1398. پاسخ‌های رشدی و بیوشیمیایی برخی ژنوتیپ‌های بادام روی پایه GN_{15} به‌تنش کم‌آبیاری. فرآیند و کارکرد گیاهی. جلد 8، شماره 29، ص 30- 15.

14. فیاضی، ح. ابدالی مشهدی، ع. کوچک‌زاده، ا. پاپ‌زن، ع. و ارزانش، م.ح. 1397. اثر کودهای آلی و زیستی بر محتوای نیتروژن، فسفر و پتاسیم، رنگیزه‌های فتوسنتزی و میزان ماده مؤثره گیاه دارویی سرخارگل (*Echinacea Purpurea* L.). نشریه پژوهش‌های زراعی ایران. جلد 16، شماره 2، ص 298 -283.

www.SID.ir

Archive of SID

15. قربانعلی، م. و نیاکان، م. 1384. بررسی اثر تنش خشکی بر روی میزان قندهای محلول، پروتیین، پرولین، ترکیبات فنلی و فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز گیاه سویا رقم گرگان 3. نشریه علوم دانشگاه تربیت معلم. جلد 5، شماره 1، ص 550-537.
16. کشاورزفرد، س. سلگی، م. باقری، ح. شهرجردی، ا. 1399. کاربرد بیوچار و اسید هیومیک برای افزایش مقاومت به تنش خشکی در گل آهار. مجله زیست‌شناسی کاربردی. جلد 33، شماره 1، ص 174-148.
17. یامچی، ا. رستگار جزی، ف. قبادی، س. موسوی، ا. و کارخانه‌ای، ع.ا. 1383. بیان فراوان ژن Δ-پرولین -5- کربوکسیلاز سنتتاز (P5CS)، با هدف افزایش مقاومت به تنش‌های اسموتیک در گیاه تراریخت توتون (*Nicotiana tabacum* cv.Xanthi). علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی. جلد 8، شماره 4، ص 39 -31.
18. Aebi, H. 1984. Catalase in vitro. Method of Enzymology 105: 121-126.
19. Akhter, A., Ahmed, K., Soja, G. and Steinkellner, S. 2015. Compost and biochar alter mycorrhization, tomato root exudation, and development of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*. Frontiers in Plant Science 6(529): 1-13.
20. Alam, M.Z., McGee, R., Hoque, A., Ahammed, G.J. and Carpenter-Boggs, L. 2019. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi, selenium and biochar on photosynthetic pigments and antioxidant enzyme activity under arsenic stress in mung bean (*Vigna radiata*). Frontiers in Physiology 10(193): 1-13.
21. Arnon, D.I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphennoloxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiol 24: 1-150.
22. Aslam, M., Magbool, M. A. and Cengiz. R. 2015. Drought stress in maize (*Zea mays* L.) effects, resistance mechanisms, global achievements and biological strategies for improvement. Springer Briefs in Agriculture.
23. Badr, M.A., El-Tohamy, W.A., Abou-Hussein S.D. and Gruda, N.S. 2020. Deficit irrigation and arbuscular mycorrhiza as a water-saving strategy for eggplant production. Horticulturae 6(45): 1-17.
24. Bargmann, I., Martens, R., Rillig, M.C., Kruse. A. and Kücke, M. 2014. Hydrochar amendment promotes microbial immobilization of mineral nitrogen. Journal of Plant Nutrition and Soil Science 177: 59-67.
25. Bates, L.S., Waldren, R.P. and Teare, I.D. 1973. Rapid determination of free prolin for water stress studies. Plant and Soil 39: 205-207.
26. Beauchamp, C. and Fridovich, I. 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. Analytical Biochemistry 44: 276-287.
27. Beltrano, J. and Ronco, M.G. 2008. Improved tolerance of wheat plants (*Triticum aestivum* L.) to drought stress and rewatering by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus claroideum*: Effect on growth and cell membrane stability. Brazilian Journal of Plant Physiology 20(1): 29-37.
28. Berek, A.K., Hue, N. and Ahmad, A. 2011. Beneficial use of biochar to correct soil acidity. The Food Provider 1-3.
29. Bradford. M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitative titration of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.
30. Caser, M., Victorino, I.M.M., Demasi, S., Berruti, A., Donno, D., Lumini, E., Bianciotto, V. and Scariot, V. 2019. Saffron cultivation in marginal alpine environments: How AMF inoculation modulates yield and bioactive compounds. Agronomy 1-14.
31. Chen, W., Meng, 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(1117): 1-29.
32. Dalpé, Y. 1993. Vesicular-arbuscular mycorrhiza. p. 287- 301. In: Soil sampling and methods of analysis. (ed.) Carter, MR. Lewis Publishers, Boca Raton.

www.SID.ir

Archive of SID

33. Du, Y., Zhao, Q., Chen, L., Yao, X. and Xie, F. 2020. Effect of drought stress at reproductive stages on growth and nitrogen metabolism in soybean. Agronomy 10(302): 1-22.
34. Fallah, m., Amini, R., Hadi, H. and Hassanzadeh-Gholttapeh, A. 2020. The Role of eco-friendly soil amendments co-application on the performance of lingrain (*Linum Usitatissimum* L.) under late-season irrigation limitation. Research Square 1-23.
35. Gerdemann, J.W. and Nicolson, T.H. 1963. Spores of mycorrhizal *Endogene* species extracted from soil by wet- siving and decanting. Transaction in British Mycological Society 46: 235-244.
36. Ghorbanpour, M., Mohammadi, H. and Kariman, K. 2020. Nanosilicon-based recovery of barley (Hordeum vulgare) plants subjected to drought stress. Environmental Science Nano 7:443- 461.
37. Hashem, A., Kumar, A., Al-Dbass, A.M., Algarawi, A.A., Al-Arjani, A.F., Sing, G., Farooq, M. and Abd-Allah, E.F. 2019. Arbuscular mycorrhizal fungi and biochar improves drought tolerance in chickpea. Saudi Journal of Biological Sciences 26: 614-624.
38. He, F., Sheng, M. and Tang, M. 2017. Effects of rhizophagus irregularis on photosynthesis and antioxidative enzymatic system in *Robinia pseudoacacia* L. under drought stress. Frontiers in Plant Science 8(183): 1-14.
39. Kammann, C.I., Linsel, S., Gößling, G.W. and Koyro, H.W. 2011. Influence of biochar on drought tolerance of *Chenopodium quinoa* Willd and on soil–plant relations. Plant and Soil 345: 195-210.
40. Krüger, M., Stockinger, H., Krüger, C. and Schüßler, A. 2009. DNA-based species level detection of Glomeromycota: one PCR primer set for all arbuscular mycorrhizal fungi. New Phytologist 183: 212-223.
41. Kumari, N., Gheek Batra, N. and Sharma, V. 2018. Photosynthetic performance and drought-induced changes in activity of antioxidative enzymes in different varieties of *vigna radiate*. Agriculchral Research 1-9.
42. Liu, C., Liu, F., Ravnskov, S., Rubæk, G.H., Sun, Z. and Andersen, M.N. 2017. Impact of wood biochar and its interactions with mycorrhizal fungi, phosphorus fertilization and irrigation strategies on potato growth. Journal of Agronomy and Crop Science 203: 131-145.
43. Maleki, M., Ebrahimzade H., Gholami M. and Niknam, V. 2011. The effect of drought stress and exogenous abscisic acid on growth, protein content and antioxidative enzyme activity in saffron (*Crocus sativus* L.). African Journal of Biotechnology 10(45): 9068-9075.
44. Mickan, A.S., Abbott, L.K., Stefanova, K. and Solaiman, Z.M. 2016. Interactions between biochar and mycorrhizal fungi in a water-stressed agricultural soil. Mycorrhiza 26: 565-574.
45. Nikkah Naeeni, F., Moghadam, A.R., Moradi, P., Rezaei, M. and Abdoosi, V. 2017. Effect of vermicompost and mycorrhiza fungi on yield and growth of milk thistle and antioxidant system activity. Iranian Journal of Plant Physiology 7 (3): 2063-2074.
46. Norris, I.R., Read, D.J. and Varma, A.K. 1992. Methods in Microbiology. Techniques for Study of Mycorrhiza. Academic Press, London 450 p.
47. Pinior, A., Grunewaldt-Stöcker, G., Alten, H.V. and Strasser, R.J. 2005. Mycorrhizal impact on drought stress tolerance of rose plants probed by chlorophyll a fluorescence, proline content and visual scoring. Mycorrhiza 15: 596-605.
48. Porcel, R. and Ruiz-Lozano, J.M. 2005. Arbuscular mycorrhizal influence on leaf water potential, solute accumulation, and oxidative stress in soybean plants subjected to drought stress. Journal of Experimental Botany 55(403): 1743-1750.

www.SID.ir

Archive of SID

49. Pretty, J. 2007. Agricultural sustainability: concepts, principles and evidence. Philosophical Transactions of the Royal Society 365: 447-465.
50. Renker, C., Heinrichs, J., Kaldorf, M. and Buscot, F. 2003. Combining nested PCR and restriction digest of the internal transcribed spacer region to characterize arbuscular mycorrhizal fungi on roots from the field. Mycorrhiza 13: 191-198.
51. Seyyedi, S.M., Ebrahimian, E. and Rezaei-Chiyaneh, E. 2018. Saffron daughter corms formation, nitrogen and phosphorous uptake in response to low planting density, sampling rounds, vermicompost and mineral fertilizers. Communications in Soil Science and Plant Analysis 49(5): 585-603.
52. Srinivasan, M., Kumar, K., Kumutha, K. and Marimuthu, P. 2014. Establishing monoxenic culture of arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* through root organ culture. Journal of Applied and Natural Science 6(1): 290-293.
53. Symanczik, S., Blaszkowski, J., Koegel, S., Boller, T., Wiemken, A., AL-Yahayaei, M.N. 2014. Isolation and identification of desert habituated arbuscular mycorrhizal fungi newly reported from the Arabian Peninsula. Journal of Arid Land 6(4): 488-497.
54. Tang, W. and Newton, R.J. 2005. Peroxidase and catalase activities are involved in direct adventitious shoot formation induced by thidiazuron in eastern white pine (*Pinus strobus* L.) zygotic embryos. Journal of Plant Biochemistry and Physiology 43: 730-769.
55. Sattar, A., Sher, A., Ijaz, M., Irfan, M., Butt, M., Abbas, T., Hussain, S., Abbas, A., Ullah, M.S. and Cheema, M.A. 2019. Biochar application improves the drought tolerance in maize seedlings. Phyton, International Journal of Experimental Botany 88(4): 379-388.
56. Sheng, M., Tang, M., Chen, H., Yang, B., Zhang, F. and Huang, Y. 2008. Influence of arbuscular mycorrhizae on photosynthesis and water status of maize plants under salt stress. Mycorrhiza 18: 287-296.
57. Zhang, C., Shi, S., Liu, Z., Yang, F. and Yin, G. 2018. Drought tolerance in alfalfa (*Medicago sativa* L.) varieties is associated with enhanced antioxidative protection and declined lipid peroxidation. Journal of Plant Physiology 232: 226-240.

www.SID.ir

Archive of SID

Evaluation of root colonization and biochemical compounds of saffron under irrigation regime, arbuscular mycorrhizal fungi and organic fertilizer

M. Habibi, F. Rejali[1], F. Zafarian and N. Bagheri

PhD student, Department of Agronomy, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University; E-mail: Maryam.habibi462@gmail.com

Assistant professor, Soil and Water Research Institute Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO) Karaj, Iran; E-mail: frejali@yahoo.com

Assistant professor of Agronomy, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University; E-mail: fa_zaefarian@yahoo.com

Assistant professor of Plant Breeding, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University; E-mail: bagherinadali@yahoo.com

Received: August, 2021 & Accepted: January, 2022

Abstract

In order to evaluate the potential of native species of saffron arbuscular mycorrhizal fungus under the conditions of irrigation cut stress on its physiological traits, a study was conducted as split plot factorial based on a randomized completely design with three replications in the institute of Soil and Water research in Karaj, during the years 2017-2019. Treatment consisted: Irrigation regime as the main factor in three levels (such as optimal irrigation as control, water interruption at the beginning of the growing season (mild restriction water) and water interruption at the beginning and mid of the growing season (severe restriction water)), organic fertilizer in three levels (no organic fertilizer, vermicompost (20 ton ha^{-1}) and biochar (10 ton ha^{-1}) and Arbuscular mycorrhizal fungal in three levels (no application, isolate a and isolate b) as the subfactor. . Based on the molecular findings, both isolate isolated from saffron rhizosphere belonged to *Rhizophagus irregularis*. The results of this study showed that the interaction of irrigation regime, organic fertilizer and *R. irregularis* had a significant effect on all measured parameters. The highest percentage of root colonization (98.7%) was for optimal irrigation treatment with biochar and isolate b. The highest content of chlorophyll a, b and carotenoids (with an average of 5.74, 4.36 and 1.52 µg / ml, respectively) was observed in the optimal irrigation treatment with vermicompost and isolate b. Also, the treatment of severe water restriction with biochar and isolate b increased 253, 82, 95 and 165% of CAT, POD and SOD enzyme activities and proline, respectively, in comparison with the optimal irrigation treatment and no application of organic fertilizer and mycorrhiza fungal, which had the lowest amount of these traits. According to the results obtained from this study, it is argued that the use of biochar and vermicompost fertilizers with isolate b can reduce the destructive effects of soil moisture stress.

Keywords: Irrigation, Antioxidant enzymes, Biochar, Proline, Identification Arbuscular mycorrhizal fungi, Root colonization

[1]. Corresponding author: Soil and Water Research Institute Agricultural Research Education and Extension Organization Karaj, Iran.

www.SID.ir