

تأثیر باکتری محرک رشد و اسید سالیسیلیک بر برخی شاخص‌های بیوشیمیایی ژنوتیپ‌های لوبیای معمولی (*Phaseolus vulgaris* L.) تحت تنش خشکی

نرگس اسدیان^۱ | علی احمدی^{۲*} | منیژه سبکدست نودهی^۳

۱. گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده‌گان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: n.asadian@alumni.ut.ac.ir

۲. نویسنده مسئول، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده‌گان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: ahmadia@ut.ac.ir*

۳. گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده‌گان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: Sabokdast@ut.ac.ir

چکیده

تنش خشکی یکی از مهم‌ترین تنش‌های غیرزیستی محسوب می‌شود که تولید محصولات زراعی و حبوبات را در سراسر جهان تهدید می‌کند. هدف پژوهش حاضر، بررسی برخی صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در لوبیای معمولی تحت شرایط تنش خشکی بود. برای این منظور، آزمایشی در مزرعه تحقیقاتی گروه زراعت دانشکده‌گان کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران واقع در کرج، طی سال زراعی ۱۴۰۱، به صورت آزمایش اسپلیت فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی با سه تکرار اجرا شد. تیمارهای این طرح شامل سه سطح آبیاری (آبیاری نرمال و آبیاری بر اساس ۳۰ و ۶۰ درصد ظرفیت زراعی)، دو سطح هورمون سالیسیلیک اسید (۰ و ۰/۵ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید)، دو سطح باکتری (عدم استفاده و استفاده از باکتری ریزوبیوم تثبیت‌کننده نیتروژن *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli سویه R160) و دو ژنوتیپ لوبیا (صدری و یاس) بود. نتایج نشان داد که افزایش شدت تنش خشکی موجب کاهش محتوای پروتئین و افزایش میزان پرولین، مالون دی‌آلدئید، نشت الکترولیت، کاتالاز، پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز و گلوکاتایون پراکسیداز شد. همچنین، کاربرد سالیسیلیک اسید و باکتری ریزوبیوم نسبت به شاهد (عدم استفاده از هورمون و باکتری)، باعث بهبود محتوای پروتئین و فعالیت‌های آنزیمی شد و در عین حال میزان مالون دی‌آلدئید و نشت الکترولیت را کاهش داد. رقم حساس و متحمل نیز در صفات نشت الکترولیت، محتوای پروتئین و مالون دی‌آلدئید تفاوت معنی‌دار از خود نشان دادند. به طور کلی، این نتایج ایده استفاده توأم از سالیسیلیک اسید و باکتری ریزوبیوم را به عنوان روشی مؤثر برای افزایش تحمل به خشکی در ارقام حساس و متحمل لوبیای معمولی تقویت می‌کند.

کلیدواژه‌ها: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، تیمارهای زیستی، تنش خشکی، لوبیا، سالیسیلیک اسید

The Effect of Growth-Promoting Bacteria and Salicylic Acid on Some Biochemical Indices of Common Bean Genotypes under Drought Stress

Abstract

Drought stress is one of the most important abiotic stresses that threatens the production of crops. The objective of the present study was to evaluate certain physiological and biochemical traits in common bean under drought stress conditions. For this purpose, a field experiment was conducted at the Research Farm of the Department of Agronomy, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, during the 2022 growing season. The experiment was carried out as a split-factorial arrangement in a randomized complete block design with three replications. Treatments included three irrigation levels (normal irrigation and irrigation at 30% and 60% of field capacity), two levels of salicylic acid (0 and 0.5 mM), two bacterial treatments (without and with inoculation of nitrogen-fixing *Rhizobium*

leguminosarum biovar phaseoli strain R160), and two bean genotypes (Sadri and Yas). The results showed that increasing drought stress intensity led to a reduction in protein content and an increase in proline, malondialdehyde, electrolyte leakage, catalase, peroxidase, ascorbate peroxidase, and glutathione peroxidase activities. Moreover, the application of salicylic acid and Rhizobium inoculation, compared with the control (no hormone or bacteria), enhanced protein content and enzymatic activities while decreasing MDA levels and electrolyte leakage. Significant differences were also observed between the sensitive and tolerant genotypes in terms of electrolyte leakage, protein content, and MDA. These findings support the idea that the combined application of salicylic acid and Rhizobium inoculation can serve as an effective strategy to improve drought tolerance in both sensitive and tolerant common bean genotypes.

Keywords: Antioxidant enzymes, Biotic treatments, Drought stress, Common bean, Salicylic acid

مقدمه

ایران با میانگین بارندگی سالانه ۲۴۰ میلیمتر، در زمره کشورهای با اقلیم خشک طبقه‌بندی می‌شود. این شرایط موجب شده است که بیش از ۴۰ درصد از اراضی کشاورزی کشور با چالش کمبود آب مواجه باشند (Morante-Carballo *et al.*, 2022). تنش‌های محیطی به عنوان مهم‌ترین موانع دستیابی به پتانسیل ژنتیکی گیاهان زراعی شناخته می‌شوند. مطالعات نشان می‌دهد که در شرایط مطلوب، عملکرد واقعی بسیاری از محصولات زراعی کمتر از ۱۰-۲۰ درصد پتانسیل ژنتیکی آنهاست (Lipiec *et al.*, 2013). در میان تنش‌های غیرزیستی، خشکی به عنوان یکی از مخرب‌ترین عوامل محدودکننده تولیدات کشاورزی، به ویژه در مناطق خشک و نیمه‌خشک جهان مطرح است (Bharti *et al.*, 2024). به‌طور جهانی، بیش از ۵۰ درصد از میانگین عملکرد محصولات عمده به دلیل تنش خشکی کاهش می‌یابد (Cohen *et al.*, 2021). تنش خشکی از طریق مکانیسم‌های متعددی موجب کاهش عملکرد گیاهان می‌گردد که از جمله می‌توان به اختلال در فرآیندهای فیزیولوژیک (کاهش نرخ فتوسنتز تا ۵۰ درصد)، بیوشیمیایی (تولید گونه‌های فعال اکسیژن) و مولکولی اشاره کرد (Wahab *et al.*, 2022). لوبیای معمولی (*Phaseolus vulgaris* L.) به عنوان یکی از مهم‌ترین منابع پروتئین گیاهی در جهان، به ویژه در کشورهای در حال توسعه، حساسیت بالایی به تنش خشکی نشان می‌دهد. گزارش‌ها حاکی از آن است که تنش خشکی می‌تواند تا ۸۷ درصد از عملکرد این محصول را در مراحل حساس رشد کاهش دهد (Martínez *et al.*, 2007). امروزه مقابله با تنش خشکسالی به یک چالش جهانی تبدیل شده است. کشور ایران با وجود وسعت خاک و تنوع گیاهی، از دیرباز با کمبود آب برای کشاورزی روبرو بوده است. تنش خشکی مانند سایر تنش‌های محیطی، تغییرات فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی در گیاهان ایجاد می‌کند (Wahab *et al.*, 2022). بسیاری از فرآیندهای گیاهی به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم به وجود آب وابسته هستند و کمبود آب باعث کاهش جوانه‌زنی، رشد اندام‌های هوایی، کاهش تولید ماده خشک و تأخیر در رشد می‌شود (Bhattacharya & Bhattacharya, 2021). تنش آبی عاملی مهم در کاهش تولید محصولات زراعی محسوب می‌شود و این اثرات با سایر تنش‌های غیرزیستی و همچنین تغییرات اقلیمی تشدید می‌گردد (Kopecká *et al.*, 2023). شرایط خشکی می‌تواند عملکرد لوبیای معمولی را به شدت کاهش دهد، به‌طوری که کاهش عملکرد تا ۴۹٪ در دوره گلدهی و ۵۸-۸۷٪ در مراحل تولیدمثل گزارش شده است (Martínez *et al.*, 2007). تنش خشکی با ایجاد تغییرات فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی در گیاهان، فرآیندهایی چون

فتوستنتر، تعادل آبی، فعالیت آنزیمی و ساختار غشایی را تحت تاثیر قرار می‌دهد. در بسیاری از گیاهان، کمبود آب منجر به بسته شدن روزنه‌ها، کاهش رشد ریشه و اندام‌های هوایی، تجمع اسمولیت‌هایی مانند پرولین، و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان می‌شود (Wahab *et al.*, 2022). تحت تنش، گیاهان یک مکانیسم دفاعی و هموستاز سلولی را با تجمع اسمولیت‌ها (مانند پرولین، گلیسین بتائین) و پروتئین‌ها ایجاد می‌کنند و در نتیجه تحمل گیاهان را در برابر تنش افزایش می‌دهند (Nahar *et al.*, 2016). با این حال، تحمل گیاه به تنش‌های غیرزیستی یک صفت پیچیده است که شامل طیف وسیعی از مکانیسم‌های مولکولی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی است (Singh *et al.*, 2022). پاسخ گیاهان به تنش‌ها به گونه‌ها و ژنوتیپ‌ها، طول و شدت کمبود آب و سن و مرحله رشد بستگی دارد (Oguz *et al.*, 2022). بررسی‌های دیگر نیز نشان داده‌اند که واکنش گیاه لوبیا به تنش خشکی به ژنوتیپ وابسته است. در مطالعات انجام‌شده روی چند ژنوتیپ لوبیا قرمز، اعمال سطوح مختلف تنش خشکی در مرحله پیش از گلدهی موجب تغییرات قابل‌توجهی در رنگدانه‌های فتوسنتزی، محتوای کربوهیدرات کل، نشت الکترولیت، محتوای نسبی آب (RWC)، میزان پرولین، اسید آسزیک و پروتئین‌های محلول گردیده است. همچنین، افزایش پراکسیداسیون لیپید (MDA) و تغییر در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نظیر کاتالاز، گاباکول پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز بسته به ژنوتیپ تفاوت‌هایی نشان داده است (Mombeni & Abbasi, 2019).

چندین راهکار برای مقابله با تنش خشکی یا افزایش تحمل گیاه وجود دارد، سالیسیلیک اسید به عنوان یک هورمون گیاهی، نقش کلیدی در القای مقاومت به تنش‌های محیطی از طریق تنظیم بیان ژن‌های مرتبط با تحمل به خشکی، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و حفظ پتانسیل اسمزی ایفا می‌کند (Naeem *et al.*, 2020). مطالعات نشان داده‌اند که کاربرد این ترکیب می‌تواند تا ۳۰ درصد از خسارات ناشی از تنش خشکی را کاهش دهد (Salem *et al.*, 2021). پژوهش‌ها نشان می‌دهند که استفاده توأم از این باکتری‌ها با ترکیباتی مانند سالیسیلیک اسید می‌تواند اثرات سینرژیستی در بهبود تحمل به خشکی ایجاد کند (Mehrasa *et al.*, 2022). سالیسیلیک اسید به عنوان یک فیتوهورمون شبه‌فنولی، نقش مهمی در مقاومت گیاه به تنش‌های غیرزیستی نظیر خشکی، شوری و سرما دارد (Alamer & Fayez, 2020; Khan *et al.*, 2014). سالیسیلیک اسید ضمن تنظیم انتقال یون، افزایش فتوستنتر، بهبود نفوذپذیری غشا، القای بیان ژن و افزایش جذب عناصر معدنی، به تقویت سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی گیاه کمک می‌کند (Naeem *et al.*, 2020). مطالعات مختلف نشان داده‌اند که محلول‌پاشی سالیسیلیک اسید می‌تواند آسیب اکسیداتیو را کاهش داده و رشد گیاه را در شرایط کم‌آبی بهبود بخشد (Salem *et al.*, 2021). همچنین سپهری و همکاران در مطالعات خود دریافتند که انواع ژنوتیپ لوبیا تاثیرات گوناگونی نسبت به اعمال سالیسیلیک اسید از خود نشان می‌دهند و برخی ارقام با اسپری برگی این هورمون به عملکرد بالاتری نسبت به سایر ارقام دست پیدا می‌کنند.

علاوه بر سالیسیلیک اسید، باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه نیز از طریق تثبیت نیتروژن، افزایش دسترسی به عناصر غذایی، تولید هورمون‌های رشد و کاهش تنش اکسیداتیو، باعث بهبود تحمل گیاهان به خشکی می‌شوند (Gontia-Mishra *et al.*, 2016; Khan *et al.*, 2019). باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه مانند گونه‌های *Bacillus*، *Pseudomonas* و *Azotobacter* می‌توانند با ترشح اگزوپلی‌ساکاریدها و تولید آنتی‌بیوتیک‌های طبیعی، مقاومت گیاهان را در برابر شرایط سخت افزایش دهند (Ojuederie *et al.*, 2019). در یک پژوهش، Feizian و همکاران (۲۰۱۷) گزارش دادند که استفاده از باکتری ریزوبیوم سویه ۱۶۰، گیاه لوبیا قادر به تحمل تنش خشکی متوسط بدون افت عملکرد است. خاوری و شاکرمی (۲۰۱۹) گزارش کردند که ژنوتیپ‌های مختلف لوبیا قرمز واکنش‌های متفاوتی به تلقیح باکتری ازتوباکتر و قارچ میکوریزا نشان دادند. هر رقم به میزان متفاوتی در افزایش عملکرد دانه و محتوای پروتئین دانه پاسخ داد، به طوری که بیشترین اثر ترکیبی بر عملکرد دانه در رقم گلی مشاهده شد و سایر ارقام نیز به ترتیب مقادیر متفاوتی افزایش عملکرد و پروتئین را تجربه کردند. این یافته‌ها نشان‌دهنده وجود تفاوت ژنوتیپ × تیمار ($G \times T$) در پاسخ به

کودهای زیستی و اهمیت انتخاب ژنوتیپ مناسب برای بهره‌وری بهینه در شرایط مزرعه است.

کاربرد همزمان باکتری‌های محرک رشد گیاه (PGPR) و هورمون‌پاشی با سالیسیلیک اسید می‌تواند نقش بسزایی در افزایش مقاومت گیاهان تحت تنش خشکی ایفا کند. نتایج پژوهش‌ها نشان داده است که این ترکیب علاوه بر کاهش نشت الکترولیت از غشاهای سلولی، موجب پایداری بیشتر ساختار غشا و کاهش آسیب‌های اکسیداتیو می‌شود. همچنین، استفاده همزمان از این عوامل محرک، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نظیر کاتالاز، پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز را بهبود بخشیده و از تجمع رادیکال‌های آزاد جلوگیری می‌کند. در نتیجه، گیاه قادر خواهد بود تعادل متابولیکی خود را بهتر حفظ کرده و فرآیندهای فیزیولوژیک حیاتی مانند فتوسنتز و جذب عناصر غذایی را در شرایط تنش حفظ نماید. این اثرات مثبت در نهایت منجر به افزایش کارایی مصرف آب و بهبود رشد و عملکرد گیاه در شرایط کم‌آبی می‌شود (زمانی و همکاران، ۲۰۲۴).

با توجه به اهمیت لوبیای معمولی (*Phaseolus vulgaris* L.) به‌عنوان منبع پروتئین و انرژی در رژیم‌های غذایی و به‌ویژه در کشورهای در حال توسعه (Castro-Guerrero et al., 2016) و نیز با توجه به کاهش منابع آبی و آسیب‌های ناشی از تنش خشکی، استفاده از راهکارهای زیستی پایدار جهت افزایش بهره‌وری و تحمل این گیاه امری ضروری به نظر می‌رسد. بنابراین هدف این پژوهش، بررسی اثرات محلول‌پاشی سالیسیلیک اسید و استفاده از باکتری‌های محرک رشد در بهبود شاخص‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی دو ژنوتیپ لوبیای معمولی تحت شرایط مختلف آبیاری بود. با وجود مطالعاتی در زمینه نقش تنش خشکی و کاربرد باکتری‌های محرک رشد (PGPR) در بهبود سازگاری گیاهان، هنوز بررسی همزمان ژنوتیپ‌های متحمل و حساس لوبیا در پاسخ به تنش خشکی و تیمارهای PGPR کمتر مورد توجه قرار گرفته است. این موضوع بیانگر جنبه‌ی نوآوری و ارزش افزوده پژوهش حاضر است.

روش‌شناسی پژوهش

محل و طرح آزمایش

پژوهش حاضر به صورت آزمایش مزرعه‌ای در سال زراعی ۱۴۰۱-۱۴۰۰ در مزرعه تحقیقاتی دانشکدگان کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران واقع در کرج (با مختصات جغرافیایی ۵۰ درجه و ۵۴ دقیقه طول شرقی و ۳۵ درجه و ۵۵ دقیقه عرض شمالی و ارتفاع ۱۳۱۲ متر از سطح دریا)، با بافت خاک لومی‌رسی اجرا گردید. خصوصیات شیمیایی خاک مزرعه محل آزمایش در جدول شماره ۱ ذکر شده است. آزمایش به صورت اسپلیت فاکتوریل در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با سه تکرار انجام شد. تیمارهای آزمایشی شامل موارد زیر بودند:

جدول ۱- خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک مزرعه محل آزمایش

Soil physical and chemical properties of experimental field

Texture	Available K (mg.Kg ⁻¹)	Available P (mg.Kg ⁻¹)	Total N (%)	Organic Carbon (%)	EC (dS.m ⁻¹)	pH
Loamy Clay	147	8.17	0.066	0.59	1.01	7.6

سه سطح آبیاری: آبیاری نرمال (ظرفیت مزرعه کامل)، آبیاری در ۶۰٪ ظرفیت زراعی، و آبیاری در ۳۰٪ ظرفیت زراعی؛ ظرفیت زراعی خاک به روش وزنی و با استناد به مقاله (Ramezan & Abbaszadeh, 2016) تعیین گردید. بدین منظور، پس از اشباع کامل کرت‌ها و گذشت ۴۸ ساعت، از عمق ۰ تا ۳۰ سانتی‌متری خاک نمونه‌برداری شد. نمونه‌ها بلافاصله توزین و سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد در آون خشک شدند. با مقایسه وزن تر و خشک، درصد رطوبت خاک در حد ظرفیت زراعی محاسبه گردید. برای اعمال تیمارهای آبیاری، از روش وزنی و معادله زیر استفاده شد:

$$V = \rho \times Z \times A \times (FC - PWP) / 100$$

که در آن:

V: حجم آب مورد نیاز (لیتر)

ρ : وزن مخصوص ظاهری خاک (g/cm^3)

Z: عمق توسعه ریشه (cm)

A: مساحت واحد آزمایشی (m^2)

FC: رطوبت خاک در ظرفیت زراعی (%)

PWP: رطوبت خاک در نقطه پژمردگی دائم (%)

میزان آب مورد نیاز هر کرت بر اساس این رابطه محاسبه و با استفاده از کنتور حجمی به کرت‌ها اعمال شد.

دو سطح سالیسیلیک‌اسید: عدم مصرف و مصرف محلول ۰/۵ میلی مولار سالیسیلیک‌اسید؛

دو سطح باکتری: بدون باکتری و استفاده از باکتری ریزوبیوم تثبیت‌کننده نیتروژن *Rhizobium leguminosarum biovar*

phaseoli R160

دو ژنوتیپ لوبیا: در این مطالعه از ژنوتیپ‌های لوبیای معمولی صدری و یاس استفاده شد، که بر اساس یافته Soltani (۲۰۲۲)

ژنوتیپ صدری مقاوم به خشکی و ژنوتیپ یاس حساس به خشکی است. بذرهاى ژنوتیپ‌های صدری و یاس از بانک ژن دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج تهیه شد.

کاشت و نگهداری

بعد از انجام خاکورزی مرسوم منطقه و تعیین محل کاشت، کرت‌هایی با طول ۳ متر و عرض ۲٫۵ متر تهیه و آماده شد. به این صورت که در هر کرت ۵ ردیف ۳ متری وجود داشت. فاصله هر ردیف نیم متر در نظر گرفته شد. فاصله هر کرت با کرت دیگر نیز نیم متر بود. فاصله بوته در یک ردیف ده سانتی متر بود. برای جلوگیری از اختلاط تیمارهای تنش بین کرت‌های آبیاری دو متر فاصله در نظر گرفته شد. از هیچ نوع کودی هنگام کاشت، داشت و برداشت استفاده نگردید.

بذرها قبل از کاشت با باکتری ریزوبیوم تلقیح شدند (بذر مال). محلول پاشی سالیسیلیک‌اسید ۱۵ روز و ۳۰ پس ظهور گیاهچه انجام شد، به این ترتیب که در هر لیتر آب، ۰/۱۳ گرم سالیسیلیک‌اسید حل شده و به هر گیاه ۱۰۰ میلی‌لیتر از محلول در هر بار اسپری شد. وچین نیز در مرحله استقرار گیاه و تقریباً ۲۵ روز بعد از کاشت انجام خواهد شد. اعمال تنش خشکی یک ماه پس از کاشت آغاز گردید.

نمونه‌برداری و نگهداری نمونه

دو هفته پس از اعمال تنش، نمونه‌برداری برگ از برگ سوم هر گیاه (برگ سوم از بالا انتخاب شد زیرا نه خیلی جوان و در حال رشد است و نه خیلی پیر و در حال تخلیه مواد. این برگ از نظر فیزیولوژیکی پایدارتر است و استفاده از آن امکان مقایسه بهتر بین تیمارها را فراهم می‌کند) انجام شد. از هر تیمار، ۲۰ برگ انتخاب و در پاکت‌های آلومینیومی قرار داده شدند. سپس نمونه‌ها در تانک نیتروژن مایع سریعاً منجمد و تا زمان آزمایش در دمای منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

اندازه‌گیری نشت الکترولیت برگ

از برگ‌های جوان کاملاً توسعه‌یافته نمونه‌های ۳۰ تایی به شکل دیسک دایره‌ای با اندازه یکسان تهیه شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر قرار داده شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت، با استفاده از EC متر (Ino lab ساخت کشور ژاپن)، هدایت الکتریکی هر نمونه اندازه‌گیری شد (EC1). به‌منظور اندازه‌گیری میزان کل نشت الکترولیت‌های برگ در اثر مرگ سلول‌ها، لوله‌های آزمایش به مدت ۴۵ دقیقه در حمام آب جوش با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. بعد

از سرد شدن لوله‌ها در دمای آزمایشگاه، پس از ۲۴ ساعت مجدداً هدایت الکتریکی نمونه‌ها اندازه‌گیری شد (EC2). در نهایت درصد نشست الکترولیت نمونه‌ها با استفاده از رابطه زیر تعیین گردید (McKay, 1992).

رابطه ۱

$$EL (\%) = (EC_1/EC_2) \times 100$$

اندازه‌گیری پروتئین برگ

برای تعیین غلظت کل پروتئین، ۰/۱ گرم از برگ‌های خرد شده و پودر شده با بافر استخراج آنزیمی که شامل پلی‌وینیل‌پیرولیدون، اسید اتیلن‌دی‌آمین‌تتراستیک، و تربیتون X-100 در بافر فسفات سدیم ۵۰ میلی‌مولاری (pH ۶/۷) بود، مخلوط شد. سپس مخلوط برای ۳۰ ثانیه در دستگاه ورتکس قرار گرفت. پس از آن، با سرعت ۱۵۰۰۰ g به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. فاز مایع حاصل به داخل لوله‌های پلاستیکی منتقل و در یخچال با دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد برای تجزیه و تحلیل‌های بعدی پروتئین و فعالیت آنزیمی نگهداری شد. سرم آلبومین گاوی به عنوان استاندارد برای ایجاد منحنی کالیبراسیون جهت کمی‌سازی سطوح پروتئین به کار رفت. محتوای پروتئین به صورت میلی‌گرم به ازای هر گرم وزن تازه برگ (mg g⁻¹ FW) با اندازه‌گیری جذب نور واکنش‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر تعیین شد (Bradford, 1976).

اندازه‌گیری محتوای پرولین برگ

به این منظور، حدود ۵/۰ گرم بافت تازه برگ در ۱۰ میلی‌لیتر اسید سولفوسالسیلیک ۳ درصد (وزنی/حجمی) همگن‌سازی شد و عصاره حاصل به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. از سوپرناتانت شفاف، ۲ میلی‌لیتر برداشته و با ۲ میلی‌لیتر معرف نین‌هیدرین اسیدی و ۲ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال مخلوط شد. مخلوط واکنش به مدت یک ساعت در حمام آب جوشان (۱۰۰ درجه سانتی‌گراد) قرار گرفت و سپس بلافاصله در حمام یخ سرد شد. در ادامه، ۴ میلی‌لیتر تولوئن به آن افزوده شد و فاز رنگی قرمز-بنفش حاصل جدا گردید. جذب نوری این فاز در طول موج ۵۲۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. غلظت پرولین با استفاده از منحنی استاندارد تهیه‌شده با پرولین خالص محاسبه و بر حسب میکرومول در گرم وزن تر ($\mu\text{mol g}^{-1}$ FW) بیان شد (Bates *et al.*, 1973).

اندازه‌گیری مالون‌دی‌آلدئید

برای تعیین غلظت مالون‌دی‌آلدئید به روش Heath and packer (۱۹۶۸)، ابتدا ۰/۵ گرم برگ تازه در محلول ۲۰ درصد تری کلرو استیک اسید (TCA) حاوی ۰/۵ درصد تیو باربیتوریک اسید (TBA) به صورت کامل پودر شد. مخلوط به مدت ۲۵ دقیقه در حمام بن‌ماری با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد. سپس مخلوط سریعاً سرد شده و با سانتریفیوژ، رسوب جدا شد. غلظت مالون‌دی‌آلدئید از جذب محلول در طول موج ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری و محاسبه شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

کاتالاز (CAT)

برای سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز، میزان تجزیه هیدروژن پراکسید (H_2O_2) در طول موج ۲۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم بر حسب کاهش جذب نوری در واحد زمان محاسبه گردید. مخلوط واکنش شامل بافر فسفات (۵۰ میلی‌مولار، pH حدود ۷)، محلول H_2O_2 (۳۰ میلی‌مولار) و عصاره آنزیمی بود. (Pereira *et al.*, 2002).

پراکسیداز (POD)

در ابتدا ۰/۵ گرم از برگ‌های خرد شده به طور کامل با نیتروژن مایع و ۰/۱ درصد اسید تری‌کلرواستیک (TCA) مخلوط شدند و

سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۶۰۰۰ گرم سانتیفریوژ شدند. قبل از حل کردن یدید پتاسیم ۱ مولار در مخلوط، حجمی برابر از فاز مایع نمونه‌های سانتیفریوژ شده با یک بافر فسفات ۱۰ میلی‌مولار، ترکیب شد. در نهایت، جذب محلول حاصل در ۳۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (Velikova et al., 2000).

آسکوربات پراکسیداز (APX)

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز بر اساس واکنش آن با اسید آسکوربیک و H_2O_2 ، که منجر به تشکیل دهیدروآسکوربات می‌شود، در طول موج ۲۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. محیط واکنش شامل ۱۵۰۰ میکرولیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار (pH=7)، ۶۰۰ میکرولیتر EDTA (۰٫۱ میلی‌مولار)، ۴۰۰ میکرولیتر آسکوربیک اسید (۰٫۵ میلی‌مولار)، ۴۰۰ میکرولیتر H_2O_2 (۳۰٪) و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. تغییرات جذب محلول طی ۷ دقیقه و در فواصل زمانی ۲۰ ثانیه ثبت گردید. (Nakano et al., 1981).

گلوتاتیون ردوکتاز (GR)

سنجش فعالیت گلوتاتیون ردوکتاز برپایه کاهش جذب در طول موج ۳۴۰ نانومتر بر اساس اکسایش NADPH به NADP سنجیده شد (Foyer & Halliwell, 1976).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

داده‌های به‌دست آمده از اندازه‌گیری کلیه صفات بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS ۹٫۴ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel استفاده شد. مقایسه میانگین‌ها برای اثرات اصلی تیمارها با آزمون LSD و برای برهم‌کنش‌ها با استفاده از رویه L.S.means و در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

نتایج و بحث

در این مطالعه، دو ژنوتیپ مختلف لوبیا از نظر میزان پروتئین، محتوای پرولین، مالون‌دی‌آلدئید، فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز، گلوتاتیون ردوکتاز و نشت الکترولیت تحت شرایط کاربرد هورمون و باکتری ریزوبیوم مورد ارزیابی قرار گرفت. اثر تیمارهای تنش خشکی بر این پارامترها در این ژنوتیپ‌های معنی‌دار بود. داده‌ها نشان می‌دهد که صفات بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی ژنوتیپ‌های لوبیا بسته به سطح کم‌آبی به‌طور قابل‌توجهی تحت تأثیر قرار گرفته است (جدول‌های ۱ و ۲). تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر چهارگانه تیمارها (آبیاری × باکتری × هورمون × ژنوتیپ) بر محتوای پروتئین برگ، غلظت مالون‌دی‌آلدئید و نشت الکترولیت معنی‌دار شد. همچنین اثر سه‌گانه آبیاری × هورمون × باکتری و آبیاری × هورمون × ژنوتیپ بر محتوای پرولین لوبیا معنی‌دار بود. علاوه بر این، اثر سه‌گانه آبیاری × هورمون × باکتری بر فعالیت آنزیم کاتالاز و اثر سه‌گانه آبیاری × هورمون × باکتری بر فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز نیز معنی‌دار گزارش شد (جدول‌های ۱ و ۲).

مطابق شکل ۱، در هر سه سطح آبیاری، کاربرد همزمان هورمون سالیسیلیک‌اسید (h_2) و باکتری ریزوبیوم (b_2) در مقایسه با عدم استفاده از آنها (h_1) و (b_1)، باعث افزایش معنی‌دار محتوای پروتئین برگ شد. همچنین ژنوتیپ صدری نسبت به ژنوتیپ یاس محتوای پروتئین بالاتری نشان داد.

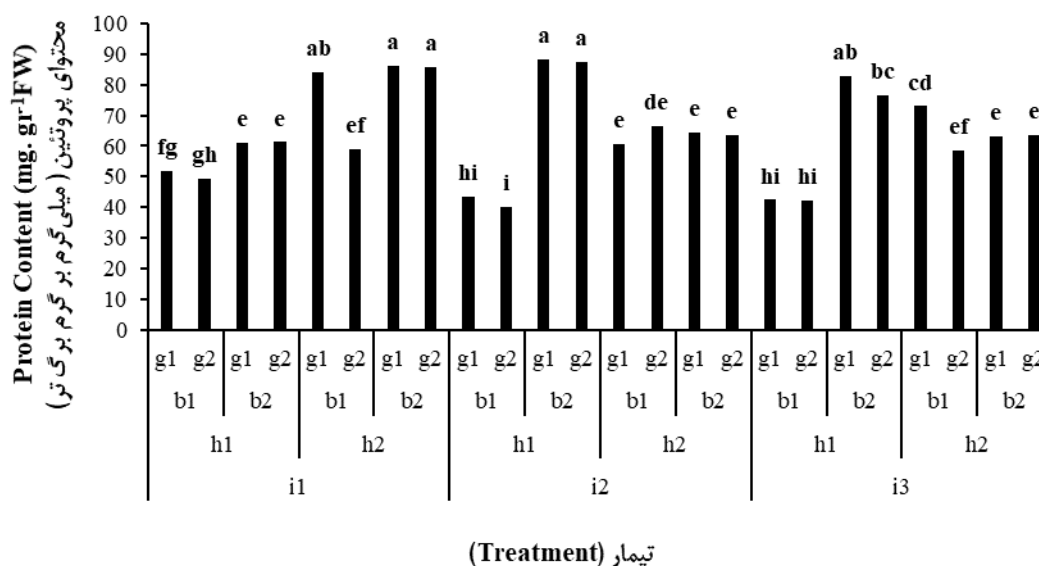
جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس مربوط به صفات مختلف اندازه‌گیری شده ژنوتیپ‌های لوبیای معمولی در اثر استفاده از تیمارهای هورمونی و باکتری در شرایط تنش آبی

Mean Squares						
Sources of Variation	df	Peroxidase activity	Catalase activity	Malondialdehyde content	Proline content	Protein content
Replication	2	0.828 n.s	0.076 n.s	0.017 n.s	4.724 n.s	35.892 n.s
Irrigation	2	2723.309 ***	2224.348 ***	981.896 ***	6067.664 ***	131.458 n.s
Error (Main plot)	4	2.271	0.937	0.099	3.223	29.152
Hormone	1	549.862***	61.069***	284.638***	1779.747***	1272.372***
Bacterium	1	802.202***	38.257***	126.378***	38.848***	5644.466***
Genotype	1	0.595 n.s	2.359 n.s	13.622***	39.490***	285.642**
Irrigation * Hormone	2	161.172***	245.054***	97.557***	1086.331***	963.039***
Irrigation * Bacterium	2	307.819***	61.972***	49.200***	58.018***	172.641**
Irrigation * Genotype	2	0.977 n.s	7.458***	1.827***	9.530*	78.050 n.s
Hormone * Bacterium	1	342.266***	32.943***	4.159***	21.592**	3244.744***
Hormone * Genotype	1	5.640 n.s	0.903 n.s	1.557***	0.220 n.s	60.129 n.s
Bacterium * Genotype	1	0.006 n.s	0.734 n.s	3.071***	0.039 n.s	126.014*
Irrigation * Hormone * Bacterium	2	193.622***	0.166 n.s	8.312***	74.006***	1093.499***
Irrigation * Hormone * Genotype	2	2.356 n.s	3.018*	0.147 n.s	9.909*	97.951*
Irrigation * Bacterium * Genotype	2	0.413 n.s	0.325 n.s	0.926***	2.342 n.s	93.026*
Hormone * Bacterium * Genotype	1	1.637 n.s	0.0006 n.s	1.908***	4.453 n.s	138.016*
Irrigation * Hormone * Bacterium *	2	3.097 n.s	0.075 n.s	1.891***	3.892 n.s	117.342*
Second error (Sub-plot)	42	2.96	0.842	0.068	2.776	25.137
Coefficient of Variation	-	10.97	3.03	2.24	4.59	7.70

جدول ۳- نتایج تجزیه واریانس مربوط به صفات مختلف اندازه‌گیری شده ژنوتیپ‌های لوییای معمولی در اثر استفاده از تیمارهای هورمونی و باکتری در شرایط تنش آبی

Mean Squares				
Sources of Variation	df	Ion Leakage	Glutathione reductase	Ascorbate Peroxidase Activity
Replication	2	1.676 n.s	1.685 n.s	8.753 n.s

Irrigation	2	1713.015***	784.209***	1556.414***
First error (Main plot)	4	1.156	1.016	2.247
Hormone	1	1543.701***	341.020***	611.360***
Bacterium	1	878.466***	116.656***	386.468***
Genotype	1	28.718***	29.120***	0.534 n.s
Irrigation * Hormone	2	404.662***	4.228 n.s	89.652***
Irrigation * Bacterium	2	290.543***	2.922 n.s	45.567***
Irrigation * Genotype	2	8.519**	0.690 n.s	0.844 n.s
Hormone * Bacterium	1	495.034***	0.004 n.s	221.329**
Hormone * Genotype	1	28.380***	0.059 n.s	0.856 n.s
Bacterium * Genotype	1	46.355***	1.162 n.s	8.735 n.s
Irrigation * Hormone * Bacterium	2	171.911***	6.020**	140.333**
Irrigation * Hormone * Genotype	2	8.683**	0.629 n.s	6.327 n.s
Irrigation * Bacterium * Genotype	2	8.620**	0.695 n.s	5.009 n.s
Hormone * Bacterium * Genotype	1	16.062**	0.492 n.s	1.675 n.s
Irrigation * Hormone * Bacterium * Genotype	2	10.701**	3.059 n.s	0.950 n.s
Second error (Sub-plot)	42	1.359	1.395	3.818
Coefficient of Variation		5.88	7.06	13.43



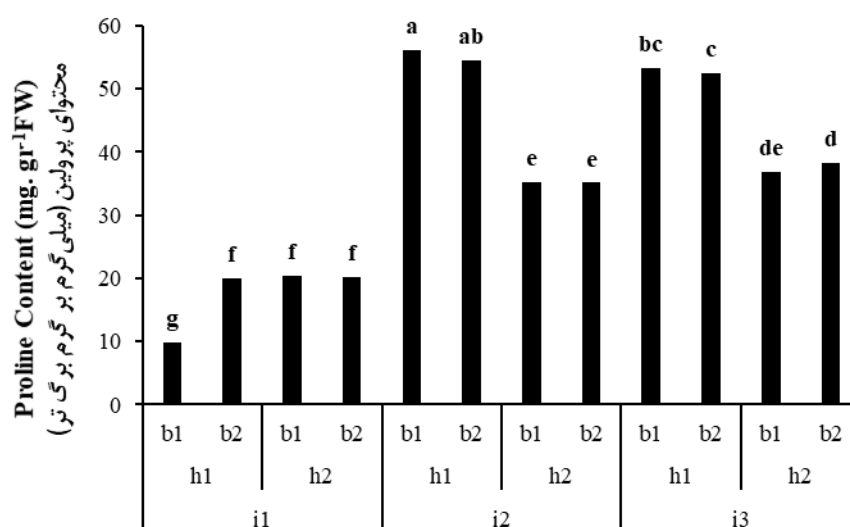
شکل ۱: مقایسه میانگین اثرات آبیاری، هورمون، باکتری و ژنوتیپ بر محتوی پروتئین در لوبیای معمولی. آبیاری در سه سطح

شاهد (i1) (۹۰ درصد ظرفیت زراعی)، ۶۰ (i2) و ۳۰ درصد ظرفیت زراعی (i3)، ژنوتیپ‌های لوبیای معمولی شامل یاس (g1) و صدری (g2)، باکتری در دو سطح (عدم تلقیح با باکتری (b1)، تلقیح با جدایه باکتریایی (b2)) و هورمون در دو غلظت صفر (h1) و ۰/۵ میلی مولار سالیسیلیک اسید (h2). حروف متفاوت بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال یک درصد تفاوت معنی‌دار دارند.

در آزمایش حاضر، نتایج جداول ۱ و ۲ نشان می‌دهد که میزان تجمع پرولین، محتوای پروتئین، نشت الکترولیت و محتوای مالون‌دی‌آلدئید در تمامی ژنوتیپ‌ها به‌طور معناداری تحت تأثیر تنش آبی قرار گرفته‌اند.

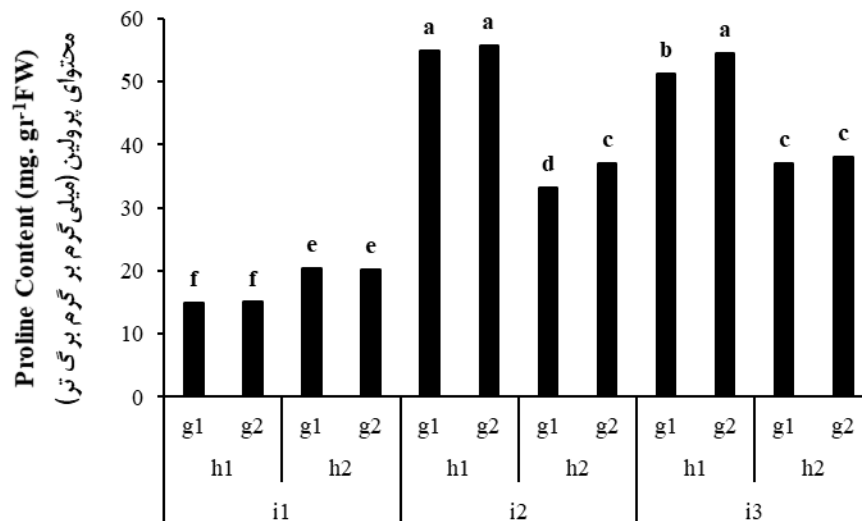
محتوای پرولین

انباشت پرولین در گیاهان تحت تنش خشکی در این مطالعه با افزایش شدت تنش خشکی افزایش یافت (جدول ۱؛ شکل‌های ۲ و ۳). با این حال، استفاده از هورمون و باکتری باعث کاهش میزان پرولین نسبت به شرایط بدون کاربرد آن‌ها شد (شکل ۲). مطابق شکل ۳، کاربرد هورمون در مقایسه با عدم کاربرد آن، موجب کاهش میزان پرولین گردید. همچنین در مقایسه ژنوتیپ‌ها، در سطح تنش خشکی ۳۰ درصد ظرفیت زراعی (با کاربرد هورمون) و ۶۰ درصد ظرفیت زراعی (بدون کاربرد هورمون)، ژنوتیپ صدری در مقایسه با ژنوتیپ صدری دارای انباشت پرولین بیشتری بود. در سایر تیمارها، تفاوت معناداری بین ژنوتیپ‌ها مشاهده نشد (شکل ۳). مطالعات متعددی تجمع پرولین را در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی مختلف گزارش کرده‌اند. تجمع پرولین می‌تواند تولید رادیکال‌های آزاد ناشی از تنش خشکی را محدود سازد. افزون بر این، پرولین با فراهم کردن منبع انرژی تنفسی برای گیاه، به مقاومت و بازیابی گیاه تحت تنش کمک می‌کند (Zulfiqar & Ashraf, 2023). بر اساس نتایج Soltani و همکاران (۲۰۲۳) دو رقم صدری و یاس تفاوت معنی‌داری در میزان پرولین در شرایط شاهد و تنش از خود نشان می‌دهند.



تیمار (Treatment)

شکل ۲: مقایسه میانگین اثرات آبیاری، هورمون، باکتری و ژنوتیپ بر محتوای پرولین در لوبیای معمولی. آبیاری در سه سطح شاهد (i1) (۹۰ درصد ظرفیت زراعی)، ۶۰ (i2) و ۳۰ درصد ظرفیت زراعی (i3)، باکتری در دو سطح (عدم تلقیح با باکتری (b1)، تلقیح با جدایه باکتریایی (b2)) و هورمون در دو غلظت صفر (h1) و ۰/۵ میلی مولار سالیسیلیک اسید (h2). حروف متفاوت بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال یک درصد تفاوت معنی‌دار دارند.



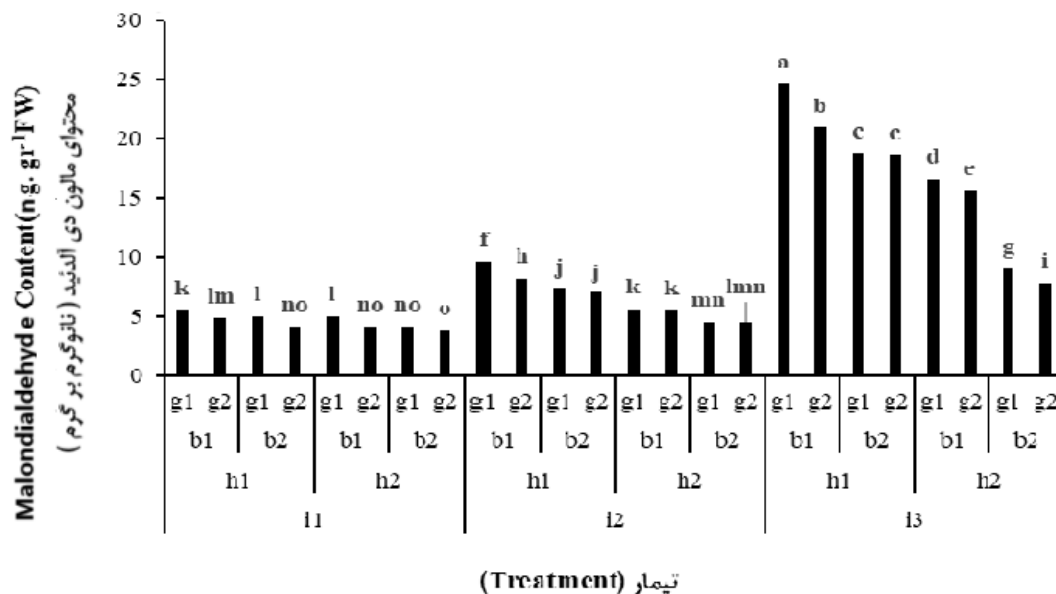
تیمار (Treatment)

شکل ۳: مقایسه میانگین اثرات آبیاری، هورمون، باکتری و ژنوتیپ بر محتوی پرولین در لوبیای معمولی. آبیاری در سه سطح شاهد (i1) (۹۰ درصد ظرفیت زراعی)، ۶۰ (i2) و ۳۰ درصد ظرفیت زراعی (i3)، ژنوتیپ‌های لوبیای معمولی شامل یاس (g1) و صدری (g2) و هورمون در دو غلظت صفر (h1) و ۰/۵ میلی مولار سالیسیلیک اسید (h2). حروف متفاوت بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال یک درصد تفاوت معنی‌دار دارند.

پرولین یکی از اسمولیت‌های رایج در گیاهان است که در پاسخ به انواع مختلف تنش‌های غیرزیستی، از جمله خشکی و شوری، در گونه‌های مختلف گیاهی تجمع می‌یابد (Sorkhi & Fateh., 2019). علاوه بر این، افزودن اسید سالیسیلیک در غلظت‌های مختلف باعث افزایش میزان پرولین شده و این امر موجب بهبود مقاومت گیاه به تنش خشکی می‌شود (یزدان پناه و همکاران، ۱۳۸۸). تلقیح گیاهان با *Rhizobium leguminosarum* به‌طور چشم‌گیری باعث افزایش میزان پرولین شد که این امر می‌تواند بیانگر نقش باکتری در القای تحمل به خشکی از طریق تنظیم اسمزی و بهبود سازوکارهای دفاعی گیاه باشد. همچنین این تلقیح موجب بهبود سایر صفات فیزیولوژیکی از جمله RWC، و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی گردید (AbdelMotlb et al., 2023).

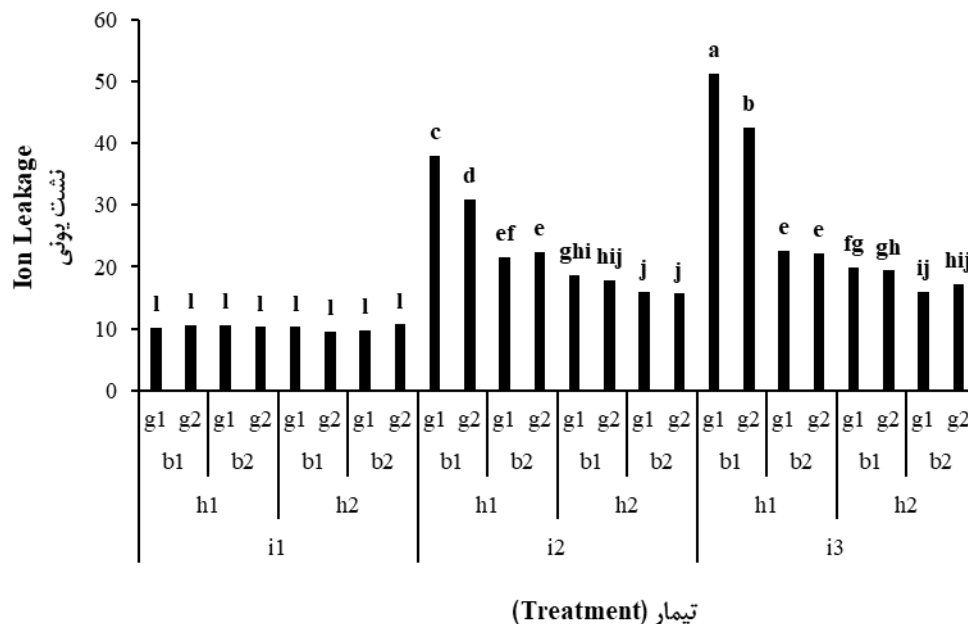
تأثیر خشکی بر محتوای مالون‌دی‌آلدئید و نشت الکترولیت

نتایج نشان داد که با افزایش شدت تنش خشکی، میزان مالون‌دی‌آلدئید افزایش یافت، به‌طوری‌که در سطح تنش ۳۰ درصد ظرفیت زراعی، بیشترین میزان مالون‌دی‌آلدئید مشاهده شد. همچنین، کاربرد باکتری در مقایسه با عدم کاربرد آن، در هر سه سطح تنش خشکی باعث کاهش محتوای مالون‌دی‌آلدئید گردید؛ این امر نشان می‌دهد که استفاده از باکتری موجب کاهش آسیب به غشاهای سلولی و کاهش نشت الکترولیت سلول‌ها می‌شود. شرایط خشکی همراه با تلقیح باکتری و تیمار با اسید سالیسیلیک (SA)، بر سطح مالون‌دی‌آلدئید تأثیر گذاشتند (شکل ۴)، که به‌عنوان شاخصی برای سنجش تنش اکسیداتیو و آسیب سلولی محسوب می‌شود. تیمارهای حاوی SA و باکتری‌های محرک رشد گیاه (PGPR) به‌طور قابل توجهی نشانگرهای استرس اکسیداتیو را کاهش داده، روابط آبی گیاه را بهبود بخشیدند و تحمل به خشکی را افزایش دادند (شکل ۴). کاهش میزان مالون‌دی‌آلدئید، بیشتر از این فرضیه حمایت می‌کند که این تیمارها آسیب غشایی ناشی از استرس اکسیداتیو را کاهش می‌دهند (Zamani et al., 2024).



شکل ۴: مقایسه میانگین اثرات آبیاری، هورمون، باکتری و ژنوتیپ بر محتوی مالون دی آلدئید در لوبیای معمولی. آبیاری در سه سطح شاهد (i1) (۹۰ درصد ظرفیت زراعی)، ۶۰ (i2) و ۳۰ درصد ظرفیت زراعی (i3)، ژنوتیپ‌های لوبیای معمولی شامل صدری (g2) و یاس (g1)، باکتری در دو سطح (عدم تلقیح با باکتری (b1)، تلقیح با جدایه باکتریایی (b2)) و هورمون در دو غلظت صفر (h1) و ۰/۵ میلی مولار سالیسیلیک اسید (h2). حروف متفاوت بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال یک درصد تفاوت معنی‌دار دارند.

توانایی تیمارهای SA و باکتری ریزوبیوم در حفظ سطح بالاتری از فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، در حالی که میزان مالون دی‌آلدئید را کاهش می‌دهند، اثربخشی این تیمارها را در محافظت از ساختارهای سلولی، به‌ویژه تحت شرایط تنش خشکی، نشان می‌دهد (شکل ۴). مالون دی‌آلدئید در تیمار تلقیح بذر و اسپری سالیسیلیک اسید با کاهش روبرو شدند که این موضوع گواهی بر کاهش تنش اکسیداتیو و اثر مثبت این دو تیمار در تخفیف اثر تنش خشکی بود همچنین تنش خشکی به تنهایی و بدون بکارگیری تیمارهای هورمونی و باکتریایی می‌تواند موجب افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در گیاه لوبیا شود (Zamani et al., 2024). این یافته با مطالعاتی مطابقت دارد که نشان می‌دهند تلقیح با PGPR و محلولپاشی هورمونی با جلوگیری از آسیب غشایی، موجب افزایش تحمل به خشکی در محصولات مانند *Phaseolus vulgaris* می‌شود.



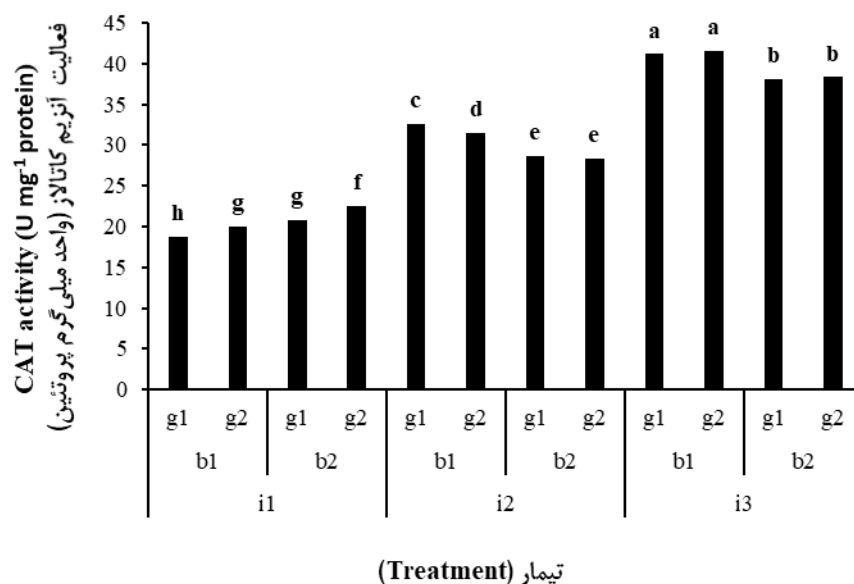
شکل ۵: مقایسه میانگین اثرات آبیاری، هورمون، باکتری و ژنوتیپ بر نشت الکترولیت در لوبیای معمولی. آبیاری در سه سطح شاهد (i1) (۹۰ درصد ظرفیت زراعی)، ۶۰ (i2) و ۳۰ درصد ظرفیت زراعی (i3)، ژنوتیپ‌های لوبیای معمولی شامل یاس (g1) و صدری (g2)، باکتری در دو سطح (عدم تلقیح با باکتری (b1)، تلقیح با جدایه باکتریایی (b2)) و هورمون در دو غلظت صفر (h1) و ۰/۵ میلی مولار سالیسیلیک اسید (h2). حروف متفاوت بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال یک درصد تفاوت معنی‌دار دارند.

با افزایش شدت تنش خشکی، میزان نشت الکترولیت افزایش یافت، به‌طوری‌که در سطح تنش ۳۰ درصد ظرفیت زراعی، بیشترین میزان نشت الکترولیت مشاهده شد. همچنین، استفاده از هورمون و باکتری در مقایسه با عدم کاربرد آنها، در هر سه سطح تنش خشکی موجب کاهش نشت الکترولیت گردید. مشاهدات نشان داد که نشت الکترولیت و تجمع مالون‌دی‌آلدهید به شدت تحت تأثیر میزان تنش خشکی قرار دارند (جدول ۱ و ۲، شکل‌های ۴ و ۵). در شرایط تنش خشکی، محتوای نسبی آب برگ (RWC) نقش مهمی در تحمل گیاه به تنش ایفا می‌کند، چرا که از طریق تجمع مواد محافظ اسمزی باعث تنظیم اسمزی می‌شود (Karimi et al., 2018). در این مطالعه، کاهش نشت یونی در حضور اسید سالیسیلیک نشان می‌دهد که این شبه هورمون گیاهی قادر است با تحریک سامانه دفاعی آنتی‌اکسیدانی، از اکسیداسیون لیپیدهای غشا جلوگیری کرده و ساختار آن را حفظ کند (Rajeshwari & Bhuvaneshwari, 2017). مطالعات نشان داده‌اند که همزیستی لوبیا با ریزوبیوم می‌تواند در بهبود پایداری غشای سلولی مؤثر باشد و از میزان نشت الکترولیت‌ها بکاهد. Zahran et al. (۲۰۲۱) گزارش کردند که تلقیح گیاه سویا با سویه‌های مؤثر *Rhizobium* در شرایط تنش خشکی منجر به کاهش قابل توجه نشت یونی شد که این امر به حفظ بهتر ساختار غشا، کاهش آسیب اکسیداتیو، و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نسبت داده شد. این نتایج تأکیدی است بر نقش حفاظتی ریزوبیوم در پایداری فیزیولوژیک گیاه در مواجهه با تنش خشکی. در مجموع، کاهش نشت یونی در تیمارهای حاوی باکتری و اسید سالیسیلیک، به‌ویژه در رقم متحمل، حاکی از نقش کلیدی این عوامل در حفظ ساختار غشاهای سلولی و افزایش تحمل گیاه به خشکی است.

فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

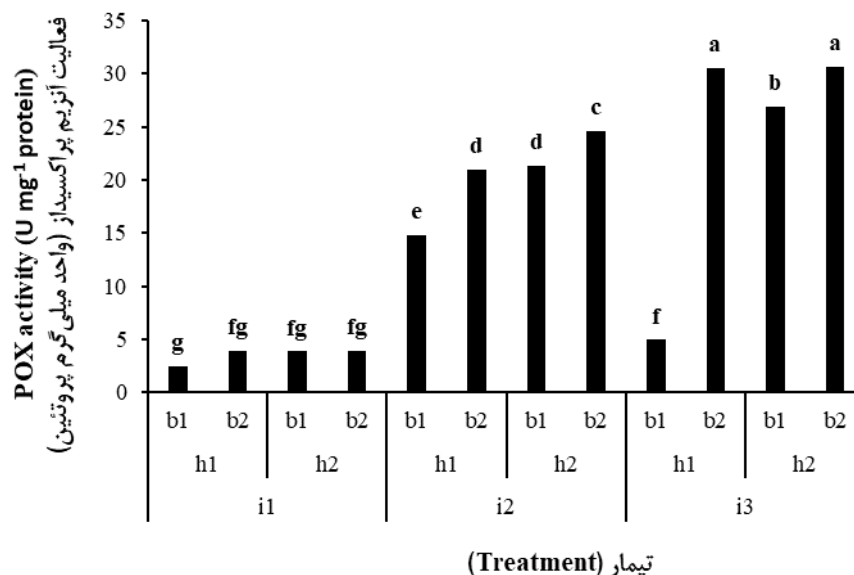
نتایج نشان داد که با افزایش شدت تنش خشکی، میزان فعالیت آنزیم کاتالاز افزایش یافت، به‌طوری‌که در سطح تنش ۳۰ درصد

ظرفیت زراعی، بالاترین میزان کاتالاز مشاهده شد. همچنین، کاربرد باکتری در مقایسه با عدم کاربرد آن، در هر سه سطح تنش خشکی موجب کاهش میزان کاتالاز گردید.



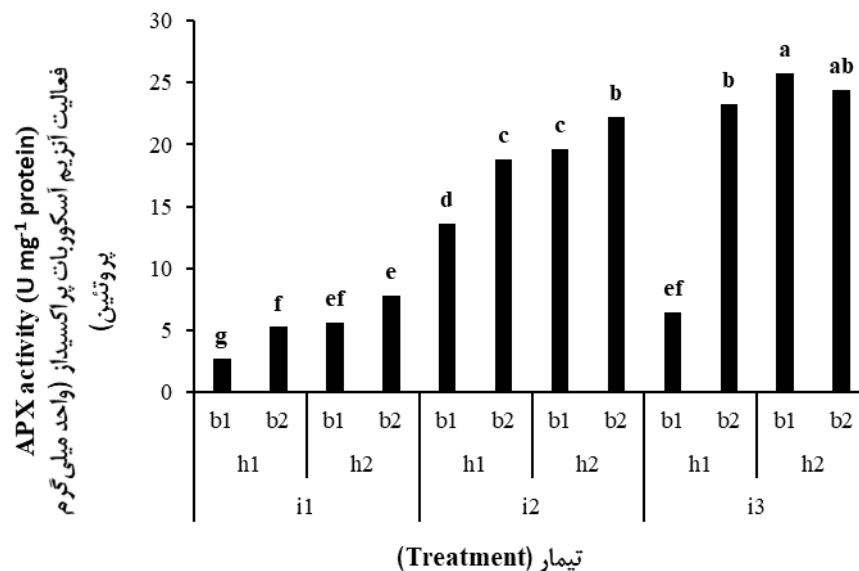
شکل ۶: مقایسه میانگین اثرات آبیاری، هورمون، باکتری و ژنوتیپ بر فعالیت آنزیم کاتالاز در لوبیای معمولی. آبیاری در سه سطح شاهد (i1) (۹۰ درصد ظرفیت زراعی)، ۶۰ (i2) و ۳۰ درصد ظرفیت زراعی (i3)، ژنوتیپ‌های لوبیای معمولی شامل یاس (g1) و صدری (g2) و باکتری در دو سطح (عدم تلقیح با باکتری (b1)، تلقیح با جدایه باکتریایی (b2)). حروف متفاوت بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال یک درصد تفاوت معنی دار دارند.

مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که با افزایش شدت تنش خشکی، میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز افزایش یافت؛ به‌طوری‌که در سطح تنش ۳۰ درصد ظرفیت زراعی، بالاترین میزان پراکسیداز مشاهده شد. همچنین، استفاده از هورمون و باکتری در مقایسه با عدم استفاده از آنها، در هر سه سطح تنش خشکی موجب افزایش فعالیت پراکسیداز گردید.



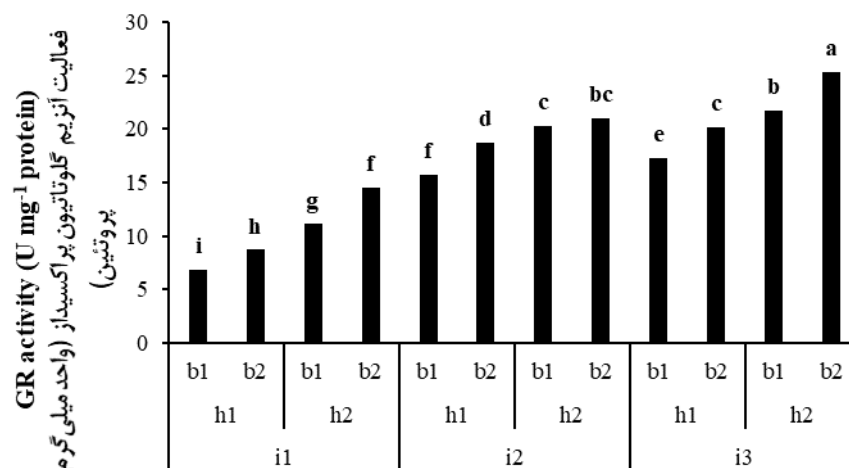
شکل ۷: مقایسه میانگین اثرات آبیاری، هورمون، باکتری و ژنوتیپ بر فعالیت آنزیم پراکسیداز در لوبیای معمولی. آبیاری در سه سطح شاهد (i1) (۹۰ درصد ظرفیت زراعی)، ۶۰ (i2) و ۳۰ درصد ظرفیت زراعی (i3)، باکتری در دو سطح (عدم تلقیح با باکتری (b1)، تلقیح با جدایه باکتریایی (b2)) و هورمون در دو غلظت صفر (h1) و ۰/۵ میلی مولار سالسیلیک اسید (h2). حروف متفاوت بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال یک درصد تفاوت معنی دار دارند.

نتایج نشان داد که با افزایش شدت تنش خشکی، میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز افزایش یافت؛ به طوری که در سطح تنش ۶۰ درصد ظرفیت زراعی، بالاترین میزان آسکوربات پراکسیداز مشاهده شد. همچنین، استفاده از هورمون و باکتری در مقایسه با عدم استفاده از آنها، در هر سه سطح تنش خشکی موجب افزایش فعالیت آسکوربات پراکسیداز گردید. فعالیت بالاتر آنزیم‌هایی مانند APX، به‌ویژه در شرایط خشکی، سودمند است؛ زیرا تعادل بین تولید و حذف گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) را حفظ کرده و از تجمع بیش از حد این مولکول‌ها که می‌تواند به شدت ساختار و عملکرد سلولی را مختل کند، جلوگیری می‌کند (Laxa et al., 2019). افزایش فعالیت APX تضمین می‌کند که H_2O_2 به‌طور مؤثر سم‌زدایی شود، در نتیجه از کلروپلاست‌ها محافظت کرده و کارایی فتوسنتز را حتی در شرایط کمبود آب حفظ می‌کند. این افزایش ظرفیت مهار ROS، در نهایت به بهبود تحمل به خشکی در گیاهان تیمار شده کمک می‌کند (Hussain et al., 2019). فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، آسیب اکسیداتیو را به‌ویژه در شرایط محدودیت آبی به حداقل می‌رساند و در نتیجه از فرآیندهای سلولی حیاتی، از جمله فتوسنتز، محافظت می‌کند (Moradi & Piri 2018). به‌عنوان مثال، در گیاه لوبیا، تنش خشکی به‌طور قابل توجهی فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیرآنزیمی را در مقایسه با شرایط آبی معمولی افزایش داده است (Desoky et al., 2021). در تحقیقات مشابه گیاهانی که با سویه ریزوباکتری محرک رشد گیاه *Rhizobium* (HAS31) تیمار شدند، در شرایط تنش خشکی توانستند فعالیت بالاتری از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز (CAT) و پراکسیداز (POD) را در مقایسه با گیاهان شاهد بدون تیمار با PGPR حفظ کنند. این موضوع نشان می‌دهد که حضور *Rhizobium* با تحریک سیستم دفاعی گیاه، نقش مهمی در کاهش آسیب‌های ناشی از تنش اکسیداتیو و افزایش توانایی گیاه برای سازگاری با خشکی ایفا می‌کند (Batool et al., 2020).



شکل ۸: مقایسه میانگین اثرات آبیاری، هورمون، باکتری و ژنوتیپ بر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در لوبیای معمولی. آبیاری در سه سطح شاهد (i1) (۹۰ درصد ظرفیت زراعی)، ۶۰ (i2) و ۳۰ درصد ظرفیت زراعی (i3)، باکتری در دو سطح (عدم تلقیح با باکتری (b1)، تلقیح با جدایه باکتریایی (b2)) و هورمون در دو غلظت صفر (h1) و ۰/۵ میلی مولار سالسیلیک اسید (h2). حروف متفاوت بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال یک درصد تفاوت معنی دار دارند.

با افزایش شدت تنش خشکی، میزان فعالیت آنزیم گلوکاتایون ردوکتاز افزایش یافت؛ به طوری که در سطح تنش ۳۰ درصد ظرفیت زراعی، بالاترین میزان گلوکاتایون ردوکتاز مشاهده شد. همچنین، استفاده از هورمون و باکتری در مقایسه با عدم استفاده از آنها، در هر سه سطح تنش خشکی موجب افزایش فعالیت گلوکاتایون ردوکتاز گردید. همچنین، استفاده از هورمون و باکتری در مقایسه با عدم استفاده از آنها، در هر سه سطح تنش خشکی موجب افزایش فعالیت گلوکاتایون پراکسیداز گردید. افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی، به ویژه کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز، پراکسیداز یک نتیجه قابل توجه از استفاده از هورمون سالسیلیک اسید و باکتری ریزوبیوم بود (شکل‌های ۶ تا ۹). این افزایش نشان دهنده تقویت سیستم دفاعی آنتی اکسیدانی توسط این تیمارها، کاهش استرس اکسیداتیو و بهبود تحمل به خشکی است. فعالیت‌های آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز نقش مهمی در تجزیه H_2O_2 به آب و اکسیژن ایفا می‌کنند، در حالی که آسکوربات پراکسیداز با استفاده از آسکوربات، یک مکانیسم ضروری در شرایط خشکسالی، H_2O_2 را کاهش می‌دهد. افزایش فعالیت آسکوربات پراکسیداز در طول خشکسالی به جلوگیری از تجمع گونه‌های فعال اکسیژن کمک می‌کند، که در غیر این صورت می‌تواند منجر به آسیب سلولی شود (Sharma et al., 2019).



تیمار (Treatment)

شکل ۹: مقایسه میانگین اثرات آبیاری، هورمون، باکتری و ژنوتیپ بر فعالیت آنزیم گلوکاتایون ردوکتاز در لوبیای معمولی. آبیاری در سه سطح شاهد (i1) (۹۰ درصد ظرفیت زراعی)، ۶۰ (i2) و ۳۰ درصد ظرفیت زراعی (i3)، باکتری در دو سطح (عدم تلقیح با باکتری (b1)، تلقیح با جدایه باکتریایی (b2)) و هورمون در دو غلظت صفر (h1) و ۰/۵ میلی مولار سالیسیلیک اسید (h2). حروف متفاوت بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال یک درصد تفاوت معنی دار دارند.

در پژوهشی (Kusvuran & Dasgan, 2017) که اثر تنش خشکی را بر آسیب‌های اکسیداتیو و تغییرات آنتی‌اکسیدان‌ها در دو رقم لوبیا Bn-16 (حساس به خشکسالی) و Bn-150 (مقاوم به خشکسالی) مورد بررسی قرار دادند، مشاهده شد که فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، مانند سوپراکسید دیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز و گلوکاتایون ردوکتاز، در ژنوتیپ‌های مقاوم (Bn-150) نسبت به ژنوتیپ‌های حساس (Bn-16) افزایش بیشتری داشت. همچنین پراکسیداسیون لیپیدی با افزایش شدت خشکی در همه ژنوتیپ‌ها افزایش یافت. این نتایج نشان داد که یک سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی، اسمولیت‌ها (مانند پرولین) نقش مهمی در لوبیا معمولی (*Phaseolus vulgaris* L) در طول تنش خشکی و بازیابی دارند. باکتری‌های اندوفیت و کاربرد سالیسیلیک اسید (SA) باعث بهبود رشد، خواص بیوشیمیایی و جذب مواد مغذی در لوبیا سفید تحت تنش خشکی می‌شوند (Mehrasa et al., 2022). در پژوهشی دیگر بیان شد که فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی به طور قابل توجهی در گیاهان تحت تیمار، در شرایط خشکی، افزایش یافت. شواهد متعددی بیانگر آن است که اسید سالیسیلیک در گیاهان تحت تنش با گونه‌های فعال اکسیژن و گلوکاتایون برهم‌کنش داشته و این تعامل نقش مهمی در تنظیم پاسخ‌های دفاعی ایفا می‌کند. مطالعات اخیر نشان داده‌اند که ارتباط میان اسید سالیسیلیک، گونه‌های فعال اکسیژن و گلوکاتایون با فرآیندهای تنظیمی رونویسی ژن‌های دفاعی مرتبط است. علاوه بر این، تغییرات وضعیت اکسید و احیا (ردوکس) در تنظیم‌کننده‌ها و هم‌تنظیم‌کننده‌های درگیر در مسیرهای وابسته به اسید سالیسیلیک می‌تواند الگوهای زمانی بیان ژن‌های دفاعی را در واکنش به تنش‌های محیطی تعیین کند (Herrera-Vásquez et al., 2015).

همچنین باید در نظر داشت که تفاوت ژنوتیپ‌های مختلف لوبیا تحت تنش خشکی عمدتاً در صفاتی مثل نرخ رشد، عملکرد دانه، عملکرد بیولوژیکی، محتوای کلروفیل، محتوای نسبی آب برگ، میزان پرولین و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (کاتالاز و پراکسیداز) مشاهده می‌شود. ارقام مقاوم معمولاً کاهش کمتری در عملکرد و ویژگی‌های فیزیولوژیکی نشان می‌دهند و افزایش بیشتری در فعالیت آنتی‌اکسیدانی و تجمع پرولین دارند (سپهری و همکاران، ۱۳۹۴). به این ترتیب، می‌توان این صفات را به عنوان شاخص‌هایی برای مقایسه بین ارقام و بررسی تفاوت حساسیت آن‌ها به خشکی در نظر گرفت.

به‌طور کلی، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی با افزایش سطوح تنش خشکی در همه ژنوتیپ‌ها به‌طور قابل توجهی افزایش یافت (شکل‌های ۶، ۷، ۸ و ۹). آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی معمولاً همبستگی‌های مثبت قوی با یکدیگر نشان می‌دهند، که نشان می‌دهد اغلب در پاسخ به تنش اکسیداتیو همزمان القا یا سرکوب می‌شوند (شکل‌های ۶، ۷، ۸ و ۹) که نشان‌دهنده همبستگی مثبت بین این آنزیم‌ها در مدیریت تنش اکسیداتیو است.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج به‌طور کلی نشان داد که تمامی خصوصیات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی دو ژنوتیپ لوبیا تحت تنش خشکی تغییرات معنی داری یافت. همچنین ژنوتیپ صدری با افزایش بیشتر فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی توانایی بهتری در کاهش آسیب اکسیداتیو داشتند. فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی به‌طور قابل توجهی در گیاهان تیمار شده با هورمون سالیسیلیک اسید و باکتری‌های ریزوبیوم تحت تنش خشکی افزایش یافت. این مطالعه پتانسیل تیمارهای تلقیح بذر با باکتری و هورمونی را در افزایش تحمل به خشکی در لوبیاهای معمولی نشان می‌دهد و رویکردی مناسب برای افزایش تحمل به تنش ارائه می‌کند. استفاده از تیمارهای سالیسیلیک اسید و باکتری ریزوبیوم سوئه R160 تقویت چندین مکانیسم فیزیولوژیکی و مولکولی، این اثرات ناشی از خشکی را در گیاه لوبیای معمولی کاهش داد. این تیمارها با حفظ رطوبت نسبی سلول بالاتر و کاهش تنش اکسیداتیو از طریق افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، به افزایش تحمل به تنش کمک می‌کنند و افزایش سطح پرولین بیشتر از تنظیم اسمزی پشتیبانی می‌کند. همچنین ارقام مقاوم در مقایسه با ارقام حساس، دارای فعالیت بالاتر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و میزان بیشتری پروتئین و پرولین بودند.

منابع

- AbdelMotlb, N. A., Abd El-Hady, S. A., Abdel-all, F. S., Ghoname, A. A. A., & Youssef, S. M. S. (2023). Rhizobium enhanced drought stress tolerance in green bean plants through improving physiological and biochemical biomarkers. *Egyptian Journal of Horticulture*, 50(4). <https://doi.org/10.21608/ejoh.2023.211561.1246>
- Adejumo, S. A. (2023). Sustainable Crop Nutrition for Ameliorating Biotic Stress in Grain Legumes and Ensuring Food Security. In *Advances in Legume Research: Physiological Responses and Genetic Improvement for Biotic Stress Resistance*. Bentham Science Publishers, pp, 130-141.
- Alamer, K. H. & Fayez, K. A. (2020). Impact of salicylic acid on the growth and physiological activities of parsley plants under lead toxicity. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 26, pp.1361-1373. <https://doi.org/10.1007/s12298-020-00830-1>
- Anjum, S. A. Ashraf, U. Zohaib, A. Tanveer, M. Naeem, M. Ali, I. Tabassum, T. & Nazir, U. (2017). Growth and development responses of crop plants under drought stress: a review. *Zemdirbyste-Agriculture*, 104(3), pp. 267–276. <https://doi.org/10.13080/z-a.2017.104.034>
- Arif, Y. Sami, F. Siddiqui, H. Bajguz, A. & Hayat, S. (2020). Salicylic acid in relation to other phytohormones in plant: A study towards physiology and signal transduction under challenging environment. *Environmental and Experimental Botany*, 175, p.104040. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2020.104040>
- Batool, T., Ali, S., Seleiman, M. F., Naveed, N. H., Ali, A., Ahmed, K., Abid, M., Rizwan, M., Shahid, M. R., Alotaibi, M., Al-Ashkar, I., & Mubushar, M. (2020). Plant growth promoting rhizobacteria alleviates drought stress in potato in response to suppressive oxidative stress and antioxidant enzymes activities. *Scientific Reports*, 10, 16975. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73489-z>
- Bates, L. S., Waldren, R. P., & Teare, I. D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, 39(1), 205–207. <https://doi.org/10.1007/BF00018060>

- Beigzadeh, S. Maleki, A. Heydari, M. M. Khourgami, A. & Rangin, A. (2019). Ecological and physiological performance of white bean (*Phaseolus vulgaris* L.) affected by algae extract and salicylic acid spraying under water deficit stress. *Applied Ecology & Environmental Research*, 17 (1). http://dx.doi.org/10.15666/aecer/1701_343355
- Behera, S. K., & Panda, R. K. (2009). Effect of fertilization and irrigation schedule on water and fertilizer solute transport for wheat crop in a subhumid subtropical region. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 130, 141–155. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2008.11.010>
- Bharti, R. Sharma, D. & Kunjam, S. (2024). Role of abiotic and biotic stress management practices in extreme environment in monitoring and improving physiological properties of plant. *Modern Techniques To Sustainable Agriculture; EDU Publishers*: Lucknow, India, p.125.
- Bhattacharya, A. & Bhattacharya, A. (2021). Effect of soil water deficit on growth and development of plants: a review. *Soil water deficit and physiological issues in plants*, pp.393-488. https://doi.org/10.1007/978-981-33-6276-5_5
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Castro-Guerrero, N. A. Isidra-Arellano, M. C. Mendoza-Cozatl, D. G. & Valdés-López, O. (2016). Common bean: a legume model on the rise for unraveling responses and adaptations to iron, zinc, and phosphate deficiencies. *Frontiers in Plant Science*, 7, p.600. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00600>
- Cohen, I. Zandalinas, S. I. Huck, C. Fritschi, F. B. & Mittler, R. (2021). Meta-analysis of drought and heat stress combination impact on crop yield and yield components. *Physiologia Plantarum*, 171(1), pp.66-76. <https://doi.org/10.1111/ppl.13203>
- Daniel, A. I. Fadaka, A. O. Gokul, A. Bakare, O. O. Aina, O. Fisher, S. Burt, A. F. Mavumengwana, V. Keyster, M. & Klein, A. (2022). Biofertilizer: the future of food security and food safety. *Microorganisms*, 10(6), p.1220. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10061220>
- Desoky, E. S. M. Mansour, E. El-Sobky, E. S. E. Abdul-Hamid, M. I. Taha, T. F. Elakkad, H. A. Arnaout, S. M. Eid, R. S. El-Tarabily, K. A. & Yasin, M. A. (2021). Physio-biochemical and agronomic responses of faba beans to exogenously applied nano-silicon under drought stress conditions. *Frontiers in Plant Science*, 12, p.637783. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.637783>
- Emamverdian, A. Ding, Y. & Mokhberdoran, F. (2020). The role of salicylic acid and gibberellin signaling in plant responses to abiotic stress with an emphasis on heavy metals. *Plant signaling & behavior*, 15(7), p.1777372.
- Feizian, M. Hemmati, A. AsadiRahmani, H. & Azizi, K. (2017). 'Effects of rhizobium bacteria strains on yield components of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in drought stress condition', *Journal of Sol Biology*, 4(2), pp. 165-176. doi: 10.22092/sbj.2017.109311.
- Foyer, C. H., & Halliwell, B. (1976). The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: A proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta*, 133(1), 21–25. <https://doi.org/10.1007/BF00386001>
- Gharib, F. A. E. L. Osama, K. Sattar, A. M. A. E. & Ahmed, E. Z. (2024). Impact of *Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis salina*, and *Arthrospira platensis* as bio-stimulants on common bean plant growth, yield and antioxidant capacity. *Scientific Reports*, 14(1), p.1398. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-50040-4>
- Gill, S. S. & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant physiology and biochemistry*, 48(12), pp.909-930. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016>
- Gontia-Mishra, I. Sapre, S. Sharma, A. & Tiwari, S. (2016). Amelioration of drought tolerance in wheat by the interaction of plant growth-promoting rhizobacteria. *Plant Biology*, 18(6), pp.992-1000. <https://doi.org/10.1111/plb.12505>
- Heath, R.L. and Packer, L., 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of biochemistry and biophysics*, 125(1), pp.189-198.
- Herrera-Vásquez, A., Salinas, P., & Holuigue, L. (2015). Salicylic acid and reactive oxygen species interplay in the transcriptional control of defense genes expression. *Frontiers in Plant Science*, 6, 171. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00171>
- Hussain, S. Rao, M. J. Anjum, M. A. Ejaz, S. Zakir, I. Ali, M. A. Ahmad, N. & Ahmad, S. (2019). Oxidative stress and antioxidant defense in plants under drought conditions. *Plant abiotic stress tolerance: Agronomic, molecular and biotechnological approaches*, pp.207-219. https://doi.org/10.1007/978-3-030-06118-0_9

- Ismail, M. A. Amin, M. A. Eid, A. M. Hassan, S. E. D. Mahgoub, H. A. Lashin, I. Abdelwahab, A. T. Azab, E. Gobouri, A. A. Elkelish, A. & Fouda, A. (2021). Comparative study between exogenously applied plant growth hormones versus metabolites of microbial endophytes as plant growth-promoting for *Phaseolus vulgaris* L. *Cells*, 10(5), p.1059. <https://doi.org/10.3390/cells10051059>
- Jha, Y. Yadav, K. A. & Mohamed, H. I. (2023). Plant growth-promoting bacteria and exogenous phytohormones alleviate the adverse effects of drought stress in pigeon pea plants. *Plant and Soil*, pp.1-21. <https://doi.org/10.1007/s11104-023-06155-8>
- Karimi, S. Rahemi, M. Rostami, A. A. & Sedaghat, S. (2018). Drought effects on growth, water content and osmoprotectants in four olive cultivars with different drought tolerance. *International Journal of Fruit Science*, 18(3), pp.254-267. <https://doi.org/10.1080/15538362.2018.1438328>
- Khan, M. I. R. Asgher, M. & Khan, N. A. (2014). Alleviation of salt-induced photosynthesis and growth inhibition by salicylic acid involves glycinebetaine and ethylene in mungbean (*Vigna radiata* L.). *Plant Physiology and Biochemistry*, 80, pp.67-74. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.03.026>
- Khan, N. Bano, A. Rahman, M. A. Guo, J. Kang, Z. & Babar, M. A. (2019). Comparative physiological and metabolic analysis reveals a complex mechanism involved in drought tolerance in chickpea (*Cicer arietinum* L.) induced by PGPR and PGRs. *Scientific Reports*, 9(1), p.2097. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-38702-8>
- Khavari, H., & Shakerami, Q. (2019). Role of arbuscular mycorrhiza and *Azotobacter chroococcum* on growth and yield of different red bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars. *Plant Ecophysiology Journal*, 11(38), 131–181.
- Kopecká, R., Kameniarová, M., Černý, M., Brzobohatý, B. & Novák, J., 2023. Abiotic stress in crop production. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(7), p.6603. <https://doi.org/10.3390/ijms24076603>
- Kuila, D. & Ghosh, S. (2022). Aspects, problems and utilization of *Arbuscular Mycorrhizal* (AM) application as bio-fertilizer in sustainable agriculture. *Current Research in Microbial Sciences*, 3, p.100107. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2022.100107>
- Kumar, G. Singh, S. Singh, R. & Mishra, R. (2021). Role of physical agents in inducing genotoxicity and oxidative stress in plants. *Induced Genotoxicity and Oxidative Stress in Plants*, pp.65-102. https://doi.org/10.1007/978-981-16-2074-4_3
- Kumar, M. S. Reddy, G. C. Phogat, M. & Korav, S. (2018) 2018. Role of bio-fertilizers towards sustainable agricultural development: A review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7(6), pp.1915-1921.
- Kumari, V. V. Banerjee, P. Verma, V. C. Sukumaran, S. Chandran, M. A. S. Gopinath, K. A. Venkatesh, G. Yadav, S. K. Singh, V. K. & Awasthi, N. K. (2022). Plant nutrition: An effective way to alleviate abiotic stress in agricultural crops. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(15), p.8519. <https://doi.org/10.3390/ijms23158519>
- Kusvuran, S. & Dasgan, H. Y. (2017). Effects of drought stress on physiological and biochemical changes in *Phaseolus vulgaris* L. *Legume Research-An International Journal*, 40(1), pp. 55-62. <https://doi.org/10.18805/lr.v0i0.7025>
- Laxa, M. Liebthal, M. Telman, W. Chibani, K. & Dietz, K. J. (2019). The role of the plant antioxidant system in drought tolerance. *Antioxidants*, 8(4), p.94. <https://doi.org/10.3390/antiox8040094>
- Lipiec, J., Doussan, C., Nosalewicz, A., & Kondracka, K. (2013). Effect of drought and heat stresses on plant growth and yield: A review. *International Agrophysics*, 27(4), 463–477. <https://doi.org/10.2478/intag-2013-0017>
- Loboguerrero, A. M. Campbell, B. M. Cooper, P. J. Hansen, J. W. Rosenstock, T. & Wollenberg, E. (2019). Food and earth systems: priorities for climate change adaptation and mitigation for agriculture and food systems. *Sustainability*, 11(5), p.1372. <https://doi.org/10.3390/su11051372>
- Martínez, J. P. Silva, H. F. L. J. Ledent, J. F. & Pinto, M. (2007). Effect of drought stress on the osmotic adjustment, cell wall elasticity and cell volume of six cultivars of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *European Journal of Agronomy*, 26(1), pp.30-38. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2006.08.003>
- Martínez-Hidalgo, P., & Hirsch, A. M. (2017). The nodule microbiome: N₂-fixing rhizobia do not live alone. *Phybiomes Journal*, 1(2), 70–82. <https://doi.org/10.1094/PBIOMES-12-16-0019-RVW>

- Masheva, V. Spasova-Apostolva, V. Aziz, S. & Tomlekova, N. (2022). Variations in proline accumulation and relative water content under water stress characterize bean mutant lines (*P. vulgaris* L.). *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 28, 430–436.
- McKay, H. M. (1992). Electrolyte leakage from fine roots of conifer seedlings: a rapid index of plant vitality following cold storage. *Canadian Journal of Forest Research*, 22(9), 1371-1377. <https://doi.org/10.1139/x92-182>
- Mehrasa, H., Farnia, A., Kenarsari, M. J., & Nakhjavan, S. (2022). Endophytic bacteria and SA application improve growth, biochemical properties, and nutrient uptake in white beans under drought stress. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 22(3), 3268–3279. <https://doi.org/10.1007/s42729-022-00884-y>
- Mladenov, P. Aziz, S. Topalova, E. Renaut, J. Planchon, S. Raina, A. & Tomlekova, N. (2023). Physiological responses of common bean genotypes to drought stress. *Agronomy*, 13(4), p.1022. <https://doi.org/10.3390/agronomy13041022>
- Mombeni, M., & Abbasi, A. (2019). Biochemical responses of some common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes to drought stress. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 21(2), 407–421.
- Moradi, A. & Piri, R. (2018). Plant growth promoting rhizobacteria enhance salinity stress tolerance in Cumin (*Cuminum cyminum* L.) during germination stage. *Journal of Plant Process and Function*, 6(22), pp.47-54. <http://jispp.iut.ac.ir/article-1-831-en.html>
- Morante-Carballo, F. Montalván-Burbano, N. Quiñonez-Barzola, X. Jaya-Montalvo, M. & Carrión-Mero, P. (2022). What do we know about water scarcity in semi-arid zones? A global analysis and research trends. *Water*, 14(17), p.2685. <https://doi.org/10.3390/w14172685>
- Myers, J. R. & Kmiecik, K. (2017). Common bean: Economic importance and relevance to biological science research. *The common bean genome*, pp.1-20. https://doi.org/10.1007/978-3-319-63526-2_1
- Naeem, M. Basit, A. Ahmad, I. Mohamed, H. I. & Wasila, H. (2020). Effect of Salicylic Acid and Salinity Stress on the Performance of Tomato Plants. *Gesunde Pflanzen*, 72(4), pp. 1-10. <https://doi.org/10.1007/s10343-020-00521-7>
- Nahar, K. Hasanuzzaman, M. & Fujita, M. (2016). Roles of osmolytes in plant adaptation to drought and salinity. Osmolytes and plants acclimation to changing environment: *Emerging Omics Technologies*, pp.37-68. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2616-1_4
- Nakano, Y. and Asada, K., 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and cell physiology*, 22(5), pp.867-880
- Naseem, H. and Bano, A., 2014. Role of plant growth-promoting rhizobacteria and their exopolysaccharide in drought tolerance of maize. *Journal of Plant Interactions*, 9(1), pp.689-701.
- Oguz, M. C. Aycan, M. Oguz, E. Poyraz, I. & Yildiz, M. (2022). Drought stress tolerance in plants: Interplay of molecular, biochemical and physiological responses in important development stages. *Physiologia*, 2(4), pp.180-197. <https://doi.org/10.3390/physiologia2040015>
- Ojuederie, O. B. Olanrewaju, O. S. & Babalola, O. O. (2019). Plant growth promoting rhizobacterial mitigation of drought stress in crop plants: implications for sustainable agriculture. *Agronomy*, 9(11), p.712. <https://doi.org/10.3390/agronomy9110712>
- Qiao, M. Hong, C. Jiao, Y. Hou, S. & Gao, H. (2024). Impacts of drought on photosynthesis in major food crops and the related mechanisms of plant responses to drought. *Plants*, 13(13), p.1808. <https://doi.org/10.3390/plants13131808>
- Pereira, G.J.G., Molina, S.M.G., Lea, P.J. and Azevedo, R.A.D., 2002. Activity of antioxidant enzymes in response to cadmium in *Crotalaria juncea*. *Plant and soil*, 239(1), pp.123-132.
- Rajeshwari, V., & Bhuvaneshwari, V. (2017). Salicylic acid induced salt stress tolerance in plants. *International Journal of Plant Biology and Research*, 5(3), 1067
- Ramezan, G., & Abbaszadeh, B. (2016). The effect of drought stress on yield, content, and percentage of essential oil of *Nepeta pogonosperma* Jamzad et Assadi under different plant densities. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 31(6), 1071–1085. <https://doi.org/10.22092/ijmapr.2016.105895>
- Salem, K. F. Saleh, M. M. Abu-Ellail, F. F. Aldahak, L. & Alkuddsi, Y. A. (2021). The role of salicylic acid in crops to tolerate abiotic stresses. *Salicylic Acid-A Versatile Plant Growth Regulator*, pp.93-152. https://doi.org/10.1007/978-3-030-79229-9_7

- Sepehri, A., Abbasi, R., & Karami, A. (2015). Effect of drought stress and salicylic acid on yield and yield components of red bean genotypes. *Journal of Crop Improvement*, 17(2), 123-136. <https://doi.org/10.22059/jci.2015.55196>
- Sharma, P. Jha, A. B. & Dubey, R. S. (2019). Oxidative stress and antioxidative defense system in plants growing under abiotic stresses. In *Handbook of Plant and Crop Stress, Fourth Edition* (pp. 93-136). CRC press.
- Sheteiwy, M. S. Ali, D. F. I. Xiong, Y. C. Brestic, M. Skalicky, M. Hamoud, Y. A. Ulhassan, Z. Shaghaleh, H. AbdElgawad, H. Farooq, M. & Sharma, A. (2021). Physiological and biochemical responses of soybean plants inoculated with *Arbuscular mycorrhizal* fungi and *Bradyrhizobium* under drought stress. *BMC Plant Biology*, 21, pp.1-21. <https://doi.org/10.1186/s12870-021-02949-z>
- Sheteiwy, M. S. An, J. Yin, M. Jia, X. Guan, Y. He, F. & Hu, J. (2019). Cold plasma treatment and exogenous salicylic acid priming enhances salinity tolerance of *Oryza sativa* seedlings. *Protoplasma*, 256, pp.79-99. <https://doi.org/10.1007/s00709-018-1279-0>
- Singh, P. Choudhary, K. K. Chaudhary, N. Gupta, S. Sahu, M. Tejaswini, B. & Sarkar, S. (2022). Salt stress resilience in plants mediated through osmolyte accumulation and its crosstalk mechanism with phytohormones. *Frontiers in Plant Science*, 13, p.1006617. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1006617>
- Soltani, E. (2022). *The effect of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) on biochemical, physiological, and molecular traits of some common bean (Phaseolus vulgaris L.) genotypes under drought stress* [Doctoral dissertation, University of Tehran, College of Agriculture and Natural Resources]
- Sorkhi, F. & Fateh, M. (2019). Effect of drought stress on leaf area index, photosynthesis, stomatal conductance and proline content in two pinto bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.). *Environmental Stresses in Crop Sciences*, 12(2), pp.389-399. <https://doi.org/10.22077/escs.2018.1373.1294>
- Velikova, V., Yordanov, I., & Edreva, A.J.P.S. (2000). Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: protective role of exogenous polyamines. *Plant science*, 151(1), 59-66.
- Voccianti, M. Grifoni, M. Fusini, D. Petruzzelli, G. & Franchi, E. (2022). The role of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) in mitigating plant's environmental stresses. *Applied Sciences*, 12(3), p.1231. <https://doi.org/10.3390/app12031231>
- Wahab, A. Abdi, G. Saleem, M. H. Ali, B. Ullah, S. Shah, W. Mumtaz, S. Yasin, G. Muresan, C. C. & Marc, R. A. (2022). Plants' physio-biochemical and phyto-hormonal responses to alleviate the adverse effects of drought stress: A comprehensive review. *Plants*, 11(13), p.1620. <https://doi.org/10.3390/plants11131620>
- Yazdanpanah, S., Abbasi, F., & Baqizadeh, A. (2009). Effect of salicylic acid and ascorbic acid treatments on proline, sugar, and protein content in maize under drought stress. *Proceedings of the 1st National Conference on Environmental Stresses in Agricultural Sciences*, University of Birjand, Iran. [In Persian]
- Youssef, S. M. López-Orenes, A. Ferrer, M. A. & Calderón, A. A. (2023). Foliar application of salicylic acid enhances the endogenous antioxidant and hormone systems and attenuates the adverse effects of salt stress on growth and yield of french bean plants. *Horticulturae*, 9(1), p.75. <https://doi.org/10.3390/horticulturae9010075>
- Zahrán, H. H., Abbas, M. M., & Abdel Wahab, A. M. (2021). Physiological and biochemical responses of *Phaseolus vulgaris*-*Rhizobium* symbiosis to drought stress. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(4), 2297–2306. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.01.061>
- Žalnėravičius, R. Paškevičius, A. Samukaitė-Bubnienė, U. Ramanavičius, S. Vilkienė, M. Mockevičienė, I. & Ramanavičius, A. (2022). Microbial fuel cell based on nitrogen-fixing *Rhizobium anhuiense* bacteria. *Biosensors*, 12(2), p.113. <https://doi.org/10.3390/bios12020113>
- Zamani, F. Hosseini, N. M. Oveisi, M. Arvin, K. Rabieyan, E. Torkaman, Z. & Rodriguez, D. (2024). Rhizobacteria and Phytohormonal interactions increase Drought Tolerance in *Phaseolus vulgaris* through enhanced physiological and biochemical efficiency. *Scientific Reports*, 14(1), p.30761. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-79422-y>
- Zulfiqar, F. & Ashraf, M. (2023). Proline alleviates abiotic stress induced oxidative stress in plants. *Journal of Plant Growth Regulation*, 42(8), pp.4629-4651. <https://doi.org/10.1007/s00344-022-10839-3>