Downloaded from cpj.iauahvaz.ac.ir at 16:36 +0430 on Saturday May 20th 2017

بررسی تحمل به تنش خشکی دو رقم گندم تلقیح شده با رایزوباکتری‌های محرک رشد گیاه (PGPR) تحت شرایط گلخانه

افشین مظفری*[۱]، داود حبیبی[۲]، احمد اصغرزاده[۳] و مسعود مشهدی اکبر بوجار[۴]

۱) استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، واحد ایلام، دانشگاه آزاد اسلامی، ایلام، ایران.
۲) دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران.
۳) عضو هیات علمی موسسه تحقیقات خاک و آب، کرج، ایران.
۴) دانشیار گروه علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران.

* نویسنده مسئول: : afshin.mozafari@ilam-iau.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۰/۰۵ تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۱/۳۱

چکیده

این پژوهش به‌منظور بررسی تحمل به تنش خشکی دو رقم گندم تلقیح شده با رایزوباکتری‌های محرک رشد گیاه (PGPR) در سال زراعی ۹۳-۱۳۹۲ در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج اجرا شد. آزمایش به‌صورت اسپلیت فاکتوریل در قالب طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار بود. کرت اصلی شامل دو سطح آبیاری مطلوب و تنش خشکی (کم آبیاری در مرحله گرده افشانی تا پایان رسیدگی کامل) و کرت‌های فرعی شامل باکتری‌های PGPR در چهار سطج ۱) تلقیح بذر با *Azotobacter chroococcum*، ۲) تلقیح بذر با *Azospirillum lipoferum*، ۳) مصرف همزمان هردو باکتری*Azospirillum* + *Azotobacter* و ۴) عدم کاربرد باکتری (شاهد) و دو رقم گندم شامل سیروان و مرودشت بود. صفات آزمایش شامل فعالیت آنزیم آنتی اکسیدانتی سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، فعالیت بیومارکر بیوشیمیایی مالون دی آلدهید (MDA) میزان کلروفیل a، b و a+b بودند. نتایج آزمایش نشان داد، اثر ساده تیمارهای آبیاری، رقم و باکتری بر کلیه صفات مطالعه شده معنی دار (P≤۰/۰۱) بود. میزان فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) در تیمار تنش خشکی بالاتر از تیمار آبیاری کامل (نرمال) بود. رقم سیروان و مرودشت به‌ترتیب با ۳/۶ و ۲/۷ واحد بر گرم پروتئین میزان فعالیت آنزیم SOD بیش‌تر و کم‌تری را نشان دادند. رقم سیروان در مقایسه با رقم مرودشت از میزان فعالیت بیومارکر MDA (۲۷/۴۲۴میلی‌گرم بر گرم وزن تازه بافت) کم‌تر و محتوی کلروفیل a، b و a+b به‌ترتیب با ۳/۲۵۵، ۱/۵۷۸ و ۴/۸۱۱ (میلی‌گرم بر گرم وزن تازه بافت) بیش‌تری برخوردار بود. در مقابل، رقم مروردشت در مقایسه با رقم سیروان از میزان بیومارکر MDA (۳۱/۷۵۲ میلی‌گرم بر گرم وزن تازه بافت) بیش‌تر و محتوی کلروفیل a، b و a+b به‌ترتیب با ۲/۷۴۷، ۱/۳۳۰ و ۴/۰۳۲ (میلی‌گرم بر گرم وزن تازه بافت) کم‌تری برخوردار بود.

واژه‌های کلیدی: آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، بیومارکر مالون‌دی‌آلدهید و کلروفیل.

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from cpj.iauahvaz.ac.ir at 16:36 +0430 on Saturday May 20th 2017

مقدمه

گندم یکی از محصولات استراتژیک در دنیا است که بالغ بر ۴۵ درصد پروتئین و ۵۵ درصد از کالری مورد نیاز انسان را تأمین می‌کند (نورمحمدی و همکاران، ۱۳۷۸). خشکی و تنش ناشی از آن از جمله عوامل مهمی است که تولیدات کشاورزی را در ایران با محدودیت روبرو ساخته و بازده استفاده از مناطق خشک را کاهش می‌دهد. کشور ایران با متوسط بارندگی سالانه حدود ۲۲۰ میلی‌متر به استثنای برخی استان‌های واقع در شمال کشور که در مجاورت دریای خزر قرار گرفته‌اند، جزء مناطق خشک دنیا محسوب شده و در اغلب استان‌ها گیاه زراعی گندم با خطر جدی تنش خشکی به‌ویژه پس از مرحله گل‌دهی مواجه می باشد (Ehdaie, 1995). ریزوباکتری‌های بهبود دهنده رشد گیاه (PGPR)، گروهی از باکتری‌ها هستند که قادرند به‌طور فعال ریشه‌های گیاه را آلوده کرده و رشد گیاه را افزایش دهند (Kloepper and Schroth, 1978). در این بین باکتری‌های جنس‌های ازوتوباکتر، آزوسپیریلوم و سودوموناس به‌عنوان باکتری‌های PGPR از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند. اخیرا به نقش ریزجانداران در سازگاری گیاهان نسبت به تنش خشکی توجه بیش‌تری شده است (East, 2013). این راهبرد یعنی استفاده از باکتری‌های آزادزی محرک رشد گیاه (PGPR) جهت افزایش تحمل گیاه زراعی در برابر تنش‌های غیرزنده از جمله تنش خشکی نه تنها آسان، بلکه کم هزینه و اقتصادی نیز است (Kim *et al.*, 2013، Timmusk and Wagner, 1999; Yang *et al.*, 2009). برهمکنش گیاه با ریزجانداران خاک شرایط خوبی را برای گیاه در برابر تنش کم آبی فراهم می‌سازد (Verma *et al.*, 2016). توانایی باکتری‌های PGPR در بالابردن و بهبود رشد گیاه و نقش آن‌ها در افزایش تحمل گیاه به تنش خشکی اولین بار توسط Timmusk و Wagner (۱۹۹۹) گزارش شده است. باکتری‌های PGPR علاوه بر افزایش قدرت محصول‌دهی و ایمنی گیاه باعث فعال شدن سامانه القای تحمل (ISR)[1] در برابر تنش‌های غیرزنده نظیر تنش خشکی و شوری در گیاه می شود (Yang *et al.*, 2009). Timmusk و Wagner (۱۹۹۹) بیان داشتند که در سطوح نسخه‌برداری[2]، باکتریوم PGPR باعث القای ژن‌های مسئول در تنش خشکی[3] و به دنبال آن افزایش تحمل گیاهان نسبت به تنش خشکی می‌شود. باکتری‌های حل کننده فسفر علاوه بر افزایش جذب فسفر در گیاه زراعی ذرت توانستند رشد گیاه را بهبود بخشیده و باعث افزایش تحمل ذرت در برابر تنش خشکی شوند (Ehteshami *et al.*, 2009). Vardharajula و همکاران (۲۰۱۱) نیز نشان دادند باکتری‌های PGPR باعث القای تحمل به تنش خشکی در گیاه ذرت می‌شوند. Kasim و همکاران (۲۰۱۳) در تحقیقی به‌منظور کنترل تنش خشکی در گندم با استفاده از باکتری‌های محرک رشد دریافتند که تلقیح باکتریایی به‌طور قابل ملاحظه‌ای میزان آسیب

[1] Induced systemic tolerance, ISR.
[2] Transcriptional level.
[3] Drought-responsive gene.

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from cpj.iauahvaz.ac.ir at 16:36 +0430 on Saturday May 20th 2017

حاصل از تنش خشکی را در گیاه گندم کاهش داد. آن‌ها نیز اشاره داشتند که باکتری‌های محرک رشد از طریق سازوکارهای متعددی چه به‌صورت مستقیم و غیر مستقیم باعث افزایش تحمل گیاه گندم در برابر تنش خشکی می‌شوند. آن‌ها نیز بیان داشتند که مکانیزم‌های القاء بیان ژن‌های مسئول تنش خشکی نظیر (SAMS1،APX1 و HSP17.8) در برگ‌های گندم باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های چرخه آسکوربیت-گلوتاتیون ریداکس[۴] می شود (Kasim *et al.*, 2013).

باکتری‌های PGPR و قارچ‌های مایکوریزا پتانسیل بالا و خوبی جهت تعدیل و تنظیم پاسخ‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه در برابر تنش خشکی داشته و به همین خاطر باعث افزایش بقای گیاه تحت شرایط سخت و متنوع محیطی می‌شوند (Marasco *et al.*, 2012 ;Redman *et al.*, 2011). باکتری‌های PGPR با تولید بیوفیلم[۵] و ترشح اگزوپلی ساکاریدها[۶] و نیز تحریک گیاه به تولید حفاظت کننده‌های اسمزی[۷] و پروتئین‌های شوک گرمایی[۸] اثر مثبتی بر سازگاری و تحمل گیاه به تنش خشکی دارند (Grover *et al.*, 2010). اگزوپلی ساکاریدها (EPS) تولید شده توسط ریزجانداران، جزء فعال ماده آلی خاک را تشکیل داده (Verma *et al.*, 2016) و بخش عمده‌ای از فضای خارج سلولی جرم باکتری (دامنه ای بین ۴۰ تا ۹۵ درصد) را در بر می‌گیرند (Wingender and Flemming, 2001). EPS ها وظایف حیاتی در حفاظت نظیر جذب سطحی[۹]، تشکیل بیوفیلم، تشکیل اجتماع میکروبی، افزایش تعامل بین گیاه و ریزجاندارن و زیست پالایی[۱۰] ایفاء می‌کنند (Verma *et al.*, 2016). اگزوپلی ساکاریدها تولید شده توسط باکتری‌های محرک رشد گیاه نظیر آزوسپریلوم (*Azospirillum*) با بهبود ساختمان و ذرات خاک، باعث تحمل بهتر گیاه به تنش خشکی می شود (Verma *et al.*, 2016). برخی از نژادهای باکتری‌های PGPR با رهاسازی ترکیبات آلی فرار (VOCs) [۱۱] به‌صورت مستقیم یا غیر مستقیم باعث افزایش زیست توده، بالا رفتن تحمل گیاه در برابر تنش‌های غیرزیستی و مقاومت در برابر بیماری‌ها می‌شوند (Liu and Zhang, 2015). برخی نژادهای PGPR نظیر *Pseudomonas aeruginosa* سویه Pa2 با تولید اگزوپلی ساکریدها، توانایی باکتری‌ها را جهت حفظ محتوی رطوبت خاک و افزایش تحمل گیاه در برابر تنش خشکی، افزایش می‌دهند (Naseem and Bano, 2014). بعضی ترکیبات آلی فرار باکتریایی[۱۲] نظیر استیک اسید که جزء اصلی اگزوپلی ساکریدها می‌باشد قادر به القاء تشکیل بیوفیلم در خاک هستند (Chen *et al.*, 2015). بنابراین این امکان وجود

[4] Ascorbate–glutathione redox cycle.
[5] Biofilm.
[6] Exopolysaccharides.
[7] Osmoprotectors.
[8] Heat shock proteins.
[9] Surface attachment.
[10] Bioremediation.
[11] Volatile Organic Compounds, VOCs.
[12] Bacterial VOCs.

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from cpj.iauahvaz.ac.ir at 16:36 +0430 on Saturday May 20th 2017

دارد که برخی باکتری‌های PGPR حاوی VOCs با تولید اگزوپلی ساکریدها، تحمل گیاه را در برابر تنش خشکی افزایش دهند (Liu and Zhang, 2015). تنش خشکی اثر فیزیولوژیکی و بیولوژیکی متنوعی را در گیاه ایجاد کرده و می‌تواند منجر به ممانعت از فرآیندهای بیوشیمیایی مهمی نظیر فتوسنتز، تنفس و اسیمیلاسیون عناصر غذایی گیاهی شود. برخی گیاهان بر اثر آسیب‌های ناشی از تنش‌های محیطی نظیر خشکی، شوری و غیره، تنش اکسیداتیو[۱۳] را تحریک می‌کنند که این منجر به تولید و انباشته شدن گونه‌های اکسیژن واکنش‌گر[۱۴] (ROS) نظیر رادیکال‌های سوپراکسید ($\dot{O}_2^-$)، رادیکال‌های هیدروکسیل ($\dot{O}H$)، اکسیژن یکتایی ($\dot{O}$) و پراکسید هیدروژن (H_2O_2)، می‌شود (Price and Henry, 1989; Smirnoff, 1993). گونه‌های فعال اکسیژن[۱۵] (AOS) که در طی تنش تولید می‌شوند قادرند ترکیبات آلی سلولی نظیر کربوهیدرات‌ها، لیپیدها، پروتین‌ها و اسیدهای نوکلئیک (نظیر DNA) را تخریب کنند. بیومارکرهای بیوشیمیایی مالون‌دی‌آلدهید[۱۶] (MDA)، دی‌تیروزین[۱۷] (D-T) و دی‌هیدروکسی‌دی‌اکسی‌گوآنوزین[۱۸] (8-2-OH-dG) به‌ترتیب حاصل تجزیه لیپید، پروتئین و اسیدهای نوکلئیک ناشی از تنش اکسیداتیو در گیاه هستند. هرچه میزان این نشانگرهای زیستی[۱۹] در گیاه افزایش یابد نشان دهنده بالا بودن اثر تخریبی ناشی از تنش است (Chen *et al.*, 2000). گیاهان برای مقابله با هجوم این گونه‌های فعال اکسیژن (AOS)، دارای سیستم دفاع آنتی اکسیدانتی از نوع آنزیمی هستند (Larson, 1988، Price and Henry, 1989، Smirnoff, 1993). آنزیم‌های آنتی اکسیدانتی نظیر آنزیم سوپراکسید دیسموتاز[۲۰] (SOD)، کاتالاز[۲۱] (CAT)، گلوتاتیون پراکسیداز[۲۲] (GPX)، پروکسیداز[۲۳] (POX)، گلوتاتیون ردکتاز[۲۴] (GR)، آسکوربیک پروکسیداز (APX) و گلوتاتیون S-ترانسفراز (GST) قادرند سلول‌های گیاهی را در برابر دامنه وسیعی از تنش‌های زنده و غیر زنده محافظت کرده و رادیکال‌های اکسیژن فعال (AOS) حاصل از این تنش را در گیاه طی واکنش‌های اکسیداسیون و احیاء از بین برده یا به اصطلاح جاروب[۲۵] کرده و آنها را به مولکول های آب (H_2O) و اکسیژن (O_2) احیاء کنند (Gill and Tuteja, 2010; Agarwal and Pandey, 2004). در شرایط تنش خشکی میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانتی SOD، POD، CAT و APX جهت مقابله با گونه‌های اکسیژن فعال (AOS) افزایش می‌یابد (Cakmakci *et*

13 Oxidative stress.
14 Reactive Oxygen Species.
15 Active Oxygen Species.
16 Malondialdehyde.
17 8-hydroxy-2-deoxyguaosine (8-2-OH-DG).
18 Oxygen Species.
19 Phytoindicators.
20 Superoxide dismutase.
21 Catalase.
22 Glutathion proxidase.
23 Proxidase.
24 Glutathion redoctase.
25 Scavenging.

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from cpj.iauahvaz.ac.ir at 16:36 +0430 on Saturday May 20th 2017

مقدار بیومارکر مالون‌دی‌آلدهید (MDA) و پرواکسید هیدروژن (Patel and Hemantaranjan, 2012 ;2009 ,*al.*) (H_2O_2) به‌عنوان نشان‌گرهای فیزیولوژیکی گیاه در برابر تنش به‌کار رفته و سطوح بالای هردوی آن‌ها در شرایط تنش خشکی شدید، نشان دهنده ایجاد تنش اکسیداتیو می‌باشد (Erdogan *et al.*, 2016). میزان فعالیت آنزیم‌های اکسیدانتی نظیر SOD، POD و CAT و مقدار بیومارکر MDA نشانگرهای گیاهی مفید جهت ارزیابی درجه تحمل گیاهان زراعی در برابر تنش خشکی می‌باشد (Zhang *et al.*, 2011). PGPR های القاء کننده تحمل به تنش خشکی نیز می توانند از طریق بالابردن پاسخ‌های آنتی‌اکسیدانی در سطح فعالیت آنزیمی و افزایش تجمع متابولیت‌ها باعث افزایش تحمل گیاه گندم به تنش خشکی شوند (Chakraborty *et al.*, 2013). Erdogan و همکاران (۲۰۱۶) نتیجه گرفتند که بوته های تلقیح شده با باکتری‌های محرک رشد گیاه از فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانتی (SOD، CAT، GR، POD و APX) بالاتری برخوردار بودند و در مقابل میزان بیومارکر مالون‌دی‌آلدهید (MDA) و پراکسید هیدروژن (H_2O_2) آنها پایین بود. Islam و همکاران (۲۰۱۶) با بررسی اثر باکتری‌های محرک رشد گیاه بر تحمل گیاه ماش به تنش شوری از طریق تنظیم دفاع آنتی اکسیدانتی نتیجه گرفتند که تحت شرایط تنش، بوته‌های تلقیح شده با باکتری‌های PGPR در مقایسه با بوته‌های تلقیح نشده از میزان کلروفیل، مقدار فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی SOD، POD و CAT بالاتر و مقدار بیومارکر MDA و پرواکسید هیدروژن (H_2O_2) کم‌تری برخوردار بود. Islam و همکاران (۲۰۱۵) نیز نتایج مشابهی در ارتباط با اثر گونه *Pseudomonas aeruginosa* روی تحمل گیاه گندم در برابر تنش اکسیداتیو ناشی از تنش فلز روی را گزارش کردند. مشاهده شده است که بالا بودن میزان تجمع پرولین و بیان ژن آنزیم‌های جاروب کننده گونه‌های اکسیژن واکنش‌گر[۲۶] در بوته‌های تیمارشده با باکتری‌های PGPR نقش مهمی در بالابردن تحمل آن‌ها نسبت به تنش‌های مختلف از جمله خشکی، شوری و سمیت فلزات سنگین ایفاء می‌کند (Gururani *et al.*, 2013). با توجه به مباحث بالا در این پژوهش سعی شد اثر باکتری‌های محرک رشد گیاه بر فعالیت آنزیم آنتی اکسیدانتی سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، فعالیت بیومارکر بیوشیمیایی مالون‌دی‌آلدهید (MDA) میزان کلروفیل a، b و a+b در دو رقم گندم نان تحت شرایط تنش خشکی و نرمال مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش ها

این تحقیق به‌منظور بررسی بیومولکولی تحمل به تنش خشکی دو رقم گندم تلقیح شده با رایزوباکتری‌های محرک رشد گیاه (PGPR) در سال زراعی ۹۳-۱۳۹۲ در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج اجرا شد. آزمایش به

[26]Gene expression of ROS-scavenging enzymes.

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from cpj.iauahvaz.ac.ir at 16:36 +0430 on Saturday May 20th 2017

صورت اسپلیت فاکتوریل (جهت مدیریت بهتر و دقیق‌تر آبیاری از این طرح آماری استفاده شد) در قالب طرح پایه بلوک های کامل تصادفی در سه تکرار اجرا شد. کرت اصلی شامل دو سطح آبیاری کامل و تنش خشکی (کم آبیاری در مرحله گل‌دهی تا پایان رشد گیاه) بودند و در کرت‌های فرعی، چهار سطح باکتری PGPR (عدم مصرف باکتری (شاهد)، مصرف تکی ازتوباکتر کروکوکوم (سویه ۱۲)[۲۷]، مصرف تکی باکتری آزوسپریلوم لیپوفروم (سویه of)[۲۸]، مصرف هردوی این باکتری‌ها به عنوان فاکتور اول و دو رقم گندم نان مرودشت (به‌عنوان رقم حساس) و رقم سیروان (به‌عنوان رقم متحمل) به عنوان فاکتور دوم در نظر گرفته شد. در این پژوهش صفات مورد مطالعه شامل فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانتی سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، فعالیت بیومارکر بیوشیمیایی مالون‌دی‌آلدهید (MDA) میزان کلروفیل a، b و a+b بودند. خاک مورد مطالعه را از الک دو میلی‌متری عبور داده و یک نمونه از آن را برای تجزیه به آزمایشگاه خاک فرستاده شد. بستر کاشت شامل گلدان‌های پلاستیکی با ارتفاع ۴۰ و قطر ۲۰ سانتی‌متر که حاوی هشت کیلوگرم خاک خشک لومی رسی، کود حیوانی پوسیده و شن به ترتیب با نسبت ۱:۱:۲ بودند. کودهای شیمیایی فسفره و پتاسه و۱/۳ کود نیتروژن پیش کاشتی مورد نیاز را براساس آزمون خاک (جدول ۱) قبل ازکاشت با خاک گلدان‌ها مخلوط کرده و سپس بذرها براساس نوع تیمار به تعداد ۳۰ بذر در هر گلدان کشت شدند.

جدول ۱: مشخصات شیمیایی و فیزیکی خاک محل آزمایش (عمق نمونه برداری ۳۰-۰ سانتی متری خاک)

اسیدیته (pH)	شوری (EC) (Ds/m)	بافت خاک	شن (%)	رس (%)	لای (%)	مواد آلی (%)	فسفر قابل جذب (ppm)	پتاس قابل جذب (ppm)	نیتروژن کل (%)
۷/۰۴	۱/۲	لوم رسی شنی	۵۶	۲۴	۲۰	۰/۶	۱۱	۳۲۰/۲۳	۰/۰۸

پس از اطمینان از سبز شدن بوته‌های موجود در هر گلدان، عملیات تنک کردن صورت گرفت و تراکم نهایی به ۱۰ عدد بوته در هر گلدان رسید. کود سرک ازته در دو مرحله پنجه زنی و ساقه رفتن به خاک گلدان‌ها اضافه شد. عملیات آبیاری در هر دو تیمار آبیاری کامل و تنش خشکی تا مرحله گرده‌افشانی و باروری (مقیاس زادوکس GS69) با توجه به مراحل رشد، وضعیت ظاهری گیاه و رطوبت موجود در خاک شبیه هم بود. اما در تیمار تنش خشکی، آبیاری پس از مرحله GS69 تا پایان دوره رشد گیاه و رسیدگی کامل دانه به‌صورت کم‌آبیاری (حجم آب آبیاری در این تیمار بر اساس ۳۰ درصد از کل آب مورد نیاز جهت آبیاری کامل معین شد) اعمال شد. مبارزه با علف‌های هرز نیز به‌صورت مکانیکی (وجین دستی) به‌صورت هم‌زمان و یک‌نواخت انجام گرفت. سویه‌های باکتری‌ها به‌صورت خالص (فرموله شده در موسسه تحقیقات خاک و آب کرج) قبل از کاشت با بذور گندم تلقیح شد و بلافاصله پس از کاشت، آبیاری صورت گرفت. جهت سنجش

[27] *Azotobacter chroococcum* strain 12.
[28] *Azospirillum lipoferum* strain of.

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from cpj.iauahvaz.ac.ir at 16:36 +0430 on Saturday May 20th 2017

صفات آزمایشی، در مرحله شیری-خمیری دانه از هر گلدان چند نمونه برگ سبز (ترجیحا برگ پرچم) انتخاب و پس از قرار گرفتن در مخازن ازت مایع و فریز شدن جهت اندازه‌گیری صفات بیومولکولی به آزمایشگاه منتقل شدند. سنجش فعالیت SOD براساس روش Minami و Yoshikawa (۱۹۷۹) انجام گردید. محلول واکنش شامل بافر تریس با غلظت ۵۰ میلی‌مول (mM) با pH= ۸/۲ به همراه ۰/۱ میلی‌مول (mM) از EDTA، مقدار ۱/۴۲ درصد از Triton X-100 و ۰/۰۵ میلی‌مول (mM) از نیترو بلو تترازولیم و پیرگالول با غلظت ۱۶ میلی‌مول (mM) بود که به دو میلی‌لیتر (mL) از آین محلول برای انجام واکنش ۱۰۰ میکرولیتر (µL) عصاره بافت گیاه اضافه شد و در دمای آزمایشگاه بعد از یک دقیقه تغییر جذب نوری ان در ۵۲۰ نانومتر (nm) با اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. بر اساس منحنی استاندارد، مقدار فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) مشخص گردید. بیومارکر مالون‌دی‌آلدئید (MDA) با روش Ohkawa و همکاران (۱۹۷۹) ارزیابی شد. جهت اندازه‌گیری مالون‌دی‌آلدئید دو برگ از گیاه استخراج و با آب مقطر شستشو داده شد، سپس ۰/۲ گرم بافت گیاهی (برگ یا ریشه)، به قطعات کوچک تقسیم و با هموژنایزر در دو میلی‌لیتر محلول تری کلرو استیک اسید پنج درصد در مجاورت یخ هموژن گردید. سپس در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ و محلول روئی برداشت شد. ۰/۵ میلی‌لیتر از این محلول با ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول تیوباربیتوریک اسید و تری‌کلرواستیک ۲۰ درصد مخلوط و در ۹۶ درجه سانتی گراد به‌مدت ۲۵ دقیقه خوابانده (انکوبه) شد. سپس در شرایط سرد در ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه به‌مدت پنج دقیقه سانتریفوژ گردید. جذب محلول روئی در ۵۳۲ نانومتر اندازه‌گیری شد. از محلول تیوباربیتوریک اسید و تری‌کلرواستیک ۲۰ درصد به‌عنوان شاهد استفاده شد. مقدار بیومارکر مالون دی آلدئید (MDA) با استفاده از منحنی استاندارد تعیین گردید.

جهت اندازه‌گیری کلروفیل a و b ابتدا ۰/۲ گرم برگ (ترجیحا برگ پرچم) از هر گلدان انتخاب و درون یک هاون چینی ریخته و به آن یک گرم سولفات منیزیم و ۱۰ میلی لیتر استون ۱۰۰ درصد اضافه گردید و آنقدر در هاون سایئده شد تا خمیری شل حاصل گردید. هاون مربوطه را در داخل ظرف آب و یخ قرار گرفت. ضمنا آزمایشگاه حتی‌الامکان باید تاریک باشد تا فعل و انفعالات شیمیایی به حداقل برسد. سپس خمیر شل حاصله را برداشته و در داخل سانتریفوژ با ۲۵۰۰ دور در دقیقه و به مدت پنج دقیقه قرار داده و سانتریفیوژ گردید، سپس مقدار یک سی‌سی از این عصاره هموژن (سوپرناتانت) را با نه میلی‌لیتر استن داخل سل‌های دستگاه اسپکتروفتومتر ریخته و در طول موج‌های ۶۴۷ نانومتر (nm) برای کلروفیل a و ۶۶۳ نانومتر (nm) برای کلروفیل b میزان جذب نور قرائت شد و از فرمول‌های زیر مقدار کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل a+b به‌دست آمد، ضمنا دستگاه قبل از آزمایش با استون خالص کالیبره گردید (Porra *et al.*, 1989; Zhang, 1990).

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from cpj.iauahvaz.ac.ir at 16:36 +0430 on Saturday May 20th 2017

رابطه ۱: $\text{Chl a (mg/L)} = (12.25 \times A_{663}) - (2.79 \times A_{647})$

رابطه ۲: $\text{Chl b (mg/L)} = (21.5 \times A_{647}) - (5.1 \times A_{663})$

رابطه ۳: $\text{Chl a+b (mg/L)} = (7.15 \times A_{663}) - (18.71 \times A_{647})$

کلیه محاسبه‌های آماری و تجزیه واریانس با استفاده از نرم افزار SAS نسخه ۱۶، و همچنین مقایسه میانگین‌ها به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد انجام گرفت. تمامی نمودارها و جداول به‌ترتیب از طریق نرم افزارهای Excel و Word نسخه ۲۰۱۰ ترسیم شدند.

نتایج و بحث

با توجه به نتایج جدول ۲، اثر ساده تیمارهای آبیاری، رقم، و باکتری‌های PGPR بر فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز معنی دار ($P\leq$۰/۰۱) شد. بر اساس جدول ۳، فعالیت آنزیم SOD در تیمار تنش خشکی (۴/۲۳۹ واحد بر گرم پروتئین) بیش‌تر از تیمار آبیاری کامل (۲/۰۸۶ واحد بر گرم پروتئین) بود (شکل ۱). این مسئله نشان دهنده افزایش میزان گونه‌های فعال اکسیژن (AOS) تحت شرایط تنش خشکی و فعال شدن سیستم دفاع آنتی اکسیدانتی جهت از بین بردن آن‌ها است (مشهدی اکبر بوجار، ۱۳۹۰). بر اساس جدول ۳، رقم سیروان با ۳/۵۹۵ واحد بر گرم پروتئین نسبت به رقم مرودشت با ۲/۷۳ واحد بر گرم پروتئین از نظر مقدار فعالیت آنزیم SOD برتر بود (شکل ۲). بالاتر بودن فعالیت آنزیم SOD رقم سیروان نسبت به رقم مرودشت نشان‌گر توان دفاع آنتی اکسیدانتی آنزیمی بالای این رقم در برابر تنش اکسیداتیو ناشی از تنش خشکی می‌باشد. بر اساس نتایج جدول ۳، تیمار مصرف توام و عدم مصرف باکتری‌های PGPR به ترتیب با ۴/۱۱ و ۲/۳ واحد بر گرم پروتئین بالاترین و پایین‌ترین میزان فعالیت آنزیم SOD را به خود اختصاص دادند و تیمارهای مصرف تکی ازوتوباکتر و آزوسپیریلوم هردو در یک گروه آماری مشترک (b) قرار گرفتند (شکل ۵). به‌طورکلی نتایج آزمایش نشان داد که مصرف باکتری‌های PGPR به‌ویژه مصرف توام آن‌ها در مقایسه با تیمار عدم مصرف باکتری‌های PGPR باعث شد تا میزان فعالیت آنزیم SOD گیاه گندم افزایش یابد که این بیان‌گر اثرات مثبت باکتری‌های PGPR در افزایش میزان تحمل گیاهان زراعی در برابر تنش‌های محیطی به‌ویژه تنش خشکی است. با توجه به نتایج جدول ۲، برهمکنش دوگانه باکتری و آبیاری بر میزان فعالیت آنزیم SOD معنی دار ($P\leq$۰/۰۱) تشخیص داده شد. در شرایط تنش خشکی مصرف توام باکتری‌های PGPR و عدم مصرف باکتری (شاهد) به‌ترتیب با ۵/۷۳۷ و ۲/۸۰۷ (واحد بر گرم پروتئین) بالاترین و پایین‌ترین میزان فعالیت آنزیم SOD را به خود اختصاص دادند (جدول ۳). به‌طور کلی هم در شرایط نرمال و هم تنش خشکی مصرف باکتری‌های PGPR باعث ارتقای میزان فعالیت آنزیم SOD شد. بالا بودن میزان فعالیت آنزیم SOD در

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from cpj.iauahvaz.ac.ir at 16:36 +0430 on Saturday May 20th 2017

تیمار مصرف توام باکتری بیان‌گر اثر سینرژیستی (هم‌افزایی) بین آن‌ها است. این باکتری‌ها از سازوکارهای مختلف جهت بهبود رشد و افزایش تحمل گیاه نسبت به شرایط تنش خشکی استفاده می کنند.

جدول ۲: نتایج تجزیه واریانس صفات آزمایش در تیمارهای مورد مطالعه

منابع تغییرات (SOV)	درجه آزادی (df)	میانگین مربعات				
		سوپراکسید دیسموتاز (SOD)	مالون دی آلدهید (MDA)	کلروفیل (a)	کلروفیل (b)	کلروفیل (a+b)
تکرار	۲	۰/۲۶۸ ns	۳۶/۰۷۱ ns	۰/۴۶۳ ns	۰/۰۱۸ ns	۰/۷۷۶ ns
آبیاری	۱	۵۵/۶۲۵**	۶۴۶/۲۸۷**	۱۹/۳۱۷**	۳/۷۸۶**	۳۸/۸۰۸**
اشتباه (a)	۲	۰/۰۵۰	۶۰/۷۳۶	۰/۶۹۴	۰/۱۵۴	۱/۵۹۸
رقم	۱	۸/۹۸۴**	۲۲۴/۷۷۰*	۳/۰۹۶**	۰/۷۳۵*	۷/۲۸۵**
آبیاری× رقم	۱	۰/۱۰۶ ns	۳۶/۱۴۰ ns	۰/۰۳۹ ns	۰/۰۱۶ ns	۰/۱۶۸ ns
باکتری	۳	۶/۷۹۴**	۳۰۹/۷۰۹**	۴/۳۱۶**	۰/۷۹۹**	۹/۴۳۷**
آبیاری× باکتری	۳	۲/۵۶۲**	۱۱۹/۶۵۳*	۰/۰۶۳ ns	۰/۰۶۹ ns	۰/۳۳۶ ns
رقم× باکتری	۳	۰/۳۳۱ ns	۲۳/۳۲۰ ns	۰/۱۳۵ ns	۰/۰۳۳ ns	۰/۲۳۵ ns
آبیاری× رقم× باکتری	۳	۰/۰۴۵ ns	۲/۴۵۷ ns	۰/۰۲۴ ns	۰/۰۲۹ ns	۰/۰۵۹ ns
اشتباه	۲۴	۰/۳۴۳	۳۵/۷۸۷	۰/۳۵۷	۰/۰۹۳	۰/۶۶۸
ضریب تغییرات (درصد)	-	۷	۲۰/۲۲	۱۹/۹۰	۸/۷۰	۱۸/۴۸

ns، * و**: به‌ترتیب بیان‌گر عدم اختلاف معنی‌دار و اختلاف معنی‌دار در سطح پنج و یک درصد هستند.

جدول ۳: مقایسه میانگین صفات آزمایش در سطوح مختلف تیمارهای مورد مطالعه

تیمارهای آزمایشی		سوپراکسید دیسموتاز (SOD) (U/g.protein)	مالون دی آلدهید (MDA) (µg/g.Fw)	کلروفیل a (mg/g.Fw)	کلروفیل b (mg/g.Fw)	کلروفیل a+b (mg/g.Fw)
آبیاری	نرمال	۲/۰۸۶ b	۲۵/۹۱۹ b	۳/۶۳۵ a	۱/۷۳۵ a	۵/۳۲۰ a
	تنش	۴/۲۳۹ a	۳۳/۲۵۷ a	۲/۳۶۷ b	۱/۱۷۳ b	۳/۵۲۲ b
رقم	مرودشت	۲/۷۳۰ b	۳۱/۷۵۲ a	۲/۷۴۷ b	۱/۳۳۰ b	۴/۰۳۲ b
	سیروان	۳/۵۹۵ a	۲۷/۴۲۴ b	۳/۲۵۵ a	۱/۵۷۸ a	۴/۸۱۱ a
باکتری	عدم مصرف	۲/۳۰۰ c	۳۵/۹۴۵ a	۲/۳۸۳ c	۱/۱۶۴ c	۳/۴۸۰ c
	مصرف ازوتوباکتر	۳/۲۹۵ b	۲۹/۵۸۱ b	۲/۹۴۱ b	۱/۴۷۰ b	۴/۴۱۹ b
	مصرف آزوسپیریلوم	۲/۹۴۷ b	۲۹/۳۱۷ b	۲/۸۵۸ bc	۱/۳۹۳ bc	۴/۱۷۶ b
	مصرف توام	۴/۱۰۶ a	۲۳/۵۱۰ c	۳/۸۲۲ a	۱/۷۸۸ a	۵/۶۱۰ a

در هر ستون، میانگین‌هایی که حروف غیر مشترک دارند، دارای اختلاف معنی‌دار به روش دانکن در سطح احتمال خطای پنج درصد هستند.

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from cpj.iauahvaz.ac.ir at 16:36 +0430 on Saturday May 20th 2017

نتایج آزمایشات نشان داده که میزان فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانتی سوپراکسیددیسموتاز SOD و میزان بیومارکر بیوشیمیایی مالون دی آلدهید (MDA) در تیمار تنش خشکی بیشتر از تیمار آبیاری نرمال (آبیاری کامل) بوده که این نشان‌دهنده بالا رفتن مقدار گونه‌های فعال اکسیژن (AOS) در گیاه در شرایط تنش خشکی می باشد (مشهدی اکبر بوجار، ۱۳۹۰، Mozafari, 2014; Jaleel *et al.*, 2007a). آنزیم آنتی‌اکسیدانتی سوپراکسید دیسموتاز SOD یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی است که با شناسایی رادیکال سوپراکسید ($O_2^{\cdot-}$) آنرا به مولکول‌های آب (H_2O) و اکسیژن (O_2) تجزیه می کند.

آزمایشات متعدد در گونه‌های مختلف گیاهان در گلخانه و مزرعه وجود افزایش قابل توجهی در فعالیت این آنزیم‌ها را در مقابله با تنش خشکی تایید کرده است. در صورتی‌که این دفاع موفق به از بین بردن رادیکال‌ها نشود، تخریب‌های اکسیداتیو توسعه پیدا کرده و محصولات تخریبی شامل مالون دی آلدهید (MDA) (حاصل تخریب لیپیدها) و دی هیدروکسی‌دی‌اکسی‌گوانوزین (8-2-OH-DG) (حاصل تخریب اسیدهای نوکلئیک) و دی تیروزین (D-T) (حاصل تخریب پروتئین‌ها) افزایش می یابند (مشهدی اکبر بوجار، ۱۳۹۰). افزایش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز (SOD) در بررسی‌های Diaz و همکارن (۲۰۰۵) بروی گیاه لوتوس ژاپنی و بررسی های Jaleel و همکاران (۲۰۰۷b) که اثرات خشکی بروی گیاه *Aatharanthus roseus* را مورد بررسی قرار داده اند نیز گزارش شده است. در تحقیق ما، باکتری‌های بهبود دهنده رشد گیاه (PGPR) به‌ویژه تیمار مصرف توام با تقویت سیستم دفاع آنزیم آنتی‌اکسیدانتی و افزایش کلروفیل باعث افزایش تحمل ارقام گندم نسبت به شرایط تنش خشکی شدند. Mozafari (۲۰۱۴) در مطالعه‌ای با عنوان تاثیر باکتری‌های PGPRبر فعالیت آنزیم SOD، بیومارکر MDA و پرولین در دو رقم گندم تحت شرایط تنش خشکی نتیجه گرفتند که تنش خشکی با افزایش ROS باعث افزایش میزان فعالیت آنزیم SOD در مقایسه با تیمار آبیاری کامل (نرمال) شد.

مصرف باکتری‌های PGPR به ویژه مصرف توام آن‌ها (*Azotobacter+Azospirillum+Pseudomonas*) باعث افزایش فعالیت آنزیم آنتی اکسیدانتی SOD و کاهش میزان بیومارکر بیوشیمیایی MDA در ارقام گندم شد.

بر اساس جدول ۳، میزان بیومارکر بیوشیمیایی مالون دی آلدهید (MDA) تیمار تنش خشکی (۳۳/۲۵۷ میکروگرم بر گرم وزن تازه بافت) بیش‌تر از تیمار آبیاری کامل (۲۵/۹۱۹ میکروگرم بر گرم وزن تازه بافت) بود (شکل ۳). این مسئله نشان‌دهنده افزایش میزان گونه‌های فعال اکسیژن (AOS) تحت شرایط تنش خشکی و تخریب غشاءهای زیستی در اثر هجوم گونه‌های اکسیژن واکنش‌گر (ROS) می‌باشد (مشهدی اکبر بوجار، ۱۳۹۰). به عبارت دیگر در شرایط تنش خشکی میزان تولید ROS بالا رفته و این اکسیژن‌های سمی باعث پراکسیده شدن فسفولیپیدهای موجود در غشاء سیتوپلاسمی شده و نهایتا میزان مالون‌دی‌آلدهید (MDA) که حاصل تخریب چربی‌ها است، افزایش می یابد. براساس جدول ۲، عامل

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from cpj.iauahvaz.ac.ir at 16:36 +0430 on Saturday May 20th 2017

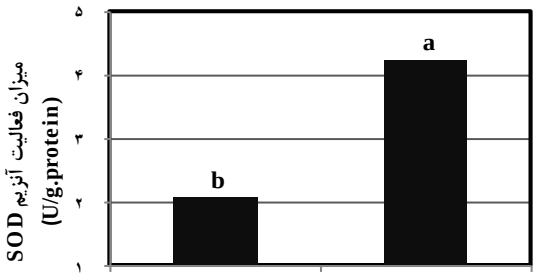
رقم اثر معنی داری ($P\leq ۰/۰۵$) بر میزان بیومارکر MDA گذاشت. با توجه به جدول ۳، رقم سیروان میزان بیومارکر MDA (با ۲۷/۴۲۴ میکروگرم بر گرم وزن تازه بافت) کمتری را در مقایسه با رقم مرودشت (با ۳۱/۷۵۲ میکروگرم بر گرم وزن تازه بافت) به‌خود اختصاص داد (شکل ۴). پایین بودن مقدار بیومارکر MDA در رقم سیروان نسبت به رقم مرودشت نشان-دهنده توان دفاع آنتی‌اکسیدانتی آنزیمی بالای این رقم در برابر تنش اکسیداتیو و کاهش میزان تخریب اکسیداتیو غشاءهای زیستی در بود. بنابراین می توان نتیجه گرفت که رقم سیروان در مقایسه با رقم مرودشت از میزان تحمل بالایی در برابر تنش خشکی برخوردار است. همچنین نتایج آزمایش نشان داد که تیمار مصرف توام باکتری‌های PGPR و تیمار عدم مصرف باکتری (شاهد) به ترتیب با ۲۳/۵۱۰ و ۳۵/۹۴۵ (میکروگرم بر گرم وزن تازه بافت) کم‌ترین و بیش‌ترین میزان بیومارکر MDA را به خود اختصاص دادند و تیمارهای مصرف تکی ازوتوباکتر و آزوسپیریلوم در یک گروه آماری مشترک (b) قرار گرفتند (جدول ۳ و شکل ۶). به‌طورکلی در شرایط تنش خشکی، مصرف منفرد و توام باکتری‌های PGPR باعث شد تا میزان بیومارکر MDA گیاه گندم در مقایسه با تیمار عدم مصرف باکتری (شاهد) کاهش بیشتری یابد که این بیانگر اثر مثبت باکتری‌های PGPR در افزایش میزان تحمل گیاهان زراعی در برابر تنش‌های محیطی به‌ویژه تنش خشکی است. برهمکنش دوگانه باکتری و آبیاری بر میزان بیومارکر MDA معنی دار ($P\leq ۰/۰۵$) بود (جدول ۲). در شرایط تنش خشکی، مصرف توام باکتری و عدم مصرف باکتری (شاهد) به‌ترتیب با ۲۵/۴۵۳ و ۴۴/۳۴۸ (میکروگرم بر گرم وزن تازه بافت) پایین‌ترین و بالاترین میزان بیومارکر MDA را به خود اختصاص دادند. به‌طور کلی هم در شرایط نرمال و هم تنش خشکی مصرف باکتری‌های PGPR باعث کاهش میزان بیومارکر MDA شد. پایین بودن میزان بیومارکر MDA در تیمار مصرف توام باکتری به‌دلیل استفاده این باکتری‌ها از سازوکارهای مختلف جهت بهبود رشد و تحمل گیاه در شرایط تنش خشکی می باشد. بسیاری از محققان به این نتیجه رسیدند که تحت شرایط تنش‌های محیطی نظیر تنش خشکی، شوری، گرما، فلزات سنگین میزان گونه‌های فعال اکسیژن (AOS) یا گونه‌های اکسیژن واکنش‌گر (ROS) در گیاه افزایش یافته و نهایتا این گونه‌های سمی اکسیژن در گیاه باعث ایجاد تنش اکسیداتیو می‌شود (مشهدی اکبر بوجار، ۱۳۹۰، مظفری و همکاران، ۱۳۹۴، Mozafari, 2012). ROSها با تخریب لیپیدها، پروتئین ها، اسیدهای نوکلوئیک (DNA)، کلروفیل و دیگر ترکیبات آلی در گیاه، باعث کاهش رشد و قدرت محصول‌دهی گیاه می‌شوند (Mozafari *et al.*, 2015). گونه‌های اکسیژن واکنش‌گر (ROS) با پراکسیداسیون لیپیدهای غشاءهای سلولی باعث شکسته شدن پیوندهای بین مولکول گلیسرول و اسیدهای چرب شده که به دنبال آن بیومارکر مالون‌دی‌آلدهید (MDA) تولید می شود که هر چه میزان آن در گیاه افزایش یابد نشان‌دهنده شدت آسیب تنش ها از جمله تنش خشکی است. جهت مقابله با ROSها و تنش اکسیداتیو

Archive of SID

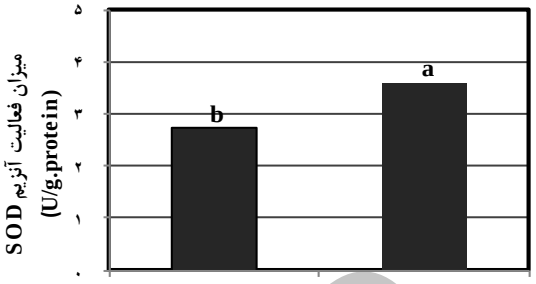
www.SID.ir

ناشی از تنش خشکی گیاه با استفاده از سیستم دفاع آنزیمی باعث جاروب کردن گونه های فعال اکسیژن (AOS) می شوند.

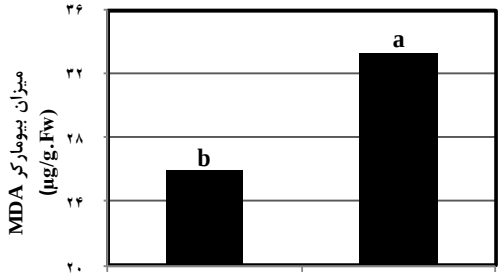
Downloaded from cpj.iauahvaz.ac.ir at 16:36 +0430 on Saturday May 20th 2017



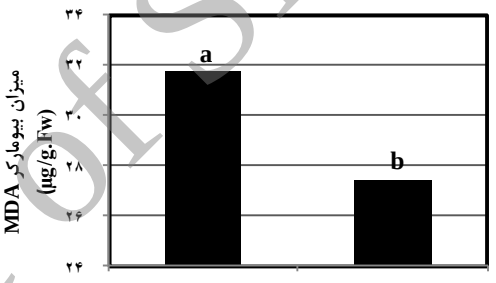
شکل ۱: اثر آبیاری بر میزان فعالیت آنزیم SOD



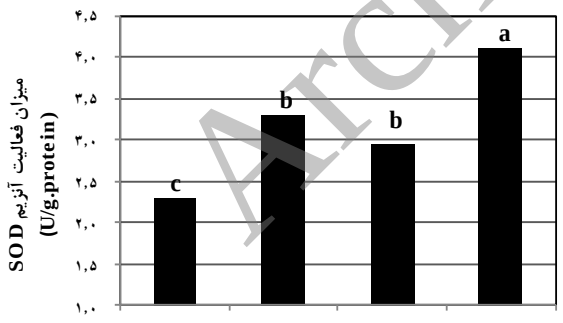
شکل ۲: اثر رقم بر میزان فعالیت آنزیم SOD



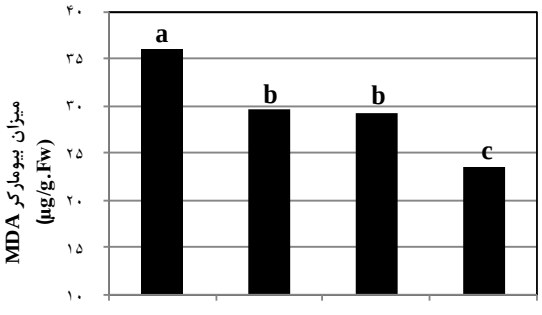
شکل ۳: اثر آبیاری بر بیومارکر MDA



شکل ۴: اثر رقم بر بیومارکر MDA



شکل ۵: اثر باکتری بر میزان فعالیت آنزیم SOD



شکل ۶: اثر باکتری بر میزان بیومارکر MDA

بر اساس جدول ۲، اثر اصلی آبیاری، ارقام گندم و باکتری بر روی محتوی کلروفیل a بسیار معنی‌دار ($P\leq$۰/۰۱) تشخیص داده شد. بر اساس جدول مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن (جدول ۳)، محتوی کلروفیل a در تیمار تنش خشکی (۲/۳۶۷ میلی‌گرم بر گرم وزن تازه بافت) کم‌تر از تیمار آبیاری کامل (۳/۶۳۵ میلی‌گرم بر گرم وزن تازه بافت) بود

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from cpj.iauahvaz.ac.ir at 16:36 +0430 on Saturday May 20th 2017

(شکل ۷). این مسئله نشان دهنده افزایش میزان گونه‌های فعال اکسیژن تحت شرایط تنش خشکی و هجوم رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) و تخریب پروتئین‌های گیاهی از جمله کلروفیل‌ها می باشد. مظفری و همکاران (۱۳۹۴) نتایج مشابهی را گزارش کردند.

با توجه به جدول ۳، رقم سیروان (با ۳/۲۵۵ میلی‌گرم بر گرم وزن تازه بافت) از نظر میزان کلروفیل a نسبت به رقم مرودشت (با ۲/۷۴۷ میلی‌گرم بر گرم وزن تازه بافت) برتر بود (شکل ۸). نتایج نشان داد که تیمار مصرف توام باکتری‌های PGPR و تیمار عدم مصرف باکتری (شاهد) به‌ترتیب با ۳/۸۲۲ و ۲/۳۸۳ (میلی‌گرم بر گرم وزن تازه بافت) بالاترین و پایین‌ترین محتوی کلروفیل a را به خود اختصاص دادند و تیمارهای مصرف تکی ازوتوباکتر و آزوسپیریلوم اختلاف معنی‌داری با هم نداشتند (جدول ۳ و شکل ۱۳). به‌طورکلی نتایج آزمایش نشان داد که مصرف باکتری‌های PGPR به‌ویژه مصرف توام آن‌ها باعث شد تا محتوی کلروفیل a گیاه گندم در مقایسه با تیمار عدم مصرف باکتری‌های PGPR افزایش یابد که این بیان‌گر اثرات مثبت باکتری‌های PGPR در افزایش رشد گیاه از طریق سازوکارهای مستقیم و غیر مستقیم است. با توجه به نتایج تجزیه واریانس، کلیه برهمکنش دوگانه و سه گانه بین عوامل آزمایش بر میزان کلروفیل a معنی دار نبود (جدول ۲).

با توجه به نتایج تجزیه واریانس، اثر اصلی آبیاری، ارقام گندم و باکتری بر محتوی کلروفیل b معنی‌دار ($P\leq ۰/۰۱$) بود (جدول ۲). بر اساس جدول ۳، محتوی کلروفیل b در تیمار تنش خشکی (۱/۱۷۳ میلی‌گرم بر گرم وزن تازه بافت) کم‌تر از تیمار آبیاری کامل (۱/۷۳۵ میلی‌گرم بر گرم وزن تازه بافت) بود (شکل ۹). این مسئله نشان دهنده افزایش میزان گونه‌های فعال اکسیژن تحت شرایط تنش خشکی و هجوم رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) و تخریب پروتئین‌های گیاهی از جمله کلروفیل‌ها می باشد.

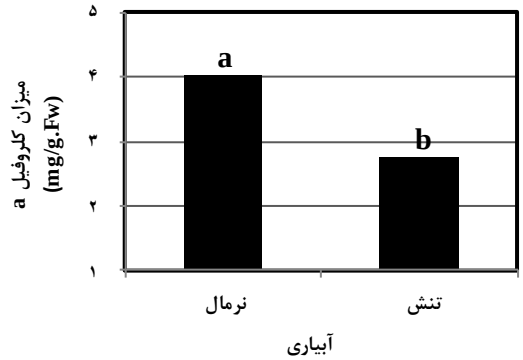
با توجه به نتایج تجزیه واریانس، عامل رقم اثر معنی‌داری ($P\leq ۰/۰۵$) بر میزان کلروفیل b گذاشت (جدول ۲). با توجه به جدول مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن در سطح احتمال پنج درصد، رقم سیروان (با ۱/۵۷۸ میلی‌گرم بر گرم وزن تازه بافت) از نظر محتوی کلروفیل b نسبت به رقم مرودشت (با ۱/۳۳۰ میلی‌گرم بر گرم وزن تازه بافت) برتر بود (جدول ۳ و شکل ۱۰). بر اساس نتایج جدول تجزیه واریانس، در بین سطوح مختلف باکتری‌های بهبود دهنده رشد گیاه (PGPR) اختلاف معنی‌داری ($P\leq ۰/۰۱$) از نظر محتوی کلروفیل b مشاهده شد (جدول ۳). نتایج نشان داد که تیمار مصرف توام باکتری‌های PGPR و تیمار عدم مصرف باکتری (شاهد) به‌ترتیب با ۱/۷۸۸ و ۱/۱۶۴ (میلی‌گرم بر گرم وزن تازه بافت) بالاترین و پایین‌ترین محتوی کلروفیل b را به خود اختصاص دادند و تیمارهای مصرف تکی ازوتوباکتر و آزوسپیریلوم اختلاف معنی داری با هم نداشتند (جدول ۳ و شکل ۱۴). به‌طورکلی نتایج آزمایش نشان داد که مصرف باکتری‌های

Archive of SID

www.SID.ir

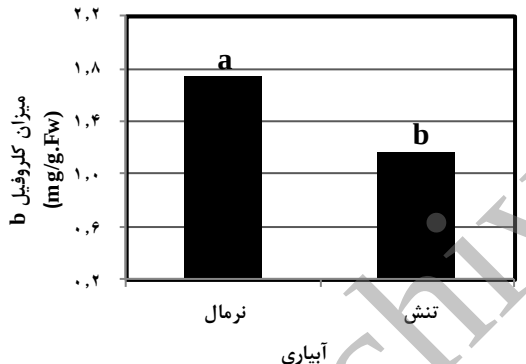
Downloaded from cpj.iauahvaz.ac.ir at 16:36 +0430 on Saturday May 20th 2017

PGPR به‌ویژه مصرف توام آنها باعث شد تا میزان کلروفیل b گیاه گندم در مقایسه با تیمار عدم مصرف باکتری‌های PGPR افزایش یابد که این بیانگر اثرات مثبت باکتری‌های PGPR در افزایش رشد گیاه از طریق سازوکارهای مستقیم و غیرمستقیم است. با توجه به نتایج تجزیه واریانس، کلیه برهمکنش دوگانه و سه گانه بین عوامل آزمایش بر میزان کلروفیل b معنی دار نشد (جدول ۲).

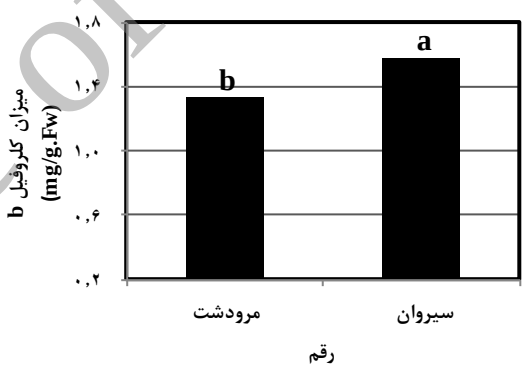


شکل ۷: اثر آبیاری بر میزان کلروفیل a

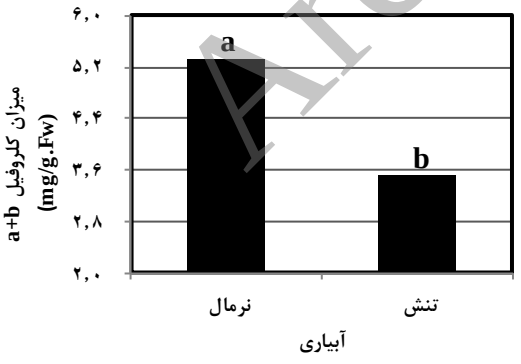
شکل ۸: اثر رقم بر میزان کلروفیل a



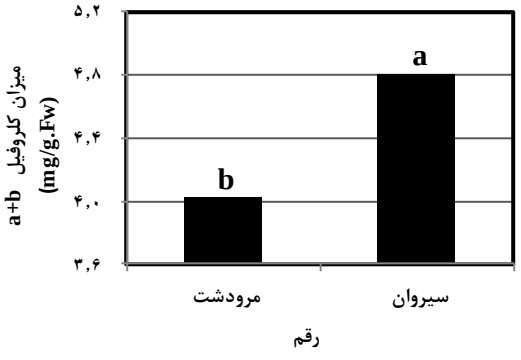
شکل ۹: اثر آبیاری بر کلروفیل b



شکل ۱۰: اثر رقم بر کلروفیل b



شکل ۱۱: اثر آبیاری بر کلروفیل a+b



شکل ۱۲: اثر رقم بر کلروفیل a+b

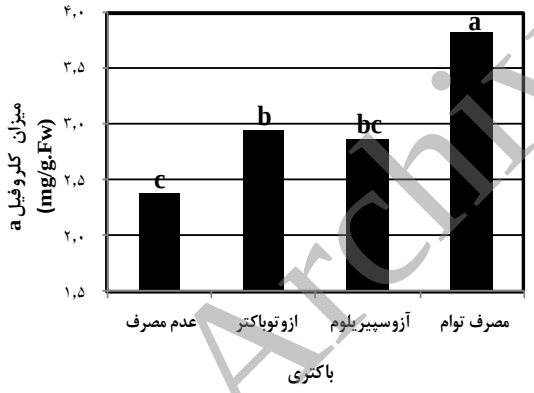
با توجه به نتایج جدول ۲، اثر اصلی عوامل آزمایش بر روی میزان کلروفیل a+b معنی دار ($P\leq ۰/۰۱$) تشخیص داده شد. میزان کلروفیل a+b در تیمار تنش خشکی (۳/۵۲۲ میلی‌گرم بر گرم وزن تازه بافت) کمتر از تیمار آبیاری نرمال

Archive of SID

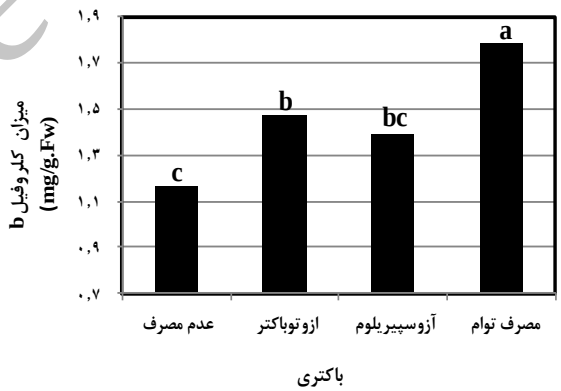
www.SID.ir

Downloaded from cpj.iauahvaz.ac.ir at 16:36 +0430 on Saturday May 20th 2017

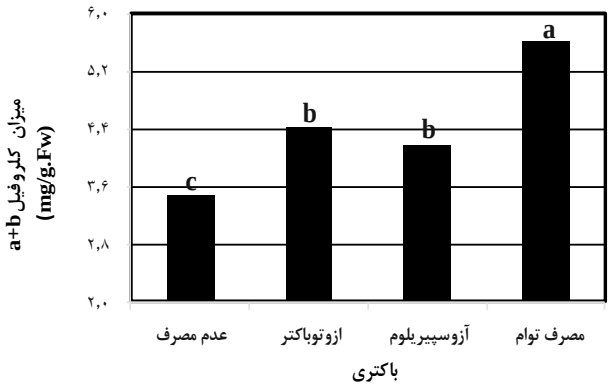
(۵/۳۲۰ میلی‌گرم بر گرم وزن تازه بافت) بود (جدول ۳ و شکل ۱۱). با توجه به جدول ۳، رقم سیروان (با ۴/۸۱۱ میلی‌گرم بر گرم وزن تازه بافت) از نظر میزان کلروفیل a+b نسبت به رقم مرودشت (با ۴/۰۳۲ میلی‌گرم بر گرم وزن تازه بافت) برتر بود (شکل ۱۲). نتایج آزمایش نشان داد، تیمار مصرف توام باکتری‌های PGPR و تیمار عدم مصرف باکتری (شاهد) به ترتیب با ۵/۶۱۰ و ۳/۴۸۰ (میلی‌گرم بر گرم وزن تازه بافت) بالاترین و پایین‌ترین محتوی کلروفیل a+b را به خود اختصاص دادند و تیمارهای مصرف تکی ازوتوباکتر و آزوسپیریلوم اختلاف معنی‌داری با هم نداشتند و هر دو در یک گروه آماری مشترک قرار گرفتند (جدول ۳ و شکل ۱۵). به‌طورکلی نتایج آزمایش نشان داد که مصرف باکتری‌های PGPR به‌ویژه مصرف توام آن‌ها باعث شد تا محتوی کلروفیل a+b گیاه گندم در مقایسه با تیمار عدم مصرف باکتری‌های PGPR افزایش یابد که این بیان‌گر اثرات مثبت باکتری‌های PGPR در افزایش رشد گیاه از طریق سازوکارهای مستقیم و غیر مستقیم است. با توجه به نتایج تجزیه واریانس، کلیه برهمکنش دوگانه و سه گانه بین عوامل آزمایش بر میزان کلروفیل a+b معنی دار تشخیص داده نشد (جدول ۲). Moslemi و همکاران (۲۰۱۱) در بررسی تعدادی از سویه‌های PGPR در شرایط تنش خشکی نشان دادند که تلقیح بذر با باکتری‌های آزوسپیریلوم لیپوفروم+ سودوموناس پوتیدا، میزان کلروفیل a، b و a+b را افزایش می دهد.



شکل ۱۳: اثر باکتری بر میزان کلروفیل a



شکل ۱۴: اثر باکتری بر میزان کلروفیل b



شکل ۱۵: اثر باکتری بر میزان کلروفیل a+b

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from cpj.iauahvaz.ac.ir at 16:36 +0430 on Saturday May 20th 2017

نتیجه‌گیری

رقم سیروان به‌دلیل محتوی کلروفیل و فعالیت آنزیم آنتی اکسیدانتی SOD بالا و میزان کم بیومارکر MDA نسبت به رقم مرودشت از تحمل به تنش خشکی بیش‌تری برخوردار بود. بالاترین میزان آنزیم SOD و MDA و پایین‌ترین محتوی کلروفیل a، b و a+b متعلق به تیمار تنش خشکی بود. باکتری‌های بهبود دهنده رشد گیاه (PGPR) به‌ویژه کاربرد توام آن‌ها با افزایش میزان فعالیت آنزیم SOD و محتوی کلروفیل a، b و a+b و کاهش بیومارکر تخریب مالون دی آدهید MDA اثرات مخرب تنش اکسیداتیو ناشی از تنش خشکی را در گندم کاهش دادند.

منابع

مشهدی اکبر بوجار، م. ۱۳۹۰. فلزات سنگین و تنش اکسیداتیو در گیاهان. اولین کارگاه تنش اکسیداتیو. دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی.

مظفری، ا.، دانشیان، ج.، حبیبی، د.، شیرانی راد، ا.ح. و اصغر زاده، ا. ۱۳۹۴. بررسی تاثیر باکتری‌های محرک رشد گیاه (PGPR) بر برخی صفات مرفوفیزیولوژیکی گندم نان تحت شرایط تنش خشکی انتهایی، مجله فیزیولوژی گیاهان زراعی، جلد ۷، شماره ۱۲، صفحه۳۶-۲۱.

نورمحمدی، ق.، سیادت، ع. و کاشانی، ع. ۱۳۷۶. زراعت، جلد اول غلات، انتشارات دانشگاه شهید چمران اهواز.

Çakmakçi, R., Erat, M., Oral, B., Erdogan, U., Şahin, F. 2009. Enzyme activities and growth promotion of spinach by indole-3-acetic acid-producing rhizobacteria. Journal of Horticultural Science and Biotechnology 84: 375–380.

Chakraborty, U., Chakraborty, B. N., Chakraborty, A. P., and Dey, P. L. 2013. Water stress amelioration and plant growth promotion in wheat plants by osmotic stress tolerant bacteria. World Journal of Microbiology and Biotechnology 29: 789–803.

Chen, W. P., Li, P. H. and Chen, T. H. 2000. Glycine betaine increase chilling tolerance and reduce chilling-induced lipid peroxidation in *Zea mays* L. Plant, Cell and Environment 23: 609–618.

Diaz, P., Monza, J. and Marquez, A. 2005. Drought and Saline stress , *Lotuse japinicus*. Handbook 39-50.

East, R. 2013. Microbiome: Soil science comes to life. Nature 50: S18-9.

Ehdaie, B. 1995. Variation in water use efficiency and its components in wheat. II. Pot and field experiments. Crop Science 35: 1617–1626.

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from cpj.iauahvaz.ac.ir at 16:36 +0430 on Saturday May 20th 2017

Ehteshami, S. M. R., Aghaalikhani, M., Khavazi, K. and Chaichi, M. R. 2007. Effect of Phosphate Solubilizing Microorganisms on quantitative and qualitative characteristics of Maize (*Zea mays* L.) under water deficit stress. Pakistan Journal of Biological Sciences 10: 3585-3591.

Erdogan, U., Cakmakci, R., Varmazyari, A., Turan, M., Erdogan, Y. and Kitir, N.2016. Role of inoculation with multi-trait rhizobacteria on strawberries under water deficit stress. Zemdirbyste-Agriculture 103 (1): 67–76.

Flemming H. C. and Wingender, J. 2001. Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs)-parts I: structural and ecological aspects.Water Science Technology. 43: 1–8.

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

Grover, M., Ali, S. Z., Sandhya, V., Rasul, A. and Venkateswarlu, B. 2010. Role of microorganisms in adaptation of agriculture crops to abiotic stress. World Journal of Microbiology and Biotechnology 27: 1231-1240.

Islam, F., Yasmeen, T., Ali, Q., Ali, S., Arif, M.S., Hussain, S., Rizvi, H. 2015. Influence of *Pseudomonas aeruginosa* as PGPR on oxidative stress tolerance in wheat under Zn stress. Ecotoxicol. Environment Saf. DOI:10.1016/j.ecoenv.2014.03.008.

Islam, F., Yasmeen, T., Arif, M. S., Ali, S., Ali, B., Hameed, S. and Zhou, W. 2016. Plant growth promoting bacteria confer salt tolerance in *Vigna radiata* by up-regulating antioxidant defense and biological soil fertility. Plant Growth Regulation 80:23–36.

Jaleel, C. A., Manivannan, P., Sankar, B., Kishorekumar, A., Gopi, R., Somasundaram, R. and Panneerselvam, R. 2007a. *Pseudomonas fluorescens* enhances biomass yield and ajmalicine production in *Catharanthus roseus* under water deficit stress. Colloids Surf B Biointerfaces 60: 7-1.

Jaleel, C. A, Manivannan, P., Sankar, B., Kishorekumar, A., Gopi, R ., Somasundaram, R. and Panneerselvam, R. 2007b. Induction of drought stress tolerance by ketoconazole in *catharanthus roseus* is mediated by enhanced antioxidant potentials and secondary metabolite accumulation, Colloids Surf B Biointerfaces 60: 201-206.

Jaleel, C. A., Manivannan, P., Wahid, A., Farooq, M., Al-Juburi, H. J., Somasasundaram, R. and Panneerselvam, R. 2009. Drought stress plants: a review on morphological characteristics and pigments composition. International Journal of agricultureand biology 11: 100-105.

Kasim, W. A., Osman, M. E., Omar, M. N., Abd El-Daim, I. A., Abd El-Daim, I. A., Bejai, S. and Meijer, J. 2013. Control of Drought Stress in Wheat Using Plant-Growth- Promoting Bacteria. Journal of Plant Growth Regulation 32: 122–130.

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from cpj.iauahvaz.ac.ir at 16:36 +0430 on Saturday May 20th 2017

Kim, Y. C., Glick, B., Bashan, Y. and Ryu, C. M. 2013. Enhancement of plant drought tolerance by microbes. In: Aroca R, editor. Plant responses to drought stress. 2013. Berlin: Springer Verlag.

Kloepper, J.W. and Schroth, M. N. 1978. Plant growth promoting rhizobacteria on radishes. IV. International Conference on Plant Pathogenic Bacteria. Angers France 2: 879-882.

Liu, X-M and Zhang, H. 2015. The effects of bacterial volatile emissions on plant abiotic stress tolerance. Frontiers Plant Science**.** 6: 1-6, 774.

Marasco, R., Rolli, E., Ettoumi, B., Vigani, G., Mapelli, F., Borin, S., Abou-Hadid, A.F., El-Behairy, U. A., Sorlini, C., Cherif, A. 2012. A drought resistance promoting microbiome is selected by root system under desert farming. 7: 1-14.

Minami, M., Yoshikawa, H., 1979. A simplified assay method of superoxide dismutase activity for clinical use. Clinica Chimica Acta 92: 337–342.

Moslemi, Z., Habibi, D., Asgharzadeh, A., Ardakani, M. R., Mohammadi A. and Sakari A. 2011. Effects of super absorbent polymer and plant growth promoting rhizobacteria on yield and yield components of maize under drought stress and normal conditions. African Journal of Agricultural Research 6: 4471-4476.

Mozafari, A. 2012. Evaluation of Some Crop Species for Remedation of Lead (Pb) In Contaminated Soils Under Greenhouse condition. EUROSOI2012. The 4th International Congress of the European Confederation of Soil Science Societies (ECSSS), 2-6 July, Bari, Italy.

Mozafari, A. 2014. Evaluation the effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on SOD, MDA and Proline content in two wheat cultivar. 20th World Congress of Soil Science. June 8-13, Jeju, Korea.

Mozafari, A., Siadat, S. A. and Abdali, M. 2015. The study of lead accumulation, antioxidant enzyme activity and malondialdehyde biomarker content in two barely species. e-proceedings of the 6th European Bioremediation Conference (ebc-vi 2015). Chania, Crete, Greece, June 29-July 2.

Naseem, H., and Bano, A. 2014. Role of plant growth-promoting rhizobacteria and their exopolysaccharide in drought tolerance of maize. Journal of Plant Interaction 9: 689–701.

Ohkawa, H., Ohishi, N. and Y. Yagi, 1979. Assay of lipid peroxides in tissues by thiobarbituric acid reaction. Annual Biochemstry 95: 51-358.

Patel, P.K. and Hemantaranjan, A. 2012. Antioxidant defence system in chickpea (*Cicer arietinum* L.): influence by drought stress implemented at pre- and post-anthesis stage. American Journal of Plant Physiology, 7: 164–173

Price, A. H. and Henry, G. A. F. 1989. Stress and the role of activated oxygen scavengers and protective enzymes on plants subjected to drought. Biochemical Society Transactions 17: 493-493

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from cpj.iauahvaz.ac.ir at 16:36 +0430 on Saturday May 20th 2017

Porra, R. J., Thompson, W. A. and Kriedemann, P. E. 1989. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. Biochim Biophys Acta 975: 384–94.

Redman, R. S., Kim, Y. O., Woodward, C. J. D. A., Greer, C. and Espino, L. 2011. Increased fitness of rice plants to abiotic stress via habitat adapted symbiosis: A strategy for mitigating impacts of climate change. http://dx.doi.org/10.1371/.

Smirnoff, N. 1993. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. New Phytologist 125: 27-58.

Timmusk, S. and Wagner, E. G. H. 1999. The plant-growth-promoting rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* induces changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression: a possible connection between biotic and abiotic stress responses. Molecular Plant–Microbe Interactions 12: 951–959.

Vardharajula, S., Zulfikar Ali, S., Grover, M., Reddy, G. and Bandi, V. 2011. Drought-tolerant plant growth promoting *Bacillus spp*.: effect on growth, osmolytes, and antioxidant status of maize under drought stress. Journal of Plant Interaction 6:1–14.

Verma, P., Saxena, R. and Tomar, R. S. 2016. Rhizobacteria: A Promising Tool for Drought Tolerance in Crop Plants. Proceeding of International Conference on Recent Advances in Biotechnology (Int-BIONANO-2016).

Yang, J., Kloepper, J. W. and Ryu, C. M. 2009. Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. Trends Plant Science 14: 1–4.

Zhang, Z. L. 1990. Guide to plant physiology experiments. Beijing: Higher Education Press.

Zhang, L. X., Wang, K., Zhang, X. F., Lu, L. X., Li, Y. F., Gao, M., Wang, C. Y., Hu J. J., Liang, Z. S. 2011. Role of nitrate nutrition in alleviation of the adverse effects of drought stress on maize cultivars: biomass production and antioxidative capacity. Pakistan Journal of Botany, 43: 2869–2874.

Archive of SID

www.SID.ir