Archive of SID

نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی
جلد بیست و پنجم، شماره چهارم، ۱۳۹۷
http://jopp.gau.ac.ir
DOI: 10.22069/jopp.2018.13521.2220

بررسی همزیستی اندوفایت روی صفات ریخت‌شناسی و زیست– شیمیایی در گونه چمانواش بلند تحت تنش خشکی

آزاده مداح[۱]، عبدالله حاتم‌زاده[۲]، *احد یامچی[۳] و رضا محمدی[۴]

[۱]گروه باغبانی، پردیس دانشگاهی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران، [۲]گروه باغبانی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران،
[۳]گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، گرگان، ایران،
[۴]پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی شمال‌غرب و غرب کشور، تبریز، ایران

تاریخ دریافت: ۹۶/۰۳/۲۹ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۸/۱۱

چکیده

سابقه و هدف: چمن فسکویی بلند (*Festuca arundinacea schreb*) از وسیع‌ترین جنس‌ها در خانواده گندمیان است و اندوفایت‌های علفی، قارچ‌هایی از خانواده Clavicipitaceae و از جنس *Neotyphodium* هستند که گندمیان زیرخانواده Poaceae را به‌صورت سیستمیک آلوده می‌کنند. کشف رابطه همزیستی مطلوب بین چمن فستوکا و قارچ‌های اندوفایت، متخصصان اصلاح نباتات را به استفاده از این رابطه در ایجاد گیاهان دارای عملکرد بهینه و عادات رشدی کاراتر در شرایط تنش ترغیب کرده است. در این پژوهش اثر تنش خشکی (۱٤ روز خشکی و کنترل) و قارچ‌های اندوفایت و ژنوتیپ گیاه (والد مادری و نتاج) بر تغییرات ریخت‌شناسی و فیزیولوژیک مانند پرولین، کلروفیل، کاروتنوئید، وزن تر و خشک و مقایسه میزان رشد طولی گیاه مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: گیاهچه‌های ژنوتیپ فسکیوی بلند از کلکسیون موجود در پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی شمال‌غرب و غرب کشور به‌صورت E^+ تهیه شدند. جهت همسان شدن نمونه‌ها، یک گیاهچه E^+ با استفاده از روش تقسیم پنجه‌ها به‌مدت ۲ ماه تکثیر شدند و برای تهیه گیاهچه‌های E^- تعدادی از نمونه‌های E^+ در اوایل تکثیر دو مرتبه با فاصله ۱۰ روز توسط قارچ کش پروپیکونازول با غلظت ۲ گرم در لیتر ماده مؤثره تیمار شدند و پس از انجام تست وجود یا عدم وجود قارچ اندوفایت با استفاده از رنگ‌آمیزی رزبنگال، به گیاهان شامل دو ژنوتیپ گیاهی والد مادری و نتاج، پس از ۲۰ روز استقرار در گلدان‌ها تیمارهای آبی شامل شاهد (۱۰۰ درصد ظرفیت مزرعه)، تنش خشکی به‌مدت ۱٤ روز (۲۵ درصد ظرفیت مزرعه) و ۱٤ روز آبدهی دوباره پس از بازیابی در دو تکرار به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی اعمال شد. سپس صفات مورد نظر اندازه‌گیری و تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS صورت گرفت. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد مقدار پرولین برای تنش آبی و نوع گونه در سطح احتمال ۰/۰۱ درصد معنی‌دار شد و بیش‌ترین مقدار پرولین (۲/۹٦ میلی‌گرم در گرم وزن تر) در شرایط تنش و برای گونه نتاج به‌دست آمد و اثر قارچ اندوفایت چشم‌گیر نبود. از

* مسئول مکاتبه: yam12001@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

طرفی میزان کلروفیل، کاروتنوئید و رشد رویشی گیاه قبل از تنش در مورد اثرات مورد آزمایش معنی‌دار نشد. در مورد وزن تر و خشک گیاه، اثرات تنش آبی، قارچ اندوفایت، ژنوتیپ گیاهی و برهمکنش این سه اثر بر هم بسیار معنی‌دار شد (P<۰/۰۱) و بیش‌ترین مقدار وزن تر (۱/۱٦۷ گرم) و وزن خشک (۰/۱۸٤ گرم) به‌ترتیب مربوط به ژنوتیپ نتاج و ژنوتیپ والد بدون اندوفایت و در شرایط کنترل بود. کم‌ترین مقدار وزن خشک (۰/۰۲۵ گرم) در گونه نتاج بدون اندوفایت و در شرایط تنش بود. برای رشد اندام هوایی دو هفته بعد از تنش نیز اثر تنش آبی و برهم‌کنش دو اثر تنش و ژنوتیپ گیاه نیز در سطح احتمال ۰/۰۱ درصد معنی‌دار شد و بیش‌ترین ارتفاع (۳۱/۲۵ سانتی‌متر) را گونه نتاج در شرایط کنترل داشت.

نتیجه‌گیری: برای مدیریت این تنش بهتر است از گونه والد که در شرایط تنش هم وزن خشک بالاتری داشته و هم رشد طولی بهتری بعد از دو هفته تنش داشت، استفاده شود از طرفی در مورد نقش اندوفایت در این پژوهش همان‌طور که مشاهده شد تأثیر قابل‌توجهی دیده نشد.

واژه‌های کلیدی: پرولین، تنش خشکی، قارچ اندوفایت، کاروتنوئید، کلروفیل

مقدمه

فسکیوی بلند[1] (*Festuca arundinacea schreb*) گیاهی دگرگشن، علوفه‌ای، چمنی و سردسیری با ژنوم هگزاپلوئید است و از مهم‌ترین جنس‌ها در خانواده گندمیان می‌باشد که اعضای آن به‌صورت گسترده با نواحی متفاوت بوم‌شناختی سازگار شدند (۵۲). آب به‌دلیل ارتباط قوی بین فتوسنتز و تنفس از طریق برگ برای تولید محصول یکی از ارکان نظام کشاورزی است (۱۲). گیاه از آب در سطح سلولی برای واکنش‌های شیمیایی درون گیاه استفاده می‌کند و آب در کل گیاه، نقش اصلی در انتقال مواد ضروری بین اندام‌ها و بافت‌های گیاه بر عهده دارد. بنابراین هر گونه تنشی ناشی از کمبود آب آسیب‌های جدی به گیاه وارد خواهد کرد (۲٤، ۳۱ و ۳۷). تنش‌های محیطی از مهم‌ترین عوامل کاهش‌دهنده عملکرد در سطح جهان هستند و به‌خصوص خشکی یکی از مهم‌ترین عوامل محدودکننده رشد و نمو گیاهان محسوب می‌شود. گاهی تنش خشکی ممکن است در نزدیکی سطح خاک رخ دهد، در حالی‌که آب به مقدار کافی برای جذب ریشه در اعماق وجود داشته باشد. در چنین شرایطی به‌دلیل عدم محدودیت برای ریشه‌ها تنها واکنش بخش هوایی دارای اهمیت است. در این بخش مهم‌ترین پاسخ گراس‌ها به تنش خشکی شامل کاهش تولید، کاهش اندازه برگ، کاهش تراکم، رنگ‌پریدگی، پژمردگی، خشک شدن برگ‌ها و در نهایت کاهش کیفیت است (۲۱). قابل ذکر است که گزارش‌ها در مورد تأثیر تنش خشکی بر میزان کلروفیل برگ متفاوت است. افزایش، کاهش و یا عدم تغییر میزان کلروفیل برگ تحت شرایط تنش خشکی با توجه به نوع محصول، مرحله رشد، طول دوره تنش و شدت تنش خشکی متفاوت است (۲). در گیاهان زراعی گزارش‌هایی در رابطه با واکنش متفاوت کلروفیل به خشکی در ارقام حساس و مقاوم (۹) و یا عدم تأثیر تنش خشکی بر غلظت کلروفیل ارائه شد (۲٤). امروزه وجود تنوع برای مقاومت به خشکی در ارقام زیادی از گونه‌ها از جمله فسکویی بلند به اثبات رسید (۱۰ و ۱٤). کشف رابطه همزیستی مطلوب بین گیاهان مرتعی (از جمله جنس فسکویی بلند که دارای اهمیت علوفه‌ای و سازگاری وسیع هستند) با قارچ‌های اندوفایت، متخصصان اصلاح نباتات را در ایجاد گیاهان دارای عملکرد بهینه و عادات رشدی

1- Tall fescue

www.SID.ir

Archive of SID

کاراتر در شرایط تنش ترغیب کرد (۲۸). در این رابطه همزیستی، از یک طرف گیاه، مواد فتوسنتزی و معدنی را برای قارچ فراهم می‌کند و از طرف دیگر قارچ‌های اندوفایت می‌توانند موجب افزایش رشد، محافظت در مقابل تنش‌های زنده و غیرزنده مانند آفات و بیماری‌ها، خشکی (۱۶ و ٤۲)، سرما، دمای بالا (۲٦)، کمبود مواد معدنی خاک و غیره شوند (۳ و ۳۰). تجمع پرولین در بافت‌های گیاهی که آب از دست داده‌اند اولین بار در سال ۱۹٥٤ گزارش شد (۳۱). افزایش غلظت این اسید آمینه که به تنظیم اسمزی کمک می‌کند، ناشی از چند عامل است که می‌توان به ممانعت از تجزیه پرولین یا افزایش تجزیه پروتئین که ممکن است با کاهش رشد همراه باشد، اشاره کرد (۲۲). نتایج آزمایش‌ها نشان می‌دهد که تجمع پرولین و کربوهیدرات‌های محلول در جهت تنظیم اسمزی در صورتی روی می‌دهد که پتانسیل آب بیش از یک مگاپاسکال کاهش یابد (۳۲). در مجموع کاهش در تورژسانس سلول عامل اولیه تجمع پرولین تحت تنش‌های شوری و خشکی است. کاهش تورژسانس باعث فعال شدن یک توالی پیچیده از فرایندهای تطابقی مرتبط با سطح تحمل گیاه به تنش می‌شود (۳۲).

در این پژوهش تغییرات غلظت کلروفیل a، b و کل و کاروتنوئید به‌عنوان واکنش کوتاه‌مدت به تنش و به‌عنوان معیاری از قدرت گیاه در شرایط تنش خشکی در حضور و عدم حضور قارچ‌های اندوفایت مورد بررسی قرار گرفت و از طرفی ارزیابی پرولین در حضور و عدم حضور اندوفیت‌ها به‌عنوان شاخصی اصلی و مهم برای تنظیم اسمزی تحت شرایط تنش مورد مطالعه قرار گرفت. با توجه به اطلاعات اندک درباره گونه‌های پوششی در فضای سبز و لزوم شناسایی گیاهان مناسب برای شرایط تنش خشکی و وجود بحران کمبود آب در کشور و همچنین وجود اطلاعات کمی در مورد قارچ‌های همزیست و میکوریزا با چمن فسکویی بلند و تأثیر آن‌ها در شرایط تنش، این پژوهش صورت گرفت.

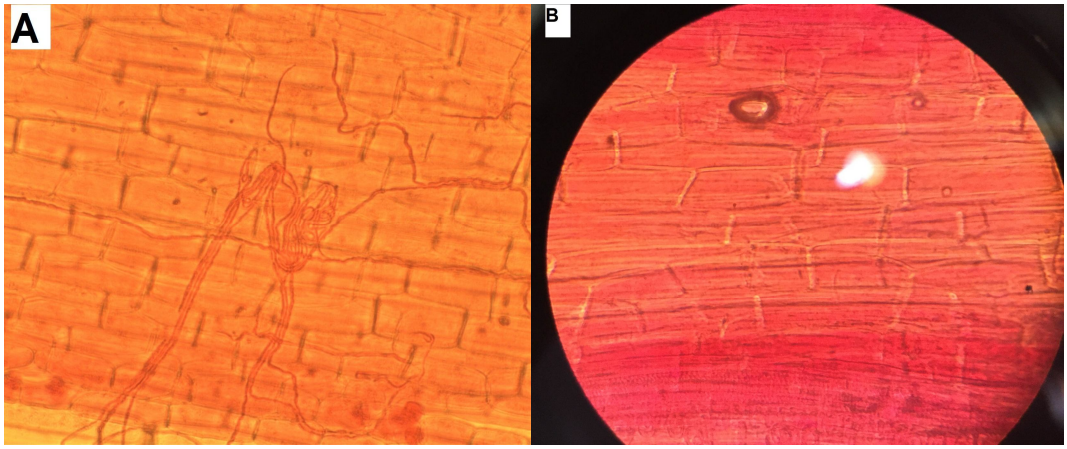
مواد و روش‌ها

به‌منظور تولید بذر چمن بومی فسکویی بلند یک ژنوتیپ بومی با نام اختصاری Fa-fa-83-A که حاوی قارچ همزیست اندوفایت از جنس *Neotyphodium* بود به‌عنوان والد مادری با یک ژنوتیپ از رقم تجاری Rebel به‌عنوان پایه پدری تلاقی داده شد. هدف از این تلاقی انتقال صفات مناسب چمن مانند رنگ سبز تیره، پاکوتاهی و باریکی برگ به ژنوتیپ بومی حاوی قارچ اندوفایت بود. گیاهچه‌های ژنوتیپ فسکیوی بلند از کلکسیون موجود در پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی شمال‌غرب و غرب کشور به‌صورت E^+ تهیه شدند. جهت همسان شدن نمونه‌ها، یک گیاهچه E^+ با استفاده از روش تقسیم پنجه‌ها به‌مدت ۲ ماه تکثیر شدند و برای تهیه گیاهچه‌های E^- تعدادی از نمونه‌های E^+ در اوایل تکثیر دو مرتبه با فاصله ۱۰ روز توسط قارچ‌کش پروپیکونازول[1] با غلظت ۲ گرم در لیتر ماده مؤثره تیمار شدند. بررسی آلودگی به قارچ اندوفایت با استفاده از رنگ‌آمیزی رزبنگال[2] (۳۳) صورت گرفت. به این ترتیب که نمونه غلاف برگ از ٥ تا ٦ سانتی‌متری بالای یقه گرفته شد و به طول ۱ سانتی‌متر خرد شده و مقدار ۰/٥ میلی‌لیتر قطره از محلول رنگی استاندارد حاوی ۰/٥ گرم پودر رزبنگال در ۹۹/٥ میلی‌لیتر اتانول ٥ درصد را درون تیوب ریخته و حدود ۳۰ دقیقه اجازه داده شد تا رنگ جذب بافت گیاهی شود، سپس قطعات طوری روی لام قرار داده شد که قسمت داخلی غلاف برگ به سمت بالا باشد. و با میکروسکوپ مشاهده گردید (شکل ۱).

1- Propiconazole
2- Rose bengal

www.SID.ir

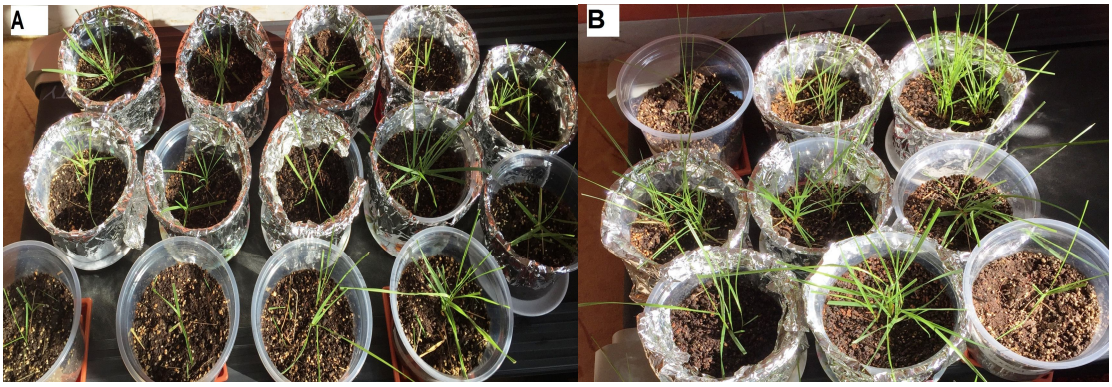
Archive of SID



شکل ۱- نمونه‌ای از مشاهده میکروسکوپی پس از رنگ‌آمیزی رزبنگال در چمن فسکویی بلند آلوده به قارچ اندوفایت (شاهد) (A) و چمن عاری از قارچ اندوفیت پس از تیمار با قارچ‌کش پروپیکونازول (B).

Figure 1. An example of microscopic observation after Rosebengal coloring in the long-lasting grass-infected endophyte (A) and endophytic fungus-free grass after treatment with propiconazole fungicide (B).

پس از استقرار گیاهان درون گلدان (با قطر ۱۹ و ارتفاع ۱۳ سانتی‌متر) حاوی خاک باغچه، خاک برگ، پرلیت و کود پوسیده دامی، به‌مدت ۲۰ روز، در شرایط گلخانه‌ای با دمای تقریبی ۲۵ درجه سانتی‌گراد در روز و ۲۰ درجه سانتی‌گراد در شب با طول روز تقریباً ١٤ ساعت، براساس آزمایش خاک، تیمارهای آبی شامل شرایط مطلوب یا شاهد (۱۰۰ درصد ظرفیت مزرعه)، تنش خشکی به‌مدت ١٤ روز (۲۵ درصد ظرفیت مزرعه) و ١٤ روز آبدهی دوباره[1] پس از بازیابی (آبیاری دوباره تا حد ظرفیت مزرعه پس از ١٤ روز تنش خشکی)، در دو ژنوتیپ گیاهی شامل والد مادری و نتاج و در شرایط وجود یا عدم وجود قارچ‌های اندوفیت در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان اعمال شد.



شکل ۲- گیاهان والد و نتاج در شرایط مطلوب (A) و تنش خشکی (B).

Figure 2. Parent and offspring plants under favorable conditions (A) and drought stress (B).

1- Rewatering

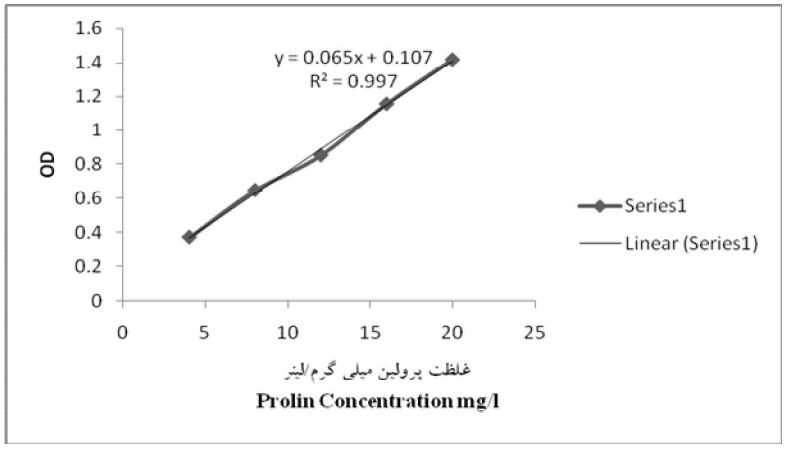
www.SID.ir

Archive of SID

آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در دو تکرار انجام شد. فاکتورها شامل ژنوتیپ گیاهی در دو سطح، وجود و عدم وجود اندوفایت و تنش خشکی در دوسطح بودند. صفاتی چون وزن تر و خشک، میزان پرولین (٤)، کلروفیل a و b و کلروفیل کل، کارتنوئید (۲۵) برگ‌ها و میزان رشد طولی بخش هوایی گیاهان والد و نتاج اندازه‌گیری شد. تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS صورت گرفت و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن استفاده شد.

سنجش پرولین: اندازه‌گیری میزان پرولین با استفاده از روش بتس و همکاران (٤) به‌شرح زیر انجام شد.

۰/۱۲۵ گرم نین‌هیدرین به دو میلی‌لیتر اسیداستیک گلاسیال اضافه شد، سپس محلول گرم شده تا نین‌هیدرین کاملاً در اسید حل شود، بعد از آن دو میلی‌لیتر اسید فسفریک شش مولار به محلول اضافه و محلول به‌دست آمده به‌مدت ٢٤ ساعت در یخچال با دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری شد تا معرف به‌خوبی تثبیت گردید. سپس ۰/۰۵ گرم ماده تر گیاهی در پنج میلی‌لیتر محلول اسیدسولفوسالیسلیک (سه درصد) سائیده و محلول با کاغذ واتمن شماره دو صاف شد و حجم عصاره صاف شده یادداشت گردید. دو میلی‌لیتر از عصاره صاف‌شده را با دو میلی‌لیتر محلول اسید نین‌هیدرین و دو میلی‌لیتر اسیداستیک مخلوط شدند و ۳۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه قرار گرفت. بعد از سرد شدن، به هر یک از لوله‌ها مقدار چهار میلی‌لیتر تولوئن اضافه شد. برای مخلوط کردن این دو محلول، به‌مدت ۲۰-۱۵ ثانیه با استفاده از ورتکس لوله‌ها، تکان داده شدند. سرانجام فاز رویی که به رنگ قرمز درآمده و حاوی پرولین محلول در تولوئن بود را برداشته و هم‌زمان با نمونه‌های استاندارد، در دستگاه اسپکتروفتومتر قرار گرفت. اعداد در طول موج ۵۲۰ نانومتر قرائت گردیدند. غلظت پرولین موجود از هر نمونه بر حسب میکرومول پرولین بر گرم وزن تازه گیاه با استفاده از منحنی استاندارد محاسبه شد، سپس برای رسم منحنی استاندارد (شکل ۲) محلول‌هایی با غلظت صفر، چهار، هشت، ۱۲، ١٦، ۲۰، ٢٤و ۲۸ میلی‌گرم بر لیتر پرولین خالص تهیه شده و همه مراحل فوق بر روی هر کدام از نمونه‌ها انجام گرفت.



شکل ۳- منحنی استاندارد پرولین.

Figure 3. Proline standard curve.

www.SID.ir

Archive of SID

سنجش محتوای کلروفیل و کاروتنوئید: ابتدا مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم بافت برگ در ۵ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد به‌خوبی سائیده شده و سپس مخلوط به‌دست آمده به‌مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. مایع فوقانی به لوله آزمایش جدید منتقل شد و مقدار کلروفیل و کاروتنوئید با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در سه طول موج ٤٧٠، ٦٤٤/٨، ٦٦١/٦ قرائت گردید. برای تعیین کلروفیل‌های a، b، کل و کاروتنوئید بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر از روابط زیر استفاده شد (۲۵).

$$C_a\ (\mu g/ml) = 12.25\ A_{663.2} - 2.79\ A_{646.8} \quad (۱)$$

$$C_b\ (\mu g/ml) = 21.50\ A_{646.8} - 5.10\ A_{663.2} \quad (۲)$$

$$C_{a+b}\ (\mu g/ml) = 7.15\ A_{663.2} - 18.71\ A_{646.8} \quad (۳)$$

$$C_{x+c}(\mu g/ml) = (1000\ A_{470} - 1.82 C_a - 85.02\ C_b)/198 \quad (٤)$$

نتایج و بحث

نتایج تجزیه و تحلیل آماری محتوای پرولین بیانگر آن بود که اثر گونه و تنش خشکی بر این صفت بسیار معنی‌دار ($P<۰/۰۱$) است (جدول ۱). همچنین برهم‌کنش گونه و تنش خشکی نیز در سطح احتمال ۰/۰۱ درصد معنی‌دار بود (شکل ۱). گونه نتاج بیش‌ترین میزان پرولین (۲/۹٦ میلی‌گرم در گرم وزن تر) را در بین گونه‌ها دارا بود. از طرف دیگر، تیمار تنش آبی بیش‌ترین مقدار پرولین (۲/۹٦ میلی‌گرم در گرم وزن تر) را در بین دو سطح رطوبتی به خود اختصاص داد.

جدول ۱- تجزیه واریانس صفات مختلف گیاهان فسکیوی بلند در تنش خشکی و تحت اثر اندوفایت و نوع ژنوتیپ.

Table 1. Variance analysis of different traits of tall fescue under drought stress and under effect of endophyte fungi and type of genotype.

منابع تغییرات Sources	درجه آزادی DF	کلروفیل a Chlorophyll a	کلروفیل b Chlorophyll b	کلروفیل کل Total Chlorophyll	کاروتنوئید Carotenoid	وزن تر Biomass	وزن خشک Dry weight	ارتفاع اندام هوایی قبل تنش Shoot before stress	ارتفاع اندام هوایی بعد تنش Shoot after stress	پرولین Proline
تنش (A) Drought	1	1.461^{ns}	6.649^{ns}	23.694^{ns}	0.265^{ns}	1.359**	0.036**	1.5^{ns}	337.5**	6.011**
اندوفایت (B) Endophyte	1	0.213^{ns}	7.502^{ns}	35.608^{ns}	1.844^{ns}	0.234**	0.013**	0.094^{ns}	30.375^{ns}	0.062^{ns}
ژنوتیپ (C) Genotype	1	0.307^{ns}	45.217^{ns}	0.178^{ns}	0.206^{ns}	0.185*	0.013**	0.094^{ns}	1.500**	7.923**
A*B	1	1.433^{ns}	7.100^{ns}	41.574^{ns}	0.010^{ns}	0.330**	0.011**	0.000^{ns}	3.375^{ns}	0.005^{ns}
A*C	1	2.913^{ns}	5.597^{ns}	26.551^{ns}	0.023^{ns}	0.003^{ns}	0.001^{ns}	0.000^{ns}	661.500**	1.502**
B*C	1	0.367^{ns}	0.007^{ns}	17.751^{ns}	0.487^{ns}	0.013^{ns}	0.000^{ns}	0.844^{ns}	9.375^{ns}	0.050^{ns}
A*B*C	1	17.432^{ns}	40.229^{ns}	0.043^{ns}	0.217^{ns}	0.583**	0.013**	0.000^{ns}	9.375^{ns}	0.000^{ns}
خطا Error	16	8.238	14.750	22.306	1.014	0.029	0.001	0.859	8.750	0.066
کل Total	23									
ضریب تغییرات (درصد) CV%		15.295	31.766	16.128	14.672	27.837	26.114	12.464	13.146	26.836

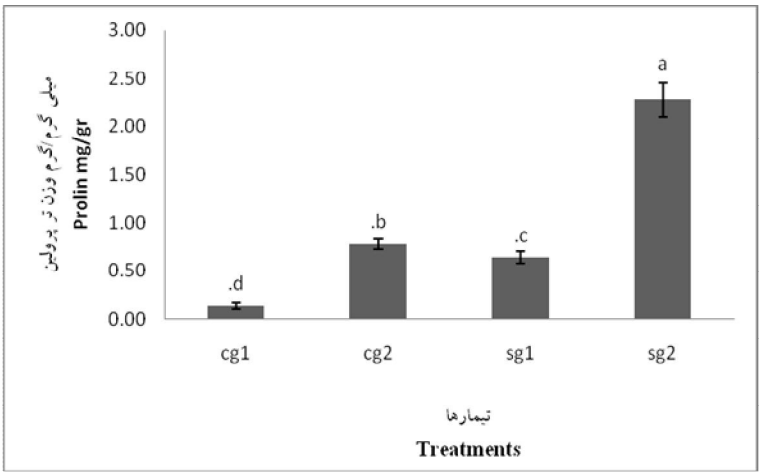
*، ** و ^{ns} به‌ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد، ۱ درصد و غیرمعنی‌دار.

*, ** and ^{ns} respectively significant at 5%, 1% and non significant.

www.SID.ir

Archive of SID

کم‌ترین میزان پرولین نیز (۰/۰۵ میلی‌گرم در گرم وزن تر) مربوط به گونه والد و در شرایط بدون تنش خشکی بود (شکل ۳). اثر اندوفایت در مورد گونه و تنش آبی در مورد صفت پرولین معنی‌دار نشد ولی بیش‌ترین پرولین (۲/۹٦ میلی‌گرم در گرم وزن تر) نیز در گونه نتاج دارای اندوفایت و در شرایط تنش آبی بود. در پژوهش‌های فراوان صورت گرفته تحت شرایط تنش خشکی، اسید آمینه پرولین همواره به‌عنوان یک ترکیب فعال اسمزی مطرح می‌باشد که قادر است پتانسیل اسمزی را کاهش داده و فشار از دست رفته آماس را جبران کند. همچنین مقدار پرولین با افزایش شدت تنش خشکی افزایش پیدا می‌کند. نقش پرولین در مقاومت به خشکی بسیار پیچیده و مبهم است. در واقع تجمع پرولین در شرایط تنش خشکی یک واکنش عمومی است که به‌علت ساخت پرولین در بافت، ممانعت از اکسیداسیون پرولین و جلوگیری از شرکت پرولین در ساخت پروتئین‌ها صورت می‌گیرد (۲۹). طی تنش خشکی درصد پایین اکسیداسیون پرولین (٤۰) همچنین تجمع بالای پرولین (۳۷) ناشی از تحریک تولید گلوتامات و تبدیل شدن به پرولین-۵-کربوکسیلات، (P5C) می‌باشد که سبب افزایش میزان پرولین در گیاه می‌شود (۵ و ٦). از طرفی کاهش اکسیداسیون پرولین می‌تواند زمانی اتفاق بیفتد که کاهش ظرفیت اکسیدکننده میتوکندریایی پرولین ضروری باشد ولی برای تجمع پرولین کافی نیست. افزایش پرولین در هنگام روبرو شدن با تنش خشکی روی سایر گیاهان مثل ذرت (۳٤)، بادام‌زمینی (۳۹)، شبدر (۱۹) گزارش شده است که تأییدکننده نتیجه به‌دست آمده در پژوهش حاضر می‌باشد. البته در برخی گزارش‌ها نیز اشاره شد که پرولین و تجمع آن در شرایط تنش خشکی نمی‌تواند به‌عنوان یک شاخص مقاومت به خشکی در یک رقم یا گونه خاص به حساب آید. بخاری و همکاران (۱۹۸۵) گزارش کرده‌اند که با وجود افزایش پرولین در برخی گندمیان، نمی‌توان این تجمع را شاخصی از مقاومت به خشکی به حساب آورد، بلکه این افزایش شاخص خوبی از قدرت تنش خشکی است که بر گیاه اعمال شد (۷).



شکل ٤- میزان پرولین (میلی‌گرم بر گرم وزن تر) گیاه فسکویی بلند در شرایط تنش (s) و کنترل (c)، بین ژنوتیپ والد مادری (g1) و ژنوتیپ نتاج (g2). حروف مختلف بر روی ستون‌ها نشانگر تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد براساس آزمون دانکن بین میانگین‌ها می‌باشد.

Figure 4. Proline (mg/gr) content of fescue under drought stress (s) and control (c) condition between parent (g1) and off spring (g2) genotypes. Different alphabets indicate significant differences between means at 5% probability level and based on the Duncan test.

www.SID.ir

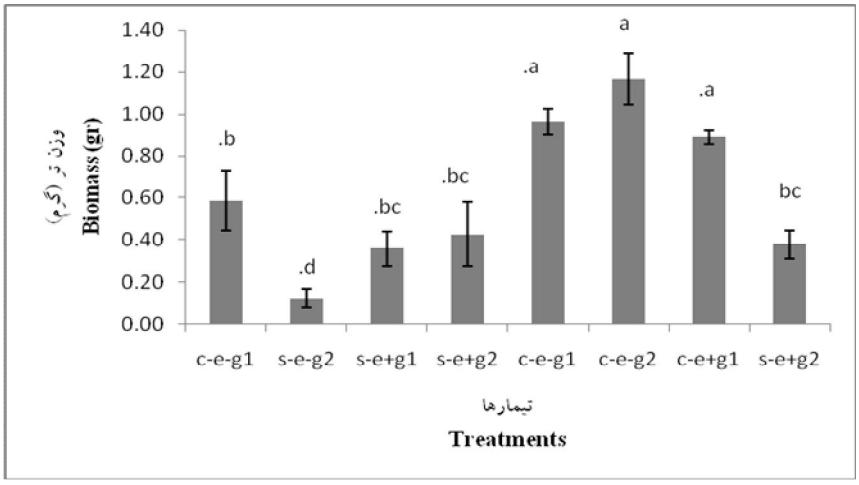
Archive of SID

نتایج حاصل از محتوای کلروفیل a، b و کلروفیل کل، همچنین کاروتنوئید در سطوح مختلف معنی‌دار نشد. گزارش‌ها در مورد تأثیر تنش خشکی بر میزان کلروفیل برگ متفاوت است. به‌طورکلی، مقدار کلروفیل به‌عنوان یک معیار بسیار مفید همواره برای ارزیابی وضعیت فیزیولوژیک گیاه مورد توجه قرار می‌گیرد (۲۱). افزایش، کاهش و یا عدم تغییر میزان کلروفیل برگ تحت شرایط تنش خشکی با توجه به نوع محصول، مرحله رشد، طول دوره تنش و شدت تنش خشکی متفاوت است (۲). برخی پژوهش‌ها نشان داده است که در شرایط تنش خشکی در گیاهان میزان کلروفیل کاهش و مقدار پرولین افزایش می‌یابد (۱، ۲٦، ۲۷ و ۳٤) که با نتایج پرولین پژوهش حاضر مطابقت دارد ولی در مورد کلروفیل مطابق نیست. به‌نظر می‌رسد که کاهش میزان کلروفیل در اثر تنش خشکی، به‌علت افزایش تولید رادیکال‌های اکسیژن باشد، که این رادیکال‌های آزاد باعث پراکسیداسیون و در نتیجه تجزیه این رنگیزه می‌گردد (۳٦ و ۳۸). ژیانگ و هوآنگ (۲۱)، محتوای کلروفیل در گیاهان زنده را یک عامل مهم جهت تعیین ظرفیت اسمزی دانسته‌اند. از طرفی در مورد کاروتنوئید فویر و همکاران (۱۹۹۸) می‌گویند بی‌تردید گونه‌ای که بتواند کاروتنوئید بیش‌تری داشته باشد در تنش اکسیداتی و ناشی از تنش آب دفاع موفق‌تری خواهد داشت و در مقابل تنش آب تحمل بیش‌تری از خود نشان می‌دهد (۱۳).

نتایج حاصل از پژوهش حاضر در ارتباط با وزن تر و خشک در شرایط تنش آبی و با حضور و عدم حضور قارچ اندوفایت و برای دو گونه مورد بررسی چمن فستوکای بلند در سطح احتمال ۰/۰۱ و ۰/۰۵ درصد معنی‌دار شد (جدول ۱). در برهم‌کنش سه‌گانه اثرات گونه و قارچ اندوفایت و تیمار تنش آبی، بیش‌ترین وزن تر (۱/۱٦۷گرم) مربوط به گونه نتاج بدون اندوفایت و در شرایط مطلوب بود. در مورد اثر متقابل تنش خشکی و قارچ اندوفایت نیز بیش‌ترین میزان وزن تر در شرایط کنترل و در گونه بدون اندوفایت بود (۱/۰٦۵ گرم). نتایج آماری در مورد وزن خشک تفاوت معنی‌داری را در سطح احتمال ۰/۰۱ درصد برای تیمارهای تنش آبی، قارچ اندوفایت و نوع گونه و اثرات متقابل آن‌ها نشان داد (شکل‌های ۲ و ۳). بیش‌ترین مقدار وزن خشک (۰/۱۸٤ گرم) مربوط به گونه نتاج بدون اندوفایت و در شرایط بدون تنش بود و کم‌ترین مقدار آن (۰/۰۲۵ گرم) در گونه نتاج بدون اندوفایت و در شرایط تنش بود. رشد اندام هوایی دو گونه فستوکای آلوده به قارچ اندوفایت و بدون اندوفایت دو هفته قبل از تنش تفاوت چشم‌گیری نداشت ولی دو هفته بعد از تنش برهم‌کنش تنش آبی و گونه بسیار معنی‌دار بود ($P<0/01$) بیش‌ترین میزان رشد اندام هوایی (۳۱/۲۵ سانتی‌متر) را گونه نتاج و در شرایط کنترل داشت و کم‌ترین میزان رشد (۱۳/۲۵ سانتی‌متر) نیز مربوط به گونه نتاج بوده، ولی در شرایط تنش خشکی. کاهش رشد برگ در اثر تنش خشکی قبلاً نیز تأیید شد (۱۱).

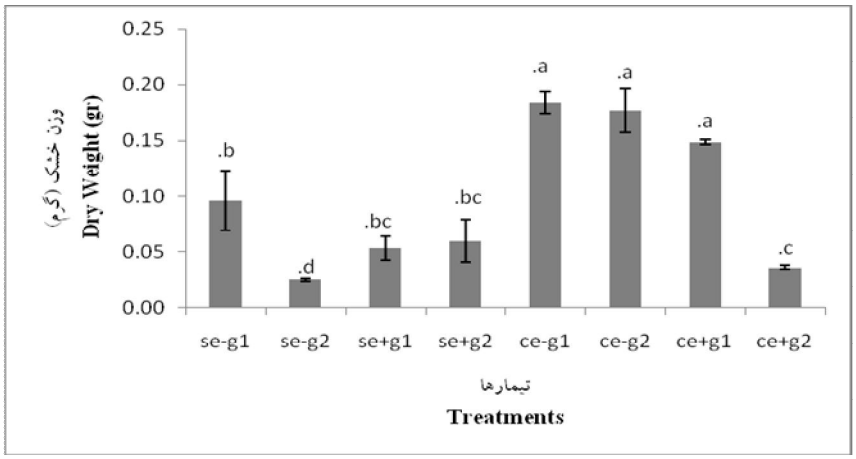
www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۵- میزان وزن تر (گرم) گیاه فسکویی بلند در شرایط تنش (s) و کنترل (c)، تحت اثر وجود (e+) و عدم وجود قارچ اندوفایت (e-) بین ژنوتیپ والد (g1) و ژنوتیپ نتاج (g2). حروف مختلف بر روی ستون‌ها نشانگر تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد براساس آزمون دانکن بین میانگین‌ها می‌باشد.

Figure 5. Biomass (gr) mean comparison between parent (g1) and off spring (g2) genotypes. Different alphabets indicate significant differences between means At a 5% probability level and based on the Duncan test.



شکل ٦- مقایسه میانگین وزن خشک (گرم) گیاه فسکویی بلند در شرایط تنش (s) و کنترل (c)، تحت اثر وجود (e+) و عدم وجود قارچ اندوفایت (e-) بین ژنوتیپ والد (g1) و ژنوتیپ نتاج (g2). حروف مختلف روی ستون‌ها نشانگر تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد و براساس آزمون دانکن بین میانگین‌ها می‌باشد.

Figure 6. Dry weight mean comparison (gr) of fescue under drought stress (s) and control (c) conditions under the influence of presence (e+) or absence (e-) of endophyte fungi and parent (g1) and off spring (g2) genotype. Different alphabets indicate significant differences between means At a 5% probability level and based on the Duncan test.

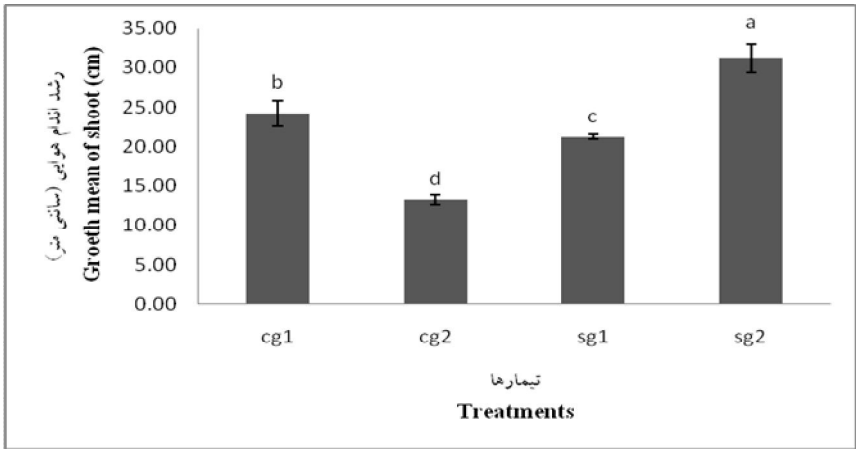
فو و هوآنگ (۱۵) گزارش کردند که رشد طولی فسکویی بلند تحت تنش خشکی سطحی و خشکی کامل خاک در مقایسه با سطح شاهد به شکل معنی‌داری کاهش یافت و مقدار این کاهش در خشکی کامل بیش‌تر بود و به توقف رشد منجر شد.

نتایج نشان داد که در شرایط تنش ارتفاع گیاه در هر دو گونه گیاهی اختلاف معنی‌داری با سطوح شاهد پیدا کرد. رشد طولی سلول در گیاه از فرایندهای حساس به تنش خشکی است و قبل از این‌که فتوسنتز یا روزنه‌ها تحت‌تأثیر قرار گیرند، کاهش می‌یابد (۱۷).

www.SID.ir

Archive of SID

به‌نظر می‌رسد در دو گونه مورد مطالعه نیز تنش خشکی بر تقسیم یا طویل شدن سلول‌ها اثر داشته و ارتفاع را کاهش داد. طبق گزارش بورل و همکاران (۸) بیش‌ترین تغییر در سطح برگ تحت‌تأثیر تنش‌های محیطی مربوط به تغییرات طولی برگ می‌شود و تغییر در میزان عرض برگ سهم کم‌تری از تغییرات برگ را به خود اختصاص می‌دهد از جمله تأثیر فیزیولوژیک خشکی روی گیاهان، کاهش رشد رویشی به‌ویژه رشد شاخساره است. کاهش بخش هوایی در باریک‌برگان یک سازوکار مناسب و سازگارکننده در زمان وقوع تنش‌های شدید رطوبتی است. تنش شدید، توسعه سلولی را در ناحیه رشد به‌شدت محدود می‌سازد (۳۲). در این دو گونه چمن مورد بررسی در این آزمایش ماده خشک در طول تنش کاهش یافت. با توجه به مصرف بالای آب در چمن با طولانی شدن خشکی، کاهش ماده خشک در گونه‌های چمن مورد مطالعه مشاهده شد. نتایج جیانگ و همکاران (۱۹۹۸) نشان داد که رژیم‌های آبیاری خود به تنهایی عامل کاهش طویل شدن سلول‌ها و در نتیجه کاهش ارتفاع و مواد خشک است که این تأییدکننده نتایج این بخش از پژوهش حاضر است (۲۰). با توجه به این‌که در زمان بروز تنش خشکی برای جلوگیری از هدرروی آب از طریق تعرق، روزنه‌ها بسته می‌شوند، میزان دی‌اکسیدکربن در دسترس گیاه برای انجام فتوسنتز نیز کاهش می‌یابد. با کاهش فتوسنتز میزان ساخت کربوهیدرات‌ها نیز کاهش یافته و به تبع آن وزن خشک اندام هوایی نیز کم می‌شود. این کاهش در ارقام حساس به خشکی با شدت بیش‌تری تظاهر می‌یابد (٤١). نتایج پژوهشی نشان داد که ١٤ روز عدم آبیاری در فسکویی بلند منجر به تخریب سلول‌های ریشه، نشت الکترولیت‌ها و عدم برگشت‌پذیری شد (۱۸). بنابراین در آزمایش صورت گرفته با ١٤ روز آبیاری فقط به مقدار ۲۵ درصد ظرفیت مزرعه، کاهش وزن تر و خشک، کاهش رشد اندام هوایی بدیهی است. چمن‌های مقاوم به خشکی مانند فستوکا ضمن تجربه تنش زنده می‌مانند. در بسیاری موارد این باریک‌برگان به خواب رفته و برگ‌های خود را از دست می‌دهند، اما طوقه زنده مانده و رشد گیاه پس از ریزش باران و ایجاد شرایط مناسب رشد، به وضع عادی خود بر می‌گردد.



شکل ۷- رشد اندام هوایی (سانتی‌متر) گیاهان فسکویی بلند در شرایط تنش (s) و کنترل (c) دو ژنوتیپ والد (g1) و نتاج (g2). حروف مختلف روی ستون‌ها نشانگر تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد براساس آزمون دانکن بین میانگین‌ها می‌باشد.

Figure 7. Growth mean of shoot (cm) for two parent (g1) and offspring (g2) genotypes of fescue under drought (s) and control (c) condition. Different alphabets indicate significant differences between means At a 5% probability level and based on the Duncan test.

www.SID.ir

Archive of SID

به‌طور کلی با توجه به بحران کمبود آب موجود در کشور و خشکسالی‌هایی که هر ساله به‌خصوص در مناطق خشک و نیمه‌خشک کشور صورت می‌پذیرد برای مدیریت این تنش با توجه به نتایج این آزمایش بهتر است از گونه نتاج که در شرایط تنش هم وزن خشک بالاتری داشته و هم رشد طولی بهتری بعد از دو هفته تنش داشت استفاده شود. از طرفی در مورد نقش اندوفایت در این پژوهش همان‌طور که مشاهده شد تأثیر قابل‌توجهی دیده نشده است البته این نتیجه در شرایطی گرفته شده است که تنش خشکی در سطح ۲۵ درصد ظرفیت مزرعه بود و به احتمال زیاد در تنش خشکی کامل نقش اندوفایت‌ها قابل‌توجه باشد که این امر نیازمند پژوهش‌های بیش‌تری می‌باشد.

منابع

1. Ahmadi, A. and Siocemardeh, A. 2004. Effect of drought stress on soluble carbohydrate, chlorophyll and Proline in four adopted wheat cultivars with various climate of Iran. Agr. Sci. 35: 753-763.
2. Antolin, M., Yoller, C. and Sanchez- Diaz, M. 1995. Effects of temporary drought on nitrate- fed and nitrogen fixing alfalfa plants. Plant Sci. 107: 159-165.
3. Arechavaleta, M., Bacon, C.W., Hoveland, C.S. and Radcliffe, D.E. 1989. Effect of the tall fescue endophyte on plant response to environmental stress. Agron. J. 81: 83-90.
4. Bates, I.S., Waldern, R.P. and Tear, I.D. 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant Soil. 39: 205-207.
5. Boggess, S.F., Stewart, C.R., Aspinall, D. and Paleg, L.G. 1976. Plant Physiol. 58: 398.
6. Boggess, S.F. and Stewart, C.R. 1976. Contribution arginine to proline accumulation in water-stressed barley leaves. Plant Physiol. 58: 796-797.
7. Bokhari, U.G. and Trent, J.D. 1985. Proline concentrations in water stressed grasses. J. Range. Manage. 38: 37-38.
8. Borrell, A.K., Hummer, G.L. and Douglas, A.C.L. 2000. Does maintaining green leaf area in sorghum improve yield under drought. I. Leaf growth and senescence. Crop Sci. 40: 1026-1037.
9. Carrow, R.N. 1996. Drought resistance aspects of turfgrass in the southeast: Root-Shoot responses. Crop Sci. 36: 687-694.
10. Castrillo, M. and Calcargo, A.M. 1989. Effects of water stress and rewatering on ribulose-I,5-bisphosphate carboxylase activity, chlorophyll and protein contents in two cultivars of tomato. J. Hort. Sci. 64: 6. 717-724.
11. Feldhake, C.M., Danielson, R.E. and Butler, J.D. 1984. Turfgrass evapotranspiration. II. Responses to deficit irrigation. Agron. J. 76: 85-89.
12. Fischer, R.A. and Turner, N.C. 1978. Plant productivity in the arid and semiarid zones. Annu. Rev. Plant Physiol. 29: 277-317.
13. Foyer, C.H., Valadier, M.H., Migge, A. and Becker, T.W. 1998. Drought induced effects on reductase activity and mRNA and on the coordination of nitrogen and carbon metabolism in maize leaves. Plant Physiol. 117: 283-292.
14. Fu, J. and Huang, B. 2001. Involvement of antioxidants and lipid peroxidation in the adaptation of two cool-season grasses to localized drought stress. Environ. Exp. Bot. 45: 105-114.
15. Fu, J., Fry, J. and Huang, B. 2004. Minimum water requirements of four turfgrasses in the transition zone. Hort. Sci. 39: 1740-1744.
16. Hill, N.S., Belesky, D.P. and Stringer, W.C. 1991. Competitiveness of tall fescueas influenced by Acremonium coenophialum. Crop Sci. 31: 185-190.

www.SID.ir

Archive of SID

17. Iannucci, A., Russo, M., Arena, L., Difonzo, N. and Martiniello, P. 2002. Water deficit effects on osmotic adjustment and solute accumulation in leaves of annual clovers, Europ. J. Agron. 16: 111-122.
18. Hsiao, T.C. and Xu, L.K. 2000. Sensitivity of growth of roots versus leaves to water stress: biophysical analysis and relation to water transport. J. Exp. Bot. 51: 1595-1616.
19. Huang, B. and Fry, J.D. 1998. Root anatomical, physiological and morphological responses to drought stress for tall fescue cultivars. Crop Sci. 38: 1017-1022.
20. Jiang, H. and Fry, J. 1998. Drought responses of perennial ryegrass treated with plant growth regulators. Hort. Sci. 33: 270-273.
21. Jiang, Y. and Huang, B. 2001. Drought and heat stress injury to two cool-season turfgrass in relation to antioxidant metabolism and lipid peroxidation. Crop Sci. 41: 436-442.
22. Kao, C.H. 1981. Senescence of rice leaves. VI. Comparative study of the metabolic changes of senescing turgid and water-stressed excised leaves. Plant Cell Physiol. 22: 683-685.
23. Kramer, P.J. 1988 Changing concepts regarding plant water relations. Plant Cell Environ. 11: 565-568.
24. Kulshreshtha, S., Mishra, D.P. and Gupta, R.K. 1987. Changes in content of chlorophyll, proteins and lipids in whole chloroplast and chloroplast membrane fractions at different leaf water potentials in drought resistant and sensitive genotypes of wheat. Photosynthetica. 21: 1. 65-70.
25. Lichtenthaler, H.K. 1987. Chlorophyll and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. Methods Enzymol. 148: 350-382.
26. Manuchehri, R. and Salehi, H. 2015. Morphophysiological and biochemical changes in tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) under combined salinity and deficit irrigation stresses. Desert. 20: 1. 29-38.
27. Marks, S. and Clay, K. 1996. Physiological responses of *Festuca arundinacea* to fungal endophyte infection. New Phytol. 133: 727-733.
28. Nayyar, H. and Walia, D.P. 2003. Water stress induced proline accumulation in contrasting wheat genotypes as affected by calcium and abscisic acid. Biol. Plantarum. 46: 275-279.
29. Passioura, J.P. 1988. Water Uptake and transport roots. Annu. Rev. Plant Physiol. 39: 245-265.
30. Pedrol, N., Ramos, P. and Riegosa, M.J. 2000. Phenotypic plasticity and acclimation to water deficits in velvetgrass: a long-term greenhouse experiment. Changes in leaf morphology, photosynthesis and stress-induced metabolites. Plant Physiol. 157: 383-393.
31. Pessarkli, M. 1999. Hand book of Plant and Crop Stress. Marcel Dekker Inc. 697p.
32. Ren, Z., Ward, T.E., Logan, B.E. and Regan, J.M. 2007. Characterization of the Cellulolytic and Hydrogen-Producing Activities of Six Mesophilic Clostridium Species. J. Appl. Microbiol. 103: 6. 2258-2266.
33. Saha, D.C., Jackson, M.A. and Johnson-Cicalse, J.M. 1988. A rapid staining method for detection of endophytic fungi in turf and forage grass. Phytopathol. 48: 237-239.
34. Samieiani, A., Azizi, H., Hashemi-Nia, S.M. and Selahvarzi, Y. 2013. Effects of drought stress on some biochemical indices of four groundcovers (*Lolium perenne*, Potentilla spp, *Trifolium repens* and Frankenia spp) with potential usage in landscape. J. Sci. Tech. Greenhouse. 4: 15. 101-109. (Translated In Persian)
35. Serraj, R. and Sinclair, T.R. 2002. Osmolyte accumulation: can it really help increase crop yield under drought conditions. Plant and Cell Environ. 25: 333-341.
36. Schulze, E.D., Steudle, E., Gollan, T. and Schurr, U. 1988: Response to Dr. P.J. Kramer's article, Changing concepts regarding plant water relations. 11, 7, 565-568, Plant, Cell, Environ. 11: 573-576.

www.SID.ir

Archive of SID

37. Schutz, M. and Fangmeir, E. 2001. Growth and yield responses of spring wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Minaret) to elevated CO_2 and water limitation. Environ. Pollut. 114: 187-194.
38. Singh, T.N., Paleg, L.C. and Aspinall, D. 1973. Stress metabolism 1. Nitrogen metabolism and growth in the barley plant during water stress. Aust. J. Biol. Sci. 26: 4546.
39. Smirnoff, N. 1993. The role of active oxygen in the response of plant to water deficit and desiccation. New Phytol. 125: 27-58.
40. Smith, B.N., Girija, C. and Swamy, P.M. 2002. Interactive effects of sodium chloride and calcium chloride on the accumulation of proline and glycine betaine in peanut (*Arachis hypogaea* L.). laciniata populations. C. R. Biol. 213: 205-333.
41. Stewart, G.R. and Larher, F. 1980. Accumulation of amino acids and related compounds in relation to environmental stress. Academic Press, New York, Pp: 609-635.
42. Turkan, I., Bor, M., Ozdemir, F. and Koca, H. 2005. Differential responses of lipid peroxidation and antioxidants in the leaves of drought-tolerant P. acutifolius Gray and drought-sensitive *P. vulgaris* L. subjected to polyethylene glycol mediated water stress. Plant Sci. 168: 223-231.

www.SID.ir

www.SID.ir