نشریه زراعت شماره ۱۰۷، تابستان ۱۳۹۴

(پژوهش و سازندگی)

بررسی صفات فیزیولوژیکی خلر و جو در کشت خالص و مخلوط در شرایط آبی و دیم

- سیده سودابه شبیری، محقق مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی زنجان (نویسنده مسئول)
- داوود حبیبی، استادیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج
- علی کاشانی، استاد دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج
- فرزاد پاک نژاد، دانشیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج
- حسین جعفری، عضو هیأت علمی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی زنجان

تاریخ دریافت: اردیبهشت ماه ۱۳۹۲ تاریخ پذیرش: آبان ماه ۱۳۹۲

تلفن تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۲۵۴۱۳۰۶۸

پست الکترونیک نویسنده مسئول: s.shobeiri@yahoo.com

چکیده

به منظور بررسی برخی صفات فیزیولوژیکی مانند فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت(سوپر اکسید دسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز) و تولید بیومارکرها (مالون دی آلدهید، دی تیروزین، دی هیدروکسی گوانوزین) آزمایشی در سال زراعی۸۷-۸۶ در دو محیط آبی و دیم درمرکز تحقیقات کشاورزی استان زنجان اجرا گردید. آزمایش با استفاده از دو گیاه علوفه ای خلر و جو در کشت خالص و مخلوط در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با ۵ تیمار و ۴ تکرار انجام گردید. تیمارها عبارت بودند از: ۱- کشت خالص جو(*Hordeum vulgareL*) ۲- کشت خالص خلر (*Lathyrus sativus*) ۳- نسبت ۷۵ درصد خلر،۲۵ درصد جو ۴- نسبت ۵۰ درصد خلر،۵۰ درصد جو ۵- نسبت ۲۵ درصد خلر،۷۵ درصد جو. نتایج نشان داد میزان تولید بیومارکرها)مالون دی آلدهید، دی تیروزین، دی هیدروکسی گوانوزین) و فعالیت آنزیم‌ها (سوپراکسید دسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز) و میزان هدایت الکتریکی در شرایط دیم بیشتر از آبی بود. اندازه‌گیری آنزیم‌های آنتی اکسیدانت به عنوان آنزیم‌های ضد تنش نشان داد که در شرایط دیم با افزایش میزان تولید بیومارکرها، میزان فعالیت آنزیم‌ها نیز افزایش یافت. همچنین درصد نیتروژن، محتوای آب نسبی و کلروفیل a,b در شرایط آبی بیشتر از دیم بود. در نسبت‌های بالاتر کشت خلر و نسبت‌های پایین جو در کشت مخلوط، فعالیت آنزیم‌ها، درصد نیتروژن، محتوای آب نسبی و کلروفیل a,b بیشتر و میزان تولید بیومارکرها و هدایت الکتریکی کمتر بود. با افزایش نسبت لگوم در مخلوط فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت (سوپراکسید دسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز) افزایش و تولید بیومارکرها)مالون دی آلدهید، دی تیروزین، دی هیدروکسی گوانوزین) کاهش یافت. با افزایش نسبت لگوم در مخلوط فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت افزایش و تولید بیومارکرها کاهش یافت. یکی از دلایل افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت در نسبت‌های کشت مخلوط با نسبت بالای لگوم، وجود باکتری‌های ریزوبیوم و تأثیر این باکتری‌ها در افزایش رادیکال های آزاد اکسیژن می‌باشد. لذا برای تثبیت نیتروژن در طول دوره گره‌سازی و از بین بردن رادیکال‌های آزاد اکسیژن، فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت افزایش یافته و در نتیجه تولید بیومارکرها کاهش یافت.

کلمات کلیدی: تنش اکسیداتیو، ریزوبیوم، کشت مخلوط، گرامینه، لگوم

Agronomy Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No:107 pp: 91-98

Study of physiological traits of grass pea with barely in pure and mixed cropping under dry land and irrigated conditions

By:

- *S. S. Shobeiri, (Corresponding Author; Tel: 09125413068), Researcher of Agriculture and Natural Resources Research Center of Zanjan, Iran*
- *D. Habibi, Assistant Professor of Islamic Azad University, Karaj Branch, Iran*
- *A. Kashani, Professor of Islamic Azad University, Karaj Branch, Iran*
- *F. Paknejad, Associate Professor of Islamic Azad University, Karaj Branch, Iran*
- *H Jafari,Scientific Staff of Agriculture and Natural Resources Research Center of Zanjan, Iran*

Received: April 2013 **Accepted: November 2013**

In order to evaluate some physiological traits such as activity of antioxidant enzymes (Superoxid-Dismutase, Catalase, Glutathione peroxidase) and production of biomarkers (Malon De Aldeide, Dityrozin, Dihydroxy guanozin), an experiment was carried out in two dry land and irrigated conditions at Zanjan Agricultural Research Center during 2007-2008. The experiment using two plants grass pea and barely in pure and mixed cropping was designed as randomized complete blocks with five treatments and four replications. Treatments were as fallows: 1. pure stand of barely 2. pure stand of grass pea 3. ratio of 75% grass pea +25% barely, 50% grass pea +50% barely , 25% grass pea +75% barely. Results showed that production levels of biomarkers (MDA, DI-TY, DG) and enzymes activity (SOD, CAT, GPX) and electrical conductivity (EC) were higher in dry land compared to irrigated condition. The measurement of anti-oxydant enxymes as anti-stress enzymes showed that enzymes activity increased with increasing biomarkers production rate in dry condition. In addition, % nitrogen, relative water content (RWC), chlorophyll content *a, b* in dry condition were lower than irrigated condition. Higher ratio of grass pea and lower ratio of barley in mixed croppings, there were greater enzymes activity (SOD,CAT,GPX), % nitrogen, RWC, chlorophyll *a,b*, and lower amount of biomarkers (MDA, DI-TY, DG) and EC. With increasing of ratio legume in mixtures, activity of antioxidant enzymes increased and biomarkers production decreased. One reason for increasing activity of antioxidant enzymes in mixcropping with high ratios of legume was due to rhizobium bacteria and effects of these bacteria in increasing free radical oxygens. Therefore, for nitrogen fixation during nodule formation and elimination oxygen free radicals, activity of antioxidant enzymes increased and, thus biomarkers production decreased.

key Words: Gramineae, Legume, Mix cropping, Oxidative stress, Rhizobium

مقدمه

در نواحی گرمسیری و نیمه گرمسیری مانند ایران، آب مهمترین عامل محدود کننده تولیدات کشاورزی بوده و باید سعی نمود که با حداکثر بهره برداری از آب موجود میزان تولید را افزایش داد. یکی از راههای رسیدن به این مقصود انجام چند کشتی و کشت مخلوط گیاهان مختلف می باشد(Mazaheri,1994). صفاتی مانند عمق ریشه به قسمت هوایی، سطح ویژه برگ، محتوای آب نسبی(Merah, 2001) و مقاومت روزنه‌ای(Zebri *et al.*,1991) جزو صفات اجتناب از تنش می باشند. در حالیکه پایداری غشای سلولی(Jiang and Huang, 2001) ، فعالیت آنزیمهای آنتی اکسیدانت چون کاتالاز، پراکسیداز و سوپر اکسید دسموتاز و انتقال مجدد ماده خشک و نیتروژن(Fathi *et al.*,1997) جزو تحمل پسابیدگی می‌باشند. در برخی از گونه‌های گیاهی آسیب ناشی از گرما یا خشکی تنش اکسیداتیو را تحریک می‌کند که منجر به تولید و انباشته شدن انواع اکسیژن سمی نظیر رادیکالهای سوپراکسید، آب اکسیژنه و رادیکالهای هیدروکسیل می‌شود. گونه های فعال اکسیژن که در طی تنش تولید می‌شود می‌تواند به برخی از ترکیبات سلولی نظیر لیپیدها، کربوهیدراتها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک آسیب برساند. تنش اکسیداتیو می‌تواند منجر به ممانعت فتوسنتز و فرآیند تنفس و رشد گیاه شود. گیاهان سیستم آنزیمی و غیر آنزیمی را در مقابله با انواع گونه های فعال اکسیژن ساخته‌اند(Tanaka *et al.*, 1999). تجمع گونه های فعال اکسیژن(ROS) یکی از تغییرات بیوشیمیایی است که وقتی گیاهان در معرض تنش خشکی قرار می گیرند اتفاق می افتد (Pan *et al.*, 2006).

سوپراکسید و هیدروژن پراکسید مولکول های سمی هستند و

در اثر واکنش با اجزای کلروپلاست می‌توانند حتی تولیدات اکسیژنی با میل ترکیبی بیشتر نظیر رادیکال هیدروکسیل ($OH^{\cdot}$) و اکسیژن نوزاد(O_2) تشکیل دهند(Casimir Brou *et al.*,2007; Lai *et al.*, 2007; Valentovic *et al.*, 2006;Yong *et al.*, 2006). این ROS ها سم سلولی هستند(Badawi *et al.*,2004). تنش اکسیداتیو ناشی از تولید و تجمع گونه های سمی اکسیژن بوسیله محققین دیگر نیز گزارش شده است(Foyer and Noctor.2001). محققین زیادی گزارش کردند که در شرایط تنش خشکی فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانتی همچون گلوتاتیون پراکسیداز(Habibi *et al.*,2004) ، کاتالاز (Kellos *et* Habibi *et al.*,2004; Serpil and Ozlem Cekie,2005 ; *al.*,2008) سوپراکسید دیسموتاز (Habibi *et al.*,2004; Serpil and Ozlem Cekie,2005 ; Kellos *et al.*,2008) افزایش می یابد.

آنزیم‌های آنتی اکسیدانت کنترل کننده وضعیت سطوح متعادل گونه های فعال اکسیژن و نیتروژن(ROS, RNSبوده، به آنها انجام نقش‌های مهم در جایگاههای مخصوص، شرایط‌های محیطی و یا مراحل رشد و نمو در گیاهان را می‌دهد. اگرچه آنتی اکسیدانت‌ها دارای نقش‌های متعددی در فرایندهای مختلف فیزیولوژیکی در گیاه دارند. در نتیجه فعل و انفعالات مولکولی پیچیده و مستمر بین باکتری و گیاه، مقدار زیادی ROS و احتمالاً RNS، در طول زمان زندگی گره‌ها تولید می‌شود ، از این رو یک نقش مهم آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در هر دو سوی همزیستی انتظار می‌رود(Matamoros *et al.*,2003).

سوپراکسید دسموتاز ریزوبیوم یک نقش مهم در آلودگی، تثبیت نیتروژن و به تأخیر انداختن پیری برگ دارد(Santos *et al.* 2000) و اسکونج کننده رادیکال‌های سوپر اکسید بوده، پراکسید هیدروژن تولید کرده که بوسیله کاتالاز و پراکسیداز تخریب می‌شود. کاتالاز فعالانه در گره‌ها و ریزوبیوم‌های آزادزی یافت می‌شود و در گره‌سازی و تثبیت نیتروژن نقش دارد(Francis and Alexander 1972, Sigaud *et al.*, 1999, Jamet *et al.*, 2003). پراکسیدازها نقش وسیعی در گره‌ها دارند(Matamoros *et al.*, 2003). ماتاموروس و همکاران (Matamoros *et al.*, 2003) اهمیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت در حمایت از همزیستی، به خصوص تحت شرایط استرس نشان دادند.

لذا انجام تحقیق حاضر با توجه به اهمیت کشت مخلوط و نیز توجه به اینکه تنش خشکی در حال و آینده مهمترین چالش پیش روی تولید محصولات کشاورزی به خصوص در کشورهای در حال توسعه خواهد بود ضروری به نظر رسید. در این تحقیق با توجه به پژوهش های انجام گرفته در زمینه کشت مخلوط دو گیاه خلر و جو انتخاب و در ترکیبات مختلف مورد بررسی قرار گرفتند.

مواد و روش ها

این آزمایش در فصل زراعی سال ۱۳۸۷-۱۳۸۶ در ایستگاه تحقیقات کشاورزی استان زنجان (خیرآباد) و ایستگاه تحقیقات دیم خدابنده انجام گرفت. محل اجرای آزمایش در شرایط آبی در ایستگاه خیر آباد به طول ۴۸ درجه و ۴۷ دقیقه‌ی شرقی و عرض ۳۶ درجه و ۳۱ دقیقه شمالی واقع شده است . ارتفاع آن از سطح دریا در محل اجرای آزمایش ۱۷۷۰ متر می‌باشد. محل اجرای آزمایش شرایط دیم در ایستگاه دیم خدابنده در طول ۴۸ درجه و ۴۹ دقیقه‌ی شرقی و عرض ۳۶ درجه و ۹ دقیقه شمالی واقع شده است و ارتفاع از سطح دریا در این محل ۱۸۷۵ متر می باشد.

در این آزمایش جو از خانواده گرامینه و خلر از خانواده لگومینوز با روش کاشت درهم و نسبت های مختلف بذر دو گیاه همزمان به صورت خالص و مخلوط کشت گردیدند. در این آزمایش برای بدست آوردن ترکیبات مورد نظر از روش جایگزینی استفاده گردید. در این روش نسبت معینی از گیاهان یک گونه حذف و معادل گیاهی آن از گونه دوم جایگزین می گردد(Mazaheri, 1994). تیمارها عبارت بودند از:

۱- کشت خالص جو(*Hordeum vulgare* L) ۲- کشت خالص خلر ***(Lathyrus sativus)*** ۳- نسبت ۷۵ درصد خلر،۲۵ درصد جو ۴- نسبت ۵۰ درصد خلر،۵۰ درصد جو ۵- نسبت ۲۵ درصد خلر،۷۵ درصد جو .

کشت به صورت پاییزه و در چهار تکرارانجام شد. تراکم جو ۳۵۰ بوته در مترمربع و خلر ۲۵۰ بوته در متر مربع در نظر گرفته شد. جهت آماده سازی زمین برای شخم از گاوآهن قلمی به عمق ۲۵ سانتی متر استفاده و سپس توسط دیسک(هرس بشقابی) زمین جهت کشت آماده گردید. ابعاد هر کرت ۵×۳ تعیین شد. کاشت در ۲۸ آبان ماه و به صورت دستی صورت گرفت. با توجه به آزمایش خاک ، مقدار ۴۶ کیلوگرم در هکتار کود فسفر(p_2o_5) از منبع سوپرفسفات تریپل(۴۶درصد) قبل ازکاشت در زمین پخش گردید. در بهار مقدار ۲۳ کیلوگرم کود نیتروژن از منبع اوره به صورت سرک به کلیه تیمارها داده شد. در شرایط آبی اولین آبیاری بعد از اتمام فصل یخبندان و در بهار در تاریخ ۲۵ فروردین انجام گرفت و بعد از آن بر اساس نیاز فیزیولوژیک تا زمان برداشت ادامه یافت.

جهت اندازه گیری نیتروژن، از هر گیاه (خلر و جو) در نسبت های مختلف کشت شده، نمونه برداری و در آزمایشگاه میزان نیتروژن به روش کجلدال (kjeldhal)محاسبه گردید(Walling *et al.*,1989). اندازه گیری ازت از عصاره حاصل از هضم تر(مرطوب) طی سه مرحله هضم، تقطیر، تیتراسیون با دستگاه اتوماتیک کجلدال انجام گردید.۱۰ سی سی از عصاره گیاهی را درون لوله های هضم ریخته و عمل تقطیر در حضور سود غلیظ انجام شد. ازت به شکل آمونیوم داخل اسید بوریک ۲ درصد جمع آوری و در حضور معرف شیمیایی بروموکروزوگرین متیل رد با اسید سولفوریک رقیق تیتر گردید. خاتمه تیتراسیون با ظهور رنگ قرمز بود. از حجم مصرفی اسید در هر نمونه تیترانت مربوط به شاهد را کم کرده و عدد بدست آمده را در یک ضریب ثابت کاربردی آزمایش ضرب کرده که این ضریب به شرایط کار در آزمایش بستگی دارد.

جهت محاسبهٔ آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز(GPX) و کاتالاز((CAT از روش پاگلیا(Paglia,1997) میزان تغییرات آنزیم تعیین گردید . میزان فعالیت آنزیم سوپر اکسید دسموتاز (SOD) توسط روش (Misra and Fridovich,1972) تعیین شد . سنجش دی هیدروکسی گوانوزین-8 OH-dG براساس روش(Bogdanov and Bical,1999) انجام شد. سنجش مالون دی آلدهید (MDA) و دی تیروزین (Di-Ty) بر اساس روش(Steven and Josef,1978) تعیین گردید.

بمنظور اندازه گیری کلروفیل برگ ابتدا مقدار ۰/۵ گرم برگ تازه گیاه با قیچی خرد شد و با استفاده از حدود ۵ میلی لیتر آب مقطر در هاون چینی کاملاً سائیده گردید تا توده یکنواختی بدست آید. مخلوط حاصل در یک بالن ژوژه ریخته و با آب مقطر به حجم ۲۵ میلی لیتر

رسانده شد. مقدار ۰/۵ میلی لیتر از عصاره نمونه حاصل برداشته و با ۴/۵ میلی لیتر استون ۸۰ درصد مخلوط گردید. سپس محلول حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰ دور سانتریفوژ گردید. پس از سانتریفوژ کردن، محلول روئی جدا شده و میزان جذب نوری آن با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر(Milton Roy-model 21D) در طول موج ۶۶۳ و ۶۴۵ نانومتر قرائت شد و غلظت کلروفیل آن ها بر اساس روابط زیر تعیین گردید(Arnon,1994 ؛ Ashraf *et al.*,1994) .

میلی گرم کلروفیل a در هر گرم وزن تر:

۰/۵ میلی لیتر حجم نمونه استخراج شده×{(جذب در ۶۴۵ نانومتر)۲/۶۹–(جذب در ۶۶۳ نانومتر)۱۲/۷

میلی گرم کلروفیل b در هر گرم وزن تر:

۰/۵ میلی لیتر حجم نمونه استخراج شده×{(جذب در ۶۶۳ نانومتر)۴/۶۹–(جذب در ۶۴۵ نانومتر)۲۲/۹}

تجزیه و تحلیل نتایج دو ساله صفات با استفاده از نرم افزارSAS صورت گرفت و تجزیه واریانس مرکب برای دو محیط انجام و میانگین ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۵ در صد مقایسه شدند.

نتایج

با توجه به جدول تجزیه واریانس (جدول۱و۳) مشاهده شد که در خلر و جو بین محیط های مختلف آزمایش (آبی و دیم) و در نسبت های خالص و مخلوط از نظر آنزیم ها(SOD،CAT،GPX) و بیومارکرها(8-OH-DG،Di-Ty،MDA)، میزان هدایت الکتریکی، محتوای آب نسبی، کلروفیل اختلاف معنی داری وجود داشت. جدول ۲و۴ نشان می دهد که میزان تولید بیومارکرها و فعالیت آنزیم ها در شرایط دیم بیشتر از آبی بود و تفاوت معنی داری هم بین آنها وجود داشت. در خلر در شرایط دیم نسبت به آبی میزان GPX;CAT;SOD;8-OH-DG;Di-Ty;MDA به ترتیب ۱۹/۳۸، ۲/۵۳، ۱۰/۲۵، ۱۲/۴۴، ۱۵/۳۰، ۱۶/۳۰ درصد افزایش یافت. در جو در شرایط دیم نسبت به آبی مقدار GPX;CAT;SOD;8-OH-DG;Di-Ty;MDA به ترتیب ۲۵/۳۵ ، ۲۲/۵۶ ، ۹/۹۲ ، ۱۸/۱۲ ، ۸/۷۴، ۲۲/۸۲ درصد افزایش یافته است. در مورد میزان فعالیت آنزیم ها و بیو مارکرها در کشت خالص و مخلوط مشاهده شد که میزان فعالیت آنزیم ها در کشت خالص خلر بیشترین و تولید بیومارکرها کمترین مقدار را داشت و بالعکس میزان فعالیت آنزیم ها در نسبت ۲۵ درصد جو بیشترین و تولید بیومارکرها کمترین بود.

همچنین مشاهده شد که درصد نیتروژن خلر و جو در شرایط آبی بیشتر از دیم بوده و تفاوت معنی دار هم وجود داشت(جدول۲و۴). درصد نیتروژن خلر در شرایط دیم نسبت به آبی۹/۱۸ درصد کاهش یافت. بیشترین درصد نیتروژن در کشت خالص خلر b1 و کمترین درصد آن در نسبت ۲۵ درصد خلر یا همان b4 بود به طوریکه با کاهش نسبت خلر میزان درصد این عنصر نیز کاهش یافت(جدول۲). درصد نیتروژن جو در شرایط دیم نسبت به آبی ۱۲/۵ درصد کاهش یافت. کمترین درصد نیتروژن در کشت خالص جو و بیشترین درصد آن در نسبت ۲۵ درصد یا همان b4 بود. به طوریکه با افزایش نسبت جو میزان درصد این عناصر نیز کاهش یافته و نسبت های b3,b4 از نظر درصد نیتروژن در گیاه جو اختلاف معنی داری نداشت(جدول۴).

جدول مقایسه میانگین۲و۴ نشان می‌دهد که میزان محتوای آب نسبی، کلروفیل خلر و جو در شرایط آبی بیشتر از دیم بوده و تفاوت معنی‌دار هم وجود داشت. برعکس میزان هدایت الکتریکی در شرایط دیم بیشتر از آبی بود. در گیاه خلر محتوای آب نسبی، کلروفیل *a* و کلروفیل *b* در شرایط دیم نسبت به آبی به ترتیب۲۹/۹۱ ، ۱۷/۰۹ ، ۱۹/۵۸ درصد کاهش یافت. بیشترین میزان محتوای آب نسبی، کلروفیل*a* و کلروفیل*b* در کشت خالص خلر(b1) بود و کمترین درصد آن در نسبت ۲۵ درصد یا همان b4بوده به طوریکه با کاهش نسبت خلر میزان این صفات نیز کاهش یافت. برعکس میزان هدایت الکتریکی در نسبتb4 بیشترین بود(جدول۲). در جو محتوای آب نسبی، کلروفیل*a* و کلروفیل*b* در شرایط دیم نسبت به آبی به ترتیب۲۴/۵۴، ۱۱/۵۳ ، ۳۵/۷۱ درصد کاهش یافت. کمترین میزان محتوای آب نسبی، کلروفیل*a* و کلروفیل*b* در کشت خالص جوb1 مشاهده شد و بیشترین درصد آن در نسبت ۲۵ درصد یا همان b4بود به طوریکه با افزایش نسبت جو میزان این صفات نیز کاهش یافت. برعکس میزان هدایت الکتریکی در نسبتb4 کمترین بود. در جو میزان کلروفیل*a* و کلروفیل*b* در نسبت‌های b1 ، b2 تفاوت معنی‌داری نداشتند(جدول۴).

بحث

با توجه به نتایج حاصل از اندازه‌گیری صفات فوق مشخص شد که درصد نیتروژن، محتوای آب نسبی، کلروفیل در شرایط آبی بیشتر از دیم بود. این نتیجه با نتایج حاصله توسط(Kazemi nasab *et al.*,2005 ؛ Phazeli *et al.*,2005) مبنی بر کاهش کلروفیل در شرایط تنش خشکی مطابقت می‌کند. مسلماً کاهش میزان کلروفیل در شرایط تنش بدلیل تخریب کلروپلاست در این شرایط و کاهش ساخت رنگیزه ها می‌باشد. گزارشاتی مبنی بر کاهش کلروفیل در شرایط تنش خشکی وجود دارد(Kuroda *et al.*,1990؛ Mayoral and *et al.*,1981؛ Majum-dar *et al.*,1991). همچنین کاهش محتوای آب نسبی در هنگام تنش خشکی را به دلیل کمبود آب داخل برگهای گیاه تحت تنش ذکر می نمایند(Santiago *et al.*,2000).

نتایج حاصله از افزایش هدایت الکتریکی در شرایط دیم با نتایج بدست آمده از تحقیقات (Kazemi nasab *et al.*,2005) بر روی ذرت(Rafiei *et al.*,2005) بر روی آفتابگردان روغنی مطابقت دارد، ایشان معتقدند کمبود آب و تنظیم پتانسیل اسمزی برگ با ذخیره املاح و یون‌های معدنی و اسیدهای آلی و مواد قندی و رنگیزه های محلول در آب همراه است که تجمع این ترکیبات نوعی مقابله با کمبود آب را در گیاه القاء می‌نماید که سبب افزایش هدایت الکتریکی و کاهش مقاومت غشاء سیتوپلاسمی می‌شود.

گیاهان در کشت خالص و نسبت‌های مختلف آنها در کشت مخلوط، از نظر درصد نیتروژن، محتوای آب نسبی، کلروفیل، مقاومت غشاء سلولی، اختلاف معنی‌داری با هم نشان دادند. در کشت خالص خلر از خانواده گیاهان لگومینوز که باکتری های تثبیت کننده نیتروژن در تراکم بیشتر افزایش می‌یابد میزان این صفات بیشتر از تراکم های کمتر این گیاهان بود. بالعکس در گیاهان خانواده گرامینه از قبیل جو در نسبت‌های کمتر این گیاهان که با نسبت بیشتر گیاهان خلر همراه بود میزان این صفات افزایش بیشتری نشان دادند و بالعکس میزان هدایت الکتریکی کمتری داشتند. تأثیر مثبت باکتری های تثبیت کننده روی

رشد و عملکرد توسط(Maunuksela, 2001؛ Gholami *et al.*,2009 Nelson, 2004) نیز گزارش شده است. تلقیح با قارچ میکوریزا Glo-mus intraradices و Pseudomonas straita و ریزوبیوم باعث افزایش معنی‌دار در رشد گیاه و تعداد غلاف، محتوی کلروفیل، نیتروژن، فسفر و پتاسیم در نخود شد(Sayeed Akhtar and Siddiqui, 2008). همچنین تلقیح لوبیا با ریزوبیوم باعث افزایش محتوی کلروفیل، تعداد گره و وزن تر گره شد(Rajenran, *et al.,* 2008) در گیاه سویا محتوی کلروفیل برگ به طور معنی‌داری با تجمع نیتروژن در گیاه ارتباط داشت(Mirza *et al.*,1990)

زمانی که تنش اکسیداتیو ایجاد می شود، رادیکال های آزاد باعث تخریب پروتئین ها شده، اسیدهای آمینه مختلف آزاد می شوند و از اتصال دو اسید آمینه تیروزین از محل اکسیژن هایشان یک دی پپتید بنام دی تیروزین ایجاد می گردد که این ماده نشانه ای از حمله رادیکال های آزاد در هنگام تنش خشکی به پروتئین ها و تخریب آنها می باشد. در واقع در هنگام تنش با توجه به اینکه میزان رادیکال های آزاد اکسیژن بیشتر می شود، پروتئین ها بیشتر در معرض تخریب قرار گرفته و میزان تولید دی تیروزین نیز بالا می‌رود از اندازه گیری میزان تولید این ماده می توان به این نکته پی برد که تنش اکسیداتیو افزایش یافته است.در شرایط تنش و با تشکیل رادیکال های آزاد که منجر به صدمات و نابودی سلولها می شود میزان تخریب لیپیدها بیشتر شده و تولید MDA نیز افزایش می یابد. در اثر تنش خشکی با افزایش رادیکال های آزاد سطح تولید و ترشح دی هیدروکسی گوآنوزین اضافه شده و تخریب DNA و جهش و اثرات ژنتیکی کشنده دیگر بیشتر می‌شود.

بدین ترتیب همانطور که ملاحظه شد میزان تولید بیومارکرها و فعالیت آنزیم ها در کشت دیم بیشتر از آبی بوده و به همین دلیل است که در شرایط تنش آسیب به گیاه وارد شده و میزان بیومارکرها افزایش یافته و بدنبال آن گیاه برای مقابله با تنش فعالیت آنزیم ها را افزایش داده است. این نتایج با نتایج جوز و همکاران (Jose *et al.*,1999) و جین و همکاران (Jin *et al.*, 2006) مبنی بر افزایش آنزیم ها و تولید بیومارکرها در شرایط تنش خشکی همسو است. در واقع هنگام افزایش سطح رادیکال های آزاد اکسیژن این رادیکال ها در DNA اثرات تخریبی خود را انجام داده و بررسی این اثرات تخریبی نشان می دهد که اسکلت قندی و بازهای نولکئوتیدی DNA هر دو به اکسیداسیون حساس بوده و این به دلیل تجزیه بازی، شکستگی حلقه منفرد و اتصال به پروتئین است، تجزیه بازی، محصولات فراوانی نظیر ۸- هیدروکسی گوآنوزین را تولید می نماید، این ماده از شیرهٔ هسته ترشح و به سمت سیتوپلاسم حرکت و اثرات تخریبی خود را ظاهر می نماید. آنها معتقدند با دسترسی آب و کاهش تنش میزان سطح رادیکال های آزاد اکسیژن کاهش می یابد و در نتیجه تخریب حاصله نیز کاهش می یابد.

آزمایشات صورت گرفته توسط(Saei *et al.*,2005) بر روی سورگوم علوفه ای نشان می دهد که فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانت در شرایط تنش خشکی نسبت به شرایط نرمال بیشتر می‌شود، پس از این آنزیم ها می‌توان جهت تعیین گونه های مقاوم به خشکی استفاده نمود . افزایش فعالیت این آنزیم ها در تیمار تنش به خاطر نقش مهم این آنزیم ها جهت مقابله با رادیکالهای آزاد اکسیژن ایجاد شده در اثر تنش خشکی می‌باشد. بنابراین SOD به عنوان یکی از اجزای مهم مکانیسم دفاعی گیاه در نظر گرفته می‌شود. از جمله آنزیم های مهم که در مقابله تنش های محیطی نقش مهمی را ایفا می‌نماید، گلوتاتیون پراکسیداز می باشد که کاهش پراکسید هیدروژن را با استفاده از گلوتاتیون احیا شده (GSH) کاتالیز می‌کند و بدین وسیله از سلولها در برابر آسیب‌های ناشی از اکسایش حفاظت می‌کند(Ghorbani ghojdi and Ladan Moghadam,2005).گروهی از محققین هم گزارش کردند که افزایش فعالیت کاتالاز جهت کاهش اثر پراکسید هیدروژن در هنگام تنش های محیطی در گیاهان گندم ، جو ، سویا و نخود نقش مهمی دارد(Kendall (and McKersie(1989 ; (Basra and (Basra(2001 .

میزان فعالیت آنزیم های خلر در کشت مخلوط به طور معنی داری کمتر از کشت خالص بود. در واقع با کاهش تراکم از نسبت خالص ۱۰۰درصد به نسبت مخلوط ها(۷۵، ۵۰، ۲۵) میزان فعالیت آنزیم ها نیز کاهش یافته است و بالعکس میزان بیومارکرها افزایش یافته است. در کشت خالص جو نسبت به مخلوط ها کمترین میزان فعالیت آنزیم و بیشترین تولید بیومارکر را داشت. پس در واقع می توان گفت در کشت خالص جو به گیاه خسارت بیشتری نسبت به زمانیکه آن مخلوط با گیاه لگوم کشت شده اند وارد آمده است. برعکس در کشت خالص خلر میزان فعالیت آنزیم ها بیشتر و تولید بیومارکرها نسبت به زمانیکه آن به صورت مخلوط با گیاه دیگر کشت شده اند کمتر بود. زیرا گیاهان خانواده لگوم باکتری های تثبیت کننده نیتروژن داشته و زمانیکه تراکم این گیاهان بیشتر است باکتری های تثبیت کننده بیشتر بوده و لزوم تثبیت نیتروژن بیشتر باعث افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانت می شود.

به نظر می رسد یکی از دلایل افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانت در نسبت های کشت مخلوط با نسبت بالای لگوم، وجود باکتری های ریزوبیوم و تأثیر این باکتری ها در افزایش رادیکال های آزاد اکسیژن باشد. لذا برای تثبیت نیتروژن در طول دوره گره سازی و از بین بردن رادیکال های آزاد اکسیژن، فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانت افزایش یافته و در نتیجه تولید بیومارکرها کاهش یافته است. خلر از خانواده گیاهان لگومینوز که باکتری های تثبیت کننده نیتروژن در تراکم بیشتر افزایش می یابد، بنابراین در صد نیتروژن بیشتر از تراکم های کمتر این گیاهان بود. بالعکس در گیاهان خانواده گرامینه از قبیل جو در نسبت های کمتر این گیاهان که با نسبت بیشتر گیاه خلر همراه بود میزان درصد نیتروژن افزایش بیشتری نشان داد. تأثیر مثبت باکتری های تثبیت کننده نیتروژن روی رشد و عملکرد در ذرت توسط(Gholami *et al.*,2009; Maunuksela, 2001; Nelson, 2004) نیز گزارش شده است.

جدول ۱- تجزیه واریانس مرکب صفات اندازه گیری شده خلر در دو محیط

			میانگین مربعات(MS)										
sov	منابع تغییر	DF	کلروفیل *b*	کلروفیل *a*	محتوای آب نسبی	هدایت الکتریکی	نیتروژن Nitrogen	گلوتاتیون پراکسیداز GPX	کاتالاز CAT	سوپراکسید دیسموتاز SOD	دی هیدروکسی گوانوزین 8-OH-DG	دی تیروزین DI-ty	مالون دی آلدئید MDA
Environment	محیط	۱	۱/۱۴**	۳/۵۲**	۴۷۳۶/۳۲**	۰/۱۷**	۰/۹۸۳**	۱۳۲/۰۳**	۲۳۷۳/۶۰**	۵۵۸۰۹۶/۱۳**	۹/۸۹**	۵/۲۰ns	۳/۱۱**
error(Environment)	خطای محیط	۶	۰/۰۰۳	۰/۰۱	۱۱/۵۹	۰/۰۴۶	۰/۰۶۷	۲/۳۴	۱۷/۸۲	۳۱۳۵۴/۵۶	۰/۸۶	۵/۴۰	۰/۲۲
treat	تیمار	۳	۰/۰۲۵**	۰/۰۷۹**	۳۵۴/۵۲**	۰/۱۰۳ns	۰/۴۶۶*	۲۲۱۱/۸۱**	۵۵۶۰/۸۸**	۱۳۶۸۱۷۳۴/۵۸**	۳۴/۰۲**	۹۷۷*	۱۰/۹۷**
Environment *treat	محیط*تیمار	۳	۰/۰۰۱*	۰/۰۰۳*	۴/۶۲ns	۰/۰۳۶**	۰/۰۵۴**	۲/۵۳ns	۶/۱۰ns	۱۱۴۷۹۱/۷۱ ns	۰/۵۳ns	۵۸/۹۳**	۰/۱۰۷ ns
error	خطا	۱۸	۰/۰۰۰۳	۰/۰۰۰۹	۹/۶۶	۰/۰۰۳	۰/۰۰۹	۳/۷۶	۶۸/۷۵	۵۹۹۹۴/۲۸	۰/۸۶	۷/۷۹	۰/۱۵۸

ns , *، ** به ترتیب غیر معنی دار، معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد و یک درصد

جدول ۲- مقایسه میانگین صفات اندازه گیری شده خلر در دو محیط

تیمارها	کلروفیل *b* (mg/gr)	کلروفیل *a* (mg/gr)	محتوای آب نسبی(%)	هدایت الکتریکی (ms/cm)	نیتروژن %Nitrogen	گلوتاتیون پراکسیداز GPX u/mg protein	کاتالاز CAT u/mg protein	سوپراکسید دیسموتاز SOD u/mg protein	دی هیدروکسی گوانوزین 8-OH-DG nm/mg protein	دی تیروزین DI-ty nm/mg protein	مالون دی آلدئید MDA nm/mg protein
E1	۱/۹۴a	۳/۸۶a	۸۱/۳۲a	۰/۵۹b	۳/۸۱a	۲۴/۹۶b	۱۱۲/۵۰b	۲۱۲۲/۸۱b	۱۰/۹۲b	۳۲/۰۱b	۳/۲۵b
E2	۱/۵۶b	۳/۲۰b	۵۶/۹۹b	۱/۲۲a	۳/۴۶b	۲۹/۰۳a	۱۲۹/۷۲a	۲۳۸۶/۹۴a	۱۲/۰۴a	۳۲/۸۲a	۳/۸۸a
b 1	۱/۸۱a	۳/۶۳a	۷۵/۷۸a	۰/۸۰a	۳/۹۲a	۵۱/۵۶a	۱۵۵/۶۰a	۴۱۲۸/۵a	۹/۳۹c	۲۰/۷۰c	۲/۵۰c
b 2	۱/۷۸ab	۳/۵۷ab	۷۲/۰۹b	۰/۸۴a	۳/۷۶ab	۲۲/۷۳b	۱۲۶/۶۷b	۲۰۷۲/۶b	۱۰/۶۹b	۲۶/۹۸bc	۲/۷۷c
b 3	۱/۷۵b	۳/۵۲b	۶۸/۵۵c	۰/۹۴a	۳/۶۱ab	۱۷/۸۲c	۱۰۶/۷۰c	۱۶۸۹b	۱۱/۵۹b	۳۵/۸۸ab	۳/۹۵b
b 4	۱/۶۸c	۳/۳۹c	۶۰/۲۱d	۱/۰۵a	۳/۳۳b	۱۵/۸۷c	۹۵/۴۷d	۱۱۲۹/۴c	۱۴/۲۶a	۴۶/۱۱a	۵/۰۵a

در هر ستون میانگین های دارای حروف مشابه بر اساس آزمون دانکن اختلاف آماری معنی دار با هم ندارند.

(محیط دیم=E2 , محیط آبی=E1) محیط: E ؛ (خلر ٪۲۵=b_4 ، خلر ٪۵۰=b_3 ، خلر ٪۷۵=b_2 ، خلر ٪۱۰۰=b_1) گیاه اصلی: b

جدول ۳- تجزیه واریانس صفات اندازه گیری شده جو در دو محیط

			میانگین مربعات(MS)										
sov	منابع تغییر	DF	کلروفیل *b*	کلروفیل *a*	محتوای آب نسبی	هدایت الکتریکی	نیتروژن Nitrogen	گلوتاتیون پراکسیداز GPX	کاتالاز CAT	سوپراکسید دیسموتاز SOD	دی هیدروکسی گوانوزین 8-OH-DG	دی تیروزین DI-ty	مالون دی آلدئید MDA
Environment	محیط	۱	۲/۸۴**	۱/۳۹**	۲۸۴/۰۱** ۲	۲/۶۲**	۰/۳۸۱**	۱۸۶/۲۴**	۷۴۴/۹۸**	۹۵۷۰۳۶/۱۲**	۱۲/۲۲۶**	۴۵۳/۷۵۷*	۶/۳۱۰**
error(Environment)	خطای محیط	۶	۰/۰۰۲	۰/۰۰۱	۵۷/۹۳	۰/۰۱۲	۰/۰۳۸	۲/۹۱۲	۸۶/۷۷	۲۵۰۵۰/۷۹	۲/۰۹	۱۳/۳۵۷	۰/۳۶۸
treat	تیمار	۳	۰/۰۰۵**	۰/۰۲۶**	۴۰۷/۲۷**	۰/۱۶۰**	۰/۵۶۲**	۴۶۴/۲۲**	۱۸۳۸/۰۱۹**	۲۱۹۶۲۴۵/۳۷۵**	۲۶/۹۴**	۱۱۲۱/۳۲**	۱۰/۹۹**
Environment *treat	محیط*تیمار	۳	۰/۰۰۴ns	۰/۰۰۲ns	۵۱/۶۹*	۰/۰۰۲ns	۰/۰۲۲*	۰/۹۶۵ns	۶/۵۳ns	۲۲۷۳۱/۲۰ns	۰/۲۸ ns	۲۴/۶۰ns	۰/۱۴۸ns
error	خطا	۲۲	۰/۰۰۲	۰/۰۰۱	۱۰/۵۶	۰/۰۰۴	۰/۰۰۶	۷/۵۰	۴۷/۱۶	۲۲۳۳۴/۴۵	۰/۶۷۱	۹/۹۴	۰/۱۵۰

ns , *، ** به ترتیب غیر معنی دار، معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد و یک درصد

جدول ۴- مقایسه میانگین صفات اندازه گیری شده جو در دو محیط

تیمارها	کلروفیل *b* (mg/gr)	کلروفیل *a* (mg/gr)	محتوای آب نسبی(%)	هدایت الکتریکی (ms/cm)	نیتروژن %Nitrogen	گلوتاتیون پراکسیداز GPX u/mg protein	کاتالاز CAT u/mg protein	سوپراکسید دیسموتاز SOD u/mg protein	دی هیدروکسی گوانوزین 8-OH-DG nm/mg protein	دی تیروزین DI-ty nm/mg protein	مالون دی آلدئید MDA nm/mg protein
E1	۱/۶۸a	۳/۶۴a	۷۶/۷۹a	۰/۶۹b	۱/۶۸a	۲۱/۱۶b	۱۱۰/۳۲b	۱۹۰۷/۸۸b	۱۲/۳۹a	۳۳/۴۱b	۳/۵۱b
E2	۱/۰۸b	۳/۲۲b	۵۷/۹۴b	۱/۲۶a	۱/۴۷b	۲۵/۹۹a	۱۱۹/۹۷a	۲۲۵۳/۷۵a	۱۳/۶۲a	۴۰/۹۵a	۴/۴۰a
b 1	۱/۳۱b	۳/۳۸b	۷۵/۷۵a	۱/۱۰a	۱/۲۹b	۱۴/۴۰d	۹۴/۲۰d	۱۳۵۶/۶۳c	۱۴/۹۰a	۵۰/۶۱a	۳/۳۸a
b 2	۱/۳۲b	۳/۳۸b	۷۰/۴۷ab	۱/۰۶a	۱/۵۰b	۲۰/۶۰c	۱۱۵/۴۲c	۲۰۴۵/۰۰b	۱۳/۸۸b	۴۳/۴۰a	۴/۲۶b
b 3	۱/۴۱ab	۳/۴۵ab	۶۳/۴۲b	۰/۹۵b	۱/۷۲a	۲۷/۸۰b	۱۲۱/۲۱b	۲۳۹۳/۵۰a	۱۲/۶۱c	۲۹/۴۳b	۳/۵۷c
b 4	۱/۴۸a	۳/۵۰a	۵۹/۸۱b	۰/۷۹c	۱/۸۵a	۳۱/۵۲a	۱۲۹/۷۶a	۲۵۲۸/۱۳a	۱۰/۶۴d	۲۵/۲۸b	۲/۶۰d

در هر ستون میانگین های دارای حروف مشابه بر اساس آزمون دانکن اختلاف آماری معنی دار با هم ندارند.

(محیط دیم=E2 , محیط آبی=E1) محیط: E (جو٪۲۵=b_4، جو٪۵۰=b_3، جو٪۷۵=b_2، جو٪۱۰۰=b_1) گیاه اصلی: b

منابع مورد استفاده

1. Arnon, D. I. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts; polyphenol-oxidase in Beta vulgaris. *Plant Physiology*. Vol, 24. pp:1-15.
2. Ashraf, M. Y, Azmi, A. R, Khan, A. H and Ala, S. A. (1994). Effect of water stress on total phenols, peroxidase activity and chlorophyll content in wheat. Acta Physiologiae Plantarum.Vol, No,3. pp: 1- 185.
3. Badawi, G. H., Y. Yamauchi, E. Shimada, R. Sasaki, N. Kawano, K. Tanaka and Tanaka, K. (2004). Enhanced tolerance to salt stress and water deficit by overexpressing superoxide dismutase in tobacco (*Nicotiana tabacum*) chloroplasts. *Plant Science*, Vol, 166. pp: 919-928.
4. Basra, A. S and Basra, R. K. (2011). *Mechanisms of Environmental Stress Resistance in Plants*.Translated by Kafi, M. A.Mahdavi Damghani. 467p.
5. Bogdanov, MF and Bical, MB. (1999). Acarbon column based LCEG approch to routin 8-OH-dG measurments in biological matrices. *Free Radical Biology & Medicine*.Vol, 27.pp: 647-666.
6. Casimir Brou,Y., A. Zeze, O. Diouf and Eyletters, M.(2007). Water stress induces overexpression of superoxide dismutases that contribute to the protection of cowpea plants against oxidative stress. *African Journal of Biotechnology*. Vol, 6, No, 17. pp: 1982-1986.
7. Fathi, G., G.K.Mc Donald and Lance, R.C. (1997). Effects of postanthesis water stress on the yield and grain protein concentration of barely grown at two levels of nitrogen. *Australian Journal of Agricultural Research*.Vol, 48. pp: 67-80.
8. Foyer, C.H. and Noctor, G. (2001). Oxygen Processing in photosynthesis: Regulation and signaling. New phytol.Vol, 146. pp: 359-388.
9. Francis, A.J and Alexander, M. (1972). Catalase activity and nitrogen fixation in legumes root nodules. *Canadian Journal of Microbiology*.Vol, 18. pp: 861-864.
10. Gholami, A., S. Shahsavani and Nezaeat, S. (2009).The of growth promoting Rhizobacteria (PGPR) on germination, seedling growth and yield of maize. *International Journal of Biological and Life Sciences*. 35p.
11. Ghorbani ghojdi, H. and Ladan Moghadam, A. (2005). Introduction to oxidative stresses and plant strains. Davavin Tehran. 128 p.
12. Jamet, A., K. Mandon, A. Puppo and Herouart, D. (2007). H2O2 is required for optimal establishment of the Medicago sativa/ Sinorhizobium meliloti symbiosis. *Journal of Bacteriology*. Vol, 189. pp: 8741-8745.
13. Jiang, Y. and Huang, B. (2001).Drought and Heat stress injury to two cool- season turfgrasses in relation to Antioxidant, metabolism and lipid peroxidation. *Crop science*.Vol, 41. pp: 436-449.
14. Jose, M. M., C. Preze Gomes and Castro, I.C.N.E. (1999). Chemical Biochemistry. Vol. No,3. pp: 595- 603.
15. Jin, J., S. h. Ningwei., B. Jinhe and Junping, G. (2006). Regulation of ascorbate peroxidase at the transcript level is involved in tolerance to postharvest water deficit stress in the cut Rose (Rose Hybrida L.) CV. Samantha.
16. Habibi,D.,M. Mashdi Akbar Boojar, A.Mahmoudi, M.R.Ardakani and Taleghani, D. (2004). Antioxidant enzymes in sunflower subjected to drought stress.pp:1-5.
17. Kazemi nasab, A. N.Khodbandeh, D. Habibi, M. N. Ilikaei and Bankeh saz, A. (2005). Effect of different plant denŁ sities and cycocel on cytoplasmic membrane stability and chlorophyll pigment content in maize. First International Conference on Life Sciences, Iran. Islamic Azad University, Karaj, Iran.
18. Kuroda, M., T. Qzawa and Imagava, H. (1990). Changes in chloroplast peroxidase Activity in Relation to chlorophyll loss in barley leaf segments. Physiologia plantarum.Vol, 80. pp: 555-650.
19. Kendall, E.J. and McKersie, B.D. (1989). Free radical and freezing injury to cell membrance of winter physiol. Plant. Vol,76.pp: 86-140.
20. Kellos, T.,L.Timar, V. Szilagyi, G. Szalai, G. Galiba and Kocsy, G. (2008). Effect of abiotic stress on antioxidants in maize.Acta Biologica Szegediensis. Vol,52,No,1,pp:173-174.
21. Lai, Q.X., Z.Y. Bao, Z. J. Zhu, Q. Q. Qian and Mao, B. Z. (2007). Effects of osmotic stress on antioxidant enzymes activites in leaf discs of P-IPT modified gerbera .J.Zhejiang Univ Sci B.Vol, 8, No,7. pp:458-464.
22. Matamoros, M.A., D.A., Dalton., J. Ramos.,M.R. Clemente., M.C., Rubio and Becana, M. (2003).Plant Physiology. *American Society of Plant Biologists Journal*.133:499-509.
23. Mayoral, M.L., D. Atsmon, D. Shimshi and Gromete-Elharan, Z. (1981). Effect of water stress on enzyme activities in wheat and Related wild species: Carboxylase Activity, electron transport and photophosphorilation in isolated chloroplasts.*Australian Journal of Plant physiology*.Vol,8,pp:385-393.
24. Majumdar, S., S. Ghosh, B.R. Glick, E.B.R. Glick and

Dumbroff, E.B. (1991). Activity of chlorophyllase, phosphoenlpyruvate carboxyllase, and Rubilose-1.5-bis phosphate carboxylase in the primary leaves of soybean during senescense and drought.Physiological plantarum. Vol, 81, pp: 473-480.

25. Mazaheri, D.(1994). Intercropping. Tehran University Publications. 262p.
26. Maunuksela, L.(2001).Molecular and physiological characterization of rhizosphere bacteria and Frankia in forest soils devid of actinorhizal plants.Academic Dissertation in General Microbiology.pp:1-54.
27. Merah, O.(2001). Potential importance of water status traits for durum wheat improvement under Mediterranean conditions. *Journal of Agricultural Research*. Vol, 137.pp: 139-145.
28. Mirza, N.A., B. Ben Bohlool and Somasegaran, P. (1990). *Soil Biology and Biochemistry*. Vol, 22. pp: 203-207.
29. Misra, H.P. and Fridovich, I. (1972). The Generation of super oxide Radical during oxidation. *Journal of Biological Chemistry*.
30. Nelson, L. M.(2004).Plant growth promoting rhizobacteria(PGPR): Prospects for new inocolants. pp:1-7.
31. Paglia, D. (1997). Studies on the quantitive trait Dase. J.Lab. med. Vol,70,pp: 158-165.
32. Pan, Y., L.J. Wn, Yu, z.l. (2006). Effect of salt and drought stress on antioxidant enzymes activities and SOD isoenzymes of liquorice (Glycyrrhiza uralensis fisch).Plant Growth Regul.Vol, 49. pp: 157-165.
33. Phazeli,F. M.Ghorbanli and Niknam, V. (2005). Effects of drought stress on pigments in the leaves of sesame(Sesamum Indicum L.). First International Conference on Life Sciences, Iran. Islamic Azad University, Karaj, Iran.
34. Rafiei,H., D. Habibi. N. Khodabandeh, J. Daneshian, M. Mashhadi akbar boojar, Shokravi, M. (2005). Determination of antioxidant enzyme activity levels as a parameter in determining forage sorghum varieties resistant to drought
35. Rajenran, G, F.Sing, A. J. Desai and Archana, G. (2008). *Biroresource Technology Journal*.Vol, 99. pp: 4544-4550.
36. Saei,M., D. Habibi, M. Mashhadi akbar boojar, A.Mahmoodi and Ardekani, M.R. (2005). Determination of antioxidant enzyme activity levels as a parameter in determining forage sorghum varieties resistant to drought. First International Conference on Life Sciences, Iran. Islamic Azad University, Karaj, Iran.
37. Sayeed Akhtar.M and Siddiqui, A. (2008). Biocontrol of a root- rot disease complex of chickpea by Glomus intraradices, Rhizobium sp and Pseudomonas straita. Crop protection.Vol, 27. pp: 410-417.
38. Santos, R., D. Herouart, A. Puppo and Touati, D. (2000). Critical protective role of bacterial superoxide dismutase in Rhizobium –legume symbiosis. Mol Microbiol .Vol,38,pp: 750-759.
39. Santos, R., T. Franza, M.L. Lapotte, C. Sauvage, D. Touati and Expert, D. (2001). Essential role of superoxide dismutase on the pathogenicity of Erwinia chrysanthemi strain 3937.Mol Plant Microbe Interact.Vol, 14, pp: 758-767.
40. Santiago, L.S., T.S. Lau, P.J. Melcher, O. Colin and Goldsein, G. (2000). Morphological and Physiological responses of Hawalian Hibiscas tiliaceus population to light, salinity and drought. *International Journal of plant & Soil Science.* Vol, 161,No,1.pp: 99-106.
41. Sigaud, S., V. Becquet, P. Frendo, A. Puppo and Herouart, D. (1999). Differential regulation of two divergent Sinorhizobium meliloti genes for HPII-like catalases during free-living growth and protective role of both catalases during symbiosis. *Journal of Bacteriology*.Vol, 181.pp: 2634–2639.
42. Serpil, U., and Ozlem Cekic, F. (2005).Changes in antioxidative enzymes of young and mature leaves of tomato seedlings under drought stress.Turk.J.Biol.29:211-216.
43. Steven, A. K. and Joseph, M. H. (1978). Lipid peroxidase in sample as measurd by liquid choromatography separation. Elin. Chem. 32: 217-220.
44. Tanaka, K., R. Masuda, T. Sugimoto and Z. Sakak.(1999). water efficiency – induced changes. In the contents.
45. Valentovic, P., M. Luxova, L. Kolarovic and Gasparikova, O. (2006). Effect of osmotic stress on compatible solutes content, membrane stability and water relations in two maize cultivars.*Plant Soil Environment*. Vol, 52, No,4. pp:186-191.
46. Walling, I., W.,Van.Vark, V.J.G. Houba and Vander lee, J.J. (1989). Soil and plant Analysis , a series of syllabi.Part 7. Plant Analysis procedures. The first Edition. Wageningen Agriculture University, 263p.
47. Yong,T., L. Zongsuo, S. Hongbo and Feng, D. (2006).Effect of water deficits on the activity of anti-oxidative enzymes and osmoregulation among three different genotypes of Radix Astragali at seeding stage.Colloids and Surfaces B:Biointerfaces.Vol,49.pp:60-65.
48. Zebri, G., J.A. Morgan and Lecain, D.R. (1991).Gas exchange and water Relations in water and salinity stressed wheat lines.J.*Agronomy & crop science*.Vol,166.pp:1-7.