Archive of SID

فرآیند و کارکرد گیاهی، جلد ٤، شماره ١٤، زمستان ١٣٩٤

تأثیر باکتری‌های محرک رشد بر تولید متابولیت‌های سازگاری و برخی خصوصیات یونجه همدانی در طی تنش خشکی

مهناز ظفری، علی عبادی*، قاسم پرمون و سدابه جهانبخش
[1] گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی
(تاریخ دریافت: ۹۳/۰٦/۲۸، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹٤/۰۲/۰۲)

چکیده:

خشکی یکی از مهم‌ترین تنش‌های محیطی است که رشد گیاه و تولید محصول را به طرز نامطلوبی تحت تأثیر قرار می‌دهد. به این منظور پژوهش به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در گلخانه دانشگاه محقق اردبیلی در سال ۱۳۹۲ انجام شد. تیمارهای آزمایش، شامل تنش خشکی در سه سطح ۳۵، ۵۵ و ۷۵ درصد ظرفیت مزرعه‌ای و تلقیح بذور با محرک‌های رشد، میکروریزا (*Glomus mosseae*)، ریزوبیوم (*Sinorhizobium meliloti*)، ترکیب هر دو نوع و عدم تلقیح که به عنوان شاهد انتخاب شد. نتایج نشان داد، اثرات مجزا و برهمکنش تنش خشکی و تلقیح بذر بر میزان پرولین، قندهای محلول، پایداری غشا، پتانسیل اسمزی، طول ساقه، وزن خشک اندام هوایی و سطح برگ یونجه تأثیر معنی‌داری داشت. میزان لیزین و متیونین تحت تأثیر تیمارهای آزمایش قرار گرفت. خشکی سبب افزایش تولید پرولین، قندهای محلول و موجب کاهش پتانسیل اسمزی، پایداری غشا، میزان لیزین، طول ساقه، وزن خشک اندام هوایی و سطح برگ گردید. به نظر می‌رسد محرک‌های رشد با افزایش در تولید متابولیت‌های سازگاری و کاهش پتانسیل اسمزی و پایداری غشا موجب کاهش تأثیرات مخرب تنش شده و در نهایت سبب افزایش طول ساقه، وزن خشک اندام هوایی و سطح برگ یونجه شد. در اکثر صفات اندازه‌گیری شده میکروریزا بهتر از ریزوبیوم عمل کرده اما استفاده همزمان آن‌ها همواره بهترین تأثیر را نشان داد. همچنین با توجه به معادلات رگرسیونی قندهای محلول و پتانسیل اسمزی بالاترین سهم را در پیش‌بینی آب سلول داشت. همچنین تغییرات سطح برگ و وزن خشک اندام هوایی با محتوای آب سلول به صورت معادله درجه دوم بوده اما طول ساقه در مقایسه با آنها کمتر تحت تأثیر محتوای آب سلول است. به طور کلی کاربرد توام میکروریزا و ریزوبیوم همواره بهترین تیمار در جهت کاهش تأثیرات تنش خشکی در گیاه یونجه بود که نشان دهنده وجود رابطه هم افزایی بین آنها می‌باشد.

کلمات کلیدی: پرولین، لیزین، پایداری غشا، میکروریزا و ریزوبیوم

مقدمه:

تنش‌های محیطی از فاکتورهای مهم کاهش محصولات کشاورزی در دنیا هستند. خشکی، دماهای بالا و پایین و شوری خاک به طور نامطلوبی جوانه‌زنی، رشد گیاه و در نهایت تولید محصول را تحت تأثیر قرار می‌دهند (Van Den Berg and Zeng, 2006). کمبود آب، می‌تواند به عنوان عدم وجود رطوبت کافی و ضروری برای یک گیاه به منظور رشد نرمال و کامل کردن چرخه زندگی تعریف شود (Manivannan *et al.*, 2008). یکی از حساس‌ترین مراحل فیزیولوژیکی گیاه که نسبت به خشکی حساس است رشد و توسعه سلول می‌باشد، که علت آن کاهش فشار آماس است. تنش آبی توسعه سلولی و رشد گیاه را به علت فشار پایین

*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: ebadi@uma.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

آماس متوقف می‌سازد (Makersie and Leshem, 1994). همچنین، کاهش جذب آب از راه ریشه‌ها، با کاهش تورژسانس سلول همراه بوده و موجب کاهش تقسیم سلولی و مهار رشد سلولی می‌شود (Yordanov *et al.*, 2000). کاهش میزان آب در محیط جذب، باعث اختلال در انتقال مواد غذایی و کاهش رشد را به دنبال دارد. کاهش آب سبب لوله‌ای شدن و پیچ خوردن برگ‌ها، بسته شدن روزنه‌ها، کاهش فتوسنتز، اثر روی تنفس، کاهش فضای بین سلولی، تخریب پروتئین‌ها و آنزیم‌ها، تولید مواد سمی و افزایش تولید انواع اکسیژن واکنش گر می‌شود (Shimshi *et al.*, 1992). تنش خشکی موجب کاهش محتوای نسبی آب و باعث تغییر در غشاء سلول و افزایش نشت الکترولیت‌های سلول می‌گردد (Fu *et al.*, 2004).

گیاهان از سازوکارهای متعددی جهت مقابله با تنش استفاده می‌کنند. تنظیم اسمزی، یک نوع سازگاری به تنش کمبود آب است که از طریق تجمع مواد محلول درون سلول‌ها، منجر به حفظ تورژسانس سلول‌ها و فرآیندهای وابسته به آن در پتانسیل‌های پایین آب می‌شود (Vinocur and Altman, 2005). تنظیم اسمزی از طریق تولید انواع مواد آلی مانند پرولین، بتائین و قندهای محلول در ریشه‌ها و اندام‌های هوایی است (Mohammadkkhani and Heidari, 2008; Ahmad and Sharma, 2010). قندهای محلول به عنوان ثبات دهنده غشاهای سلولی و حفظ کننده تورژسانس سلول‌ها، عمل می‌کنند. در حقیقت، در گیاهانی که قندهای محلول در پاسخ به تنش خشکی تجمع می‌یابند، تنظیم اسمزی بهتر صورت می‌گیرد (Slama *et al.*, 2007). اسیدآمینه پرولین معمولاً در مقادیر زیاد در پاسخ به تنش‌های محیطی، تجمع می‌یابد. شکستن سریع پرولین بعد از پایان یافتن شرایط تنش، ممکن است خود تأمین‌کننده عوامل مورد نیاز برای ATP فسفوریلاسیون اکسیداتیو میتوکندریایی و تولید ترمیم صدمات ناشی از تنش باشد (Bates *et al.*, 1973). مقدار چندین اسیدآمینه دیگر نیز تحت تأثیر تنش‌های مختلف مانند خشکی و شوری افزایش می‌یابد. متیونین یکی دیگر از اسیدهای آمینه است که غیر قطبی بوده و به همراه سیستئین جزء دو اسیدآمینه حاوی سولفور است. متیونین یک واسطه بیوسنتز سیستئین، کارنتئین، تورین، لستین، فسفولیپیدها بوده و به عنوان پیش‌ساز هورمون اتیلن و در تنظیم باز شدن روزنه‌های برگ موثر است، و از طرفی به عنوان باقی‌مانده پروتئین‌ها اکسید شده بوده که می‌تواند توسط رادیکال‌های فعال اکسیژن تولید شده در سیستم‌های زیستی تولید شود (Refsum *et al.*, 1998). همچنین لیزین در تنظیم باز شدن روزنه‌های برگ، در جوانه زنی دانه‌های گرده و در سنتز کلروفیل کاربرد دارد که می‌تواند نقش مهمی در افزایش تحمل گیاه به تنش ایفا کند (نجفی، ۱۳۹۲).

آخوندی و همکاران (۱۳۸۵) در مطالعه تأثیر تنش بر تجمع پرولین در یونجه نشان دادند که با افزایش تنش خشکی بر میزان تجمع پرولین در اندام‌های مختلف افزوده شد، چنین نتایجی توسط Dehqanzadeh و همکاران (۲۰۰۸) نیز گزارش شده است. سمیعیانی و همکاران (۱۳۹۲) در مطالعه اثر تنش خشکی بر برخی شاخص‌های بیوشیمیایی چند گونه گیاهی نشان دادند، تنش موجب افزایش میزان پرولین و فعالیت آنتی اکسیدان‌ها و کاهش قند محلول و محتوای کلروفیل برگ‌ها شد. افزایش شدت تنش خشکی موجب کاهش معنی‌دار در میزان فتوسنتز، تبخیر و تعرق و شاخص پایداری غشا نخود شد (زارع مهرجردی و همکاران، ۱۳۹۱). همچنین در گیاه اقاقیا مشاهده شد، خشکی بر روی پروتئین‌ها و پتانسیل اسمزی تأثیر داشته و موجب کاهش مقدار آن‌ها می‌شود (Soliman *et al.*, 2011).

یکی از مهم‌ترین روش‌های کاهش تأثیر تنش، استفاده از کودهای زیستی می‌باشد. کودهای زیستی دارای مواد نگهدارنده‌ای با انبوه بالای موجودات مفید خاکزی و یا به صورت فرآورده متابولیت این موجودات می‌باشند که در ناحیه اطراف ریشه و یا بخش‌های داخلی گیاه تشکیل کلونی داده و رشد گیاه میزبان را با روش‌های مختلف تحریک می‌کنند (Singh and Kapoor, 1999). اثرات مفید باکتری‌های محرک رشد شامل تحریک رشد گیاهان از طریق تثبیت نیتروژن اتمسفری، افزایش قابلیت دسترسی عناصر غذایی، افزایش سطح تماس ریشه، تولید تنظیم کننده‌های رشد و بهبود

www.SID.ir

Archive of SID

همزیستی مفید با گیاه میزبان در مراحل مختلف رشد می‌باشد (چوگان، ۱۳۸۳). فضائلی و بشارتی (۱۳۹۱) نشان داند که تلقیح با باکتری *Sinorhizobium meliloti* باعث افزایش معنی‌دار وزن خشک ریشه و اندام هوایی، تعداد گره‌های فعال و غلظت نیتروژن یونجه در شرایط شور می‌شود. Soliman و همکاران (۲۰۱۱) در مطالعه خود نشان داد کاربرد محرک‌های رشد موجب افزایش جذب عناصر به ویژه نیتروژن در اقاقیا شده و از این طریق موجب افزایش توان گیاه در تولید متابولیت‌های سازگاری جهت مقاومت گیاه می‌شود. هدف از این مطالعه بررسی تأثیر محرک‌های رشد بر تولید متابولیت‌های سازگاری و محتوای اسیدهای آمینه و نقش آنها در حفظ آماس سلول و رشد و توسعه برگ‌های یونجه همدانی می‌باشد.

مواد و روش‌ها:

طرح آزمایشی: این پژوهش به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کاملاً تصادفی در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه محقق اردبیلی با مختصات جغرافیای ۳۸/۲۵ شمالی ۴۸/۳۰ شرقی در ارتفاع ۱۵۰۰ متری از سطح دریا با سه تکرار در سال ۱۳۹۲ اجرا گردید. تیمارهای آزمایش شامل تنش کم‌آبی در ۳ سطح ۷۵، ۵۵ و ۳۵ درصد ظرفیت زراعی و تلقیح بذر با محرک‌های رشد میکوریزا (*Glomus mosseae*)، ریزوبیوم (*Sinorhizobium meliloti*)، مخلوط هر دو محرک رشد و شاهد (عدم تلقیح) بود. در این پژوهش میزان قندهای محلول، پرولین، لیزین، متیونین، پروتئین، پایداری غشا، پتانسیل اسمزی، محتوای آب نسبی سلول و همچنین سطح برگ، طول ساقه و وزن خشک اندام هوایی اندازه‌گیری شد. ظرفیت زراعی خاک به روش وزنی تعیین و بذور سالم و یکنواخت یونجه همدانی که از موسسه نهال و بذر کرج تهیه شده بود به روش دستی از توده بذری جدا شده و توسط آب مقطر استریل، شستشو داده شدند، سپس به مدت ۳۰ ثانیه در اتانل ۹۶ درصد قرار داده و دوباره با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. پس از آن بذور به مدت ۲ الی ۳ دقیقه در محلول کلرید جیوه قرار داده شد و با آب مقطر استریل شستشو داده شدند.

برای تعیین میزان آب مورد نیاز در هر بار آبیاری، در ابتدا میزان رطوبت خاک در حد ظرفیت زراعی تعیین و سپس گلدان‌ها به صورت روزانه دو نوبت وزن شده و در صورت کمتر بودن وزن گلدان‌ها از حد معین، آب مورد نیاز جهت تأمین حد رطوبتی مورد نظر به هر گلدان اضافه شد (۱۰ درصد از وزن به عنوان تفاوت رشد گیاهان در نظر گرفته شد) (Riahinia *et al.*, 2013). همچنین برای کاهش جمعیت قارچ های میکوریزا و سایر ریز جانداران بومی موجود در خاک اقدام به استریل کردن خاک گردید و سپس گلدان‌های پلاستیکی با ظرفیت ۵ کیلوگرم خاک انتخاب و به تمام آنها مقدار مساوی از خاکی اضافه شد (جدول ۱). در ادامه بسته به مورد با مایه تلقیح (باکتری ریزوبیوم از شرکت فناوری زیستی مهر آسیای تهران و مایه تلقیح قارچ از فناوری زیستی توران شاهرود تهیه شد) باهم آغشته شده سپس برای کشت در گلدان‌ها ابتدا لایه‌ای از خاک سطح گلدان‌ها را کنار زده و ۲۰ گرم از مایه تلقیح همراه ۲۰۰ عدد بذر آغشته شده را کشت کرده و سپس سطح آن‌ها با خاک پوشانده شد. نتایج آزمون تجزیه خاک مورد استفاده در زیر آمده است. بوته‌ها یونجه بعد از رشد و رسیدن به مرحله گلدهی(۶۵ روز بعد کاشت) نمونه های مورد نظر جهت اندازه‌گیری صفات بیوشیمیایی انجام شده و بعد گیاه کف بر شده و برای محاسبه طول ساقه، سطح برگ و وزن خشک اندام هوایی به آزمایشگاه منتقل شدند.

پتانسیل اسمزی: میزان پتانسیل اسمزی بافت گیاهی به روش Janardhan و Krishnamorthy (۱۹۷۵) براساس هدایت الکتریکی تعیین شد. در این روش یک گرم بافت تازه برگی توزین، له و با آب مقطر به حجم ۲۵ میلی‌لیتر رسانده شد. هدایت الکتریکی (EC) آن در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرائت شد. محتوای آب یک گرم نمونه دیگر نیز با قرار دادن آن‌ها در آون در دمای ۷۵°C به مدت ۴۸ ساعت به دست آمد و با استفاده از معادلات زیر پتانسیل اسمزی محاسبه شد. در این رابطه df فاکتور رقیق‌سازی، OP پتانسیل اسمزی است.

میزان پروتئین: برای اندازه‌گیری میزان پروتئین ۰/۵ گرم نمونه تر برگی در هاون چینی کوبیده و سپس ۳ میلی‌لیتر بافر

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ١ – نتایج تجزیه خاک مورد استفاده در آزمایش.

شوری ($dsm.m^{-2}$)	pH	کربن آلی(٪)	میزان عناصر قابل‌جذب (میلی‌گرم در لیتر)			ذرات خاک (٪)			بافت خاک
			نیتروژن	فسفر	پتاسیم	رس	سیلت	شن	
٠/٦٢٥	٧/٨٨	٠/٦٢	٠/٠٦	٨/٥	١٧٠	٢	١٤	٨٤	لومی

$$df=\frac{gr\text{ماده}\times 25}{\text{مقدار آب موجود در یک گرم بافت برگی}}$$

$$OP=\frac{\mathbf{Ec}\ (25^{\circ}\text{در دمای})\times \mathbf{0.36}\times df}{\mathbf{0.987}}$$

استخراج که شامل ٥ میلی‌لیتر تریس- اسید کلریدریک یک مولار، ٢٠٠ میکرولیتر Na_2EDTA یک مولار و ٠/٠٤ درصد (v/v- ٢- مرکاپتو اتانول) می‌باشد مخلوط شده و مخلوط حاصل به مدت ٢١ دقیقه با سرعت ١١٥٠٠ دور در دقیقه در دمای ٤ سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. سپس برای خارج کردن تمام ناخالصی‌ها موجود در نمونه قسمت بالایی داخل لوله مجدداً به مدت ٢٠ دقیقه در ٤٠٠٠ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شد و ٥٠٠٠ میکرولیتر از محلول برادفورد و ٢٩٠ میکرولیتر بافر استخراج و ١٠ میکرو لیتر عصاره استخراج را مخلوط کرده و بعد از ورتکس میزان جذب در طول موج ٥٩٥ نانومتر قرائت شد (Bradford, 1976).

میزان پرولین: اندازه‌گیری میزان پرولین برگ با استفاده از روش Bates و همکاران (١٩٧٣) صورت گرفت، یک گرم بافت برگی در ١٠ میلی‌لیتر سولفوسالیسیلیک اسید ٣/٣ درصد سائیده وهمگنای حاصل از کاغذ صافی عبور داده شد و با سرعت ٤٠٠٠ دور در دقیقه در دمای ٤ سانتی‌گراد به مدت ١٠ دقیقه سانتریفیوژ گردید و سپس به دو میلی‌لیتر از عصاره حاصل، دو میلی‌لیتر معرف نین‌هیدرین که ١/٢٥ گرم پودر اسید نین هیدرین را در ٣٠ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال حل نموده و سپس ٢٠ میلی‌لیتر اسید فسفریک ٦ مولار به آن اضافه کرده و سپس دو میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال خالص اضافه گردید. لوله‌ها به مدت یک ساعت در حمام آب گرم قرار داده شد و سپس چهار میلی‌لیتر تولوئن به هر یک از لوله‌ها اضافه و به مدت ١٥ تا ٢٠ ثانیه ورتکس گردید. پس از تشکیل دو فاز جداگانه، فاز بالایی رنگی، با دقت جدا و جذب آن با دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل یو وی ٢١٠٠ ساخت یونیکو امریکا) با طول موج ٥٢٠ نانومتر قرائت شد.

میزان قندهای محلول: اندازه‌گیری قندهای محلول برگ به روش فنول سولفوریک (Dubois *et al.*, 1956) با کمی تغییر صورت گرفت. به مقدار ٠/٢ گرم از نمونه‌های جوان‌ترین برگ پودر شده را با دو میلی‌لیتر بافر سدیم فسفات (pH= ٧) ساییده و با سرعت ١٠٠٠٠ دور در دقیقه به مدت ٢٠ دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. از محلول رویی ١٠ میکرولیتر برداشته و به آن ٩٩٠ میکرولیترآب مقطر افزوده شد. به ٠/٥ میلی‌لیتر از محلول حاصل، ٠/٥ میلی‌لیتر فنول ٥ درصد و ٢/٥ میلی‌لیتر اسید سولفوریک (٩٨ درصد) افزوده شد. پس از تثبیت رنگ به مدت ١٥–١٠ دقیقه در دمای ٣٠–٢٧ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و جذب نمونه‌ها در طول موج ٤٩٠ نانومتر صورت گرفت.

میزان لیزین و متیونین: اندازه‌گیری لیزین و متیونین با استفاده از روش Feller و همکاران (١٩٦٩) صورت گرفت، برای اندازه‌گیری میزان لیزین ٠/٥ گرم نمونه برگی را در ٥٠ میلی‌لیتر از هیدروکلریک اسید (٠/١ نرمال) حل کرده آن را با آب به حجم ١٠٠ میلی‌لیتر رسانده و صاف‌کرده و سپس نیم میلی‌لیتر از آن را با گلیسرول (٥٠ درصد)، دو میلی‌لیتر از بافر فسفات (pH=6) و یک میلی‌لیتر نین‌هیدرین حل و به مدت ٣٠ دقیقه در آب جوش ١٠٠ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و جذب در ٥٧٠ نانومتر قرائت شد. همچنین برای اندازه‌گیری مقدار متیونین ١٠ میلی‌لیتر از محلول فیلتر شده در مرحله سه لیزین را برداشته و در فلاکس ٥٠ میلی‌لیتری به آن چهار میلی-لیتر از سدیم هیدروکسید (٥ نرمال)، دو میلی‌لیتر از محلول گلیسین آبدار و دو میلی‌لیتر از محلول سدیم نیتروفری‌سیانید آبدار (٠/١) اضافه شد بعد از هر اضافه کردن خوب مخلوط (ورتکس) گردید. محلول حاصل به مدت ١٠ دقیقه در دمای ٤٠ درجه سانتی‌گراد و سپس به مدت ٥ دقیقه در حمام یخ

www.SID.ir

Archive of SID

نگهداری شد. پنج میلی‌لیتر هیدروکلریک‌اسید (۱:۱) را اضافه کرده و خوب مخلوط نموده و سپس به مدت ۳-۲ دقیقه خنک کرده و از صافی عبور داده شد. سپس میزان جذب در ۵۱۰ نانومتر قرائت و میزان لیزین و میتونین بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر محاسبه گردید.

پایداری غشاء: پایداری غشاء با استفاده از روابط زیر تعیین شد (Saneoka *et al*., 2004) ؛ که در آن T_1 و T_2 به ترتیب EC نمونه قبل و بعد از اتوکلاو و C_1 و C_2 به ترتیب EC نمونه شاهد قبل و بعد از اتوکلاو می‌باشد.

درصد خسارت غشاء = $1 - (1- T_1/T_2) / (1 - C_1/C_2) \times 100$

درصد پایداری غشاء = ۱ – درصد خسارت

محتوای آب نسبی بافت: برای اندازه‌گیری میزان محتوای آب نسبی بافت برگ با استفاده از روش Weatherley (۱۹۹۵) مقدار ۰/۵ گرم از نمونه‌های برگی جدا شدند. بلافاصله وزن تر آن‌ها تعیین شد. سپس نمونه‌ها در داخل لوله‌های آزمایش در بدار محتوای ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر غوطه‌ور شدند و به مدت ٦ ساعت در محیط نسبتاً خنک و بدون نور نگهداری شدند. پس از گذشت این مدت برگ‌ها را از داخل لوله‌های آزمایش در آورده و سریعاً با کاغذ خشک کن، آب روی برگ‌ها زدوده شد و وزن آن‌ها تعیین شد. سپس نمونه‌ها به داخل آون الکتریکی با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند و بعد از ٤٨ ساعت وزن خشک برگ‌ها تعیین گردید و با استفاده از رابطه زیر محاسبه محتوای آب نسبی تعیین شد.

$$RWC = \frac{\text{وزن تر} - \text{وزن خشک}}{\text{وزن خشک} - \text{وزن آماس}} \times 100$$

سطح برگ و طول ساقه و وزن خشک اندام هوایی: سطح برگ با دستگاه سطح سنج مدل ADC اندازه‌گیری شد. برای تعیین طول ساقه و وزن خشک اندام هوایی نیز تمام بوته‌های به طور کامل برداشت شده و سپس به آزمایشگاه منتقل شده و بعد از جدا نمودن شاخه‌های جانبی طول ساقه اصلی و وزن خشک اندام هوایی محاسبه و متوسط در هر گلدان تعیین شد. تجزیه آماری داده‌های توسط نرم‌افزار SAS و مقایسه میانگین با استفاده از آزمون LSD در سطح ۵ درصد انجام شد. تجزیه رگرسیونی با استفاده از SPSS و رسم نمودارها با استفاده از Excel صورت گرفت.

نتایج و بحث:

نتایج تجزیه واریانس‌ها نشان داد، اثرات اصلی و برهم کنش محرک‌های رشد و تنش کم‌آبی در سطح ۱ درصد بر پرولین و قندهای محلول معنی‌دار شد (جدول ۲). مقایسه میانگین اثرات متقابل نشان داد، در طی تنش، تولید پرولین و قندهای محلول افزایش پیدا کرده و استفاده از محرک‌های رشد نقش مهمی در افزایش تولید این متابولیت‌ها داشت. تیمار تلقیحی با میکوریزا بیشتر از ریزوبیوم بر تولید پرولین و قندهای محلول تأثیر داشت ولی با این وجود تلقیح مخلوط هردو محرک رشد بیش‌ترین تأثیر را بر میزان پرولین و قندهای محلول نشان داد، به طوری که این تیمار در تمام سطوح تنش بالاترین مقدار را به خود اختصاص داد (شکل ۱).

افزایش پرولین و قندهای محلول در شرایط خشکی در نتایج Dehqanzadeh و همکاران (۲۰۰۸) نیز دیده شده است. آخوندی و همکاران (۱۳۸۵) نیز افزایش تولید پرولین در یونجه در اثر خشکی را گزارش نمودند. تولید پرولین با تولید قندهای محلول ارتباط دارد. یکی از مسیرهای تولید پرولین گلوتامات می‌باشد، چنانچه با افزایش تولید قندهای محلول میزان تولید گلوتامات افزایش یافته و سنتز پرولین تشدید می‌یابد. Irigoyen و همکاران (۱۹۹۲) نیز تشدید بیوسنتز پرولین را ناشی از تأمین متابولیت α-گلوتارات توسط قندها گزارش کرده‌اند. Ghorbanli و Niakan (۲۰۰۵) نیز از دلایل تجمع پرولین در شرایط تنش، به تخریب پروتئین‌ها و انباشت برخی آمینواسیدهای آزاد در جهت تنظیم اسمزی سلول اشاره کرده‌اند. همچنین Rafiee و همکاران (۲۰۰۸) گزارش کردند، میزان قندهای محلول با اعمال تنش کم‌آبی در ذرت افزایش یافت. افزایش پرولین و قندهای محلول در تیمارهای تلقیح ممکن است به افزایش جذب عناصر غذایی به خصوص نیتروژن مربوط بوده که در تلقیح دوگانه به دلیل اثر هم افزایی میزان جذب نسبت به حالت انفرادی بیشتر بود. پرولین دارای ساختار

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ٢- تجزیه واریانس اثر کاربرد محرک‌های رشد و تنش خشکی بر صفات یونجه همدانی.

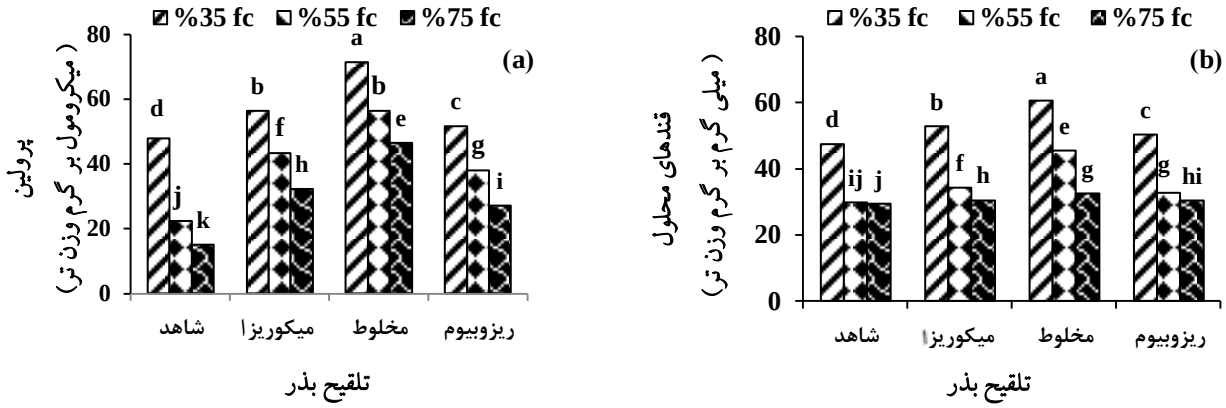
منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات					
		پرولین	قندهای محلول	پروتئین	لیزین	متیونین	پتانسیل اسمزی
تکرار	٢	٠/٠٠٢^{ns}	٠/٠٠٨٣^{ns}	٢/٧٦^{ns}	٠/٠٠١^{ns}	٠/٠٠٠٠٠٧^{ns}	٠/٠١١^{ns}
محرک رشد (M)	٣	١٣/١٦**	١/٨٨**	١٦٩/٤٩**	٠/٠٢٣*	٠/٠٠٠٠١٢^{ns}	١٨/٩٤**
خشکی (D)	٢	٢١/٦٢**	١٦/١٨**	٩٤٢/٠٧**	٠/٠١٩*	٠/٠٠٠٠٤٧**	١١٢/٣٣**
M × D	٦	٧/٨١**	٣/٦**	٥١٥/٩٨**	٠/٠٠٩^{ns}	٠/٠٠٠٠٠٩^{ns}	٢٧/٧٧**
خطای آزمایش	٢٢	٠/٠٠١	٠/٠٠١	٠/٨١	٠/٠٠٦	٠/٠٠٠٠٠٩	٠/١٧
ضریب تغییرات (٪)	-	٠/٧٥	٠/ ٨١	٢/١٣	٥/٩	٣/٦	٣/٣٢

ns،،* به ترتیب غیره معنی‌دار، معنی‌دار در سطح ١ و ٥ درصد.**

ادامه جدول ٢- تجزیه واریانس اثر کاربرد محرک‌های رشد و تنش خشکی بر صفات یونجه همدانی

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات				
		پایداری غشا	محتوای آب نسبی	ارتفاع ساقه	سطح برگ	وزن خشک اندام هوایی
تکرار	٢	٣/٠٢٧^{ns}	٠/١٩٨**	٠/١٩	٣/٤٤	٠/٠٣٨
محرک رشد (M)	٣	١٧٣/٥٤**	٢٨٦/١٤**	٢٢٢/٠٢**	٦٨٦/٤٧**	٦٠/٧٨**
خشکی (D)	٢	٦٤٠/٥٥**	٢٨٤٤/٩٤**	٢٨٦/٣٦**	٩١٩/٥٢**	٩٤/٣٨**
M × D	٦	٤٩٦/١١**	٦١٢/٧٥**	١٩٥/٥٥**	٣٦٠/٩٣**	٣٦/٦٥**
خطای آزمایش	٢٢	٢/٩٩	٠/٥٨	٠/٥٨	٢/٧٧	٠/٠٠٠٦٣
ضریب تغییرات (٪)	-	٣/١٨	١/٦٦	٣/٩٣	٧/٣٦	٠/٣٢

ns،،* به ترتیب غیره معنی‌دار، معنی‌دار در سطح ١ و ٥ درصد.**

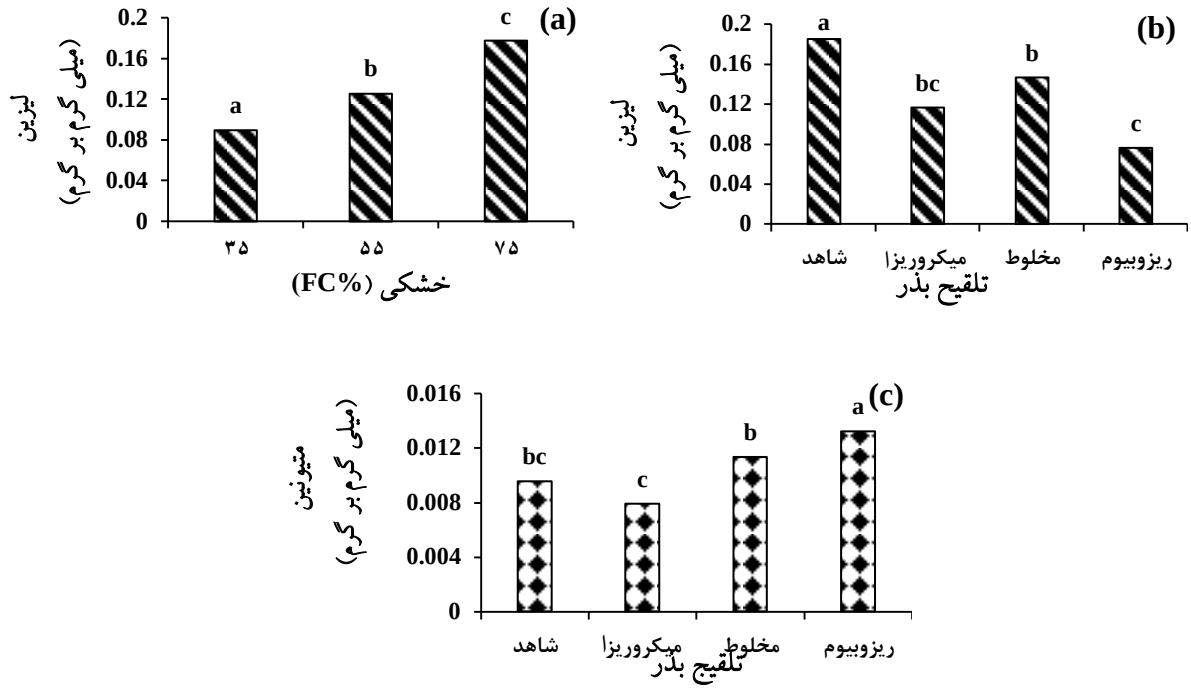


شکل ١- تأثیر محرک‌های رشد بر میزان پرولین (a) و قندهای محلول (b) یونجه تحت تنش کم‌آبی. حروف نامشابه نشان دهنده تفاوت معنی‌دار آزمون LSD در سطح ٥ درصد است.

نیتروژنی هست و استفاده از نیتروژن می‌تواند سبب افزایش مقدار آن‌ها در گیاه شود (Marschner, 1995). اثر هم افزایی به این دلیل است که گره‌های ریزوبیوم به دلیل نیاز شدیدی که به فسفر دارد به تلقیح با قارچ‌های میکوریزآربوسکولار واکنش مثبت نشان دهد. همچنین به هیف های میکوریزآربوسکولار چسبیده و از آن به عنوان راه نفوذ به ریشه استفاده می‌کنند؛

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲- تأثیر تنش خشکی بر میزان لیزین (a) و محرک‌های رشد بر میزان لیزین (b) و متیونین(c) یونجه تحت تنش کم‌آبی. حروف نامشابه نشان دهند تفاوت معنی‌دار آزمون LSD در سطح ۵ درصد.

بنابراین احتمالاً ریزوبیوم ها نیز با گسترش هیفها گسترش یابند و میزان فعالیت آن‌ها افزایش یابد (Bianciotto *et al.*, 2001)

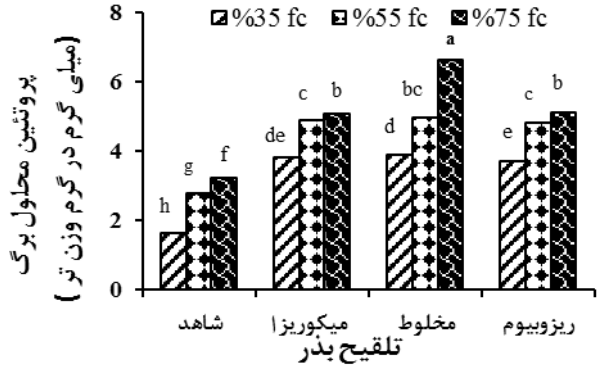
اثرات اصلی تنش خشکی در سطح ۵ درصد بر میزان لیزین تأثیر معنی‌داری نشان داد ولی بر مقدار متیونین بی تأثیر بود (جدول ۲). خشکی موجب کاهش مقدار لیزین در برگ‌های یونجه گردید، به طوری که مقدار این اسیدآمینه در شرایط عدم تنش (۷۵ درصد ظرفیت زراعی) ۰/۱۷۷ میلی‌گرم بر گرم بود، ولی شدیدترین سطح تنش با کاهش ۹۸ درصد به ۰/۰۸۹ میلی‌گرم بر گرم رسید (شکل ۲). تلقیح با محرک‌های رشد نیز در سطح ۵ درصد بر میزان لیزین تأثیرگذار بود. تلقیح بذر موجب کاهش میزان لیزین شد. بیشترین (۰/۱۸۵ میلی‌گرم بر گرم) و کمترین (۰/۰۷٦ میلی‌گرم بر گرم) مقدار لیزین به ترتیب از تیمار شاهد و تلقیح با قارچ ریزوبیوم بدست آمد. تلقیح بذر در سطح ۱ درصد بر میزان متیونین نیز تأثیر معنی‌داری داشت بر خلاف لیزین موجب افزایش مقدار این اسیدآمینه شد. ریزوبیوم بالاترین مقدار متیونین را به خود اختصاص داد (شکل ۲).

کاهش اسید آمینه‌های لیزین و متیونین در پژوهش توکلی و همکاران (۱۳۹۳) در طی تنش خشکی در ژنوتیپ‌های گندم نیز گزارش شده است. پژوهش‌گران معتقدند که افزایش رادیکال‌های آزاد در طی تنش موجب اکسیده کردن اسیدهای آمینه متیونین، هیستیدین و تریپتوفان می‌شود (Breusegem *et al.*, 2001). همچنین لیزین و متیونین پیش ماده سنتز پلی آمین‌های دیگر بوده که به عنوان تقویت کننده سیستم دفاعی عمل کرده و در شرایط تنش تجزیه این اسیدهای آمینه موجب افزایش تولید پلی آمین‌ها و افزایش مقاومت گیاه در مقابل تنش می‌شود (Pang *et al.*, 2007). همچنین محتوای اسیدهای آمینه و ترکیبات نیتروژن‌دار تحت تأثیر کود نیتروژن قرار می‌گیرد (Pavlik *et al.*, 2010). محرک‌های رشد از منابع تامین نیتروژن برای گیاهان بوده و فراهمی نیتروژن برای گیاهان اغلب باعث افزایش غلظت آمینواسیدها می‌شود (Atanasova, 2008). Eppendorfer (۱۹۷۸) در آزمایش‌های خود بر روی گیاهان مختلف به این نتیجه رسیدند که با افزایش نیتروژن از میزان اکثر اسیدهای آمینه (مانند لیزین، متیونین و...) کاسته شد (Mengel and Kirkby, 2001).

پروتئین‌های برگ نیز در سطح ۱ درصد تحت تأثیر

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳- برهمکنش محرک‌های رشد و تنش خشکی بر پروتئین محلول برگ‌های یونجه. حروف نامشابه نشان دهند تفاوت معنی‌دار آزمون LSD در سطح ۵ درصد.

برهمکنش محرک‌های رشد و تنش کم‌آبی قرار گرفت (جدول ۲). افزایش شدت تنش موجب کاهش پروتئین‌های محلول برگ شده و تلقیح بذر سبب افزایش مقدار آن شد. بیشترین پروتئین محلول برگ در تمام سطوح تنش به تلقیح دوگانه تعلق داشت و تیمارهای ریزوبیوم و میکوریزا در یک دامنه بوده و با یک دیگر تفاوت آماری نداشتند. بالاترین (٦/٤٣ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) و پایین‌ترین (١/٦٥ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) میزان پروتئین به ترتیب در تیمار تلقیحی مخلوط در ۷۵ درصد ظرفیت زراعی مشاهده شد (شکل ۳).

پژوهش‌دیگری تأثیر کاهش پتانسیل آبی خاک بر روی پروتئین و رنگیزه های موجود در کلروپلاست را گزارش نمود (Soliman *et al.*, 2011). تنش رطوبتی وضعیت پلی ریبوزوم های مؤثر در ساخته‌شدن پروتئین‌ها در بافت‌ها را تغییر می‌دهد. تعداد پلی ریبوزوم‌ها در شرایط کم‌آبی کاهش می‌یابد. در این رابطه مطالعات انجام گرفته در ذرت دلالت بر این دارد که افزایش سطح تنش آبی موجب کاهش در سطح پلی ریبوزوم‌ها شده و در نتیجه گونه‌های گیاهی که توانسته‌اند تحت این شرایط ادامه بقاء یابند، ظرفیت و توانایی بیشتری در جهت تولید پلی ریبوزوم‌ها در بافت‌های خود نشان داده‌اند (Scott *et al.*, 1979). یون‌های فلزی از قبیل آهن به عنوان عنصر ریزمغذی ضروری دخیل در تقسیم سلولی، متابولیسم اسید نوکلئیک و سنتز پروتئین هستند (Cakmak *et al.*, 1999). فتحی امیر خیز و همکاران (۱۳۹۰) گزارش نمودند، کاربرد آهن تاثیری مثبت در افزایش مقدار پروتئین‌های محلول برگ گلرنگ در تنش کم‌آبی داشت. از طرف دیگر همان طور که در بحث پرولین و قندهای محلول ذکر شد نیتروژن در ساخت پروتئین نقش دارد و با تغییر مقدار آن در اثر تنش پروتئین‌ها تخریب‌شده و میزان آن‌ها کاهش می‌یابد. همچنین از آنجا که نیتروژن در گیاهان به صورت پروتئین تکامل می‌یابد و یکی از منابع ساخت نیتروژن باکتری‌های تثبیت‌کننده نیتروژن و میکوریزا می‌باشند از طرف دیگر همان طور که ذکر گردید این دو ریز جانداران باعث افزایش جذب عناصر آهن و پتاسیم می‌شود؛ بنابراین افزایش میزان نیتروژن، آهن و پتاسیم در گیاه منجر به افزایش میزان پروتئین می‌شود. در مطالعه Movludi و همکاران(۲۰۱٤) نشان دادند مصرف نیتروژن در طی تنش کم آبی موجب افزایش میزان قندهای محلول و پرولین در برگ‌های جوه بهاره شد.

پایداری غشاء تحت تأثیر تنش خشکی و تلقیح بذر قرار گرفت، اثرات اصلی خشکی و تلقیح بذر و برهمکنش آن‌ها در سطح ۱ درصد دارای تفاوت آماری بود (جدول ۲). مقایسه میانگین اثرات متقابل نشان داد، تنش موجب کاهش پایداری غشاء شده و استعمال محرک‌های رشد نقش موثری در کاهش این تأثیرات و افزایش پایداری غشاء نشان دادند. بالاترین پایداری غشاء در بین تیمارهای مختلف تلقیح مربوط به استعمال همزمان میکروریزا و ریزوبیوم (مخلوط) بود. همچنین مشاهده شد، کاربرد میکروریزا به تنهایی تأثیر بهتری در مقایسه با ریزوبیوم نشان داد و در درجه دوم اهمیت قرار گرفت. به طور کلی بالاترین (۷۱ درصد) و پایین‌ترین (۳۲ درصد) پایداری غشاء به ترتیب مربوط به تلقیح بذر با هردو محرک در

www.SID.ir

Archive of SID

شرایط عدم تنش و عدم تلقیح بذر در تنش ۳۵ درصد ظرفیت زراعی است (شکل ٤).

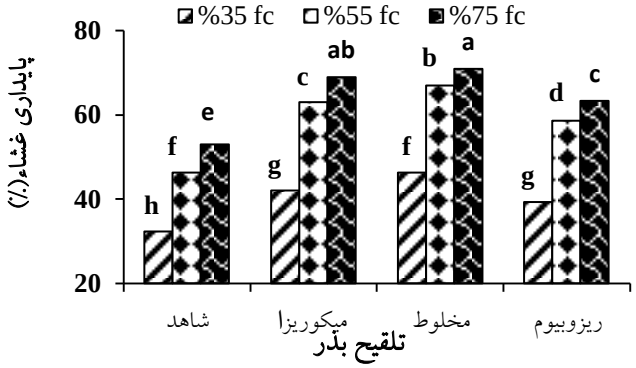
تنش با تولید رادیکال‌های سمی و اکسیژن آزاد موجب اکسیده شدن چربی‌های غشاء و از بین رفتن پایداری غشاء می‌شود (Wang and Huang, 2004). در چنین شرایطی گیاه با تولید متابولیت‌های سازگاری (پرولین و قندهای محلول) موجب کاهش تأثیرات منفی تنش می‌شود. قندهای محلول می‌توانند سبب تنظیم اسمزی، پایداری غشاء و پروتئین‌های در حال خشک شدن شوند و از طریق جایگزین شدن با آب موجود در غشاءی لیپیدی از متراکم شدن فسفولیپیدها جلوگیری کنند و باعث افزایش پایداری غشاء می‌شود (Irigoyen *et al.*, 1992). در تلقیح دوگانه در اثر افزایش فتوسنتز ناشی از افزایش کلروفیل، هدایت روزنه و عملکرد کوانتومی و بهبود وضعیت آبی و همچنین افزایش تنظیم‌کننده-های اسمزی، مانند پرولین و قندهای محلول میزان تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن ناشی از تنش کم‌آبی به شدت کاهش می‌یابد. در نتیجه میزان آسیب به غشاءها کاهش یافته و میزان پایداری غشاء افزایش می‌یابد (Wang and Huang, 2004).

برهم‌کنش خشکی و تلقیح بذر بر پتانسیل اسمزی برگ‌های یونجه تأثیرگذار بود (جدول ۲). تنش موجب کاهش پتانسیل اسمزی شده و تلقیح بذر نیز موجب افزایش مقدار آن شد. با توجه به نتایج موجود در شکل ۵ مشاهده می‌شود. سطوح پایین تنش تأثیر غیره معنی‌داری بر پتانسیل اسمزی داشته به طوری که در شرایط عدم تلقیح (شاهد) بین ۷۵ و ۵۵ درصد ظرفیت زراعی تفاوت آماری مشاهده نشد. همچنین در شرایط عدم تنش (۷۵ درصد ظرفیت زراعی) تلقیح بذر تأثیری بر پتانسیل اسمزی نداشته ولی با شدت یافتن تنش تفاوت بین تیمارهای تلقیح افزایش یافت. پایین‌ترین پتانسیل اسمزی (بالاترین پتانسیل منفی) از تلقیح مخلوط در سطح ۳۵ درصد ظرفیت زراعی بدست آمد (شکل ۵). یافته‌های این پژوهش با نتایج Dehqanzadeh و همکاران (۲۰۰۸) مطابقت دارد. در طی تنش، پتانسیل آب سلول به پایین‌تر از حد آستانه می‌رسد. کاهش تورژسانس باعث فعال شدن یک توالی پیچیده فرآیندهای تطابقی مرتبط با سطح تحمل گیاه به تنش می‌شود. در چنین شرایطی آنزیم پروتئولاز افزایش می‌یابد و سنتز پرولین به‌منظور افزایش توان جذب آب تشدید می‌شود. (Ghorbanli and Niakan, 2005). تجمع املاح و محلول‌های سازگاری موجب متعادل کردن پتانسیل واکوئل‌ها و کاهش پتانسیل اسمزی سلولی می‌شود (Mansour *et al.*, 2005). از متابولیت‌های سازگار می‌توان به تجمع پرولین، قندهای محلول و برخی از اسید آمینه‌های دیگر، مانند لیزین و متیونین اشاره کرد که در این پژوهش نیز با افزایش تنش تولید آن‌ها افزایش پیدا کرد. کاهش پتانسیل اسمزی از طریق تجمع املاح در سلول‌ها و حفظ فشار آماس سلول‌ها به توسعه و رشد گیاه در شرایط تنش کمک می‌کند. استفاده از محرک‌های رشد موجب بهبود تنظیم اسمزی در جهت افزایش تحمل گیاه به تنش شد. چنین نتایجی توسط مطالعات دیگر نیز گزارش شده است (Kaschuk *et al.*, 2010). تجمع محلول‌های سازگار در شرایط تنش با توجه به وجود نیتروژن در ساختار آن‌ها موجب تحمیل هزینه کربن و نیتروژن بر گیاه می‌شود. از این‌رو استفاده از محرک‌های رشد با تأمین نیتروژن تا حد زیادی سبب افزایش مقدار آن‌ها در گیاه شده و موجب تنظیم اسمزی می‌شود (Soliman *et al.*, 2011).

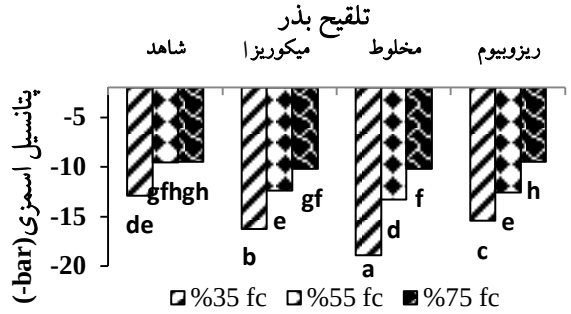
محتوای آب نسبی نیز تحت تاثیر اثرات اصلی و برهمکنش محرک‌های رشد و تنش خشکی در سطح ۱ درصد قرار گرفت (جدول ۲). مقایسه میانگین‌ها نشان داد، تنش موجب کاهش محتوای آب نسبی سلول و تلقیح با کاهش تاثیرات تنش، سبب افزایش محتوای آب نسبی بافت شد. مشاهده شد بین تنش ۷۵ و ۵۵ درصد ظرفیت زراعی تفاوت زیادی نیست ولی تنش ۳۵ درصد موجب کاهش شدید در آب سلول شد. تنش موجب افزایش اختلاف بین تیمارهای تلقیح نیز شده است. در بین تیمارهای تلقیح، تلقیح مخلوط بیشترین تاثیر را نشان داد، به طوری که بیشترین (۹۱/۱ درصد) و کمترین (۵۲ درصد) محتوای آب نسبی به ترتیب از تیمار مخلوط در ۷۵ درصد ظرفیت زراعی و شاهد در ۳۵ درصد ظرفیت زراعی بدست آمد (شکل ٦).

www.SID.ir

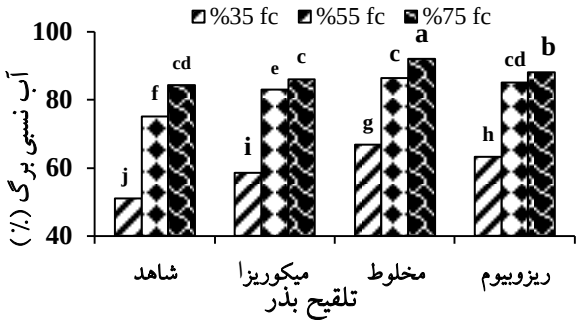
Archive of SID



شکل ٤- برهم‌کنش محرک‌های رشد و تنش خشکی بر پایداری غشاء برگ‌های یونجه. حروف نامشابه نشان دهند تفاوت معنی‌دار آزمون LSD در سطح ٥ درصد.



شکل ٥- برهم‌کنش محرک‌های رشد و تنش خشکی بر پتانسیل اسمزی برگ‌های یونجه. حروف نامشابه نشان دهند تفاوت معنی‌دار آزمون LSD در سطح ٥ درصد.



شکل ٦- برهم کنش محرک‌های رشد و تنش خشکی بر میزان آب نسبی برگ‌های یونجه. حروف نامشابه نشان دهند تفاوت معنی‌دار آزمون LSD در سطح ٥ درصد.

کاهش رشد و فعالیت ریشه و افزایش میزان تبخیر و تعرق از جامعه گیاهی از عوامل کاهش محتوای آب نسبی بافت شناخته شده‌اند (Tarumingkeng and Coto, 2003). به نظر می‌رسد محرک‌های رشد با جذب بیشتر آب توسط هیف‌ها می‌توانند در افزایش محتوای آب نسبی بافت نقش داشته باشند. تصور می‌شود عامل دیگری نیز مانند افزایش جذب آب نیز در بالا بردن آب نسبی برگ دخیل باشد. به طوری که تلقیح مخلوط با افزایش جذب عناصر غذایی و افزایش جذب آب و همچنین گسترش ریشه‌ها ناشی از گسترش هیف‌های میکوریزا بیشترین محتوای آب نسبی را به خود اختصاص داد. علاوه بر آن با افزایش پرولین و قندهای محلول در حضور تلقیح دوگانه میزان محتوای آب نسبی نیز افزایش می‌یابد که احتمالاً به دلیل حفظ آماس است. با توجه به نتایج معادلات رگرسیونی مشاهده می‌شود در طی تشدید تنش سهم متابولیت‌های

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳- پیش‌بینی محتوای آب نسبی با استفاده از صفات اندازه‌گیری شده در طی تنش.

صفات مستقل	همبستگی	ضرایب رگرسیونی معادله				مدل
	R square	b_0	b_1	b_2	b_3	Model
قندهای محلول	۰/۸۹٤	۱۱٤/۸۳**	−۷/۸۰٦**	−۰/٤۳٦**	۰/۰۰۰**	$Y = b_0+b_1X+b_2X^2+b_3X^3$
پرولین	۰/۳۸۵	۵۲/۲۸**	۲۷/۹۳**	−۷/۳۵۷**	۰/٤۸۳**	$Y = b_0+b_1X+b_2X^2+b_3X^3$
لیزین	۰/۲۸٤	۹۵/۳۱*	−۲۲٦/٦٤^{ns}	٦۲۱/۰۹**	−٦٤۹/۹۰^{ns}	$Y = b_0+b_1X+b_2X^2$
متیونین	۰/۰۳۵	٦۹/۲۸^{ns}	٦۹٤/۱۹^{ns}	....^{ns}	....^{ns}	$Y = 0$
پروتئین	۰/۲۳۸	۲۸/۹۷^{ns}	۱/٦۷^{ns}	۱۱/٦۰**	−۱/۰٦**	$Y = b_2X^2$
پتانسیل اسمزی	۰/۸۸۲	۱۱۸/۱۸**	−۲/۵٤^{ns}	−۰/۵۷^{ns}	۰/۰۰**	$Y = b_0+b_1X+b_2X^2+b_3X^3$
پایداری غشاء	۰/۸۳۱	−۱٦/۰۸*	۲/۲۲**	۰/۰۰۰	−۰/۰۰۰**	$Y = b_0+b_1X+b_2X^2+b_3X^3$

ns،، * به ترتیب غیره معنی‌دار، معنی‌دار در سطح ۱ و ۵ درصد**

سازگاری به قندهای محلول در پیش‌بینی محتوای آب نسبی بافت افزایش می‌یابد (جدول ۳). افزایش قندهای محلول با توجه به نقش آن در پایداری غشا موجب افزایش سهم پایداری غشا در تنظیم آب بافت می‌شود.

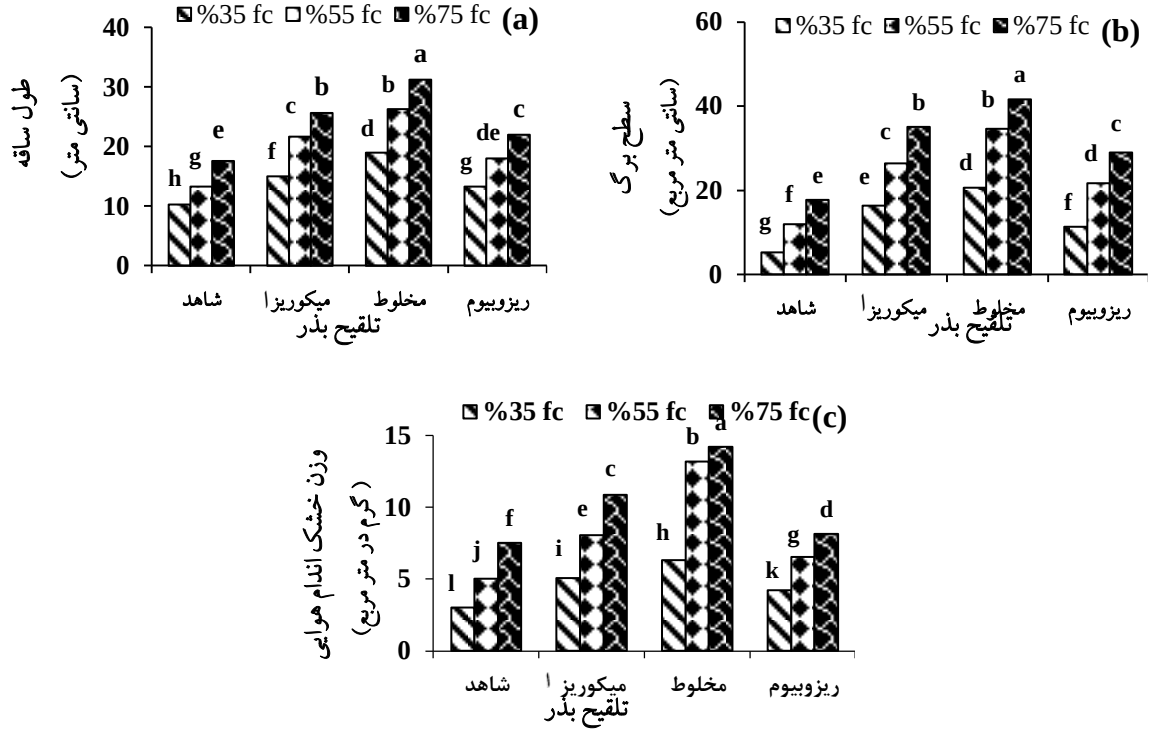
در طی تنش به علت تخریب پروتئین‌ها و انباشت برخی آمینواسیدهای آزاد در جهت تنظیم اسمزی سلول موجب افزایش تولید پرولین می‌شود (Ghorbanli and Niakan, 2005). تغذیه گیاه با نیتروژن باعث افزایش محتوای رطوبت نسبی برگ می‌شود (Saneoka *et al.*, 2004) چنین نتایجی توسط Allam و Haider (۲۰۰۷) نیز اشاره کرده‌اند. تجزیه پروتئین‌ها در طی تنش یکی از عوامل اصلی افزایش تولید پرولین در طی تنش شده است. به نظر می‌رسد با توجه به این که رابطه هم افزایی بین محرک‌های رشد وجود دارد این عامل می‌تواند در کاهش تاثیرات تنش و افزایش جذب عناصر به ویژه نیتروژن نقش داشته باشد و موجب افزایش کربن و نیتروژن مورد نیاز تولید پرولین و دیگر اسیدهای آمینه و کاهش تجزیه پروتئین‌ها شود.

با توجه به تجزیه واریانس‌ها مشاهده می‌شود که اثرات اصلی تنش خشکی و تلقیح بذر و برهم‌کنش آن‌ها در سطح احتمال ۱ درصد بر طول ساقه، سطح برگ و وزن خشک اندام هوایی یونجه معنی‌دار بود (جدول ۲). مقایسه میانگین اثرات متقابل نشان داد، تنش موجب کاهش ارتفاع، سطح برگ و وزن خشک اندام هوایی یونجه شده و کاربرد محرک‌های رشد نیز موجب افزایش مقدار آن‌ها شد. با توجه به نتایج مشاهده می‌شود کاربرد میکروریزا در مقایسه با ریزوبیوم بهتر عمل کرده و همواره در تمام سطوح تنش بالاتر از ریزوبیوم بود ولی با این وجود کاربرد همزمان آن‌ها بالاترین طول ساقه، سطح برگ و وزن خشک اندام هوایی را نشان داد. بالاترین طول ساقه (۳۱ سانتی‌متر)؛ سطح برگ (٤۱/٦٦ سانتی‌متر مربع) و وزن خشک اندام هوایی(۱٤/۵۲ گرم در متر مربع) در ۷۵ درصد ظرفیت زراعی و تلقیح مخلوط بذر و کمترین مقدار آن‌ها (۱۰/۳۳ سانتی‌متر طول ساقه،۵/۳ سانتی‌متر مربع در بوته سطح برگ و ۳/۵۷ گرم در متر مربع وزن خشک اندام هوایی) نیز از ۳۵ درصد ظرفیت زراعی از بذور تلقیح نشده بدست آمد (شکل ۷).

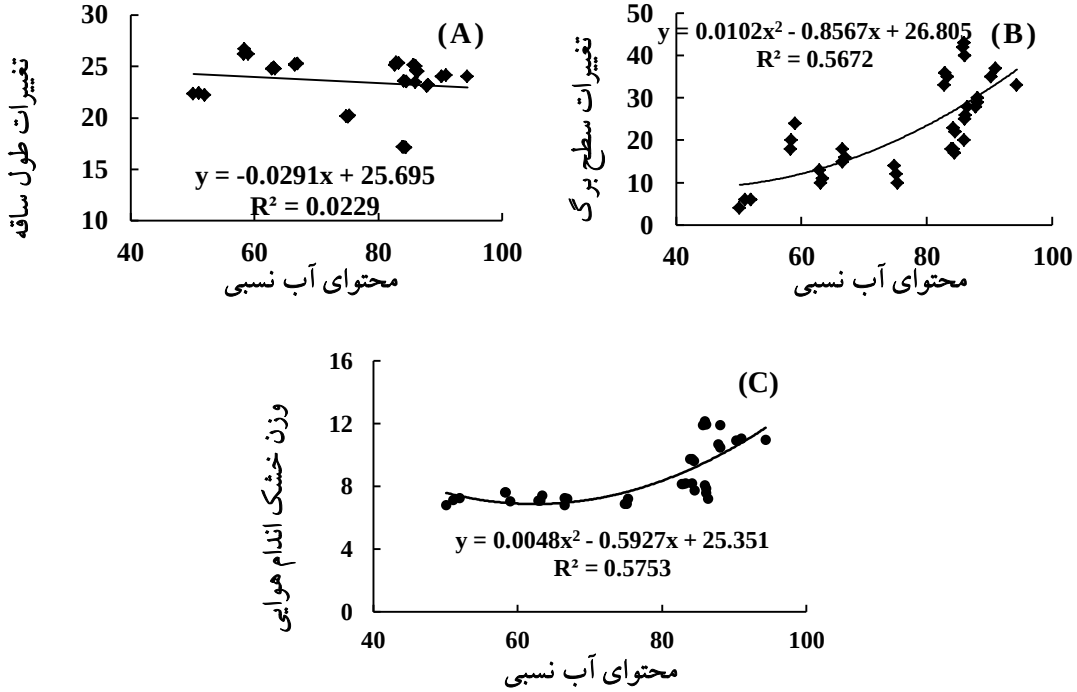
کاهش طول ساقه و سطح برگ و وزن خشک اندام هوایی با افزایش تنش در گزارش Pennypacker و همکاران (۱۹۹۰) نیز گزارش شده است. رشد برگ اولین فرایندی است که به کمبود آب واکنش نشان می‌دهد و در نتیجه سطح برگ در گیاه کاهش می‌یابد (Paye, 2000). کمبود آب با کاهش آماس سلولی، رشد و تقسیم سلول‌ها را کاهش داد و در نتیجه تعداد و سطح برگ و طول ساقه و وزن خشک در گیاه کاهش پیدا می‌کند (Desuloux *et al.*, 2000). با توجه به تغییرات سطح برگ و وزن خشک اندام هوایی در طی محتوای آب بافت مشاهده می‌شود که تغییرات آنها با یکدیگر به صورت معادله درجه دوم می‌باشد. به طوری که افزایش محتوای آب بافت تا یک حدی موجب افزایش سطح برگ و وزن خشک گردید.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۷- برهمکنش محرک‌های رشد و تنش خشکی بر طول ساقه (a) و سطح برگ (b) و وزن خشک اندام هوایی (c) یونجه. حروف نامشابه نشان دهند تفاوت معنی‌دار آزمونLSD در سطح ۵ درصد.



شکل ۸- پیش‌بینی طول ساقه (A)، سطح برگ (B) و وزن خشک (C) طی تغییرات محتوای آب نسبی سلول‌ها.

طول ساقه در مقایسه با سطح برگ و وزن خشک اندام هوایی کمتر تحت تأثیر محتوای آب بافت می‌باشد و تغییرات آن‌ها کمترین ضریب همبستگی را نشان داد (شکل ۸). همچنین میکوریزا با افزایش جذب عناصر غذایی و حضور

www.SID.ir

Archive of SID

هیف‌های قارچ موجب افزایش سطح جذب کننده ریشه و افزایش در جذب آب که این امر موجب کاهش تأثیرات تنش می‌گردد (Baon *et al.*, 1994). محرک‌های رشد با تأثیر مستقیم در تثبیت زیستی نیتروژن و افزایش قابلیت دسترسی عناصر غذایی مختلف برای گیاه باعث افزایش رشد گیاه می‌شوند. تحقیقات نشان داده که بین قارچ‌های میکوریزا و باکتری‌های ریزوبیوم اثر متقابل مثبت وجود دارد (Antunes *et al.*, 2005). در پژوهش‌های Azcon و همکاران (۱۹۹۱) نیز گزارش شده است که اثر توأم دو ریزجاندار ریزوبیوم و میکوریزا باعث افزایش جذب عناصر فسفر، نیتروژن و پتاسیم در گیاه یونجه شده است. همچنین افزایش جذب عناصر میکرو و ماکرو در تلقیح دوگانه میکوریزا با ریزوبیوم در پژوهش Soliman و همکاران (۲۰۱۱) دیده می‌شود. افزایش جذب عناصر موجب افزایش تقسیم سلولی و فتوسنتز گیاه شده و نقش مهمی در بهبود رشد گیاه دارد.

نتیجه‌گیری:

با توجه به نتایج این پژوهش مشاهده شد که خشکی موجب کاهش محتوای آب نسبی بافت و در نتیجه کاهش پتانسیل اسمزی و آسیب رسیدن به غشاءی سلولی شده کاهش رشد و تقسیم سلولی و آسیب رسیدن به پروتئین‌ها و در نهایت موجب کاهش سطح برگ و طول ساقه و وزن خشک اندام هوایی یونجه شد. در این شرایط تولید متابولیت‌های سازگاری مانند قندهای محلول، پرولین در گیاه افزایش یافت. به نظر می‌رسد که افزایش تولید متابولیت‌های سازگاری با افزایش در تجزیه پروتئین، اسید آمینه لیزین ومتیونین به عنوان پیش ماده تولید پلی آمین‌ها و همراه می‌باشد. تولید متابولیت‌های سازگاری با بالابردن پتانسیل اسمزی و همچنین جلوگیری از بهم چسبیدن غشاء سلولی موجب بهبود پایداری غشا و افزایش محتوای آب نسبی سلول می‌گردد. همچنین استفاده از محرک‌های رشد با افزایش کربن و عناصر به ویژه نیتروژن موجب افزایش توان گیاه در مقاومت به خشکی می‌شود. در بین تیمارهای مختلف استفاده همزمان میکروریزا و ریزوبیوم به بهترین نتیجه را نشان داد. که این نشان دهنده وجود رابطه هم افزایی بین قارچ میکروریزا و باکتری ریزوبیوم در گیاه یونجه در شرایط خشکی می‌باشد.

منابع:

آخوندی، م. صفرنژاد، ع. لاهوتی، م. ۱۳۸۵. اثر تنش خشکی بر تجمع پرولین و تغییرات عناصر در یونجه یزدی نیکشهری و رنجر(*Medicage sativa* L.). علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی. ۱۷٤:۱-۱٦۵.

توکلی، ح. عبادی، ع. جهانبخش، س. ۱۳۹۳. بررسی برخی از ساز و کارهای تحمل به تنش کم‌آبی در ژنوتیپ های گندم نان. تحقیقات غلات. ۲۵:۱-۱۳.

چوگان، ر .۱۳۸۳. اصلاح ذرت برای تحمل تنش خشکی و نیتروژن (ترجمه). انتشارات وزارت جهاد کشاورزی . ص ۹۵.

زارع مهرجردی، م. باقری، ع. بهرامی، ا.ر . نباتی، ج. معصومی، ع .۱۳۹۱. تأثیر تنش خشکی بر خصوصیات فتوسنتزی، ترکیبات فنلی و ظرفیت مهار رادیکال های فعال ژنوتیپ های مختلف نخود (*Cicer arietinum* L.) در محیط آبکشت. علوم و فنون کشت های گلخانه ای۱٤:. ۷٦-۵۹.

سمیعیانی، ا. انصاری، ح. عزیزی، م. هاشمی نیا، م . سلاحورزی، ی. ۱۳۹۲. اثر تنش خشکی بر برخی شاخ صهای بیوشیمیایی در چهار گونه گیاه پوششی (چمن لولیوم پرنه، پتنتیلا، شبدر سفید و فرانکینیا) با قابلیت استفاده در فضای سبز. علوم و فنون کشت های گلخانه ای ۱۵:۱۰۹-۱۰۱.

فتحی امیرخیز، ک.، امینی دهقی، م.، مدرس ثانوی، ع.، حشمتی، س. ۱۳۹۰. تاثیر کاربرد خاکی و برگی عنصر آهن بر برخی خصوصیات بیوشیمیایی گلرنگ (*Catthamus tinctorius* L.)، تحت دو رژیم رطوبتی. مجله علوم گیاهان زراعی ایران ٤۲: ۵۰۹-۵۱۸.

نجفی، م. نقش اسیدهای آمینه در کشاورزی ارگانیک. http://www.talfighdaneh.ir/News/post-23550 زمان استخراج اسفند ۱۳۹۲

Ahmad, P. and Sharma, S. (2010) Physiobiochmical attributes in two cultivars of mulberry (*Morus alba* L.) under $NaHCO_3$ stress. International Journal of Plant Production 4: 79-86.

www.SID.ir

Archive of SID

Feller, R. E., Feller, D. A. and Shepherd, A. D. (1969) Determiation of free lysine and Methionine in Amino acid-Forttified wheat. HortScience 46: 614-620.

Fu, J., J. Fry and Huang, B. (2004) Minimum water requirements of four turfgrasses in the transition zone. HortScience 39: 1740-1744.

Ghorbanli, M., and Niakan, M. (2005) Study the effect of drought stress on soluble sugars, protein, proline, phenol compounds and reductase enzyme activity in soybean plants cv. Gorgan 3. Tarbiat Moallem University Sci Magazin. 5: 537-550.

Irigoyen, J. J., Emerich, D. W., Sanchez-Diaz, M. (1992) Alfalfa leaf senescence induced by drought stress: photosynthesis, hydrogen peroxide metabolism, lipid peroxidation and ethylene evoluation. Physiologia Plantarum 84:67-72.

Janardhan, K. V. and Krishnamorthy, V. (1975) A rapid method for determination of osmotic potential of plant cell. Current Science 44: 390-391

Kaschuk, G, Leffelaar, P. A, Giller, K. E, Alberton, O., Hungria, M. and Kuyper, T. W. (2010) Responses of legumes to rhizobia and arbuscular mycorrhizal fungi: a meta-analysis of potential photosynthate limitation of symbioses. Soil Biology and Biochemistry 42: 125-127

Makersie, B. D. and Leshem, Y. Y. (1994) Stress and stress coping in cultivated plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands

Manivannan, P., Abdul Jaleel, C ,.Somasundaram, R. and Panneerselvam, R. (2008) Osmoregulation and antioxidant metabolism in drought-stressed Helianthus annuus under triadimefon drenching. Comptes Rendus Biologies 331: 418–425.

Mansour, M. M. F., Salama, K. H., Ali. F. Z. M. and Abou Hadid, A. F. (2005) Cell and plant responses to NaCl in *Zea mays* L. cultivars differing in salt tolerance. General and Applied Plant Physiology 31: 29-41.

Marschner, H., (1995) Mineral Nutrition of Higher Plants. 2nd edition, Academic Press. Ltd., London, 862 p.

Mengel, K. and Kirkby, E. A. (2001) Principles of Plant Nutrition. 5th Edition. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, 849.

Mohammadkkhani, N. and Heidari, R. (2008) Drought-induced accumlation of soluble sugars and proline in two maize varieties. World Applied Sciences Journal 3: 448-453.

Movludi, A., Ebadi, A., Jahanbakhsh, S., Davari, M. and Parmoon, G. H. (2014) The Effect of Water Deficit and Nitrogen on the Antioxidant Enzymes'Activity and Quantum Yield of Barley (*Hordeum vulgare* L.). Not Bot Horti Agrobo. 2014: 42(2):398-404.

Pang, X. M., Zhang, Z. Y., Wen, X. P., Ban, Y. and Moriguchi, T. (2007) Polyamines, allpurpose players in response to environment stresses in plants function of polyamines in plants: recent

Allam, M. Z., Haider, S. A. (2007) Accumulation of protein, chlorophyll and relative leaf water Content in Barley (*Hordeum vulgare* L.) in relation to sowing time and nitrogen fertilizer. Reserch Journal Agricultur Biological Science 3: 149-152.

Antunes, P. M., Deaville, D., and Goss, M. J. (2005) Effect of two AMF life strategies on the tripartite symbiosis with *Bradyrhizobium japonicum* and soybean. Mycorrhiz Issue: Online First, Published online: 16 December 2005.

Atanasova, E. (2008) Effect of nitrogen sources on the nitrogenous forms and accumulation of amino acid in head cabbage. Plant Soil and Environment 54: 66–71.

Azcon, R., Rubio, R. and Burea, J. M. (1991) Selective interaction between different species of mycorrhizal fungi and Rhizobium meliloti strains and their effects on growth, N_2-fixation (N_{15}) and nutrition of Medicago sativa L. New Phytolologist 117:339-404.

Baon, J. B., Smith S.E. and Alston A. M. (1994) Growth and phosphorus uptake of rye with long and short root hairs: interaction with mycorrhizal infection. Plant and Soil 197: 247-254.

Bates, L. S., Walderen, R. D. and Taere, I. D. (1973) Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant Soil, 39: 205-207.

Bianciotto, V., S. Andreotti, R. Balestrini, P. Bonfante and S. Perotto. (2001) Extracellular polysaccharides are involved in the attachment of *Azospirillum brasilense* and *Rhizobium leguminosarum* to arbuscular mycorrhizal structures. European Journal of Histochem 45: 39-49.

Bradford, M. M. (1979) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.

Cakmak, I., Kalayci, M., Ekis, H., Brauni, J., Kilinc, Y. & Yilmaz, A. (1999) Zn deficiency as a practical problem in Plant and human nutrition in Turkey: a NATO-science for stability project. Field Crops Research, 60, 175-188.

Dehqanzadeh, H., Khajehpour, M. R., Heidari Sharif Abad, H., and Soleimani, A. S. (2008) Effect of limited irrigation on the accumulation of proline, free soluble sugars and potassium in bread wheat cultivars. 10th Iran Cong Agron and Plant Breed Science, 430p.

Desuloux, D., Huynh, T. T., and P. Roumet. (2000) Idaetification of soybean plant characteristics that indicate the timing of olrought stress. Crop Science 40: 716-722.

Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry 28:350-356.

Eppendorfer, W.H. (1978) Effects of N-fertilisation on amino acid composition and nutritive value of spinach, kale, cauliflower and potatoes. Journal Science Food Agricultueal 4: 305-311.

www.SID.ir

Archive of SID

vesicular arbuscular mycorrhizal fungus improves dry matter yield and nutrient uptake by wheat grown in a sandy. Biology and Fertility of Soils 28: 139–144.

Slama, I., Ghnaya, T., Hessini, K., Messedi, D., Savoure, A. and Abdelly, C. (2007) Comparative study of the effects of mannitol and PEG osmotic stress on growth and solute accumulation in *Sesuvium portulacastrum*. Environmental and Experimental Botany 61:10–17.

Soliman, A. S., Shanan, N. T., Massoud, O. N. and Swelim, D. M. (2011) Improving salinity tolerance of *Acacia saligna* (Labill.) Plant by *Arbuscular mycorrhizal* fungi and *Rhizobium* inoculation. African Journal of Biotechnology 11: 1259-1266.

Tarumingkeng, R. C., and Coto, Z. (2003) Effects of drought stress on growth and yield of soybean. @2003 Kisman, Science Philosopy PPs 702, Term paper, Graduate School, Borgor Agricultural University (Institut Ppertanian Bogor), December 2003.

Van Den Berg, L. and Zeng, Y. J. (2006) Response of South African indigenous grasss pecies to drought stress induced by polyethylene glycol (PEG) 6000. South African Journal of Boany 72: 284-286

Vinocur, B. and Altman, A. (2005) Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. Current Opinion in Biotechnology 16: 123-132.

Wang, Z. and B. Huang. (2004) Physiological recovery of Kentucky bluegrass from simultaneous drought and heat stress. Crop Science 44:1729-1736.

Weatherley, P. E. (1995) Studies in water relation of cotton plants, the field measurement of water deficit in leaves. New Phytologist 49: 81-87.

Yordanov, I., Velikova, V. and Tsonev, T. (2000) Plant Responses to Drought, Acclimation, and Stress Tolerance. Photosynthetica 38: 171-186

development (new approaches). Plant Growth Regulation 34: 135-148

Pavlik, M., Pavlíková, D., Balík, J. and Neuberg, M. (2010) The contents of amino acids and sterols in maize plants growing under different nitrogen conditions. Plant Soil and Environment 56: 125-132.

Paye, W. A. (2000) Water relations of sparse canopied crops. Agronomy Journal 92:807-814.

Pennypacker, B. W., Leath, K. T., Stout, W. L. and R. R. Hill (1990) Technique for simulating field drought stress in the greenhouse. Agronomy Journal 82: 951-957.

Rafiee, M., Lari, H., and Abdipoor, F. (2008) Change of corn cultivars carbohydrate under drought stress. 10th Iranian Cong. of Agron and Plant Breeding Sci . 318p.

Refsum H., Ueland, P.M, Nygård, O., Vollset, S.E. (1998) Homocysteine and Cardiovascular Disease. Annual Review of Medicine 49: 31–62

Riahinia, S. H., Khazaei H. R., Kafi M., and Nezami, A. (2013) Effects of water stress and nitrogen levels on relative water content, chlorophyll fluorescence and membrane stability index in grain sorghum (*Sorghum bicolor* L.). Reserch on Crops 14: 88-94.

Saneoka, H., Moghaieb, R. E. A., Premachandra, G. S., and Fujita, K. (2004) Nitrogen nutrition and water stress effects on cell membrane stability and leaf water relations in Agrostis palustris Huds. Environmental and Experimental Botany 52:131–138.

Scott, N. S., R. Munns and Barlow, E. W. R. (1979) Polyribosome content in young and eged wheat leaves subjected to drought. Journal of Experimental Botany 30: 905- 91.

Shimshi, D., Mayoral, M. L., Atsmond, D. (1992). Response to water stress in wheat and related wild species. Crop Science 22: 123-128.

Singh, S. and Kapoor, K. K. (1999) Inoculation with phosphate solubilizing microorganisms and a

www.SID.ir