

واکنش پارامترهای فلورسانس کلروفیل و فیزیولوژیک گیاه ریحان (*Ocimum basilicum* L.)

به کاربرد باکتری‌های افزایش‌دهنده رشد (PGPR) تحت تنش شوری

سیده حدیثه بهاری ساروی^۱، همت‌اله پیردشتی^{۲*} و یاسر یعقوبیان^۲

^۱گروه زراعت، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود، گروه زراعت، پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری.

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۲/۰۲، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۵/۰۲/۲۱)

چکیده:

به منظور بررسی اثر باکتری‌های افزایش‌دهنده رشد (PGPR) بر فلورسانس کلروفیل و برخی صفات فیزیولوژیکی گیاه ریحان تحت تنش شوری، آزمایشی در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی به صورت فاکتوریل اجرا شد. تیمارهای آزمایشی شامل تنش شوری در چهار سطح (۰، ۴۰، ۸۰ و ۱۲۰ میلی‌مولار کلرید سدیم) و تیمار زیستی در سه سطح شامل شاهد بدون تلقیح باکتری، تلقیح با باکتری‌های ازتوباکتر و آزوسپیریلوم و باکتری‌های آزوسپیریلوم، سودوموناس و باسیلوس بود. بر اساس نتایج، افزایش تنش شوری باعث افزایش فلورسانس حداقل (F_o) و حداکثر (F_m) و کارایی کوانتومی غیرفتوشیمیایی تنظیم نشده فتوسیستم II [Y(NO)] و نیز کاهش فلورسانس متغیر (F_v)، حداکثر کارایی کوانتومی فتوسیستم II (F_v/F_m) و کارایی کوانتومی فتوشیمیایی مؤثر فتوسیستم II [Y(II)] شد. روند تغییرات سبزیگی برگ و کلروفیل *a* و *b* در تیمار شاهد در سطوح پایین و متوسط شوری افزایشی و در شوری بالاتر کاهش بود، ولی محتوای کارتنوئیدها و محتوی رطوبت نسبی (RWC) همواره روند کاهش و نشت الکترولیت روند افزایشی داشت. با این وجود، کاربرد باکتری‌های افزایش‌دهنده رشد، F_o و Y(NO) را به صورت معنی‌داری کاهش و F_v، F_v/F_m و Y(II) را نسبت به شاهد افزایش داد. از بین تیمارهای زیستی، کاربرد همزمان آزوسپیریلوم، سودوموناس و باسیلوس با افزایش ۱۲ درصدی Y(II) و کاهش ۱۶ درصدی Y(NO) بیشترین اثر مثبت را بر سیستم فتوستیزی گیاه داشت. تیمار زیستی، همچنین باعث بهبود سبزیگی برگ، غلظت کلروفیل *a* و RWC و نیز کاهش نشت الکترولیت شد. در مجموع، نتایج بیانگر نقش مثبت باکتری‌های افزایش‌دهنده رشد به ویژه کاربرد همزمان باکتری‌های آزوسپیریلوم، سودوموناس و باسیلوس بر بهبود پارامترهای فلورسانس کلروفیل برگ و صفات فیزیولوژیک گیاه ریحان بود.

واژه‌های کلیدی: باکتری‌های افزایش‌دهنده رشد، تنش شوری، رنگیزه‌های فتوستیزی، ریحان، فلورسانس کلروفیل *a*

مقدمه:

آب آبیاری گیاه را با تنش شوری مواجه نموده و گیاه با قرار گرفتن در محیط شور و منفی شدن پتانسیل اسمزی محلول خاک و انباشتگی بیش از حد یون‌هایی سمی نظیر سدیم و کلر صدمه می‌بیند (Munns, 2002).

تنش شوری با اختلال بر چند مکانیسم مهم گیاه مانند فتوستتوز، فشار اسمزی و فعالیت آنزیم‌ها، رشد گیاه را کاهش

شوری پس از خشکی از مهم‌ترین و متداول‌ترین تنش‌های محیطی در سطح جهان از جمله ایران است (صفاری و همکاران، ۱۳۹۲) و یکی از عوامل مهم کاهش رشد و عملکرد بسیاری از گیاهان زراعی به شمار می‌رود (Hall, 2001; Marschner, 1995). زیادی املاح مختلف در

کاهش و خاموشی غیرفتوشیمیایی را افزایش داد.

علاوه بر آن تنش شوری اثرات تخریبی بر سایر فرآیندهای فیزیولوژیکی گیاه نیز دارد که می‌تواند به دلیل کاهش جذب آب یا افزایش جذب نمک باشد. از جمله آسیب‌های ناشی از شوری می‌توان به تخریب غشای سلولی و در نتیجه افزایش نشت الکترولیت‌ها و همچنین آسیب به رنگیزه‌های فتوسنتزی از جمله کلروفیل *a* و *b* اشاره کرد (عموآقایی و نیک‌اندیش، ۱۳۹۴).

در این میان یکی از راهکارهایی که تحت تنش شوری می‌تواند آسیب به فرآیندهای فیزیولوژیکی و کارایی فتوسنتزی گیاه را تعدیل نماید، استفاده از باکتری‌های افزایش‌دهنده رشد (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*) می‌باشد. باکتری‌های افزایش‌دهنده رشد باعث کاهش میزان اتیلن گیاه از طریق تولید آنزیم آمینوسیکلوپروپان‌کربوکسیلات‌دی‌آمیناز می‌شوند که آمینوسیکلوپروپان‌کربوکسیلات را به آلفا کتوتیترات و آمونیاک هیدرولیز کرده و میزان فراهمی عناصر کم‌مصرف در شرایط تنش شوری را افزایش می‌دهد (Chang *et al*, 2007).

با این حال، عمده‌ی مطالعات مربوط به اثربخشی باکتری‌های افزایش‌دهنده رشد (PGPR)، معطوف به عملکرد و اجزای عملکرد می‌باشد (به‌عنوان مثال: بهاری و پیردشتی، ۱۳۹۱؛ عسیوند و همکاران، ۱۳۹۳) و کمتر به نقش آن در بهبود فرآیندهای فیزیولوژیکی از جمله فتوسنتز و مؤلفه‌های آن پرداخته شده است. این در حالی است که برخی مطالعات نشان می‌دهد که تلقیح این باکتری‌ها و حضور آن در ریزوسفر گیاهان، از طریق کاهش اتیلن ناشی از تنش‌هایی نظیر شوری (ربیعی و همکاران، ۱۳۹۱) و خشکی (Ruiz-Sanchez *et al*, 2011) می‌تواند کارایی فتوسنتزی گیاهان را در شرایط نامساعد محیطی بهبود بخشد. از سوی دیگر، طی مطالعات متعدد ثابت شده است که اندازه‌گیری فلورسانس کلروفیل، روش معتبر و قابل اعتمادی برای مطالعه فرآیندهای فتوسنتزی گیاه تحت تنش‌های محیطی و همچنین کاربرد میکروارگانیزم‌های محرک رشد در مواجهه با این تنش‌ها می‌باشد، برای نمونه، ربیعی و همکاران (۱۳۹۱) در گیاه گشنیز (*Coriandrum sativum*) تحت تنش

می‌دهد (Ashraf, 2001). یکی از بارزترین واکنش‌های گیاهان به عوامل تنش‌زای محیطی افت فتوسنتز ناشی از بسته شدن روزنه‌ها و کاهش دی‌اکسیدکربن قابل دسترس می‌باشد (عشقی‌زاده و همکاران، ۱۳۸۸). در چنین شرایطی، به دنبال کاهش فتوسنتز و کاهش مصرف فرآورده‌های انتقال الکترون یعنی ATP و NADPH در چرخه کالوین، عملکرد کوانتومی فتوسیستم II کاهش پیدا می‌کند (Maxwell and Johnson, 2005). یکی از روش‌های مطالعه این فرآیند، بررسی فلورسانس کلروفیل است. مقدار فلورسانس کلروفیل، سالم بودن غشای تیلاکوئید و کارایی زنجیره انتقال الکترون را از فتوسیستم II به فتوسیستم I نشان می‌دهد (Bhardway and Singhal, 1981). همچنین با استفاده از تکنیک فلورسانس کلروفیل می‌توان عدم توازن بین فرآیند متابولیسم و تولید را بررسی نمود (Ali Dib *et al*, 1994)، چرا که جریان الکترون در فتوسیستم شاخصی برای میزان کلی فتوسنتز می‌باشد و اندازه‌گیری فلورسانس کلروفیل تخمینی از نحوه عمل فتوسنتز را برای ما امکان‌پذیر می‌سازد (Maxwell and Johnson, 2005).

انرژی نوری جذب شده بوسیله مولکول‌های کلروفیل در یک برگ به یکی از صورت‌های زیر تبدیل می‌شود: می‌تواند برای پیشبرد فتوسنتز استفاده شود (خاموشی فتوشیمیایی)، انرژی مازاد می‌تواند به صورت حرارت پراکنده شود (خاموشی غیر فتوشیمیایی) و یا می‌تواند به صورت نور با طول موج بلند (فلورسانس کلروفیل) ساطع شود (Baker, 2008). از آنجایی که این سه فرآیند به صورت رقابتی رخ می‌دهند، می‌توان از طریق اندازه‌گیری عملکرد فلورسانس کلروفیل، اطلاعاتی را در مورد تغییرات کارایی فتوشیمیایی و هدررفت گرمایی به دست آورد (Lazar, 1999).

فتوسیستم II بسیار حساس به عوامل بازدارنده محیطی بوده و تنش شوری موجب خسارت به مرکز واکنش آن می‌شود (Grafts and Salvucci, 2002). در همین رابطه پژوهش‌ها نشان داد که تنش شوری در گیاه برنج (Moradi and Ismaili, 2007)، چغندر قند (Masojidek *et al*, 1991) و ارقام مختلف گندم (Cha-um *et al*, 2009)، عملکرد کوانتومی فتوسیستم II را

۳۰×۴۰ سانتی متر انجام شد. گیاهان تا مرحله هشت برگگی با آب معمولی آبیاری و پس از آن جهت اعمال تنش شوری، گلدان‌ها به مدت ۲۰ روز و به صورت یک روز در میان با محلول‌های شوری (۰، ۴۰، ۸۰ و ۱۲۰ میلی مولار) و به مقدار ۵۰۰ میلی لیتر در هر گلدان آبیاری شدند.

پس از اعمال تنش شوری، اندازه‌گیری پارامترهای فلورسانس کلروفیل در آخرین برگ توسعه یافته با استفاده از دستگاه فلورومتر (PAM 2500-Walz, Germany) و بر اساس روش Genty و همکاران (۱۹۸۹) صورت گرفت. بدین منظور، برگ‌ها با استفاده از گیره‌های مخصوص برگ (2030-B, Walz) به مدت ۲۰ دقیقه در تاریکی قرار گرفتند. سپس فلورسانس حداقل (Fo) با همه‌ی مراکز واکنشی باز فتوسیستم II و فلورسانس حداکثر (Fm) با همه‌ی مراکز واکنشی بسته فتوسیستم II در برگ‌های سازگار شده به تاریکی تعیین شد. در مرحله بعد در شرایط روشنایی میزان فلورسانس پایدار (Ft)، فلورسانس حداقل (Fo') و حداکثر (Fm') در برگ‌های سازگار شده به روشنایی تعیین شد. با استفاده از پارامترهای تعیین شده در برگ‌های سازگار شده به تاریکی و روشنایی، میزان فلورسانس متغیر (Fv)، حداکثر کارایی کوانتومی فتوسیستم II (Fv/Fm)، کارایی کوانتومی غیرفتوشیمیایی تنظیم شده فتوسیستم II [Y(II)]، کارایی کوانتومی غیرفتوشیمیایی تنظیم نشده فتوسیستم II [Y(NPQ)]، کارایی کوانتومی غیرفتوشیمیایی تنظیم نشده فتوسیستم II [Y(NO)] و خاموشی غیرفتوشیمیایی (NPQ) بر اساس جدول ۳ محاسبه شد.

برای اندازه‌گیری محتوای نسبی آب برگ (RWC) از آخرین برگ گسترش یافته گیاه استفاده شد. به این منظور، یک برگ از برگ‌های انتهایی گیاه برداشت و پس از توزین وزن تر برگ (WF) به مدت ۲۴ ساعت در آب مقطر قرار گرفته و سپس وزن آماس (WT) برگ‌ها تعیین شد. سپس نمونه‌های برگگی در آن در دمای ۷۲ درجه و به مدت ۴۸ ساعت خشک شده و وزن خشک (WD) برگ‌ها اندازه‌گیری شد. محتوای نسبی آب برگ‌ها با استفاده از معادله ۱ بدست آمد (Schofield et al., 1988).

$$RWC = \frac{WF - WD}{WT - WD} \times 100 \quad \text{معادله ۱}$$

شوری و کاربرد باکتری‌های افزایشنده رشد، یعقوبیان و همکاران (۱۳۹۱) در گیاه گندم تحت تنش رطوبتی و همزیستی میکوریزایی و همچنین Yaghoobian و همکاران (۲۰۱۶) تحت تنش کادمیم در گیاه خرفه، جنابیان و همکاران (۱۳۹۴) تحت تنش سرما و نور در گیاه سویا و نیز حسنی و همکاران (۱۳۹۲) و Yaman و همکاران (۲۰۰۸) در گیاه برنج تحت تنش سرما و شوری از این روش استفاده نمودند.

ریحان (*Ocimum basilicum*) گیاهی است یکساله، علفی و متعلق به خانواده نعناعیان (Lamiaceae) و دارای اهمیت بسزایی در صنایع دارویی و غذایی می باشد. مواد مؤثره‌ی پیکر رویشی این گیاه اشتهاآور بوده و برای درمان برخی بیماری‌های قلبی و سردردهای میگرنی و عصبی مورد استفاده قرار می‌گیرد (امیدبیگی، ۱۳۸۸). این تحقیق جهت بررسی اثر باکتری‌های افزایشنده رشد در تحمل به تنش شوری گیاه ریحان با استفاده از پارامترهای فلورسانس کلروفیل و برخی صفات فیزیولوژیکی مربوطه انجام شد.

مواد و روش‌ها:

پژوهش حاضر در بهار و تابستان ۱۳۹۰ در گلخانه دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار به اجرا درآمد. قبل از شروع آزمایش به منظور تعیین خصوصیات خاک، نمونه‌برداری از خاک انجام گرفت که برخی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آن در جدول ۱ نشان داده شده است. تیمارهای آزمایشی شامل تنش شوری کلرید سدیم در چهار سطح (۰، ۴۰، ۸۰ و ۱۲۰ میلی مولار) و تلقیح باکتری در سه سطح شامل شاهد (عدم تلقیح باکتری)، تلقیح گیاه با باکتری‌های *ازتوباکتر* و *آزوسپیریلوم* و باکتری‌های *آزوسپیریلوم*، *سودوموناس* و *باسیلوس* بود. مشخصات باکتری‌های افزایشنده رشد در جدول ۲ آمده است. تلقیح باکتری به صورت پیش تیمار به روش بذر مال و براساس دستورالعمل شرکت تولید کننده (جدول ۲) صورت گرفت. سپس بذور در سایه و به دور از تابش مستقیم آفتاب قرار داده شد تا خشک شود. پس از اعمال تیمارهای باکتریایی کاشت بذور به تعداد ۲۰ بذر در گلدان‌هایی به ابعاد

جدول ۱ - نتایج تجزیه نمونه خاک اولیه قبل از اجرای آزمایش (عمق صفر تا ۳۰ سانتی متری)

هدایت الکتریکی (دسی زیمنس بر متر)	اسیدیته pH	کربن آلی نیترژن (درصد)	فسفر قابل جذب (میلی گرم بر کیلوگرم)	پتاسیم	شن (درصد)	رسی (درصد)	سیلت
۳/۳۶	۷/۰۸	۴	۱۶/۸۸	۳۸۰	۱۷	۵۴/۲	بافت خاک رسی - سیلتی

جدول ۲- برخی مشخصات کودهای زیستی مورد استفاده

نام تجاری	علایم اختصاری	واحد تشکیل دهنده کلونی در هر میلی لیتر (CFU/ml)	شرکت سازنده
نیتروکسین	AZB+AZL	۱۰ ^۸ در هر میلی لیتر	فناوری زیستی مهر آسیا
سوپرنیتروپلاس	AZL+PSF+BAS	۱۰ ^۸ در هر میلی لیتر	فناوری زیستی مهر آسیا

جدول ۳- مؤلفه های بیوفیزیکی اندازه گیری شده فلورسانس کلروفیل و معادلات مربوط به آنها

(Klughammer and Schreiber, 2008; Li et al., 2008)

مؤلفه	شناسه	معادله
فلورسانس متغیر	Fv	Variable fluorescence
حداکثر کارایی کوانتومی فتوسیستم II	Fv/Fm	Maximum photochemical quantum yield of photosystem II
کارایی کوانتومی فتوشیمیایی مؤثر فتوسیستم II	Y(II)	Effective photochemical quantum yield of photosystem II
کارایی کوانتومی غیرفتوشیمیایی تنظیم شده فتوسیستم II	Y(NPQ)	Quantum yield of regulated non-photochemical
کارایی کوانتومی غیرفتوشیمیایی تنظیم نشده فتوسیستم II	Y(NO)	Quantum yield of non-regulated non-photochemical
خاموشی غیرفتوشیمیایی	NPQ	Non-photochemical quenching

به منظور اندازه گیری نشت الکترولیت، نمونه ی برگی در لوله های آزمایش حاوی ۱۰ میلی لیتر آب مقطر قرار گرفته و پس از ۲۴ ساعت هدایت الکتریکی هر نمونه با استفاده از دستگاه EC متر (CON 410، سنگاپور) اندازه گیری شد (EC₁). سپس لوله های آزمایش به مدت ۲۰ دقیقه در دستگاه بن ماری با دمای ۹۰ درجه قرار گرفته و مجدداً هدایت الکتریکی نمونه ها که نشانگر میزان کل نشت الکترولیت ها در اثر مرگ سلول است، ثبت شد (EC₂). درصد نشت الکترولیت ها با استفاده از معادله ۵ محاسبه شد (Teutonica et al., 1993):

$$\text{معادله ۵} \quad \text{درصد نشت الکترولیت} = \frac{EC_1}{EC_2} \times 100$$

در نهایت داده های به دست آمده با استفاده از نرم افزار SAS نسخه ی ۹/۱ تجزیه و مقایسه میانگین اثر باکتری بر

همچنین رنگیزه های فتوسنتزی با استفاده از روش Lichtenthaler (۱۹۴) اندازه گیری و میزان کلروفیل a ، b و کارتنوئید بر اساس معادله های ۲، ۳ و ۴ محاسبه شد.

$$\text{معادله ۲} \quad C_a (\mu\text{g} / \text{ml}) = 16.72 A_{665.2} - 9.16 A_{652.4}$$

$$\text{معادله ۳} \quad C_b (\mu\text{g} / \text{ml}) = 34.09 A_{652.4} - 15.28 A_{665.2}$$

$$\text{معادله ۴} \quad \text{Carotenoid } (\mu\text{g} / \text{ml}) =$$

$$(1000A_{470} - 1.63C_a - 104.96C_b) / 221$$

در این رابطه ها C_a ، C_b به ترتیب کلروفیل a و b (میکروگرم در میلی لیتر) و همچنین $A_{665.2}$ ، $A_{652.4}$ ، A_{470} میزان نور جذبی محلول در طول موج های ۶۶۵/۲، ۶۵۲/۴ و ۴۷۰ نانومتر است.

نسبت به شاهد مشاهده شد (شکل ۱- C).

روند تغییرات حداکثر کارایی کوانتومی فتوسیستم II (F_v/F_m) نیز نسبت به افزایش سطوح شوری به صورت درجه دوم بود. پارامتر F_v/F_m با افزایش تنش شوری از صفر به ۴۰ میلی مولار تقریباً ثابت بوده، ولی در ادامه از ۴۰ تا ۱۲۰ میلی مولار کاهش نشان داد، به طوری که شیب کاهش آن با افزایش تنش شوری، افزایش یافت. کمترین میزان F_v/F_m در سطح ۱۲۰ میلی مولار NaCl مشاهده شد که به میزان پنج درصد نسبت به شاهد کاهش معنی داری نشان داد (شکل ۱- D). بر خلاف سایر پارامترهای مورد بررسی، روند پاسخ فلورسانس پایدار (F_t) نسبت به تغییرات شوری از نوع درجه اول بوده و با افزایش تنش شوری با شیب ۰/۰۰۵ واحد افزایش نشان داد و در سطح شوری ۱۲۰ میلی مولار به بیشترین مقدار خود رسید که نسبت به شاهد ۲۴ درصد افزایش داشت (شکل ۱- E). تنش شوری همچنین منجر به افزایش پارامتر خاموشی غیر فتوشیمیایی (NPQ) شد به طوری که بیشترین شیب افزایش آن در سطوح پایین شوری بوده و رفته رفته با افزایش سطوح شوری شیب تغییرات کاهش یافته و بیشترین میزان خاموشی غیر فتوشیمیایی (۰/۳۶۵) در سطح شوری ۹۴ میلی مولار مشاهده شد (شکل ۱- F).

طبق جدول ۵، کاربرد باکتری‌های افزایشنده رشد، میزان فلورسانس حداقل (F_o) را به صورت معنی داری کاهش داد، به طوری که این کاهش برای کاربرد همزمان ازتوباکتر و آزوسپیریلوم و کاربرد همزمان آزوسپیریلوم، سودوموناس و باسیلوس به ترتیب ۸ و ۵ درصد نسبت به شاهد بود. میزان فلورسانس حداکثر (F_m) برخلاف F_o تحت تأثیر باکتری‌های افزایشنده رشد افزایش نشان داد. بیشترین افزایش مربوط به تیمار کاربرد ازتوباکتر و آزوسپیریلوم بود که نسبت به کاربرد همزمان آزوسپیریلوم، سودوموناس و باسیلوس نیز افزایش معنی داری داشت. همچنین پارامترهای F_v ، F_v/F_m ، NPQ نیز در برگ‌های گیاهان تلقیح شده با باکتری‌های افزایشنده رشد به صورت معنی داری نسبت به شاهد افزایش یافت. این افزایش در تیمار کاربرد همزمان ازتوباکتر و آزوسپیریلوم برای F_v ،

پارامترهای فلورسانس کلروفیل و صفات فیزیولوژیک با آزمون حداقل اختلاف معنی دار (LSD) در سطح احتمال پنج درصد انجام شد. در سطوح تنش شوری نیز از تجزیه رگرسیونی و برازش منحنی درجه یک و دو استفاده شد.

نتایج:

فلورسانس کلروفیل α نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده های آزمایش (جدول ۴) نشان داد که تنش شوری در پارامترهای F_o ، F_v ، F_m ، F_v/F_m و $Y(II)$ در سطح احتمال پنج درصد و در پارامترهای F_m ، $Y(NO)$ و NPQ در سطح احتمال یک درصد اثر معنی داری داشت. همچنین تیمار باکتری‌های افزایشنده رشد مورد مطالعه نیز در پارامترهای F_o ، F_m ، F_v و F_v/F_m در سطح احتمال یک درصد و در پارامترهای $Y(II)$ ، $Y(NO)$ و NPQ در سطح احتمال پنج درصد اثر معنی داری را نشان داد (جدول ۴). بین باکتری‌های افزایشنده رشد مورد مطالعه و سطوح مختلف شوری از نظر تمامی صفات مورد مطالعه برهمکنش معنی داری مشاهده نشد.

برای توصیف اثر شوری بر پارامترهای F_o ، F_m و F_v از معادله رگرسیونی درجه دوم استفاده شد (شکل ۱- A، B و C). روند تغییرات فلورسانس حداقل در برگ‌های سازگار به تاریکی (F_o) با افزایش تنش شوری از نوع درجه دوم و به صورت افزایشی بوده و با افزایش سطوح شوری، شیب منحنی پاسخ نیز افزایش یافت، به طوری که بالاترین میزان آن (با حدود ۷ درصد افزایش نسبت به شاهد) که نشان دهنده آسیب شدید ناشی از تنش می‌باشد، در سطح شوری ۱۲۰ میلی مولار مشاهده شد (شکل ۱- A). همچنین فلورسانس حداکثر (F_m) نیز با افزایش تنش شوری از سطح صفر تا ۵۰ میلی مولار افزایش، ولی در ادامه (از سطح ۵۰ تا ۱۲۰ میلی مولار) کاهش نشان داد (شکل ۱- B). برخلاف F_o و F_m ، روند تغییرات فلورسانس متغیر (F_v) در پاسخ به افزایش تنش شوری به صورت کاملاً کاهشی بوده و بیشترین شیب کاهش نیز در سطوح بالای تنش مشاهده شد. کمترین مقدار فلورسانس متغیر (F_v) در سطح شوری ۱۲۰ میلی مولار و با ۴/۵ درصد کاهش

جدول ۴- میانگین مربعات اثر تیمارهای مورد بررسی بر پارامترهای فلورسانس کلروفیل در گیاه ریحان

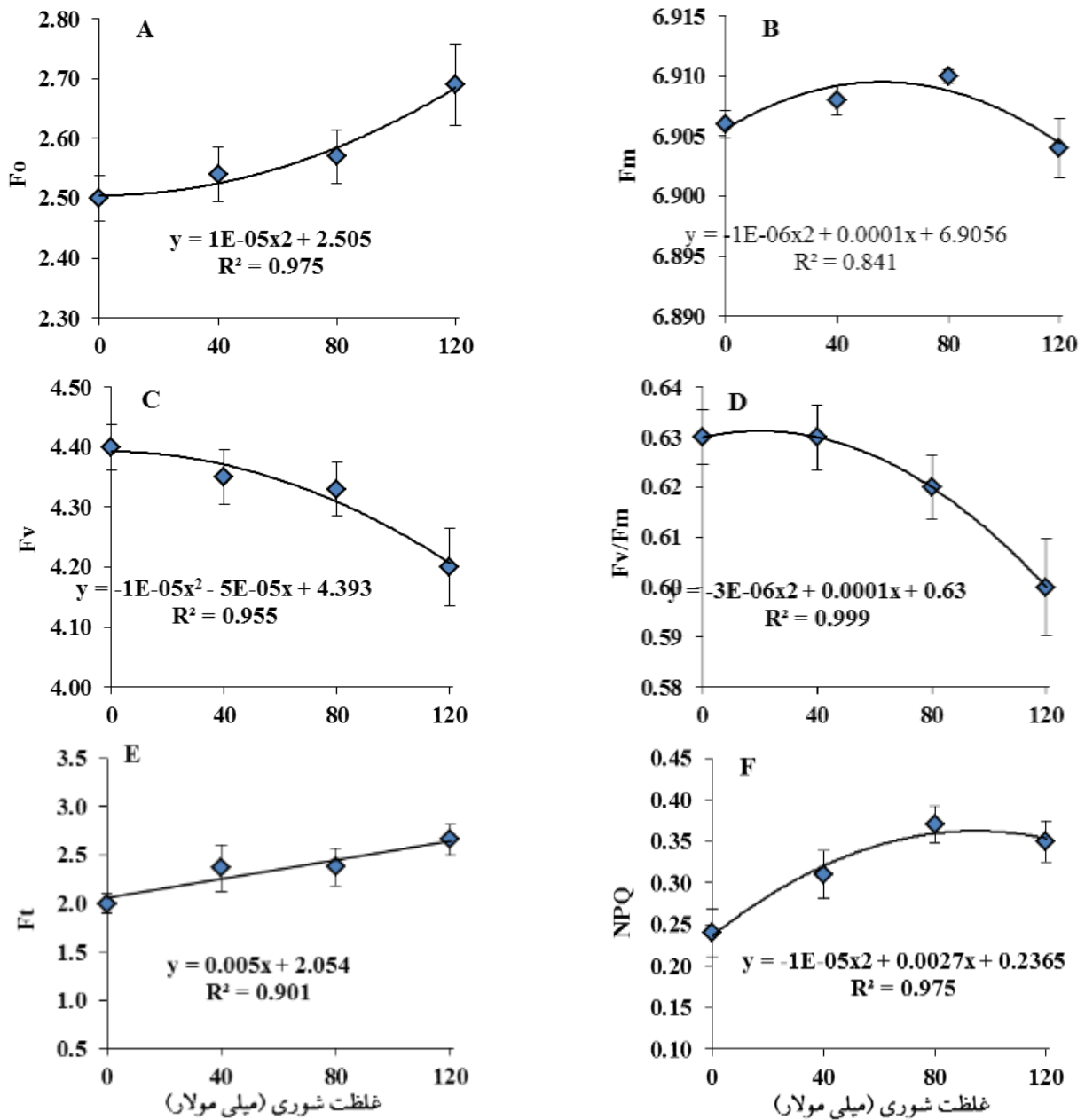
منابع تغییر	شوری (A)	تیمار زیستی (B)	A×B	خطای آزمایشی	ضریب تغییرات
درجه آزادی	۳	۲	۶	۳۶	(درصد)
Fo	۰/۰۸*	۰/۱۸**	۰/۰۳	۰/۰۲	۵/۵۹
Fm	۰/۰۰۰۷**	۰/۰۰۰۱۰**	۰/۰۰۰۰۱	۰/۰۰۰۰۰۱	۰/۰۴
Fv	۰/۲۵*	۰/۳۸**	۰/۲۰	۰/۰۲	۳/۳۴
Fv/Fm	۰/۰۰۱۰*	۰/۰۰۳۰**	۰/۰۰۰۰۷	۰/۰۰۰۰۴	۳/۳۳
Ft	۰/۸۷	۰/۸۵	۰/۳۸	۰/۳۶	۲۵/۶
Y(II)	۰/۰۱۴*	۰/۰۱۸*	۰/۰۰۸	۰/۰۰۳	۱۱/۰
Y(NPQ)	۰/۰۰۰۹	۰/۰۰۲۰	۰/۰۰۱۰	۰/۰۰۰۰۷	۲۶/۱
Y(NO)	۰/۰۲۰**	۰/۰۲۰*	۰/۰۰۲	۰/۰۰۳	۱۸/۰
NPQ	۰/۰۳۰**	۰/۰۳۰*	۰/۰۱۰	۰/۰۰۶	۲۴/۳

* و ** به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال پنج و یک درصد

منجر به افزایش ۶ و ۱۲ درصدی کارایی کوانتومی فتوشیمیایی مؤثر فتوسیستم II [Y(II)] در برگ گیاه ریحان شد (شکل ۲- B). همچنین شکل ۲-B نشان داد که کارایی کوانتومی غیرفتوشیمیایی تنظیم نشده فتوسیستم II [Y(NO)] تحت تأثیر کاربرد باکتری‌های افزایشنده رشد قرار گرفت. براساس یافته‌ها، کاربرد همزمان آزوسپیریلوم، سودوموناس و باسیلوس و یا ازتوباکتر و آزوسپیریلوم به ترتیب منجر به کاهش ۱۶ و ۱۱ درصدی Y(NO) نسبت به شاهد شد. با این وجود، تلقیح همزمان باکتری‌های آزوسپیریلوم، سودوموناس و باسیلوس، میزان کارایی کوانتومی غیرفتوشیمیایی تنظیم نشده فتوسیستم دو Y(NPQ) را حدود ۱۰ درصد نسبت به شاهد کاهش داد، ولی کاربرد توأم ازتوباکتر و آزوسپیریلوم، اثر چندانی بر این پارامتر نداشت (شکل ۲-B).

صفات فیزیولوژیک: براساس جدول تجزیه واریانس، اثر تیمارهای مورد مطالعه بر صفات فیزیولوژیک (جدول ۶)، تیمار شوری بر تمام صفات فیزیولوژیک اندازه‌گیری شده شامل سبزیگی برگ، کلروفیل *a* و *b*، کارتنوئید، محتوی نسبی آب برگ (RWC) و نشت الکترولیت در سطح احتمال یک درصد اثر معنی‌داری داشت. اثر تیمار زیستی نیز بر صفات سبزیگی برگ در سطح احتمال یک درصد و در کلروفیل *a*، RWC و

NPQ، Fv/Fm به ترتیب ۵، ۶/۵ و ۱۲ درصد و در تیمار کاربرد همزمان آزوسپیریلوم، سودوموناس و باسیلوس به ترتیب ۳، ۳/۵ و ۱۸ درصد بود. در پژوهش حاضر، کارایی کوانتومی فتوشیمیایی مؤثر فتوسیستم II [Y(II)]، کارایی کوانتومی غیرفتوشیمیایی تنظیم-شده فتوسیستم II [Y(NPQ)] و همچنین کارایی کوانتومی غیرفتوشیمیایی تنظیم نشده فتوسیستم II [Y(NO)] تحت تأثیر تنش شوری قرار گرفتند (شکل ۲-A). میزان Y(II) با افزایش تنش شوری روند کاهشی نشان داد، به طوری که سطح شوری ۴۰، ۸۰ و ۱۲۰ میلی‌مولار کلرید سدیم به ترتیب منجر به کاهش ۲، ۸ و ۱۱ درصدی آن نسبت به شاهد شد. با افزایش سطوح شوری میزان کارایی کوانتومی غیر فتوشیمیایی تنظیم نشده فتوسیستم II افزایش یافت به طوری که بیشترین مقدار Y(NO) در سطح شوری ۱۲۰ میلی‌مولار مشاهده شد که حدود ۳۰ درصد نسبت به شاهد افزایش داشت. همچنین میزان Y(NPQ) در گیاهان تحت تنش شوری کاهش نشان داد، به طوری که در تنش شوری ۱۲۰ میلی‌مولار به کمترین میزان خود رسید که این کاهش نسبت به شاهد ۱۲ درصد بود (شکل ۲-A). کاربرد همزمان ازتوباکتر و آزوسپیریلوم و همچنین کاربرد همزمان آزوسپیریلوم، سودوموناس و باسیلوس به ترتیب

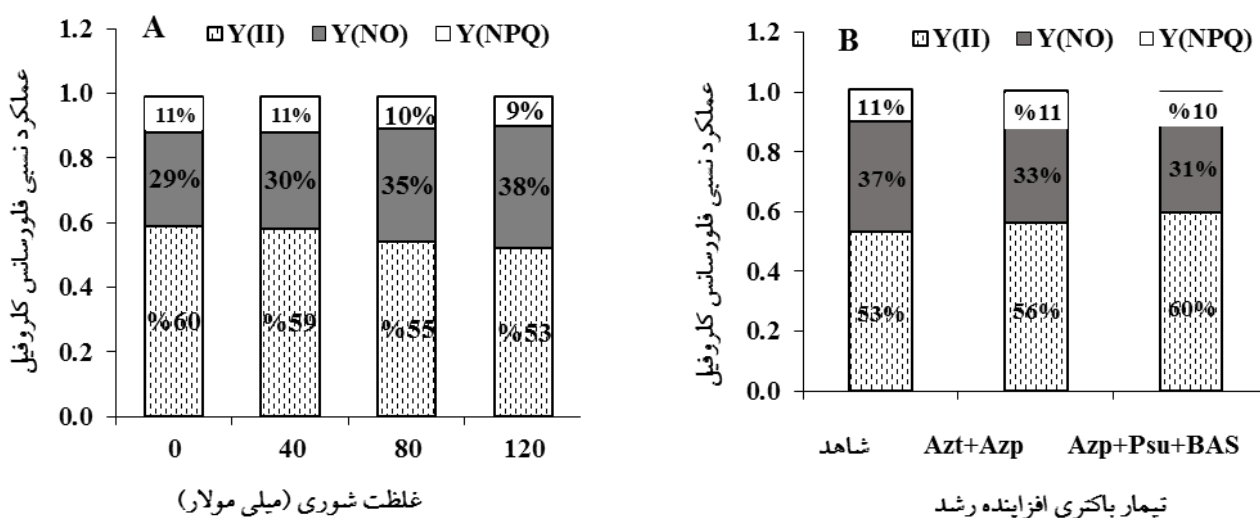


شکل ۱- روند تغییرات پارامترهای فلورسانس حداقل (A)، فلورسانس حداکثر (B)، فلورسانس متغیر (C)، حداکثر کارایی کوانتوم فتوسنتز II (D)، فلورسانس پایدار (E) و خاموشی غیر فتوشیمیایی (F) در پاسخ به افزایش شوری خاک در گیاه ریحان. میله‌های عمودی نشان‌دهنده خطای استاندارد می‌باشد.

جدول ۵- مقایسه میانگین اثر ساده باکتری‌های افزایشنده رشد بر پارامترهای فلورسانس کلروفیل در گیاه ریحان

تیمار	Fo	Fm	Fv	Fv/Fm	NPQ
شاهد	۲/۶۹ ^a	۶/۹۰۴ ^c	۴/۲۱ ^b	۰/۶۰ ^b	۰/۲۷ ^b
AZB+AZL	۲/۴۸ ^b	۶/۹۱۰ ^a	۴/۴۳ ^a	۰/۶۴ ^a	۰/۳۵ ^a
AZL+PSF+BAS	۲/۵۶ ^b	۶/۹۰۸ ^b	۴/۳۳ ^a	۰/۶۲ ^a	۰/۳۳ ^a

*در هر ستون میانگین‌های دارای حرف یا حروف مشترک بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند



شکل ۲- تغییرات پارامترهای Y(II)، Y(NPQ) و Y(NO) در پاسخ به افزایش شوری خاک (A) و تلقیح با باکتری‌های افزایشده رشد (B) در گیاه ریحان

جدول ۶- میانگین مربعات اثر تیمارهای مورد بررسی بر رنگی‌های فتوسنتزی و صفات فیزیولوژیک گیاه ریحان

منابع تغییر درجه آزادی	شوری (A)	تیمار زیستی (B)	A×B	خطای آزمایشی		ضریب تغییرات (درصد)
				۳	۶	
سبزی‌نگی برگ (عدد SPAD)	۵/۴۶۴**	۱۱/۶۱۲**	۲/۸۷۷*	۱/۱۳۰	۲/۵۳	
کلروفیل a	۲/۴۴۴*	۳/۱۰۶*	۱/۴۹۰*	۰/۵۸۹	۱۰/۱۱	
کلروفیل b	۱۱/۴۲۲**	۰/۹۳۹	۲/۶۵۲	۱/۵۶۶	۲۶/۸۶	
کاروتنوئید	۳/۴۷۳**	۰/۲۶۷	۰/۵۷۵	۰/۲۵۹	۲۶/۵۸	
محتوی نسبی آب برگ	۷۰/۶۹**	۴۸/۹۳*	۱۷/۳۸	۱۴/۶۶	۵/۱۵	
نشت الکتروولت	۱۲۰۸/۱۲**	۱۹۸/۲۸*	۱۳۱/۵۲	۵۹/۴۴	۲۷/۸۲	

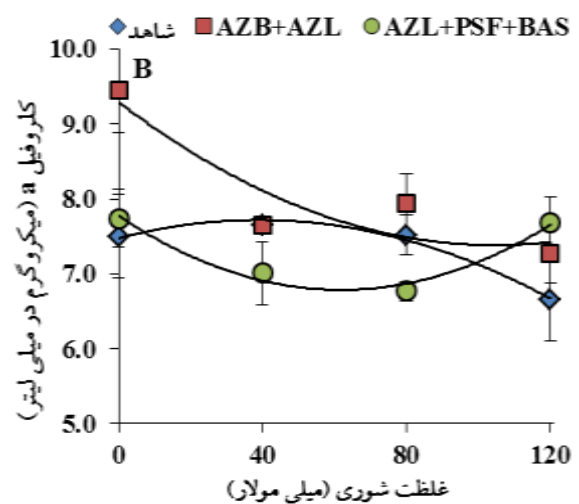
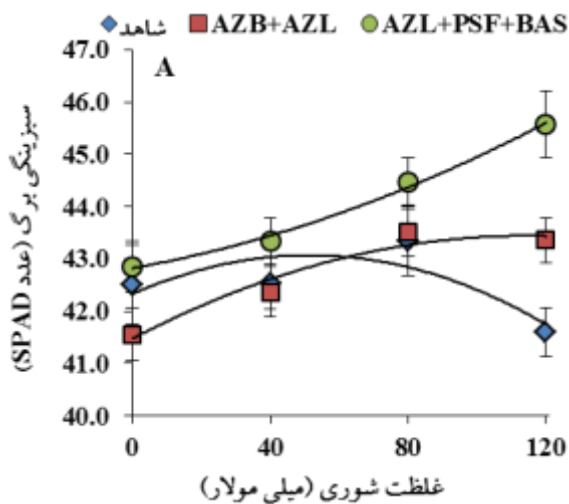
* و ** به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال پنج و یک درصد

ازتوباکتر و آزوسپریلوم نیز تا غلظت حدود ۸۰ میلی‌مولار به صورت افزایشی و سپس تقریباً ثابت بود. گیاهان تلقیح شده با ترکیب باکتری‌های آزوسپریلوم، سودوموناس و باسیلوس در تمام سطوح شوری و گیاهان تلقیح شده با ترکیب باکتری‌های ازتوباکتر و آزوسپریلوم در سطوح بالای شوری (۶۰ تا ۱۲۰ میلی‌مولار) از سبزی‌نگی برگ بالاتری نسبت به گیاهان شاهد برخوردار بودند (شکل ۳- A و جدول ۷).

تغییرات کلروفیل a نیز در پاسخ به افزایش شوری آب آبیاری به صورت معادله درجه دوم بود (شکل ۳- B و جدول ۷). با این وجود، عکس‌العمل کلروفیل a نسبت به تنش شوری در سطوح مختلف تیمار زیستی متفاوت بود. در تیمار شاهد،

نشت الکتروولت در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود. برهمکنش شوری و تیمار زیستی نیز در سبزی‌نگی برگ و غلظت کلروفیل a معنی‌دار ($P < 0.01$) بود.

بر اساس یافته‌ها، روند تغییرات سبزی‌نگی برگ و غلظت کلروفیل a در پاسخ به افزایش شوری خاک از معادله درجه دوم تبعیت کرد (شکل ۳ و جدول ۷). با افزایش غلظت شوری آب آبیاری از صفر تا ۴۰ میلی‌مولار، سبزی‌نگی برگ در هر سه تیمار زیستی روند افزایشی داشت، ولی با افزایش بیشتر شوری از ۴۰ تا ۱۲۰ میلی‌مولار در تیمار کاربرد همزمان آزوسپریلوم، سودوموناس و باسیلوس این روند افزایشی ادامه داشته، ولی در شاهد به صورت کاهشی بود. همچنین در کاربرد همزمان



شکل ۳- اثر تیمار کود زیستی بر روند تغییرات سبزیگی برگ (عدد SPAD) (A) و کلروفیل a (B) در پاسخ به افزایش شوری خاک در گیاه ریحان. میله‌های عمودی نشان‌دهنده خطای استاندارد می‌باشد.

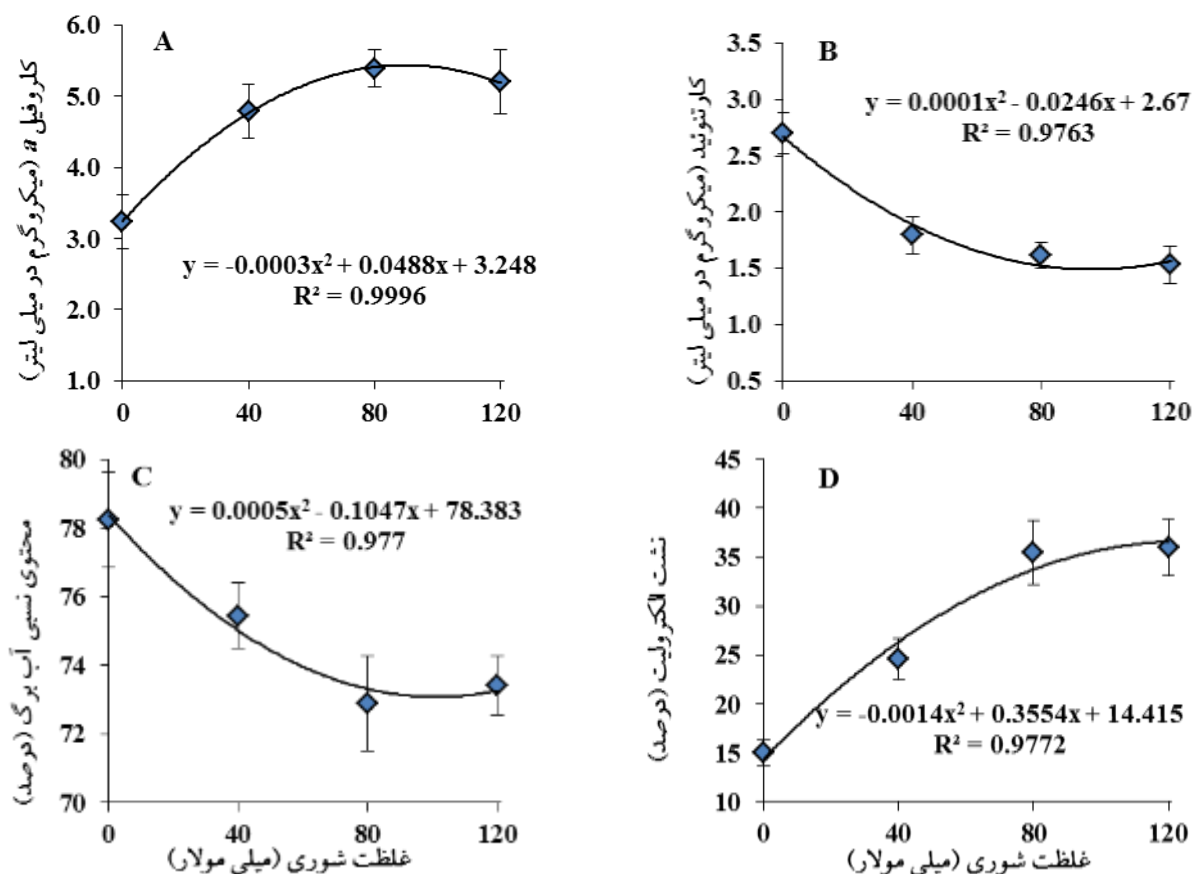
جدول ۷- معادله مناسب توصیف کننده اثر تیمار کود زیستی بر روند تغییرات سبزیگی برگ (عدد SPAD) و کلروفیل a در پاسخ به افزایش شوری خاک در برگ گیاه ریحان

نام صفت	سبزیگی برگ (عدد SPAD)	تیمار زیستی
کلروفیل a	سبزیگی برگ (عدد SPAD)	شاهد (عدم تلقیح)
$y = -0.0002x^2 + 0.0124x + 7.477$ $R^2 = 0.983$	$y = -0.0003x^2 + 0.0287x + 42.335$ $R^2 = 0.643$	
$y = 0.0002x^2 - 0.0366x + 9.296$ $R^2 = 0.8266$	$y = -0.0001x^2 + 0.0343x + 41.479$ $R^2 = 0.947$	AZB+AZL
$y = 0.0003x^2 - 0.0319x + 7.7735$ $R^2 = 0.968$	$y = 1E-04x^2 + 0.0117x + 42.825$ $R^2 = 0.994$	AZL+PSF+BAS

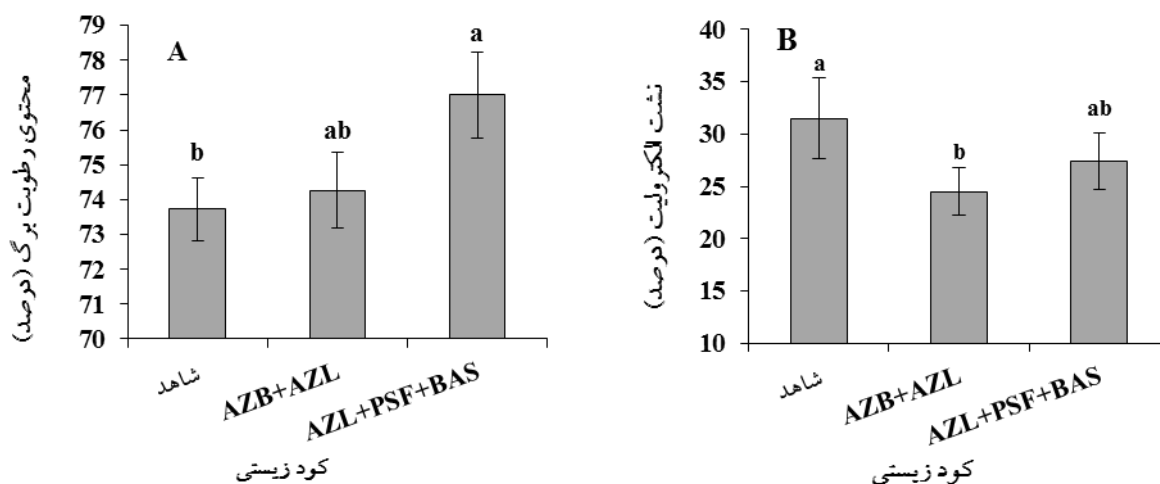
داشت (شکل ۴- A). روند پاسخ غلظت کارتنوئید نسبت به افزایش تنش شوری مشابه کلروفیل a و منفی بوده و در اثر شوری کاهش یافت. بیشترین شیب کاهش آن در سطوح پایین شوری مشاهده شد و با افزایش تنش، شیب منحنی پاسخ کاهش یافت (شکل ۴- B).

محتوی نسبی آب نیز در اثر تنش شوری کاهش یافت، به طوری که در شوری ۱۲۰ میلی‌مولار نسبت به شوری صفر، حدود شش درصد کاهش داشت. بیشترین شیب کاهش منحنی در سطوح پایین تنش مشاهده شد و با افزایش شوری از شدت تغییرات کاسته شد (شکل ۴- C). برخلاف RWC، روند تغییرات نشت الکترولیت در پاسخ به افزایش تنش شوری به صورت کاملاً افزایشی بوده و بیشترین شیب افزایشی نیز در سطوح پایین تنش مشاهده شد. بیشترین مقدار نشت الکترولیت

غلظت کلروفیل a از شوری صفر تا حدود ۸۰ میلی‌مولار روند افزایشی و سپس (از ۸۰ تا ۱۲۰ میلی‌مولار) کاهش بود، درحالی که در کاربرد همزمان باکتری‌های ایزوباکتر و آزوسپریلوم، روند تغییرات آن همواره کاهش بود، با اینحال تقریباً در تمام سطوح شوری از غلظت کلروفیل a بالاتری نسبت به تیمار شاهد برخوردار بود (شکل ۳- B و جدول ۷). برای توصیف اثر شوری بر غلظت کلروفیل a، کارتنوئید، RWC و نشت الکترولیت از معادله رگرسیونی درجه دوم استفاده شد (شکل ۴- A-D). روند تغییرات غلظت کلروفیل a با افزایش تنش شوری به صورت افزایشی بود که با افزایش سطوح شوری شیب منحنی کاهش یافت، به طوری که بالاترین میزان آن با حدود ۶۶ درصد افزایش نسبت به شاهد در سطح شوری حدود ۸۵ میلی‌مولار مشاهده شد و سپس روند کاهش



شکل ۴- روند تغییرات کلروفیل a (A)، کارتنوئید (B)، محتوی نسبی آب برگ (C) و نشت الکترولیت (D) در پاسخ به افزایش شوری خاک در گیاه ریحان. میله‌های عمودی نشان‌دهنده خطای استاندارد می‌باشد.



شکل ۵- اثر تیمار کود زیستی بر محتوی نسبی آب برگ (A) و نشت الکترولیت (B) در گیاه ریحان. میله‌های عمودی نشان‌دهنده خطای استاندارد می‌باشد.

(شکل ۵- A) نشان داد که کاربرد باکتری‌های افزایشنده رشد RWC را افزایش داد، به طوری که این افزایش برای کاربرد همزمان آزوسپیریلیوم، سودوموناس و باسیلوس نسبت به شاهد

(۳۶ درصد) در سطح شوری ۱۲۰ میلی‌مولار و با ۱/۴ برابر افزایش نسبت به شاهد مشاهده شد (شکل ۱- D). مقایسه میانگین اثر باکتری‌های افزایشنده رشد بر RWC

فلورسانس حداقل F_0 بدست می‌آید، وضعیت جریان الکترون از بخش فتوسیستم به QA را نشان می‌دهد (Xia et al, 2004). نتایج نشان داد که تنش شوری، کاهش مقدار فلورسانس متغیر را به دنبال داشت (جدول ۵). اصولاً مقدار فلورسانس کلروفیل هنگامی که اولین پذیرنده الکترون (QA) در حالت احیا باشد زیاد است و به این دلیل مقدار فلورسانس متغیر (F_v) نیز در این حالت زیاد می‌شود، اما زمانی که QA در حالت اکسیداسیون است، مقدار فلورسانس کلروفیل کم می‌باشد و میزان فلورسانس متغیر (F_v) کاهش می‌یابد (صفاری و همکاران، ۱۳۹۲). Ali Dib و همکاران (۱۹۹۴) گزارش کردند که تنش‌های محیطی مقدار (F_v) را به علت ممانعت از فتواکسیداسیون فتوسیستم II کاهش می‌دهند. از آنجایی که فلورسانس متغیر نشانگر احیای کامل پذیرنده الکترون (Q) می‌باشد، بنابراین می‌توان استنباط نمود که تنش شوری در انتقال الکترون به فتوسیستم I اختلال ایجاد می‌کند (صفاری و همکاران، ۱۳۹۲).

نسبت F_v/F_m نیز نشان دهنده‌ی ظرفیت انتقال الکترون فتوسیستم II می‌باشد و به عنوان شاخصی معتبر برای نشان دادن اختلال ناشی از تنش در مراکز فتوشیمیایی و بازدارندگی نوری استفاده می‌شود (Li et al, 2008; Baker and Rosenqvist, 2004). کاهش میزان F_v/F_m در شرایط تنش نشانه کاهش میزان حفاظت نوری بوده و همچنین دلیل معنی‌دار بودن تنش شوری بر کارایی فتوسنتز است. به‌طور کلی به نظر می‌رسد گیاهی که در سطوح بالای شوری نسبت F_v/F_m بیشتری داشته باشد، توانایی انجام محافظت نوری در شرایط تنش را خواهد داشت. نتایج حاصل از این پژوهش نیز حاکی از کاهش F_v/F_m در اثر تنش شوری می‌باشد (جدول ۵). NPQ در واقع شاخص مربوط به هدررفت گرمایی است و افزایش این پارامتر بیانگر ظرفیت بالای چرخه گزانتوفیل و توانایی گیاه در دفع تنش از طریق هدر دادن انرژی به صورت گرما می‌باشد (Chaves et al, 2009)، ولی با افزایش بیشتر سطوح تنش، ممکن است افزایش در NPQ برای مصرف انرژی مازاد و حفظ اکسیداسیون پذیرنده‌های الکترون

۴/۴ درصد و معنی‌دار بود.

از سوی دیگر، کاربرد باکتری‌های افزایشنده رشد، کاهش نشت الکتروولیت را در برگ‌های گیاه ریحان به دنبال داشت. بیشترین کاهش نشت الکتروولیت (حدود ۲۲ درصد نسبت به شاهد) مربوط به تیمار کاربرد ازتوباکتر و آزوسپیریلوم بود که با کاربرد همزمان آزوسپیریلوم، سودوموناس و باسیلوس در یک گروه آماری قرار گرفت (شکل ۵-B).

بحث:

فلورسانس حداقل (F_0) تحت تأثیر تنش‌های محیطی که تغییر ساختاری در مراکز واکنش اولیه فتوسیستم II بوجود می‌آورند، قرار می‌گیرد. در مطالعه حاضر، میزان F_0 با افزایش سطح شوری افزایش یافت (جدول ۴)، که این امر بیانگر تخریب زنجیره انتقال الکترون فتوسیستم II در اثر کاهش ظرفیت کوئینون آ (QA) و عدم اکسیداسیون کامل آن به دلیل جریان کند الکترون در طول مسیر فتوسیستم II و در مجموع غیرفعال شدن فتوسیستم II می‌باشد (Zlatev and Yordanov, 2004). افزایش F_0 در اثر تنش شوری در آفتابگردان (حیدری و همکاران، ۱۳۸۹) و کلزا (صفاری و همکاران، ۱۳۹۲) نیز گزارش شده است. فلورسانس حداکثر (F_m) در اثر تابش فوتون‌های نوری و احیای همه ناقل‌های الکترون و بسته بودن همه مراکز واکنش ایجاد می‌شود (Mehta et al, 2010). نتایج ارائه شده در پژوهش حاضر در خصوص فلورسانس حداکثر نشان می‌دهد که سطح شوری ۱۲۰ میلی‌مولار موجب افت میزان F_m شد (شکل ۱). Yaman و همکاران (۲۰۰۸) نیز کاهش F_m را در گیاه برنج تحت تنش شوری گزارش کردند. نتایج مشابهی مبنی بر کاهش میزان F_m در اثر تنش خشکی در گیاهچه گندم زمستانه (Zlatev, 2009) و تنش شوری در کلزا (Atlassi et al, 2009) نیز گزارش شده است. افت F_m ممکن است با کاهش فعالیت کمپلکس آنزیم تجزیه‌کننده آب و همچنین چرخه انتقال الکترون در درون یا اطراف فتوسیستم II مرتبط باشد (Chaves et al, 2009).

فلورسانس متغیر (F_v) که از اختلاف فلورسانس حداکثر F_m با

فتوسیستم II ناکافی باشد (Ort and Baker, 2002).

در آزمایش حاضر، اعمال تنش شوری کاهش میزان Y(II) و به دنبال آن افزایش Y(NO) را به همراه داشت (شکل ۲-A). از آنجایی که Y(II) نسبت نور استفاده شده در فرآیند فتوسنتز به کل نور جذب شده به وسیله کلروفیل مربوط به فتوسیستم II بوده و مستقیماً با سرعت آسیمیلایون CO₂ در برگ ارتباط دارد (Genty et al., 1989). این کاهش احتمالاً بیانگر کاهش فرآیند فتوسنتزی و آسیمیلایون CO₂ در اثر تنش شوری می باشد. در همین راستا، حسنی و همکاران (۱۳۹۲) کاهش پارامتر Y(II) در شرایط تنش سرما در ژنوتیپ‌های گیاه برنج را گزارش کردند. میزان فلورسانس حداقل (Fo) در اثر تلقیح بوته‌های ریحان با باکتری‌های محرک رشد کاهش نشان داد (جدول ۶). کم بودن مقدار فلورسانس حداقل نشان دهنده‌ی حفاظت مراکز فتوسیستم II می باشد. همچنین نتایج حاصله (جدول ۶) بیانگر اثر بخشی باکتری‌های افزایشنده رشد بر پارامترهای Fv، Fm، Fv/Fm، NPQ و در مقایسه با تیمار شاهد بود. از سوی دیگر تلقیح باکتری‌های افزایشنده رشد، میزان Y(II) را افزایش و در عوض Y(NQ) و Y(NO) را کاهش داد که نشانگر افزایش نسبت نور استفاده شده در فرآیند فتوشیمیایی نسبت به دو فرآیند اتلاف انرژی به صورت هدر رفت گرمایی تنظیم شده [Y(NPQ)] و تنظیم نشده [Y(NO)] و در نتیجه افزایش سرعت آسیمیلایون CO₂ می باشد (Klughammer and Schreiber, 2008; Li et al., 2008). ربیعی و همکاران (۱۳۹۱) نیز نتایج مشابهی را در خصوص تأثیر باکتری‌های افزایشنده رشد بر پارامترهای فلورسانس کلروفیل تحت تنش شوری در گیاه گشنیز ارائه کردند. باکتری‌های افزایشنده رشد در زمان وقوع تنش‌های محیطی با تولید موادی همچون اکسین، آنتی‌اکسیدان‌ها، سیتوکینین‌ها، اسانس‌ها و آنزیم ACC دامیناز به رشد گیاه و تحمل شرایط نامساعد کمک می‌کنند (Jungwook et al., 2009). هرچند مطالعات چندانی در مورد اثر باکتری‌های افزایشنده رشد بر پارامترهای فلورسانس کلروفیل انجام نشده است، ولی در مورد قارچ‌های میکوریزا که به عنوان کود زیستی مورد استفاده قرار می‌گیرند، نشان داده شده است

که کاربرد این قارچ‌ها به عنوان کود زیستی تحت تنش‌های محیطی از جمله تنش شوری و خشکی می‌تواند کارایی کواتومی فتوسیستم II را افزایش دهد. در این خصوص می‌توان به مطالعات Ruiz و همکاران (۲۰۱۱) در گیاه برنج و Zhu و همکاران (۲۰۱۲) در گیاه ذرت تحت تنش خشکی اشاره کرد.

در آزمایش حاضر علیرغم اثر مثبت کاربرد باکتری‌های افزایشنده رشد بر پارامترهای فلورسانس کلروفیل برگ ریحان، برهمکنش تیمار باکتری‌ها و تنش شوری در هیچ‌کدام از پارامترهای مورد بررسی معنی‌دار نبود که ناشی از اثر مثبت باکتری‌های افزایشنده رشد در تمام سطوح شوری مورد بررسی بدون در نظر گرفتن غلظت کلرید سدیم می‌باشد. همچنین بین دو تیمار باکتریایی مورد مطالعه، کاربرد همزمان باکتری‌های *آزوسپریلیوم*، *سودوموناس* و *باسیلوس* نسبت به کاربرد همزمان *ازتوباکتر* و *آزوسپریلیوم* به میزان بیشتری Y(II) را افزایش و Y(NPQ) و Y(NO) را کاهش داد که حاکی از اثر بهتر این باکتری‌ها در تلقیح با گیاه ریحان بود.

نتایج آزمایش نشان داد که روند تغییرات سبزیگی برگ و کلروفیل *a* در تیمار شاهد با افزایش شوری تا ۴۰ میلی‌مولار افزایشی و سپس کاهش بود (شکل ۳ و جدول ۷). کلروفیل *b* نیز در سطوح پایین و متوسط شوری افزایش و در شوری بالاتر کاهش یافت (شکل ۴-A). ولی کارتنوئید همواره روند کاهش داشت (شکل ۴-B). در سطوح پایین تنش شوری به علت فعال شدن مکانیسم‌های تحمل به تنش از قبیل کاهش سطح برگ و افزایش ضخامت آن می‌تواند باعث افزایش کلروفیل در واحد سطح برگ شود (Rajcan et al., 1999). در همین راستا، پژوهشگران افزایش مقدار کلروفیل در اثر تنش ملایم را به افزایش وزن مخصوص برگ نسبت داده و بیان داشتند که در ادامه و با افزایش بیش از حد تنش و اثرات سوء آن بر ساختار کلروفیل و در نتیجه تخریب کلروپلاست، میزان کلروفیل کاهش می‌یابد (Cramer, 2002; Masojidek et al., 1991). Koyro (۲۰۰۰) نیز با تأکید بر اینکه منیزیم یک عنصر ضروری برای ساخت کلروفیل است، کاهش غلظت کلروفیل را با کاهش جذب منیزیم در اثر تنش شوری مرتبط دانست.

موجب کاهش آسیب‌های اکسیداتیو ایجاد شده توسط شوری و در نتیجه کاهش نشت الکترولیت می‌شود. جلوگیری از پراکسیداسیون غشاء توسط تیمارهای همزیستی به پایداری غشاء کمک کرده و با حفاظت از کلروفیل از کاهش عملکرد فتوسنتزی تحت تنش شوری جلوگیری می‌کند (عموآقایی و نیک‌اندیش، ۱۳۹۴). در پژوهش حاضر نیز چه در شدت‌های متفاوت تنش شوری و چه شرایط بهینه رشدی، استفاده از باکتری‌های افزایش‌دهنده رشد موجب افزایش RWC و تعدیل آسیب‌های غشایی شده و نشت الکترولیت را کاهش داد. بعلاوه، این میکروارگانیسم‌ها با بهبود سبزیگی برگ و غلظت کلروفیل، کارایی کوانتومی فتوسیستم II را نیز در سطوح مختلف شوری ارتقاء بخشید. عموآقایی و نیک‌اندیش (۱۳۹۴) نیز طی آزمایشی روی دو واریته یونجه نتایج مشابهی را در کاربرد باکتری‌های محرک رشد سینوریزوبیوم و باسیلوس تحت تنش شوری گزارش نمودند.

نتیجه‌گیری کلی:

در مجموع نتایج نشان داد که تنش شوری با آسیب به سیستم فتوسنتزی گیاه ریحان و تخریب رنگیزه‌های فتوسنتزی آن، حساسیت بیشتر پارامترهای فلورسانس کلروفیل برگ را در پی دارد. از سوی دیگر، کاربرد باکتری‌های افزایش‌دهنده رشد به‌ویژه کاربرد همزمان باکتری‌های *آزوسپریلیوم*، *سودوموناس* و *باسیلوس* چه در شرایط مطلوب رشدی و چه در سطوح مختلف شوری باعث تعدیل اثر تخریبی شوری و در نتیجه بهبود سیستم فتوسنتزی و وضعیت فیزیولوژیکی گیاه شد، که در نهایت می‌تواند باعث افزایش تحمل گیاه به تنش شوری و همچنین افزایش عملکرد آن در مناطقی با خاک یا آب شور شود.

سپاسگزاری:

بدین وسیله از مساعدت‌های پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری در فراهم نمودن امکانات اندازه‌گیری فلورسانس کلروفیل تشکر و قدردانی می‌شود.

افزایش تنش شوری محتوای نسبی آب برگ را کاهش داد (شکل ۴- C)، ولی روند تغییرات نشت الکترولیت نسبت به افزایش تنش شوری به‌صورت کاملاً افزایشی بوده و بیشترین شیب افزایش نیز در سطوح پایین تنش مشاهده شد (شکل ۱- D). در طی تنش شوری به‌علت کاهش پتانسیل آب و جذب بالای یون‌های سدیم و کلر و اثر آنها بر فرآیندهایی مانند سنتز دیواره سلولی، سرعت طویل شدن سلول‌ها و تورژسانس کاهش یافته، دیواره‌ی سلول‌ها سخت و ضخیم می‌گردند (Fricke and Peter, 2002). کاهش RWC در اثر افزایش تنش شوری در گیاهانی چون تربچه (Yildirim *et al.*, 2008) و بزرک (Nasir Khan, 2007) نیز گزارش شده است. نشت الکترولیت به عنوان شاخص پایداری غشاء تحت تنش شوری افزایش می‌یابد، چراکه تنش‌های محیطی از طریق افزایش تولید گونه‌های اکسیژن فعال در داخل سلول، موجب پراکسیداسیون لپیدی و کاهش پایداری غشاء و در نتیجه نشت مواد سیتوپلاسمی از آن شده و افزایش نسبت هدایت الکتریکی را به دنبال دارد (Manchanda and Garg, 2008). از سوی دیگر گونه‌های اکسیژن فعال باعث ناپایداری غشای تیلاکوئیدی و در نتیجه آسیب به کلروفیل می‌شوند (عموآقایی و نیک‌اندیش، ۱۳۹۴) افزایش نشت الکترولیت در اثر شوری در گیاهانی چون گندم (Farooq and Azam, 2006) و تاج‌خروس (Battacharjee and Mukherjee, 1996) گزارش شده است.

نتایج ارائه شده در پژوهش حاضر نشان می‌دهد که پیش‌تیمار زیستی بذر باعث بهبود سبزیگی برگ و غلظت کلروفیل a شد (شکل ۳ و جدول ۷). همچنین افزایش RWC و کاهش نشت الکترولیت را در برگ‌های گیاه ریحان به دنبال داشت (شکل ۵). Ashraf و همکاران (۲۰۰۴) بیان داشتند که بعضی از باکتری‌های PGPR اگزوبلی ساکاریدهایی را تولید می‌کنند که با کاتیون‌هایی چون Na^+ پیوند برقرار کرده و باعث کاهش تجمع سدیم و اثرات منفی ناشی از آن در سلول شده و در نتیجه با کاهش اثرات منفی شوری باعث جلوگیری از تخریب غشاء سلولی و نهایتاً سبب افزایش تحمل گیاه به شرایط تنش شوری می‌شود. از این‌رو، به‌نظر می‌رسد همزیستی باکتریایی

منابع:

- امید بیگی، ر. (۱۳۸۸) تولید و فرآوری گیاهان دارویی. آستان قدس رضوی. جلد دوم. ۴۳۸ صفحه.
- بهراری ساروی، ح. و پیردشتی، ه. ا. (۱۳۹۱) ارزیابی کاربرد باکتری‌های محرک رشد گیاه (PGPR) و حل‌کننده فسفات (PSM) بر عملکرد و اجزای عملکرد گندم (N_{80}) در سطوح مختلف نیتروژن و فسفر در شرایط گلخانه. نشریه پژوهش‌های زراعی ایران. ۱۰: ۶۸۹-۶۸۱.
- حسینی، ز. پیردشتی، ه. ا. یعقوبیان، ی. و نوری، م. ز. (۱۳۹۲) کاربرد تکنیک فلورسانس کلروفیل برای شناسایی ژنوتیپ‌های متحمل به سرمای هوا و آب در گیاه برنج (*Oryza sativa* L.). مجله سلول و بافت. ۵ (۲): ۱۹۵-۲۰۶.
- جنابیان، م. پیردشتی، ه. ا. یعقوبیان، ی. (۱۳۹۴) اثر شدت تابش بر تحمل به سرمای سویا [*Glycine max* (L.) Merr.] با استفاده از روش فلورسانس کلروفیل. مجله فرآیند و کارکرد گیاهی. ۴: ۱۵۲-۱۴۱.
- حیدری، م. مصری، ف. و کیخا، ز. (۱۳۸۹) اثر تنش شوری بر متابولیسم اسیدهای نوکلئیک، فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان، فلورسانس کلروفیل و تنظیم‌کننده‌های اسمزی پنج رقم کلزا. مجله علوم گیاهان زراعی ایران. ۴۱ (۳): ۵۰۲-۴۹۱.
- ربیعی، ز. پیردشتی، ه. ا. راهداری، پ. حسینی، ج. و یعقوبی، م. (۱۳۹۱) تأثیر باکتری‌های محرک رشد در پارامترهای فلورسانس کلروفیل در گیاه گشنیز (*Coriandrum sativum*) تحت تنش شوری. اولین همایش ملی تنش‌های محیطی. دانشگاه اصفهان. ایران. صفحات ۱۹۱-۱۸۶.
- صفاری، ر. مقصودی مود، ع. ا. و صفاری و. ر. (۱۳۹۲) اثر تنش شوری بر فلورسانس کلروفیل و عملکرد دانه برخی ارقام آفتابگردان (*Helianthus annuus* L.). مجله به زراعی نهال و بذر. ۹: ۱۳۰-۱۰۹.
- عیسوند، ح. ر. دوستی، ا. مجنون حسینی، ن. و پوربابایی، ا. ع. (۱۳۹۳) تأثیر باکتری‌های محرک رشد و پیری بذر بر عملکرد و اجزای عملکرد دانه لوبیا چیتی. نشریه علوم گیاهان زراعی ایران. ۴۵: ۲۸۵-۲۷۷.
- عشقی‌زاده، ح. ر. و احسان‌زاده، پ. (۱۳۸۸). تاثیر رژیم‌های مختلف آبیاری بر چند ژنوتیپ ذرت: I فلورسانس کلروفیل، خصوصیات رشد و عملکرد دانه. علوم گیاهان زراعی ایران. ۴۰: ۱۴۴-۱۳۵.
- عموآقایی، ر. و نیک‌اندیش، ف. (۱۳۹۴). اثر تلقیح ریشه دو رقم یونجه (*Medicago sativa*) با جدایه‌هایی از گونه‌های سینوریزوبیوم و باسیلوس بر رشد، مقدار کلروفیل و تمامیت غشای سلول در شرایط تنش شوری. مجله پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست‌شناسی ایران). ۲۸: ۱۵۲-۱۴۰.
- یعقوبیان، ی. پیردشتی، ه. ا. گل‌تپه، م. ا. اسفندیاری، ا. و فیضی‌اصل، و (۱۳۹۱). اثر همزیستی میکوریزایی بر کارایی کوانتومی فتوسیستم II تحت تنش رطوبتی در گندم. دوازدهمین کنگره علوم زراعت و اصلاح نباتات ایران. دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج. ایران. صفحات ۲۲۳-۲۱۹.
- Ali Dib, T., Monneveux, P. H., Acevedo, E. and Nachit, M. M. (1994) Evaluation of proline analysis chlorophyll fluorescence quenching measurements as drought tolerance indicator in durum wheat (*Triticum turgichum* L.). *Euphytica* 79: 65-67.
- Ashraf, M., Berge S. H. and Mahmood O. T. (2004) Inoculating wheat seedling with exopolysaccharide producing bacteria restricts sodium uptake and stimulates plant growth under salt stress. *Biology and Fertility of Soils* 40: 157-162.
- Ashraf, M. (2001) Relationship between growth and gas exchange characteristics in some salt tolerant amphidiploid Brassica species in relation to their diploid parents. *Environmental and Experimental Botany* 45: 155-163.
- Atlasi Pak, V., Nabipour, M. and Meskarbashee, M. (2009) Effect of salt stress on chlorophyll content, fluorescence, Na and K ions content in rape plants (*Brassica napus* L.). *Asian Journal of Agricultural Research* 3: 28-37.
- Baker, N. R. (2008) Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. *Annual Review of Plant Biology* 59: 89-113.

- Battacharjee, S. and Mukherjee, A. K. (1996) Ethylene evolution and membrane lipid peroxidation as indicators of salt injury in leaf tissues of *Amaranthus* seedlings. *Indian Journal Experimental Biology*. 34: 279–281.
- Bhardway, R. and Singhal, G. (1981) Effect of water stress on photo chemical activity of chloroplasts during greening etiolated barley seed ling. *Plant and Cell Physiology* 22: 155-162.
- Chang, P. C. (2007) The use of plant growth- promoting rhizobacteria (PGPR) and an arbuscular mycorrhiza fungus (AMF) to improve plant growth in saline soil for phytoremediation. A thesis presented to the University of Science in Biology, Ontario, Canada. 153p.
- Cha-Um, S., Supaibulwattana, K. and Kirdmanee, C. (2009) Comparative effect of salt stress and extreme pH stress combined on glycinebetaine accumulation, photosynthetic abilities and growth characters of two rice genotypes. *Rice Science* 16: 247-282.
- Chaves, M., Flaxes, J. and Pinheiro, C. (2009) Photosynthesis under drought and salt stress regulation mechanism from whole plant to cell. *Annals of Botany* 103: 551-556.
- Cramer, G.R. (2002) Response of abscisic acid mutant of *Arabidopsis* to salinity. *Functional Plant Biology* 29: 561-567.
- Farooq S. and Azam, F. (2006) The use of cell membrane stability (CMS) technique to screen for salt tolerant wheat varieties. *Journal of Plant Physiology* 163: 629-637.
- Fricke, W. and Peter, W.S. (2002) The biophysics of leaf growth in salt-stressed barley. A Study at the cell level. *Plant Physiology* 129: 374–388.
- Genty, B., Briantais, J. M. and Baker, N. R. (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and photochemical quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta* 990: 87–92.
- Grafts-Brander, S. J. and Salvucci, M. E. (2002) Sensitivity of photosynthesis in a C₄ plant, maize, to heat stress. *Plant Physiology* 129: 1773-1780.
- Hall, A. E. (2001) Crop responses to environmental stresses. 232p.
- Jungwook Yang, J., Kloepper, W. and Choong- Min, R. (2009) Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends in Plant Science* 14: 118-123.
- Klughammer, C. and Schreiber, U. (2008) Complementary PSII quantum yields calculated from simple fluorescence parameters measured by PAM fluorometry and the saturation pulse method. *PAM Application Notes* 1: 27-35.
- Koyro, H.W. (2000) Effect of high NaCl-salinity on plant growth, leaf morphology and ion composition in leaf tissues of *Beta vulgaris* ssp. *Maritima*. *Angewandte Botanik* 74: 67-73.
- Lazar, D. (1999) Chlorophyll *a* fluorescence induction. *Biochimica et Biophysica Acta* 1412: 1–28.
- Li, G. M., Liu, B. B., Wu, Y. and Zou, Z. R. (2008) Interactive effects of drought stresses and elevated CO₂ concentration on photochemistry efficiency of cucumber seedlings. *Journal Integrative Plant Biology* 50(10): 1307-1317.
- Lichtenthaler, H. K. (1994) Chlorophylls and carotenoid pigments of photosynthetic Biol. Membrane. *Method in Enzymology* 148: 350-382.
- Manchanda, G. and Garg, N. (2008) Salinity and its effects on the functional biology of legumes. *Acta Physiologia Plantarum* 30: 595-618.
- Marschner, H. (1995) Mineral nutrition of higher plant. 2nd Academic Press. Ltd. London.
- Masojidek, J., Trivedi, S., Halshaw, L., Alexiou, A. and Hall, D.O. (1991) The synergetic effect of drought and light stress in sorghum and pearl millet. *Plant Physiology* 96: 198-207.
- Maxwell, K. and Johnson, G. N. (2005) Chlorophyll fluorescence-a practical guide. *Journal of Experimental Botany* 51: 659-668.
- Mehta, P., Jajoo, A., Mathur, S. and Bharti, S. (2010) Chlorophyll *a* fluorescence study revealing effects of high salt stress on Photosystem II in wheat leaves. *Plant Physiology and Biochemistry* 48:16-20.
- Moradi, F. and Ismaeil M. (2007) Responses of photosynthesis, chlorophyll fluorescence and ROS-scavenging systems to salt stress during seedling and reproductive stages in rice. *Annals of Botany* 99: 1161-1173.
- Munnas, R. (2002) Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environment* 28: 239-250.
- Nasir Khan, M., Siddiqui, M. H., Mohammad, F., Mansoor, M., Khan, A. and Naeem, M. (2007) Salinity induced changes in growth, enzyme activities, photosynthesis, prolin accumulation and yield in linseed genotypes. *World Journal of Agricultural Sciences* 5: 685-695.
- Ort, D. R. and Baker, N. R. (2002) A photoprotective role for O₂ as an alternative electron sink in photosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 193–198.
- Rajcan, I., Dwyer, L.M. and Tollenaar, M. (1999) Note on relationship between leaf soluble carbohydrate and chlorophyll concentration in maize during leaf senescence. *Field Crops Research* 63: 13-17.
- Ruiz-Sanchez, M., Aremada, E., Munoz, Y. and Aroca, R. (2011) *Azospirillum* and *arbuscular* mycorrhizal colonization enhanced rice growth and physiological traits under well-watered and drought conditions. *Journal of Plant Physiology* 168: 1031-1037.

- Schonfeld, M. A., Johnson, R. C., Carver, B. and Morhinweg, D. W. (1988) Water relation in winter wheat as drought resistance indicator. *Crop Science* 28: 526-531.
- Teutonica, R. A., Palta, J. P. and Osborn, T.C. (1993) In vitro freezing tolerance in relation to winter survival of rapeseed cultivars. *Crop Science* 33: 103-107.
- Xia, A., Li, Y. and Zou, D (2004) Effects of salinity stress on PSII in *Ulva lactuca* as probed by chlorophyll fluorescence measurements. *Aquatic Botany* 8: 129-137.
- Yaghoubian, Y., Siadat, S. A., Moradi Telavat, M. R., Pirdashti, H. (2016). Quantify the response of purslane plant growth, photosynthesis pigments and photosystem II photochemistry to cadmium concentration gradients in the soil. *Russian Journal of Plant Physiology* 63: 1-8.
- Yaman, K., Kawasaki, M., Taniguchi, M. and Miyake, H. (2008) Correlation between chloroplast ultrastructure and chlorophyll fluorescence characteristics in the leaves of rice (*Oryza sativa* L.) grown under salinity. *Plant Production Science* 11: 139 - 145.
- Yildirim, E., Turan, M., Donmez, M.F. (2008) Mitigation of salt stress in radish (*Raphanus Sativus* L.) by plant growth promoting rhizobacteria. *Romanian Biotechnological Letters* 13: 3933-3943
- Zhu, X. C., Song, F. B. and Liu, S. Q. (2012) Arbuscular mycorrhizae improves photosynthesis and water status of *Zea mays* L. under drought stress. *Plant, Soil and Environment* 58: 186-191.
- Zlatev, Z. (2009) Drought-induced changes in chlorophyll fluorescence of young wheat plants. *Biotechnology and Biotechnological Equipment* 23: 438-441.
- Zlatev, Z. and Yordanov, T. (2004) Effect of soil drought on photosynthesis and chlorophyll fluorescence in bean plants. *Bulgarian Journal of Plant Physiology* 30: 3-18.